



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бојана С. Стојановић

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

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Марија Миловановић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. године

ИНДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Бојана С. Стојановић	
Датум и место рођења: 12.04.1988. Призрен	
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Патолошка физиологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Утицај галектина-3 на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код мишева инфицираних <i>Cytomegalovirus</i> -ом	
Број страница: 247	
Број слика: 11 слика, 35 графикона, 5 шема	
Број библиографских података: 300	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Медицина	
Ментор: др сци. мед. Марија Миловановић, ванредни професор	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 13.05.2016.	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-834/21 од 13.09.2016.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор - емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан3. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор - емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета	

Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

3. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Дефицијенција галектина-3 (Gal-3) је удружена са атенуацијом експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ) код C57BL/6 мишева. Инфекција мишјим цитомегаловирусом (MCMV од енг. *Murine Cytomegalovirus*) прекида резистенцију BALB/c мишева на индукцију ЕАЕ. У овој студији је показано да одсуство Gal-3 утиче на имунски одговор на MCMV и да претходна инфекција MCMV-ом прекида атенуацију ЕАЕ код Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева (Gal-3 KO). Клиничке и хистолошке карактеристике ЕАЕ који развијају Gal-3 KO мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ након инфекције цитомегаловирусом су сличне оним које развијају неинфицирани имунизовани C57BL/6 WT мишеви. У инфилтратима централног нервног система (ЦНС) Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ после инфекције MCMV-ом уочена је већа заступљеност инфламацијских CD8⁺ ћелија него инфламацијских CD4⁺ ћелија. Дефицијенција Gal-3 је удружена са повећањем процента класично активираних макрофага у мозгу мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ након инфекције MCMV-ом. Одсуство Gal-3 повећава проценат инфламацијских ефекторско-меморијских (IFN- γ +CD4+CD28⁻) лимфоцита у периферној крви и инфламацијских NK и NKT ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Gal-3 KO мишеви развијају тежи хепатитис након инфекције MCMV-ом са више запаљенских и некротичких фокуса, израженијом апоптозом и некроптозом хепатоцита и већом репликацијом вируса. Већем оштећењу јетре код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом не доприноси активност NK ћелија. Већа експресија TNF- α у хепатоцитима инфицираних Gal-3 KO мишева, удружена са већом апоптозом ових ћелија уз смањење инфламације и апоптозе хепатоцита код мишева код којих је блокиран TNF- α указује да TNF- α игра улогу у већем оштећењу јетре Gal-3 KO мишева изазваном инфекцијом MCMV-ом. Примена рекомбинантног Gal-3 смањује инфламацију и некрозу хепатоцита у јетри инфицираних Gal-3 KO мишева. Примена инхибитора галектина-3 значајно повећава некрозу јетре WT мишева након инфекције MCMV-ом. Резултати ове студије указују да Gal-3 модулише имунски одговор на MCMV и тако смањује оштећење ткива изазвано вирусном инфекцијом и развој аутоимунске неуроинфламације.

ABSTRACT

Galectin-3 (Gal-3) deficiency is accompanied with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) attenuation in C57BL/6 mice. Murine cytomegalovirus infection (MCMV) abrogates resistance of BALB/c mice to EAE induction. Here, we have provided the evidence that Gal-3 deficiency affects immune response to MCMV and abrogates attenuation of EAE in Gal-3 deficient mice (Gal-3 KO). Gal-3 KO mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ after MCMV infection develop clinical and histological signs similar to those seen in uninfected immunized C57BL/6 WT mice. Larger proportion of inflammatory CD8⁺ cells than inflammatory CD4⁺ cells is detected in the CNS infiltrates of Gal-3 KO mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ after MCMV infection. Gal-3 deficiency favors classical activation of macrophages in CNS after MOG₃₅₋₅₅ immunization. Gal-3 deficiency also increases percentage of inflammatory effector-memory (IFN- γ +CD4+CD28⁻) cells in peripheral blood and inflammatory NK and NKT cells in spleen of MCMV infected mice. Enhanced hepatitis manifested by more inflammatory and necrotic foci, enhanced apoptosis and necroptosis of hepatocytes and enhanced viral replication were detected in MCMV-infected Gal-3 deficient mice. NK cells do not contribute to more severe liver damage in MCMV-infected Gal-3 KO mice. Enhanced expression of TNF- α in the hepatocytes of Gal-3 KO mice after MCMV infection, abrogated hepatocyte death, and attenuated inflammation in the livers of Gal-3 KO mice after TNF- α blockade suggest that TNF- α plays the role in enhanced disease in Gal-3 deficient animals. Treatment with recombinant Gal-3 reduces inflammation and especially necrosis of hepatocytes in the livers of MCMV-infected Gal-3 KO mice. Treatment with Gal-3 inhibitor significantly enhances liver necrosis in MCMV infected WT mice. Our results indicate that Gal-3 modulates immune response to MCMV and thus attenuates tissue damage induced by viral infection and development of autoimmune neuroinflammation.

ЗАХВАЛНИЦА

За несебично пружену помоћ и подршку у изради докторске дисертације велику захвалност дугујем ментору проф.др Марији Миловановић, проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Миодрагу Л. Лукићу.

Посебну захвалност дугујем мом тиму, др Александру Арсенијевићу и др Јелени Миловановић као и лабораторијским сарадницима из Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Хвала мојој породици на огромној љубави и подршци.

Садржај

1. УВОД	11
1.1. Цитомегаловирус.....	11
1.1.1. Мишји цитомегаловирус (енгл. <i>Murine Cytomegalovirus</i> , MCMV).....	13
1.1.2. Имуни одговор на цитомегаловирус.....	14
1.1.3. Модулација имуноског одговора цитомегаловирусом	17
1.2. Класификација и структура галектинских молекула.....	17
1.2.1. Структура галектина-3	19
1.2.2. Биолошке функције галектина-3.....	19
1.2.3. Улога галектина-3 у регулисању имуноског одговора	20
1.2.4. Улога галектина-3 у инфекцији и акутној и хроничној инфламацији.....	22
1.2.5. Експресија галектина-3 у централном нервном систему.....	23
1.3. Мултипла склероза.....	24
1.3.1. Имунопатогенеза мултипле склерозе	25
1.3.2. Улога CMV у патогенези мултипле склерозе и ЕАЕ	27
1.4. Имуни одговор на CMV у јетри	29
2. ЦИЉ РАДА.....	31
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	32
3.1. Експерименталне животиње	32
3.1.1. Начин добијања C57BL/6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3....	32
3.2. Индукција хепатитиса изазваног WT MCMV-ом	33
3.3. Инфекција вирусом и индукција ЕАЕ.....	33
3.4. Праћење клиничког тока ЕАЕ.....	34
3.5. Апликација инхибитора Gal-3 (Gal-3 INH).....	34
3.6. Апликација рекомбинатног Gal-3.....	34
3.7. Третман инфликсимабом.....	35
3.8. Патохистолошка анализа ткива кичмене мождине, мозга и јетре.....	35
3.8.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	35
3.9. Процена хистолошког скорa	36
3.10. Биохемијска анализа оштећења јетре.....	36
3.11. Одређивање концентрација цитокина у серуму	37

3.12. Изолација моноклеарних ћелија из јетре.....	37
3.13. Изолација моноклеарних ћелија из слезине.....	38
3.14. Изолација леукоцита из ЦНС-а.....	38
3.15. Анализа популација моноклеарних ћелија јетре, слезине, мозга и кичмене мождине методом проточне цитометрије.....	39
3.15.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера.....	39
3.15.2. Интрацелуларно бојење цитокина.....	39
3.15.3. Стимулација ћелија.....	40
3.15.4. Бојење површинских антигена.....	40
3.15.5. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране.....	40
3.15.6. Бојење интрацелуларних цитокина.....	40
3.16. Изолација мишићних хепатоцита.....	41
3.16.1. <i>Annexin V</i> бојење и детекција експресије калретикулина на површини хепатоцита.....	41
3.17. Имунохистохемија мишићних узорака јетре.....	41
3.18. Бојење мишићних узорака јетре TUNEL методом.....	42
3.19. Статистичка обрада података.....	43
4. РЕЗУЛТАТИ.....	44
4.1. МСМV инфекција прекида атенуацију ЕАЕ-а код Gal-3 КО мишева.....	44
4.2. Претходна МСМV инфекција смањује проценат и број проинфламацијских CD4+ лимфоцита у мозгу Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом MOG ₃₅₋₅₅	47
4.3. МСМV инфекција пре имунизације пептидом MOG ₃₅₋₅₅ повећава проценат и број проинфламацијских CD8+ лимфоцита у мозгу у одсуству галектина-3.....	49
4.4. Инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG ₃₅₋₅₅ утиче на повећање процента CD86+ ћелија у популацији макрофага у ЦНС-у Gal-3 КО мишева и процента CD206+ ћелија у популацији макрофага у ЦНС-у WT мишева.....	52
4.5. Инфекција МСМV-ом изазива експанзију инфламацијских CD4+CD28- лимфоцита у периферној крви Gal-3 КО мишева.....	53
4.6. У одсуству галектина-3 успорава се пораст процента НК ћелија и IFN- γ позитивних ћелија у популацији НК ћелија у слезини изазван инфекцијом мишићим цитомегаловирусом.....	54
4.7. Одсуство галектина-3 успорава пораст процента НКТ ћелија и процента IFN- γ позитивних ћелија у популацији НКТ ћелија у слезини изазван инфекцијом мишићим цитомегаловирусом.....	57

4.8. Дефицијенција галектина-3 је удружена са мањим процентом инфламацијских CD11b ⁺ ћелија у слезини мишева инфицираних мишијим цитомегаловирусом.....	60
4.9. Дефицијенција галектина-3 је удружена са тежом формом хепатитиса који је изазван МСМV вирусом.....	63
4.10. Gal-3 КО мишеви инфицирани МСМV-ом имају више апоптотских хепатоцита ..	67
4.11. Инфекција МСМV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима.....	70
4.12. Тежа болест код Gal-3 КО мишева је независна од активности NK ћелија	71
4.13. У јетри Gal-3 КО мишева је присутно више вирусом инфицираних ћелија	75
4.14. Експресија TNF- α у хепатоцитима је повећана код Gal-3 КО мишева инфицираних МСМV-ом	76
4.15. Дефицијенција гена за галектин-3 не утиче на заступљеност дендритских ћелија и макрофага који садрже TNF- α , а смањује проценат ових ћелија које садрже IL-10 у јетри инфицираних мишева	79
4.16. Инхибиција везивања TNF- α ублажава хепатитис индукован МСМV-ом.....	82
4.20. Егзогени галектин-3 ублажава оштећење јетре које је изазвано МСМV-ом	85
4.21. Инхибитор галектина-3 (Gal-3INH) значајно повећава некрозу јетре код WT мишева након инфекције МСМV-ом	88
5. ДИСКУСИЈА.....	91
5.1. МСМV инфекција погоршава ЕАЕ-а код Gal-3 КО мишева	91
5.2. Претходна МСМV инфекција смањује заступљеност проинфламацијских CD4 ⁺ Т лимфоцита у мозгу WT и Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом MOG ₃₅₋₅₅	92
5.3. МСМV инфекција пре имунизације пептидом MOG ₃₅₋₅₅ повећава заступљеност проинфламацијских CD8 ⁺ Т лимфоцита у мозгу Gal-3 дефицијентних мишева	94
5.4. Инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG ₃₅₋₅₅ утиче на повећање процента класично активираних макрофага у ЦНС-у Gal-3 КО мишева.....	95
5.5. Инфекција МСМV-ом изазива експанзију инфламацијских CD4 ⁺ CD28 ⁻ лимфоцита у периферној крви Gal-3 КО мишева	95
5.6. Галектин-3 игра протективну улогу у оштећењу јетре изазваном инфекцијом цитомегаловирусом.....	96
5.7. Повећана инфламација и слабија контрола вирусне инфекције у јетри Gal-3 КО мишева је независна од активности NK ћелија.....	98
5.8. Експресија TNF- α у хепатоцитима је повећана код Gal-3 КО мишева инфицираних МСМV-ом	99
5.9. Инфекција МСМV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима.....	100
5.10. Gal-3 КО мишеви инфицирани МСМV-ом имају више апоптотских хепатоцита	100
6. ЗАКЉУЧЦИ	102

7. РЕФЕРЕНЦЕ	105
8. БИОГРАФИЈА.....	123
9. БИБЛИОГРАФИЈА.....	124
10. ПРИЛОГ.....	128
10.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	128
10.2 KEY WORDS DOCUMENTATION	132
10.3. <i>Образац 1</i>	135
10.4. <i>Образац 2</i>	136
10.5. Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације.....	138

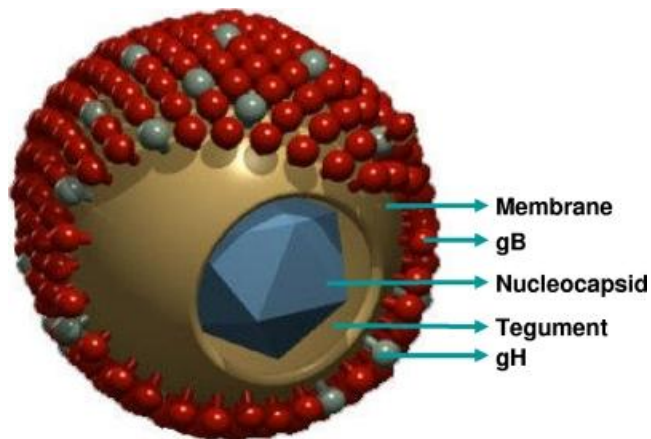
1. УВОД

1.1. Цитомегаловирус

Цитомегаловирус (енгл. *Cytomegalovirus*, CMV) је стриктно *species* специфични вирус који припада фамилији *Herpesviridae*, субфамилији *β -Herpesvirinae*. Иако су интрануклеарне инклузије типичне за инфекцију цитомегаловирусом уочене још 1881. године, хумани и мишји тип CMV-а су независно изоловани тек 1956. и 1957. године (1). Хумани цитомегаловирус (енгл. *Human Cytomegalovirus*, HCMV) је убиквитарни вирус, спада у групу најраспрострањенијих хуманих вируса који код имунокомпетентних особа изазива углавном асимптоматске инфекције, док у стањима имунодефицијенције, после трансплантација, код оболелих од AIDS-а, изазива тешке облике болести чак и смрт (2, 3). HCMV се преноси директним контактом са телесним течностима инфициране особе и примарна инфекција се најчешће догађа у детињству (4). Преноси се и трансплацентарно и може изазвати озбиљно оштећење централног нервног система са развојем тешких неуролошких поремећаја попут глувоће, микроцефалије, менталне ретардације и епилепсије (5). HCMV инфицира велики број ћелија, међу њима и фибробласте, макрофаге, ћелије глатке мускулатуре, епителне и ендотелне ћелије (1). Као и сви остали херпес вируси, након примарне инфекције и литичке репликације, CMV успоставља доживотну латенцију, са фазама реактивације и секреције вируса (6).

Величина цитомегаловируса је око 200 nm. CMV садржи четири компонентне: језгро, капсид, тегумент и омотач (Шема 1). У језгру се налази дволанчана линеарна ДНК дужине 220 kbp, са капацитетом кодирања око 100 протеина. Протеински омотач, капсид, окружује језгро и заједно граде нуклеокапсид (7). Капсид је окружен тегументом који садржи неколико протеина који учествују у склапању вириона и успостављању продуктивне инфекције у новој ћелији. Током инфекције ови протеини ремете одбрамбене механизме домаћина и помажу у активацији експресије вирусних гена (8). Последња компонента вириона херпес вируса је омотач, чија двослојна липопротеинска мембрана потиче од нуклеарне и ћелијске мембране инфицираних ћелија домаћина. Омотач вируса садржи неколико вирусних гликопротеина од којих су неки, као што су gB и gH, кључни за улазак вируса у ћелије (9).

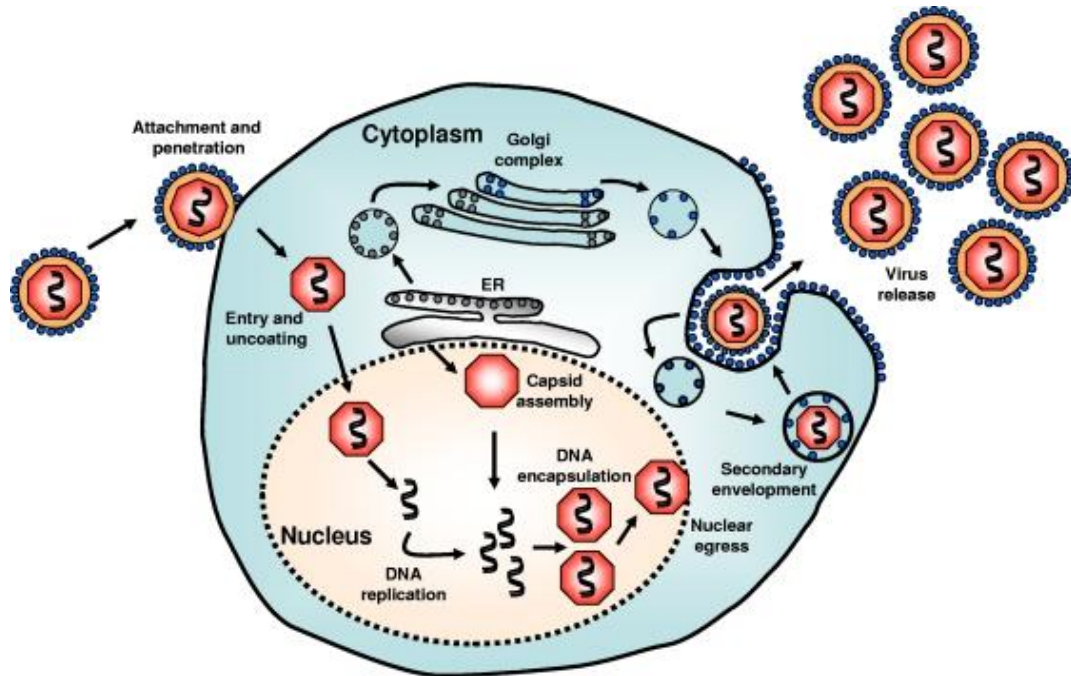
Шема 1.



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

Интеракцијом вирусних гликопротеинских комплекса са протеогликанским комплексима на ћелијској мембрани ћелија домаћина остварује се почетна интеракција вируса са ћелијом. CMV се затим везује за специфичније рецепторе, као што је рецептор за епителни фактор раста преко гликопротеина gB који је кодиран вирусним генима (10). Гликопротеин gB у омотачу вируса олакшава фузију вируса са ћелијском мембраном, депонујући тегумент и нуклеокапсид у ћелијску цитоплазму (11, 12). Након уласка у ћелију, вирусни нуклеокапсид мигрира у једро акцијом система микротубула, где се вирусни геном репликује и формира се нуклеокапсид. Нуклеокапсид излази из једра пролази кроз секреторни систем где се комплетирају вириони (13). Процеси уласка вируса у ћелију, репликација и излазак новонасталих вируса из ћелије су приказани на Шеми 2. Циклус репликације HCMV је дуг, тако да се након продукције неколико хиљада копија вирусног генома по инфицираној ћелији, 24 до 48 сати после продора у ћелију, ослобађају нови вируси. После репликације вирус се дисеминује и инфицира ткива и органе према којима CMV показује тропизам, епителне ћелије бубрежних тубула, дуктуса пљувачних жлезди, жучне кесе, јетре и других органа и на овај начин се омогућава излучивање вируса путем телесних течности (14).

Шема 2.



Шема 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.*

Након примарне инфекције, цитомегаловирус успоставља латентну инфекцију у моноцитима и мијелоидним прекурсорским CD34+ ћелијама костне сржи (15). Након диференцијације моноцита у ткивне макрофаге цитомегаловирус се реактивира, започиње интензивна репликација генома и дисеминација вируса (16). Диференцијацијом ћелија у којима је присутан цитомегаловирус омогућава се дисеминација вируса (17).

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

Мишји CMV (MCMV) је вирус који има изразите сличности са хуманих цитомегаловирусом (18). Геном ових вируса има сличну организацију, инфицирају сличне ћелије и изазивају идентичне патолошке промене (19). Патогенезе болести које изазивају MCMV и HCMV су сличне. Успостављају доживотну латенцију, а болест може да се развија и после реактивације латентне инфекције (18). Због ових сличности MCMV се користи као модел за проучавање патогенезе болести коју изазива хумани цитомегаловирус.

1.1.2. Имуни одговор на цитомегаловирус

Механизми урођене и стечене имуности играју кључну улогу у контроли CMV инфекције (Шема 3). Акутна инфекција C57BL/6 мишева MCMV-ом за последицу има рану продукцију инфламацијских цитокина интерферона, IL-12 и TNF- α . Максимална продукција ових цитокина се достиже 2-3 дана после инфекције, а продукција свих наведених цитокина изузев IFN- γ независна је од NK ћелија и Т лимфоцита (20). Стимулација TLR3 и TLR9 (енгл. *Toll-like Receptor*) рецептора дендритских ћелија молекулским обрасцима цитомегаловируса активира сигналне путеве што резултује секрецијом проинфламацијских цитокина који регрутују друге ћелије урођене имуности и повећањем експресије костимулаторних молекула CD80 и CD86, важних за активацију целуларне имуности (21, 22). Дендритске ћелије активирају специфичне CD8+ Т лимфоците у акутној фази инфекције. Цитомегаловирус може и да поремети ову функцију дендритских ћелија јер вирус директно смањује експресију CD80, CD86 и MHC молекула I класе (23). IFN тип I директно утиче на способност репликације вируса иницијацијом механизма који инхибирају синтезу протеина или оштећују вирусну РНК. Мишеви са делецијом гена за IFN- α/β рецептор у поређењу са WT мишевима имају већи титар вируса после MCMV инфекције (24). Поред поремећаја у вирусној репликацији, IFN тип I подстиче сазревање ћелија које презентују антиген и тако омогућава активацију специфичних CD8+ Т лимфоцита (25). CD8+ Т лимфоцити експримирају IFN α/β рецептор, тако да IFN тип I може и директно да утиче на активацију антиген-специфичних CD8+ Т лимфоцита (26).

Ћелије инфициране HCMV-ом продукују хемокин CCL2/MCP-1 који делује хемоатрактанто на моноците што олакшава успостављање латенције али и дисеминације вируса (27). MCMV садржи ген који кодира MCK-2 хемокин који има аналогну функцију као CCL2, регрутује мијеломоноците чиме се подстиче успостављање латенције и дисеминација вируса (28).

Компоненте урођене имуности која играју кључну улогу у контроли и клиренсу експерименталне MCMV инфекције су NK ћелије (29). Већи титри вируса у свим органима и већа стопа смртности *beige* мишева инфицираних MCMV-ом уз смањење смртности и клиренса вируса код ових мишева којим је урађен трансфер NK ћелија из WT мишева, доказују значај NK ћелија у контроли MCMV инфекције (30). Улога NK ћелија у

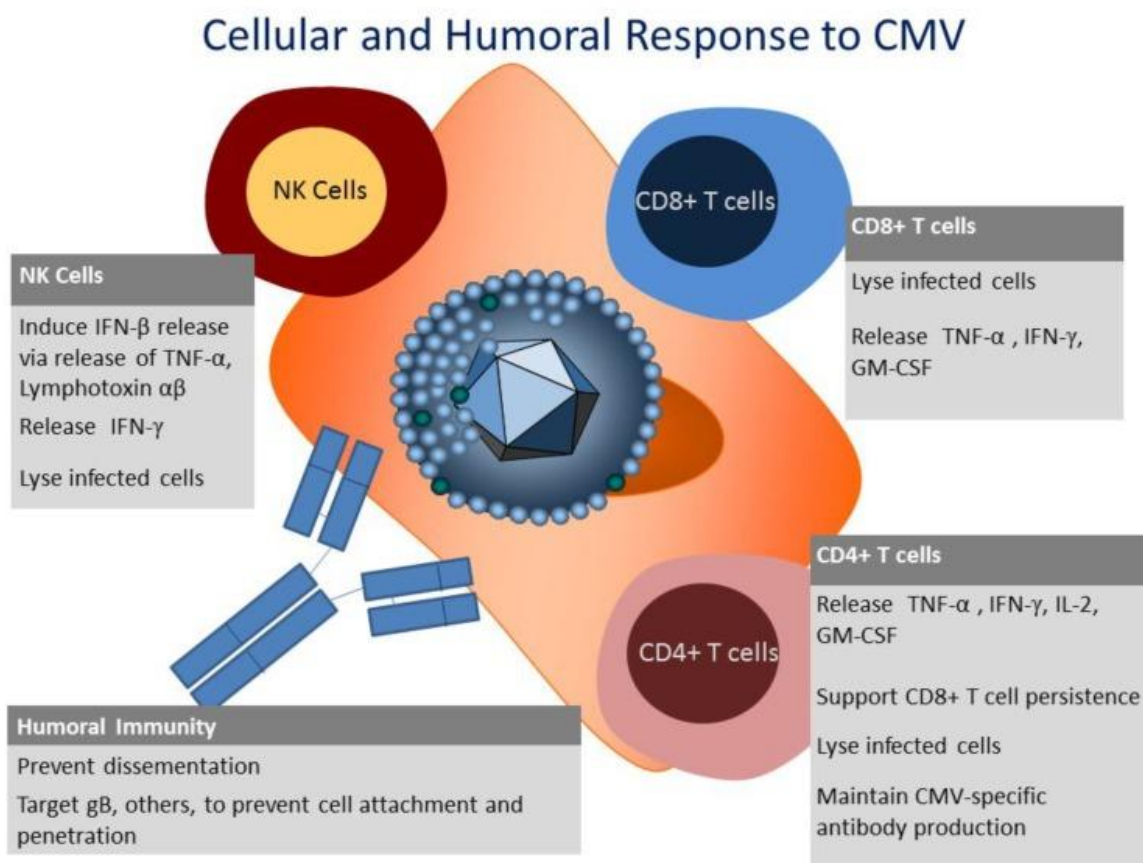
контроли репликације цитомегаловируса је потврђена и *in vitro* експериментима у којима је показано да NK ћелије активирание IL-2 инхибирају репликацију HCMV у фибробластима индукцијом ослобађања IFN- β у инфицираним фибробластима (31). Активирание NK ћелије ослобађају и IFN- γ који такође може реметити вирусну репликацију (32). NK ћелије код C57BL/6 мишева експримирају Ly49H, активациони рецептор који препознаје вирусни m157 протеин. Ћелије инфициране MCMV-ом на ћелијској мембрани експримирају вирусни протеин m157 и везивање Ly49H за m157 протеин узрокује директни цитотоксички одговор NK ћелија што за последицу има смањење титра вируса (33). NK ћелије BALB/c мишева не експримирају Ly49H молекул па је рани одговор на MCMV поремећен и одржава се висок титар вируса и 3-4 дана после инфекције (34). Кључну улогу у клиренсу MCMV-а код BALB/c мишева играју цитотоксички Т лимфоцити, а код C57BL/6 мишева NK ћелије (35).

Хуморални имунски одговор на антигене цитомегаловируса игра улогу у ограничавању дисеминације CMV и ограничавању тежине болести (36). Важност хуморалног имунског одговора за контролу оштећења изазваног CMV-а је показана у експерименталним моделима инфекције у којима је показано да пасивна заштита антителима смањује смртност животиња изложених леталној дози цитомегаловируса (37). Након примарне инфекције HCMV-ом у серуму могу да се детектују антитела на већи број антигена вируса pp65 и pp150 протеине тегумента, гликопротеине gB и gH из омотача, као и протеине укључене у транскрипцију као што је IE-1 (38). Гликопротеин B је део омотача вируса, експримиран је на површини вириона и неутралишућа антитела специфична за овај молекул блокирају везивање вириона за нове ћелије и тиме ограничавају ширење вируса (39). Пренос антитела из HCMV-серопозитивне мајке на фетус пружа новорођенчету заштиту од HCMV инфекције (40).

Целуларни имунски одговор је неопходан за контролу латентне CMV инфекције (41). Значај CD4⁺ Т лимфоцита у контроли латентне инфекције показан је код мишева са деплецијом CD4⁺ Т лимфоцита када је уочено да ови мишеви инфицирани MCMV-ом имају повећану инциденцу реактивације MCMV (42). CD4⁺ Т лимфоцити играју улогу у сузбијању репликације вируса у плувачним жлездама у току примарне инфекције. Титри MCMV у слезини и плућима се смањују већ у првој недељи после инфекције, док у плувачним жлездама титар вируса достиже пик три недеље после инфекције (29).

Деплеција CD4+ Т лимфоцита код мишева пре инфекције МСМV-ом утиче на повећање титра вируса у пљувачним жлездама, док у слезини и плућима титри вируса остају непромењени (43). Инфекцију CMV-ом прати и повећање броја вирус специфичних CD8+ Т лимфоцита, који учествују у контроли латентне инфекције вирусом (44). Латентну инфекцију CMV-ом карактерише одржавање популације меморијских CD8+ Т лимфоцита специфичних за вирус која се током година повећава и утиче на имунски одговор у старијем животном добу на остале антигене (45). Деплеција CD8+ Т лимфоцита код мишева пре инфекције МСМV-ом не мења кинетику елиминације вируса (46).

Шема 3.



Шема 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.

1.1.3. Модулација имунског одговора цитомегаловирусом

Поједини вируси су пронашли начине да избегну имунски систем домаћина, који им омогућавају да се репликују, дисеминују и перзистирају током читавог живота, повремено се реактивирају, али углавном остају у латентном облику (47). 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 (48). Бројни гени CMV-а кодирају протеине који модулишу имунски одговор домаћина и омогућавају перзистенцију вируса. Протеини које кодира CMV утичу на задржавање или деградацију MHC молекула I класе у ендоплазматском ретикулуму и тако ометају презентацију антигена CD8⁺ Т лимфоцитима у склопу MHC молекула I класе. У овај процес укључено је најмање четири продукта CMV гена: US2, US3, US6, и US11 (49). Протеини које кодира вирус утичу и на деградацију MHC молекула II класе (50). Смањење броја MHC молекула I класе на површини инфициране ћелије активира NK ћелије које убијају заражене ћелије. Међутим, CMV такође утиче на повећање експресије HLA-E, хомолога MHC молекула I класе, на инфицираним ћелијама који активира инхибицијске рецепторе на NK ћелијама и тако избегава директну цитотоксичку активност NK ћелија (51).

CMV инфицира дендритске ћелије које уводи у стање функционалне неактивности и тако спречава презентацију вирусних антигена Т лимфоцитима (52). Дендритске ћелије инфициране MCMV-ом имају смањену експресију MHC молекула I класе и костимулаторних молекула, и поремећену продукцију инфламацијских цитокина. Дендритске ћелије заражене MCMV чак и након третмана стимулусима који подстичу продукцију инфламацијских цитокина као што је липополисахарид не продукују очекиване количине ових цитокина (23).

1.2. Класификација и структура галектинских молекула

Лектини спадају у фамилију еволуционо конзервираних протеина који имају могућност везивања угљених хидрата (53). Класификовани су у 4 групе: пентраксини, галектини, лектини С типа и Р типа (54). Галектини спадају у фамилију гликопротеина од 15 чланова (означени бројевима од 1 до 15) (55). Чланови ове фамилије имају најмање један домен којим препознају угљене хидрате (енгл. *Carbohydrate recognition domain*, CRD) и

способност везивања аминокиселина јединице унутар гликана. Домен за препознавање угљених хидрата има висок афинитет да везује β -галактозиде и дужине је око 135 аминокиселина (53). Чланови фамилије галектина су подељени у 3 групе (56):

- „*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.

Галектини могу бити експримирани у скоро свим ћелијама и ткивима и то на површини ћелије, у цитоплазми, у једру, или у солубилном облику у телесним течностима (57). Присутни су у различитим ћелијама урођене и стечене имуности (58). Галектин 1 и галектин 3 су експримирани у различитим ћелијама и ткивима, а галектин 2 само у дигестивном епителу (59).

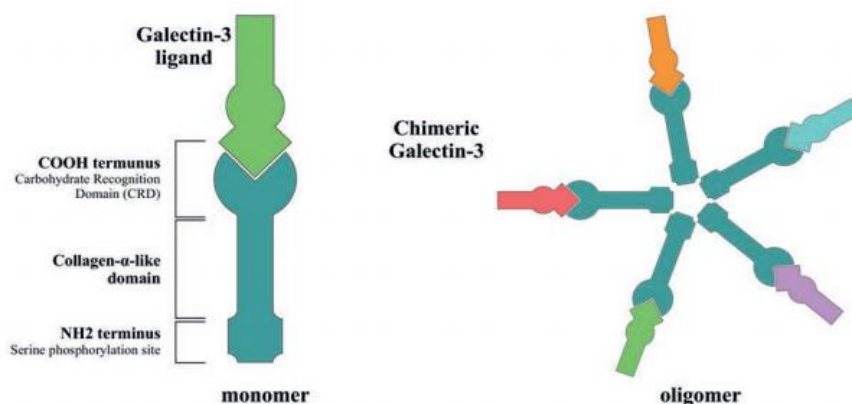
Поред тога што имају афинитет да везују галактозу, поједини галектини поседују способност да прилагоде CRD регион како би везали различите олигосахариде (60, 61). Везивањем за гликоконјугате на површини ћелије галектини покрећу различите сигналне путеве (62). Интрацелуларни галектини се везују за различите интрацелуларне протеинске лиганде и покрећу различите интраћелијске сигналне путеве (63).

Током ембриогенезе и диференцијације мења се експресија галектина (64). Галектини су укључени у бројне процесе у ћелији, пролиферацију, диференцијацију, апоптозу, адхезију, обраду РНК (65-67). Галектини су такође укључени и у патогенезу различитих патолошких стања (58).

1.2.1. Структура галектина-3

Полипептидни ланац галектина-3 садржи N-терминални и C-терминални домен (CRD регион) (Шема 4). CRD учествује у препознавању угљених хидрата (65, 68). N-терминални домен галектина-3 садржи серин који може да се фосфорилише (69, 70). Овај домен такође има секвенце сличне колегену- α које су богате пролином, глицином и тирозином (68, 71, 72). Захваљујући N-терминалним доменима молекули галектина-3 се удружују у пентамере, унакрсно повезују гликоконјугате и покрећу интрацелуларне сигналне путеве (57, 73, 74). Делација првих 11 аминокиселина у N-терминалном домену инхибира секрецију галектина-3, што указује да је N-терминални домен важан за овај процес (73, 75). N-терминални домен регулише апоптозу ћелија. Мутација серина на позицији 6 у оквиру N-терминалног домена инхибира антиапоптотску функцију галектина-3 (72). C-терминални регион галектина-3 садржи 135 аминокиселина које формирају глобуларну структуру (76).

Шема 4.



Шема 4. 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, једру и екстраћелијском простору (77). Галектин-3 везује различите лиганде у екстрацелуларној и интрацелуларној средини и обавља бројне функције у ћелији. Унутар цитоплазме подстиче ћелијску пролиферацију (78). Галектин-3 такође регулише ћелијску диференцијацију В лимфоцита, макрофага и дендритских ћелија (79-81). Везивањем за

антиапоптоски Bcl-2 протеин у цитоплазми, галектин-3 инхибира апоптозу (82). Галектин-3 утиче и на пост-транслациону обраду информационе РНК (енгл. *mRNA splicing*) (83).

Екстрацелуларни галектин-3 унакрсним повезивањем лиганата на површини ћелије изазива активацију интрацелуларних сигналних путева и активацију ћелије (77). Екстрацелуларни галектин-3 учествује у адхезији ћелија остварујући интеракције са угљеним хидратима присутним на површини ћелија и у екстрацелуларном матриксу (77, 84). Галектин-3 може деловати и као хемоатрактант, стимулише миграцију моноцита и макрофага (85).

Повећана експресија галектина-3 је забележена у многим туморима. Постоји индиректна корелација између нивоа експресије галектина-3 и метастатског потенцијала карцинома (86).

1.2.3. Улога галектина-3 у регулисању имунског одговора

Ћелије урођене имуности, моноцити, макрофаги, еозинофили, дендритске ћелије, конститутивно експримирају галектин-3, док га ћелије стечене имуности експримирају тек након активације (87).

Галектин-3 поседује важну улогу у регулисању инфламацијског одговора и делује на хемотаксу, адхезију и активацију ћелија, опсонизацију и фагоцитозу (88-90). Галектин-3 повећава стварање реактивних кисеоничних радикала и IL-1 у макрофагима (79). Макрофаги из галектин-3 дефицијентних мишева су склонији апоптози од макрофага из галектин-3 позитивних мишева (91).

Макрофаги значајно експримирају и секретују галектин-3 (79). Галектин-3 стимулише продукцију супероксидних аниона у хуманим моноцитима (79), и делује као хемоатрактант за моноците и макрофаге (85). Стимулише фагоцитозу апоптотских тимоцита и еритроцита који су опсонизовани имуноглобулином класе G (92). Овај лектин подстиче алтернативну активацију макрофага. Макрофаги изоловани из галектин-3 дефицијентних мишева се слабије активирају уколико су изложени цитокинима IL-4 и IL-13, без промене активације уколико су изложени липополисахариду и IFN- γ (93). Такође, макрофаги

изоловани из галектин-3 дефицијентних мишева стимулирани липополисахаридом продукују већу количину проинфламацијских цитокина (94).

Галектин-3 функционише као хемотаксни молекул за неутрофиле и повећава фагоцитну активност неутрофила. Подстиче адхезију хуманих неутрофила за ламинин и ендотелне ћелије (95, 96) и стимулише продукцију супероксидних анјона у неутрофилима и дегранулацију мастоцита (97, 98).

Активација, функција и миграција дендритских ћелија зависи и од галектина-3 (99, 100). Током инфекције дендритске ћелије повећавају експресију галектина-3 (101). Експресија галектина-3 у дендритским ћелијама утиче на поларизацију имунског одговора (101-103). Галектин-3 на дендритским ћелијама функционише и као рецептор за препознавање молекулских образаца (енгл. *Pattern-recognition receptor*, PRR) и тако утиче на продукцију проинфламацијских цитокина у дендритским ћелијама. Инхибицијом галектина-3 смањује се експресија IL-6, IL-1 β и IL-23, а повећава експресија IL-10 и IL-12 у хуманим дендритским ћелијама (104). Дендритске ћелије изоловане из галектин-3 дефицијентних мишева продукују већу количину IL-23 и изазивају снажнији Th17 одговор у поређењу са дендритским ћелијама пореклом из мишева дивљег соја (105).

Галектин-3 подстиче хемотаксу еозинофила у експерименталном моделу астме (106).

Галектин-3 контролише апоптозу и пролиферацију Т лимфоцита (107, 108). Апоптозу активираних Т лимфоцита подстиче експресија екстрацелуларног галектина-3, док експресија интрацелуларног галектина-3 има супротан ефекат спречава апоптозу ових ћелија (109). Галектин-3 се везује за екстрацелуларни део трансмембранских молекула CD7 и CD29 што активира митохондријални пут апоптозе, ослобађа се цитохром-с и активира се каспаза-3 (107). Утврђен је значајан степен сличности секвенци галектина-3 и антиапоптотских протеина из Bcl-2 фамилије и да интрацелуларни галектин-3 активацијом ових антиапоптотских молекула супримира апоптозу (82).

Галектин-3 повећава преживљавање В лимфоцита, зауставља диференцијацију ових ћелија у плазмоците и индукује диференцијацију у меморијске В лимфоците (80).

1.2.4. Улога галектина-3 у инфекцији и акутној и хроничној инфламацији

Галектин-3 је укључен у многе процесе који учествују у развоју акутне инфламације, попут активације и адхезије неутрофила (95), хемотаксе моноцита и макрофага, активације мастоцита (85). Чланови фамилије галектина могу деловати као рецептори за препознавање молекулских образаца патогена (110, 111). 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 (112-115). Показано је да галектин-3 може да олакша настанак инфекције појединим микроорганизмима, јер омогућава адхезију микроорганизама за ћелије домаћина и на тај начин повећава деструктивни одговор инфламацијских ћелија које оштећују организам домаћина (116-118). Мишеви са дефицијенцијом галектина-3 инфицирани патогеним паразитом *Schistosoma mansoni*, развијају слабији специфични одговор на паразит. Развијају мање гранулуме, детектован је мањи број В и Т лимфоцита у слезини, а све је последица слабије активације специфичне имуности дендритским ћелијама које не експримирају галектин-3 (102). Галектин-3 дефицијентни мишеви су подложнији инфекцији гљивом *Paracoccidioides brasiliensis*, јер се у одговору на ову гљиву у одсуству галектина-3 активирају регулаторни макрофаги који утичу на развој Th2 имунског одговора (119). Галектин-3 дефицијентни мишеви инфицирани *Streptococcus pneumoniae* развијају јачи Th1 имунски одговор и већи степен оштећења плућног ткива (88). Поларизација стеченог имунског одговора под утицајем галектина-3 вероватно је зависна од типа патогена који изазива болест (120).

Галектин-3 игра важну улогу у патогенези многобројних вирусних инфекција. Овај молекул контролише улазак *Herpes simplex virusa tip 1* (HSV-1) у хумане корнеалне кератиноците (118). Удруживање галектина-3 са трансмембранским муцинима на површини корнеалних кератиноцита ограничава инфекцију *Herpes simplex virus*-ом (118). Галектин-3 је неопходан за ефикасну инфекцију и улазак *Parvovirusa* у ћелије фибробласта и тумора дојке (121). Такође, галектин-3 промовише излазак HIV-1 вируса (енгл. *Human immunodeficiency virus*, HIV) из инфицираних Т лимфоцита (122). Делација гена за галектин-3 игра протективну улогу у вирусном моделу мултипле склерозе смањујући инфилтрацију имунских ћелија у субвентрикуларној зони (123).

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 (124). У овом мишјем моделу фулминантног хепатитиса који је индукован применом Con-A, галектин-3 има проинфламацијску улогу (124).

У многим моделима аутоимунских болести је испитана улога галектина-3. У моделу тип 1 *Diabetes mellitus*-а изазваног понављаним малим дозама стрептозотоцина уочено је да галектин-3 дефицијентни мишеви развијају мање оштећење панкреасних остраваца са мање израженом инфилтрацијом моноклеарним ћелијама (103). 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 (101). Сличан ефекат галектина-3 показан је и у експерименталном моделу реуматоидног артритиса. Галектин-3 дефицијентни мишеви након имунизације антигеном који изазива артритис имају мању концентрацију проинфламацијских цитокина IL-6 и TNF- α и аутоантитела у серуму и мањи проценат Th17 ћелија у слезини (125). У експерименталном моделу атеросклерозе галектин-3 остварује протективну улогу јер подстиче преузимање и ефикасно уклањање модификованих липопротеина (126).

1.2.5. Експресија галектина-3 у централном нервном систему

Галектин-3 је експримиран у централном нервном систему укључујући мозак и кичмену мождину у различитим ћелијама: активирана микроглија, макрофаги, епендимоцити, астроцити субвентрикуларне зоне, неурони у региону хипокампуса и Шванове ћелије након повреде нерава. Галектин-3 стимулише адхезију нервних ћелија и раст неурита (127). Галектин-3 је експримиран у епендимоцитима и астроцитима субвентрикуларне зоне где има улогу у регулацији миграције неуробласта током развоја мозга (128). Галектин-3 стимулише неурогенезу и ангиогенезу и има важну улогу у процесу ремоделовања можданог ткива након исхемијске повреде мозга (129). Галектин-3 такође стимулише диференцијацију олигодендроцита, доприносећи процесима мијелинизације што може да ограничи процесе демиелинизације (130).

Експресија галектина-3 је повећана у микроглији и макрофагима у кичменој моздини и оптичким нервима код мишева са експерименталним аутоимунским енцефаломијелитисом (131). 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 M1 фенотипа микроглијалних ћелија и на тај начин промовише неуроинфламацију у моделу неуроинфламације изазване LPS-ом (132). Са друге стране, галектин-3 ослобођен из микроглије има протективне, антиинфламацијске ефекте у амиотрофичној латералној склерози (133). Експресија галектина-3 је повећана у прионским инфекцијама мозданог ткива (134) и у експерименталном пнеумококном менингитису (135). Акумулација абнормалних протеина у прионским болестима и неуродегенеративним обољењима централног нервног система је удружена са већом експресијом галектина-3 у активираним макрофагама и микроглији (136). Такође показана је повећана експресија галектина-3 у активираној микроглији код мишева са експерименталним енцефалитисом изазваним *Junin* вирусом (137). Повећана експресија галектина-3 је уочена у дегенеративним лезијама мозга мишева са енцефалитисом узрокованог *Encefalomyocarditis* вирусом (енгл. *Encephalomyocarditis virus*, EMCV) (138).

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 (139). Активирани аутореактивни имунски ћелије инфилтришу мозак и кичмену моздину изазивајући дуготрајну инфламацију, прогресивну демиелинизацију и неуродегенерацију што изазива поремећај у спровођењу нервних импулса и на крају губитак аксона (140).

Тачан узрок МС је још увек непознат. Широко је прихваћено да је патологија болести посредована имунским системом код генетски осетљивих домаћина (141). Различити алели МНС локуса али и *non*-МНС гена су удружени са повећаним ризиком од развоја МС (142). Осим генетских фактора који одређују осетљивост и који могу утицати на тежину болести, фактори околине такође могу допринети покретању болести (143). Инфекције, посебно вирусне етиологије и недостатак витамина D могу допринети развоју МС (144). Неколико вируса могу деловати као окидачи МС. Најчешће проучаван вирус који је повезан са МС је *Epstein-Barr* вирус (EBV), члан фамилије *Herpesviridae* (145). Други

херпес вирус, хумани цитомегаловирус, такође је предложен као потенцијални окидач аутоимунског процеса у МС. Повишени титри IgG специфичних за HCMV су уочени у серуму оболелих од МС (146). Према хигијенској хипотези смањен контакт или изостанак контакта са узрочницима инфективних болести у детињству изазива неадекватну регулацију имунског одговора и може допринети развоју аутоимунских болести, као што је МС (147).

Клиничке манифестације МС могу бити различите. Најчешћи облик МС је са релапсима и ремисијама, који карактеришу фазе неуролошких испада, релапса, са периодом опоравка, ремисије, између две фазе релапса. Овај облик МС може да пређе у секундарно-прогресивну МС, која има прогресивни ток. Следећи облик МС је примарно-прогресивна МС, која прогресивно напредује од самог почетка болести без побољшања (148). Последњи облик МС је прогресивно-релапсна МС, која има прогресиван ток од почетка са повременим погоршањима (149).

1.3.1. Имунопатогенеза мултипле склерозе

Већи део разумевања имунопатогенезе мултипле склерозе се ослања на испитивања експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ), анималног модела инфламацијске демјелинизације ЦНС-а који може да се индукује имунизацијом протеинским компонентама мијелина. ЕАЕ дели многе хистолошке карактеристике са мултиплом склерозом, укључујући активну демјелинизацију, губитак олигодендроцита и аксона посредованих имунским механизмима који су вероватно покренути Т лимфоцитима специфичним за мијелин (150, 151).

Сматра се да је за развој мултипле склерозе кључан губитак ауто толеранције на мијелинске и друге антигене ЦНС-а што резултира активацијом аутореактивних Т лимфоцита на периферији (152). Т лимфоцити специфични за мијелин, активирани изван ЦНС-а, способни су да мигрирају кроз крвно-мождану баријеру. Процес трансмиграције укључује интеракцију између касног антигена-4 (енгл. *Very Late Antigen-4*, VLA-4) присутног на Т лимфоцитима и васкуларног ћелијског адхезивног молекула-1 (енгл. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, VCAM-1) експримираног на капиларним ендотелним ћелијама. У овај процес је укључена и интеракција још неколико различитих адхезивних молекула, хемокина и металопроотеиназа матрикса (150, 153). Након уласка у ЦНС,

активирани аутореактивни Т лимфоцити могу поново да се реактивирају у контакту са пептидним аутоантигенима ЦНС-а у контексту МНС молекула II класе експримираних на локалним ћелијама које презентују антиген (дендритске ћелије, макрофаги и В лимфоцити) што активира инфламацијску каскаду изазивајући ослобађање цитокина и хемокина, регрутацију додатних инфламацијских ћелија, укључујући Т лимфоците, моноците и В лимфоците, а перзистентна активација микроглије и макрофага коначно резултира оштећењем мијелина (154-156).

Присуство Т лимфоцита унутар лезија ЦНС-а се може открити у раним фазама мултипле склерозе (157). Показано је да код оболелих од мултипле склерозе постоје циркулишући CD4+Т лимфоцити који препознају базни протеин мијелина, протеолипидни протеин и мијелински олигодендроцитни гликопротеин, али њихово присуство је такође уочено и код здравих појединаца и постоје супротни докази у погледу потенцијалних разлика у фреквенцији и авидитету ових ћелија између две групе (158, 159). Субпопулације ефекторских CD4+ Т лимфоцита које играју кључну улогу у развоју МС су Th1 и Th17 ћелије. Међутим, релативни значај Th1 лимфоцита наспрот Th17 лимфоцитима у патогенези мултипле склерозе је споран. Конфликтне студије варијабилно приказују доминацију једне ћелијске врсте над другом код иницијалне дијагнозе и током накнадних релапса и прогресије болести (160, 161). CD4+ Т лимфоцити присутни на периферији, специфични за мијелин експримирају хемокински рецептор CCR6 и показују већу експресију оба цитокина Th1 и Th17 лимфоцита, IFN- γ и IL-17A у поређењу са контролама (162). Поред тога, неки од CD4+ Т лимфоцита имају интермедијарни фенотип и експримирају IFN- γ и IL-17A истовремено (163). Осим тога, изгледа да се функција Th17 лимфоцита разликује између мишева и људи. Продукција фактора стимулације гранулоцитно–макрофагних колонија посредована Th17 лимфоцитима доприноси хроничној инфламацији у ЕАЕ-у (164), док Th1 лимфоцити и друге подгрупе ћелија примарно продукују овај цитокин код људи (165). Верује се да помагачки CD4+ Т лимфоцити (Th2) који секретују интерлеукине 4, 5 и 10 имају супротну, регулаторну улогу која ограничава оштећење посредовано Th1 лимфоцитима (160).

Иако су CD4+ Т лимфоцити кључне ћелије у патогенези МС, број CD8+ Т лимфоцита је већи у активним лезијама на местима ткивне деструкције (166). CD8+ Т лимфоцити вероватно директним цитотоксичким деловањем учествују у оштећењу олигодендроцита и

неурона (167). Показано је да CD8+ Т лимфоцити продукују значајне количине проинфламацијских цитокина, TNF- α и IFN- γ , који доприносе развоју инфламације, а показују и директни цитотоксички ефекат на изоловане олигодендроците (168). CD8+ Т лимфоцити се налазе у белој маси и у кортикалним демиелинизирајућим лезијама сиве масе и њихов број приближно корелира са оштећењем аксона (169). Мијелин-специфични CD8+ Т лимфоцити се углавном активирају ширењем епитопа (170).

У поређењу са Т лимфоцитима, број В лимфоцита у ЦНС-у више варира у току прогресије мултипле склерозе, а скорија испитивања су показала да и В лимфоцити играју улогу у развоју МС (171), на шта указује и смањење броја лезија и релапса код оболелих који су лечени анти-CD20 антителом (172). Клонска експанзија В лимфоцита може се детектовати у менингеама, паренхиму и цереброспиналној течности, а антитела продукована интратекално се детектују у цереброспиналној течности и имају дијагностичку вредност. Број плазмочита у ЦНС-у који секретују антитела се повећава у току болести, а нарочито код особа које развију примарно или секундарно-прогресивни облик мултипле склерозе (169). Менингеа пацијената са секундарно прогресивном формом болести често садрже терцијерне лимфоцитне структуре које се састоје од агрегата плазмочита, В лимфоцита, Т лимфоцита и фоликуларних дендритских ћелија (173). Супротно томе, примарно прогресивна болест се карактерише дифузном менингеалном инфилтрацијом без таквих структура (174).

1.3.2. 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 настанак аутоимунских болести. Две хипотезе се ослањају на чињеницу да су потенцијално аутореактивни Т лимфоцити већ присутни у малом броју у сваком појединцу (175, 176). Једна хипотеза предлаже директну активацију аутореактивних Т лимфоцита микроорганизмима који експримирају антигенске епитопе који су структурно слични епитопима сопствених антигена (177). Пример овакве молекулске мимикрије је унакрсна реакција Т лимфоцита између мијелинског базног протеина (МВР), аутоантигена који се користи за индукцију ЕАЕ-а и *Epstein-Barr* вируса (EBV) (178). 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 који могу да се реактивирају у било ком тренутку када наиђу на сопствене антигене који су ослобођени из оштећених ткива (179). Следећа хипотеза обухвата активацију ћелија посматрача. Наиме, цитокини продуковани из имунских ћелија активираних вирусом, могу изазвати активацију аутореактивних Т лимфоцита (180). 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 могу активирати потенцијално аутореактивне Т лимфоците (181). У TMEV (енгл. *Theiler's murine encephalitis virus*) мишјем моделу мултипле склерозе је показано ослобађање антигена ЦНС-а који доспевају до периферних лимфних органа (182). Затим, митогени или суперантигени, ослобођени из микроорганизама, могу изазвати поликлонску активацију лимфоцита (175). Дакле, инфламацијска средина у вирусним инфекцијама може изазвати активацију и клонску експанзију аутореактивних Т лимфоцита, резултујући развојем аутоимунских болести (183). 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 (184). У другом анималном моделу, SJL/J мишеви инфицирани вирусом вакциније који кодира протеолипидни протеин, а касније изложени мишјем CMV, развили су лезије у белој маси. У овом моделу болести, инфекција вирусом вакциније повећава број аутореактивних Т лимфоцита, а накнадна инфекција цитомегаловирусом изазива болест активацијом ћелија посматрача или активацијом и индукцијом пролиферације претходно насталих аутореактивних Т лимфоцита (185).

Постоје супротни подаци о удружености инфекције цитомегаловирусом и мултипле склерозе. Резултати неколико епидемиолошких студија указују да CMV игра улогу у етиопатогенези мултипле склерозе. Показано је да су титри IgG антитела специфичних за CMV и за DNК вируса повећани код пацијената са мултиплом склерозом, што указује на могућу улогу CMV у развоју мултипле склерозе (186). Резултати друге студије показују да оболели од мултипле склерозе који имају антитела на CMV имају и већи број релапса и бржу прогресију болести (187). Присуство антитела на CMV је такође повезано са израженијом атрофијом сиве масе и целог мозга оболелих од мултипле склерозе (188).

Друге студије указују на заштитну улогу CMV у аутоимунским болестима. У оквиру огромног генома CMV постоје бројни гени који кодирају бројне молекуле који покрећу имуномодулаторне механизме и механизме избегавања имунског система, што може да ослаби имунске механизме код оболелих од мултипле склерозе (186, 189). Веза између титара антитела специфичних за CMV и бољег клиничког исхода је примећена у групи оболелих од мултипле склерозе код којих је показана мања атрофија мозга и краће трајање релапса (190). Постоје и студије које указују да је присуство антитела на CMV удружено са мањим ризиком од развоја мултипле склерозе (191).

Протективни ефекат инфекције цитомегаловирусом показан је и у моделу ЕАЕ изазваним инфекцијом TMEV-ом. Инфекција мишева MCMV-ом две недеље пре инфекције TMEV-ом удружена је са слабије развијеном болешћу. Ови мишеви су имали боље моторичке перформансе и мању инфилтрацију мозга Т лимфоцитима, што указује на имуносупресивни ефекат MCMV инфекције у овом моделу болести (189).

1.4. Имуни одговор на CMV у јетри

Инфекција хуманим цитомегаловирусом код имунодефицијентних особа, нарочито у стањима имуносупресије после трансплантације, изазива пнеумонију, болести гастроинтестиналног система, ретинитис и тешки хепатитис који повећава морталитет (192). Инфекција имунокомпетентних особа CMV-ом иако субклиничка, често је праћена повећањем концентрације трансминаза у серуму (193). Са друге стране инфекција имунодефицијентних одраслих особа и новорођенчади CMV-ом може да изазове фулминантни или хронични хепатитис који прогредира до цирозе јетре (194-196). Хепатоспленомегалија и жутица су два знака системске конгениталне инфекције CMV-ом (197). Касне последице конгениталне или перинаталне инфекције цитомегаловирусом су билијарна болест, фиброза и цироза јетре (198).

Код инфицираних мишева, MCMV се иницијално интензивно репликује у јетри и слезини што резултује смањењем функције јетре (199). Хепатитис који код мишева изазива MCMV је по својим карактеристикама сличан оном које се развија код људи инфицираних хуманим цитомегаловирусом. MCMV изазива хроничну непродуктивну инфекцију мишева са иницијалним хистолошким и серолошким доказима хепатичне инфламације и оштећења јетре (193, 200).

Инфекција цитомегаловирусом прво активира ћелије урођене имуности (201). NK ћелије играју кључну улогу у иницијалној контроли CMV инфекције (202). *Shellam* и сарадници су показали да различита осетљивост различитих сојева мишева на MCMV инфекцију зависи од активности NK ћелија (203). Код C57BL/6 мишева контрола инфекције MCMV-ом првенствено се постиже активношћу NK ћелија које се активирају стимулацијом активационог Ly49H рецептора вирусним протеином m157 (33, 204). Делеција m157 гена (Δ m157 MCMV) у вирусу ремети контролу вирусне инфекције NK ћелијама и повећава репликацију вируса *in vivo* (205). NK ћелије контролишу цитомегаловирусну инфекцију секрецијом цитолитичких гранула, индукцијом апоптозе у циљној ћелији и продукцијом проинфламацијских цитокина (204, 206). NK ћелије продукују IFN- γ који игра важну улогу у контроли репликације цитомегаловируса у јетри (207). Код мишева којима су деплетирани NK ћелије се развија дисеминована MCMV инфекција са тежим и дуготрајнијим оштећењем ткива (29). C57BL/6 мишеви којима су деплетирани NK ћелије пре MCMV инфекције имају веће титре вируса у јетри, слезини, плућима и пљувачним жлездама, развијају тешку форму хепатитиса и у већем проценту се MCMV инфекција завршава летално (208).

Инфламацијски моноцити, које на место инфекције привлаче хемокини домаћина (CCL2) и продукти вирусних гена (MCK2), укључени су како у контролу MCMV инфекције тако и у патогенезу хепатитиса изазваног вирусом (209, 210). Инфламацијски моноцити регрутују NK ћелије које контролишу MCMV инфекцију (211). Код BALB/c мишева CD8⁺ Т лимфоцити играју кључну улогу у контроли репликације цитомегаловируса у јетри, као и у већини периферних органа (212). Инфламацијски моноцити код BALB/c мишева ограничавају антивирусни одговор CD8⁺ Т лимфоцита, што успорава елиминацију цитомегаловируса из периферних органа и доприноси већем оштећењу ткива (213). CD4⁺ Т лимфоцити не остварују директан цитоцини ефекат на вирусе, продукују цитокине, IFN- γ који појачава антивирусну активност CD8⁺ Т лимфоцита и IL-17 који регрутовањем неутрофила доприноси акутном оштећењу јетре (214).

2. ЦИЉ РАДА

Главни циљ истраживања је проучавање утицаја галектина-3 на развој имунског одговора на *Cytomegalovirus* и последични развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса индукованог имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅ као и на оштећење јетре изазвано вирусном инфекцијом код Gal-3 дефицијентних и WT мишева.

У складу са главним циљем постављени су експериментални задаци:

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

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 (215). Током хомологе рекомбинације ген који је функционалан се мења неактивним геном, и на тај начин се елиминише функција гена који постоји (216).

Селекција ћелија где се 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) (217, 218). ТК ген се губи у хомологој рекомбинацији, док се *Neo* ген уграђује у геном ћелије (217, 218).

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 (219). 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 (91). 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 молекул 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 (91).

У мишје матичне ћелије је уграђен циљни вектор (D3), а након тога су уз помоћ G418 селектоване трансфектоване ћелије, док је употребом PCR (енгл. *Polymerase Chain Reaction*) и *Southern*- блот хибридизацијом, детектована хомолога рекомбинација у G418-51 резистентним ћелијама (91). 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) (91).

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 (91).

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

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 пептида MOG₃₅₋₅₅ 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

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 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 интраперитонелно 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 и Gal-3 KO мишеви. Мишевима је

интраперитонеално апликован рекомбинантни Gal-3 у дози од 50 μ g/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 и Gal-3 KO мишевима је интраперитонеално апликован инфликсимаб у дози од 5mg/kg у 200 μ L 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 мозга, кичмене мождине и јетре

У току максималне клиничке манифестације ЕАЕ 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 $^{\circ}$ 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 покривна 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 (193, 220).

Вредност хистолошког скорa у мозгу и кичменој мождини 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 мождини и мозгу урађена је према претходно описаном протоколу (221, 222).

3.10. Биохемијска анализа оштећења јетре

36 и 72 сата после интраперитонеалне апликације МСМV-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 (223, 224).

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 је 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 гpm 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 спленоцита 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 (40µm), 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 мононуклеари који се налазе у интерфази. На крају се ћелије оперу 2 пута у PBS-у и ресуспендују у медијуму.

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

Иzolоване су мононуклеарне 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 мононуклеарних ћелија и процентуална заступљеност ћелија је анализирана методом проточне цитометрије.

3.15.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера

Анти-мишја моноклонска антитела обележена флуоресцентним бојама и специфична за мембранске и интрацелуларне молекуле су коришћена за одређивање функционалних и фенотипских карактеристика субпопулација мононуклеара 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*™ 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 (225). 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 употребљене су супстанце које инхибишу интрацелуларни транспорт протеина, *BD GolgiStop*™ (садржи моненсин) и *BD GolgiPlug*™ (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 моноклеара изолованих из јетре (1×10^6 /ml) ресуспендованих у комплетном медијуму, су инкубирани у трајању од 4 сата на 37°C у присуству 5% CO_2 . У ћелијску суспензију је затим додат РМА (50ng/ml) и јономицин (500ng/ml). У ћелијску суспензију је такође додат *BD GolgiStopTM* (0,7 μ l/ml) како би се блокирала секреција цитокина и повећала интрацелуларна акумулација цитокина. Након инкубације моноклеари су испрани и ресуспендовани у комплетном медијуму. Потом су моноклеарне ћелије пребачене у пластичне епрувете. Остале процедуре су спроведене на $+4^\circ\text{C}$.

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 моноклеарних ћелија је ресуспендовано у 50 μ l 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 инкубирани у мраку у трајању од 30 минута на $+4^\circ\text{C}$.

3.15.5. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране

Моноклеарне 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 250 μ l *Cytofix/CytoPermTM* раствора. Након инкубације од 20 минута на $+4^\circ\text{C}$ талог је опран два пута у *Perm/WashTM* 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 инкубирани су 30 минута на $+4^\circ\text{C}$. Затим је ћелијски талог растворен у 50 μ l *Perm/WashTM*

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 мишјих хепатоцита

Иzolована 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 rpm 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 rpm 4 минута. Талог је два пута опран у комплетном DMEM-у, пропуштен кроз филтер промера 100µm и ћелије су центрифугиране на 600 rpm 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

Иzolовани хепатоцити су опрани у хладном PBS-у и ресуспендовани у 1X *binding buffer*-у у концентрацији од 1x10⁶ ћелија по mL. *Annexin FITC* и *propidium iodide* (PI) су додати у 100µL ћелијске суспензије и инкубирани су 15 минута на собној температури у мраку. Након инкубације додато је 400µL 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 мишјих 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 5µm 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. 150µl 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 испирани три пута по 5 минута у PBS-у, након чега је на исечке додато секундарно биотинизирано антитело. После инкубације од 30 минута препарати су испирани 3 пута по 5 минута. *Streptavidin Peroxidase*-а је након тога додато на ткивне исечке. Након инкубације од 10 минута препарати су испирани 3 пута по 5 минута и затим је додато 2-3 капи DAB реагенса (20µl 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 мишијих узорака јетре TUNEL методом

За бојење TUNEL методом (енгл. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) коришћени су парафински исечци ткива јетре дебљине 5µm. 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 50µL мешавине за TUNEL реакцију (450µL *Label solution*, 50µL *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 50µL *Converter*-а 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 50-100µL 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

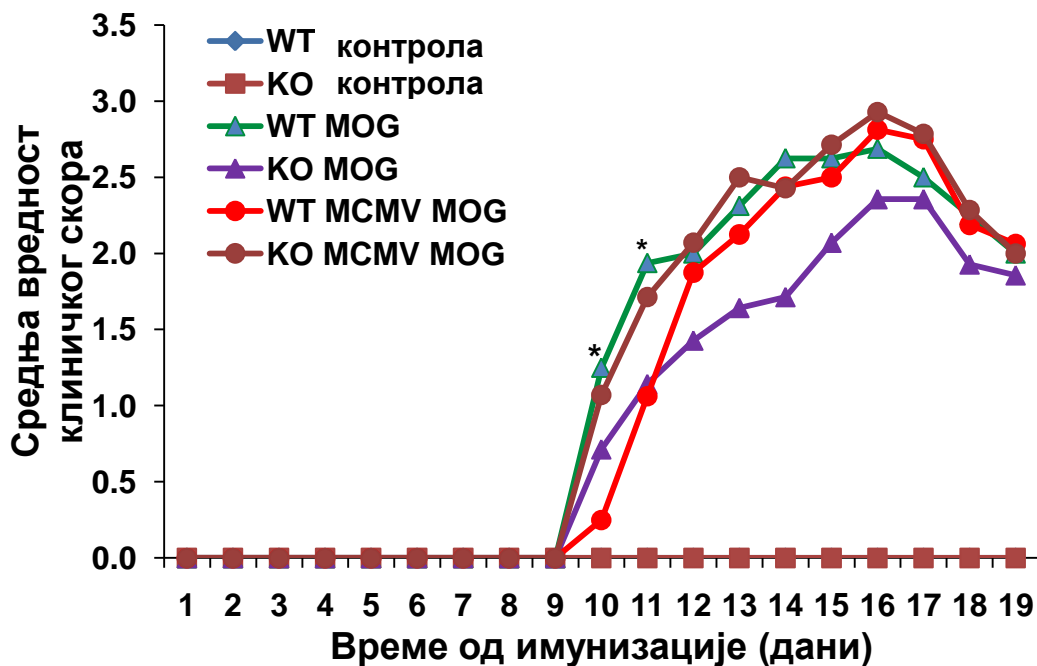
4.1. MCMV инфекција прекида атенуацију ЕАЕ-а код Gal-3 КО мишева

Подаци о утицају инфекције цитомегаловирусом на настанак мултипле склерозе код људи су различити, али резултати скоријих истраживања развоја ЕАЕ код мишева претходно инфицираних цитомегаловирусом указују да ова инфекција омогућава развој ЕАЕ код BABL/c мишева, иначе резистентних на индукцију ЕАЕ пептидом MOG₃₅₋₅₅ (222), и да појачава манифестације ЕАЕ код C57BL/6 мишева (226). Познато је да C57BL/6 мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ са делецијом гена за Gal-3 развијају блажу форму ЕАЕ (101). Да бисмо испитали како инфекција MCMV-ом утиче на тежину ЕАЕ код C57BL/6 мишева и у одсуству галектина-3, C57BL/6 WT и Gal-3 КО мишеви су 10 дана након инфекције MCMV-ом имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅. Неинфицирани WT мишеви, који су осетљиви на развој ЕАЕ (227), и неинфицирани Gal-3 КО мишеви су коришћени као контролне животиње. Развој болести је испитиван праћењем знакова болести свакодневно. Gal-3 КО мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ развили су знаке ЕАЕ, али слабије у поређењу са имунизованим WT мишевима. Статистички значајно мања вредност средњег клиничког скорa је забележена у групи имунизованих Gal-3 КО мишева у поређењу са имунизованим WT мишевима (Графикон 1А). Gal-3 КО мишеви инфицирани MCMV-ом па након тога имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају типичне клиничке знаке ЕАЕ, са средњим вредностима средњег клиничког скорa веома сличним као код осетљивих WT мишева (Графикон 1А). MCMV инфекција је одложила почетак болести код WT мишева са ЕАЕ-ом, а средња вредност клиничког скорa је до 15. дана од имунизације нешто мања него у групи WT мишева који су само имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 1А).

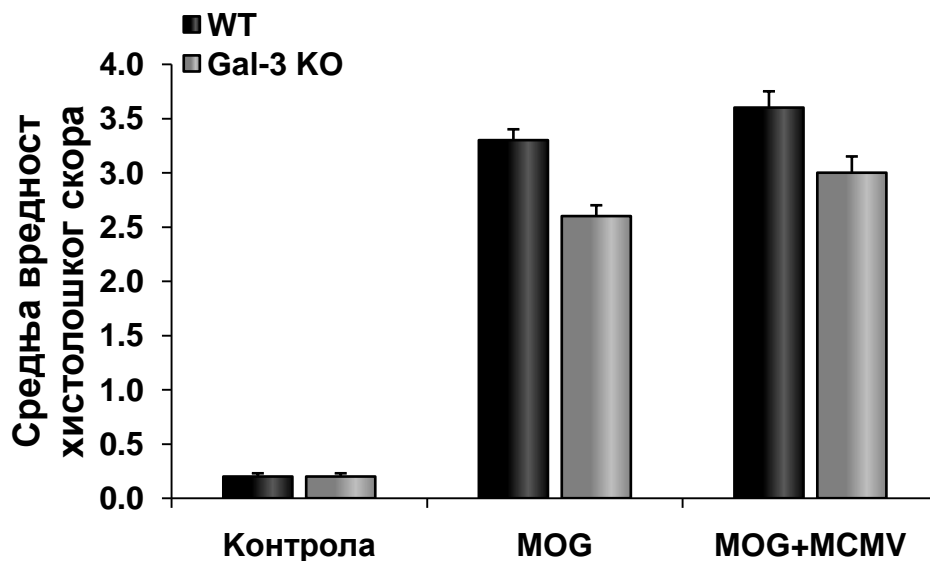
Хистолошка анализа. У исечцима ткива мозга инфицираних WT и Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом, уочени су мононуклеарни инфилтрати. Инфекција вирусом повећава вредност средњег хистолошког скорa у мозгу и у групи WT и у групи Gal-3 КО мишева, али то повећање средње вредности хистолошког скорa код мишева инфицираних вирусом не достиже статистичку значајност (Графикон 1Б).

Графикон 1

А



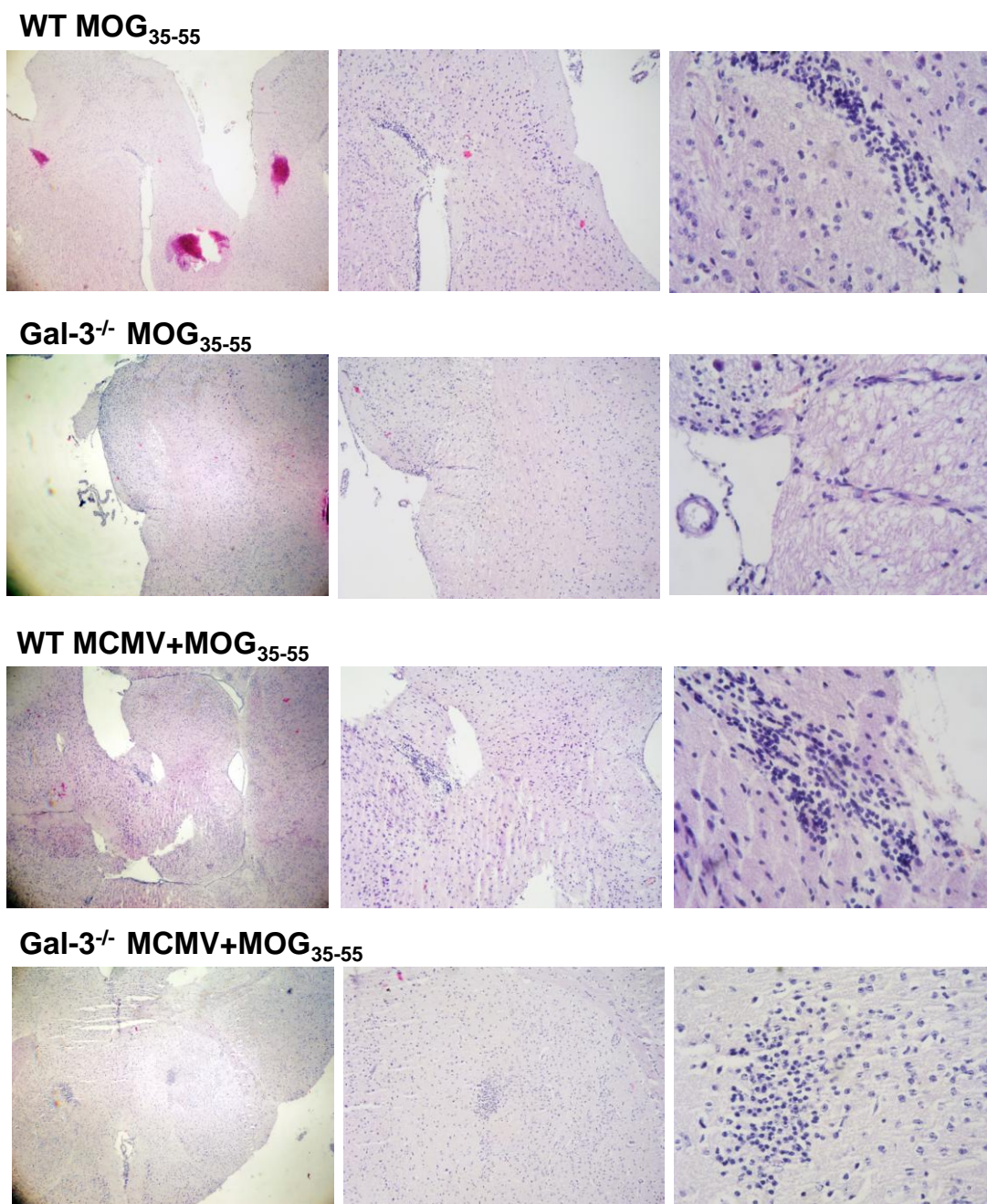
Б



Графикон 1. Gal-3 KO мишеви инфицирани MCMV-ом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају клиничке и хистолошке знаке ЕАЕ-а као и осетљиви WT мишеви. WT и Gal-3 KO мишеви су 10 дана након интраперитонеалне апликације 1×10^5 PFU MCMV имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅). Друга група WT и Gal-3 KO мишева је имунизована само пептидом MOG₃₅₋₅₅ без претходне 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 контрола, Gal-3 KO контрола). (А) Вредност клиничког скова ЕАЕ-а је представљен као средња вредност + SE. (Б) Ткиво мозга имунизованих мишева је екстирпирано 15 дана након имунизације пептидом, 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 пептидом MOG₃₅₋₅₅ код WT и Gal-3 KO мишева је индуковала развој субарахноидних и периваскуларних инфилтрата у мозгу са ширењем у паренхим у групи WT мишева. У исечцима мозга у групи WT мишева који су имунизовани само пептидом MOG₃₅₋₅₅ забележен је само периваскуларни инфилтрат, а у групи Gal-3 KO мишева само субарахноидални инфилтрат (Слика 1).

Слика 1



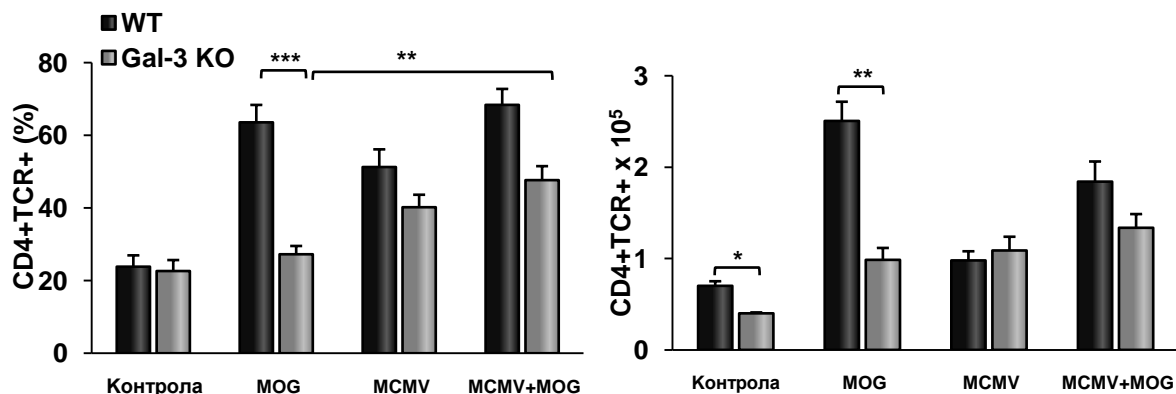
Слика 1: Хистологија мозга WT и Gal-3/- мишева инфицираних вирусом и имунизованих пептидом (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3/- MCMV+MOG₃₅₋₅₅) и WT и Gal-3 KO мишева само имунизованих енцефалитогеном (WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3/- MOG₃₅₋₅₅). Ткиво мозга је узето 15 дана након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅, исечци су бојени хематоксилин-еозином. Представљени су исечци ткива мозга, увеличања 4X, 10X и 40X.

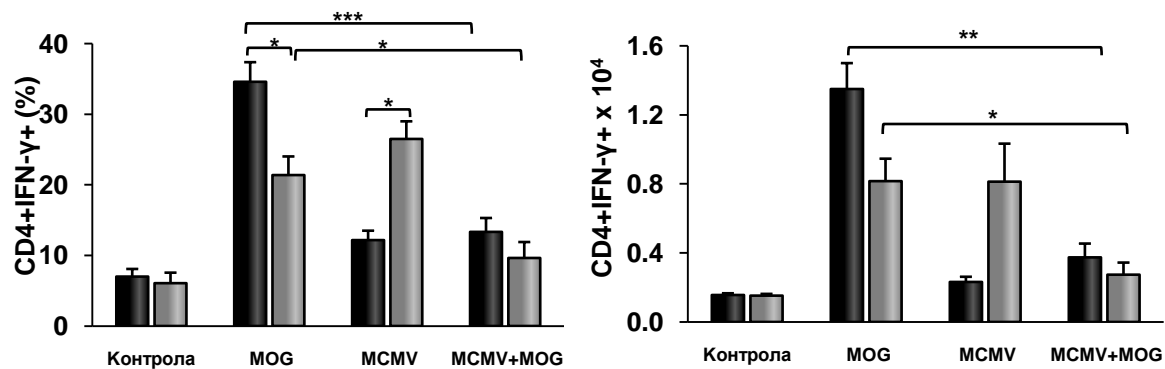
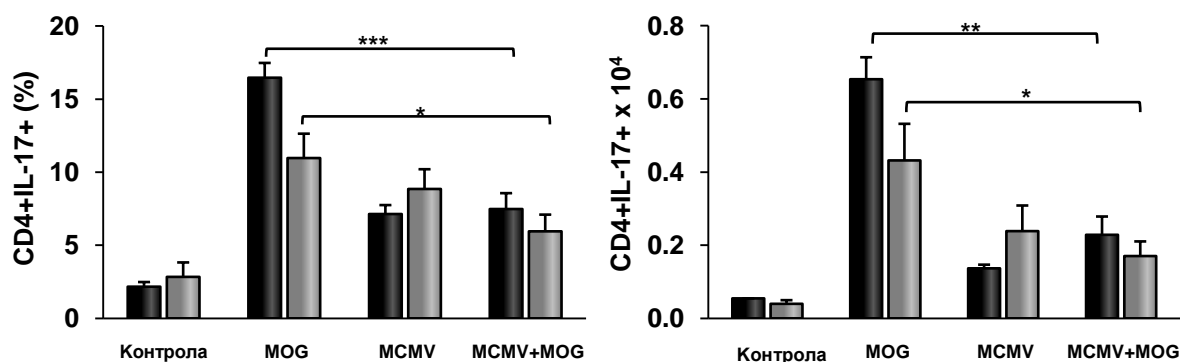
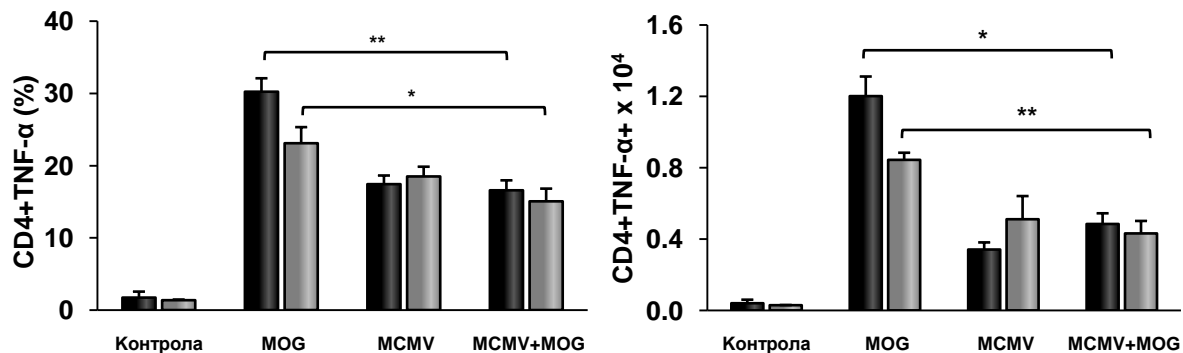
4.2. Претходна MCMV инфекција смањује проценат и број проинфламацијских CD4+ лимфоцита у мозгу Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Анализом исечака мозга је утврђено да су инфилтрати у мозгу инфицираних WT и Gal-3 KO мишева пре имунизације енцефалитогеном већи него инфилтрати присутни у мозгу само имунизованих мишева (Графикон 1Б, Слика 1). Даљом анализом је испитан састав инфилтрата. Претходна инфекција цитомегаловирусом повећава број и статистички значајно повећава проценат CD4+ Т лимфоцита у ЦНС-у у групи Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 2А). У групи WT мишева инфекција пре имунизације не утиче на процентуалну заступљеност CD4+ Т лимфоцита у инфилтратима у ЦНС-у, а смањује апсолутни број ових ћелија (Графикон 2А). Процент и укупан број CD4+ Т лимфоцита који експримирају IFN- γ у инфилтратима у ЦНС-у је значајно мањи у групама WT и Gal-3 KO мишева инфицираних вирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са групама WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 2Б). MCMV инфекција пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ смањује и проценат и укупан број IL-17+ CD4+ Т лимфоцита и TNF- α + CD4+ Т лимфоцита у ЦНС-у и WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 2В и 2Г).

Графикон 2

А



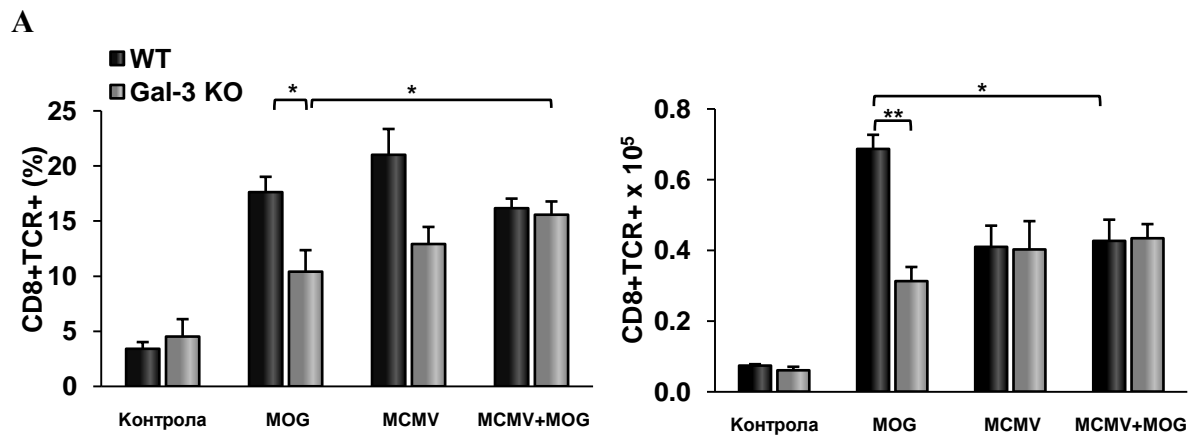
Б**В****Г**

Графикон 2. Инфилтрати у ЦНС-у WT и Gal-3 KO мишева инфицираних цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ садрже мање проинфламацијских CD4⁺ Т лимфоцита. Мишеви су жртвовани 15 дана после индукције ЕАЕ-а, изоловане су мононуклеарне ћелије из ЦНС-а, рестимулисане *ex vivo* PMA и јономицином пре интрацелуларног бојења и анализе проточном цитометријом. Приказан је проценат и апсолутни број (средња вредност + SE) CD4+TCRβ⁺, CD4+IFN-γ⁺, CD4+TNF-α⁺ и CD4+IL-17⁺ ћелија из два независна експеримента са 10 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; *p<0.05.

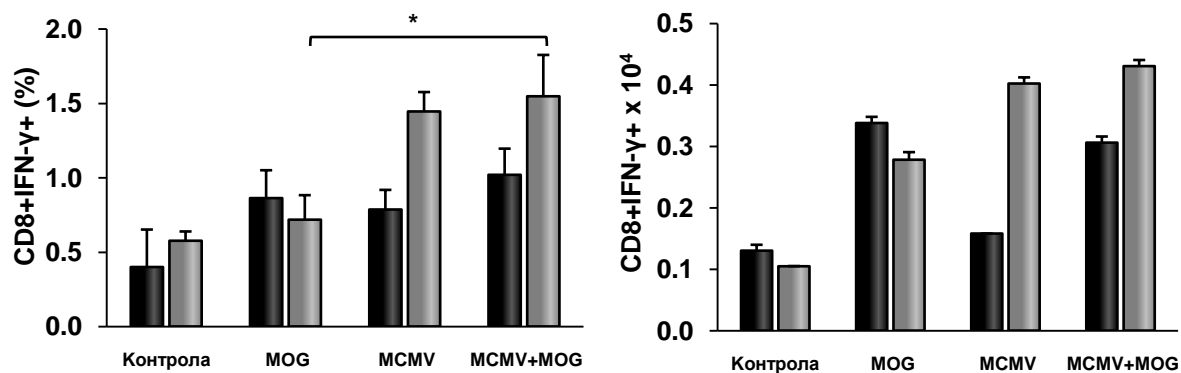
4.3. MСMV инфекција пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава проценат и број проинфламацијских CD8⁺ лимфоцита у мозгу у одсуству галектина-3

Даље је анализирано присуство и фенотип CD8⁺ Т лимфоцита у моноклеарним инфилтратима у ЦНС-у, 15 дана након индукције ЕАЕ-а. Инфекција MСMV-ом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ утиче на пораст процента CD8⁺ Т лимфоцита у инфилтратима у ЦНС-у Gal-3 КО мишева (Графикон 3). Процент CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају IFN- γ је статистички значајно већи у ЦНС-у инфицираних Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са Gal-3 КО мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 3Б). Процент и укупан број CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају IL-17 је статистички значајно већи у ЦНС-у Gal-3 КО мишева инфицираних пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са групом Gal-3 КО мишева имунизованих само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 3В). Процент и укупан број CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају TNF- α је већи у ЦНС-у WT мишева инфицираних пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са WT мишевима имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 3Г).

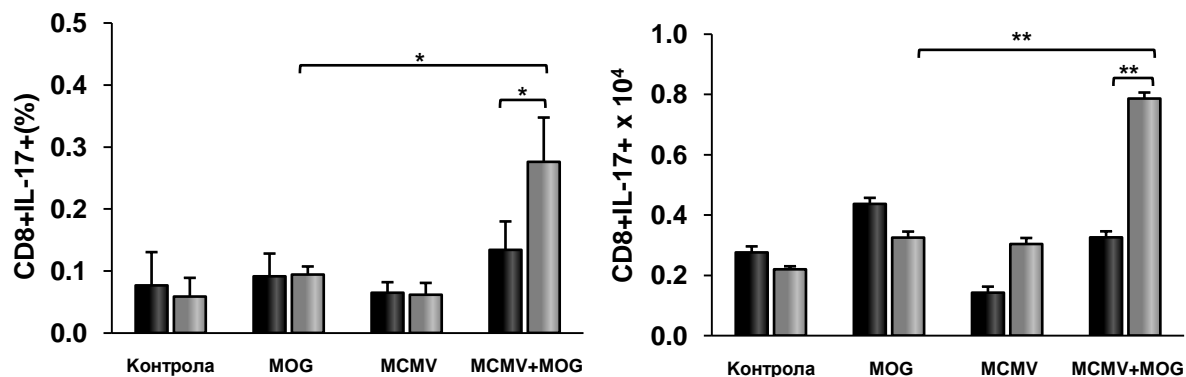
Графикон 3



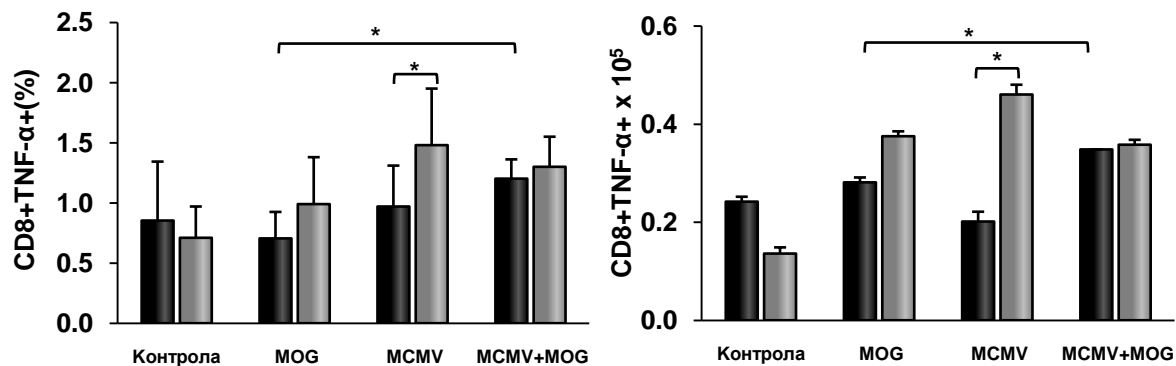
Б



В



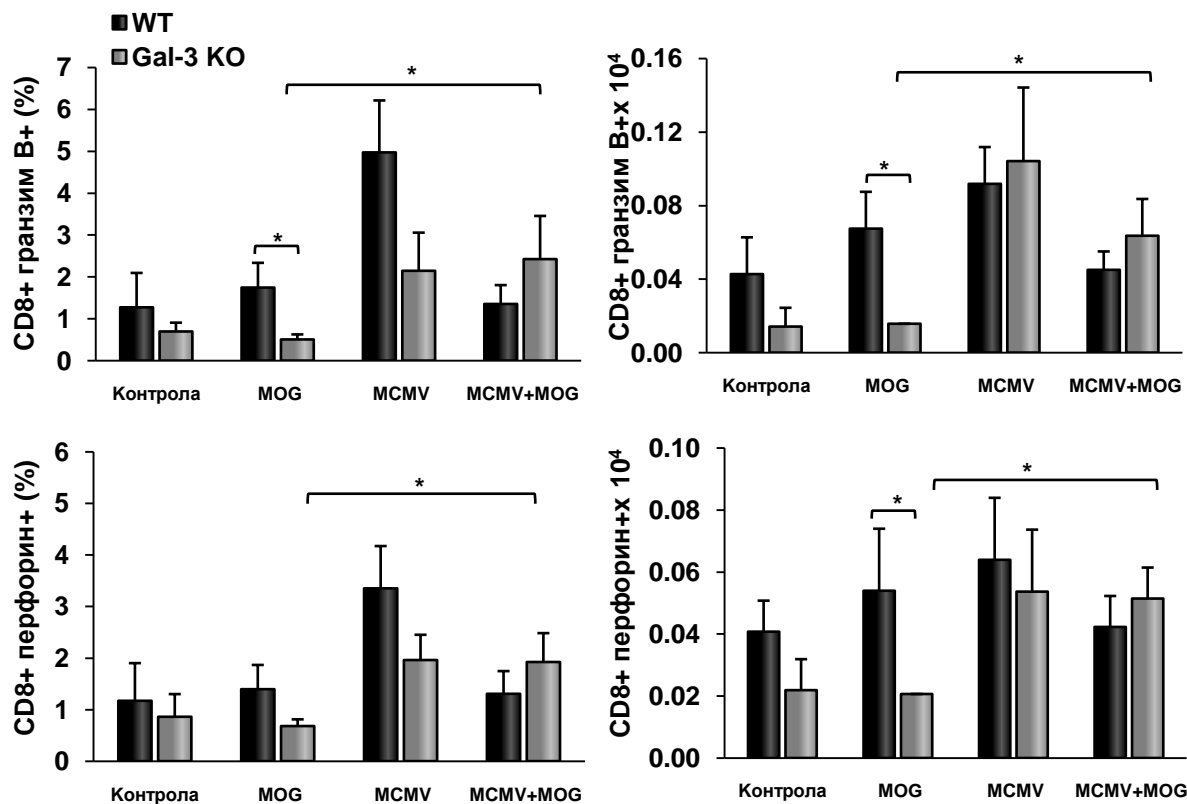
Г



Графикон 3. У одсуству галектина-3 инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава проценат и број проинфламацијских CD8+ ћелија у ЦНС-у. Мишеви су жртвовани 15 дана после индукције ЕАЕ-а, изоловане су мононуклеарне ћелије из ЦНС-а, рестимулисане *ex vivo* РМА и јономицином пре интрацелуларног бојења и анализе проточном цитометријом. Приказан је проценат и апсолутни број (средња вредност + SE) CD8+TCRβ+, CD8+IFN-γ+, CD8+TNF-α+ и CD8+IL-17+ ћелија из два независна експеримента са 10 мишеваа по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; *p<0.05.

Анализом експресије гранзима В и перфоруина, маркера цитолитичке активности CD8+ Т лимфоцита, показано је постојање већег процента и броја цитотоксичких CD8+ ћелија у ЦНС-у инфицираних Gal-3 КО мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са Gal-3 КО мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 4).

Графикон 4



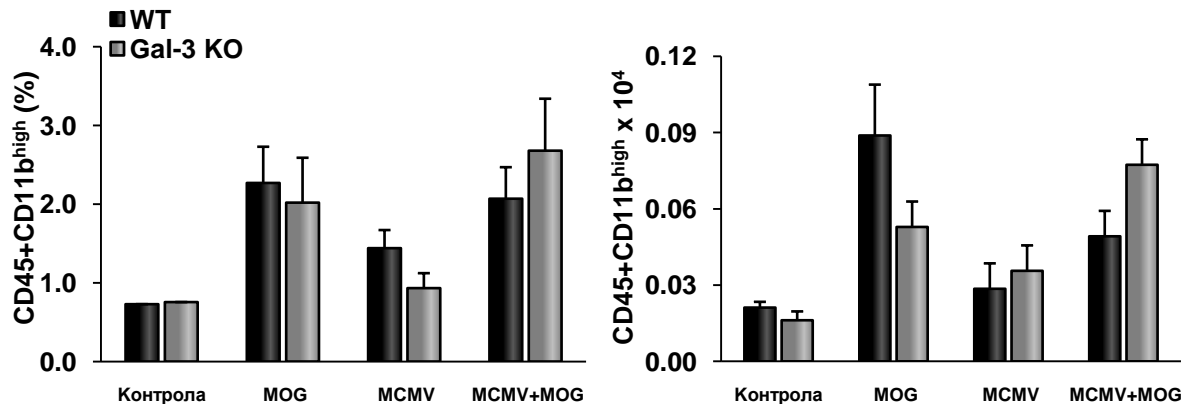
Графикон 4. У одсуству галектина-3 инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава проценат и број цитолитичких CD8+ Т лимфоцита у ЦНС-у. Мишеви су жртвовани 15 дана после индукције ЕАЕ-а, изоловане су мононуклеарне ћелије из ЦНС-а, рестимулисане *ex vivo* РМА и јономицином пре интрацелуларног бојења и анализе проточном цитометријом. Приказан је проценат и апсолутни број (средња вредност + SE) CD8+гранзим В+, CD8+перфоруин+ ћелија из два независна експеримента са 10 мишеваа по групи. Статистичка значајност разлике између инфицираних WT и Gal-3 КО мишева који су након тога имунизовани енцефалотигеном (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 КО MCMV+MOG₃₅₋₅₅) и групе само имунизованих WT и Gal-3 КО мишева пептидом MOG₃₅₋₅₅ (WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 КО MOG₃₅₋₅₅) је одређена Student-овим t тестом; *p<0.05.

4.4. Инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ утиче на повећање процента CD86⁺ ћелија у популацији макрофага у ЦНС-у Gal-3 КО мишева и процента CD206⁺ ћелија у популацији макрофага у ЦНС-у WT мишева

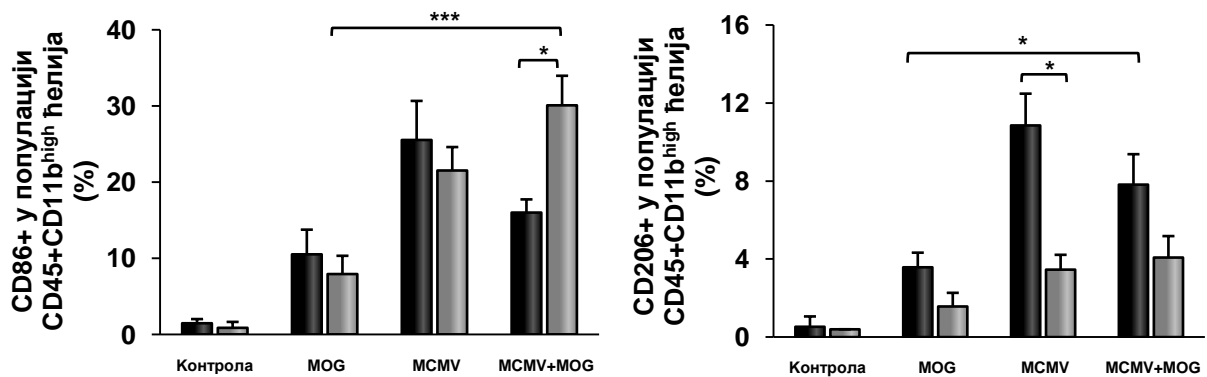
Даље смо анализирали могући утицај вирусне инфекције на промене у фенотипу макрофага у ЦНС-у. Инфекција MCMV-ом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава проценат и укупан број макрофага у ЦНС-у у групи Gal-3 КО мишева, али повећање не достиже статистичку значајност (Графикон 5А). Иако пораст процента и укупног броја макрофага у ЦНС-у Gal-3 КО мишева инфицираних пре индукције ЕАЕ није статистички значајан, у оквиру ове популације макрофага значајно се повећава проценат ћелија које експримирају маркер класичне активације, CD86 (Графикон 5Б). Инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у групи WT мишева у ЦНС-у статистички значајно повећава проценат ћелија које експримирају маркер алтернативне активације CD206⁺ у оквиру популације макрофага (Графикон 5Б).

Графикон 5

А



Б

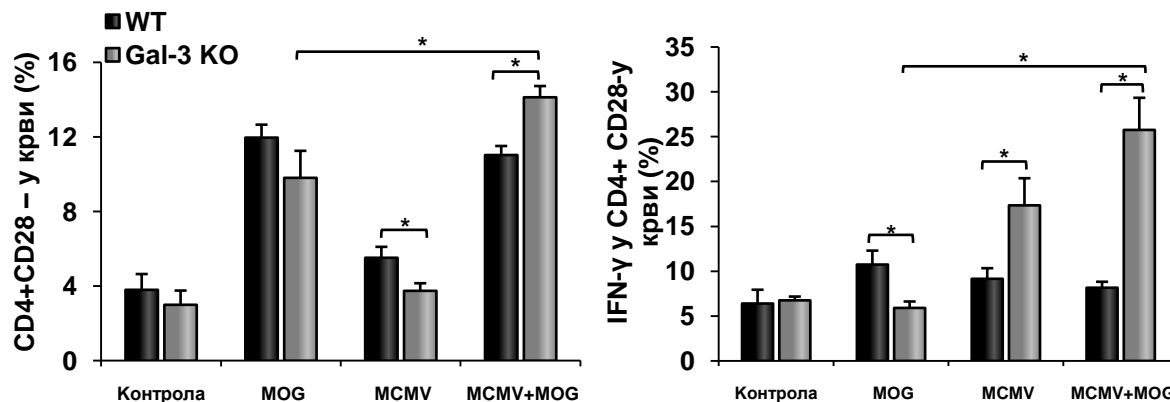


Графикон 5. Инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ утиче на повећање процента CD86⁺ ћелија у популацији макрофага у ЦНС-у Gal-3 КО мишева и процента CD206⁺ ћелија у популацији макрофага у ЦНС-у WT мишева. Мононуклеарне ћелије су изоловане из ЦНС-а WT и Gal-3 КО нетретираних мишева 15 дана након индукције ЕАЕ и анализирани проточном цитометријом. Представљене су средње вредности процента CD45+CD11b^{high} ћелија (макрофаги) и CD86⁺ и CD206⁺ ћелија у оквиру CD45+CD11b^{high} популације + SE за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим *t* тестом; **p*<0.05, ***p*<0.005, ****p*<0.001.

4.5. Инфекција MCMV-ом изазива експанзију инфламацијских CD4+CD28-лимфоцита у периферној крви Gal-3 КО мишева

Показано је да су CD4+CD28- Т лимфоцити, који се описују као ефекторско-меморијски, присутни у већем броју код животиња са ЕАЕ-ом, да проценат ових ћелија корелира са степеном демјелинизације и тежином болести и да MCMV инфекција изазива експанзију ових ћелија и тако појачава ЕАЕ (226). Да бисмо испитали да ли MCMV инфекција изазива већу експанзију CD4+CD28- Т лимфоцита на периферији у групи Gal-3 КО мишева и тако погоршава ЕАЕ анализирана је заступљеност и фенотип ових ћелија у периферној крви мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅, инфицираних цитомегаловирусом и инфицираних и имунизованих енцефалитогеном. Као што се види на графикону 6 имунизација енцефалитогеном значајно повећава проценат ефекторско-меморијских лимфоцита у периферној крви, MCMV инфекција минимално повећава проценат ових ћелија и то значајније у групи WT мишева, док инфекција вирусом и накнадна имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ значајно повећава проценат CD4+CD28-лимфоцита само у групи Gal-3 КО мишева. Процент CD4+CD28- лимфоцита у периферној крви Gal-3 КО мишева инфицираних вирусом па имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је статистички значајно већи у поређењу са процентом ових ћелија у периферној крви инфицираних и имунизованих WT мишева (Графикон 6). Интересантно је да сама вирусна инфекција значајно повећава проценат IFN- γ ⁺ ћелија у оквиру CD4+CD28- популације ћелија у групи Gal-3 КО мишева па је проценат ових ћелија статистички значајно већи него у групи инфицираних Gal-3 КО мишева (Графикон 6). Имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ после инфекције вирусом додатно повећава проценат IFN- γ ⁺ ћелија у оквиру CD4+CD28- популације у групи Gal-3 КО мишева, а у групи WT мишева ни инфекција ни имунизација не утичу на повећање процента инфламацијских ефекторско-меморијских лимфоцита.

Графикон 6



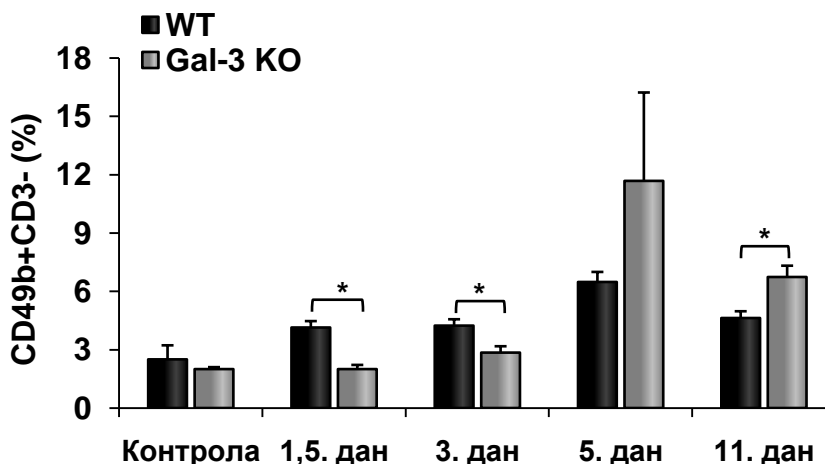
Графикон 6. Инфекција MCMV-ом изазива експанзију IFN- γ + ћелија у популацији CD4+CD28- лимфоцита у периферној крви Gal-3 KO мишева. Мононуклеарне ћелије су изоловане из периферне крви WT и Gal-3 KO нетретираних мишева 15 дана након индукције EAE и 25 дана након инфекције MCMV-ом и анализирани проточном цитометријом. Представљене су средње вредности процента CD4+CD28- ћелија и процента IFN- γ + ћелија у популацији CD4+CD28- + SE за 6 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; * $p < 0.05$.

4.6. У одсуству галектина-3 успорава се пораст процента NK ћелија и IFN- γ позитивних ћелија у популацији NK ћелија у слезини изазван инфекцијом мишијим цитомегаловирусом

Пошто је уочена разлика у фенотипу лимфоцита у периферној крви између WT и Gal-3 KO мишева након инфекције цитомегаловирусом даље је анализиран утицај Gal-3 на имунски одговор на MCMV. Код C57BL/6 мишева механизми урођене имуности играју кључну улогу у контроли репликације MCMV-а и смањењу оштећења ткива вирусом, па су даље анализирани разлике у фенотипу ћелија урођене имуности NK, NKT и дендритских ћелија, у слезини WT и Gal-3 KO мишева рано по инфекцији цитомегаловирусом. Као што се види на Графикону 7, већ 1,5 дан по инфекцији се у слезини WT мишева повећава проценат NK ћелија у односу на контролне, неинфициране мишеве, док се у групи Gal-3 KO мишева проценат NK ћелија у слезини повећава тек 5 дана после инфекције. Процент NK ћелија у слезини WT мишева је 1,5 и 3 дана након инфекције вирусом статистички значајно већи у поређењу са групом Gal-3 KO мишева (Графикон 7). Међутим, већ од петог дана по инфекцији је проценат NK ћелија у слезини Gal-3 KO мишева већи, а од 11. дана по инфекцији и статистички значајно већи у поређењу са групом WT мишева

(Графикон 7). Резултати указују да се у одсуству галектина-3 касније повећава проценат NK ћелија у слезини у одговору на MCMV инфекцију.

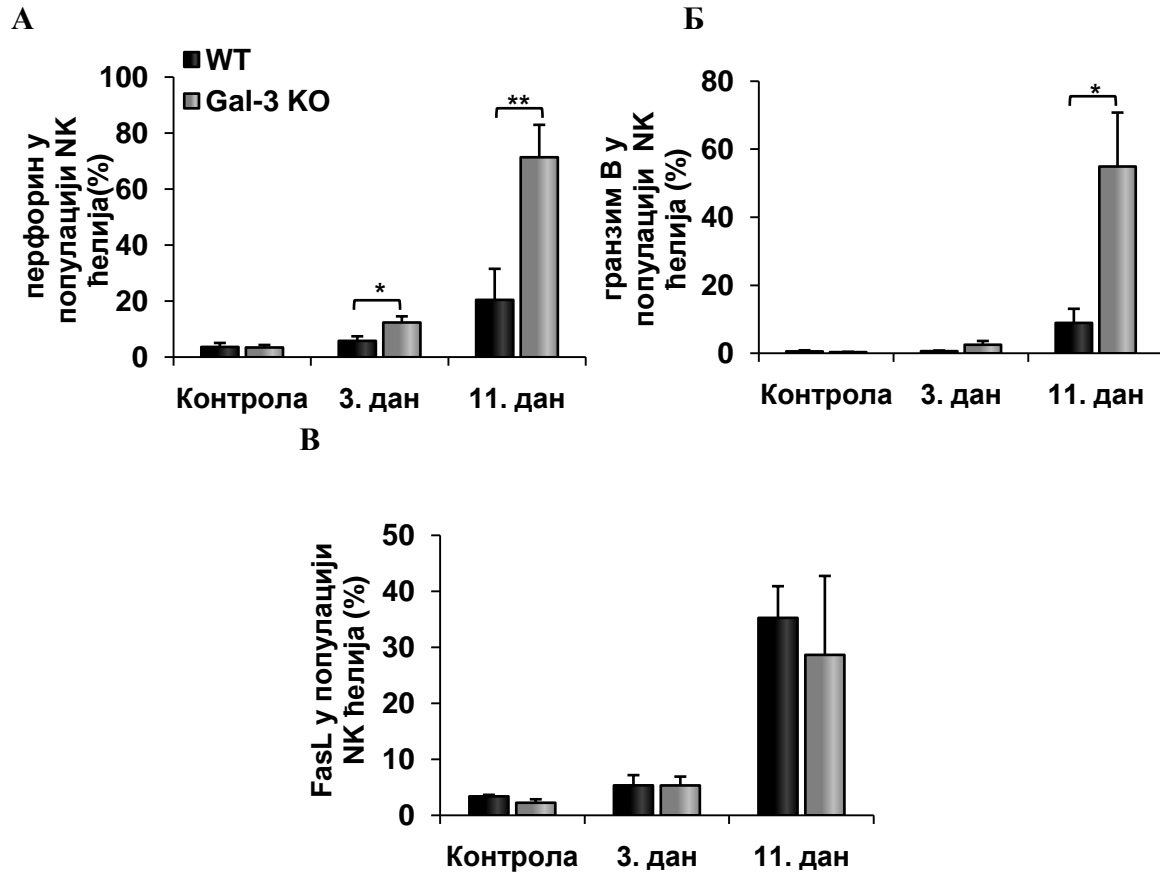
Графикон 7



Графикон 7. Процент NK ћелија у слезини се код Gal-3 дефицијентних мишева повећава тек пет дана после MCMV инфекције. Мононуклеарне ћелије су изоловане из слезина WT и Gal-3 KO нетретираних мишева и 1,5, 3, 5 и 11 дана након интраперитонеалне апликације 1×10^5 PFU MCMV и анализирани проточном цитометријом. Представљене су средње вредности процента NK ћелија (CD49b+CD3-) + SE за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим t тестом; * $p < 0.05$.

Даље је анализиран фенотип NK ћелија у слезини инфицираних мишева у различитим временским интервалима након MCMV инфекције. Уочено је да проценат ћелија које експримирају маркере цитолитичке активности, перфорин и гранзим В, у оквиру популације NK ћелија већи у групи Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 8). Процент ћелија које експримирају перфорин у оквиру популације NK ћелија је статистички значајно већи у групи Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева и 3 и 11 дана након инфекције MCMV-ом (Графикон 8А). Процент ћелија које експримирају гранзим В у оквиру популације NK ћелија је у поређењу са групом WT мишева већи у групи Gal-3 дефицијентних мишева 3 дана после инфекције MCMV-ом, а 11 дана после инфекције та разлика је и статистички значајна (Графикон 8Б). Нема разлике у проценту FASL+ у популацији NK ћелија између нетретираних и инфицираних WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 8В). Међу нетретираним WT и Gal-3 KO мишевима нема разлике у фенотипу NK ћелија у слезини (Графикон 8).

Графикон 8

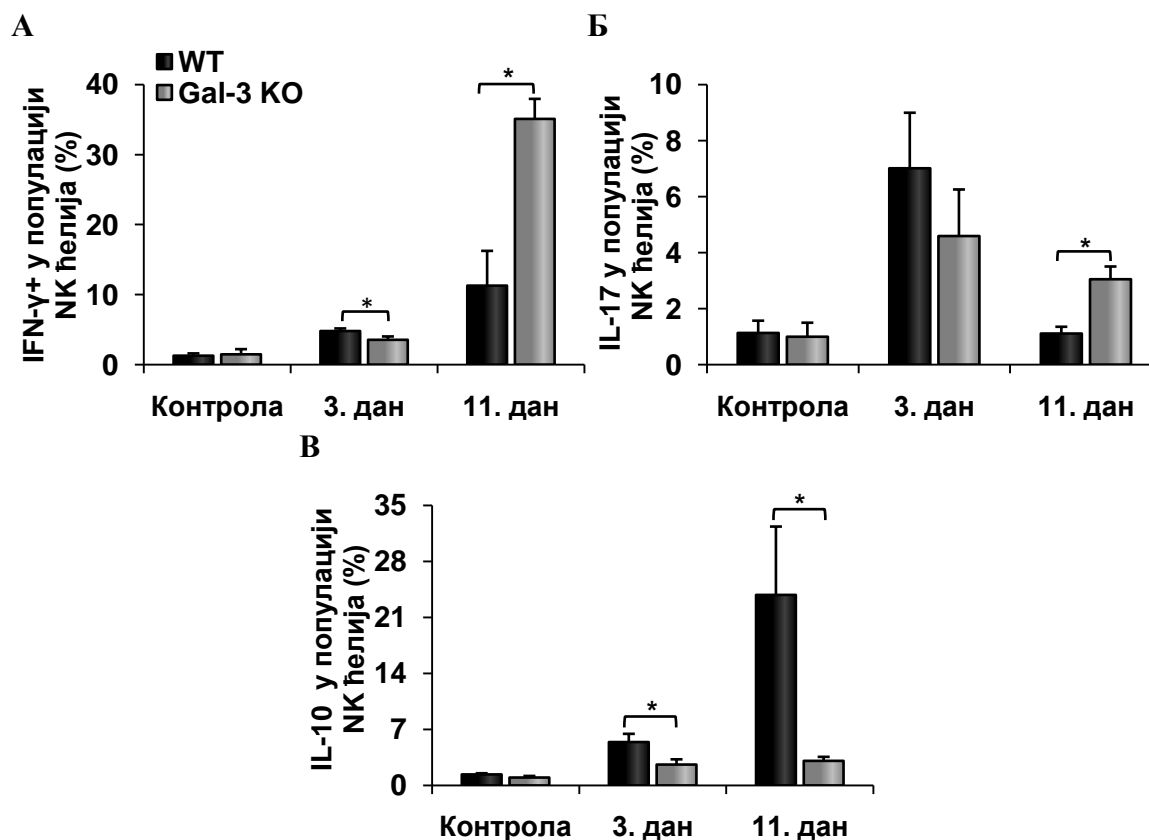


Графикон 8. Одуство галектина-3 значајно повећава проценат цитолитичких ћелија у популацији NK ћелија у слезини мишева инфицираних МСМV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након вирусне инфекције. Представљене су средње вредности + SE процента перфорин+, гранзим В+ и FасL+ ћелија у популацији NK ћелија (CD49b+CD3-) за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим *t* тестом; * $p < 0.05$.

Даљом анализом фенотипских карактеристика NK ћелија је утврђено да је проценат IFN- γ + ћелија у оквиру популације NK ћелија у слезини статистички значајно већи у групи WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева 3 дана након инфекције вирусом. Међутим, 11 дана после инфекције је обрнуто, проценат IFN- γ + ћелија у оквиру популације NK ћелија у слезини је статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева у поређењу са групом WT мишева (Графикон 9А). Процент IL-17+ ћелија у популацији NK ћелија у слезини се повећава после инфекције цитомегаловирусом и у групи WT и у групи Gal-3 KO мишева, али до 11. дана по инфекцији нема значајне разлике између ове две групе, 11 дана после МСМV инфекције је статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева (Графикон 9Б). Процентуална заступљеност антиинфламацијских IL-10+ ћелија у

популацији NK ћелија у слезини је статистички значајно већа у групи WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева и 3 и 11 дана након инфекције MCMV-ом (Графикон 9B).

Графикон 9



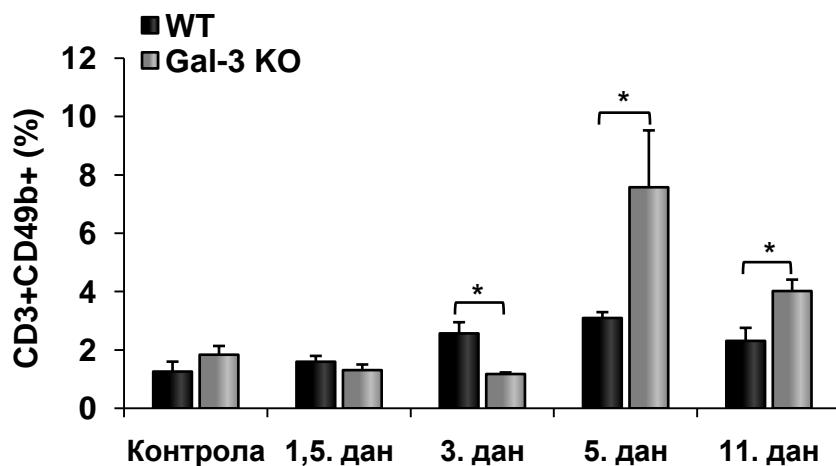
Графикон 9. Одсуство галектина-3 значајно повећава проценат IFN- γ + и IL-17+, а смањује проценат IL-10+ ћелија у популацији NK ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије изоловане из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након вирусне инфекције. Представљене су средње вредности + SE процента IFN- γ +, IL-17+ и IL-10+ ћелија у популацији NK ћелија (CD49b+CD3-) за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; * $p < 0.05$.

4.7. Одсуство галектина-3 успорава пораст процента NKT ћелија и процента IFN- γ позитивних ћелија у популацији NKT ћелија у слезини изазван инфекцијом мишјим цитомегаловирусом

Поред NK ћелија које су кључни регулатори одговора урођене имуности на цитомегаловирус (и MCMV) и NKT ћелије продукују значајну количину IFN- γ који

учествује у контроли МСМV инфекције. Даље је анализиран утицај одуства галектина-3 на заступљеност и фенотипске карактеристике NKT ћелија у слезини инфицираних мишева. Слично налазима који се односе на NK ћелије и проценат NKT (CD3+CD49b+) ћелија је у првим данима (3 дана) после МСМV инфекције статистички значајно већи у слезини WT него у слезини Gal-3 KO мишева, а од петог дана инфекције је обрнуто проценат NKT ћелија статистички је значајно већи у групи Gal-3 KO мишева (Графикон 10).

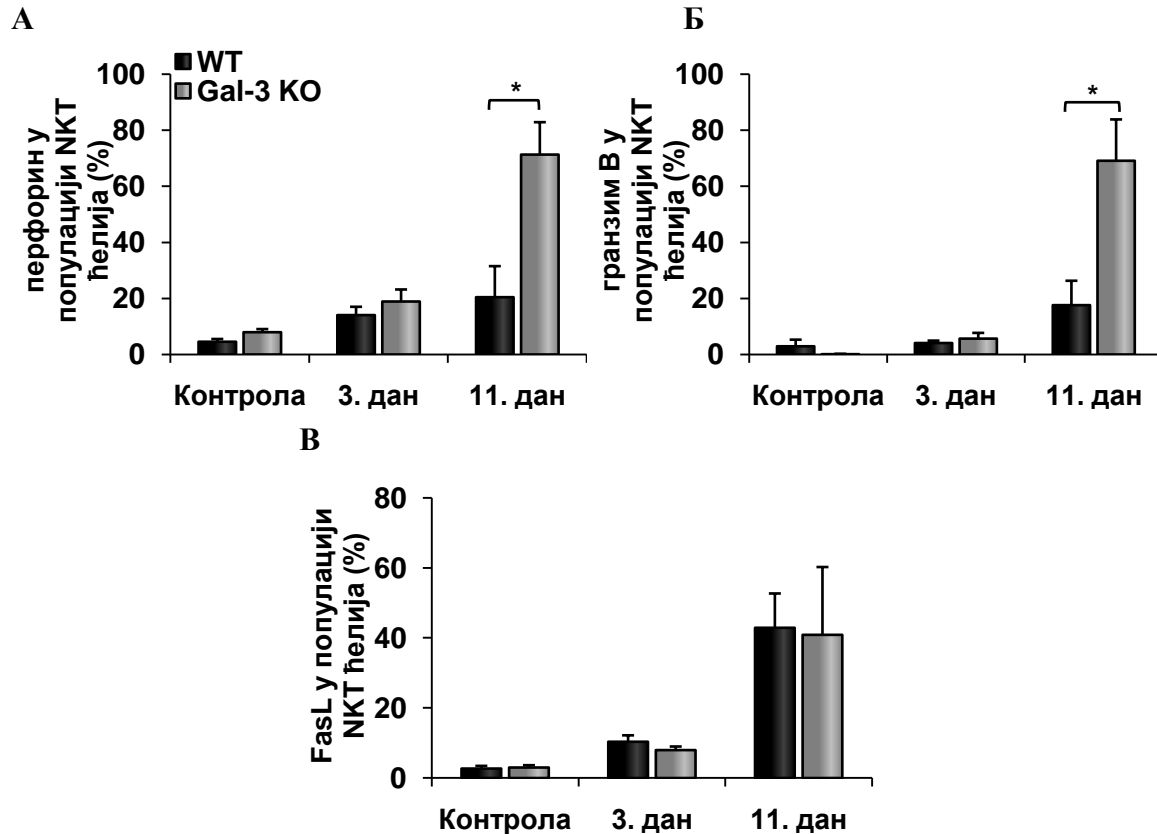
Графикон 10



Графикон 10. Процент NKT ћелија у слезини се код Gal-3 дефицијентних мишева повећава тек пет дана после МСМV инфекције. Мононуклеарне ћелије су изоловане из слезина WT и Gal-3 KO нетретираних мишева и 1,5, 3, 5 и 11 дана након интраперитонеалне апликације 1×10^5 PFU МСМV и анализирани проточном цитометријом. Представљене су средње вредности процента NKT ћелија (CD49b+CD3+) + SE за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим *t* тестом; * $p < 0.05$.

Инфекција цитомегаловирусом повећава заступљеност ћелија које експримирају маркере цитолитичке активности у популацији NKT ћелија у обе групе мишева и WT и Gal-3 KO (Графикон 11). Процент перфорин+ (Графикон 11А) и гранзим В+ (Графикон 11Б) ћелија у популацији NKT ћелија у слезини је статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева 11 дана после инфекције цитомегаловирусом у поређењу са WT мишевима. Нема разлике међу групама инфицираних мишева у проценту FASL+ ћелија у популацији NKT ћелија ни 3 ни 11 дана после инфекције (Графикон 11В).

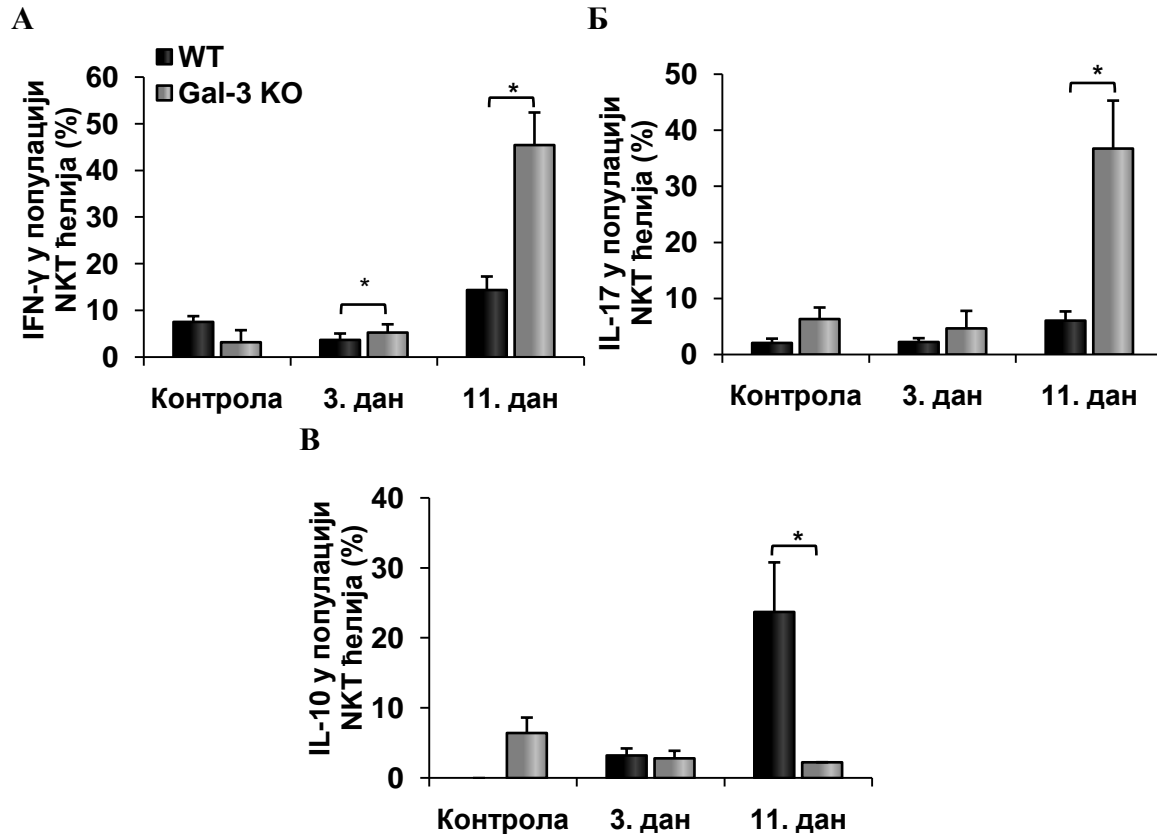
Графикон 11



Графикон 11. Одсуство галектина-3 значајно повећава проценат цитолитичких ћелија у популацији NKT ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након вирусне инфекције. Представљене су средње вредности + SE процента перфорин+, гранзим В+ и FasL+ ћелија у популацији NKT ћелија за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим *t* тестом; * $p < 0.05$.

Процент $IFN-\gamma^+$ ћелија у популацији NKT ћелија у слезини је статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева у поређењу са групом WT мишева и 3 и 11 дана после инфекције мишијим цитомегаловирусом (Графикон 12А). Слично, проценат $IL-17^+$ ћелија у NKT популацији у слезини је тек 11 дана после инфекције статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева у поређењу са групом WT мишева (Графикон 12Б). Са друге стране, проценат ћелија које експримирају антиинфламацијски цитокин $IL-10$ у популацији NKT ћелија у слезини је статистички значајно већи 11 дана после инфекције у групи WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева (Графикон 12В).

Графикон 12



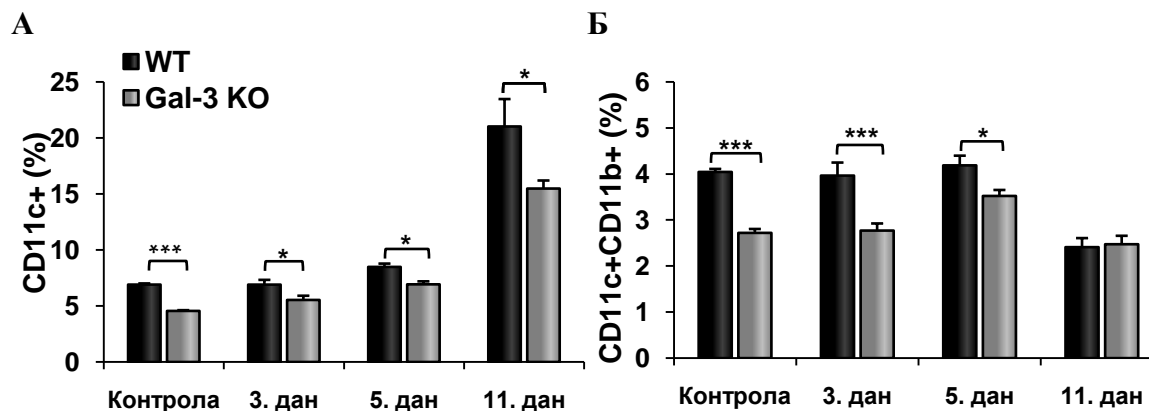
Графикон 12. Одсуство галектина-3 значајно повећава проценат IFN- γ + и IL-17+, а смањује проценат IL-10+ ћелија у популацији NKT ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије изоловане из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након вирусне инфекције. Представљене су средње вредности + SE процента IFN- γ +, IL-17+ и IL-10+ ћелија у популацији NKT ћелија за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим *t* тестом; * $p < 0.05$.

4.8. Дефицијенција галектина-3 је удружена са мањим процентом инфламацијских CD11b+ ћелија у слезини мишева инфицираних мишјим цитомегаловирусом

Пошто преживљавање, пролиферацију и цитотоксичку активност NK ћелија подстичу цитокини које продукују дендритске ћелије и макрофаги (20, 228, 229) анализирана је заступљеност и карактеристике ћелија које презентују антигене у слезини WT и Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. Процент CD11c+ дендритских ћелија је статистички значајно већи у слезини здравих, нетретираних WT мишева, али и у свим испитиваним временским интеравлима по инфекцији MCMV-ом у поређењу са инфицираним Gal-3 KO мишевима (Графикон 13А). Процент CD11b+ дендритских ћелија које такође продукују проинфламацијске цитокине којима активирају NK ћелије (228) је статистички значајно

већи у слезини WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева у контролним групама мишева, али и 3 и 5 дана по инфекцији MCMV-ом (Графикон 13Б).

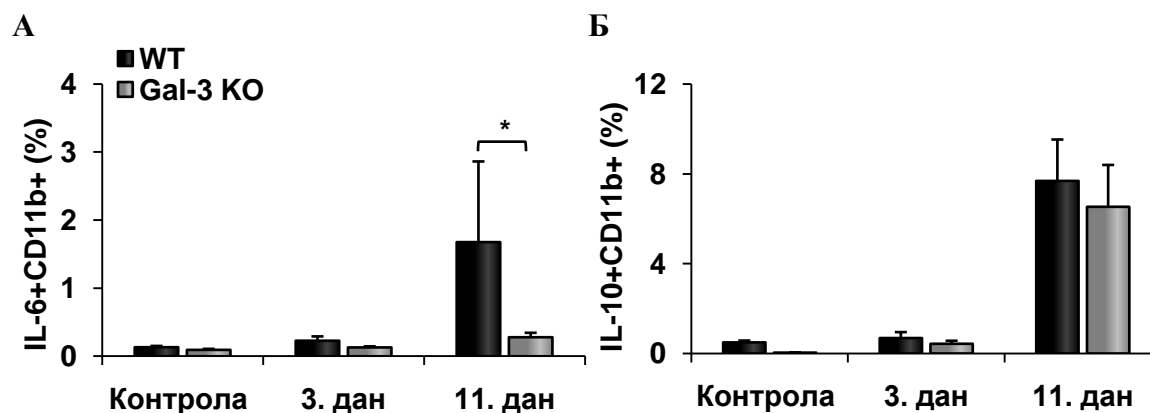
Графикон 13



Графикон 13. Одсуство галектина-3 смањује проценат дендритских ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије су изоловане из слезина WT и Gal-3 KO нетретираних мишева и 3, 5 и 11 дана након интраперитонеалне апликације 1×10^5 PFU MCMV и анализирани проточном цитометријом. Представљене су средње вредности процента CD11c+ и CD11c+CD11b+ ћелија + SE за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим t тестом; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Анализа експресије цитокина у ћелијама које приказују антигене проточном цитометријом указује да је продукција проинфламацијских цитокина мања у групи Gal-3 KO мишева. Као што се види на Графикону 14А проценат CD11b+ ћелија које експримирају IL-6 у слезини је статистички значајно већи у групи WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева, 11 дана након инфекције вирусом. Нема статистички значајне разлике у проценту CD11b+ ћелија које експримирају IL-10 између WT и Gal-3 KO групе мишева ни пре ни после инфекције MCMV-ом (Графикон 14Б).

Графикон 14

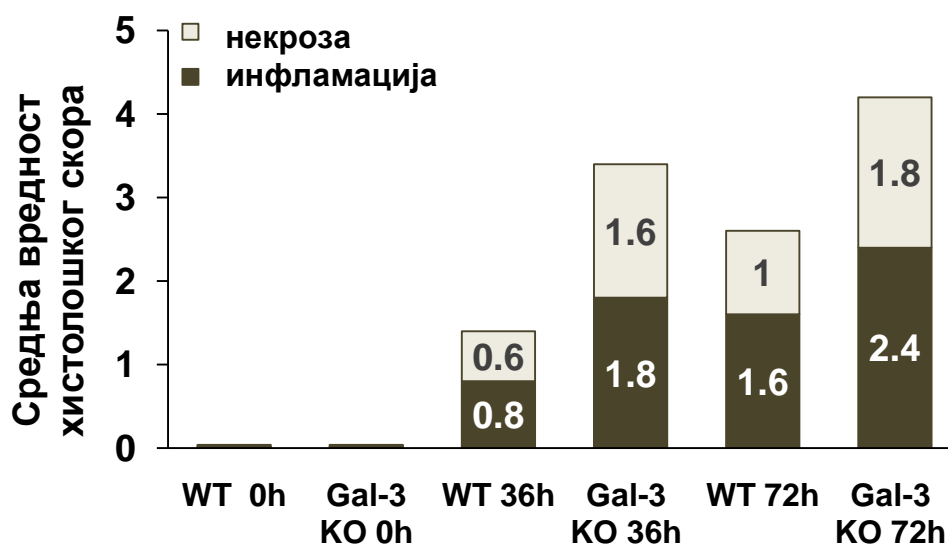


Графикон 14. Одсуство галектина-3 смањује проценат инфламацијских CD11b⁺ ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије су изоловане из слезина WT и Gal-3 KO нетретираних мишева и 3, 5 и 11 дана након интраперитонеалне апликације 1×10^5 PFU MCMV и анализирание проточном цитометријом. Представљене су средње вредности процента CD11b⁺IL-6⁺ и CD11b⁺IL-10⁺ ћелија + SE за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим t тестом; * $p < 0.05$.

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

Познато је да имунски одговор на MCMV у великој мери изазива оштећење ткива у току инфекције. Како је између WT и Gal-3 KO мишева уочена значајна разлика у карактеристикама НК и НКТ ћелија у слезини и у раној и касној фази MCMV инфекције (Графикони 8, 9, 11 и 12) даље је испитиван утицај галектина-3 на тежину хепатитиса који C57BL/6 мишеви развијају рано по инфекцији 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 2). 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 (Слика 2, Графикон 15). Већа некротична поља и већи инфламацијски фокуси су уочени у јетрама Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом (Слика 2). Сличне разлике у величини некротичних поља између Gal-3 KO и WT мишева су уочене 72 сата након MCMV инфекције (Слика 2). 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 2).

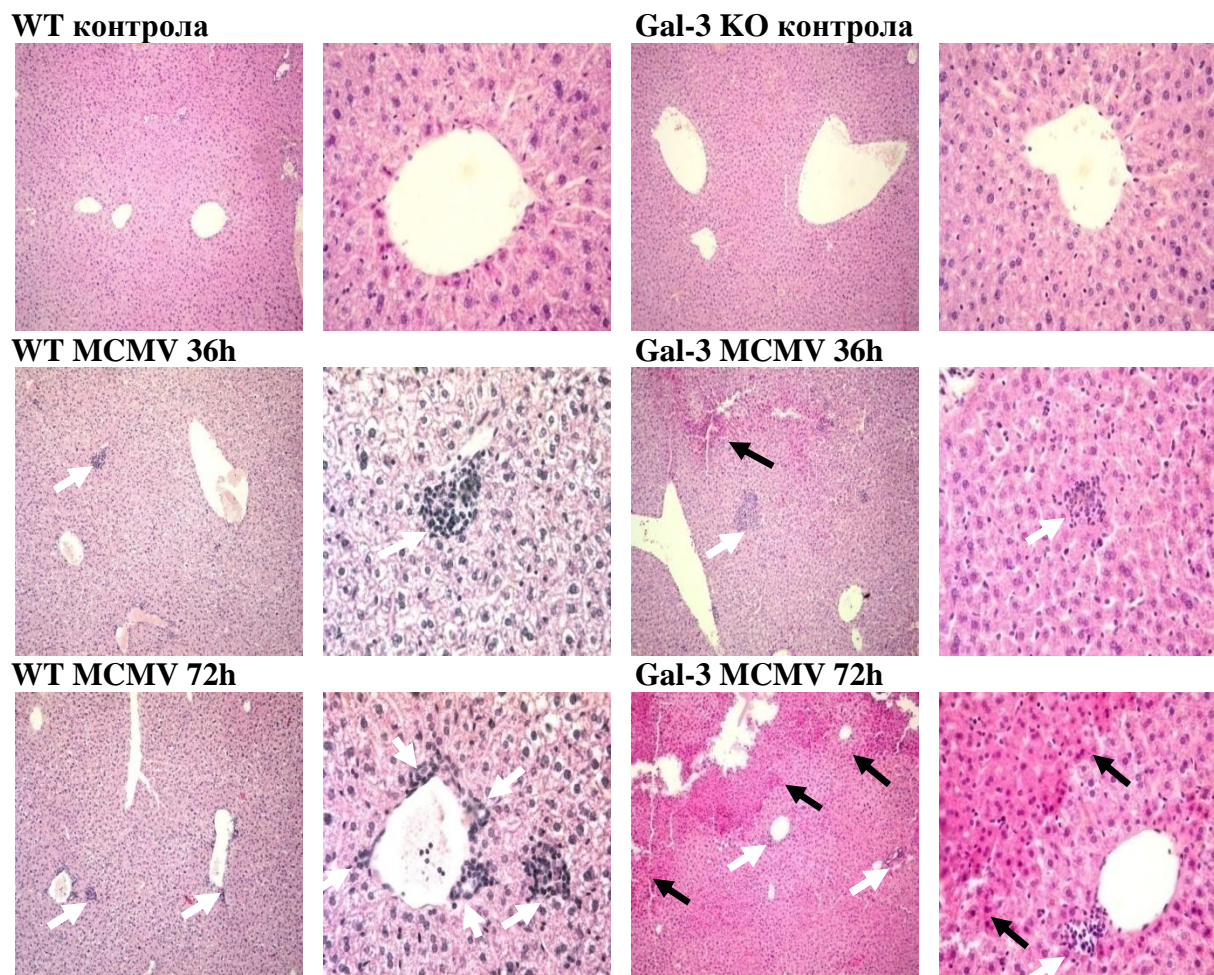
Графикон 15



Графикон 15. Инфламација и некроза јетре су израженије код Gal-3 KO мишева 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 скорa из 2 одвојена експеримента са 6 мишева по групи.

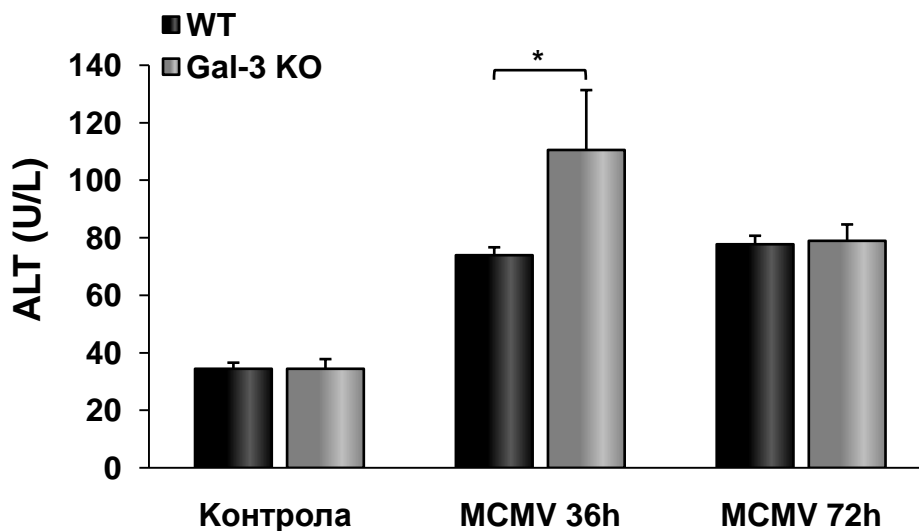
Слика 2



Слика 2. Патохистолошки исечци ткива јетре WT и Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Приказани су примери патохистолошких исечка 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.

Иако је инфекција HCMV-ом субклиничка код имунокомпетентних особа, често је праћена повишеним вредностима концентрације трансаминаза у серуму. Испитивана је концентрација аланин трансаминазе (ALT) у серуму инфицираних мишева. У складу са хистолошким налазима, нађени су статистички значајно веће концентрације ALT-а у серуму у групи Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом, у поређењу са групом WT мишева (Графикон 16).

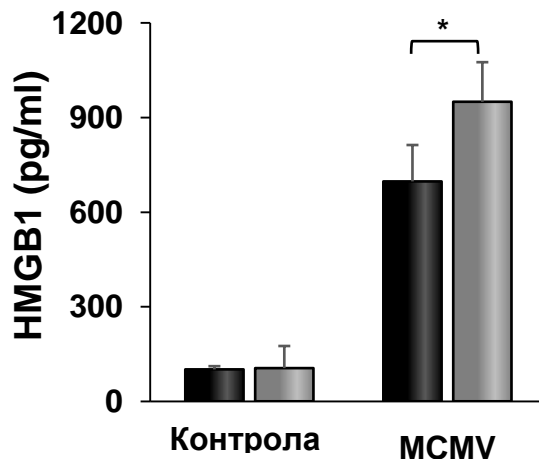
Графикон 16



Графикон 16. 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; * $p < 0.05$).

Узимајући у обзир да је велики број некротичних поља присутан у исечцима јетре Gal-3 KO мишева (Слика 2, Графикон 15) и да MCMV има способност да индукује некроптозу (230), испитивани су маркери некроптоичне смрти, HMGB1 (енгл. *High mobility group box 1*) у хомогенатима ткива јетре и мембранска експресија калретикулина на хепатоцитима, 36 сати након инфекције MCMV-ом. Статистички значајно већа концентрација HMGB1 је утврђена у хомогенатима јетре (Графикон 17) Gal-3 KO мишева у поређењу са WT мишевима 36 сати након инфекције MCMV-ом.

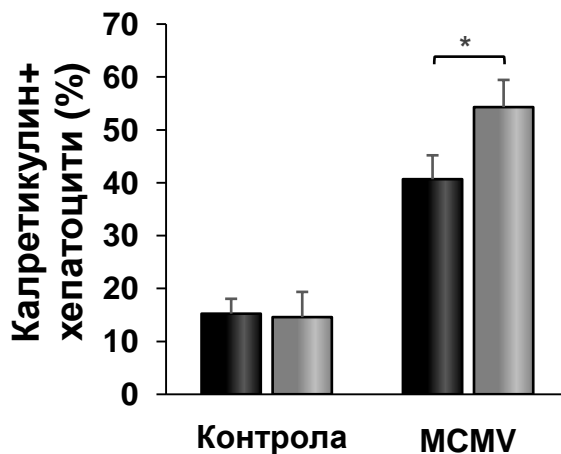
Графикон 17



Графикон 17. Концентрација HMGB1 је статистички значајно већа у хомогенату ткива јетре Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом. Концентрације HMGB1 у хомогенатима ткива јетре (100 mg) су одређене ELISA методом 36 сати после инфекције MCMV-ом. Представљена је средња вредност + SE HMGB1 концентрације, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест; * $p < 0.05$).

Израженија некроптотска смрт хепатоцита је потврђена и налазом статистички значајно већег процента калретикулин позитивних хепатоцита у групи Gal-3 KO мишева у поређењу са WT мишевима 36 сати након инфекције MCMV-ом (Графикон 18).

Графикон 18

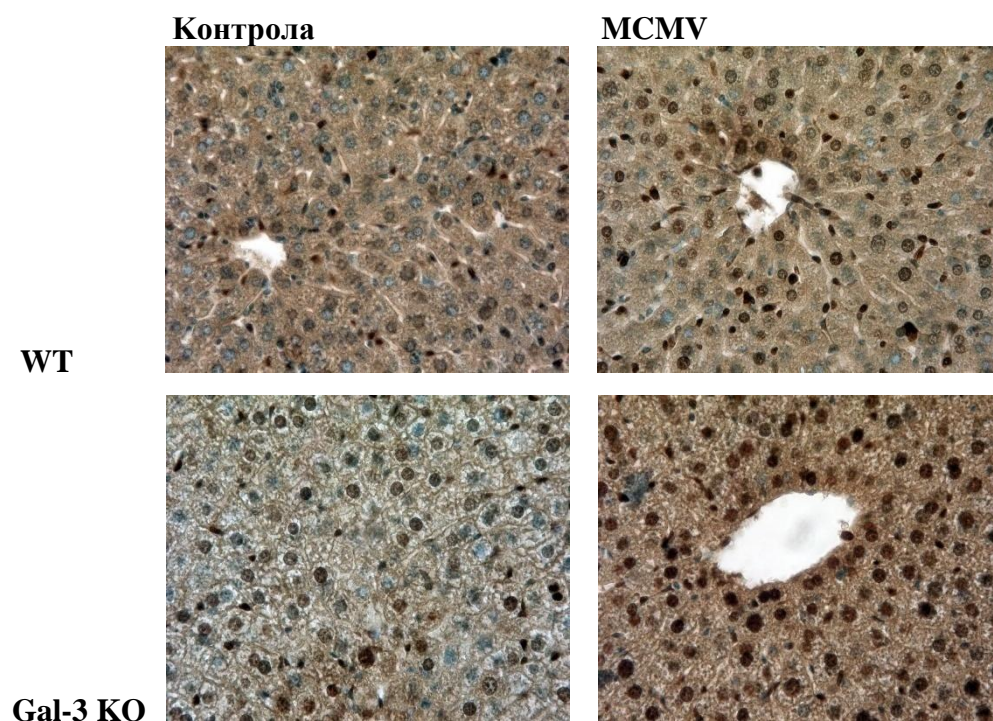


Графикон 18. Процент калретикулин+ хепатоцита је већи у јетри Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом. Процент калретикулин+ хепатоцита је одређен проточном цитометријом 36 сати након инфекције MCMV-ом. Подаци су представљени као средња вредност калретикулин+ хепатоцита + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

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

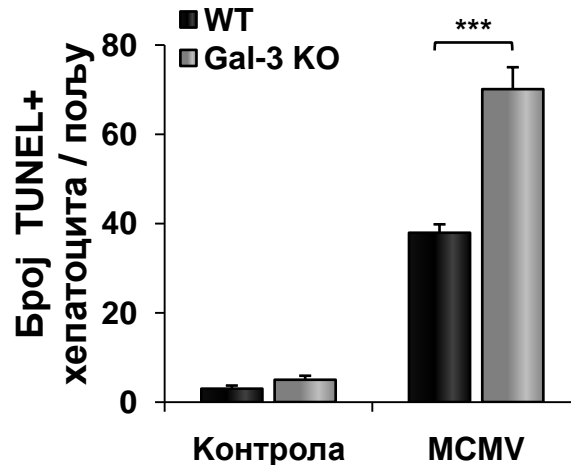
Да бисмо даље анализирали оштећење јетре код WT и Gal-3 KO мишева након инфекције MCMV-ом, користили смо TUNEL тест (означавање посредовано терминалом деоксинуклеотидил трансферазом, dUTP) за *in situ* детекцију фрагментације дезоксирибонуклеинске киселине. Као што је приказано на Слици 3 и на Графикону 19, 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.

Слика 3



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

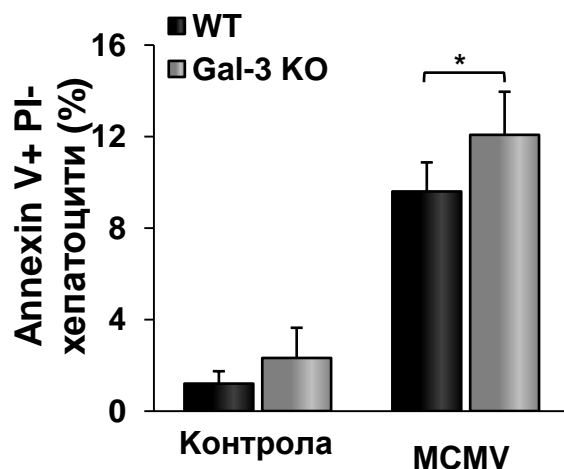
Графикон 19



Графикон 19. Број апоптотских, TUNEL позитивних хепатоцита је статистички 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; *** $p < 0.001$).

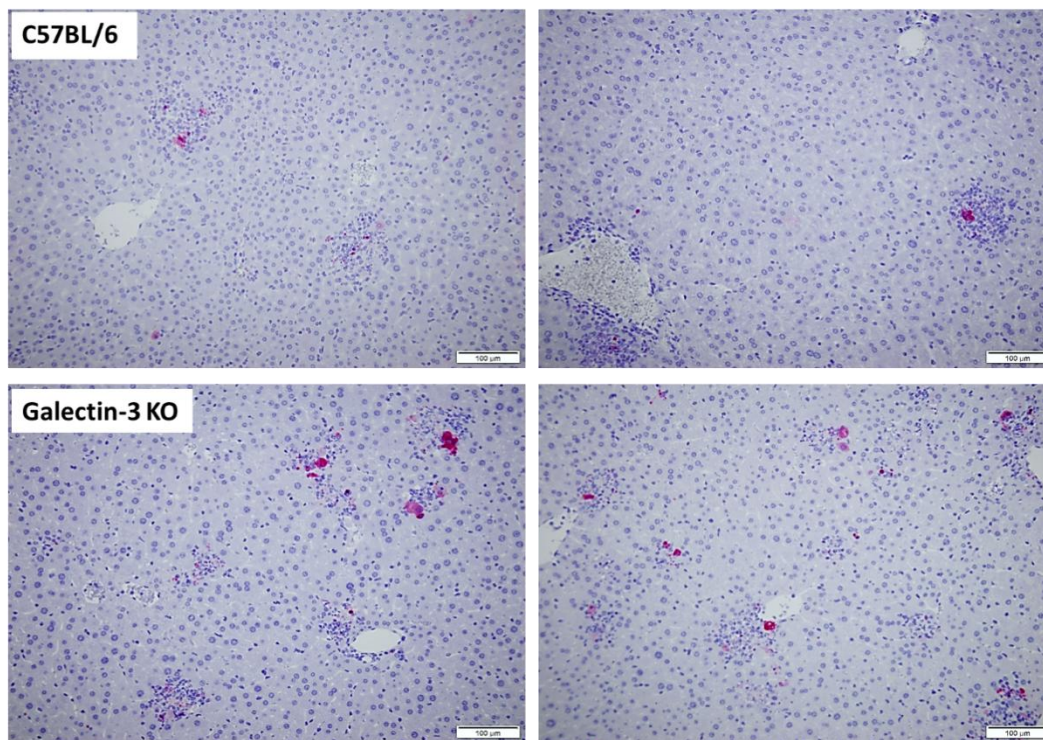
Да бисмо потврдили повећану апоптозу хепатоцита код Gal-3 KO мишева, изоловали смо хепатоците из WT и Gal-3 KO мишева 72 сата након MCMV инфекције и одредили смо проценат апоптотских ћелија проточном цитометријом. Детектовали смо статистички значајно већи проценат апоптотских, *Annexin V* позитивних хепатоцита изолованих из инфицираних Gal-3 KO мишева у поређењу са инфицираним WT мишевима (Графикон 20). Да бисмо још једном потврдили повећану апоптозу хепатоцита код Gal-3 KO мишева, урађена је имунохистохемијска анализа експресије каспазе-3 у исечцима јетре. Као што је приказано на Слици 4, 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.

Графикон 20



Графикон 20. Процент апоптотских, *AnnexinV+PI-* хепатоцита је статистички значајно већи код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. Апоптоза хепатоцита је анализирана методом проточне цитометрије помоћу *Annexin V* (FITC) и пропијидијум 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 4



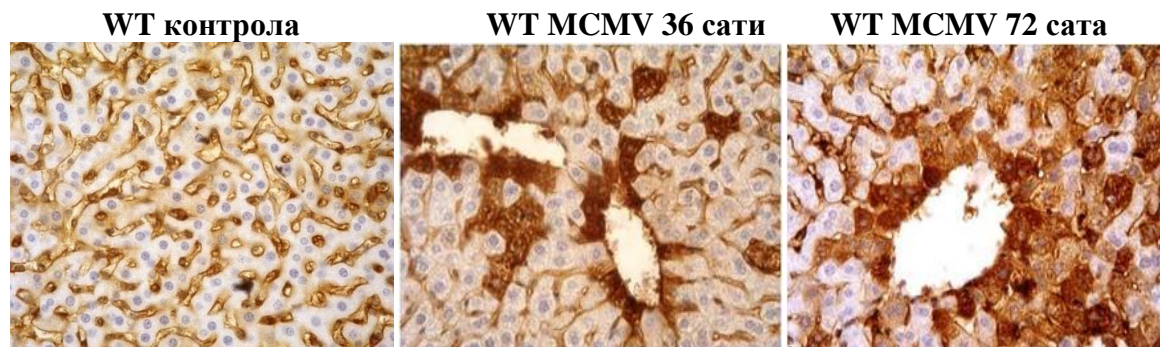
Слика 4. Имунохистохемијско бојење препарата јетре. Апоптотски хепатоцити су детектовани анти-каспаза-3 бојењем (приказани црвеном бојом). Апоптотски хепатоцити су бројнији код Gal-3 KO мишева 72 сата након инфекције MCMVΔm157 вирусом.

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

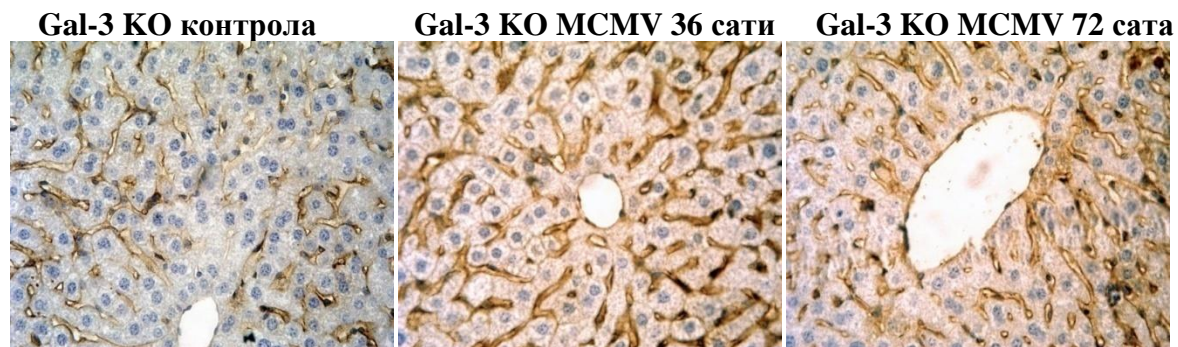
Галектин-3 има различиту улогу у патогенези тумора и у патогенези бројних хроничних инфламацијских болести (124, 231-233). Познато је да билијарне епителне ћелије и хепатоцити здравих C57BL/6 мишева имају веома слабу експресију галектина-3 (234). Показано је да појачана експресија галектина-3 постоји код пацијената са хепатитисом који је индукован вирусом (235). 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 након МСМV инфекције (слика 5А). Експресија галектина-3 није уочена у хепатоцитима неинфицираних мишева и Gal-3 KO мишева инфицираних МСМV-ом (слика 5Б).

Слика 5

А



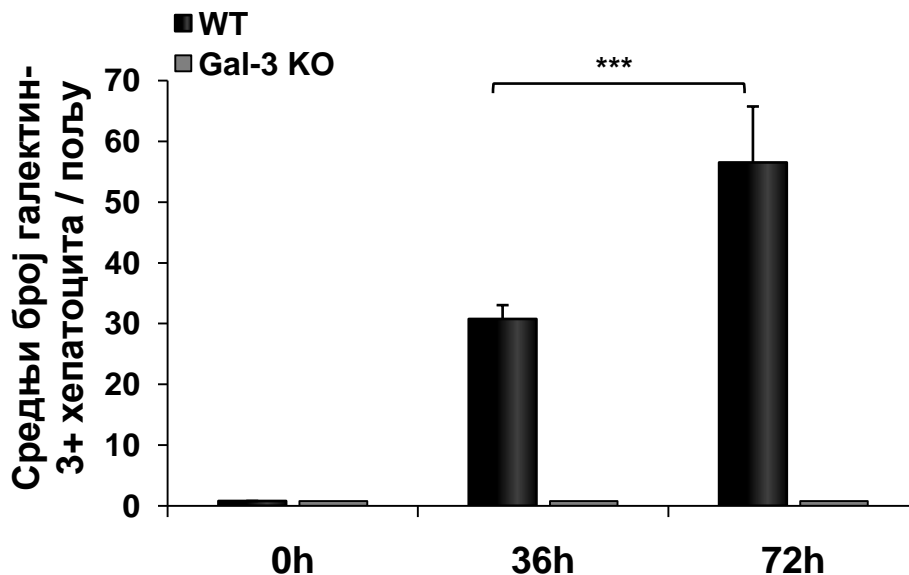
Б



Слика 5. Приказ имунохистохемијски регистроване експресије Gal-3 у исечцима јетре инфицираних WT и Gal-3 KO мишева. Репрезентативни исечци експресије галектина-3 у јетрама WT и Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције МСМV-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 МСМV-ом.

Да би се квантификовала експресија галектина-3 у јетри инфицираних мишева, бројани су галектин-3 позитивни хепатоцити у десет различитих поља на препарату и приказани су као средњи број галектин-3+ хепатоцита + SD. У јетри Gal-3 KO мишева нема галектин-3 позитивних хепатоцита као ни у јетри нетртрираних WT мишева (Графикон 21). Већ 36 сати по инфекцији је у јетри WT мишева присутан значајан број галектин-3 позитивних хепатоцита, а 72 сата након инфекције MCMV-ом број ових ћелија по видном пољу је статистички значајно већи у поређењу са бројем галектин-3 позитивних хепатоцита 36 сати након MCMV инфекције (Графикон 21).

Графикон 21



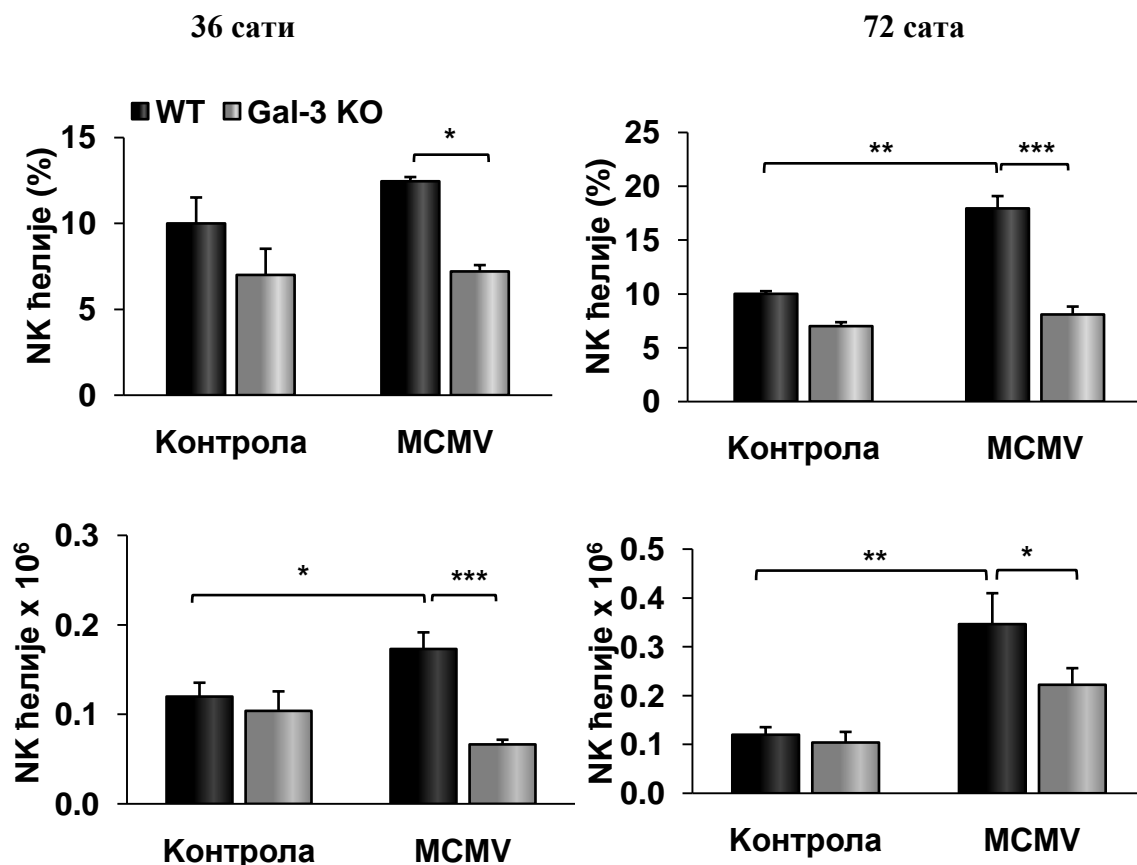
Графикон 21. Инфекција MCMV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима. Број галектин-3 позитивних хепатоцита је пребројаван у десет различитих поља и приказан је као средњи број галектин-3 позитивних хепатоцита по пољу + SD. Један репрезентативни експеримент, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест; *** $p < 0.001$).

4.12. Тежа болест код Gal-3 KO мишева је независна од активности NK ћелија

Узимајући у обзир чињенице да NK ћелије играју кључну улогу у раном имунском одговору против MCMV-а код C57BL/6 мишева (206) и да NK ћелије доприносе оштећењу јетре код вирусних инфекција (236), 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 22). Са друге стране, MCMV инфекција је индуковала статистички значајно повећање процента и укупног броја NK ћелија у јетри инфицираних WT мишева у односу на неинфициране WT мишеве (Графикон 22). Такође, проценат и укупан број NK ћелија је статистички значајно већи у јетри WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева, 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 22).

Графикон 22



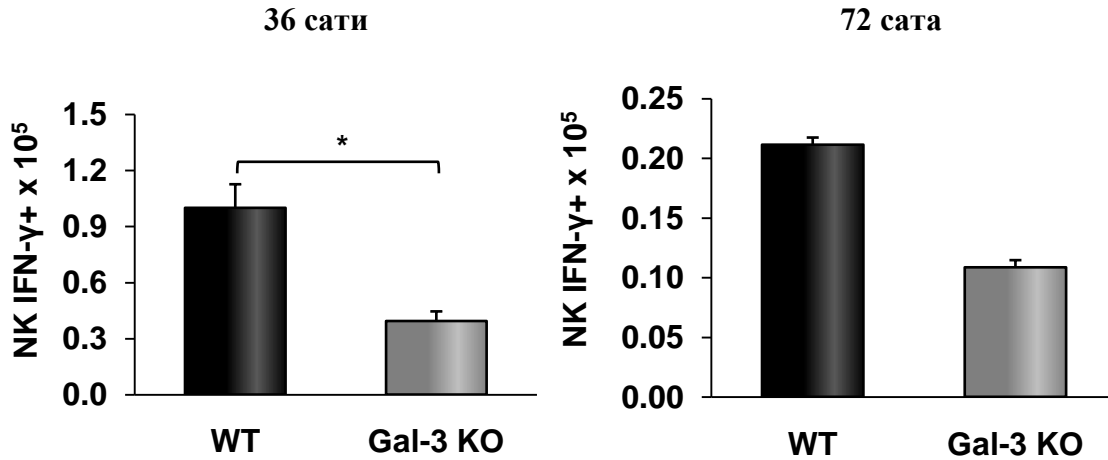
Графикон 22. Код инфицираних Gal-3 KO мишева је присутан мањи проценат и укупан број NK ћелија у јетри. Методом проточне цитометрије су анализирани мононуклеарне ћелије 36 и 72 сата после инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (Student- t тест; * $p < 0.05$).

Укупан број IFN- γ + NK ћелија је статистички значајно 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 23А). Укупан број IL-17+ NK

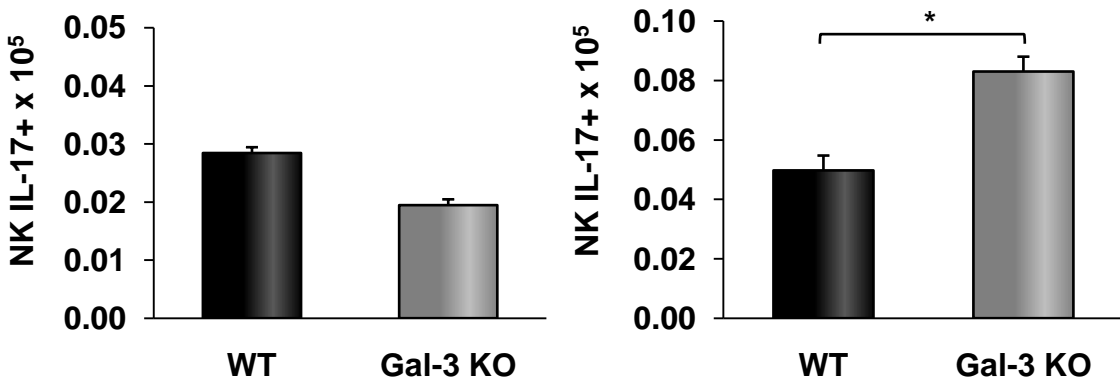
ћелија је статистички значајно већи код Gal-3 KO мишева у односу на WT мишеве, 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 23Б). Такође, укупан број NK ћелија које експримирају IL-10 је статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева, 36 сати након инфекције MCMV-ом у поређењу са групом WT мишева (Графикон 23В).

Графикон 23

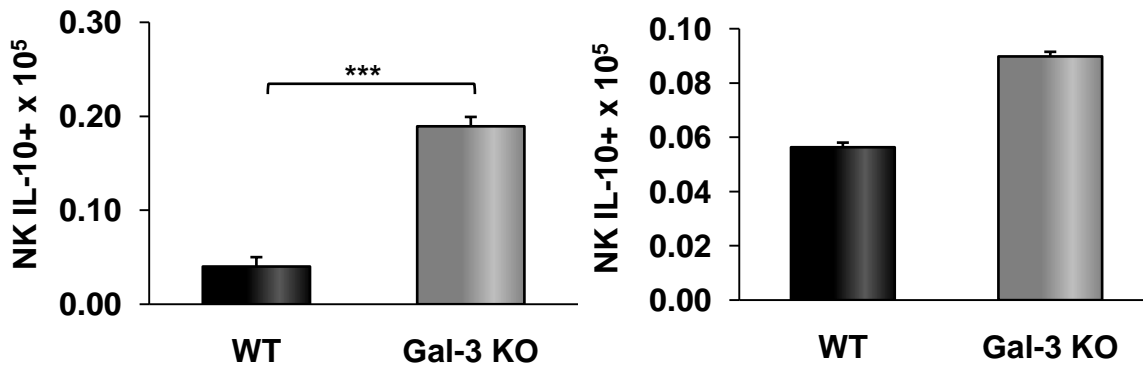
А



Б



В

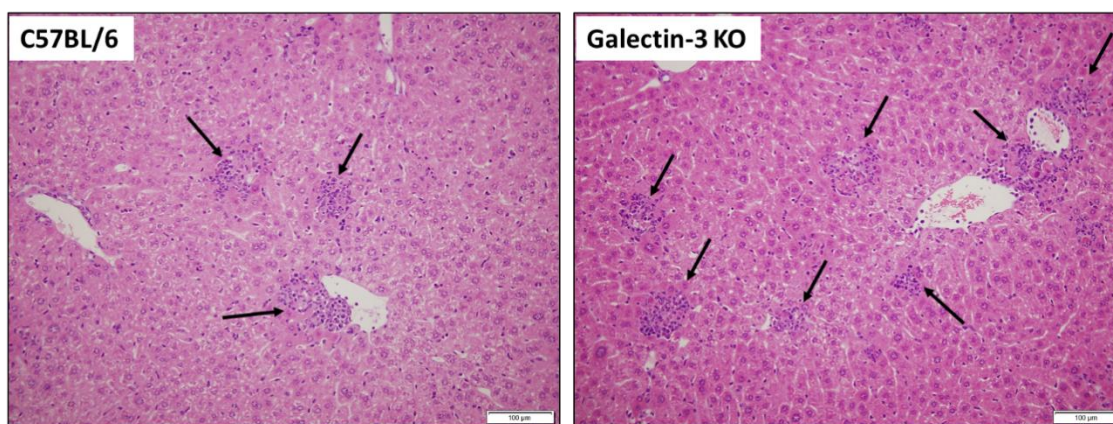


Графикон 23. У јетрама инфицираних WT мишева су бројније инфламацијске NK ћелије упркос чињеници да је оштећење јетре израженије код Gal-3 KO мишева. Мононуклеарне ћелије су анализиране

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

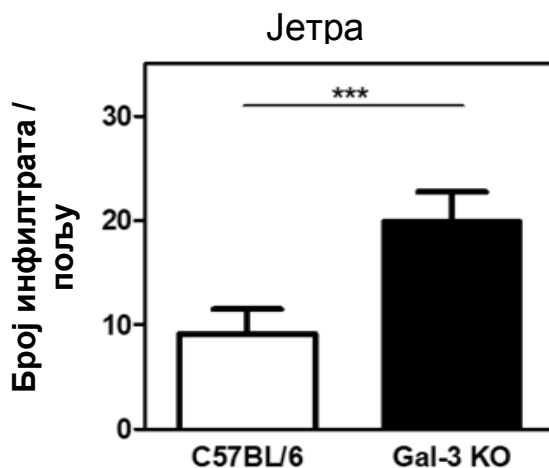
Да би се искључила улога НК ћелија у већем оштећењу јетре код Gal-3 KO мишева, анализирали смо оштећење јетре код WT и Gal-3 KO мишева након инфекције мутантним сојем МСМV вируса (**МСМV Δ m157**), којем недостаје m157 протеин који активира НК ћелије. Инфламацијски ћелијски инфилтрати се уочавају у ткиву јетре инфицираних WT и Gal-3 KO мишева (Слика 6). Није било разлике у величини инфилтрата између ове две групе мишева, али број инфилтрата је статистички значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 24).

Слика 6



Слика 6. Хистолошки исечци ткива јетре WT и Gal-3 KO мишева 72 сата након инфекције МСМV Δ m157 вирусом. WT и Gal-3 KO мишеви су инфицирани i.v. МСМV Δ m157 вирусом са 2×10^5 PFU/животињи. Ткиво јетре је екстирпирано 72 сата после инфекције МСМV Δ m157 вирусом и исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Црне стрелице означавају инфламацијске ћелијске инфилтрате.

Графикон 24

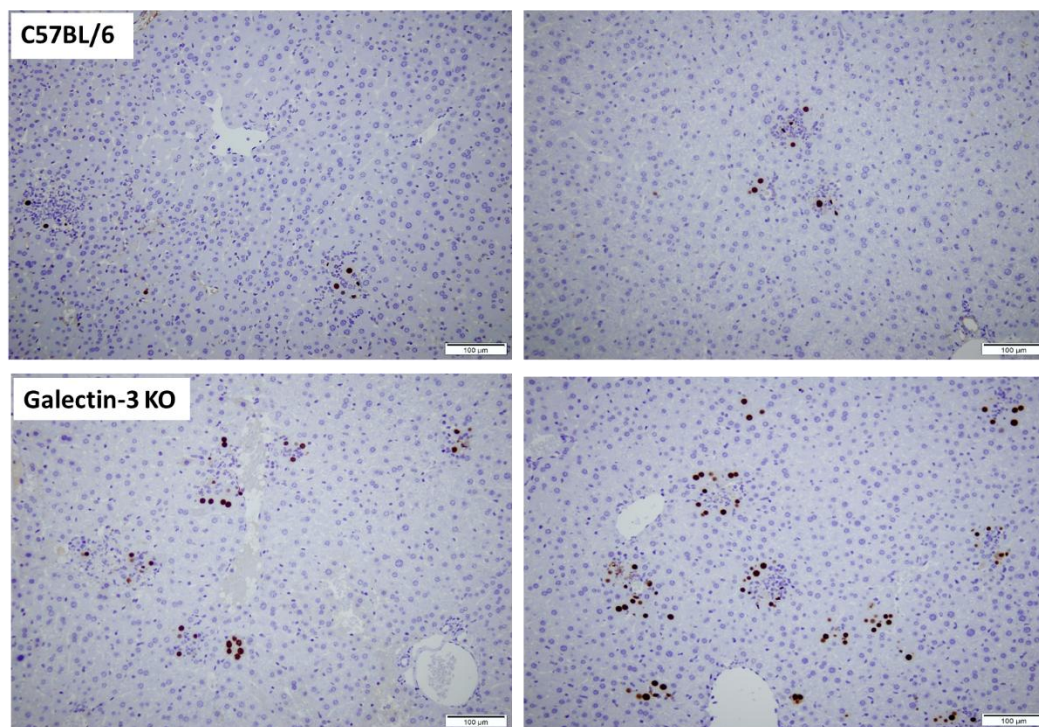


Графикон 24. Инфламацијски ћелијски инфилтрати су бројнији у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV Δ m157 вирусом. Број инфламацијских инфилтрата је пребројан и приказан као број инфилтрата по пољу + SE. Један репрезентативни експеримент, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест; *** $p < 0.001$).

4.13. У јетри Gal-3 KO мишева је присутно више вирусом инфицираних ћелија

Да би се у ткиву јетре потврдило присуство ћелија које су инфициране вирусом, у исечцима је детектовано присуство непосредно раних гена мишјег цитомегаловируса. Исецци јетре су имунохистохемијски обојени анти-IE1 антителом. Као што је приказано на Слици 7, у ткиву јетре Gal-3 KO мишева је уочен већи број ћелија и хепатоцита и ћелија мононуклеарног инфилтрата које експримирају антиген вируса.

Слика 7

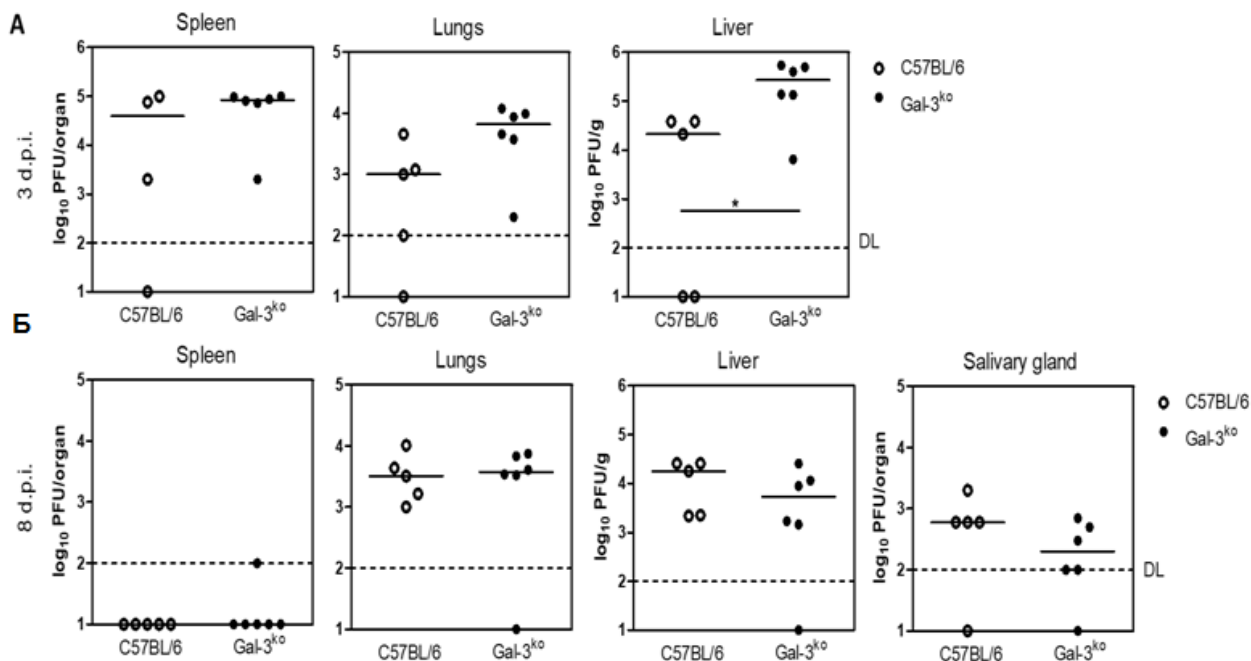


Слика 7. Имунохистохемијско бојење исечкака ткива јетре. Репрезентативни примери еспресије непосредно раног гена мишјег цитомегаловируса, IE1, у ткиву јетре (браон боја), 72 сата након инфекције MCMV Δ m157 вирусом.

С обзиром на предходни налаз да Gal-3 KO 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 25А, очекивани титар вируса је присутан у

слезини WT мишева 3 дана након инфекције вирусом. Код Gal-3 KO мишева нису уочене битне разлике у вирусном титру у слезини у односу на WT мишове, 3 дана након инфекције вирусом. Постоји повишени титар вируса у плућима Gal-3 KO мишева, али разлике нису биле статистички значајне. Међутим, у јетри Gal-3 KO 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 KO миша (Графикон 25Б). У плућима, јетри и пљувачним жлездама, детектовани су вирусни титри, али нису забележене статистички значајне разлике између ове две групе мишева (Графикон 25Б).

Графикон 25



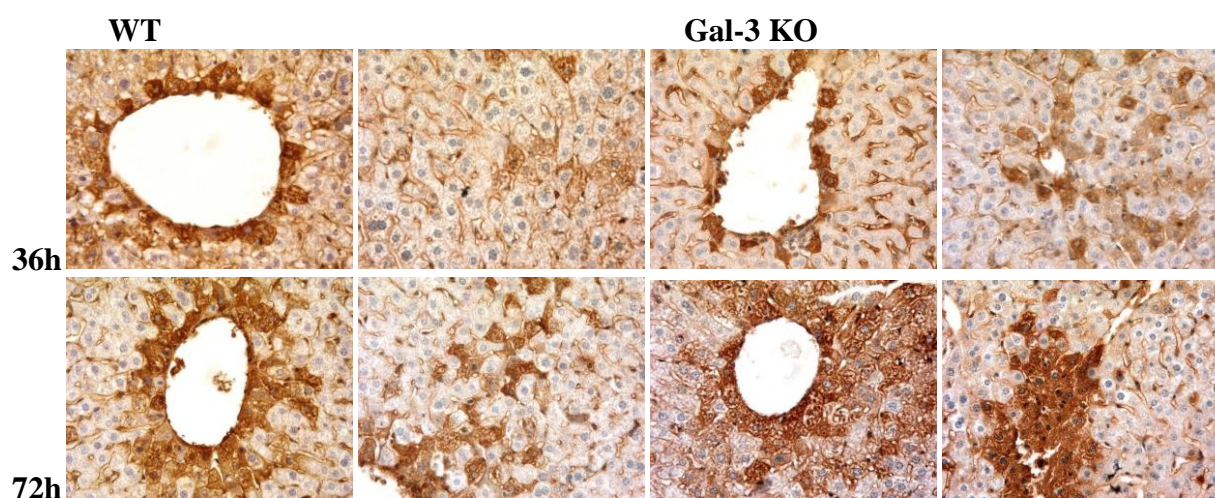
Графикон 25. Gal-3 KO мишеви имају повишене титре вируса рано након инфекције. WT и Gal-3 KO мишеви су инфицирани i.v. MCMVΔm157 вирусом са 2×10^5 PFU/животињи. Вирусни титри у појединачним органима су одређени стандардним тестом плака 3 дана (A) и 8 дана (B) након инфекције. Свака тачка представља појединачну животињу, а црта представља средишњи титар вируса.

4.14. 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 измењене 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 (200). Такође је познато да сигнализација са TNF- α покреће некроптозу (237). У циљу даљег разјашњавања улоге TNF- α код оштећења ткива јетре, 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).

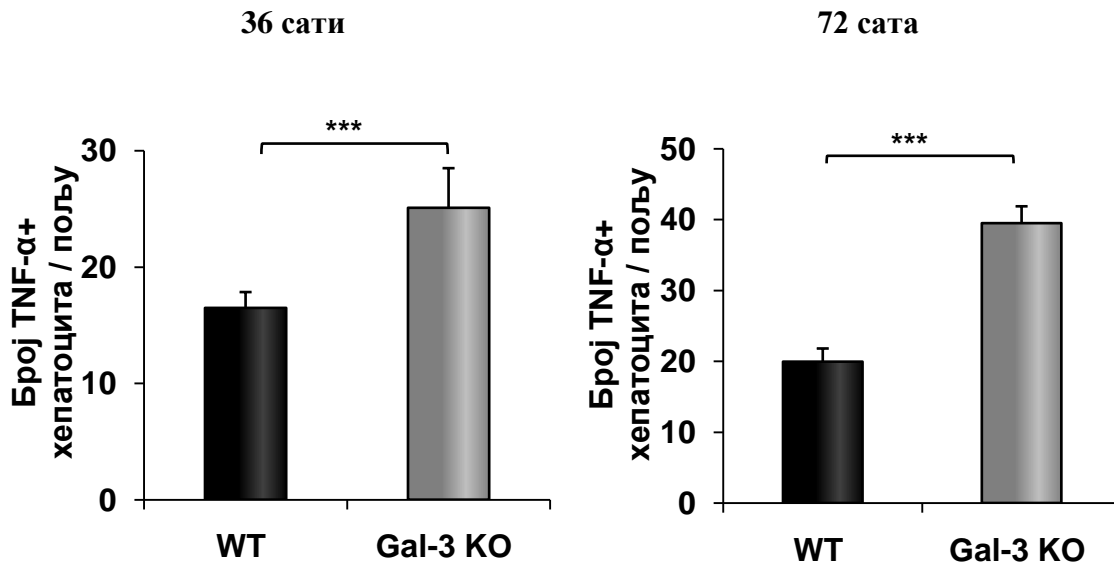
Слика 8



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.

Број TNF- α позитивних хепатоцита је статистички значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева у односу на инфициране WT мишеве, 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 26).

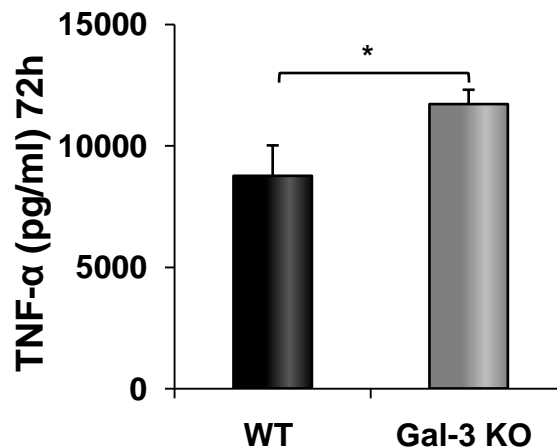
Графикон 26



Графикон 26. Број TNF- α позитивних хепатоцита је статистички значајно већи код Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције МСМВ-ом. Исечци јетре инфицираних мишева обе групе су имунохистохемијски обојени 36 и 72 сата после инфекције МСМВ-ом. 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; *** $p < 0.001$).

Такође, концентрација TNF- α у хомогенату ткива јетре је статистички значајно већа у групи Gal-3 KO мишева, 72 сата након МСМВ инфекције (Графикон 27).

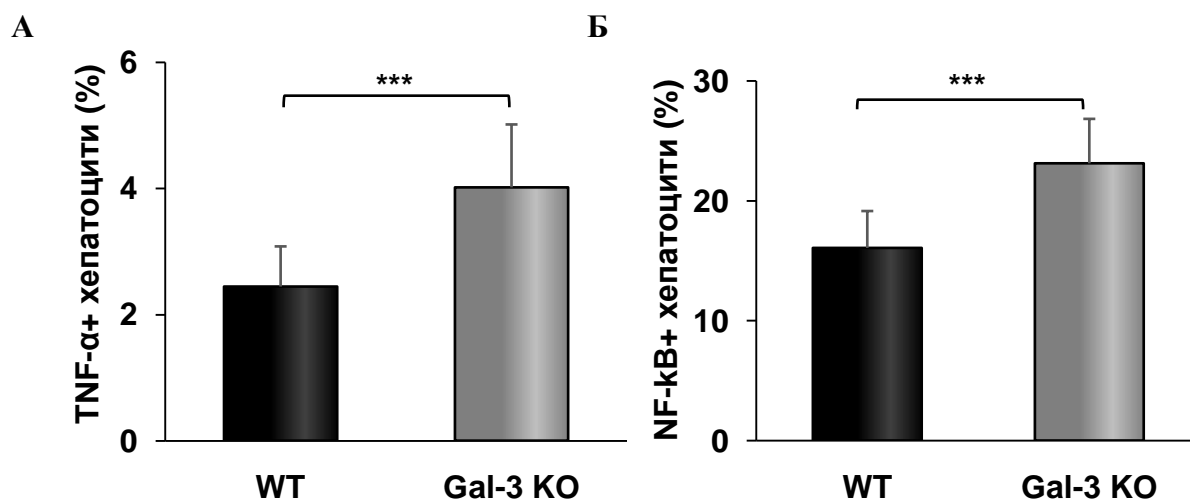
Графикон 27



Графикон 27. У хомогенату 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 МСМВ-ом. Подаци су представљени као средња вредност концентрације TNF- α + SD, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест; * $p < 0.05$).

Даље, статистички 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 28А). 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 вирусом (Графикон 28Б). 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.

Графикон 28



Графикон 28. 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 + хепатоцита и NF- κ B+ хепатоцита+ SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест; *** p <0.001).

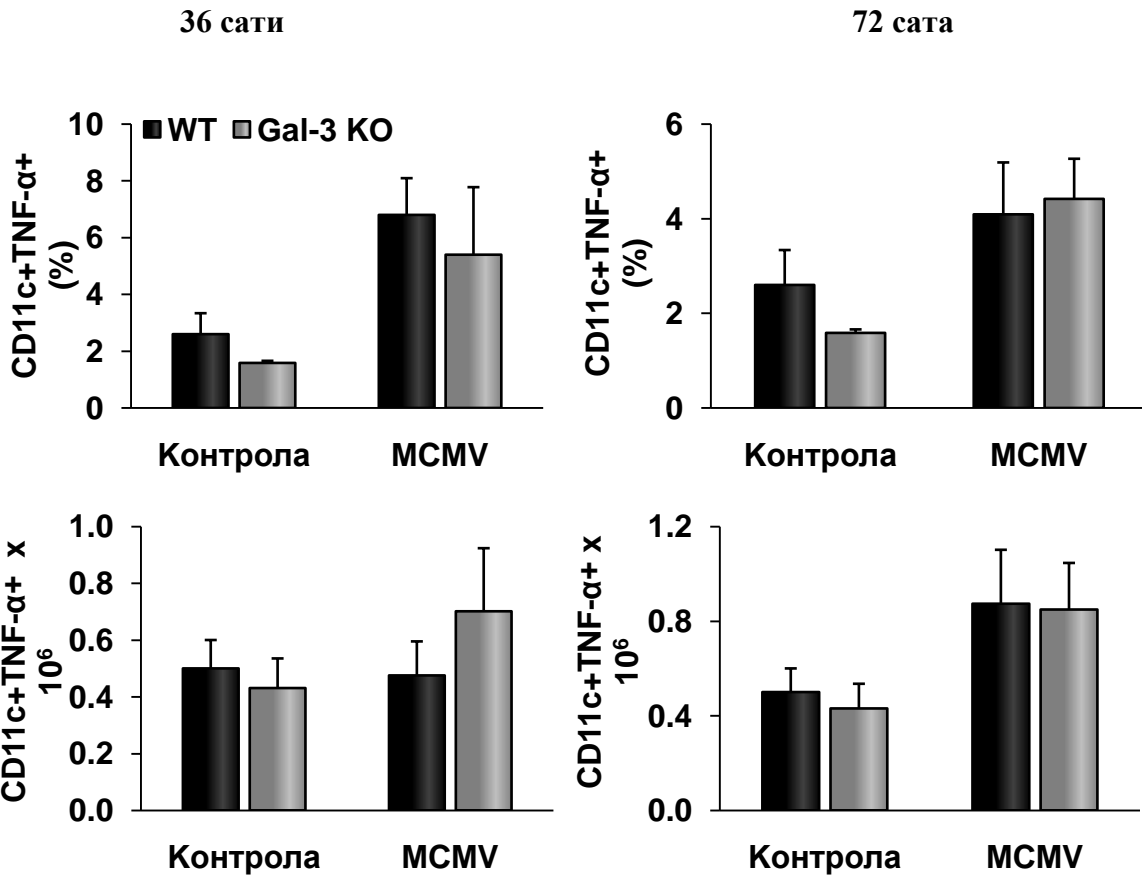
4.15. Дефицијенција гена за галектин-3 не утиче на заступљеност дендритских ћелија и макрофага који садрже TNF- α , а смањује проценат ових ћелија које садрже IL-10 у јетри инфицираних мишева

Како би се испитало да ли је већа експресија TNF- α у хепатоцитима инфицираних Gal-3 KO мишева праћена и већом заступљеношћу мијелоидних ћелија које садрже TNF- α , анализиран је проточном цитометријом проценат и број дендритских CD11c+ ћелија и макрофага, F4/80+, које експримирају TNF- α у јетри WT и Gal-3 KO 36 и 72 сата после MCMV инфекције. Као што се види на графикону 29 нема разлике у проценту и

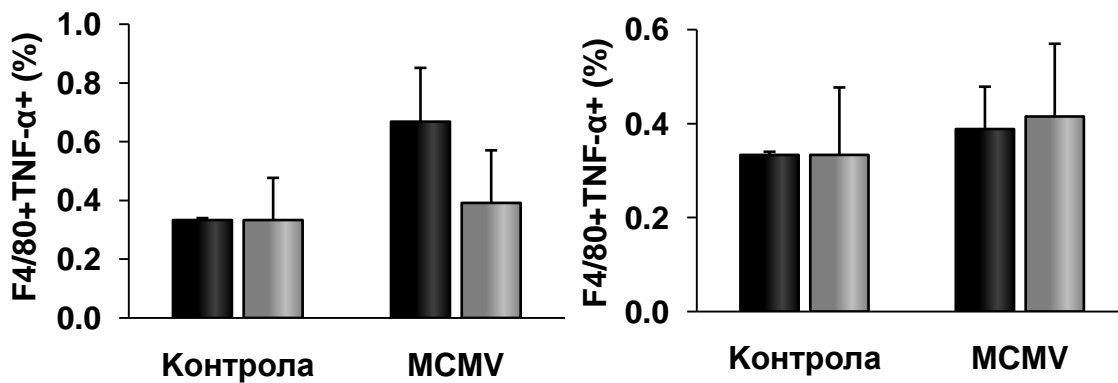
апolutном броју дендритских ћелија (Графикон 29А) и макрофага (Графикон 29Б) које садрже TNF- α ни 36, ни 72 сата после MCMV инфекције.

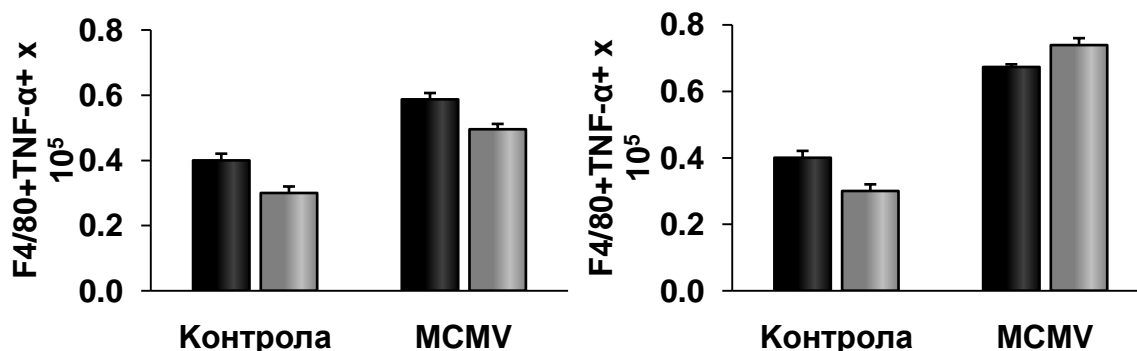
Графикон 29

А



Б



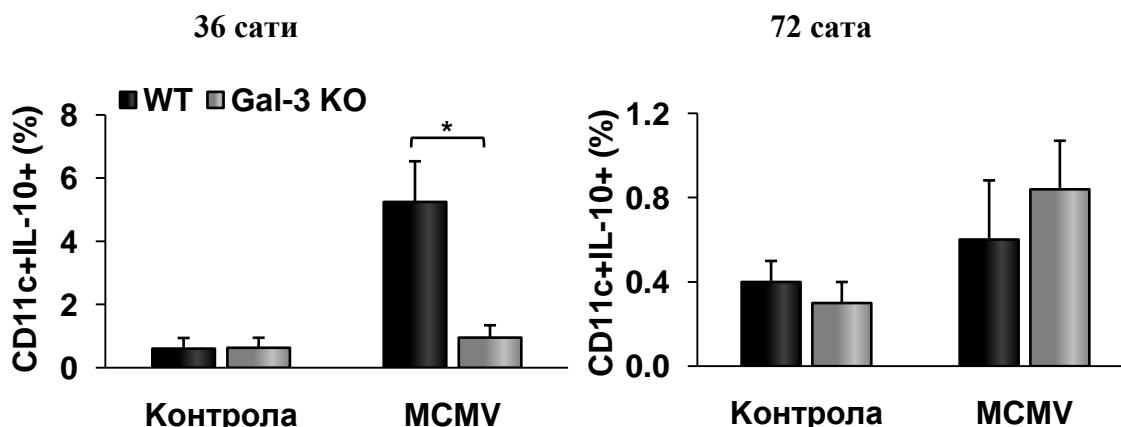


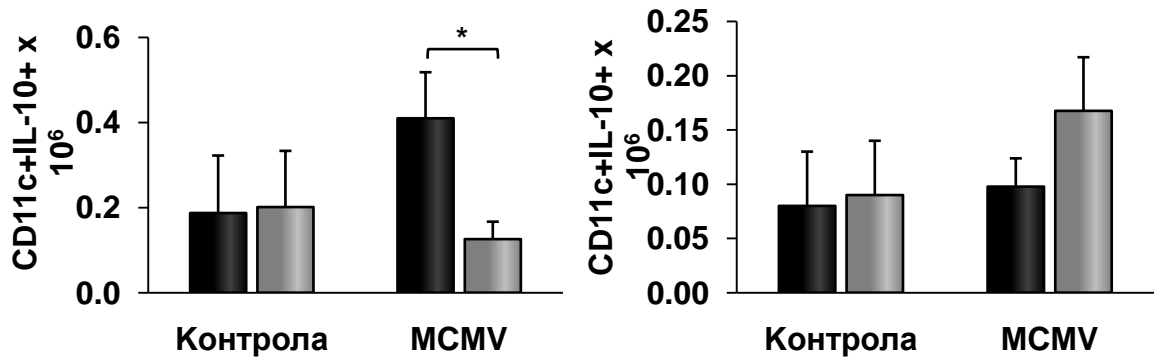
Графикон 29. Нема разлике у проценту и апсолутном броју дендритских ћелија и макрофага који експримирају TNF- α у јетрама инфицираних WT и Gal-3 KO мишева. Методом проточне цитометрије су анализирани мононуклеарне ћелије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE процента 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; * $p < 0.05$).

Даље је анализиран проценат и апсолутни број дендритских ћелија и макрофага које експримирају антиинфламацијски цитокин IL-10. Процент и апсолутни број IL-10+ дендритских ћелија је статистички значајно већи у групи WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева 36 сати после инфекције MCMV-ом (Графикон 30А). Статистичка значајност ове разлике се губи 72 сата после инфекције и тада је проценат ових ћелија нешто већи у групи Gal-3 KO мишева (Графикон 30А). Процент макрофага који експримирају IL-10 у јетри је већи код WT мишева (Графикон 30Б) и 36 и 72 сата после вирусне инфекције у поређењу са групом Gal-3 KO мишева. Апсолутни број IL-10+F4/80+ ћелија у јетри је статистички значајно већи у групи WT мишева у поређењу са групом Gal-3 KO мишева 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 30Б).

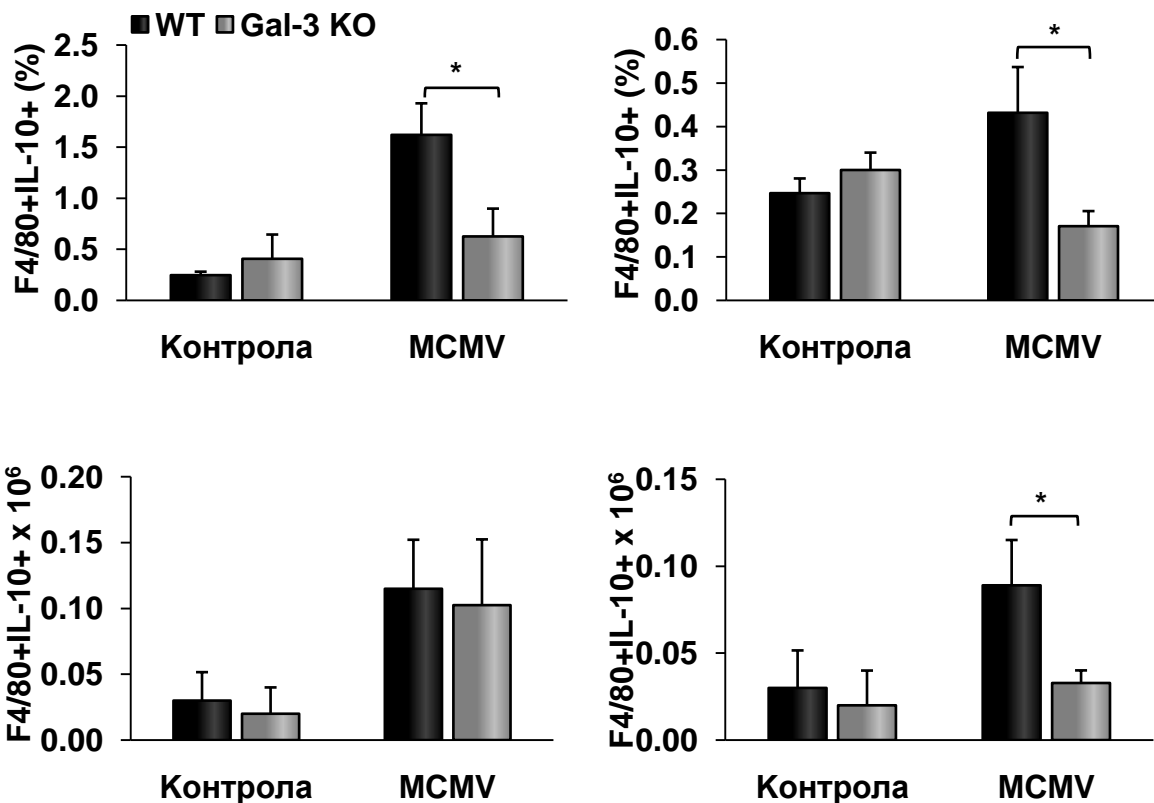
Графикон 30

А





Б



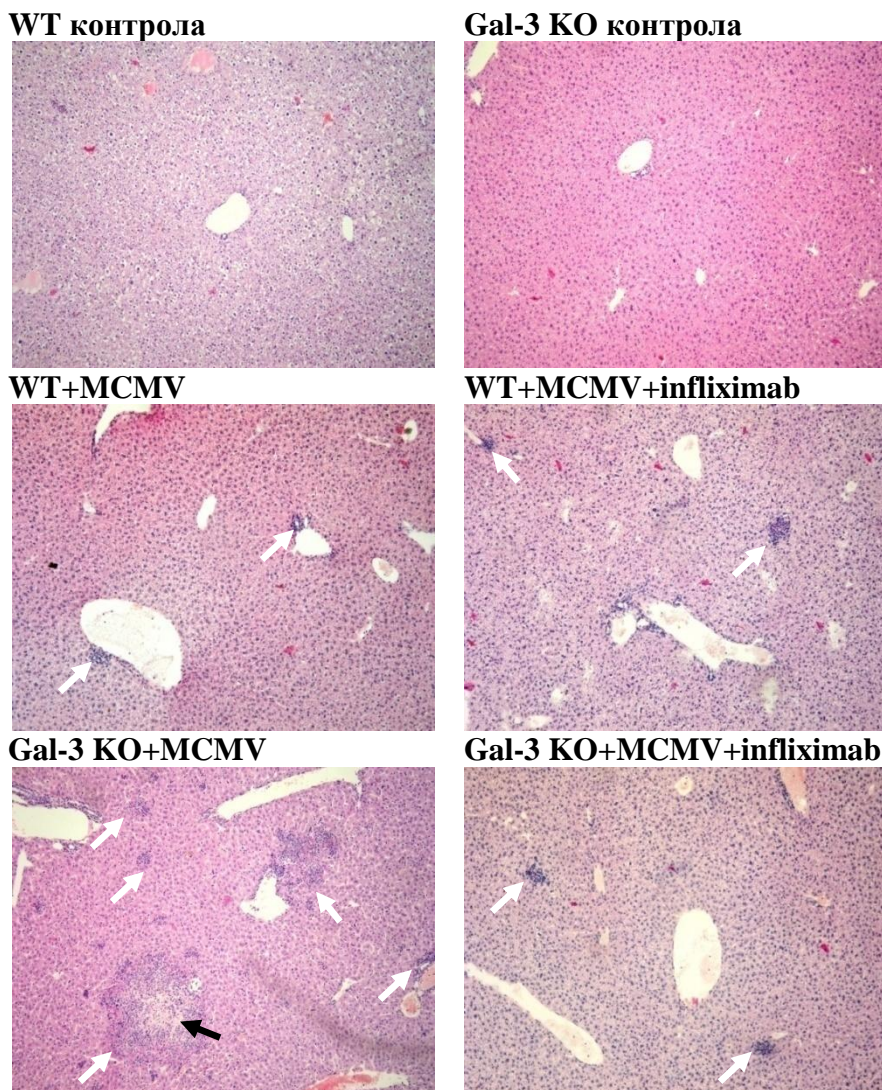
Графикон 30. Дефицијенција галектина-3 значајно смањује проценат и број регулаторних дендритских ћелија и макрофага у јетри мишева инфицираних MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE процента и укупног броја CD11c+ дендритских ћелија које експримирају IL-10 и F4/80+ макрофага који експримирају IL-10, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест; * $p < 0.05$).

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

Да би се потврдила улога TNF- α у оштећењу ткива јетре након инфекције MCMV-ом, TNF- α је фармаколошки инхибиран применом инфликсимаба један сат пре инфекције MCMV-ом. Претретман инфликсимабом Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом

значајно је смањио инфламацију и некрозу јетре (Слика 9 и Графикон 31А и 31Б). Инфламацијски и некротички фокуси су већи у јетри Gal-3 КО мишева инфицираних МСМV-ом у поређењу са групом Gal-3 КО мишева код којих је примењен инфликсимаб пре инфекције МСМV-ом (Слика 9).

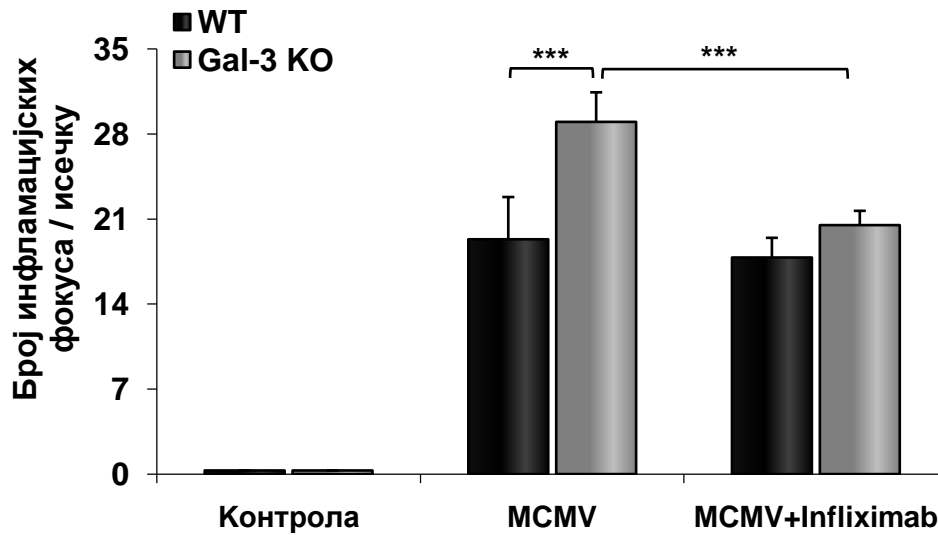
Слика 9



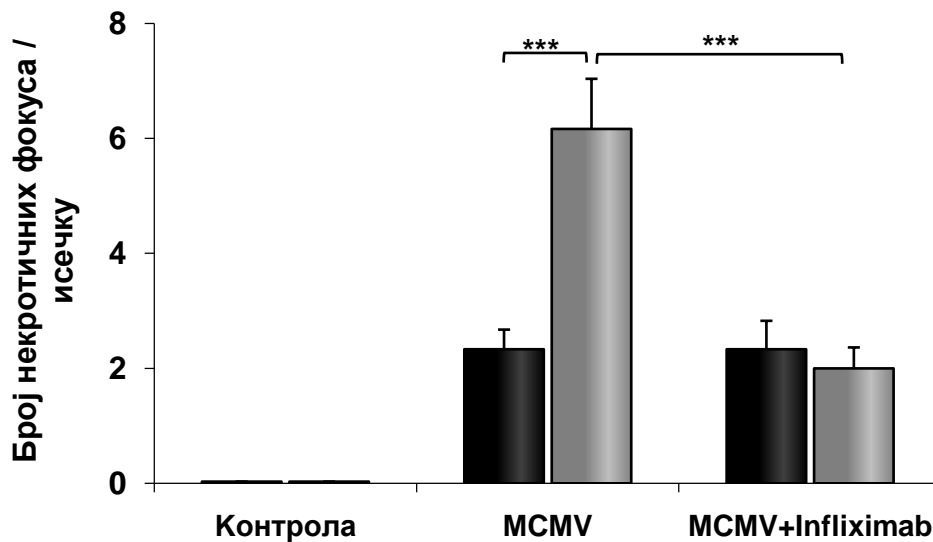
Слика 9. Блокада TNF- α смањује инфламацију и некрозу јетре код Gal-3 КО мишева инфицираних МСМV-ом. WT и Gal-3 КО мишеви су инфицирани *i.p.* МСМV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Химерично моноклонско антитело, инфликсимаб је примењен у дози од 5 mg/kg *i.p.* један сат пре инфекције МСМV-ом. Мишеви су жртвовани 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 31

А



Б

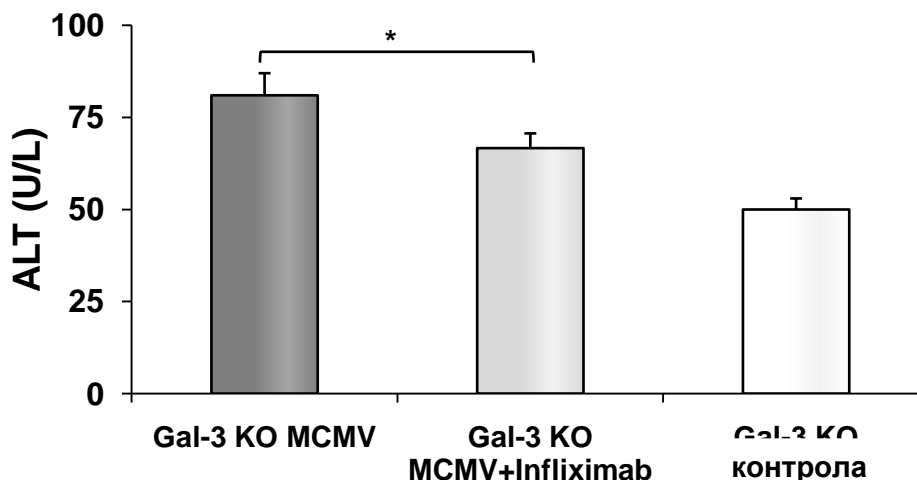


Графикон 31. Блокада TNF- α смањује број инфламацијских и некротичних фокуса у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. Број инфламацијских и некротичних фокуса је пребројаван и приказан је као број фокуса по исечку + SE. Један репрезентативни експеримент, 5 мишева по групи. (*Student-t* тест; *** $p < 0.001$).

Такође, блокада TNF- α пре инфекције MCMV-ом статистички је утицала на значајно смањење концентрације ALT-а у серуму у групи Gal-3 KO мишева (Графикон 32). Блокада TNF- α пре MCMV инфекције није утицала на величину инфламацијских поља и некрозу јетре у групи WT мишева (Слика 9, Графикон 31А и 31Б). Блажи хепатитис изазван

MCMV-ом у групи Gal-3 KO мишева третираних инфликсимабом подржава улогу TNF- α у тежем обољењу код Gal-3 дефицијентних животиња.

Графикон 32



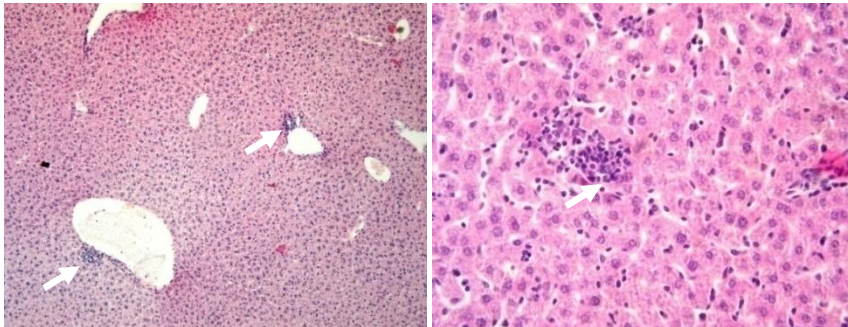
Графикон 32. Третирање Gal-3 KO мишева инфликсимабом пре инфекције цитомегаловирусом смањује концентрацију ALT у серуму. Концентрације ензима јетре у серуму су одређиване колориметријском методом 48 сати након инфекције MCMV-ом. Представљена је средња вредност ALT + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест; *** $p < 0.001$).

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

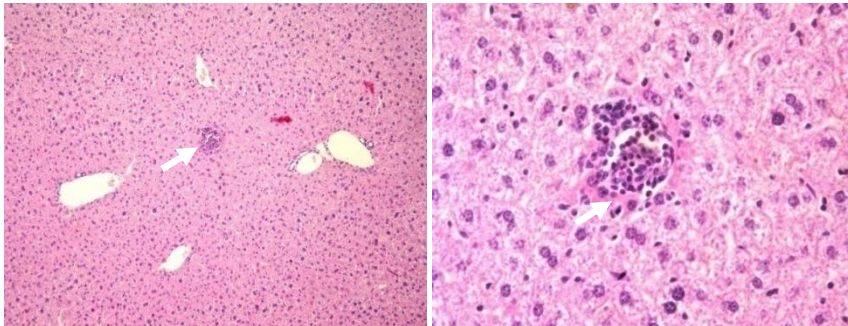
Да бисмо потврдили заштитну улогу галектина-3 у хепатитису који је индукован MCMV-ом и да бисмо утврдили ефекат примене рекомбинантног галектина-3 на патогенезу ове болести, мишевима смо интраперитонеално апликовали рекомбинантни галектин-3 у дози од 50 μ g/ml два сата пре инфекције. Примена рекомбинантног галектина-3 није утицала на величину поља инфламације и некрозе у јетри WT мишева (Слика 10). Gal-3 KO мишеви третирани рекомбинантним галектином-3 су имали мање вредности хистолошких скорова некрозе и инфламације, 72 сата након MCMV инфекције (Графикон 33).

Слика 10

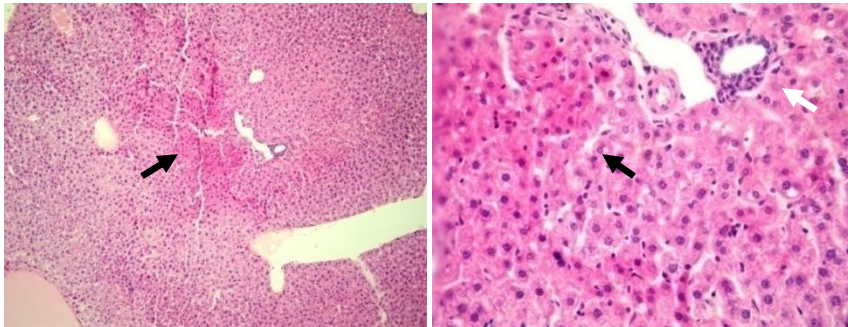
WT MCMV



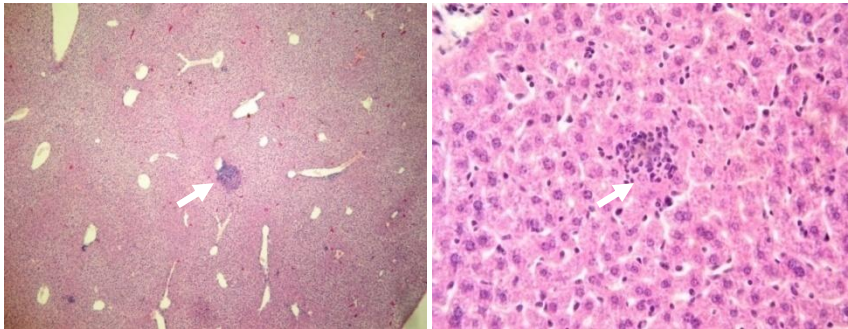
WT MCMV+rGal-3



KO MCMV

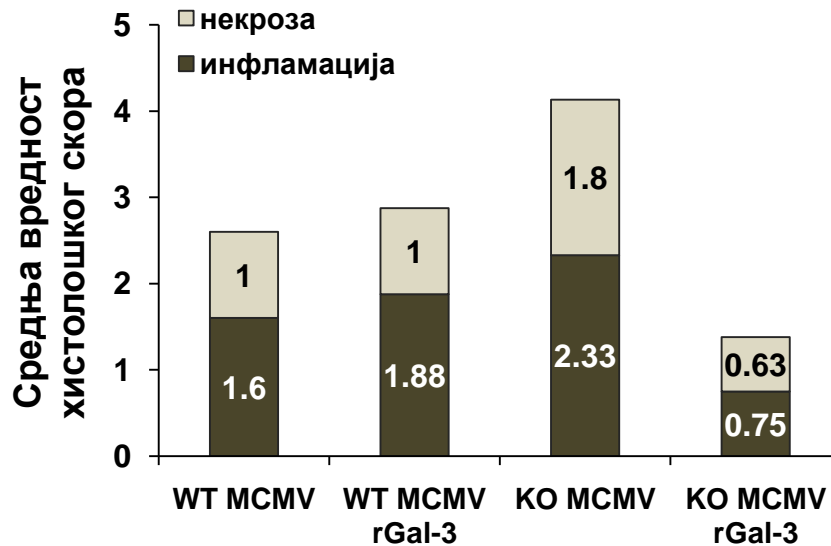


KO MCMV+rGal-3



Слика 10. Егзогени галектин-3 ублажава хепатитис изазван МСМV-ом. WT и Gal-3 KO 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.

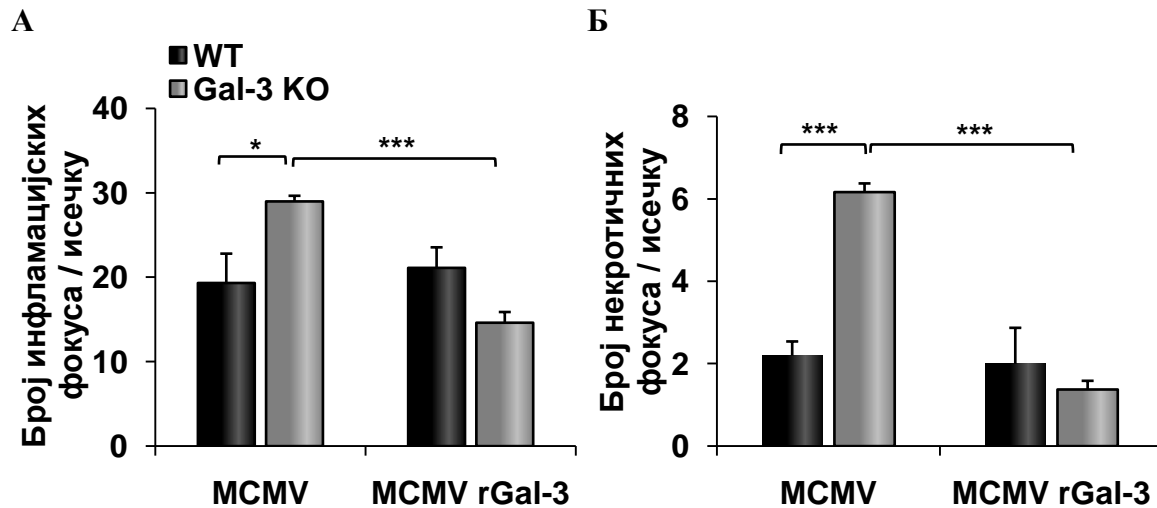
Графикон 33



Графикон 33. Примена рекомбинантног галектина-3 пре инфекције MCMV-ом смањује инфламацију и некрозу у јетри Gal-3 KO мишева. Јетра је екстирпирана 72 сата након инфекције MCMV-ом, исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Представљен је хистолошки скор из 2 одвојена експеримента са 8 мишева по групи.

Такође, у јетри Gal-3 KO мишева третираних рекомбинантним галектином-3 пре инфекције цитомегаловирусом је забележен мањи број инфламацијских и некротичних фокуса по исечку (Графикон 34А и 34Б). Третман рекомбинантним галектином-3 није променио број инфламацијских фокуса у јетри WT мишева, али је утицао на повећање величине фокуса што се уочава и на Слици 10, беле стрелице. Мањи број некротичних поља је уочен у јетрама Gal-3 KO мишева третираних пре инфекције рекомбинантним галектином-3, у поређењу са Gal-3 KO мишевима који су само инфицирани MCMV-ом (Слика 10, црне стрелице). Блажа болест код Gal-3 KO мишева третираних рекомбинантним галектином-3 потврђује заштитну улогу галектина-3 у хепатитису индукованом MCMV-ом.

Графикон 34

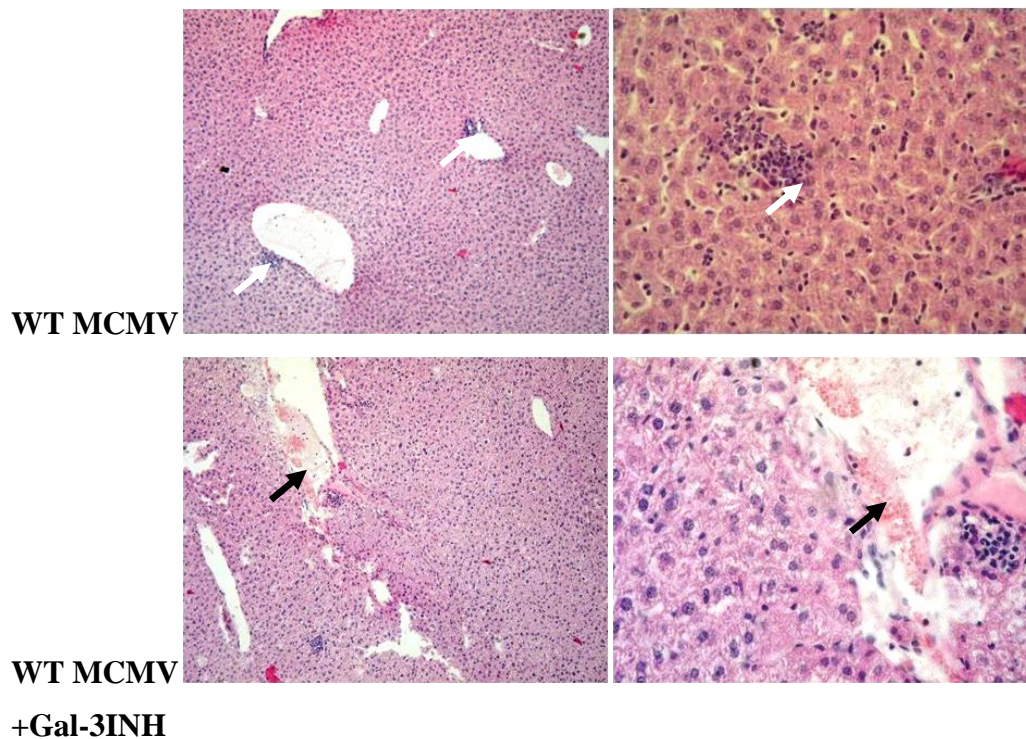


Графикон 34. Примена рекомбинантног галектина-3 смањује број инфламацијских и некротичних фокуса у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних МСМВ-ом. Број инфламацијских и некротичних фокуса је пребројан и приказан је као број фокуса по исечку + SE. Један репрезентативни експеримент, 8 мишева по групи. (*Student-t* тест; * $p < 0.05$).

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

Након што је показано да галектин-3 може деловати протективно у моделу хепатитиса изазваног МСМВ-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 МСМВ-ом, WT мишевима је апликован Gal-3INH интраперитонеално у дози од 300 μ g, два сата пре МСМВ 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 МСМВ-ом. У јетрама WT мишева инфицираних МСМВ-ом и третираних инхибитором галектина 3 је детектовано значајно веће оштећење јетре (Слика 11).

Слика 11

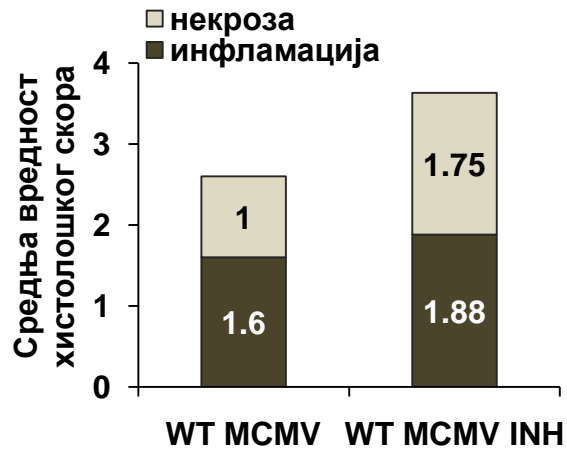


Слика 11. Инхибитор галектина-3 значајно повећава некрозу јетре код WT мишева након инфекције MCMV-ом. WT мишеви су инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Gal-3INH је примењен у дози од 300 μ g i.p два сата пре инфекције MCMV-ом. Мишеви су жртвовани 72 сата након инфекције, екстирпирано је ткиво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

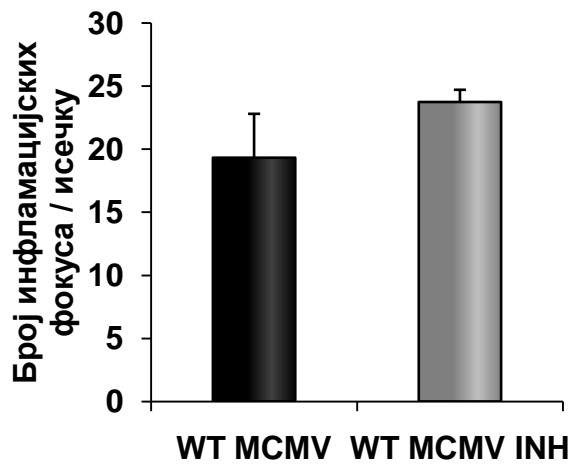
Средње вредности хистолошких скорова некрозе и инфламације у јетри су 72 сата након инфекције MCMV-ом веће у групи WT мишева третираних Gal-3INH пре инфекције (Графикон 35А). Примена Gal-3INH пре инфекције није утицала на број инфламацијских фокуса у јетри WT мишева 72 сата после MCMV инфекције (Графикон 35Б), али је значајно смањила број некротичких фокуса по исечку (Графикон 35В).

Графикон 35

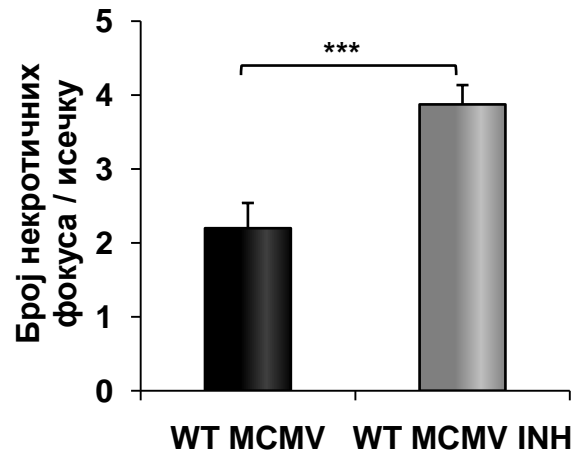
А



Б



В



Графикон 35. Примена Gal-3INH је значајно повећала број некротичних фокуса у јетри WT мишева инфицираних MCMV-ом. Ткиво јетре WT мишева је екстирпирано 72 сата после инфекције MCMV-ом, исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Представљен је хистолошки скор за 8 мишева по групи. Број инфламацијских и некротичних фокуса је пребројан и приказан као број фокуса по исечку + SE. Један репрезентативни експеримент, 8 мишева по групи. (*Student- t* тест; *** $p < 0.001$).

5. ДИСКУСИЈА

5.1. МСМV инфекција погоршава ЕАЕ-а код Gal-3 КО мишева

Вирусна инфекција се сматра једним од главних етиолошких чинилаца који утичу на развој мултипле склерозе. За развој мултипле склерозе се најчешће везују вируси из фамилије *Herpetoviridae*, а посебно *Epstein-Barr* вирус и *Cytomegalovirus* (145, 238). 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 антигене и ДНК цитомегаловируса повећани код оболелих од мултипле склерозе, указујући на улогу CMV у развоју мултипле склерозе (186). Серопозитивност на CMV је повезана са већим бројем релапса и са прогресијом до клинички дефинитивне мултипле склерозе (187). Присуство антитела на CMV је такође повезано са израженијом атрофијом сиве масе и целог мозга код пацијената са мултиплом склерозом (188).

Друге студије указују на заштитни ефекат инфекције CMV-ом у аутоимунским болестима. CMV кодира више фактора који покрећу имуномодулаторне механизме и механизме избегавања имунског система домаћина, што би могло да утиче на општу имуносупресију код оболелих од мултипле склерозе (186, 189). Веза између титара антитела специфичних за CMV и бољег клиничког исхода је примећена у групи оболелих од мултипле склерозе. У групи испитаника који су имали антитела на цитомегаловирус у серуму забележени су мања атрофија мозга и краћи релапси (190). Резултати других студија су показали да присуство антитела специфичних за CMV у серуму смањује ризик од развоја мултипле склерозе (191).

У моделу инфекције Тајлеровим вирусом мишјег енцефаломијелитиса, инфекција МСМV-ом две недеље пре TMEV инфекције утиче на боље моторичке способности мишева и мању инфилтрацију мозга Т лимфоцитима (189). Резултати ове студије указују да МСМV инфекција делује протективно у моделу ЕАЕ изазваног другом вирусном инфекцијом. Међутим подаци о утицају МСМV инфекције на ток ЕАЕ изазваног имунизацијом антигенима мијелина су другачији. Инфекција МСМV-ом ВAВL/с мишева пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ прекида резистенцију ових мишева на индукцију ЕАЕ (222). Такође претходна инфекција цитомегаловирусом појачава манифестације ЕАЕ код

C57BL/6 мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (226). У складу са налазима последње две студије је и резултат да претходна инфекција цитомегаловирусом утиче на повећање вредности средњег клиничког скорa од 15. дана након имунизације (Графикон 1А) и повећава средњу вредност хистолошког скорa (Графикон 1Б).

Ефекти галектина-3 на инфламацијске болести су различити чак и у истој болести и зависе од имунопатогенетског механизма који има доминантну улогу у појединим фазама болести (239), или у различито индукованим експерименталним моделима болести (234, 240). Галектин-3 има заштитну улогу у анималном моделу оштећења миокарда изазваном инфекцијом C57BL/6 мишева коксаки вирусом В3 (241). Међутим у моделу орган специфичне аутоимунске болести, ЕАЕ изазваног имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅ галектин-3 има проинфламацијски ефекат. Gal-3 дефицијентни мишеви имунизовани антигеном мијелина развили су слабију форму ЕАЕ (101). Резултати ове студије показују да инфекција МСМV-ом погоршава клиничке и хистолошке манифестације ЕАЕ код Gal-3 КО мишева (Графикон 1А), изједначавајући их са групом имунизованих Gal-3 позитивних мишева. Gal-3 КО мишеви инфицирани МСМV-ом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају типичне клиничке знаке ЕАЕ-а, са средњим вредностима средњег клиничког скорa веома сличним као код осетљивих WT мишева (Графикон 1А). Инфекција вирусом пре имунизације антигеном мијелина значајно је утицала на развој значајног инфламацијског инфилтрата периваскуларно и субарахноидално са ширењем у паренхим мозга у групи Gal-3 КО мишева (Слика 1).

Овај резултат указује да претходна инфекција цитомегаловирусом може да подстакне активацију аутореактивног клона/клонова и у индивидуама које су мање склоне развоју аутоимунске болести и тако повећа ризик од развоја болести.

5.2. Претходна МСМV инфекција смањује заступљност проинфламацијских CD4+ Т лимфоцита у мозгу WT и Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

У патогенези ЕАЕ кључну улогу играју Th1 и Th17 лимфоцити (242, 243). У ЦНС-у животиња којима је индукован ЕАЕ се налази велики проценат Th1 лимфоцита који продукују IFN- γ (244, 245) који активира макрофаге, ћелије које играју најзначајнију улогу у развоју инфламације у ЦНС-у (246). На значај Th1 лимфоцита у патогенези ЕАЕ указали су експерименти са мишевима са делецијом гена за IL-12p40 субјединицу која је битна за

поларизацију Т лимфоцита у правцу Th1, који су резистентни на развој ЕАЕ (247). Међутим, у другим студијама је показано да су мишеви без гена IFN- γ и STAT1, транскрипционог фактора кључног за развој Th1 лимфоцита, развили тежи ЕАЕ, што указује да и друге ћелије имају улогу у патогенези ЕАЕ-а (248). Друге студије указују да су Th17 ћелије за чији је развој неопходно присуство IL-23 и ROR γ t, кључне у инцијалним догађајима у патогенези ЕАЕ (249). IL-17 којег секретују Th17 лимфоцити привлачи и активира неутрофиле и нарушава пермеабилност крвно-мождане баријере (250). Ове ћелије синтетишу IL-21, IL-22, фактор стимулације гранулоцитних и макрофагних колонија (GM-CSF) који стимулише ћелије које презентују антигене да секретују IL-23 (251). Показано је да примена анти-IL-17 антитела смањује тежину ЕАЕ-а (252).

Улога галектина-3 у Th1/Th2 и Th17 поларизацији је контроверзна. Током паразитарних инфекција, смањена инфламација је повезана са појачаним Th1 одговором код Gal-3 КО мишева (253). Насупрот томе, показано је да галектин-3 смањује експресију гена за IL-5 (254). Gal-3 КО мишеви развијају нормалан Th2 одговор и имају веће концентрације IgG1 у серуму након инфекције интестиналним нематодама и шистозомијазом у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима (255). Слабији ЕАЕ код Gal-3 КО мишева је удружен са слабијом продукцијом IFN- γ и IL-17 (101). Већи проценат Th17 ћелија које продукују IL-17 код галектин-3 позитивних мишева у поређењу са галектин-3 дефицијентним мишевима је показан у различитим аутоимунским болестима (234, 256, 257).

У овој студији је показано да одсуство галектина-3 смањује проценат инфламацијских IFN- γ и IL-17 позитивних лимфоцита. Претходна инфекција цитомегаловирусом повећава број и статистички значајно повећава проценат CD4+ Т лимфоцита у ЦНС-у у групи Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 2А). У групи WT мишева инфекција пре имунизације не утиче на процентуалну заступљеност CD4+ Т лимфоцита у инфилтратима у ЦНС-у, а смањује апсолутни број ових ћелија (Графикон 2А). Процент и укупан број CD4+ Т лимфоцита који експримирају IFN- γ у инфилтратима у ЦНС-у је значајно мањи у групама WT и Gal-3 КО мишева инфицираних вирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са групама WT и Gal-3 КО мишева који су имунизовани само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 2Б). MCMV инфекција пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ смањује и проценат и укупан број IL-17+ CD4+ Т лимфоцита и TNF- α + CD4+ Т лимфоцита у ЦНС-у и WT и Gal-3 КО мишева (Графикон 2В и 2Г).

5.3. MCMV инфекција пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава заступљеност проинфламацијских CD8⁺ Т лимфоцита у мозгу Gal-3 дефицијентних мишева

Познато је да CD8⁺ Т лимфоцити имају патогену улогу у ЕАЕ-у (258). CD8⁺Т лимфоцити изоловани из имунизованих животиња, могу узроковати демиелинизацију код примаоца (259). Иако је опште прихваћено да централну улогу у патогенези ЕАЕ играју CD4⁺ Т лимфоцити показано је да и CD8⁺ Т лимфоцити самостално могу да покрену аутоимунски процес и да изазову благ облик болести (260).

У овој студији је показано да инфекција MCMV-ом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ утиче на пораст заступљености инфламацијских CD8⁺ Т лимфоцита у инфилтратима у ЦНС-у WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 3А). Процент CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају IFN- γ је статистички значајно већи у ЦНС-у инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 3Б). Процент и укупан број CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају IL-17 и процент и број ових ћелија које експримирају TNF- α је статистички значајно већи у ЦНС-у Gal-3 KO мишева инфицираних пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са групом Gal-3 KO мишева имунизованих само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 3В и 3Г). Процент и укупан број CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају TNF- α је већи и у ЦНС-у WT мишева инфицираних пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са WT мишевима имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 3Г). Такође је показано постојање већег процента и броја цитотоксичких CD8⁺ Т лимфоцита у ЦНС-у инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 4А и 4Б). Ови резултати су у складу претходним налазима да инфекција цитомегаловирусом повећава заступљеност инфламацијских и цитолитичких CD8⁺ лимфоцита у мозгу мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ (222). Слично, појачање ЕАЕ код C57BL/6 мишева који су инфицирани γ HV-68 удружено је са инфилтрацијом можданог паренхима цитолитичким и инфламацијским CD8⁺ лимфоцитима (261).

5.4. Инфекција цитомегаловирусом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ утиче на повећање процента класично активираних макрофага у ЦНС-у Gal-3 КО мишева

Експресија галектина-3 је повећана у микроглији и макрофагима у кичменој мождини и оптичким нервима мишева са индукованим експерименталним аутоимунским енцефаломијелитисом (131). Као одговор на инфламацијске стимулусе, микроглија секретује галектин-3 који делује као ендогени лиганд за TLR-4. Галектин-3 учествује у активацији проинфламацијског M1 фенотипа микроглијалних ћелија и на тај начин промовише неуроинфламацију (132). Показано је да системска MCMV инфекција значајно повећава број ћелија које имају карактеристике активираних микроглије и то доминантно M1 фенотип (262). У неуроинфламацији микроглија експримира MHC молекуле II класе, костимулаторне молекуле и стимулише продукцију цитокина у Т лимфоцитима (263). У складу са претходно наведеним налазом да инфекција цитомегаловирусом подстиче класичну активацију микроглије је и резултат ове студије који показује да инфекција MCMV-ом пре имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава проценат и укупан број макрофага који експримирају маркер класичне активације, CD86 у ЦНС-у у групи Gal-3 КО мишева (Графикон 5Б). Уочен је већи проценат класично активираних макрофага у мозгу имунизованих Gal-3 позитивних мишева у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева што је у складу са описаном проинфламацијском улогом галектина-3 у ЦНС-у (132), сличан налаз је забележен и код мишева само инфицираних цитомегаловирусом, али удружени ефекат инфекције и имунизације утиче на значајно већи пораст процента класично активираних макрофага у групи Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 5).

5.5. Инфекција MCMV-ом изазива експанзију инфламацијских CD4+CD28-лимфоцита у периферној крви Gal-3 КО мишева

CD4+CD28^{null} меморијски Т лимфоцити настају током хроничне активације имунског система и код здравих особа и код оболелих од мултипле склерозе. Ове ћелије имају ограничену разноликост Т ћелијског рецептора, независни су од костимулације, отпорнији су на апоптозу, и мање су подложни супресији регулаторним Т лимфоцитима (264-266). Особине које указују да ове ћелије доприносе аутоимунском оштећењу ЦНС-а у мултиплој склерози укључују њихову аутореактивност и изражене цитотоксичке капацитете (266, 267). Инфекција CMV-ом изазива експанзију проинфламацијских ефекторско-меморијских CD4+CD28^{null} Т лимфоцита код особа оболелих од мултипле

склерозе (265, 268). Стимулација CD4+CD28^{null} Т лимфоцита аутоантигенима мијелина доприноси пролиферацији и ослобађању цитотоксичких гранула што може индуковати оштећење у мултиплој склерози (269). Процент CD4+CD28^{null} Т лимфоцита корелира са степеном демјелинизације и тежином болести (226).

У овој студији је показано да имунизација енцефалитогеном значајно повећава проценат ефекторско меморијских лимфоцита у периферној крви, MCMV инфекција минимално повећава проценат ових ћелија и то значајније у групи WT мишева, док инфекција вирусом и накнадна имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ повећава значајно проценат CD4+CD28⁻ лимфоцита само у групи Gal-3 KO мишева (Графикон 6). Процент CD4+CD28⁻ лимфоцита у периферној крви Gal-3 KO мишева инфицираних вирусом па имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је статистички значајно већи у поређењу са процентом ових ћелија у периферној крви инфицираних и имунизованих WT мишева (Графикон 6). Интересантно је да сама вирусна инфекција значајно повећава проценат IFN-γ⁺ ћелија у оквиру CD4+CD28⁻ популације ћелија у групи Gal-3 KO мишева па је проценат ових ћелија статистички значајно већи него у групи инфицираних WT мишева (Графикон 6). Имунизација пептидом MOG₃₅₋₅₅ после инфекције вирусом додатно повећава проценат IFN-γ⁺ ћелија у оквиру CD4+CD28⁻ популације у групи Gal-3 KO мишева, а у групи WT мишева ни инфекција ни имунизација не утичу на повећање процента инфламацијских ефекторско меморијских лимфоцита.

Ови резултати указују да инфекција цитомегаловирусом утиче на погоршање ЕАЕ и индукцијом експанзије ефекторско меморијских CD4+CD28⁻ лимфоцита који имају инфламацијски фенотип, а који се брже активирају аутоантигенима, способни су да прођу у мождани паренхим и имају цитотоксички капацитет (266, 267),

5.6. Галектин-3 игра протективну улогу у оштећењу јетре изазваном инфекцијом цитомегаловирусом

У неколико клиничких студија је показано да су у току вирусних инфекција концентрације галектина-3 у серуму повећане (270, 271). Већа експресија галектина-3 је показана и у нервном ткиву са присутном вирусном инфекцијом, са јасном разликом у експресији у ткиву мозга са вирусном инфекцијом и дегенерацијом. Резултати ове студије указују да је галектин-3 потенцијални маркер вирусних инфекција (138). Налази добијени

у анималном моделу оштећења миокарда изазваним инфекцијом C57BL/6 мишева коксаки вирусом В3 указују на заштитну улогу галектина-3 у болестима које су изазване вирусним инфекцијама (241). Резултати ове студије јасно показују да је делеција гена за галектин-3 удружена са убрзаним и тежим оштећењем јетре изазваним инфекцијом MCMV-ом. Gal-3 дефицијентни C57BL/6 мишеви инфицирани MCMV-ом развијају тежи облик хепатитиса у поређењу са Gal-3 позитивним мишевима. У јетри Gal-3 дефицијентних мишева инфицираних MCMV-ом детектовани су већи инфилтрати и већа поља некрозе (Слика 2, Графикон 15), већи проценат апоптотичних и некроптотичних хепатоцита (Слика 3, 4, Графикон 19, 20), већи титар вируса (Графикон 25) и већи број ћелија инфицираних MCMV-ом (Слика 7). Концентрација ензима у серуму који указује на оштећење јетре, ALT, је такође већа у групи Gal-3 дефицијентних инфицираних мишева (Графикон 16). Ови резултати указују да галектин-3 вероватно игра протективну улогу у оштећењу јетре изазваном инфекцијом цитомегаловирусом. На овај закључак указује и детектована мања инфламација и некроза јетре код Gal-3 KO мишева третираних рекомбинантним галектином-3 пре инфекције MCMV-ом (Слика 10). Ефекат галектина-3 на ток и тежину различитих инфламацијских стања зависи од тока који од имунопатогенетских механизма игра доминантну улогу у развоју болести. Делеција гена за галектин-3 или фармаколошка инхибиција галектина-3 имају протективни ефекат у моделу кардитиса у ком доминантну имунопатогенетску улогу играју макрофаги и у моделу срчане фиброзе изазване инфекцијом коксаки вирусом В3 (241). Такође, раније је показано да је одсуство галектина-3 удружено са слабијом формом хепатитиса у чијој патогенези кључну улогу играју Т лимфоцити и НКТ ћелије (124, 235). У складу са наведеним подацима је и резултат новије студије да у одсуству галектина-3 готово да нема развоја холангитиса у моделу примарног билијарног холангитиса изазваног бактеријом, што је последица неадекватне активације инфламазома у одсуству галектина-3 (240).

Резултати ове студије који указују на протективни ефекат галектина-3 у оштећењу јетре изазваном инфекцијом цитомегаловирусом су у складу са резултатима претходног истраживања у којем је показано да делеција гена за галектин-3 погоршава примарни билијарни холангитис изазван имунизацијом мишева ксенобиотикум услед веће апоптозе хепатоцита у одсуству галектина-3 и последично интензивнијег ослобађања аутоантигена (234).

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

NK ћелије играју кључну улогу у раном имунском одговору на инфекцију мишјим цитомегаловирусом и утичу на елиминацију MCMV-а из јетре C57BL/6 мишева (206). Са друге стране NK ћелије доприносе оштећењу јетре у вирусним инфекцијама (236). Галектин-3 експримиран на NK ћелијама углавном утиче на смањење продукције инфламацијских медијатора у NK ћелијама и смањује њихову цитотоксичку активност (233). У овој студији је показано да се у јетри галектин-3 позитивних мишева налази већи укупан број NK ћелија које експримирају IFN- γ и маркере цитолитичке активности, а мањи број NK ћелија које експримирају IL-10 у поређењу са Gal-3 КО мишевима (Графикон 23) што је у супротности са претходно наведеним налазима (233). Такође, у овој студији је показан већи инфлукс NK ћелија у јетру инфицираних WT мишева (Графикон 22). Наведени резултати јасно указују да веће оштећење јетре код инфицираних Gal-3 КО мишева није праћено већом активношћу NK ћелија (Графикон 22 и 23) и да је вероватно да су мањи титри вируса у јетри WT мишева резултат повећане активности NK ћелија.

Резултати експеримената у којима су мишеви инфицирани мутантним сојем вируса, MCMV Δ m157, су потврдили да NK ћелије немају учешће у већем оштећењу јетре код Gal-3 КО мишева. Протеин m157 који је кодиран вирусним геном везује се за активациони рецептор на NK ћелијама, Ly49H, тако стимулише антивирусну активност NK ћелија која је кључна за рану контролу MCMV инфекције и бржу елиминацију вируса из органа (204). Делеција гена за m157 протеин у оквиру вирусног генома или блокада активационог рецептора Ly49H на NK ћелијама ремети рану контролу MCMV у већини органа (205, 212, 272, 273). Инфекција MCMV Δ m157 вирусом који нема могућност ране активације NK ћелија користи се за испитивање улоге ових ћелија у контроли инфекције и/или оштећењу ткива изазваном вирусном инфекцијом. Налаз већег броја инфилтрата у јетри Gal-3 КО мишева инфицираних са MCMV Δ m157 у поређењу са групом WT мишева инфицираних истим сојем вируса (Слика 6, Графикон 24) сугерише да веће оштећење јетре код Gal-3 КО мишева нема везе са активношћу NK ћелија.

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

MCMV инфекција индукује веома брзи развој системског инфламацијског одговора који карактерише продукција велике количине TNF- α , IL-12, IFN- γ и интерферона тип I (20, 229). TNF- α је укључен у патогенезу вирусног хепатитиса, алкохолне болести јетре, неалкохолне масне болести јетре и исхемијско-реперфузионе повреде, али игра дихотомну улогу јер не делује само као медијатор ћелијске смрти, већ може да индукује и пролиферацију хепатоцита и регенерацију јетре (274). Велике концентрације TNF- α у серуму се детектују рано након инфекције (20), а повећана експресија mRNA TNF- α детектује се у јетри, слезини и плућима инфицираних мишева (275). Антивирусна дејства TNF- α код мишева који су инфицирани MCMV-ом су индиректно посредована олакшавајући инфилтрацију инфламацијских ћелија на местима инфекције (276). Оштећење јетре које се развија рано по инфекцији посредовано је TNF- α код имунокомпетентних али и имунодефицијентних особа (200). Велика концентрација TNF- α у серуму код новорођених инфицираних мишева карактеристика је вирулентне инфекције и у корелацији је са морталитетом (277). Раније је показано да TNF- α учествује у оштећењу јетре у току инфекције MCMV-ом и то независно од деловања Т лимфоцита и НК ћелија (200). TNF- α је неопходан за развој некротичних жаришта у јетри рано по инфекцији MCMV-ом и за пораст трансминаза у серуму (200). Са друге стране резултати једне студије показују да лечење анти-TNF- α антителом нема ефекта на репликацију MCMV-а и на исход болести (278).

Резултати 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 урођене имуности (279), познато је да ткивно-специфичне ћелије такође продукују TNF- α (280-282). Продукција TNF- α у јетри мишева инфицираних MCMV-ом зависи од сигнализације са TLR3, TLR7 и TLR9 рецептора (283, 284), као и од активности MAPK-активираних протеинске киназе 2 (285). С обзиром да је у овој студији поред експресије TNF- α у хепатоцитима јасно детектовано и присуство хепатоцита инфицираних MCMV-ом (Слика 7), претпостављено је да MCMV директно стимулише производњу TNF- α у хепатоцитима. Поред тога, већа експресија TNF- α и већи број хепатоцита који експримирају TNF- α детектовани су у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом у

којој се детектује и значајно веће оштећење у поређењу са групом инфицираних галектин-3 позитивних мишева (Слика 8, Графикон 26). Примена моноклонског антитела које блокира TNF- α (*Infliximab*) пре инфекције MCMV-ом утицала је на значајну редукцију смрти хепатоцита, посебно у групи Gal-3 KO мишева (Слика 9). TNF- α сензибилише хепатоците на апоптозу која је зависна од каспазе као и на апоптозу која је независна од каспазе (286) и покреће некроптозу (237). Према томе, може се претпоставити да TNF- α којег продукују хепатоцити игра значајну улогу у оштећењу јетре након инфекције MCMV-ом. Узимајући у обзир ова запажања, вероватно је да већа продукција TNF- α у хепатоцитима Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом доприноси већем оштећењу јетре.

5.9. Инфекција MCMV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима

Хепатоцити људи у физиолошким условима не експримирају галектин-3 (234), али се експресија галектина-3 у хепатоцитима повећава у различитим обољењима јетре (287-289). Галектин-3 је обилно експримиран унутар регенеративних нодулуса у цирози јетре (290) у туморском ткиву хепатоцелуларног карцинома. Експресија галектина-3 је такође укључена у прогресију тумора и повезана је са лошијом прогнозом хепатоцелуларног карцинома (287). 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 5). Овај налаз је у складу са претходно објављеним радовима у којима је показана већа експресија галектина-3 у ткиву ЦНС-а мишева након развоја енцефаломиокардитиса који је изазван вирусном инфекцијом (138) и у микроглији и астроцитима мишева инфицираних *Junin* вирусом (137). Недавно је показано да TNF- α повећава експресију галектина-3 (291), што указује да експресија галектина-3 која је индукована MCMV-ом у хепатоцитима може бити резултат продукције TNF- α коју индукује вирус.

5.10. Gal-3 KO 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 (288, 292-294), док прекомерна експресија галектина-3 штити ћелије од апотозе (295). 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 стабилизује митохондријални мембрански потенцијал, што резултира инхибицијом активације каспазе-9 и каспазе-3 (296). У складу са тим, пронађен је већи проценат TNF- α позитивних хепатоцита (Графикон 26) и већи проценат апоптотичних хепатоцита у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом (Слика 3, 4, Графикон 19, 20). Такође, у овој студији је пронађено значајно веће ослобађање HMGB1 у ткиву јетре инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 17) и значајно већи проценат калретикулин позитивних хепатоцита (Графикон 18) (297). HMGB1 се везује за неколико рецептора на површини ћелија имунског система (TLR2, TLR4, RAGE) и стимулише развој јаке инфламације (298), док се изложени калретикулин везује за рецепторе на ћелијама које презентују антиген и стимулише фагоцитозу (299). Претпоставља се да је већа некроптоза хепатоцита у групи Gal-3 дефицијентних мишева, рано након инфекције MCMV-ом, праћена већим отпуштањем HMGB1, већом инфламацијом у јетри 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 (300) изазивајући повећано оштећење јетре.

Коначно, подаци из ове студије указују да је повећана експресија галектина-3 у јетри мишева инфицираних MCMV-ом удружена са смањеним титром вируса, штити хепатоците од апоптозе и некроптозе зависних од TNF- α , и накнадно смањује оштећење јетре. 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 изазваном инфекцијом MCMV-ом, што указује на могућност даљих претклиничких испитивања нових терапијских мера.

6. ЗАКЉУЧЦИ

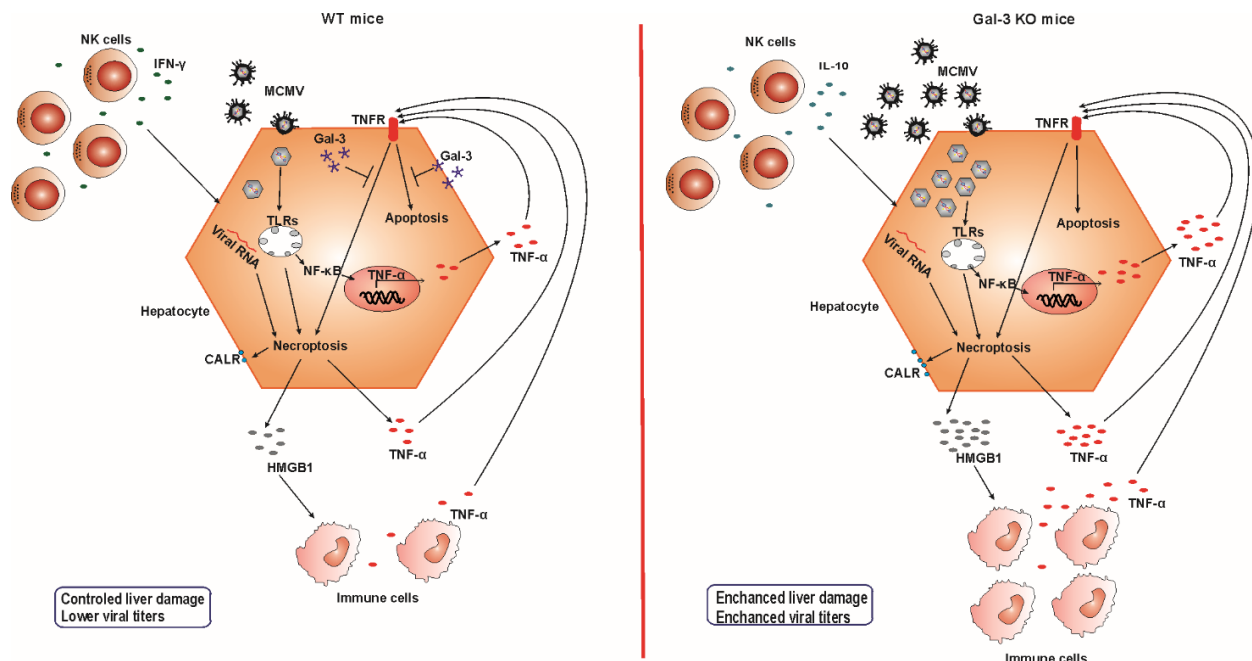
Галектин-3 утиче на развој имунског одговора на МСМV, па тако слезине инфицираних С57BL/6 мишева са делецијом гена за Gal-3 садрже мањи проценат инфламацијских мијелоидних ћелија, а након елиминације вируса, 11 дана после инфекције, садрже већи проценат инфламацијских NK ћелија што је удружено са прекидом 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. Gal-3 KO мишеви имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ након инфекције цитомегаловирусом развијају ЕАЕ сличан оном који развијају неинфицирани имунизовани С57BL/6 WT мишеви.
2. МСМV инфекција смањује проценат и број инфламацијских CD4⁺ ћелија у ЦНС-у WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ после инфекције МСМV-ом.
3. Дефицијенција галектина-3 је удружена са повећањем процента и броја проинфламацијских и смањењем процента и броја антиинфламацијских CD8⁺ ћелија у ЦНС-у инфицираних мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.
4. Дефицијенција галектина-3 је удружена са повећањем процента класично активираних макрофага у ЦНС-у мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ након инфекције МСМV-ом.
5. Одсуство галектина-3 повећава проценат инфламацијских ефекторско-меморијских (IFN- γ +CD4⁺CD28⁻) лимфоцита у периферној крви мишева инфицираних цитомегаловирусом.
6. Слезине Gal-3 KO мишева након елиминације вируса, 11 дана после инфекције, садрже већи проценат инфламацијских NK и NKT ћелија.
7. Дефицијенција галектина-3 је удружена са већим оштећењем јетре изазваним инфекцијом МСМV-ом, судећи према вредностима хистолошког скорa и биохемијских параметара и већим титром вируса.
8. Инфекција цитомегаловирусом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима.

9. 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 MCMV Δ m157 вирусом који не активира NK ћелије.
10. У јетрама Gal-3 КО мишева инфицираних MCMV-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 MCMV-ом.
11. Примена егзогеног галектина-3 ублажава оштећење јетре Gal-3 КО мишева након MCMV инфекције, а примена инхибитора галектина-3 значајно повећава некрозу јетре WT мишева након инфекције MCMV-ом.

Шема 5.



Шема 5. Улога галектина-3 у оштећењу јетре изазваном инфекцијом MCMV-ом. У присуству галектина-3 (леви панел) НК ћелије које инфилтришу јетру садрже IFN- γ и играју улогу у клиренсу вируса. Инфекција хепатоцита MCMV-ом индукује апоптозу и некроптозу, мембранску експресију калретикулина (CALR), ослобађање проинфламацијског 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 титар. Код Gal-3 KO мишева (десни панел) НК ћелије које садрже више IL-10 слабије контролишу вирус, 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.

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. Bale JF, Jr., Blackman JA, Sato Y. Outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Journal of child neurology*. 1990;5(2):131-6.
6. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):76-98, Table of Contents.
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. C. S-N. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? . *Journal of internal medicine* 2006;259(3):219-46. 2006.
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. 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.
21. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *Journal of virology*. 2004;78(15):7867-73.
22. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*. 2006;7(2):131-7.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Shellam GR, Allan JE, Papadimitriou JM, Bancroft GJ. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(8):5104-8.
31. Iversen AC, Norris PS, Ware CF, Benedict CA. Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN- β . *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2005;175(11):7568-74.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
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. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(1):9-20.
42. Polic B, Hengel H, Krmpotic A, Trgovcich J, Pavic I, Luccaroni 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunologic research*. 2012;54(1-3):140-51.
48. 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.
49. 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.
50. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus research*. 2011;157(2):151-60.
51. Mocarski ES, Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends in microbiology*. 2002;10(7):332-9.
52. Lehner PJ, Wilkinson GW. Cytomegalovirus: from evasion to suppression? *Nature immunology*. 2001;2(11):993-4.
53. 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.
54. Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology*. 1993;9:237-64.
55. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):209-31.
56. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):433-40.

57. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(1):29-41.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183:158-82.
63. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1673(1-2):75-93.
64. Chiarriotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):441-9.
65. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001;83(7):667-76.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):527-35.
75. 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.

76. 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.
77. Dumić J, Dabelić S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1760(4):616-35.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6737-42.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clause 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.
87. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug news & perspectives*. 2007;20(7):455-60.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.

93. 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.
94. 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.
95. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1996;156(10):3939-44.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Vray B, Camby I, Vercruysse 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.
101. 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.
102. 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.
103. Mensah-Brown EP, Al Rasebi 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunological reviews*. 2009;230(1):114-27.

110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. Garcin PO, Nabi IR, Pante N. Galectin-3 plays a role in minute virus of mice infection. *Virology*. 2015;481:63-72.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. 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.

126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, Dempsey RJ. Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. *Brain research*. 2009;1288:116-24.
130. 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.
131. Reichert F, Rotshenker S. Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. *Experimental neurology*. 1999;160(2):508-14.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):938-52.
140. 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.
141. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Seminars in immunology*. 2009;21(6):328-33.
142. 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.
143. 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.
144. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2010;9(6):599-612.

145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. 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.
149. Hawker K. Progressive multiple sclerosis: characteristics and management. *Neurologic clinics*. 2011;29(2):423-34.
150. Yong VW. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Contin. Lifelong Learn. Neurol*. 10:11-27. 2004.
151. 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.
152. Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C. Multiple sclerosis. *Immunological reviews*. 2005;204:208-31.
153. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta neurologica Scandinavica*. 2011;124(2):75-84.
154. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):942-55.
155. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature reviews Neuroscience*. 2002;3(4):291-301.
156. Inglese M. Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2006;27(5):954-7.
157. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annual review of pathology*. 2012;7:185-217.
158. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(6):3893-904.
159. Hellings N, Barea M, Verhoeven C, D'Hooghe M B, Medaer R, Bernard CC, et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of neuroscience research*. 2001;63(3):290-302.
160. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American journal of pathology*. 2008;172(1):146-55.
161. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Caggiula M, et al. IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine*. 2008;44(1):22-5.
162. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Science translational medicine*. 2015;7(287):287ra74.
163. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2009;66(3):390-402.

164. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology*. 2011;12(6):560-7.
165. Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, et al. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Science translational medicine*. 2014;6(241):241ra80.
166. 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.
167. Salou M, Nicol B, Garcia A, Laplaud DA. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:604.
168. 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.
169. 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.
170. Ji Q, Castelli L, Goverman JM. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nature immunology*. 2013;14(3):254-61.
171. Wekerle H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity*. 2017;50(1):57-60.
172. 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.
173. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 9):2755-71.
174. Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, et al. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 10):2925-37.
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. 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.
179. Hart BA, Hintzen RQ, Laman JD. Multiple sclerosis - a response-to-damage model. *Trends in molecular medicine*. 2009;15(6):235-44.
180. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *BioMed research international*. 2014;2014:472978.
181. 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.

182. 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.
183. Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. *Journal of infection in developing countries*. 2011;5(10):679-87.
184. 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.
185. 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.
186. 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.
187. 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.
188. 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.
189. 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.
190. 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.
191. 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.
192. Mocarski J, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. *Fields Virology*. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. Cytomegaloviruses; pp. 1960–2014. 2013.
193. 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.
194. 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.
195. Bronshter 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.
196. Bonacini M. Hepatobiliary complications in patients with human immunodeficiency virus infection. *The American journal of medicine*. 1992;92(4):404-11.
197. Jones CA. Congenital cytomegalovirus infection. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2003;33(3):70-93.

198. 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.
199. Shanley JD, Biczak L, Forman SJ. Acute murine cytomegalovirus infection induces lethal hepatitis. *The Journal of infectious diseases*. 1993;167(2):264-9.
200. 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.
201. 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.
202. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Current opinion in immunology*. 2003;15(1):45-51.
203. 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.
204. 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.
205. 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.
206. Scalzo AA, Yokoyama WM. Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;321:101-22.
207. 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.
208. 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.
209. 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.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. Daley-Bauer LP, Wynn GM, Mocarski ES. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*. 2012;37(1):122-33.
214. 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.

215. 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.
216. 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.
217. CM. S. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14:32.
218. A. R. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.
219. 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.
220. 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.
221. 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.
222. 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.
223. 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.
224. 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.
225. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):107-24.
226. 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.
227. 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.
228. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO journal*. 2014;33(10):1104-16.
229. 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.
230. Upton JW, Kaiser WJ. DAI Another Way: Necroptotic Control of Viral Infection. *Cell host & microbe*. 2017;21(3):290-3.
231. Jetic 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.

232. 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.
233. 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.
234. 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.
235. 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.
236. 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.
237. 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.
238. Wroblewska Z, Gilden D, Devlin M, Huang ES, Rorke LB, Hamada T, et al. Cytomegalovirus isolation from a chimpanzee with acute demyelinating disease after inoculation of multiple sclerosis brain cells. *Infection and immunity*. 1979;25(3):1008-15.
239. de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2015;240(8):1019-28.
240. Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Djordjevic D, Stanojevic I, Jankovic N, et al. Gal-3 Deficiency Suppresses *Novosphingobium aromaticivorans* Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1309.
241. 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.
242. Steinman L. A rush to judgment on Th17. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1517-22.
243. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1535-41.
244. Renno T, Zeine R, Girard JM, Gillani S, Dodelet V, Owens T. Selective enrichment of Th1 CD45RBlow CD4+ T cells in autoimmune infiltrates in experimental allergic encephalomyelitis. *International immunology*. 1994;6(3):347-54.
245. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cellular immunology*. 1989;124(1):132-43.
246. 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.
247. 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.
248. 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.

249. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
250. 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.
251. 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.
252. 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.
253. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, et al. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *The American journal of pathology*. 2006;168(6):1910-20.
254. Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(1):385-9.
255. Bickle Q, Helmby H. Lack of galectin-3 involvement in murine intestinal nematode and schistosome infection. *Parasite immunology*. 2007;29(2):93-100.
256. Volarevic V, Zdravkovic N, Harrell CR, Arsenijevic N, Fellabaum C, Djonov V, et al. Galectin-3 Regulates Indoleamine-2,3-dioxygenase-Dependent Cross-Talk between Colon-Infiltrating Dendritic Cells and T Regulatory Cells and May Represent a Valuable Biomarker for Monitoring the Progression of Ulcerative Colitis. *Cells*. 2019;8(7).
257. Volarevic V, Markovic BS, Jankovic MG, Djokovic B, Jovicic N, Harrell CR, et al. Galectin 3 protects from cisplatin-induced acute kidney injury by promoting TLR-2-dependent activation of IDO1/Kynurenine pathway in renal DCs. *Theranostics*. 2019;9(20):5976-6001.
258. Weiss HA, Millward JM, Owens T. CD8⁺ T cells in inflammatory demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology*. 2007;191(1-2):79-85.
259. 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.
260. Anderson AC, Chandwaskar R, Lee DH, Sullivan JM, Solomon A, Rodriguez-Manzanet R, et al. A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T and B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(5):2084-92.
261. Casiraghi C, Shanina I, Cho S, Freeman ML, Blackman MA, Horwitz MS. Gammaherpesvirus latency accentuates EAE pathogenesis: relevance to Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS pathogens*. 2012;8(5):e1002715.
262. Zinkernagel MS, Chinnery HR, Ong ML, Petitjean C, Voigt V, McLenachan S, et al. Interferon gamma-dependent migration of microglial cells in the retina after systemic cytomegalovirus infection. *The American journal of pathology*. 2013;182(3):875-85.
263. Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia*. 36:165–179. 2001.
264. Mou D, Espinosa, J. E., Stempora, L., Iwakoshi, N. N. & Kirk, A. D. Viral-induced CD28 loss evokes costimulation independent alloimmunity. *J Surg Res* 196, 241–246. 2015.
265. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4⁺CD28^{null} T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(10):6514-23.

266. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger K P, McFarland H F & Martin R. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 108, 1185–1194. 2001.
267. Broux Bea. CX(3)CR1 drives cytotoxic CD4(+)CD28(-) T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *Journal of autoimmunity* 38, 10–19. 2012.
268. Pinto-Medel MJ, Garcia-Leon JA, Oliver-Martos B, Lopez-Gomez C, Luque G, Arnaiz-Urrutia C, et al. The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2012;243(1-2):1-11.
269. Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(8):446-53.
270. 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.
271. 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.
272. 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.
273. 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.
274. 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.
275. 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.
276. 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).
277. Trgovcic 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.
278. 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.
279. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*. 2003;10(1):45-65.
280. 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.
281. Bluml S, Scheinecker C, Smolen JS, Redlich K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *International immunology*. 2012;24(5):275-81.

282. 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.
283. 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.
284. 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.
285. Ehltling 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.
286. 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.
287. 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.
288. 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.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. 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.
294. 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.
295. 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.
296. 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.
297. 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.

298. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.
299. 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.
300. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & molecular immunology*. 2016;13(3):301-15.

8. БИОГРАФИЈА

Бојана Стојановић, рођена 12.04.1988. године у Призрену. Основну школу и Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршила је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уписала је школске 2006/07. године, и дипломирала је 2012. године, са просечном оценом 9,51 (девет и 51/100) и тиме стекла звање доктор медицине. Након завршених студија, обавила је обавезан лекарски стаж и положила стручни испит за доктора медицине у априлу 2013. године. Докторске академске студије, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација уписала је школске 2012/13. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Положила је усмени докторски испит 31.07.2014. године са оценом 10 (десет). Од 06.12.2013. године, запошљена је на Факултету медицинских наука као сарадник у настави за ужу научну област Патолошка физиологија. Од 07.04.2016. године, изабрана у звање асистента за ужу научну област Патолошка физиологија. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару. Активно учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија у оквиру макро и јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

9. БИБЛИОГРАФИЈА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML, Milovanovic M. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection. *Front Microbiol.* 2019 Feb 8; 10:185. (M21=8 бодова)
2. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep* 2016; 6:23348. (M21=8 бодова)
3. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2017; 8:192. (M21=8 бодова)
4. Stojanovic B, Jovanovic I, Stojanovic BS, Stojanovic MD, Gajovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. *Eur J Immunol.* 2019 Jun; 49(6): 940-946. (M21=8 бодова)
5. Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Djordjevic D, Stanojevic I, Jankovic N, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Milovanovic M. Gal-3 Deficiency Suppresses *Novosphingobium aromaticivorans* Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. *Front Immunol.* 2019 Jun 7; 10:1309. (M21=8 бодова)
6. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, Milovanović J, Arsenijević A, Stojanović B, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure* 2016; 1116: 264-71. (M23=3 бода)
7. Mijajlović M, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Milovanović J, Arsenijević A, Stojanović B, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of platinum (IV) and palladium (II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,

N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd (1, 2-dpheddp)] complex. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering 2016; 35 (1): 79-86. (M23=3 бода)

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:

1. Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Milovanovic M, Popovic B, Jonjic S, Arsenijevic N, Lukic ML. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (4): 183-190. (M52=1,5 бодова)
2. Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Milovanovic M, Gershwin E, Leung P, Arsenijevic N, Lukic ML. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150. (M52=1,5 бодова)
3. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, Milovanovic M, Lukic ML. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res.2016; 17 (2): 4-9. (M51=1,5 бодова)
4. Besser Silconi Ž, Benazic S, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Milovanovic M, Kanjevac T. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181-186. (M51=1,5 бодова)
5. Benazic S, Besser Silconi Z, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Milovanovic M, Kanjevac T. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res 2015; 17 (1): 55-60. (M51=1,5 бодова)
6. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. Serb J Exp Clin Res.2016; 17(4): 285-95. (M51=1,5 бодова)
7. Tomović DLj, Bukonjić AM, Kočović A, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Arsenijević AN, Milovanović JZ, Stojanović B, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. Serb J Exp Clin Res 2017; 18 (1): 13-18. (M51=1,5 бодова)

Зборници међународних научних скупова

1. Milovanovic M, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic

- dendritic cells. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, August 2013. Abstract book, page 152. (M34=0,5 бодова)
2. Milovanovic J, Milovanovic M, Arsenijevic A, Stojanovic B, Popovic B, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic M. CMV infection facilitates EAE development in resistant BALB/c mice. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p79–80. 2014. (M34=0,5 бодова)
 3. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 275, Issues 1-2, p11–12. 2014. (M34=0,5 бодова)
 4. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung P, Liu FT, Gershwin, Lukic M. Deletion of Galectin 3 Enhances Primary Biliary Cirrhosis in Mice by Enhanced Apoptosis of Biliary Epithelial Cells and Release of Autoantigens. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book page 43. (M34=0,5 бодова)
 5. Milovanovic J, Milovanovic M, Arsenijevic A, Stojanovic B, Popovic B, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic M. CMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation, Arandjelovac, Serbia, May, 2015. Abstract book page 69. (M34=0,5 бодова)
 6. Stojanovic B, Milovanovic M, Arsenijevic A, Milovanovic J, Popovic B, Jonjic S, Arsenijevic N, Lukic M. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. Abstract book page 75. (M34=0,5 бодова)
 7. Milovanovic J, Milovanovic M, Arsenijevic A, Stojanovic B, Popovic B, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic M. MCMV infection in neonatal and adult mice induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 2015. Abstract book, page 105. (M34=0,5 бодова)
 8. B. S. Stojanovic, I. Strazic Geljic, A. Arsenijevic, J. Milovanovic, N. Arsenijevic, S. Jonjic, M. L. Lukic, M. Milovanovic. Galectin-3 deficiency promotes liver inflammation and facilitates TNF- α -dependent hepatocyte death in MCMV infection. 5th European Congress of Immunology (ECI) Amsterdam 2018. Abstract book, page 452. (M34=0,5 бодова)

9. D. Djordjevic, J. Milovanovic, M. Jurisevic, B. Stojanovic, O. Cvetkovic, M. Pergal, E. Ristic, D. Vojvodic, M. Simic, D. Manojlovic, M. Milovanovic, N. Arsenijevic. Protective effects of mixture of fifteen n-propyl polysulfides on ConA-induced hepatitis mediated by induction of regulatory macrophages. 5th European Congress of Immunology (ECI) Amsterdam 2018. Abstract book, page 350. (M34=0,5 бодова)

10. ПРИЛОГ

10.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Бојана С. Стојановић

Ментор/коментор:

МН

Проф. др Марија Миловановић

Наслов рада:

НР

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

Језик публикације:

Српски (ћирилица)

ЈП

Језик извода:

Српски/енглески

ЈИ

Земља публикавања:

Србија

ЗП

Уже географско подручје:

Србија

УГП

Година:

2019.

ГО

Издавач:

Ауторски репринт

ИЗ

Место и адреса:

34000 Крагујевац, Србија,

МС

Светозара Марковића 69

Физичи опис рада:

Дисертација има 247 страна, садржи

ФО

10 поглавља, 11 слика, 35 графикона,

5 шема, 300 референци

Научна област:

Медицина

Научна дисциплина:

Имунологија

ДИ

Предметна одредница/ кључне речи

МСМV, галектин-3, ЕАЕ, хепатитис

ПО

УДК

Чува се:

У Библиотеци Факултета медицинских

ЧУ

наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац

Важна напомена:**МН****Извод:****ИД**

Галектин-3 утиче на развој имунског одговора на МСМV, па тако слезине инфицираних С57BL/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. Gal-3 KO мишеви након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ и након инфекције цитомегаловирусом развијају болест сличну оној коју развијају неинфицирани имунизовани С57BL/6 WT мишеви. Дефицијенција галектина-3 је удружена са повећањем процента и броја проинфламацијских CD8+ Т лимфоцита, повећањем класичне активације макрофага, а смањењем процента и броја антиинфламацијских CD8+ Т лимфоцита у мозгу инфицираних мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Галектин-3 штити хепатоците од апоптозе и некроптозе посредоване TNF- α и тако смањује оштећење јетре изазвано инфекцијом цитомегаловирусом. Примена егзогеног галектина-3 ублажава оштећење јетре Gal-3 KO мишева изазвано МСМV инфекцијом, а примена инхибитора галектина-3 значајно повећава некрозу јетре WT мишева након инфекције МСМV-ом.

Датум прихватања теме од стране ННВ:**07.09.2016.****ДП****Датум одбране:****ДО****Чланови комисије:****КО**

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, редовни професор - емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник

2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

10.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Bojana S. Stojanović

Menthor/co-mentor

MN

Prof. dr Marija Milovanović

Title:

TI

The influence of galectin-3 on development
experimental autoimmune
encephalomyelitis in mice infected with
Cytomegalovirus

Language of text:

LT

Serbian (Cyrilic)

Language of abstract:

Country of publication:

Serbian/English

Serbia

CP

Locality of publication:

Serbia

LP

Publication year:

2019.

PY

Publisher:

Author reprint

PU

Publication place:

34000 Kragujevac, Serbia

PP

Svetozara Markovića 69

Physical description

Thesis has 247 pages, 10 chapters, 11 pictures

PD

35 charts, 5 schemes, 300 references

Scientific field:

Medicine

SF

Scientific discipline:

Immunology

SD

Subject/key words:

MCMV, galectin-3, EAE, hepatitis

SKW

UDC

Holding data:

Library of Faculty of Medical Sciences,
34000 Kragujevac

Note:

N

Abstract:

AB

Galectin-3 influences the development of the immune response to MCMV, so that the spleen of the infected C57BL/6 mice with Gal-3 gene deletion contains a lower percentage of inflammatory myeloid cells, and after eliminating the virus, 11 days after infection, they contain a higher percentage of inflammatory NK cells is associated with an interruption of attenuation of EAE caused by immunization with the peptide MOG₃₅₋₅₅. Gal-3 KO mice after immunization with the peptide MOG₃₅₋₅₅ and after cytomegalovirus infection develop a disease similar to that developed by uninfected immunized C57BL/6 WT mice. The galectin-3 deficiency was associated with an increase in the percentage and number of proinflammatory CD8⁺ T lymphocytes, an increase in classical macrophage activation, and a decrease in the percentage and number of anti-inflammatory CD8⁺ T lymphocytes in the brain of immunized MOG₃₅₋₅₅ immunized mice. Galectin-3 protects the hepatocytes from apoptosis and necrosis caused by MCMV mediated by TNF- α and thus reduces liver damage caused by cytomegalovirus infection. The use of exogenous galectin-3 alleviates damage to the liver Gal-3 KO mice caused by MCMV infection, and the use of galectin-3 inhibitors significantly increases the necrosis of the WT mice after the infection by MCMV.

Accepted by the Scientific Board on:
ASB

07.09.2016.

Defended on:
DE

Thesis defended board
(Degree/name/surname/title/faculty)
DB

1. **Prof. dr Miodrag Lukić**, Professor Emeritus of the University of Kragujevac for the scientific field of Microbiology and Immunology, president
2. **Prof. dr Danilo Vojvodić**, Full Professor of Immunology, Medical Faculty, University of Military Academy Belgrade, member
3. **Prof. dr Nebojša Arsenijević**, Full Professor of Microbiology and Immunology and Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Стојановић Бојана, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

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

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2019. године,

Стојановић Бојана
потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Стојановић Бојана

дозвољавам

не дозвољавам

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

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

која је одбраћена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 2019. године,



потпис аутора

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

10.5. Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

1. **Stojanovic B**, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML, Milovanovic M. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection. *Front Microbiol.* 2019 Feb 8;10:185. **M21=8 бодова**
2. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, **Stojanovic B**, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep* 2016; 6:23348. **M21=8 бодова**
3. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, **Stojanovic B**, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2017; 8:192. **M21=8 бодова**
4. Stojanovic B, Jovanovic I, **Stojanovic BS**, Stojanovic MD, Gajovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. *Eur J Immunol.* 2019 Mar 20. **M21=8 бодова**
5. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, Milovanović J, Arsenijević A, **Stojanović B**, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure* 2016; 1116: 264-71. **M23=3 бода**
6. Mijajlović M, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Milovanović J, Arsenijević A, **Stojanović B**, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of platinum (IV) and palladium (II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N, N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd (1, 2-dpheddp)] complex. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2016; 35 (1):79-86. **M23=3 бода**
7. Milovanovic J, Arsenijevic A, **Stojanovic B**, Milovanovic M, Popovic B, Jonjic S, Arsenijevic N, Lukic ML. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (4): 183-190. **M52=1,5 бодова**

8. Arsenijevic A, Milovanovic J, **Stojanovic B**, Milovanovic M, Gershwin E, Leung P, Arsenijevic N, Lukic ML. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150. **M52=1,5 бодова**
9. **Stojanovic B**, Milovanovic J, Arsenijevic A, Milovanovic M, Lukic ML. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res.2016; 17 (2): 4-9. **M51=1,5 бодова**
10. Besser Silconi Ž, Benazic S, Milovanovic J, Arsenijevic A, **Stojanovic B**, Milovanovic M, Kanjevac T. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181-186. **M51=1,5 бодова**
11. Benazic S, Besser Silconi Z, Milovanovic J, Arsenijevic A, **Stojanovic B**, Milovanovic M, Kanjevac T. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res 2015; 17 (1): 55-60. **M51=1,5 бодова**
12. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, **Stojanovic B**, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. Serb J Exp Clin Res.2016; 17(4): 285-95. **M51=1,5 бодова**
13. Tomović DLj, Bukonjić AM, Kočović A, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Arsenijević AN, Milovanović JZ, **Stojanović B**, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. Serb J Exp Clin Res 2017; 18 (1): 13-18. **M51=1,5 бодова**



Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection

Bojana Stojanovic^{1,2}, Jelena Milovanovic^{1,3}, Aleksandar Arsenijevic¹, Bojan Stojanovic⁴, Ivana Strazic Geljic⁵, Nebojsa Arsenijevic¹, Stipan Jonjic⁵, Miodrag L. Lukic¹ and Marija Milovanovic^{1*}

¹ Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ² Faculty of Medical Sciences, Institute of Pathophysiology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ³ Faculty of Medical Sciences, Institute of Histology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ⁴ Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ⁵ Department for Histology and Embryology, Center for Proteomics, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

OPEN ACCESS

Edited by:

Slobodan Paessler,
The University of Texas Medical
Branch at Galveston, United States

Reviewed by:

Takaaki Koma,
Tokushima University, Japan
Benedikt B. Kaufer,
Freie Universität Berlin, Germany
Isao Kosugi,
Hamamatsu University School
of Medicine, Japan

*Correspondence:

Marija Milovanovic
marjaposta@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 November 2018

Accepted: 23 January 2019

Published: 08 February 2019

Citation:

Stojanovic B, Milovanovic J,
Arsenijevic A, Stojanovic B,
Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S,
Lukic ML and Milovanovic M (2019)
Galectin-3 Deficiency Facilitates
TNF- α -Dependent Hepatocyte Death
and Liver Inflammation in MCMV
Infection. *Front. Microbiol.* 10:185.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00185

Galectin-3 (Gal-3) has a role in multiple inflammatory pathways. Various, opposite roles of Gal-3 in liver diseases have been described but there are no data about the role of Gal-3 in development of hepatitis induced with cytomegalovirus infection. In this study we aimed to clarify the role of Gal-3 in murine cytomegalovirus (MCMV)-induced hepatitis by using Gal-3-deficient (Gal-3 KO) mice. Here we provide the evidence that Gal-3 has the protective role in MCMV-induced hepatitis. Enhanced hepatitis manifested by more inflammatory and necrotic foci and serum level of ALT, enhanced apoptosis and necroptosis of hepatocytes and enhanced viral replication were detected in MCMV-infected Gal-3 deficient mice. NK cells does not contribute to more severe liver damage in MCMV-infected Gal-3 KO mice. Enhanced expression of TNF- α in the hepatocytes of Gal-3 KO mice after MCMV infection, abrogated hepatocyte death, and attenuated inflammation in the livers of Gal-3 KO mice after TNF- α blockade suggest that TNF- α plays the role in enhanced disease in Gal-3 deficient animals. Treatment with recombinant Gal-3 reduces inflammation and especially necrosis of hepatocytes in the livers of MCMV-infected Gal-3 KO mice. Our data highlight the protective role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis by attenuation of TNF- α -mediated death of hepatocytes.

Keywords: galectin-3, hepatitis, murine cytomegalovirus infection, TNF- α , hepatocyte death

INTRODUCTION

Infection with human cytomegalovirus (HCMV) is typically asymptomatic in immunocompetent individuals, but in individuals with immature or deficient immune system HCMV is a cause of morbidity and mortality (Mocarski et al., 2007). In immunocompromised hosts, especially in transplant recipients, HCMV induces severe hepatitis that elevates mortality (Bozza et al., 2007;

Mocarski et al., 2013). A better understanding of HCMV-induced liver damage could provide insights into potential novel therapeutic strategies for immunocompromised patients (Livingston-Rosanoff et al., 2012). Murine CMV (MCMV) causes a chronic infection with initial hepatic inflammation and damage and is the most widely used model to study the pathogenesis of human CMV disease (Livingston-Rosanoff et al., 2012; Brune, 2013). In C57BL/6 mice NK cells, recruited by inflammatory monocytes, play a crucial role in the early control of MCMV infection by both NK cell-mediated cytotoxicity and the production of effector cytokines (Smith et al., 2002; Scalzo and Yokoyama, 2008). Infection promotes liver inflammation by enhancing IL-1 β and TNF- α production. TNF- α plays a role in defense against MCMV infection by activation of antiviral activities of T and NK cells (Orange and Biron, 1996), but is also critical in MCMV-induced liver damage in normal or immunodeficient hosts (Orange et al., 1997). TNF- α -mediated signaling is required for the development of early necrotic foci in the livers of MCMV-infected C57BL/6J Rag-/- mice and the NK- and T- cell-deficient E26 mice, indicating that the main source of TNF- α are non-immune liver cells.

Galectins play an important role in the regulation of major cellular functions such as cell attachment, spreading, migration, proliferation (Elola et al., 2007). Gal-3 also regulates cell signaling and apoptosis (Markowska et al., 2011), and plays different roles in the pathogenesis of many inflammatory, infectious and malignant diseases (Radosavljevic et al., 2011; Volarevic et al., 2012; Arsenijevic et al., 2016; Simovic Markovic et al., 2016). An increased expression of Gal-3 was observed in human T lymphotropic virus-1 infection (Hsu et al., 1996), as well as in Junin virus-induced central nervous system lesions, but its role in the pathogenesis of viral disease is not revealed (Jaquenod De Giusti et al., 2011).

We have previously shown that deletion of galectin-3 gene, *Lgals3*, prevents ConA-induced hepatitis and that Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT cell induced liver injury (Volarevic et al., 2012, 2015). Further, *Lgals3* ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and IL-33 dependant fibrosis in mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Jefic et al., 2015), and enhances bile duct damage and liver fibrosis in xenobiotic induced primary biliary cholangitis (PBC) (Arsenijevic et al., 2016). Also Gal-3 overexpression was found in hepatocellular carcinoma (Hsu et al., 1999). The role of Gal-3 in viral hepatitis is not understood.

In order to explore possible role of Gal-3 in the development of MCMV-induced hepatitis we used Gal-3 deficient mice on C57BL/6 background and two strains of MCMV. Our results provide the first evidence that *Lgals3* deletion promotes MCMV-induced liver inflammation and enhances MCMV-induced hepatitis by facilitation of TNF- α -dependent hepatocyte death. This effect appears to be independent of NK cells. Moreover, TNF- α blockade before MCMV infection attenuates apoptosis of hepatocytes. Treatment of MCMV-infected Gal-3 KO mice with recombinant Gal-3 reduces liver necrosis and inflammation. Thus, our data show that Gal-3 plays an important role in MCMV-induced liver damage and therefore may be

a potential target for therapeutic intervention in acute CMV-induced liver disease.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Gal-3-deficient mice on the C57BL/6 background (Gal-3 KO) and wild-type (WT) C57BL/6 mice (6–8 weeks of age) were used in the experiments. Breeding pairs of WT and Gal-3 KO mice were obtained from the University of California, Davis, United States (Davis, CA, United States; by courtesy of D.K. Hsu and F.T. Liu). All animal procedures were approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and conducted in accordance with the National Institutes of Health guidelines for humane treatment of laboratory animals. Unless otherwise stated each experimental group in each experiment contained six animals.

Viruses

The bacterial artificial chromosome (BAC)-derived MCMV strain MW97.01 has previously been shown to be biologically equivalent to MCMV strain Smith (VR-1399) and is hereafter referred as WT MCMV (Wagner et al., 1999). Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1×10^5 PFU of MCMV strain MW97.01 in a volume of 200 μ L of diluent (PBS). Mice were also infected with MW97.01, the mutant virus lacking m157 gene (Δ m157 MCMV) intravenously (i.v.) with 2×10^5 PFU in a volume of 100 μ L of diluent (PBS).

Serum Levels of Transaminases

Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured 36 and 72 h after MCMV infection by standard photometric method using the automated biochemistry analyzer Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Germany) and Olympus AU reagents, according to the manufacturer's instructions, expressed in U/L.

Histological Analyses

The isolated livers were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, and consecutive 4 μ m tissue sections were cut at various depths and mounted on slides. Sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and every fourth (six slides) was evaluated for inflammation and necrosis in the liver. Section examined under low-power light microscopy (BX51; Olympus) equipped with digital camera. Scores of cumulative liver pathology for inflammation and necrosis were presented using the following scoring system: 0, normal (no pathology); 1, mild (1–3 abnormal areas); 2, moderate (3–5 abnormal areas); 3, severe (>5 abnormal areas). To determine the number of inflammatory infiltrates, whole liver tissue was sectioned at three non-subsequent depths and ten different fields were counted/section. Histological samples were blinded prior to evaluation.

Immunohistochemical Detection of Galectin-3 and TNF- α

Formalin-fixed, paraffin-embedded mouse liver tissue sections were incubated with rabbit anti-TNF- α (ab66579, Abcam), rabbit anti-caspase-3, active/cleaved (NB100-56113, Novus Biologicals), anti-caspase 3 and rabbit anti-Gal-3 (ab53082, Abcam). Sections were visualized by rabbit-specific conjugate (Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam) and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope (BX51; Olympus). Virus-infected cells were visualized by anti-IE1 staining (MCMV protein expressed with early kinetics).

Detection of Cell Death by TUNEL Staining

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nickend labeling) staining was performed to assess death hepatocytes in livers sections. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were stained with *in situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche) following the instructions of manufacturer. DAB (3,3'-diaminobenzidine) as peroxidase substrate, was used to yield the characteristic brown color for nuclei. Slides were counterstained with hematoxylin solution and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope. The TUNEL-positive nuclei (brown) were quantified under $\times 400$ magnification in five randomly fields and the data were summarized as the mean number of positive cells.

Isolation of Hepatic Mononuclear Cells and Flow Cytometry

The isolation of liver-infiltrating inflammatory mononuclear cells was conducted as previously described (Volarevic et al., 2012). The isolated liver-infiltrating mononuclear cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies, including CD3, CD49b, CD8, NKG2D, CD69, perforin, granzyme B, NF- κ B, IFN- γ , IL-10, IL-17, and TNF- α . Isotype Abs with matching conjugates were used as negative controls. For intracellular staining, cells were activated with PMA/ionomycin and processed as previously described (Milovanovic et al., 2012). Cells were analyzed with the FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences), and analysis was conducted with FlowJo (Tree Star).

Infliximab Treatment

In order to inhibit production of TNF- α , mice were injected with chimeric monoclonal antibody, Infliximab (Remicade, JANSSEN BIOLOGICS B.V.), 5 mg/kg in 200 μ L of saline intraperitoneally 1 h before MCMV infection. Mice were sacrificed 48 h after infection.

Treatment With Recombinant Galectin-3

WT and galectin-3 KO mice were treated with recombinant Galectin-3, 5 μ g per mouse (Peprotech, Rocky Hill, NJ, United States) intraperitoneally, 2 h

before MCMV infection. Mice were sacrificed 36 h after MCMV infection.

Isolation of Hepatocytes and Flow Cytometry

Hepatocytes were isolated as previously described (Li et al., 2010). Briefly, extirpated livers were transferred HBSS, cut into 1 mm³ size pieces and washed in complete DMEM. Dissected tissue was centrifuged at 800 \times G for 4 min, pellet resuspended in digestion medium (0.6% NaCl, 0.05% KCl, 1.2% HEPES, 0.07% CaCl₂, 3 g/mL collagenase type I) and incubated for 20 min at 37°C. After incubation cells centrifuged at 800 \times G for 4 min, pellet was washed twice in a complete DMEM, passed through the 100 μ m filter and cells centrifuged at 600 \times G for 4 min. Pellet that contains hepatocytes was resuspended in DMEM medium with FBS. Isolated hepatocytes were washed in cold PBS and resuspended in 1X binding buffer (10X binding buffer: 0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) at concentration 1 \times 10⁶/mL. Annexin FITC and propidium iodide (PI) were added to the 100 μ L of cell suspension and incubated for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. After incubation 400 μ L of 1X binding buffer was added to each tube and stained cells were analyzed within 1h using FACSCalibur (BD, San Jose, United States) and FlowJo software (Tri Star). For detection of cell surface expression of calreticulin, isolated hepatocytes were stained with anti-calreticulin antibody (Abcam) and analyzed by FACSCalibur (BD, San Jose, United States) and FlowJo software (Tri Star).

Measurement of TNF- α and HMGB1

Levels of TNF- α and HMGB1 in the liver homogenate were measured using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States for TNF- α and Elabscience for HMGB1) according to the manufacturer's instructions.

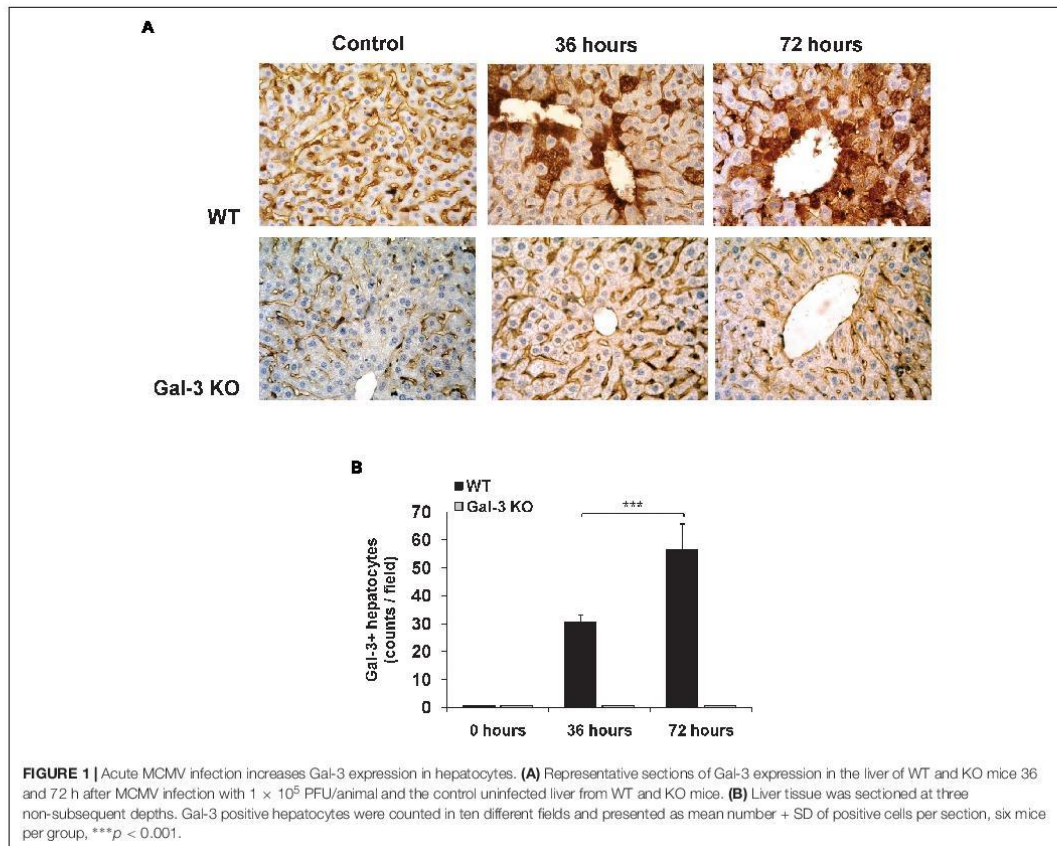
Statistical Analysis

All statistics were carried out using SPSS 18.0 for Windows software. Results were analyzed using the Student's *t*-test or Mann-Whitney test and ANOVA or Kruskal-Wallis. Data in this study were expressed as the mean + SE or +SD. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

MCMV Infection Increases the Expression of Galectin-3 in Hepatocytes

Previously, we have shown very weak expression of Gal-3 in the liver parenchyma and biliary epithelial cells in healthy C57BL/6 mice (Arsenijevic et al., 2016). Also we found strongly enhanced expression of Gal-3 in patients with virus induced hepatitis (Volarevic et al., 2015). To explore the effect of MCMV infection on Gal-3 expression in mouse livers, immunostaining of Gal-3 in the livers of WT and Gal-3 KO mice was done 36 and 72 h after MCMV infection. Time-dependent increase of Gal-3 expression in hepatocytes after MCMV infection was noticed



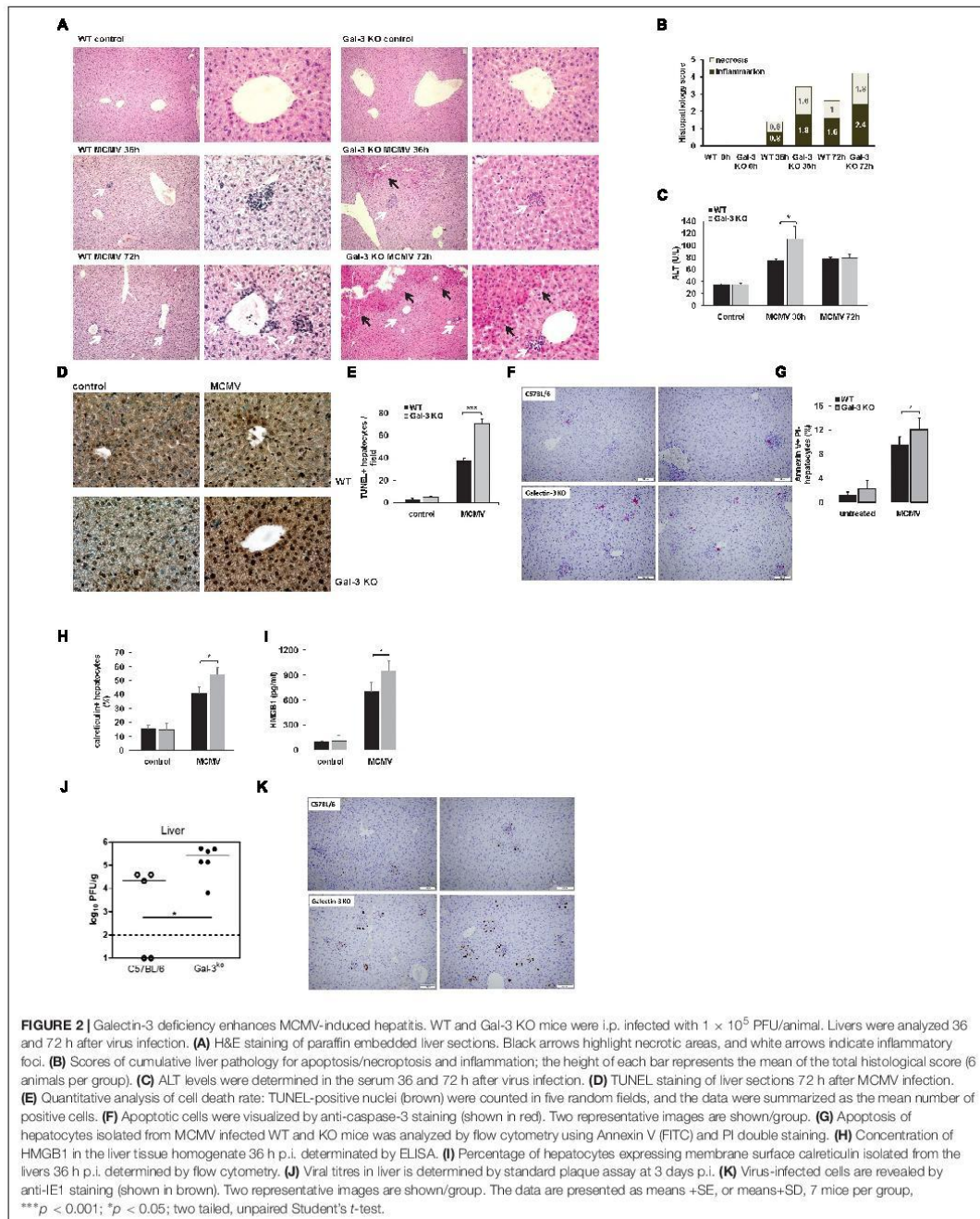
in the livers of WT mice (Figure 1A). Significantly higher number of Gal-3 expressing hepatocytes per field was noticed 72 h after infection when compared with liver sections obtained 36 h after MCMV infection (Figure 1B). As a control, Gal-3 was not detected in the livers of untreated and KO infected mice (Figure 1A).

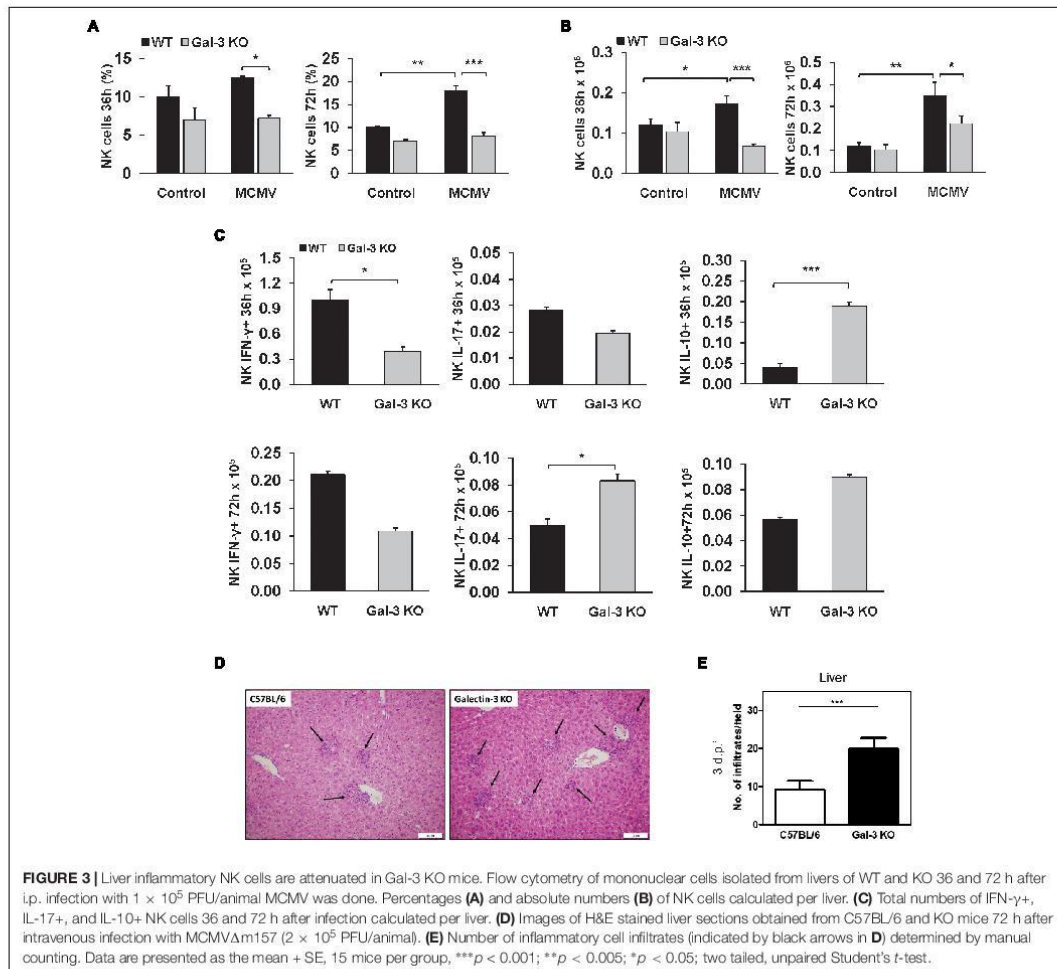
The Absence of Gal-3 Enhances Virus Induced Hepatitis and MCMV Titers in the Liver

In light of increased Gal-3 expression in hepatocytes of MCMV-infected mice, we wanted to explore the role of Gal-3 in overall severity of MCMV-induced hepatitis. For this, histological and serological parameters of liver damage were analyzed in WT and Gal-3 KO mice, 36 and 72 h after MCMV infection. Histological parameters related to MCMV-induced hepatitis, liver inflammation and necrosis were more pronounced in Gal-3 KO mice, 36 and 72 h after infection (Figures 2A,B). No difference in the architecture of liver tissue was noticed

between WT and Gal-3 KO uninfected mice (Figure 2A). Bigger necrotic areas and inflammatory foci were observed in the livers of Gal-3 KO mice in comparison with WT mice, 36 h after infection (Figures 2A,B). Similar differences between Gal-3 KO and WT mice in the size of necrotic areas were observed 72 h after infection also (Figures 2A,B). At this time point, there was no difference in the size of inflammatory foci between the two groups (Figure 2A), but Gal-3 KO mice had higher number of smaller inflammatory foci compared with WT mice (Figure 2A). Although HCMV infection in immunocompetent hosts is subclinical, it is often accompanied with elevated serum levels of transaminases. Thus, we examined the level of alanine transaminase (ALT) in the sera of infected mice. In line with histological findings, we observed significantly higher level of ALT in the sera of Gal-3 KO mice 36 h after MCMV infection, compared to WT mice (Figure 2C).

In order to further analyze the liver damage in WT and KO mice after MCMV infection we used TUNEL assay. As shown in Figures 2D,E, 72 h after MCMV infection, the livers of Gal-3 KO mice contains significantly higher number of TUNEL

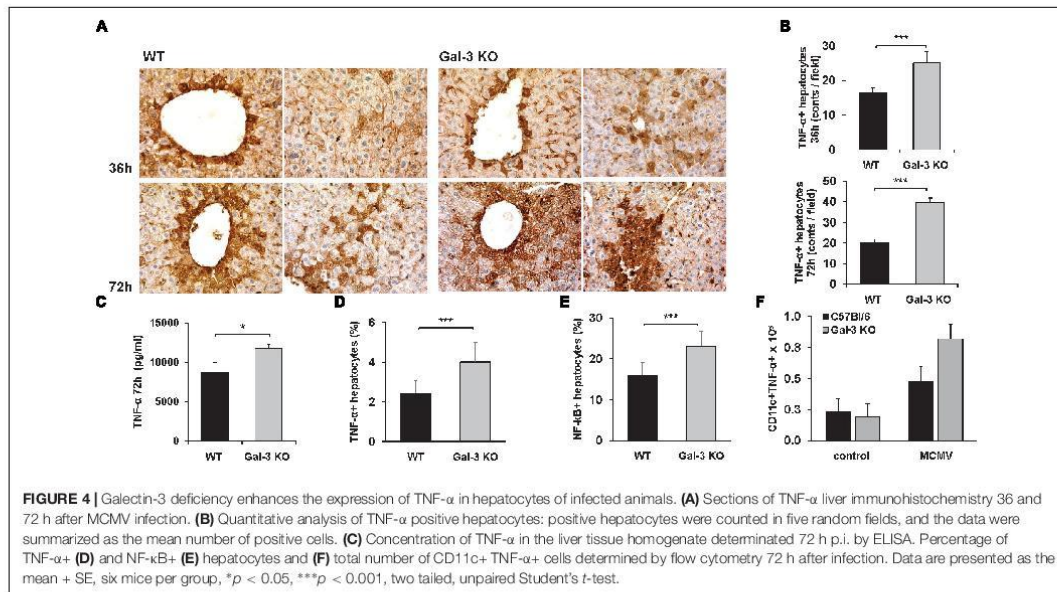




positive (brown nuclei) hepatocytes than the livers of WT mice. Moreover, higher number of apoptotic (caspase 3 positive) cells per one inflammatory infiltrate was detected in Gal-3 KO compared to the WT livers (Figure 2F, red dots). To confirm the increased apoptosis of hepatocytes in Gal-3 KO mice, we isolated hepatocytes from WT and Gal-3 KO mice 72 h after MCMV infection and measured the percentage of apoptotic cells by flow cytometry. In line with histological observations, we detected significantly higher percentage of apoptotic (Annexin V positive) hepatocytes isolated from infected Gal-3 KO mice, compared with those from WT mice (Figure 2G). Given the marked necrotic fields in the liver sections from Gal-3 KO mice (Figures 2A,B) and the ability of MCMV to induce necroptosis (Upton et al., 2017), we examined markers of necroptotic death,

HMGB1 in liver tissue homogenates and membrane expression of calreticulin on hepatocytes, 36 h after infection. We have found significantly higher concentration of HMGB1 in the liver homogenates (Figure 2H) and higher percentage of hepatocytes expressing calreticulin on membrane surface (Figure 2I) in Gal-3 KO mice in comparison with infected WT mice.

In the livers of Gal-3 KO mice, there is a significant increase in viral titers compared to the livers of wild-type mice (Figure 2J). There was no significant difference in viral titers in lung and spleen between WT and Gal-3 KO mice, 72 h after infection (Supplementary Figure S1A). At 8 days post-infection (Supplementary Figure S1B), viral plaques in spleen were not detected with the exception of a very low titer in one Gal-3 KO animal. In lungs, liver and salivary gland, viral plaques were



readily detected but no significant differences were observed between the two groups. Lastly, to demonstrate the presence of virus-infected cells, sections of liver were stained with an antibody against IE1, a MCMV protein expressed with early kinetics. As shown in **Figure 2K**, in the liver tissue of Gal-3 KO mice, higher number of infected cells was observed compared to the WT animals.

Together, previous data indicate protective role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis, possibly relating to its increased expression in hepatocytes and known role of Gal-3 in attenuation of cell death (Takenaka et al., 2004).

Enhanced Disease in Gal-3 KO Mice Is Independent of NK Cell Activation

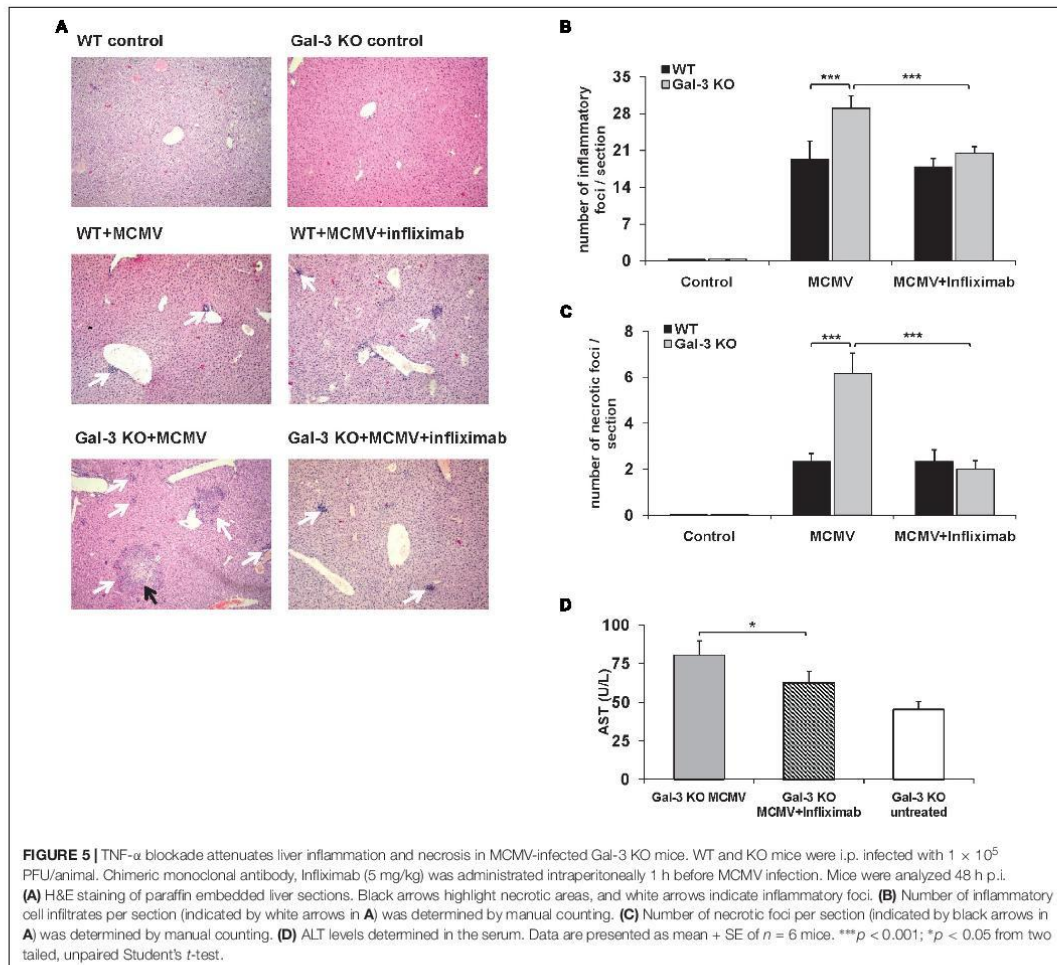
Taking into account the facts that NK cells play a crucial role in the early immune response against MCMV in C57BL/6 mice (Scalzo and Yokoyama, 2008) and that NK cells contribute to liver damage in viral infections (Zheng et al., 2015), we explored the possibility that bigger liver damage in infected Gal-3 KO mice is a consequence of stronger NK cell activity. We analyzed the presence and the phenotype of NK cells in liver mononuclear infiltrates in WT and Gal-3 KO mice, 36 and 72 h after MCMV infection. There was no statistically significant increase in the percentage and total number of NK cells in the livers of infected Gal-3 KO mice in comparison with uninfected Gal-3 KO mice (**Figures 3A,B**). On the other hand, MCMV infection induced a significant increase in both total number and percentage of NK cells in the livers of WT mice (**Figures 3A,B**). Total number of IFN- γ expressing NK cells 36 h after MCMV infection was significantly higher in the livers of WT mice in

comparison with Gal-3KO mice, while 72 h after infection this difference lost significance (**Figure 3C**). No significant difference in the percentage and total number of NK cells expressing IL-17 was noticed between the groups. Lastly, total number of IL-10 positive NK cells was significantly higher in the liver of Gal-3 KO mice in comparison with WT mice, 36 h after infection (**Figure 3C**).

In order to exclude the role of NK cells in the higher liver damage in Gal-3 KO mice, we analyzed liver damage in WT and KO mice after infection with Δ m157 MCMV, the mutant virus lacking m157 gene, which does not stimulate NK cells. As observed for WT MCMV, the inflammatory cell infiltrates were readily observed in the liver tissue of both wild-type and Gal-3 KO infected mice (**Figure 3D**, black arrows). No difference in the size of infiltrates was observed between the two groups but, interestingly, the number of infiltrates was significantly higher in Gal-3 KO mice compared to the wild-type mice (**Figure 3E**). Thus, enhanced liver damage in MCMV-infected Gal-3 KO mice does not appear to relate to NK cell activity.

The Expression of TNF- α in Hepatocytes Is Increased in MCMV-Infected Gal-3 KO Mice

Based on our finding of enhanced necroptosis in Gal-3 KO mice and the fact that TNF- α signaling triggers necroptosis (Vandenabeele et al., 2010) and is required for MCMV-induced liver damage (Orange et al., 1997), TNF- α detection in the livers of MCMV-infected mice was done. The expression of TNF- α in hepatocytes was detected by immunostaining the livers of MCMV-infected mice both, WT and Gal-3 KO (**Figure 4A**).

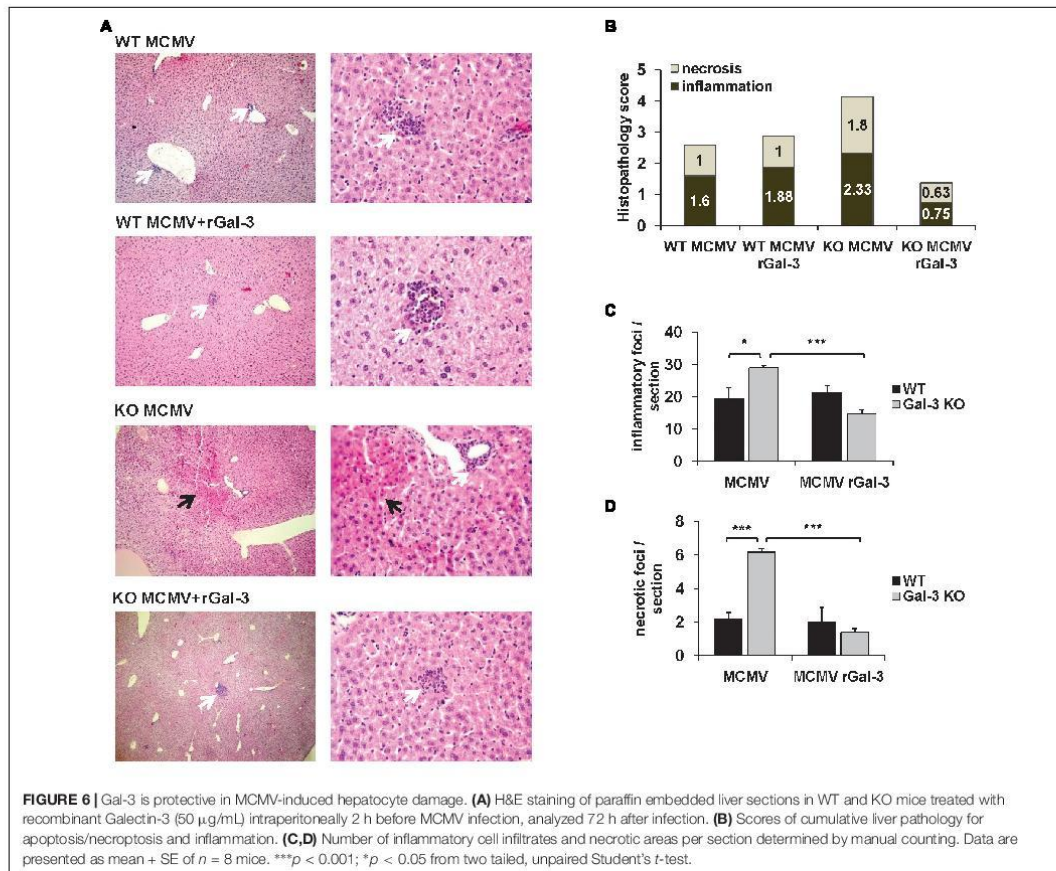


The number of TNF- α positive hepatocytes was significantly higher in the livers of Gal-3 KO mice compared to the group of infected WT mice, 36 and 72 h after infection (Figure 4B). Also, the concentration of TNF- α in the liver tissue homogenate was significantly higher in the group of Gal-3 KO mice compared to the group of WT mice, 72 h after MCMV infection (Figure 4C). Further, significantly higher percentage of TNF- α + hepatocytes (Figure 4D), and total number of TNF- α + CD11c+ cells (Figure 4E), analyzed by flow cytometry 72 h after MCMV infection, were found in the group of Gal-3 KO mice in comparison with WT mice. In accordance with the role of NF- κ B in the promotion of TNF- α expression and its role in TNF- α mediated actions, significantly higher percentage of NF- κ B+ hepatocytes was found in the group of Gal-3 KO mice in comparison to WT mice, 72 h after infection (Figure 4F). These

results suggest that higher TNF- α expression in hepatocytes and immune cells could be the cause of enhanced MCMV-induced hepatocyte death observed in Gal-3 KO mice.

Inhibition of TNF- α Binding Alleviates MCMV-Induced Hepatitis

In order to further explore the possibility that TNF- α plays a role in enhanced MCMV-induced liver damage in Gal-3 deficient animals, pharmacological inhibition of TNF- α with infiximab was done before infection. In the control group of WT mice, TNF- α blockade before MCMV infection did not alter liver inflammation or necrosis, while a pre-treatment of MCMV-infected Gal-3 KO mice with infiximab significantly decreased liver inflammation and necrosis (Figures 5A–C). Liver



of untreated MCMV-infected Gal-3 KO mice contained bigger inflammatory and necrotic foci in comparison to the liver of infliximab-pretreated mice (Figure 5A). Also, the TNF- α blockade before MCMV infection significantly decreased serum levels of ALT in Gal-3 KO mice (Figure 5D). Ameliorated MCMV-induced hepatitis in Gal-3 KO mice treated with infliximab supports the role of TNF- α in enhanced disease in Gal-3 deficient animals.

Exogenous Gal-3 Alleviates MCMV-Induced Liver Damage

To confirm the protective role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis disease severity in WT and Gal-3 KO mice treated with recombinant Gal-3 was evaluated. Administration of recombinant Galectin-3 did not significantly alter inflammation and necrosis in WT mice (Figures 6A,B). Although we have not observed an altered number of inflammatory foci per liver in WT mice, there was an increase in their size (Figure 6A, white arrows). Gal-3 KO mice treated with recombinant

Galectin-3 had lower histological score of necrosis and inflammation and lower number of inflammatory and necrotic foci per section, 72 h after MCMV infection (Figures 6A–D). Alleviated disease in Gal-3 KO mice treated with recombinant Galectin-3 confirms the protective role of Gal-3 in MCMV induced hepatitis.

DISCUSSION

Here, we provide the first evidence that Gal-3 plays a protective role in MCMV-induced hepatitis as indicated by higher liver damage, serum levels of ALT and higher virus titers in Gal-3 deficient mice (Figure 2). Further exogenous Gal-3 alleviates MCMV-induced liver damage (Figure 6).

Several clinical studies indicate an increased serum level of Gal-3 in viral infections (Ten Oever et al., 2013; Lukic et al., 2017), and point out Gal-3 as a potential marker of viral infection (Kobayashi et al., 2015). Findings obtained in

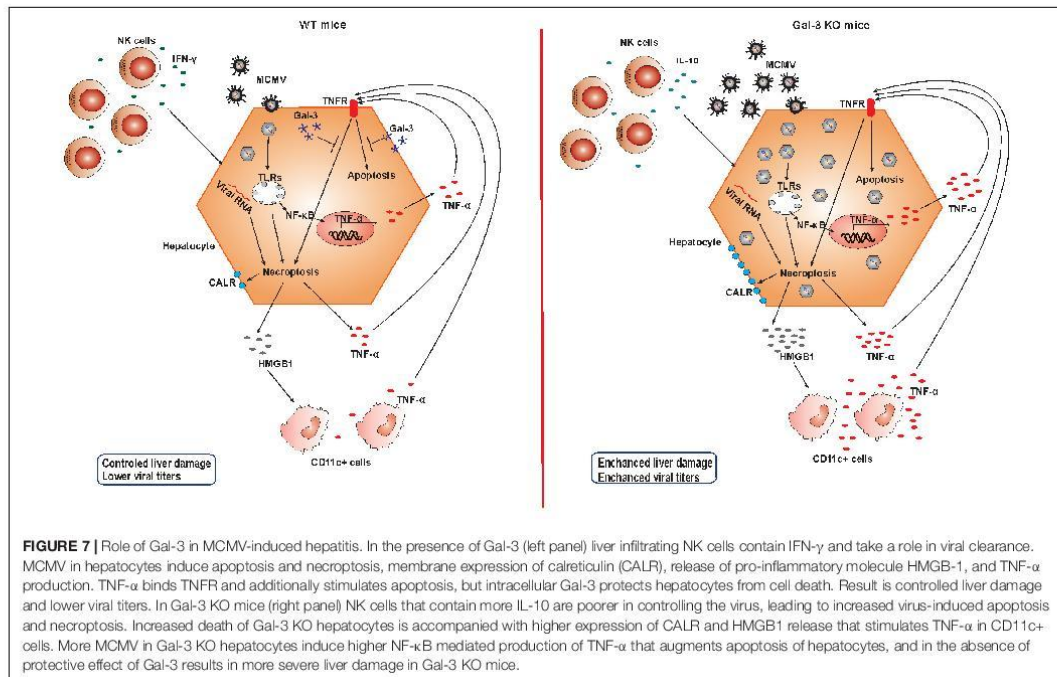


FIGURE 7 | Role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis. In the presence of Gal-3 (left panel) liver infiltrating NK cells contain IFN- γ and take a role in viral clearance. MCMV in hepatocytes induce apoptosis and necroptosis, membrane expression of calreticulin (CALR), release of pro-inflammatory molecule HMGB-1, and TNF- α production. TNF- α binds TNFR and additionally stimulates apoptosis, but intracellular Gal-3 protects hepatocytes from cell death. Result is controlled liver damage and lower viral titers. In Gal-3 KO mice (right panel) NK cells that contain more IL-10 are poorer in controlling the virus, leading to increased virus-induced apoptosis and necroptosis. Increased death of Gal-3 KO hepatocytes is accompanied with higher expression of CALR and HMGB1 release that stimulates TNF- α in CD11c+ cells. More MCMV in Gal-3 KO hepatocytes induce higher NF- κ B mediated production of TNF- α that augments apoptosis of hepatocytes, and in the absence of protective effect of Gal-3 results in more severe liver damage in Gal-3 KO mice.

animal model of coxsackievirus B3 virus induced cardiac injury in C57BL/6 mice studies indicate a protective role of Gal-3 in viral-induced diseases (Jaquenod De Giusti et al., 2015). Here, we show that Gal-3 gene deletion leads to accelerated liver damage induced by MCMV infection. In C57BL/6 mice, Gal-3 deletion enhances liver disease which is characterized by higher liver infiltrates and necrosis (Figures 2A,B), increased serum level of ALT (Figure 2C), enhanced apoptosis and necroptosis of hepatocytes (Figures 2D–I), higher viral titers (Figure 2J) and higher number of MCMV-infected cells in liver (Figure 2K). Further, a pretreatment of MCMV-infected Gal-3 KO mice with recombinant Gal-3 reduced the inflammation and liver damage in MCMV-induced hepatitis (Figure 6). The diverse effects of Gal-3 in different inflammatory conditions depend on the dominant pathogenic mechanisms involved. In macrophage mediated carditis and cardiac fibrosis induced by coxsackievirus B3 virus disruption of Gal-3 gene, or pharmacological inhibition of Gal-3, has the protective role (Jaquenod De Giusti et al., 2015). We also previously reported that Gal-3 gene deletion alleviates T and NKT cell mediated hepatitis (Volarevic et al., 2012, 2015). But, in line with finding of this study is our previous report that Gal-3 gene deletion aggravates xenobiotic induced PBC (Arsenijevic et al., 2016) due to enhanced hepatocyte apoptosis and release of autoantigens.

NK cells play a crucial role in the early immune response against murine cytomegalovirus infection and in the clearance

of MCMV in C57BL/6 mice (Scalzo and Yokoyama, 2008). NK cells, also contribute to liver damage in viral infections (Zheng et al., 2015). Although NK cells express Gal-3 that mainly downregulates their inflammatory and cytotoxic activities (Radosavljevic et al., 2011), higher liver damage in Gal-3 KO mice was not accompanied with higher activity of NK cells (Figure 3). Here, we have demonstrated that WT mice had higher influx of NK cells in the liver in comparison with Gal-3 KO mice (Figures 3A,B). Higher total number of IFN- γ expressing and lower total number of IL-10 expressing NK cells was noticed in the livers of WT mice (Figure 3C). In accordance with previous report that NK cells as the main source of IFN- γ , which plays a pivotal role in the antiviral response (Jost and Altfeld, 2013), our results indicate that lower viral titers in the livers of WT mice (Figure 2J) are the result of enhanced activity of NK cells in these mice in comparison with Gal-3 KO mice. The absence of NK cells involvement in higher liver damage in Gal-3 KO mice was confirmed by experiments with MCMV Δ m157 infection. The stimulation of activating Ly49H receptor of NK cells with MCMV-encoded protein m157, has a crucial role in early MCMV control and resistance to MCMV infection (Smith et al., 2002). The deletion of m157 gene or blocking the Ly49H receptor on NK cells abrogates the control of MCMV infection in most of the organs (Brown et al., 2001; Lee et al., 2001; Bubic et al., 2004; Sumaria et al., 2009). Higher number of liver infiltrates in Gal-3 KO mice infected with

MCMV Δ m157 in comparison with MCMV Δ m157 infected WT mice (Figures 3D,E) suggests that higher activity of NK cells doesn't play important role in enhanced liver damage of Gal-3 KO mice.

Acute MCMV infection generates an early systemic inflammatory response characterized by high levels of TNF- α , IL-12, IFN- γ , and type I IFNs (Orange and Biron, 1996; Nguyen et al., 2002). TNF- α mediates MCMV-induced liver damage independently of T and NK cells. It is required for the development of early hepatic necrotic foci and increased levels of liver enzymes (Orange et al., 1997). Our results indicate that hepatocytes are a significant source of TNF- α in MCMV infection (Figure 4). Although TNF- α is traditionally described as cytokine secreted by the cells of innate immunity (Wajant et al., 2003), tissue-specific cells also produce TNF- α (Gonzalez-Amaro et al., 1994; Bluml et al., 2012; Yoshigai et al., 2014). Production of TNF- α in the livers of MCMV infected mice depends on TLR3, TLR7, and TLR9 signaling (Zucchini et al., 2008; Crane et al., 2012) and also on activity of MAPK-activated protein kinase 2 (Ehltg et al., 2016). Since, we found MCMV-infected hepatocytes (Figure 2K) it can be assumed that MCMV directly stimulates TNF- α production in hepatocytes. We detected higher expression of TNF- α and higher number of TNF- α expressing hepatocytes in the liver of MCMV-infected KO mice (Figure 4). Additionally, TNF- α blockade with monoclonal antibody, Infliximab, significantly reduced hepatocyte death in MCMV-infected mice, especially in Gal-3 KO mice (Figure 5). TNF- α sensitizes hepatocytes to both caspase-dependant and caspase-independent apoptosis (Jones et al., 2000), and triggers necroptosis (Vandenabeele et al., 2010). Taking into account these observations, it appears that the higher production of TNF- α in hepatocytes of MCMV-infected Gal-3 KO mice contributes to greater liver damage.

Normal hepatocytes do not express Gal-3 in humans (Arsenijevic et al., 2016), but expression of Gal-3 is increased in different liver diseases (Shimonishi et al., 2001). Here, we have shown no Gal-3 expression in hepatocytes of untreated mice and a time-dependant increase of Gal-3 expression in hepatocytes of MCMV-infected WT mice (Figures 1A,B). This finding is in accordance with previously reported up-regulated expression of Gal-3 in mouse CNS tissue after encephalomyocarditis virus infection (Kobayashi et al., 2015) and in microglia and astrocytes of mice infected with Junin virus (Jaquenod De Giusti et al., 2011). Recently, it has been shown that TNF- α increases expression of Gal-3 (Okamoto et al., 2019), indicating that MCMV-induced Gal-3 expression in hepatocytes could be the result of virus-induced TNF- α production. The deletion of galectin-3-encoding gene sensitizes human keratinocytes, colorectal cancer cells, leukemia cells, human renal cell carcinoma and cholangiocarcinoma cells to apoptosis (Shi et al., 2007; Wongkham et al., 2009; Cheng et al., 2011; Xu et al., 2013), whereas the overexpression of Lgals3 protects the cells from apoptosis (Takenaka et al., 2004). Gal-3 inhibits TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL, induced apoptosis by activation of the PI3K/Akt pathway which blocks loss of the mitochondrial membrane potential, resulting

in inhibition of caspase-9 and caspase-3 activation (Oka et al., 2005). In accordance with this, we found higher percentage of TNF- α positive (Figures 4A–D) and apoptotic hepatocytes (Figures 2D–G) in infected Gal-3 KO mice, compared to WT mice. Further, we found significantly higher HMGB1 release (Figure 2H) and percentage of calreticulin positive hepatocytes (Figure 2I), markers of necroptotic death (Kepp et al., 2014), in the livers of infected Gal-3 KO mice compared with WT mice. HMGB1 binds to several receptors on the surface of immune cells (TLR2, TLR4, RAGE) and mediates strong inflammation (Scaffidi et al., 2002), while exposed calreticulin binds to receptors on antigen presenting cells and stimulates phagocytosis (Chao et al., 2010). It can be assumed that higher necroptosis of hepatocyte in Gal-3 deficient mice, early after MCMV infection, accompanied with higher release of HMGB1 (Figure 2J), enhances liver inflammation and TNF- α production in innate immune cells (Figure 4F) which in turn activates NF- κ B in hepatocytes and subsequently augments the expression of innate cytokines (TNF- α) in hepatocytes (Zhou et al., 2016) leading to enhanced liver damage.

Finally, our data suggest that the increased expression of Gal-3 in MCMV-infected livers protects hepatocytes from TNF- α facilitated apoptosis and necroptosis, and consequentially attenuates liver damage in MCMV-induced hepatitis (Figure 7). This findings combined with reduced MCMV-induced liver damage after recombinant Gal-3 treatment indicate protective role for Gal-3 in MCMV-induced liver damage, which can be of therapeutic relevance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BS (1st Author), MM, NA, SJ, and ML conceived and designed the experiments. BS (1st Author), JM, AA, BS (4th Author), IS, and MM performed the experiments. BS (1st Author), IS, and MM analyzed the data. BS (1st Author), ML, and MM wrote the paper.

FUNDING

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants Nos. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia, and The Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14 and MP 02/14).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00185/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Galectin-3 KO mice exhibit higher viral titres early after infection. C57BL/6 and galectin-3 KO mice were i.v. infected with 2×10^5 PFU/animal. Viral titres in individual organs are determined by standard plaque assay at (A) 3 days and (B) 8 days post-infection. Each dot represents an individual animal and the bar represents the median titre.

REFERENCES

- Arsenijevic, A., Milovanovic, M., Milovanovic, J., Stojanovic, B., Zdravkovic, N., Leung, P. S., et al. (2016). Deletion of Galectin-3 enhances xenobiotic induced murine primary biliary cholangitis by facilitating apoptosis of BECs and release of autoantigens. *Sci. Rep.* 6:23348. doi: 10.1038/srep23348
- Bluml, S., Scheinecker, C., Smolen, J. S., and Redlich, K. (2012). Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 24, 275–281. doi: 10.1093/intimm/dxs047
- Bozza, S., Gaziano, R., Bonifazi, P., Zelante, T., Pitzurra, L., Montagnoli, C., et al. (2007). Thymosin alpha1 activates the TLR9/MyD88/IRF7-dependent murine cytomegalovirus sensing for induction of anti-viral responses in vivo. *Int. Immunol.* 19, 1261–1270. doi: 10.1093/intimm/dxm097
- Brown, M. G., Dokun, A. O., Heusel, J. W., Smith, H. R., Beckman, D. L., Blattenberger, E. A., et al. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934–937. doi: 10.1126/science.1060042
- Brune, W. (2013). “Molecular basis of cytomegalovirus host species specificity,” in *Cytomegalovirus: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, ed. M. J. Reddehase (Poole: Caister Academic Press), 322–329.
- Bubic, I., Wagner, M., Krmpotic, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W. M., et al. (2004). Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 78, 7536–7544. doi: 10.1128/JVI.78.14.7536-7544.2004
- Chao, M. P., Jaiswal, S., Weissman-Tsakamoto, R., Alizadeh, A. A., Gentles, A. J., Volkmer, J., et al. (2010). Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2:63ra94. doi: 10.1126/scitranslmed.3001375
- Cheng, Y. L., Huang, W. C., Chen, C. L., Tsai, C. C., Wang, C. Y., Chiu, W. H., et al. (2011). Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 334–340. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.099
- Crane, M. J., Gaddi, P. J., and Salazar-Mather, T. P. (2012). UNC93B1 mediates innate inflammation and antiviral defense in the liver during acute murine cytomegalovirus infection. *PLoS One* 7:e39161. doi: 10.1371/journal.pone.0039161
- Ehling, C., Trilling, M., Tiedje, C., Le-Trilling, V. T. K., Albrecht, U., Kluge, S., et al. (2016). MAPKAP kinase 2 regulates IL-10 expression and prevents formation of intrathecal myeloid cell aggregates during cytomegalovirus infections. *J. Hepatol.* 64, 380–389. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.012
- Elo, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R., and Rabinovich, G. A. (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1679–1700. doi: 10.1007/s00180-007-7044-8
- Gonzalez-Amaro, R., Garcia-Monzon, C., Garcia-Buey, L., Moreno-Otero, R., Alonso, J. L., Yague, E., et al. (1994). Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J. Exp. Med.* 179, 841–848. doi: 10.1084/jem.179.3.841
- Hsu, D. K., Dowling, C. A., Jeng, K. C., Chen, J. T., Yang, R. Y., and Liu, F. T. (1999). Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 81, 519–526. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990517)81:4<519::AID-IJC3>3.0.CO;2-0
- Hsu, D. K., Hammes, S. R., Kuwabara, I., Greene, W. C., and Liu, F. T. (1996). Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am. J. Pathol.* 148, 1661–1670.
- Jaquenod De Giusti, C., Alberdi, L., Frik, J., Ferrer, M. F., Scharrig, E., Schattner, M., et al. (2011). Galectin-3 is upregulated in activated glia during Junin virus-induced murine encephalitis. *Neurosci. Lett.* 501, 163–166. doi: 10.1016/j.neulet.2011.07.007
- Jaquenod De Giusti, C., Ure, A. E., Rivadeneyra, L., Schattner, M., and Gomez, R. M. (2015). Macrophages and galectin 3 play critical roles in CVB3-induced murine acute myocarditis and chronic fibrosis. *J. Mol. Cell Cardiol.* 85, 58–70. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.010
- Jeftic, I., Jovicic, N., Pantic, J., Arsenijevic, N., Lukic, M. L., and Pejnovic, N. (2015). Galectin-3 ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and IL-33-dependent fibrosis in obesogenic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol. Med.* 21, 453–465. doi: 10.2119/molmed.2014.00178
- Jones, B. E., Lo, C. R., Liu, H., Srinivasan, A., Streetz, K., Valentino, K. L., et al. (2000). Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 705–712. doi: 10.1074/jbc.275.1.705
- Jost, S., and Altfeld, M. (2013). Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 163–194. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100001
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3, e955691. doi: 10.4161/21624011.2014.955691
- Kobayashi, K., Niwa, M., Hoshi, M., Saito, K., Hisamatsu, K., Hatano, Y., et al. (2015). Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation. *Neurosci. Lett.* 592, 107–112. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.061
- Lee, S. H., Girard, S., Macina, D., Busa, M., Zafer, A., Belouchi, A., et al. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* 28, 42–45. doi: 10.1038/ng0501-42
- Li, W. C., Ralphs, K. L., and Tosh, D. (2010). Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* 633, 185–196. doi: 10.1007/978-1-59745-019-5-13
- Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L. P., Garcia, A., McCormick, A. L., Huang, J., and Mocarski, E. S. (2012). Antiviral T cell response triggers cytomegalovirus hepatitis in mice. *J. Virol.* 86, 12879–12890. doi: 10.1128/JVI.01752-12
- Lukic, R., Gajovic, N., Jovanovic, I., Jurisevic, M., Mijailovic, Z., Maric, V., et al. (2017). Potential hepatoprotective role of galectin-3 during hcv infection in end-stage renal disease patients. *Dis. Markers* 2017:6275987. doi: 10.1155/2017/6275987
- Markowska, A. I., Jefferies, K. C., and Panjwani, N. (2011). Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 29913–29921. doi: 10.1074/jbc.M111.226423
- Milovanovic, M., Volarevic, V., Ljubic, B., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Arsenijevic, N., et al. (2012). Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One* 7:e45225. doi: 10.1371/journal.pone.0045225
- Mocarski, E. S., Shenk, T., Griffiths, P. D., and Pass, R. F. (2013). *Fields Virology*, 6th Edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1960–2014.
- Mocarski, E. S., Shenk, T., and Pass, R. F. (2007). “Cytomegaloviruses,” in *Fields Virology*, eds B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wei, X. Q., Liew, F. Y., et al. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* 169, 4279–4287. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4279
- Oka, N., Nakahara, S., Takenaka, Y., Fukumori, T., Hogan, V., Kanayama, H. O., et al. (2005). Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* 65, 7546–7553. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1197
- Okamoto, M., Hidaka, A., Toyama, M., and Baba, M. (2019). Galectin-3 is involved in HIV-1 expression through NF-kappaB activation and associated with Tat in latently infected cells. *Virus Res.* 260, 86–93. doi: 10.1016/j.virusres.2018.11.012
- Orange, J. S., and Biron, C. A. (1996). Characterization of early IL-12, IFN-alpha/beta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156, 4746–4756.
- Orange, J. S., Salazar-Mather, T. P., Opal, S. M., and Biron, C. A. (1997). Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 71, 9248–9258.
- Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Majstorovic, I., Mitrovic, M., Lisnic, V. J., Arsenijevic, N., et al. (2011). Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 451–462. doi: 10.1007/s10585-011-9383-y
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195. doi: 10.1038/nature00858

- Scalzo, A. A., and Yokoyama, W. M. (2008). Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 321, 101–122. doi: 10.1007/978-3-540-75203-5_5
- Shi, Y., He, B., Kuchenbecker, K. M., You, L., Xu, Z., Mikami, I., et al. (2007). Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* 121, 1175–1181. doi: 10.1002/ijc.22848
- Shimonishi, T., Miyazaki, K., Kono, N., Sabit, H., Tuneyama, K., Harada, K., et al. (2001). Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum. Pathol.* 32, 302–310. doi: 10.1053/hupa.2001.22767
- Simovic Markovic, B., Nikolic, A., Gazdic, M., Bojic, S., Vucicevic, L., Kosic, M., et al. (2016). Galectin-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1beta in macrophages. *J. Crohns Colitis* 10, 593–606. doi: 10.1093/ecco-icc/ijw013
- Smith, H. R., Heusel, J. W., Mehta, I. K., Kim, S., Dorner, B. G., Naidenko, O. V., et al. (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8826–8831. doi: 10.1073/pnas.092258599
- Sumaria, N., Van Dommelen, S. L., Andoniou, C. E., Smyth, M. J., Scalzo, A. A., and Degli-Esposti, M. A. (2009). The roles of interferon-gamma and perforin in antiviral immunity in mice that differ in genetically determined NK-cell-mediated antiviral activity. *Immunol. Cell Biol.* 87, 559–566. doi: 10.1038/icb.2009.41
- Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H., Kim, H. R., et al. (2004). Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol. Cell Biol.* 24, 4395–4406. doi: 10.1128/MCB.24.10.4395-4406.2004
- Ten Oever, J., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Van De Veerdonk, F. L., Stelma, F. F., Simon, A., Janssen, M., et al. (2013). Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1605–1610. doi: 10.1007/s10096-013-1919-4
- Upton, J. W., Shubina, M., and Balachandran, S. (2017). RIPK3-driven cell death during virus infections. *Immunol. Rev.* 277, 90–101. doi: 10.1111/imr.12539
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714. doi: 10.1038/nrm2970
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Bojic, S., Stojanovic, M., Nilsson, U., Lefler, H., et al. (2015). Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur. J. Immunol.* 45, 531–543. doi: 10.1002/eji.201444849
- Volarevic, V., Milovanovic, M., Ljujic, B., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Nilsson, U., et al. (2012). Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 55, 1954–1964. doi: 10.1002/hep.25542
- Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U. H., and Messerle, M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73, 7056–7060.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189
- Wongkham, S., Junking, M., Wongkham, C., Sripa, B., Chur-In, S., and Araki, N. (2009). Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 100, 2077–2084. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01304.x
- Xu, Y., Gu, X., Gong, M., Guo, G., Han, K., and An, R. (2013). Galectin-3 inhibition sensitizes human renal cell carcinoma cells to arsenic trioxide treatment. *Cancer Biol. Ther.* 14, 897–906. doi: 10.4161/cbt.25937
- Yoshigai, E., Hara, T., Inaba, H., Hashimoto, I., Tanaka, Y., Kaibori, M., et al. (2014). Interleukin-1beta induces tumor necrosis factor-alpha secretion from rat hepatocytes. *Hepatology Res.* 44, 571–583. doi: 10.1111/hepr.12157
- Zheng, Q., Zhu, Y. Y., Chen, J., Ye, Y. B., Li, J. Y., Liu, Y. R., et al. (2015). Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 180, 499–508. doi: 10.1111/cei.12597
- Zhou, Z., Xu, M. J., and Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol. Immunol.* 13, 301–315. doi: 10.1038/cmi.2015.97
- Zucchini, N., Bessou, G., Traub, S., Robbins, S. H., Uematsu, S., Akira, S., et al. (2008). Cutting edge: overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J. Immunol.* 180, 5799–5803. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5799

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Stojanovic, Milovanovic, Arsenijevic, Stojanovic, Strazic Geljic, Arsenijevic, Jonjic, Lukic and Milovanovic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens

Received: 13 October 2015
Accepted: 02 March 2016
Published: 21 March 2016

Aleksandar Arsenijevic¹, Marija Milovanovic¹, Jelena Milovanovic¹, Bojana Stojanovic¹, Natasa Zdravkovic², Patrick S.C. Leung³, Fu-Tong Liu³, M. Eric Gershwin³ & Miodrag L. Lukic¹

Galectin-3 (Gal-3) is a carbohydrate binding lectin, with multiple roles in inflammatory diseases and autoimmunity including its antiapoptotic effect on epithelial cells. In particular, increased expression of Gal-3 in epithelial cells is protective from apoptosis. Based on the thesis that apoptosis of biliary epithelial cells (BECs) is critical to the pathogenesis of Primary Biliary Cholangitis (PBC), we have analyzed the role of Gal-3 in the murine model of autoimmune cholangitis. We took advantage of Gal-3 knockout mice and immunized them with a mimotope of the major mitochondrial autoantigen of PBC, 2-octynoic acid (2-OA) coupled to BSA (2OA-BSA) and evaluated the natural history of subsequent disease, compared to control wild-type mice, by measuring levels of antibodies to PDC-E2, immunohistology of liver, and expression of Gal-3. We report herein that deletion of Gal-3 significantly exacerbates autoimmune cholangitis in these mice. This is manifested by increased periportal infiltrations, bile duct damage, granulomas and fibrosis. Interestingly, the BECs of Gal-3 knockout mice had a higher response to apoptotic stimuli and there were more pro-inflammatory lymphocytes and dendritic cells (DCs) in the livers of Gal-3 knockout mice. In conclusion, Gal-3 plays a protective role in the pathways that lead to the inflammatory destruction of biliary epithelial cells.

Gal-3, a member of the β -galactoside-binding lectin family, is expressed in various tissues and cell types. Gal-3 modulates numerous cellular functions and can be found in the cytoplasm, the nucleus, on the surface of cells and in extracellular space¹. Extracellular Gal-3 modulates cell adhesion to different extracellular matrix components by lattice formation and cross-linking of matrix molecules and cell surface glycoproteins. Furthermore, extracellular Gal-3 can modulate signaling pathways by binding to cell surface ligands and promotes apoptosis. On the other hand, intracellular Gal-3 suppresses apoptosis, promotes cell growth, and can regulate signal transduction. In the nuclei, Gal-3 exhibits transcriptional activity and promotes proliferation of cells². Intracellular Gal-3 overexpression can be found in many types of cancers. Gal-3 is also involved in the pathogenesis of many chronic inflammatory and malignant diseases³⁻⁸. Epithelial cells of normal intrahepatic bile ducts constitutively, but weakly express Gal-3, while its expression is strongly increased in intrahepatic cholangiocarcinoma^{9,10}. Intracellular Gal-3 in epithelial cells have anti-apoptotic effects⁹. For example, increased expression of Gal-3 in keratinocytes after their exposure to UV light protected them from apoptosis¹¹.

These observations on Gal-3 are particularly noteworthy for PBC, which is characterized by a multi-lineage response to the major mitochondrial autoantigen, PDC-E2. There have been extensive studies on the natural history of PBC, including the multiple pathways that lead to immunopathology in both humans and mice¹²⁻²⁵. These data illustrate several principles. Firstly, genetic predisposition plays a critical role. Secondly, both innate

¹Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. ²Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. ³Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology, University of California at Davis School of Medicine, Davis, CA, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M. (email: marijaposta@gmail.com) or M.L.L. (email: miodrag.lukic@medf.kg.ac.rs)

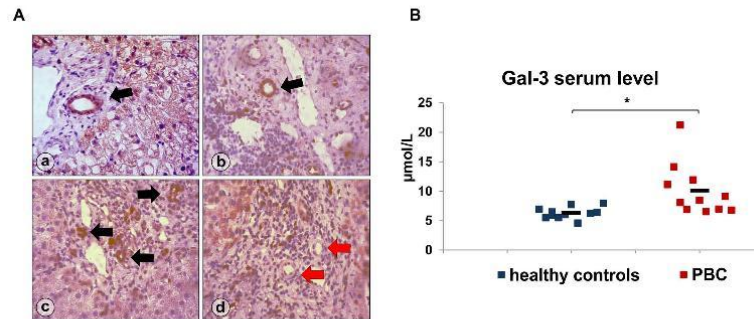


Figure 1. Gal-3 is overexpressed in BECs and level of Gal-3 is increased in the serum PBC patients. (A) Immunohistochemistry of Gal-3 in liver pathology a) PBC, b) viral hepatitis B, c) viral hepatitis C, d) sclerosing cholangitis (Gal-3 expression in BECs, black arrows; no Gal-3 expression in sclerosing bile ducts, red arrows). (B) Serum level of Gal-3 determined in eleven patients irrespectively of histological stage of disease and eleven healthy age and sex matched controls. Data were analyzed by Student t test and presented as mean + SE, or scatter plot * $p < 0.05$.

and adaptive responses are involved at different stages of disease. Thirdly, women are more commonly affected. Though this finding remains unexplained, it is suggested to be a consequence of both hormonal and genetic factors including epigenetic events on the X chromosome^{26–32}.

An interesting thesis on PBC is that BECs are not passive bystanders in PBC. Through variable expression of adhesion molecules, costimulatory molecules and proinflammatory cytokines, BECs can modulate the intensity of the inflammatory processes upon stimulation³³. BECs are also susceptible to apoptosis³⁴. During this process the major mitochondrial autoantigen, PDC-E2, remains immunologically intact³⁵ and is expressed at the luminal surface of the small bile duct cells³⁶. Autoreactive lymphocytes can be activated by antigen(s) originating from apoptosomes released from BECs³⁷. Apoptotic BECs can also stimulate the release of proinflammatory cytokine from monocyte-derived macrophages³⁸.

Animal models of PBC include the immunization of C57BL/6 mice with 2-octynoic acid (2-OA) coupled to BSA, which is characterized by high titer of anti mitochondrial antibodies (AMAs), portal inflammation, and immune mediated cholangitis similar to human PBC³⁹. We report herein that in this experimental model of PBC, Gal-3 deletion exacerbates the natural history of disease, including portal inflammation and fibrosis. We submit that this is the result of enhanced release of autoantigen and an increase in stimulation of antigen presenting cells.

Results

BECs expression and serum level of Gal-3 is increased in PBC patients. We have previously shown that Gal-3 is expressed very weakly in the biliary epithelial cells and liver parenchyma in healthy controls but is strongly expressed in patients with drug and virus induced hepatitis (7). To understand the role of Gal-3 in human PBC, we examined the expression of Gal-3 in liver tissue sections of patients diagnosed with PBC. Gal-3 overexpression was observed in the cytoplasm and nucleus of BECs in patients with PBC (Fig. 1A). Additionally, serum level of Gal-3 was significantly higher in the group of eleven PBC patients compared to eleven paired healthy controls ($p < 0.05$) (Fig. 1B). As in previous studies there was no significant expression of Gal-3 in healthy livers (7). However, high levels of Gal-3 expression were also detected in BECs of patients with viral hepatitis B and C. Furthermore, intracytoplasmic and intranuclear overexpression of Gal-3 in BECs of patients with viral hepatitis B and C was also accompanied by intra-hepatocyte and extracellular overexpression of Gal-3 around inflammatory infiltrates. On the other hand, Gal-3 was mostly absent in BECs of patients with sclerosing cholangitis, and is only weakly expressed in the cytoplasm.

Gal-3 deficiency exacerbates primary biliary cholangitis induced with 2OA-BSA. To examine the role of Gal-3 in a mouse model of PBC, we immunized C57BL/6 WT and Gal-3 KO mice with the xenobiotic, 2OA-BSA, and measured the parameters of PBC. Untreated Gal-3 KO mice at 4 months of age did not develop any liver pathology (Fig. 2D). At eight weeks after immunization, 10/10 tested Gal-3 KO mice developed granuloma and 9/10 tested Gal-3 KO mice developed liver fibrosis. In contrast, only 5/10 of WT mice developed granuloma and 4/10 WT mice had fibrosis with 2OA-BSA treatment (Fig. 2A). This is similar to previous data on C57BL/6 mice³⁹. Periportal infiltration was more pronounced in Gal-3 KO mice (Fig. 2A,D). There is no statistical difference in the degree of periportal inflammation, infiltration of bile ducts without damage, infiltration and damage of bile ducts, and subcapsular infiltrates (score 1), between Gal-3 K/O and WT mice (Fig. 2B). However, the extent of granuloma formation and fibrosis (score 2) was significantly higher in Gal-3 KO mice than WT mice ($p < 0.05$; Fig. 2B). Furthermore, the number of mononuclear cells was significantly higher in livers of Gal-3 KO mice (Fig. 2C) at eight weeks after disease induction ($p < 0.005$). Only small periductal infiltrates were observed in immunized WT mice (Fig. 2Da–c). In contrast, large inflammatory foci were present both around the bile duct and liver parenchyma in immunized Gal-3 KO mice (Fig. 2Dd–f). Obliterated ducts were frequently found in Gal-3 KO mice (Fig. 2Dc,f), but not in WT mice (not shown). We also found significant increase in serological

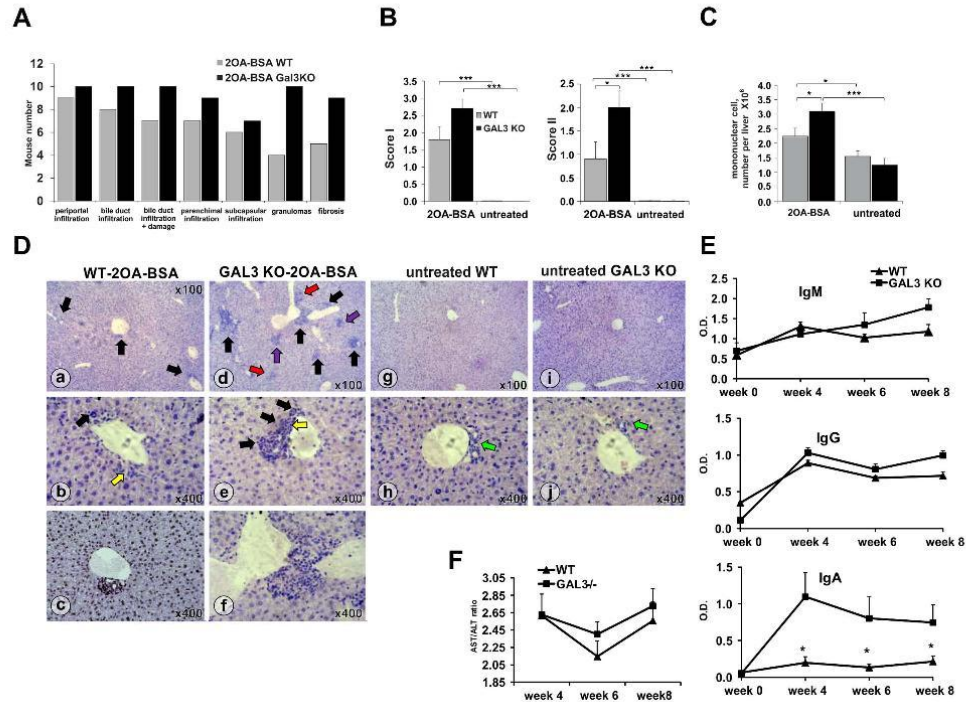


Figure 2. Deletion of Gal-3 enhanced PBC in C57BL/6 mice. (A) Number of mice with parameters of liver inflammation, granuloma formation, and fibrosis. (B) Total score I (liver infiltration and bile duct damage) and score II (liver fibrosis and granuloma formation). (C) Total number of mononuclear cells. (D) Representative liver sections of immunized WT (a–c) and Gal-3 KO (d–f); non-immunized WT (g,h) and Gal-3 KO (i,j) mice, arrows indicate: periductal mononuclear cell infiltrate (black); parenchymal infiltration (red); granuloma formation (violet); bile duct damage (yellow); bile duct obliteration (blue); no infiltration in control mice (green). (E) Serum levels of anti-PDC-E2 antibodies in non-immunized mice (week 0) and 4, 6, and 8 weeks after immunization with xenobiotic. (F) AST/ALT ratio in serum. Data presented as mean + SE, 9 mice per group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

anti-PDC-E2 IgG, IgM and IgA at four weeks after immunization in both groups of mice, with no difference in IgM and IgG levels between WT and Gal-3 KO mice (Fig. 2E). However, serum anti-PDC-E2 IgA antibody was significantly higher in Gal-3 KO mice compared to WT mice ($p < 0.05$) (Fig. 2E). There was no significant difference between AST levels; however, AST/ALT ratio in the sera was higher in the group of Gal-3 KO mice than in WT mice at weeks 6 and 8 after 20A-BSA immunization (Fig. 2F), indicating more extensive liver damage in the absence of Gal-3.

Influx of inflammatory CD8⁺ lymphoid cells is higher in the livers of Gal-3 KO mice. Eight weeks after 20A-BSA immunization, there was no difference in the percentages of CD8⁺TCR⁺ and CD4⁺TCR⁺ cells in livers of WT and Gal-3 KO immunized mice, or between control and diseased mice (Fig. 3A). Although the total number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes increased, only the number of CD8⁺ T lymphocytes was significantly higher in the liver of Gal-3 KO mice compared to WT mice ($p < 0.005$; Fig. 3B).

Gal-3 deletion favors the proinflammatory phenotype of liver DCs. We examined the relative percentage of CD11c⁺ DCs in the livers of Gal-3 KO, WT immunized, and control mice. There was no difference in the percentage of CD11c⁺ DCs between Gal-3 KO and WT mice, but significantly higher absolute numbers of DCs were detected in the livers of Gal-3 KO mice (Fig. 3C). DCs of Gal-3 KO mice had higher expression of markers of activation CD86 and MHC II molecules (Fig. 3D). Furthermore, a significantly higher number of CD11c⁺ cells expressing CD86 ($p < 0.05$) and MHC II ($p < 0.05$) molecules was observed in the livers of xenobiotic immunized Gal-3 KO mice (Fig. 3E). Percentage of CD11c⁺TNF α ⁺ cells was higher in Gal-3 KO mice (Fig. 3G), but without significant difference. However, the absolute number of CD11c⁺TNF α ⁺ cells was significantly higher in the group of Gal-3 KO mice compared with WT mice (Fig. 3F; $p < 0.05$), confirming the inflammatory phenotype of DCs.

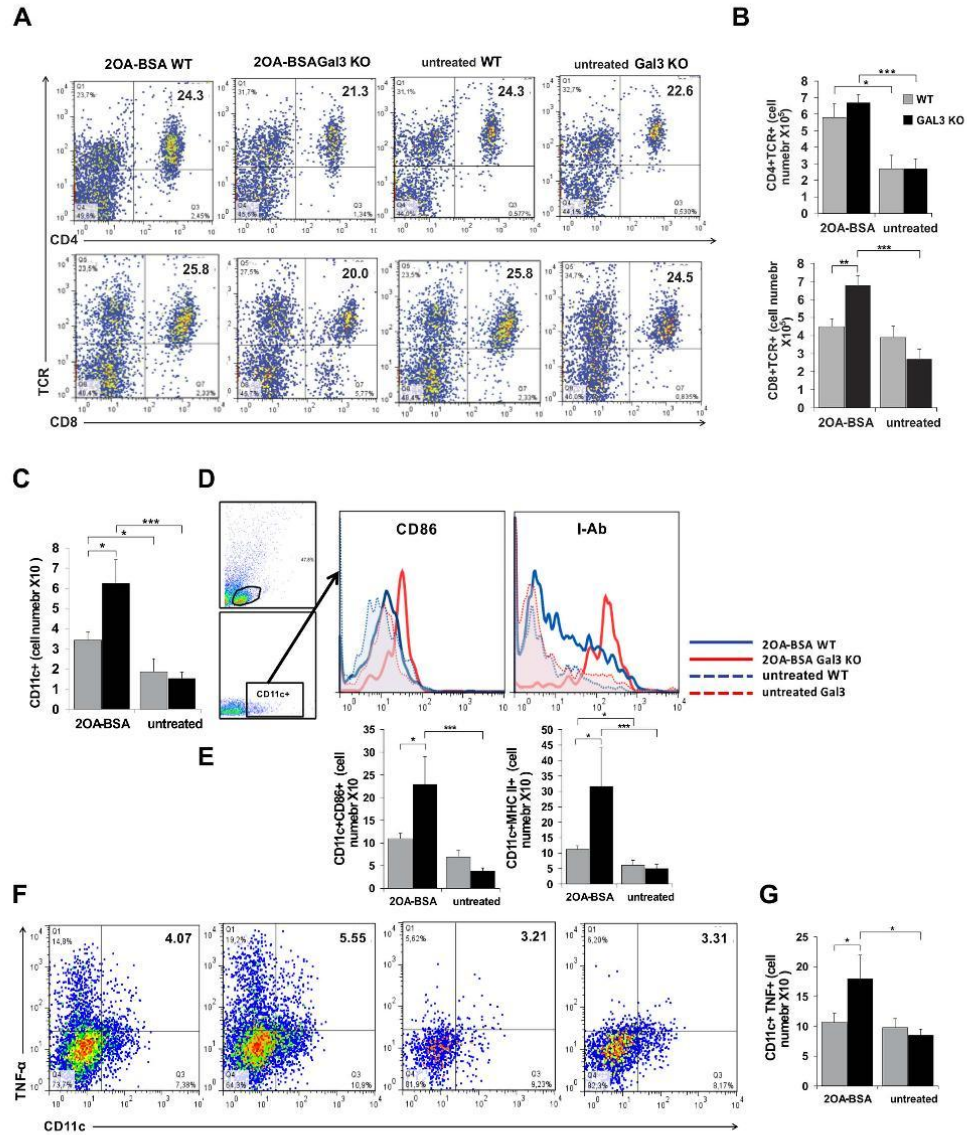


Figure 3. Gal-3 deletion leads to increase of CD8+ T lymphocytes and inflammatory phenotype of DCs in liver infiltrates after PBC induction. (A) Representative dot plots displaying the frequency and (B) total numbers of CD4+ and CD8+ T lymphocytes calculated per liver. (C) Total numbers of CD11c+ DCs in the livers. (D) Expression of markers of activation on CD11c+ gated cells. (E) Total numbers of DCs expressing CD86 and MHC II. Representative dot plots (F,G) total numbers of DCs expressing TNF-alpha. Data are presented as the mean+SE, 9 mice per group, ** $p < 0.005$; * $p < 0.05$.

Enhanced PBC in Gal-3 KO mice is characterized by more pronounced apoptosis of BECs. Consistent with previous reports and our data in humans we found that pathological changes in the liver were accompanied by increased Gal-3 expression in BECs. Immunostaining of liver sections showed no Gal-3 expression in untreated control mice (Fig. 4Aa-k), untreated mice, while significant increase in Gal-3 expression was detected in BECs and liver infiltrates in 2OA-BSA immunized WT mice (Fig. 4Aa-d). There was no Gal-3 expression in the livers of both untreated (Fig. 4Al-n) and immunized (Fig. 4Ae-h) Gal-3 KO mice.

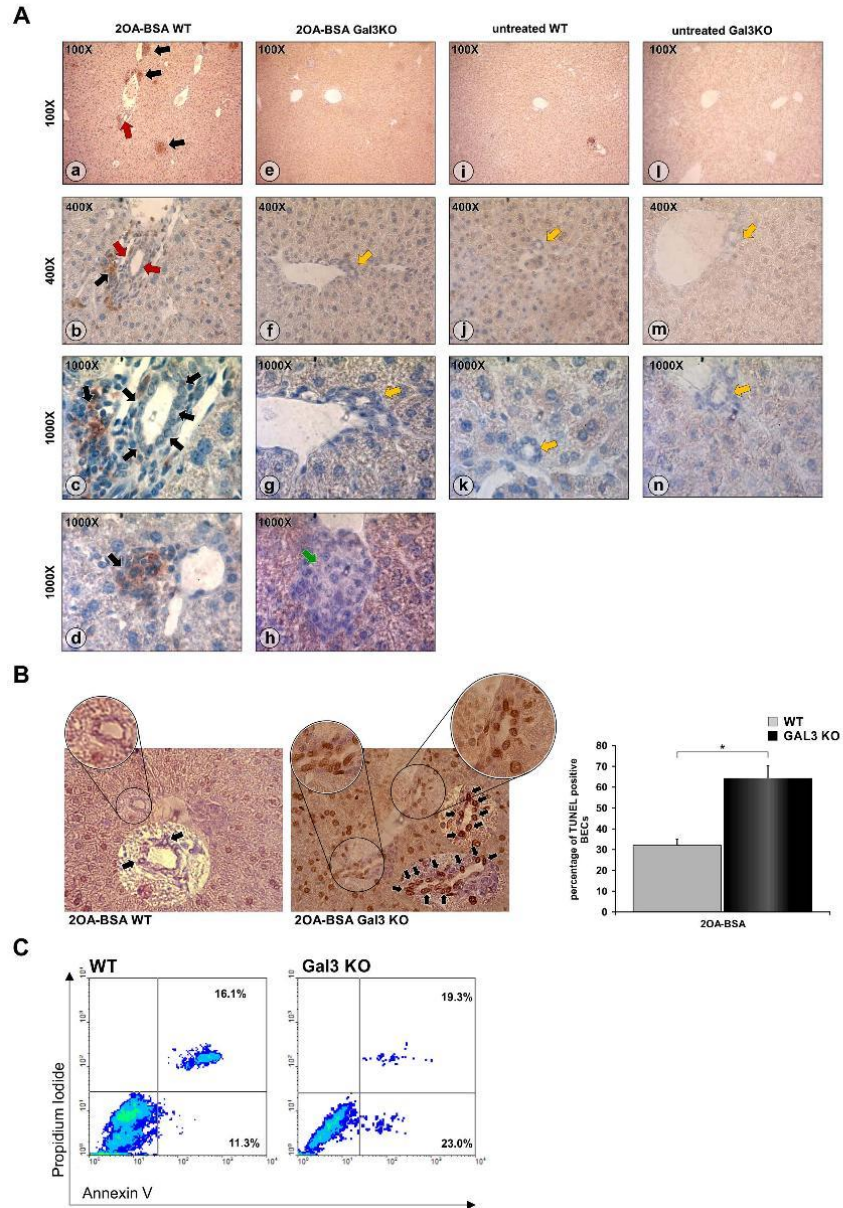


Figure 4. BECs of Gal-3KO mice are more susceptible to apoptosis. (A) Representative sections of Gal-3 liver immunohistochemistry. Gal-3 was expressed in BECs and mononuclear infiltrations in 20A-BSA treated WT mice (a–c; red and black arrows, respectively) and granuloma (d; green arrow), but was not seen in the BECs, infiltrations (e–g; yellow arrows) and granuloma (h, green arrow) of 20A-BSA Gal-3 KO mice and untreated WT (i–k) and Gal-3 KO mice (l–n). (B) TUNEL staining of liver sections (arrows indicate apoptotic cells) and numbers of apoptotic BECs presented as mean + SE; 9 animals per group; * $p < 0.05$. (C) Representative dot plots of apoptotic BECs isolated from healthy WT and Gal-3 KO mice, stained with Annexin V and propidium iodide after exposure to apoptosis inducer (ionomycin).

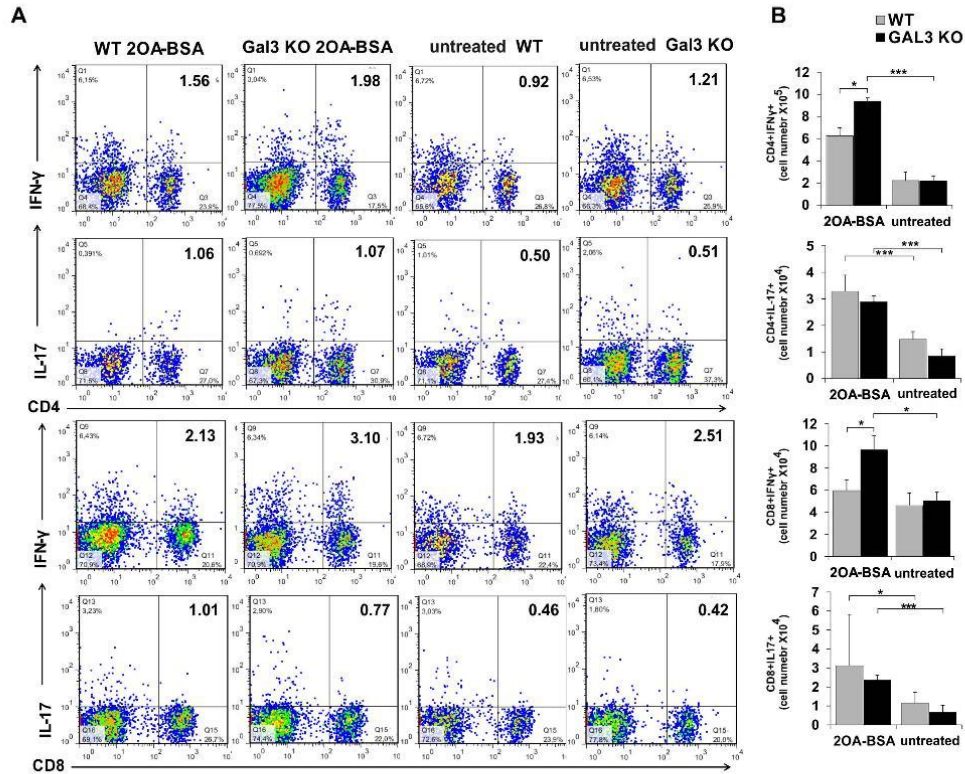


Figure 5. IFN- γ containing cells predominate in the liver of Gal-3 KO mice after PBC induction.

(A) Representative dot plots of CD4+ and CD8+ cells positive for IFN- γ and IL-17. (B) The total cell numbers of CD4+ and CD8+ cells containing IL-17 and IFN- γ in liver in wild type and Gal-3 KO mice presented as the mean \pm SE; 9 mice per group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Next we analyzed the frequency of apoptotic BECs eight weeks after 20A-BSA immunization. There were significantly more TUNEL positive BECs in the liver sections of Gal-3 KO mice compared with those in WT mice (Fig. 4B). To confirm the increased apoptosis of BECs of Gal-3 KO mice we isolated BECs from untreated WT and Gal-3 KO mice, exposed them *in vitro* to apoptotic stimuli, and measured the percentage of apoptotic cells by flow cytometry. After 22 hours of *in vitro* exposure to ionomycin, we detected higher percentage of apoptotic (Annexin V positive) BECs isolated from Gal-3 KO mice, compared with those from WT mice (Fig. 4C).

Enhanced bile duct damage is associated with enhanced Th1 immune response in the liver and enhanced systemic Th17 immune response leading to liver fibrosis. Intracellular staining of liver mononuclear cells showed similar percentages of CD4+ and CD8+ cells containing Th1 and Th17 cytokines (Fig. 5A), but the absolute numbers of CD8+ and CD4+ cells containing IFN- γ was significantly higher ($p < 0.05$) in Gal-3 KO mice compared to WT mice (Fig. 5B). There was no significant difference in the total number of CD4+ and CD8+ cells containing IL-17 in the livers of Gal-3 KO and WT mice.

Immunization with 20A-BSA induces significant increase of serum levels of IL-6, IL-17, IL-13 in WT and Gal-3 KO (Fig. 6). Interestingly, the serum level of IFN- γ was statistically significantly higher in immunized compared to untreated WT mice, but not in between the immunized and untreated Gal-3 KO mice. Furthermore, there was no difference in the serum level of IFN- γ and IL-6 between xenobiotic immunized Gal-3 KO and WT mice, although Gal-3 KO mice had significantly higher ($p < 0.05$) serum levels of profibrotic cytokines IL-13 and IL-17 (Fig. 5C). Figure 6B,C illustrate the significant enhancement of bile duct damage and fibrosis upon xenobiotic immunization, as evaluated by anti-CK7 immunostaining and Sirius red staining, respectively.

Discussion

Our previous studies indicated that deletion of Gal-3 attenuates several T cell mediated autoimmune diseases such as diabetes⁴, experimental autoimmune encephalomyelitis³, and inflammatory diseases including liver damage induced by T and NKT cells^{7,8}. In contrast to these studies, we demonstrated that deletion of Gal-3 aggravated

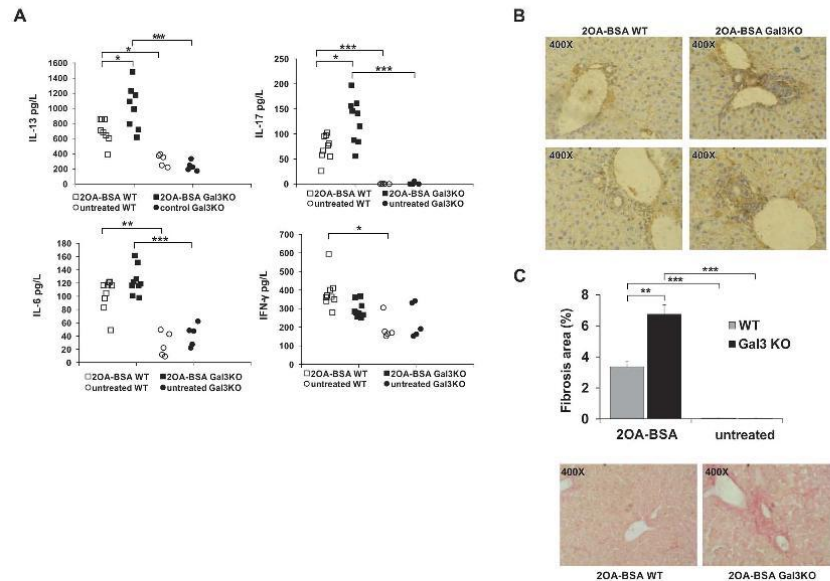


Figure 6. Gal-3 deletion increases serum levels of profibrotic IL-13 and IL-17 cytokines and fibrosis in 2OA-BSA induced PBC. (A) Serum levels of IL-13, IL-6, IL-17 and IFN- γ and (B) liver immunohistochemistry of CK-7 in WT and Gal-3 KO mice eight weeks after immunization with 2OA-BSA. (C) Liver fibrosis score of WT and Gal-3 KO mice and representative liver sections stained with Sirius red indicating minimal fibrosis in WT mice (black arrows) and marked fibrosis in Gal-3 KO mice (red arrows). Data are presented as the mean + SE; 9 mice per group, * $p < 0.05$.

another autoimmune disease, PBC. The diverse effect of Gal-3 effect may be the result of the regulation of predominant mechanisms under different immunopathological conditions. Gal-3 can modulate the development of immunopathology on at least two levels: first, by modulating function of immune cells and second, by controlling various cellular functions. In this study, it is possible that Gal-3 deficiency is accompanied by enhanced xenobiotic induced apoptosis of BECs and subsequent enhanced release of putative antigen(s). In humans, expression of Gal-3 is negligible in normal liver hepatocytes and biliary epithelial cells¹⁰. This expression is significantly enhanced in pathological conditions such as cholangitis, cholangiocarcinoma¹⁰ and hepatitis B and C (Fig. 1).

In this study we provided experimental evidence that Gal-3 gene deletion leads to accelerated 2OA-BSA induced PBC. In C57BL/6 mice, Gal-3 deletion exacerbates the disease through significantly higher liver infiltrates of CD8⁺ T lymphocytes, with enhanced bile duct damage, liver fibrosis, serological level of PDC-E2 specific IgA and increased AST/ALT ratio (Figs 2 and 3).

Bile duct damage in humans with PBC directly correlates with the frequency of CD8⁺ T cells in the liver⁴⁰. Predominance of CD8⁺ T cells in the portal tracts was also present in the IL-2R $\alpha^{-/-}$ mice and 2OA-BSA induced mouse model of PBC^{44,41}. PDC-E2 specific CTLs have the leading role in PBC pathogenesis as they are involved in the lysis of BECs¹³. More importantly, adoptive transfer of CD8⁺ T lymphocytes from dnTGF β RII mice induces autoimmune cholangitis with prominent inflammatory cell infiltration, bile duct destruction, and granuloma formation in the portal tract in Rag-1^{-/-} recipient mice, whereas transfer of CD4⁺ T cell did not induce PBC-like hepatic lesions⁴². Therefore, it is evident that an enhanced number of CD8⁺ T lymphocytes and more severe liver disease were developed in Gal-3 KO mice. In line with previous findings (39,40), higher AST/ALT ratio and more pronounced liver damage are observed in immunized Gal-3 KO compared with immunized WT mice.

The levels of anti-PDC-E2 in 2OA-BSA immunized WT mice are similar to those in the literature³⁹. We also found increased serological anti-PDC-E2 IgG, IgM and IgA in the sera after immunization (Fig. 2E) without statistical difference in total IgM and IgG levels between WT and Gal-3 KO mice. However, there is a significantly higher level of anti-PDC-E2 IgA antibody in the serum of immunized Gal-3 KO mice compared to immunized WT mice (Fig. 2E). Rigopoulou *et al.* reported that the hallmark of the disease is the presence of anti-PDC-E2 IgG, (41). However in Gal-3 KO mice, serum level of anti-PDC-E2 IgA appears to correlate with enhanced epithelial damage (Fig. 2E). This observation is of significance in light of the previous report on transcytosis of PDC-E2 IgA across the BEC and that such transcytosis initiated caspase activated apoptosis of BEC⁴³. The level of caspase activation directly correlates with anti-PDC-E2 IgA antibody in sera of PBC patients⁴³. Taking into account this correlation, it is also noted that the elevation of anti-PDC-E2 IgA antibody level in the sera of 2OA-BSA immunized Gal-3 KO mice (Fig. 2) is in association with enhanced apoptosis of BECs of immunized Gal-3 KO mice (Fig. 4).

Gal-3 is expressed widely in epithelial and immune cells, such as gastric mucosa, colon mucosa, mammary epithelium, prostate epithelium, monocytes, and macrophages^{44,45}. Expression of Gal-3 is often increased in epithelial and immune cells under inflammatory conditions. In this study, we showed that Gal-3 is expressed in BECs of patients with PBC (Fig. 1). In addition, we showed Gal-3 expression is absent in BECs of healthy mice but significantly increased in BECs of 2OA-BSA immunized mice (Fig. 4), indicating the relationship between Gal-3 expression and liver inflammation in 2OA-BSA immunized mice. Knockdown of Gal-3 sensitizes human colorectal cancer cells, keratinocytes, leukemia cells, human renal cell carcinoma and cholangiocarcinoma cells to apoptosis^{46–49} whereas overexpression of Gal-3 protects the cells from apoptosis⁵⁰. Hence, the expression of Gal-3 in the inflammatory liver of 2OA-BSA immunized mice may be a protective mechanism in the apoptosis of BECs.

It can be hypothesized that increased expression of Gal-3 in BECs in PBC is a compensatory mechanism to protect BECs from apoptosis induced by different stimuli in this disease. This hypothesis supports the finding of low expression of Gal-3 in BECs in later stages of PBC (data not shown) with marked fibrosis and progressive ductular damage.

Related to our finding presented in Fig. 5B, it appears that increased apoptosis of BECs in Gal-3 KO mice may facilitate release of autoantigens and induce stronger activation of DCs with higher influx of inflammatory lymphocytes, leading to enhanced bile duct damage (Fig. 6B) and liver fibrosis (Fig. 6C). Thus, enhanced apoptosis of BECs in immunized Gal-3 KO mice may be the consequence of the absence of Gal-3. BECs isolated from healthy Gal-3 KO mice which were exposed to apoptotic stimulus *in vitro* had significantly higher percentage of apoptotic cells compared with those from WT mice (Fig. 5B), confirming the protective role of Gal-3 against apoptosis of BECs.

Apoptosis of BECs is an important phenomenon in PBC^{37,38,51}. When BECs undergo apoptosis, PDC-E2 remains immunologically intact and its expression at the apical surface of the small bile duct cells lining the bile duct lumen is confirmed by biliary immunostaining with selected PDC-E2-specific monoclonal antibodies^{36,37,52,53}. PDC-E2 in its intact form is also localized in the apoptotic bodies of BECs where it is accessible to AMA recognition³⁷. Thus it can be assumed that enhanced apoptosis of BECs from Gal-3 KO mice leads to enhanced exposure of autoantigen, consecutive enhanced stimulation of immune response and enhanced disease.

The other contribution of enhanced apoptosis of BECs in Gal-3 KO mice to more severe PBC could be through enhanced stimulation of innate immunity. Monocyte-derived macrophages from PBC patients incubated with apoptotic blebs from BECs in the presence of AMAs intensively produced proinflammatory cytokines³⁸. In this study, proinflammatory CD11c⁺ DCs were present in the livers of Gal-3 KO mice (Fig. 6). This may be the consequence of stronger stimulation with apoptotic bodies in the presence of AMAs, even in the absence of Gal-3 in DCs.

An imbalance between the death of BECs and the proliferation of residual cells determines the progression toward bile duct loss and fibrosis. In advanced PBC, cholangiocytes lose their ability to proliferate and cell death by apoptosis prevails over compensatory proliferation. Apoptosis promotes fibrogenesis through activation of hepatic stellate cells (HSCs)^{54,55}. We found enhanced fibrosis in livers of Gal-3 KO mice (Fig. 6). Gal-3 activates various profibrotic factors including fibroblast proliferation and transformation, and collagen production in various diseases⁵⁶. However, our apparently conflicting result can be explained by significantly increased death of BECs in Gal-3 KO mice followed by enhanced activation of HSCs and enhanced fibrosis. Enhanced fibrosis in Gal-3 KO mice correlates with increased systemic levels of profibrotic cytokine IL-13 and IL-17 (Fig. 6)^{57,58}. The increased number of CD4⁺ and CD8⁺ cells containing IFN- γ in the livers of Gal-3 KO mice (Fig. 5) is in accordance with a previous report that IFN- γ deficient mice immunized with 2OA-BSA had no inflammatory cell infiltrates in livers⁵⁹. Higher numbers of IFN- γ containing CD4⁺ and CD8⁺ cells in Gal-3 KO mice is in line with enhanced inflammatory phenotype of DCs in Gal-3 KO mice. Enhanced liver inflammation, fibrosis and bile duct damage in Gal-3 KO mice immunized with 2OA-BSA suggest a protective role for Gal-3 in PBC, which can be of therapeutic relevance. Future advances in immunotherapy in PBC will require the consideration of many factors, including its multiple hit etiology and its evolving immune response at various stages of the disease^{60–63}. Gal-3 is a particularly interesting target because of its promiscuous role in multiple inflammatory pathways.

Methods

Animals. Female Gal-3-deficient mice on the C57BL/6 background and wild-type (WT) C57BL/6 mice (8 weeks of age) were used for the experiments. Knockout mice were obtained from the University of California Davis (Davis, CA; by courtesy of D.K. Hsu and F.T. Liu). All of the animal procedures were approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and conducted in accordance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines for humane treatment of laboratory animals.

PBC induction and evaluation of disease. Primary biliary cholangitis was induced as previously described³⁹. Blood samples were collected from the facial vein at weeks 2, 4 and 8 after initial immunization with 2OA-BSA, and tested for levels of anti-PDC-E2 antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described³⁹. Briefly, 96-well ELISA plates were coated with 10 μ g/ml of purified recombinant PDC-E2 in 100 μ l of carbonate buffer (pH 9.6) at 4 °C overnight, washed with Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBS-T), and blocked with 5% skim milk in TBS for 30 minutes. One hundred microliters of diluted sera (1:250) were added to each well and incubated for 2 hours at room temperature. After washing, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulin (A + M + G) (H + L) (1:3,000) (INVITROGEN ZyMax™) was added. The plates were incubated for 1 hour at room temperature, the plates were re-washed and color developed with 100 μ l of TMB peroxidase substrate (BD Biosciences, San Jose, CA) added to each well. Optical density (OD) was read at 450 nm at Zenyth multimode detector 3100. Previously calibrated positive and negative standards were included with each assay. Liver tissues were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 2 days and embedded in paraffin. Paraffin blocks were brought to room temperature and sectioned on a rotary

microtome (Leica RM2135). Twenty four serial 4- μ m sections were floated onto water at 40 °C before being transferred to glass microscope slides. The sections were deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin (H&E) and every fourth (six slides) was evaluated for periportal inflammation, infiltration of bile ducts without damage, infiltration and damage of bile ducts, and subcapsular infiltrates. Based on the levels of pathology, the indices were scored as 0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; and 4, very severe pathology. Histological score I was calculated as mean value of each scored index. Granulomas, and fibrosis were scored as 0, none; 1, mild; 2, moderate; and 3, severe pathology and histological score II was calculated based on these values. Histological analysis and scoring were performed in blinded fashion. The images were captured with a light microscope (Olympus) equipped with a digital camera.

Sirius Red staining was done by treated rehydrated sections stained 1 hour with saturated picric acid containing 0.1% Sirius Red F3BA (Sigma-Aldrich, St. Louis). The slides were washed in two changes of acidified water, then dehydrated in three changes of 100% ethanol, and then washed in xylene. Quantification of fibrosis in mouse liver sections stained with Sirius Red (x10) was performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD), on 10 fields/section.

Cytokine levels determination. Cytokine levels were determined using mouse duo sets for IL-17, IL-13, and IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Immunohistochemistry of mouse liver samples. Formalin-fixed, paraffin-embedded mouse liver tissue sections were incubated with rabbit anti-mouse cytokeratin-7 (CK-7) and Gal-3. Sections were visualized by rabbit-specific conjugate (Expose Rb-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam), and mouse-specific conjugate (Expose Ms-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam) and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope (Olympus BX51).

Gal-3 detection in human serum and liver samples. The levels of Gal-3 in sera of PBC patients (11) and healthy controls (11) were determined using Human Gal-3 Quantikine ELISA Kit (R&D). Human liver biopsy samples were obtained from the Department of Pathology University of Kragujevac tissue collection and were stained with mouse antihuman Gal-3 antibody (Abcam, Cambridge, UK) and the mouse specific conjugate (Expose Ms-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam), according to manufacturer instructions.

Isolation of hepatic mononuclear cells and flow cytometry. The isolation of liver-infiltrating mononuclear cells was conducted as previously described⁸. Mononuclear cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies, including CD4 (clone RM4-5), CD8 α (clone 53-6.7), TCR β (clone H57-597), F4/80 (clone T45-2342), CD11c (clone HL3), CD19 (clone 1D3), I-A/I-E (clone AF6-120.1), CD86 (clone GL1), IL-12 (clone C15.6), and TNF α (clone MP6-XT22) (BD Biosciences). Isotype Abs with matching conjugates were used as negative controls. For intracellular staining, cells were activated with PMA/ionomycin and processed as previously described. Live/dead cell discrimination was achieved by staining with Propidium Iodide, 10,000 events of viable cells were analyzed with the FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences), and analysis was conducted with FlowJo (Tree Star).

Isolation of BECs and apoptosis assays. To isolate the intrahepatic BECs, a two-step liver perfusion was performed. The perfused liver was removed and hepatocytes were selectively removed by forcing them with gentle pressure through an incision in the liver. Cells were suspended in DMEM media supplemented with 10% FBS, 5% NuSerum IV (BD), 0.5 mg/ml insulin-transferrin-sodium selenite (Gibco), 1 mmol/l ascorbic acid 2-phosphate, 10K7 M dexamethasone (Sigma-Aldrich Corp.), 10 ng/ml EGF (R&D, Minneapolis, MN, USA), 10 ng/ml HGF (R&D, Minneapolis, MN, USA). After 10 days cells were exposed to ionomycin 1 μ g/ml for 22 hours and percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry using the Annexin V FITC Detection Kit (BD Pharmingen, San Jose, CA).

Statistical analysis. The data are presented as mean \pm SD or mean \pm SEM. Statistical significance was determined by Independent sample Student t test and ANOVA, and, where appropriate, Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS 13.0.

References

- Hsu, D. K., Chen, H. Y. & Liu, F. T. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev* **230**, 114–127, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00798.x (2009).
- de Oliveira, F. L. *et al.* Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Exp Biol Med* **240**, 1019–1028, doi: 10.1177/1535370215593826 (2015).
- Jiang, H. R. *et al.* Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **182**, 1167–1173 (2009).
- Mensah-Brown, E. P. *et al.* Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Immunol* **130**, 83–88, doi: 10.1016/j.clim.2008.08.024 (2009).
- Pejnovic, N. N. *et al.* Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* **62**, 1932–1944, doi: 10.2337/db12-0222 (2013).
- Radosavljevic, G. *et al.* Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* **28**, 451–462, doi: 10.1007/s10585-011-9383-y (2011).
- Volarevic, V. *et al.* Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* **45**, 531–543, doi: 10.1002/eji.201444849 (2015).
- Volarevic, V. *et al.* Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **55**, 1954–1964, doi: 10.1002/hep.25542 (2012).
- Liu, F. T. & Rabinovich, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**, 29–41, doi: 10.1038/nrc1527 (2005).

10. Shimonishi, T. *et al.* Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* **32**, 302–310, doi: 10.1053/hupa.2001.22767 (2001).
11. Saegusa, I. *et al.* Galectin-3 protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis by enhancing AKT activation and suppressing ERK activation. *J Invest Dermatol* **128**, 2403–2411, doi: 10.1038/jid.2008.119 (2008).
12. Hirschfield, G. M. & Gershwin, M. E. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol* **8**, 303–330, doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164014 (2013).
13. Hsu, W. *et al.* Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(−/−) mice. *Hepatology* **49**, 133–140, doi: 10.1002/hep.22591 (2009).
14. Wakabayashi, K. *et al.* IL-2 receptor alpha(−/−) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **44**, 1240–1249, doi: 10.1002/hep.21385 (2006).
15. Hirschfield, G. M. *et al.* Ustekinumab for patients with primary biliary cholangitis who have an inadequate response to Ursodeoxycholic Acid: a proof-of-concept study. *Hepatology*, doi: 10.1002/hep.28359 (2015).
16. Hsueh, Y. H., Chang, Y. N., Loh, C. E., Gershwin, M. E. & Chuang, Y. H. AAV-IL-22 modifies liver chemokine activity and ameliorates portal inflammation in murine autoimmune cholangitis. *J Autoimmun*, doi: 10.1016/j.jaut.2015.10.005 (2015).
17. Katsumi, T. *et al.* Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 142–153, doi: 10.1007/s12016-015-8482-y (2015).
18. Li, Y. *et al.* Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 promotes intrahepatic chemokine (C-X-C motif) receptor 5+ lymphocyte homing and aberrant B-cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **61**, 1998–2007, doi: 10.1002/hep.27725 (2015).
19. Lleo, A. *et al.* Shotgun proteomics: identification of unique protein profiles of apoptotic bodies from biliary epithelial cells. *Hepatology* **60**, 1314–1323, doi: 10.1002/hep.27230 (2014).
20. Shimoda, S. *et al.* Natural killer cells regulate T cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **62**, 1817–1827, doi: 10.1002/hep.28122 (2015).
21. Tanaka, H. *et al.* Immunological potential of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol* **180**, 371–382, doi: 10.1111/cei.12581 (2015).
22. Wang, J. *et al.* Animal models of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* **34**, 285–296, doi: 10.1055/s-0034-1383728 (2014).
23. Wang, J. J. *et al.* *Escherichia coli* infection induces autoimmune cholangitis and anti-mitochondrial antibodies in non-obese diabetic (NOD).B6 (Idd10/Idd18) mice. *Clin Exp Immunol* **175**, 192–201, doi: 10.1111/cei.12224 (2014).
24. Wang, Y. H. *et al.* Systems biologic analysis of T regulatory cells genetic pathways in murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* **59**, 26–37, doi: 10.1016/j.jaut.2015.01.011 (2015).
25. Yao, Y. *et al.* Distinct from its canonical effects, deletion of IL-12p40 induces cholangitis and fibrosis in interleukin-2Ralpha(−/−) mice. *J Autoimmun* **51**, 99–108, doi: 10.1016/j.jaut.2014.02.009 (2014).
26. Berrih-Aknin, S. Myasthenia Gravis: paradox versus paradigm in autoimmunity. *J Autoimmun* **52**, 1–28, doi: 10.1016/j.jaut.2014.05.001 (2014).
27. Hirschfield, G. M. & Siminovich, K. A. Genetics in PBC: what do the “risk genes” teach us? *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 176–181, doi: 10.1007/s12016-014-8419-x (2015).
28. Miao, Q. *et al.* Emperipolesis mediated by CD8 T cells is a characteristic histopathologic feature of autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 226–235, doi: 10.1007/s12016-014-8432-0 (2015).
29. Pollheimer, M. J. & Fickert, P. Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 207–217, doi: 10.1007/s12016-014-8442-y (2015).
30. Steinman, L. & Shoenfeld, Y. From defining antigens to new therapies in multiple sclerosis: honoring the contributions of Ruth Arnon and Michael Sela. *J Autoimmun* **54**, 1–7, doi: 10.1016/j.jaut.2014.08.001 (2014).
31. Sun, Y. *et al.* Women and primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 285–300, doi: 10.1007/s12016-014-8449-4 (2015).
32. Selmi, C. *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation, copy number variation, and gene expression in monozygotic twins discordant for primary biliary cirrhosis. *Front Immunol* **5**, 128, doi: 10.3389/fimmu.2014.00128 (2014).
33. Chuang, Y. H., Lan, R. Y. & Gershwin, M. E. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol* **31**, 323–331, doi: 10.1007/s00281-009-0172-5 (2009).
34. Kimura, Y. *et al.* Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **36**, 1227–1235, doi: 10.1053/jhep.2002.36157 (2002).
35. Lleo, A. *et al.* Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **49**, 871–879, doi: 10.1002/hep.22736 (2009).
36. Tsuneyama, K. *et al.* Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BBI/B7 expression. *Hepatology* **21**, 1031–1037 (1995).
37. Lleo, A. *et al.* Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* **14**, 3328–3337 (2008).
38. Lleo, A. *et al.* Biliary apoptosis and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **52**, 987–998, doi: 10.1002/hep.23783 (2010).
39. Wakabayashi, K. *et al.* Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology* **48**, 531–540, doi: 10.1002/hep.22390 (2008).
40. Junking, M. *et al.* Decreased expression of galectin-3 is associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer* **44**, 619–626, doi: 10.1016/j.ejca.2008.01.014 (2008).
41. Lan, R. Y. *et al.* Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **43**, 729–737, doi: 10.1002/hep.21123 (2006).
42. Yang, G. X. *et al.* Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology* **47**, 1974–1982, doi: 10.1002/hep.22226 (2008).
43. Matsumura, S. *et al.* Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **39**, 1415–1422, doi: 10.1002/hep.20175 (2004).
44. Lotan, R. *et al.* Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. *Int J Cancer* **56**, 474–480 (1994).
45. Hsu, D. K., Hammes, S. R., Kuwabara, I., Greene, W. C. & Liu, F. T. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am J Pathol* **148**, 1661–1670 (1996).
46. Wongkham, S. *et al.* Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* **100**, 2077–2084, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01304.x (2009).
47. Shi, Y. *et al.* Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer* **121**, 1175–1181, doi: 10.1002/ijc.22848 (2007).
48. Cheng, Y. L. *et al.* Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 334–340, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.099 (2011).
49. Xu, Y. *et al.* Galectin-3 inhibition sensitizes human renal cell carcinoma cells to arsenic trioxide treatment. *Cancer Biol Ther* **14**, 897–906, doi: 10.4161/cbt.25937 (2013).
50. Takenaka, Y. *et al.* Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* **24**, 4395–4406 (2004).

51. Rong, G. *et al.* Epithelial cell specificity and apoptotic recognition by serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **54**, 196–203, doi: 10.1002/hep.24355 (2011).
52. Odin, J. A., Huebert, R. C., Casciola-Rosen, L., LaRusso, N. F. & Rosen, A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest* **108**, 223–232, doi: 10.1172/JCI10716 (2001).
53. Van de Water, J. *et al.* Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest* **91**, 2653–2664, doi: 10.1172/JCI116504 (1993).
54. Lleo, A., Shimoda, S., Ishibashi, H. & Gershwin, M. E. Primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: apotopes and epitopes. *J Gastroenterol* **46**, Suppl 1, 29–38, doi: 10.1007/s00535-010-0303-8 (2011).
55. Lleo, A., Selmi, C., Invernizzi, P., Podda, M. & Gershwin, M. E. The consequences of apoptosis in autoimmunity. *J Autoimmun* **31**, 257–262, doi: 10.1016/j.jaut.2008.04.009 (2008).
56. Li, L. C., Li, J. & Gao, J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* **351**, 336–343, doi: 10.1124/jpet.114.218370 (2014).
57. Du, W. J. *et al.* Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. *Diagn Pathol* **8**, 40, doi: 10.1186/1746-1596-8-40 (2013).
58. Tang, J. *et al.* Involvement of IL-13 and tissue transglutaminase in liver granuloma and fibrosis after schistosoma japonicum infection. *Mediators Inflamm* **2014**, 753483, doi: 10.1155/2014/753483 (2014).
59. Kawata, K. *et al.* Identification of potential cytokine pathways for therapeutic intervention in murine primary biliary cirrhosis. *PLoS One* **8**, e74225, doi: 10.1371/journal.pone.0074225 (2013).
60. Zhang, J. *et al.* Ongoing activation of autoantigen-specific B cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **60**, 1708–1716, doi: 10.1002/hep.27313 (2014).
61. Wang, L. *et al.* CXCR5+ CD4+ T follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **61**, 627–638, doi: 10.1002/hep.27306 (2015).
62. Beuers, U. & Gershwin, M. E. Unmet challenges in immune-mediated hepatobiliary diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* **48**, 127–131, doi: 10.1007/s12016-015-8484-9 (2015).
63. Yang, C. Y. *et al.* IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: implications for therapy. *Hepatology* **59**, 1944–1953, doi: 10.1002/hep.26979 (2014).

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants No. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia, The Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14 and MP 02/14) and the National Institutes of Health (DK067003).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: A.A., M.M. and M.L. Performed the experiments: A.A., M.M., J.M. and B.S. Analyzed the data: A.A. and M.M. Contributed reagents/materials/analysis tools: P.S.C.L., F.T.L., E.G. and N.Z. Wrote the paper: A.A., E.G. and M.L.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Arsenijevic, A. *et al.* Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci. Rep.* **6**, 23348; doi: 10.1038/srep23348 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice

Jelena Milovanovic^{1,2}, Branka Popovic³, Marija Milovanovic¹, Daria Kvestak³, Aleksandar Arsenijevic¹, Bojana Stojanovic^{1,4}, Irena Tanaskovic², Astrid Krmpotic³, Nebojsa Arsenijevic¹, Stipan Jonjic³ and Miodrag L. Lukic^{1*}

¹Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ²Faculty of Medical Sciences, Institute of Histology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ³Center for Proteomics, Faculty of Medicine, Department for Histology and Embryology, University of Rijeka, Rijeka, Croatia, ⁴Faculty of Medical Sciences, Institute of Pathophysiology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

OPEN ACCESS

Edited by:

Luigi Daniele Notarangelo,
Harvard Medical School, USA

Reviewed by:

Silva Markovic-Plese,
University of North Carolina at Chapel
Hill, USA

Anne Kathrin Mausberg,
Essen University Hospital, Germany

*Correspondence:

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

Specialty section:

This article was submitted to Multiple
Sclerosis and Neuroimmunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 July 2016

Accepted: 09 February 2017

Published: 27 February 2017

Citation:

Milovanovic J, Popovic B,
Milovanovic M, Kvestak D,
Arsenijevic A, Stojanovic B,
Tanaskovic I, Krmpotic A,
Arsenijevic N, Jonjic S and Lukic ML
(2017) Murine Cytomegalovirus
Infection Induces Susceptibility to
EAE in Resistant BALB/c Mice.
Front. Immunol. 8:192.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00192

In contrast to C57BL/6 mice, BALB/c mice are relatively resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) after challenge with MOG_{35–55} peptide. Here, we provide the first evidence that infection with murine cytomegalovirus (MCMV) in adulthood abrogates this resistance. Infected BALB/c mice developed clinical and histological signs similar to those seen in susceptible C57BL/6 mice. In addition to CD4⁺ cells, large proportion of cells in the infiltrate of diseased BALB/c mice was CD8⁺, similar with findings in multiple sclerosis. CD8⁺ cells that responded to *ex vivo* restimulation with MOG_{35–55} were not specific for viral epitopes pp89 and m164. MCMV infection favors proinflammatory type of dendritic cells (CD86⁺CD40⁺CD11c⁺) in the peripheral lymph organs, M1 type of microglia in central nervous system, and increases development of Th1/Th17 encephalitogenic cells. This study indicates that MCMV may enhance autoimmune neuropathology and abrogate inherent resistance to EAE in mouse strain by enhancing proinflammatory phenotype of antigen-presenting cells, Th1/Th17, and CD8 response to MOG_{35–55}.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis, BALB/c mice, murine cytomegalovirus infection, antigen-presenting cells, T cells

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system (CNS) with axonal injury, characterized by varying clinical course, pathology, and inflammatory patterns (1). It develops in susceptible hosts after interaction with environmental factors which trigger the disease by promoting the activation of myelin-specific T cells that normally circulate in the peripheral lymph organs of all individuals (2). It has been suggested that some infectious agents, in particular viruses, may be potential triggers of MS (2–4). Among different infective agents, Epstein–Barr virus (EBV) has been mostly associated with increased MS risk (5). Recently, it has been shown increased CD8⁺ T cell response to EBV lytic antigens in active MS and also in relapses (6). Infection with murine gamma herpesvirus 68 (γHV-68), the murine homolog to EBV, polarizes the adaptive immune response and heightens CNS pathology following experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induction and likely, influences MS pathogenesis (7).

Experimental autoimmune encephalomyelitis is the experimental model of MS, induced in susceptible animals by active immunization with myelin antigens mixed with adjuvant (8). Immunized mice develop ascending paralysis with CD4⁺ T cells and macrophages in infiltrations in the white matter of the spinal cord, and with minimal brain inflammation in the majority of experimental models. However, in MS, the vast majority of myelin lesions are found within the brain parenchyma with infiltrations that contain equivalent numbers of CD8⁺ T and CD4⁺ T cells (9, 10). Despite these differences, EAE is considered as a valuable tool for research of MS pathogenesis. Moreover, several therapeutics that are now being used to treat MS were developed in EAE (11). BALB/c mice are found partially or completely resistant to the induction of EAE with encephalitogenic peptide, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅).

Cytomegalovirus (CMV) classified within the *Betaherpesvirinae* subfamily establishes life-long latent infections in 70–100% of the human population (12). After a primary infection of fibroblasts, epithelial, endothelial, and smooth muscle cells (6), mostly asymptomatic in the immunocompetent host, CMV persists in myeloid precursor cells (7). During latency periodic asymptomatic reactivations occur (13). CMV contains a large number of latent and lytic genes, many of which code proteins that have the role in immunoregulation (5). When monocytes that carry CMV enter visceral parenchyma and differentiate into macrophages and myeloid dendritic cells, virus reactivates and through expression of different genes can modulate the immune response of the host (14).

Data on the role of CMV infection in etiopathogenesis of MS are controversial. CMV has been found in demyelinating plaques and the cerebrospinal fluid of MS patients (15) and causes demyelination mainly in the CNS of immunocompromised hosts (16). Further, enhancement of numbers of EBV and CMV-specific CD8⁺ T cells among T cells in chronic inflammatory lesions of brain of MS patients was reported (17). Several studies involving human subjects indicate correlation between CMV infection and MS development, greater rate of relapses and greater brain atrophy (18–20). Other studies indicate that CMV seropositivity is associated with a decreased MS risk and predicts a better clinical and radiological outcome in MS patient (21), suggesting a protective effect of CMV on autoimmune neuropathology (22). Furthermore, CMV encodes multiple factors that trigger immunomodulatory or evasion mechanisms, which can decrease the immune response in MS patients (23, 24).

We have recently shown that deletion of an immunoregulatory pathway, IL-33/ST2 axis, may enhance susceptibility to EAE in resistant BALB/c strain (25, 26). The present study was done with the aim to explore whether infection with murine CMV (MCMV) create “fertile field” (27, 28) that facilitates the expansion and activation of encephalitogenic cells leading to autoimmune disease of CNS.

Here, we show that MCMV infected and MOG₃₅₋₅₅ immunized BALB/c mice develop very pronounced neuroinflammation with extensive infiltrations in brain and spinal cord parenchyma containing large proportion of CD8⁺ cells in infiltrates in addition to accentuation of Th1 and Th17 immune response and skewing

microglia to M1 phenotype. Our results are compatible with the notion that MCMV abrogates inherent resistance of BALB/c mice to EAE induction with MOG₃₅₋₅₅ peptide through enhancement of inflammatory dendritic cells in the periphery, M1 type of microglia and recruitment of MOG₃₅₋₅₅ responsive CD8⁺ T cells in the CNS. Thus, CMV-induced inflammatory environment may enhance autoimmunity in CNS.

MATERIALS AND METHODS

Infection, Induction, and Scoring of EAE

Female 8-week-old BALB/c mice were used throughout this study. Mice were infected subcutaneously (footpaw) with 10⁵ plaque-forming units of tissue culture MCMV, strain MW97.01 (29). EAE was induced 10 days after infection by subcutaneous administration of 200 μL suspension at two sites over the hind flanks. Depletion of CD4⁺ lymphocytes, where indicated, was performed with intraperitoneal injection of 100 μg of anti-CD4 mAb, 1 day prior to and 5 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization. The suspension consisted of 300 μg MOG₃₅₋₅₅ peptide (Sigma-Aldrich, Germany) in 100 μL of PBS, emulsified with 100 μL complete Freund’s adjuvant (Sigma-Aldrich, Germany) with 0.7 mg heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Each mouse was immediately thereafter, injected intraperitoneally and 48 h later with 300 ng pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) in 100 μL 0.9% NaCl. Clinical signs of EAE were assessed daily by the following scoring system: grade 0, no signs; grade 1, paralyzed tail; grade 2, ataxic; grade 2.5, one hind leg paralyzed; grade 3, both hind legs paralyzed; grade 3.5, three legs paralyzed; grade 4, both hind legs and front limbs completely paralyzed; grade 5, moribund as previously described (30, 31). Mice were monitored daily with fluid administration and mashed chow on the base of cages for all mice displaying a clinical score of 3. Mice were maintained in our animal facilities in a temperature-controlled environment with a 12-h light/12-h dark cycle and were administered standard laboratory food and water *ad libitum*. All experiments were approved by and conducted in accordance with the Guidelines of the Animal Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. Endangered animal species were not used in this study.

Isolation of Mononuclear Cells from CNS and Lymph Nodes

At day 15 post-EAE induction (mean clinical score of 3 for MCMV EAE mice), mice were perfused with PBS, and brain and spinal cord were carefully removed. The mononuclear cells from CNS were isolated as described previously (25). Briefly, the brains and spinal cords were homogenized in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) with 10% FBS and 1 mg/mL collagenase type I (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C for 60 min. After digestion, the tissue was passed through a 40-μm mesh, pelleted, resuspended in 10 mL 30% Percoll (Sigma-Aldrich), overlaid onto 5 mL 70% Percoll, and centrifuged at 390 g for 20 min. The myelin layer was removed, and the mononuclear cells accumulated in the intermediate

phase were collected, washed twice in PBS, and resuspended in RPMI 1640 containing 10% FBS. Total cell numbers were determined by counting on a hemocytometer, and viability was assessed by trypan blue exclusion. Lymph nodes were minced in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) and forced gently through 40- μ m cell-strainer nylon mesh (Falcon) using a sterile syringe plunger and centrifuged at 400 g for 5 min. Pellet from lymph nodes was resuspended in RPMI 1640 containing 10% FBS.

Flow Cytometry

Single-cell suspensions of brain and spinal cord tissue were prepared according to standard protocols. For cytofluorometry, following antibodies were used: CD4, CD8, CD45, CCR6, CXCR3, TCR β , CD11c, CD11b, CD49b, CCR2, CD86, T-bet, ROR γ t, IL-17, IFN- γ , TNF- α , and IL-12 with conjugated fluorochromes (BD Biosciences). Antibodies were incubated with cells in PBS with 2% FBS for 30 min at 4°C, and then cells were analyzed. For intracellular staining of cytokines, cells were stimulated for 4 h in RPMI 1640 containing 10% FBS (Gibco), 10 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich), and 500 ng/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) with addition of Brefeldin A (BD Biosciences). Antibodies for the cell surface markers were added to the cells in PBS with 2% FBS for 30 min on ice. After wash, cells were resuspended in Cytofix/Cytoperm buffer (BD Biosciences) for 20 min on ice, washed twice, and incubated with Abs for intracellular antigens (cytokines) in Perm buffer (30 min, on ice). For staining of transcriptional factors, unstimulated cells were used. Data were acquired using FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Tetramer Staining

Immune cells were isolated as described above. Cells isolated from CNS were incubated with H-2L(d)/IE-1/pp89 (168–176 YPHFEMPTNL) and H-2D(d)/m164 (257–265 AGPPRYSRI) tetramers provided by NIH tetramer core facility. Cells stained with tetramer and anti-CD8 and anti-CD3 antibodies were incubated for 30 min at room temperature and then washed. Data were acquired using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Immunohistochemistry and Evaluation of Brain and Spinal Cord Pathology

Brains and spinal cords were fixed in 4% buffered formalin fixative overnight. Paraffin wax embedded sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin and CD3 (ab699; Abcam) immunohistochemical staining. The slides were analyzed on light microscope (BX51; Olympus), and digital images were acquired by digital camera. The level of infiltration was graded using the following score: 0, no inflammatory cells; 1, a few scattered inflammatory cells; 2, organization of inflammatory infiltrates into perivascular cuffs; 3, extensive perivascular cuffing with extension into adjacent subarachnoid space and CNS parenchyma, and 4, extensive perivascular cuffing with increasing subarachnoid and parenchymal inflammation (32). Slides were analyzed on Olympus BX51 microscope, and digital images were acquired by Olympus digital camera (DP71).

Interferon- γ Assay

Mononuclear cells isolated from CNS, 10^5 in 100 μ L complete media were put on 96-well plate in duplicates, and 100 μ L of media, or MOG_{35–55} (1 μ g/well) were added. After incubation for 1 h on 37°C, 0.2 μ L of Brefeldin A in 10 μ L of medium was added to each well and incubated for 4 h on 37°C. Cells were washed and then incubated with anti-CD8 and anti-CD4 antibodies on +4°C for 15 min. After washing, cells were resuspended in Cytofix/Cytoperm buffer for 30 min on ice, washed twice, and incubated with anti-IFN γ antibodies diluted in Perm wash buffer (30 min, on ice) and resuspended in FACS media.

Statistical Analysis

All statistics were carried out using SPSS 18.0 for Windows software. Results were analyzed using the Student's *t*-test or Mann–Whitney test and ANOVA or Kruskal–Wallis. Data in this study were expressed as the mean + SEM. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

RESULTS

MCMV Infection in Adult Life Abrogates Resistance to EAE in BALB/c Mice

BALB/c mice immunized with MOG_{35–55} did not develop clinical signs of EAE, while BALB/c mice infected with MCMV 8 weeks after birth and 10 days later challenged with MOG_{35–55} in CFA and pertussis toxin (MCMV + MOG_{35–55}) developed clinical signs that correspond to EAE manifestations seen in C57BL/6 mice (Figure 1A). Based on evaluation of clinical course (Figure 1A) and mean maximal clinical score (Figure 1B), MCMV-infected BALB/c mice developed disease indistinguishable from disease in susceptible C57BL/6 mice. Infiltration in CNS of MCMV + MOG_{35–55}, expressed by mean histological score (Figure 1D) and total cell number (Figure 1C), was significantly higher compared with BALB/c mice immunized with MOG_{35–55} only mice. BALB/c mice infected with MCMV and 10 days later immunized with MOG_{35–55} developed subarachnoid and perivascular infiltrations in the brain cortex, perivascular infiltrations in brainstem and cerebellum with spreading to parenchyma (Figure 1E), and white matter spinal cord infiltrations (Figure 1F). Single-cell infiltrates were detected in brains and spinal cords of MOG_{35–55}-immunized mice only, and mild perivascular infiltrations were detected in brainstem of MCMV-infected mice (Figures 1E,F). Immunostaining of spinal cord sections showed presence of CD3⁺ cells in the infiltrates (Figure 1G).

CNS Infiltrates of MCMV + MOG_{35–55} Mice Contain Higher Amounts of T1/T17 CD4⁺ and CD8⁺ T Cells

Further analysis showed significantly higher number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the infiltrates of MCMV + MOG_{35–55} mice compared with MOG_{35–55} mice (Figure 2A). In the CNS of MCMV + MOG_{35–55} mice, there was higher number of CD4⁺ T cells than CD8⁺ T cells, similar to typical EAE in C57BL/6 mice.

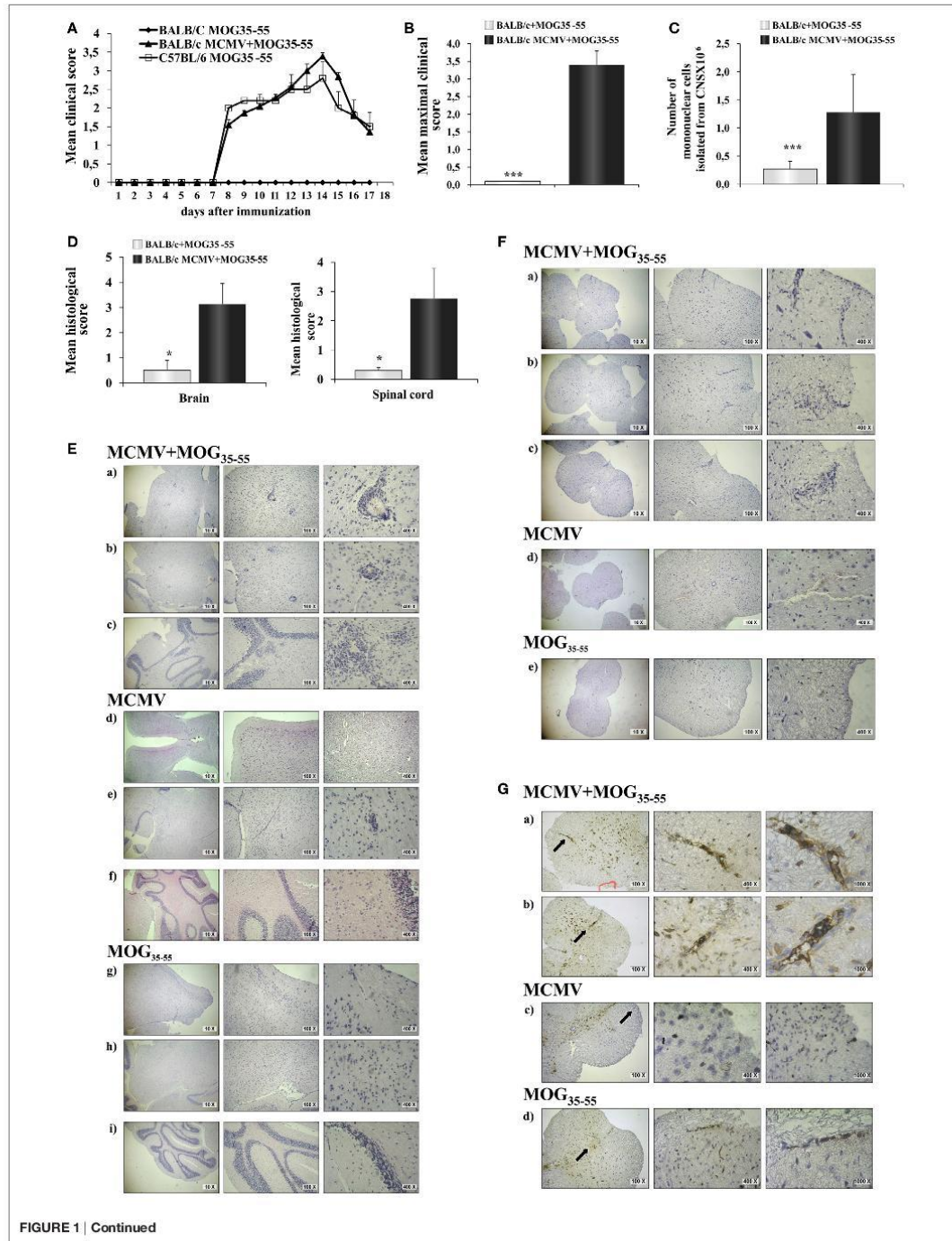


FIGURE 1 | Continued

FIGURE 1 | Continued

BALB/c mice infected with murine cytomegalovirus (MCMV) and immunized with MOG₃₅₋₅₅ develop experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Eight-week-old BALB/c mice were infected (foot-pad injection) with MCMV and 10 days after were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide in CFA and pertussis toxin (BALB/c MCMV + MOG₃₅₋₅₅). Control mice C57BL/6 and BALB/c were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide in CFA and pertussis toxin without previous infection (C57BL/6 MOG₃₅₋₅₅ and BALB/c MOG₃₅₋₅₅). **(A)** EAE scores up to day 15 post-EAE induction (four separate experiments, $n = 29/\text{group}$). **(B)** Mean maximal clinical score up to day 15 post-EAE induction (four separate experiments, $n = 29/\text{group}$). **(C)** The mean value of the mononuclear cells isolated from central nervous system (CNS) of BALB/c MCMV + MOG₃₅₋₅₅ and BALB/c MOG₃₅₋₅₅ mice (three independent experiments, $n = 24/\text{group}$). **(D)** Mean histological scores were calculated from a total of five sections per group (two separate experiments, $n = 8/\text{group}$). **(E)** The representative images of brain cortex (a), brain stem (b), cerebellum (c) of BALB/c MCMV + MOG₃₅₋₅₅; brain cortex (d), brain stem (e), cerebellum (f) of BALB/c MCMV-infected mice (BALB/c MCMV); and brain cortex (g), brain stem (h), cerebellum (i) of BALB/c MOG₃₅₋₅₅ mice. **(F)** The representative images of spinal cords of BALB/c MCMV + MOG₃₅₋₅₅ (a-c); BALB/c MCMV (d); and BALB/c MOG₃₅₋₅₅ mice (e). **(G)** Representative sections of CD3 spinal cord immunohistochemistry of BALB/c MCMV + MOG₃₅₋₅₅ (a,b); BALB/c MCMV (c); and BALB/c MOG₃₅₋₅₅ mice (d), arrows in left panels indicate the area presented in magnified sections in right panels. All pictures are representative of two separate experiments ($n = 16/\text{group}$). Data were analyzed by Student's *t*-test and presented as mean + SE. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice had increased percentage (Figure 2B) and number (Figure 2C) of both Th1 and Th17 cells, as well as Tc1 and Tc17 cells compared to MOG₃₅₋₅₅ mice. Similarly, significantly higher number of CD4⁺ cell- and CD8⁺ cell-expressing transcriptional factors, T-bet and RORγt (Figure 2D), and chemokine receptors CCR6 and CXCR3 (Figure 2E) was noticed in CNS of MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice compared with MOG₃₅₋₅₅ mice.

CD8⁺ Cells Take a Role in Autoimmune Neuropathology in BALB/c Mice with MCMV Infection

Depletion of CD4⁺ cells in MCMV-infected mice abrogated susceptibility to MOG₃₅₋₅₅-induced disease (Figure 3A) indicating autoimmune disease. Given the significant number of CD8⁺ cells in the infiltrates that were not seen in classical EAE, we explored in more details these cells found in CNS. There was significantly higher percentage and number of CD8⁺ cell-expressing markers of cytolytic activity in the CNS of MCMV + MOG₃₅₋₅₅ BALB/c mice compared to MOG₃₅₋₅₅ mice (Figure 3B). To indirectly determine the percentage of MOG₃₅₋₅₅-specific CD4⁺ and CD8⁺ cells, mononuclear cells were isolated from CNS of MCMV + MOG₃₅₋₅₅ BALB/c, MOG₃₅₋₅₅ BALB/c, and MOG₃₅₋₅₅ C57BL/6 mice and *ex vivo* restimulated with MOG₃₅₋₅₅ peptide, and IFN-γ⁺ cells were enumerated. Significantly higher percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells from CNS of MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice responded to *ex vivo* restimulation compared with MOG₃₅₋₅₅ only BALB/c mice (Figure 3C). Further, significantly higher percentage of CD8⁺ cells isolated from CNS of MCMV + MOG₃₅₋₅₅ BALB/c mice contained IFN-γ after *ex vivo* restimulation with MOG₃₅₋₅₅ compared to C57BL/6 mice immunized with MOG₃₅₋₅₅. Even more importantly, IFN-γ-containing CD8⁺ cells in MCMV + MOG₃₅₋₅₅ BALB/c mice after restimulation with MOG₃₅₋₅₅ were not specific for viral epitopes pp89 and m164, suggesting that inflammatory CD8⁺ cells in the CNS are autoimmune (Figure 3D).

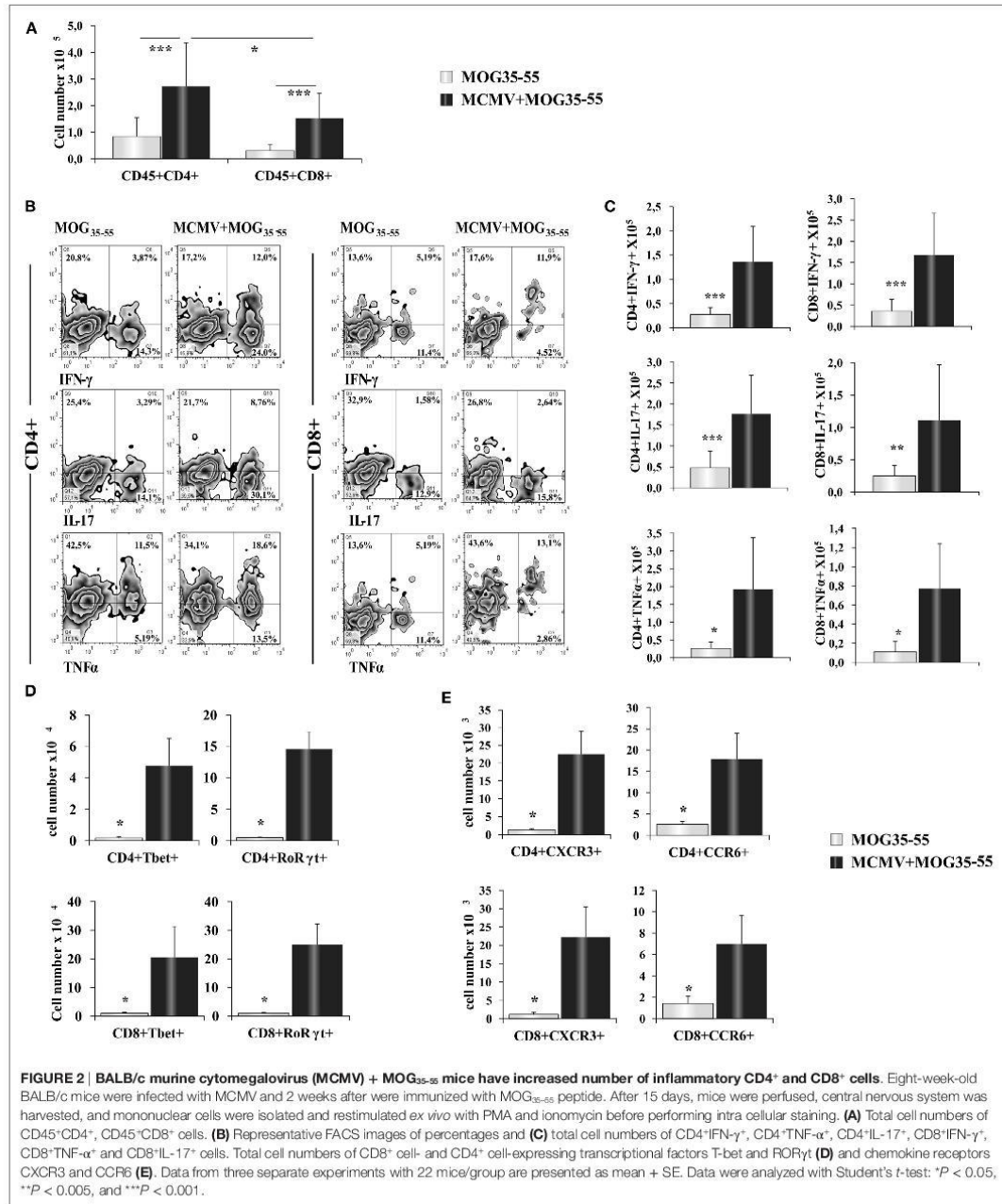
Chronic Non-Productive MCMV Infection Also Facilitates EAE Development in BALB/c Mice

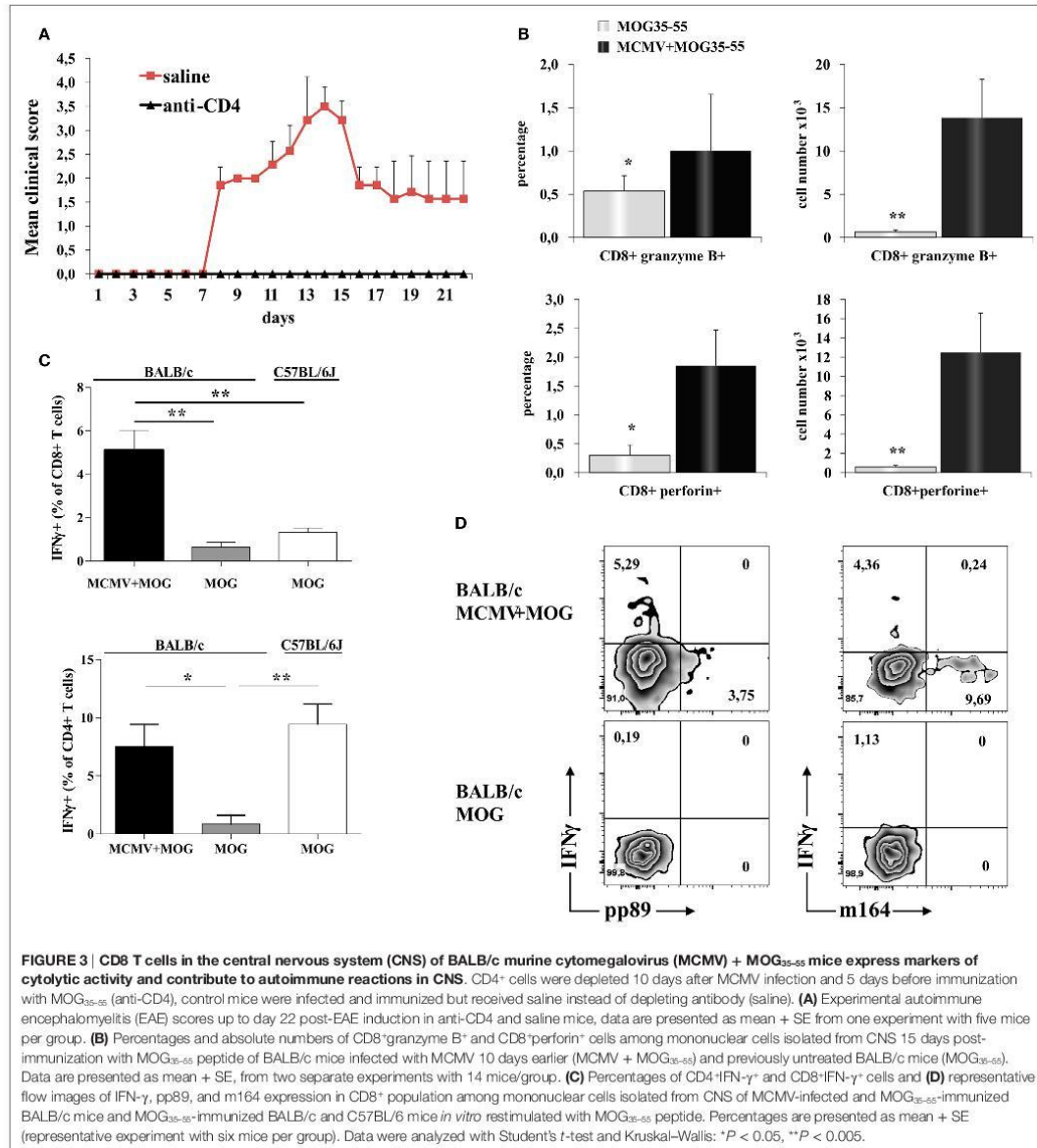
In order to test whether the chronic non-productive MCMV infection could facilitate EAE development, we immunized BALB/c mice with MOG₃₅₋₅₅ peptide 3 months after MCMV infection in adult life. As shown in Figure 4, infected mice developed

clinical signs of EAE while age-matched mice immunized with encephalitogen only, did not. Mice with chronic non-productive MCMV infection started to manifest signs of EAE 6 days after immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide; maximal clinical score reached 15 days after immunization and had very mild signs of the disease 60 days after immunization (Figure 4A). Chronic disease was confirmed with histological analysis. Perivascular infiltrates were detected in the spinal cords of mice with latent MCMV infection 2 months after challenge with MOG₃₅₋₅₅ peptide (Figure 4B). Among cells isolated from brains of MCMV-infected BALB/c mice 2 months after MOG₃₅₋₅₅ immunization, higher percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells contained inflammatory cytokines IL-17 and IFN-γ, after *in vitro* restimulation with MOG₃₅₋₅₅ peptide compared to stimulated cells isolated from MOG₃₅₋₅₅-immunized mice (Figure 4C). Our findings indicate that BALB/c mice with latent MCMV infection develop disease with long-lasting infiltrates in the CNS that contains lymphocytes specific for neuroantigens.

MCMV Infection Induces Inflammatory Phenotype of Antigen-Presenting Cells in Periphery and in CNS

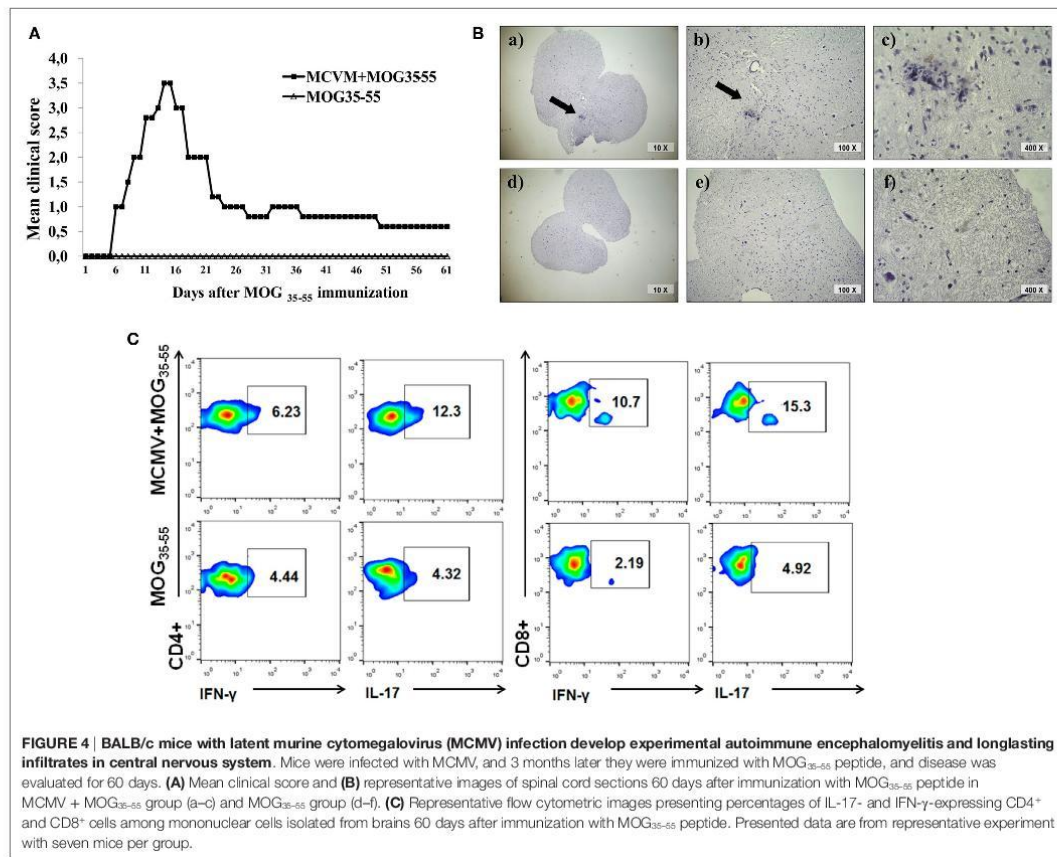
It is known that viral infection induces antiviral immune response mediated by NK cells, CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes (33). Such inflammatory microenvironment in peripheral lymph organs can affect activation of antigen-presenting cells and thus indirectly contribute to development of inflammatory lymphocytes. Therefore, we explored possible influence of viral infection on changes of phenotype of antigen-presenting cells. To this end, mononuclear cells were isolated from inguinal lymph node 12 days after MCMV was administered in foot pad and compared with cells isolated from mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ only. Lymph nodes of MCMV-infected and MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice had significantly higher percentage of CD11c⁺ dendritic cells and CD11c⁺PDCA1⁺plasmocitoid dendritic cells in inguinal lymph nodes compared to MOG₃₅₋₅₅-immunized mice (Figure 5A). Also higher percentage of dendritic cell-expressing CCR2 chemokine receptor was found in both groups of MCMV-infected mice (Figure 5B). More importantly, lymph nodes of MCMV-infected and MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice contained higher percentage of activated CD86⁺ and CD40⁺ (Figure 5C) and inflammatory IL-12⁺ dendritic cells (Figure 5E). Higher





expression of markers of activation, CD86⁺ and CD40⁺ was noticed in MCMV-infected mice compared with MOG₃₅₋₅₅-immunized mice (Figure 5D). These data suggest that inflammatory phenotype of dendritic cells is achieved in BALB/c mice with viral infection but not with encephalitogenic challenge only, as it was seen in C57BL/6 mice.

It is known that systemic inflammation in mice causes activation of microglia that persists for months (34, 35). Since MCMV infection in BALB/c mice causes systemic inflammation, we wanted to see effect of MCMV infection on phenotype of antigen-presenting cells in CNS. We analyzed expression of markers of classical (CD11c) and alternative activation



(CD206) in the population of microglia (CD45^{int}CD11b⁺) in healthy mice, MOG₃₅₋₅₅-immunized mice, MCMV-infected, and MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice. As shown in **Figure 5F**, microglia of mice with viral infection in adult life, with and without EAE, had proinflammatory, M1 phenotype. Significantly higher percentage of CD11c-expressing cells in microglia population was found in both groups of infected mice compared to healthy and MOG₃₅₋₅₅-immunized mice. On the other hand, the highest percentage of (type 2) CD206-expressing microglia was found in MOG₃₅₋₅₅ BALB/c mice. Higher percentage of M2 microglia was also found in MCMV + MOG₃₅₋₅₅-immunized mice compared to healthy and MCMV-infected mice but lower compared to MOG₃₅₋₅₅-immunized mice. Thus, high percentage of M2 microglia in mice at the peak of EAE could be also the compensatory mechanism that precedes disease attenuation.

DISCUSSION

Here, we provide the first evidence that MCMV infection results in breaking resistance of BALB/c mice to EAE induction with

MOG₃₅₋₅₅ peptide, as indicated by typical clinical manifestations and massive inflammatory infiltration in the CNS (**Figure 1**).

The role of MCMV infection in EAE is not studied, while its significance in MS is controversial. There are several prospective clinical studies that indicate protective effect of CMV infection on MS risk (21, 22, 36), while recent well-powered meta-analysis found no significant difference in the rate of CMV seropositivity between MS patients and healthy controls based on pooled samples from all studies to date (37). On the other hand, CMV has been found in demyelinating plaques and the liquor of MS patients (15), and several clinical studies support the role of CMV in MS pathogenesis (18–20). Additionally, CMV infection induces expansion of inflammation-seeking/proinflammatory effector-memory CD4⁺CD28^{null} T cells that are attracted to MS lesions via a CX3CL1 gradient (38, 39) and are mostly found in MS patients (40). Stimulation of these cells with myelin autoantigens results in their proliferation and release of cytotoxic granules, and thus may contribute to MS pathology (41). Some experimental animal studies support the role of CMV in EAE development. Cross-reactivity between CMV_{981-1,003} and MOG₃₅₋₅₅ peptides was

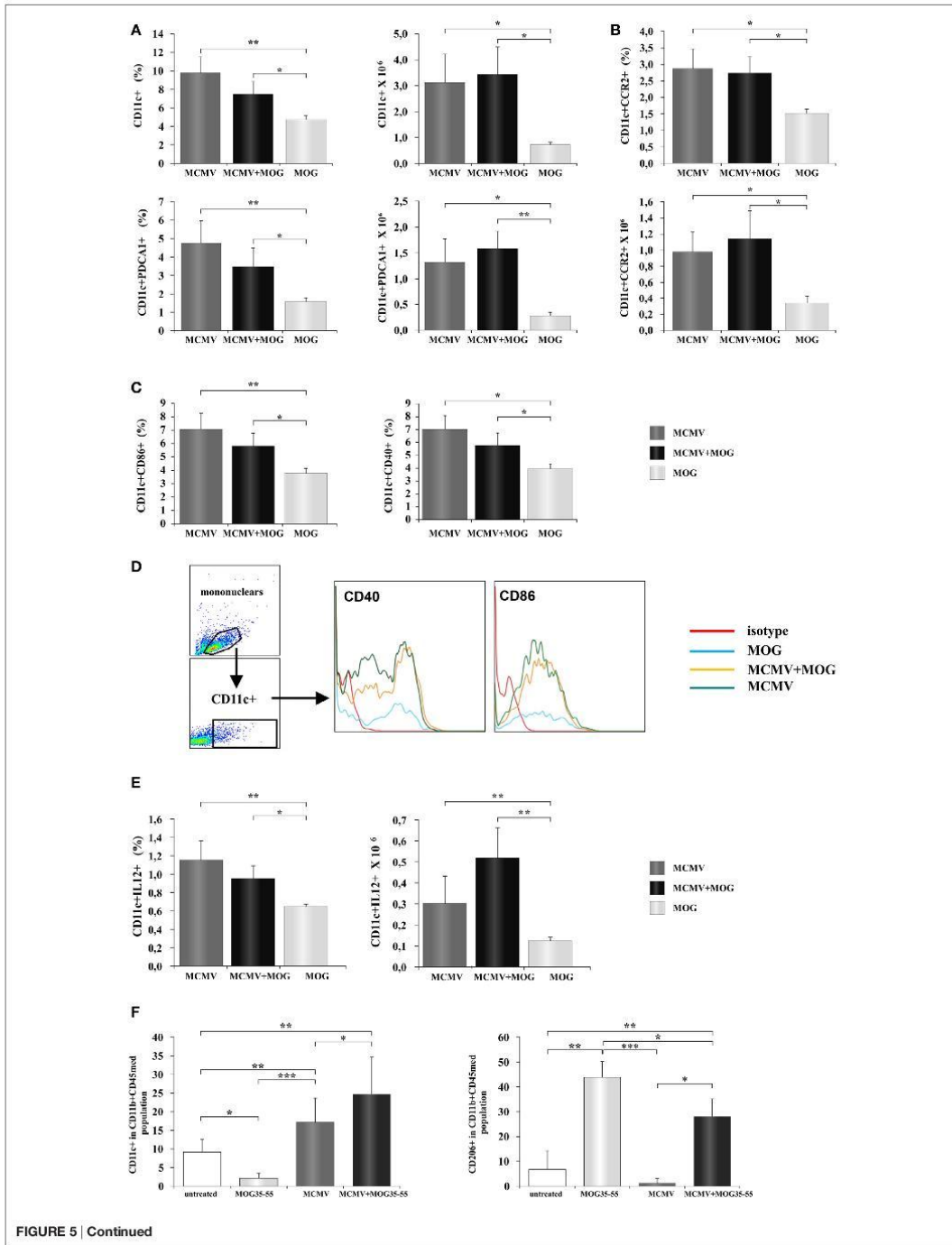


FIGURE 5 | Continued

Murine cytomegalovirus (MCMV) infection favors inflammatory phenotype of antigen-presenting cells. Mononuclear cells were isolated from inguinal lymph nodes 2 days after immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide (MOG₃₅₋₅₅) and from lymph nodes of mice 10 days after their MCMV infection (MCMV). Flow cytometric analysis of dendritic cells phenotype was done. **(A)** Percentages and absolute numbers of CD11c⁺ dendritic cells and CD11c⁺CD11b⁺PDCA1⁺ dendritic cells, **(B)** CCR2-expressing CD11c⁺ cells, and **(C)** CD86⁺ and CD40⁺ dendritic cells are presented as mean + SE (10 mice per group). **(D)** Representative histograms of CD40 and CD86 expression in CD11c⁺ population. **(E)** Percentages and absolute numbers of IL-12⁺ dendritic cells presented as mean + SE (10 mice per group). **(F)** Mononuclear cells were isolated from central nervous system of saline-treated, MOG₃₅₋₅₅-immunized, MCMV-infected, and MCMV-infected and MOG₃₅₋₅₅-immunized mice, 15 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization percentages of classically (CD11c⁺) and alternatively (CD206⁺) microglia are presented as mean + SE (8–10 mice per group). Data were analyzed with Student's *t*-test and ANOVA: **P* < 0.05, ***P* < 0.005, and ****P* < 0.001.

found in Lewis rats immunized with MOG₃₅₋₅₅ (42), while cross-reactivity between CMV_{981-1,003} and MOG₃₄₋₅₆ was found in rhesus monkeys (43). Immunization of rhesus monkeys with human CMV_{981-1,003} peptide induced expansion of MOG₃₄₋₅₆-specific T cells (43). Female SJL/J mice primed with vaccinia virus that contain PLP gene and later challenged with MCMV-developed lesions in white matter regions in the brains (28). Other studies on primates also support the role of CMV in MS pathogenesis (44, 45). Recently, Juranic Lisnic et al. demonstrated that MCMV infection of murine fibroblasts induced highest expression of interferon β , transcriptional factor T-bet, chemokine CXCL10 (46), and the role of these markers of Th1 cells, in EAE pathogenesis is well known (47–49).

However, there was no evidence that MCMV infection may directly facilitate EAE. Here, we show that adult MCMV infection overcomes resistance of BALB/c mice to induction of EAE with MOG₃₅₋₅₅ peptide. The disease is characterized by typical clinical signs (Figure 1A) seen in susceptible C57BL/6 mice and massive brain and spinal cord infiltrations (Figures 1E,F). It should be noted that brain infiltrates are more significant in BALB/c mice treated with encephalitogen than in “classical” EAE in C57BL/6 mice. It appears that the disease after infection + MOG₃₅₋₅₅ challenge in otherwise resistant mice is more similar to MS than classical EAE (50). While in C57BL/6 mice, CD4⁺ cells dominate in CNS infiltrates in the experiments presented here, there was similar number of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the infiltrates (Figure 1).

Encephalitogenicity of CD4⁺ T cells in the infiltrates in BALB/c mice is further documented by their expression of chemokine receptors CXCR3 (Figure 2E), whose blockade during EAE induction attenuated the disease (51), and CCR6 receptor known to have the key role in development of initial autoimmune infiltration in the CNS (52, 53). While γ HV-68 infection in C57BL/6 mice with EAE leads to almost exclusive infiltration with Th1 cells (7), in the CNS of MCMV-infected BALB/c mouse with EAE there is almost equal participation of Th1 and Th17 cell-expressing IFN- γ and T-bet (Th1) and IL-17 and ROR γ t (Th17) (Figures 2C,D). Moreover, inflammatory infiltrates in MCMV-pretreated BALB/c mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ contained CD8⁺ cell-expressing T1 and T17 transcriptional factors and corresponding cytokines TNF- α and IFN- γ (Tc1) and IL-17 (Tc17 cells) (Figures 2C,D). Interestingly, it was suggested that Tc17 cells are required for Th17 accumulation and development of MS (54). Patients with early-stage MS harbor a greater number of Tc17 cells in the cerebrospinal fluid than in peripheral blood that contribute to the initiation of CNS autoimmunity (54). Since

in the CNS of BALB/c mice with neonatal MCMV infection but without immunization with MOG₃₅₋₅₅ dominates Tc1 cells (IFN- γ and T-bet⁺) (55), it appears that the newly developing autoimmune process attracts a different population of CD8⁺ cells (IL-17 producing) that contribute to autoimmune process (54).

Significant accumulation of CD8⁺ cells in the infiltrates and their role in autoimmune pathogenesis is documented by clinical signs and typical pathology complemented by specificity of infiltrating cells. *Ex vivo* restimulation with MOG₃₅₋₅₅ leads to significant increase of CD8⁺ cell-producing IFN- γ in MCMV + MOG₃₅₋₅₅ BALB/c mice (Figure 3C). This finding is at variance with our finding in C57BL/6 mice. CD8⁺ cells from EAE C57BL/6 mice did not respond to restimulation with MOG₃₅₋₅₅ (Figure 3C). Further, MOG₃₅₋₅₅ responsive CD8⁺ cells in MCMV + MOG₃₅₋₅₅ BALB/c mice were not specific for viral epitopes pp89 and m164 (Figure 3D) implicating that CD8⁺ cell contributes to autoimmune process in this model of EAE. This finding is in line with previous report that initiation of autoimmune process in CNS with CD4⁺ T cells is followed with spreading to myelin-specific CD8⁺ T cells that are capable of direct recognition of oligodendrocytes and contribute to tissue damage (56). Similarly, heightened EAE in C57BL/6 mice infected with γ HV-68 is accompanied with infiltration of brain parenchyma with CD8⁺IFN- γ ⁺granzyme⁺ cells (7). However, specificity for autoantigen of these inflammatory and cytolytic CD8⁺ cells in γ HV-68-infected C57BL/6 mice was not studied (7). Finding that mice with depletion of CD4⁺ cells after MCMV infection and before MOG₃₅₋₅₅ immunization did not develop the disease (Figure 3A) contributes to the conclusion that MCMV-infected BALB/c mice developed autoimmune neuropathology. Persistence of CNS infiltrations and MOG₃₅₋₅₅-specific CD4⁺ and CD8⁺ cells in CNS of BALB/c mice 2 months after MOG₃₅₋₅₅ immunization that were infected 3 months previously (Figure 4) also proving autoimmune nature of the disease. Thus although CD4⁺ cells are required, it appears that CD8⁺ cells are the main effector cells.

MCMV infection significantly increases proportion of dendritic cells (CD11c⁺), plasmocitoid dendritic cells (CD11c⁺PDCA1⁺) in peripheral lymph nodes (Figure 5A) compared to immunization with MOG₃₅₋₅₅. Further higher percentage of dendritic cells in lymph nodes in MCMV-infected mice is accompanied with higher percentage of CCR2⁺ dendritic cells (Figure 5B). It is known that MCMV encodes proinflammatory factor (MCK-2), analog of chemokine CCL2 (57) that enhances monocyte recruitment and viral dissemination (58). Then, higher percentage of dendritic cells in inguinal lymph nodes of MCMV-infected mice

could be the consequence of CCL2 analog production, since CCL2 goes to lymph nodes where is presented on the surface of high endothelial venules for recruitment of monocytes (59). Although it was previously shown that MCMV attracts monocytes that have the immunosuppressive role (60), here, we found higher percentage of dendritic cell-expressing markers of activation CD86 and CD40 (Figure 5C) and containing Th1 promoting cytokine, IL-12 (Figures 5D,E). Our results indicate that MCMV infection of BALB/c mice induces increase of inflammatory dendritic cells in peripheral lymph nodes and thus enables development of encephalitogenic T cells. This finding is in correlation with previous report that MCMV-infected mice are resistant to bacterial infection due to prolonged production of the antiviral cytokine IFN- γ and systemic activation of macrophages (61). Significantly, there was an increase of classically activated microglia (CD45^{med}CD11b⁺CD11c⁺) in the CNS of BALB/c mice 25 days after MCMV infection compared to MOG₃₅₋₅₅-immunized mice without previous infection that had mostly alternatively activated microglia (CD45^{med}CD11b⁺CD206⁺) (Figure 5F). Lower percentage of alternatively activated microglia in MCMV + MOG₃₅₋₅₅ mice observed on day 15 after immunization and day 25 after infection in compared to MOG₃₅₋₅₅ treated mice, and prevalence of M1 microglia in virus-infected mice may contribute to chronic disease in MCMV-infected MOG₃₅₋₅₅-immunized BALB/c mice. Previously, it was shown that systemic MCMV infection elicited a

significant increase in the number of microglia with morphological signs of activation and M1 phenotype (62). Thus, it appears that at least one level of resistance of BALB/c mice to EAE is the inability to convert microglia into M1 phenotype.

In summing up, we report here that MCMV infection may promote autoimmune neuropathology and convert resistant mice into susceptible to EAE induction. This was achieved by activation of antigen-presenting cells and promoting M1 phenotype of microglia as well as participation of CD8⁺ encephalitogen-specific T cells in the autoimmune pathogenesis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: JM, MM, NA, SJ, and ML. Performed the experiments: JM, BP, MM, AA, BS, and DK. Analyzed the data: JM, BP, MM, DK, IT, and AK. Wrote the paper: JM and ML.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants No. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia, and the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14 and MP 02/14). The authors thank Milan Milojevic for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* (2006) 2(4):201–11. doi:10.1038/ncpneu0154
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* (1985) 2(8441):1313–5.
- Johnson RT. The virology of demyelinating diseases. *Ann Neurol* (1994) 36(Suppl):S54–60.
- Soldan SS, Jacobson S. Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv Virus Res* (2001) 56:517–55. doi:10.1016/S0065-3527(01)56037-6
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* (2007) 61(4):288–99. doi:10.1002/ana.21117
- Angelini DF, Serafini B, Piras E, Severa M, Coccia EM, Rosicarelli B, et al. Increased CD8⁺ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog* (2013) 9(4):e1003220. doi:10.1371/journal.ppat.1003220
- Casiraghi C, Shanina I, Cho S, Freeman ML, Blackman MA, Horwitz MS. Gammaherpesvirus latency accentuates EAE pathogenesis: relevance to Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS Pathog* (2012) 8(5):e1002715. doi:10.1371/journal.ppat.1002715
- Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol* (2009) 39(8):2031–5. doi:10.1002/eji.200939568
- Johnson TA, Jirik FR, Fournier S. Exploring the roles of CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Semin Immunopathol* (2010) 32:197–209. doi:10.1007/s00281-010-0199-7
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(9):545–58. doi:10.1038/nri3871
- Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies – potential and limitations. *J Neurol* (2008) 255(Suppl 6):7–14. doi:10.1007/s00415-008-6003-0
- Hanley PJ, Bollard CM. Controlling cytomegalovirus: helping the immune system take the lead. *Viruses* (2014) 6(6):2242–58. doi:10.3390/v6062242
- Koch S, Larbi A, Ozelik D, Solana R, Gouttefangeas C, Attig S, et al. Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* (2007) 1114:23–35. doi:10.1196/annals.1396.043
- Sinclair J. Human cytomegalovirus: latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* (2008) 41(3):180–5. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.014
- Smyk DS, Alexander AK, Walker M, Walker M. Acute disseminated encephalomyelitis progressing to multiple sclerosis: are infectious triggers involved? *Immunol Res* (2014) 60(1):16–22. doi:10.1007/s12026-014-8499-y
- Hart BA, Hintzen RQ, Laman JD. Multiple sclerosis – a response-to-damage model. *Trends Mol Med* (2009) 15(6):235–44. doi:10.1016/j.molmed.2009.04.001
- Scotet E, Peyrat MA, Saulquin X, Retiere C, Couedel C, Davodeau F, et al. Frequent enrichment for CD8 T cells reactive against common herpes viruses in chronic inflammatory lesions: towards a reassessment of the physiopathological significance of T cell clonal expansions found in autoimmune inflammatory processes. *Eur J Immunol* (1999) 29(3):973–85.
- 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. *New Microbiol* (2011) 34(3):263–74.
- Horakova D, Zivadnov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamaño-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. doi:10.1371/journal.pone.0053996
- Weinstock-Guttman B, Horakova D, Zivadnov R, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Tyblova M, et al. Interactions of serum cholesterol with anti-herpesvirus responses affect disease progression in clinically isolated syndromes. *J Neuroimmunol* (2013) 263(1–2):121–7. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.07.010
- Sundqvist E, Bergström T, Daialhosein H, Nyström M, Sundström P, Hillert J, et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler* (2014) 20(2):165–73. doi:10.1177/1352458513494489
- Zivadnov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafini M, Bratina A, Ukmar M, et al. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neuro Res* (2006) 28(3):262–9. doi:10.1179/016164106X98134

23. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res* (2011) 157(2):151–60. doi:10.1016/j.virusres.2010.10.031
24. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res* (2012) 54(1–3):140–51. doi:10.1007/s12026-012-8304-8
25. Milovanovic M, Volarevic V, Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, et al. Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One* (2012) 7(9):e45225. doi:10.1371/journal.pone.0045225
26. Jiang HR, Milovanovic M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* (2012) 42(7):1804–14. doi:10.1002/eji.201141947
27. Vanheusden M, Stinissen P, 't Hart BA, Hellings N. Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med* (2015) 21(1):16–23. doi:10.1016/j.molmed.2014.11.002
28. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* (2006) 19(1):80–94. doi:10.1128/CMR.19.1.80-94.2006
29. Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* (1999) 73(8):7056–60.
30. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* (2006) 1(4):1810–9. doi:10.1038/nprot.2006.285
31. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* (2006) 1(4):1952–60. doi:10.1038/nprot.2006.284
32. 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. doi:10.1073/pnas.0903360106
33. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomol Res Int* (2014) 2014:472978. doi:10.1155/2014/472978
34. Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci* (2004) 20(2):467–73. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03514.x
35. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* (2007) 55(5):453–62. doi:10.1002/glia.20467
36. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, et al. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology* (2011) 76(23):1989–95. doi:10.1212/WNL.0b013e31821e552a
37. Pakpoor J, Pakpoor J, Disanto G, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. *J Neurol* (2013) 260(6):1658–60. doi:10.1007/s00415-013-6912-4
38. Broux B, Pannemans K, Zhang X, Markovic-Plese S, Broekmans T, Eijnde BO, et al. CX(3)CR1 drives cytotoxic CD4(+)CD28(-) T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *J Autoimmun* (2012) 38(1):10–9. doi:10.1016/j.jaut.2011.11.006
39. Pinto-Medel MJ, García-Lcón JA, Oliver-Martos B, López-Gómez C, Luque G, Arnáiz-Urrutia C, et al. The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* (2012) 243(1–2):1–11. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.11.008
40. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol* (2007) 179(10):6514–23. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6514
41. Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* (2012) 18(8):446–53. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.003
42. 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. *Biochem Biophys Res Commun* (2014) 443(3):1118–23. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.122
43. Brok HP, Boven L, van Meurs M, Kerlero de Rosbo N, Celebi-Paul I, Kap YS, et al. The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* (2007) 182(1–2):135–52. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.10.010
44. Wroblewska Z, Gilden D, Devlin M, Huang ES, Rorke LB, Hamada T, et al. Cytomegalovirus isolation from a chimpanzee with acute demyelinating disease after inoculation of multiple sclerosis brain cells. *Infect Immun* (1979) 25(3):1008–15.
45. Jagessar SA, Kap YS, Heijmans N, van Driel N, van Straalen L, Bajramovic JJ, et al. Induction of progressive demyelinating autoimmune encephalomyelitis in common marmoset monkeys using MOG34-56 peptide in incomplete Freund adjuvant. *J Neuropathol Exp Neurol* (2010) 69(4):372–85. doi:10.1097/NEN.0b013e3181d5d053
46. Juranic Lisnic V, Babic Cac M, Lisnic B, Trsan T, Mefferd A, Das Mukhopadhyay C, et al. Dual analysis of the murine cytomegalovirus and host cell transcriptomes reveal new aspects of the virus-host cell interface. *PLoS Pathog* (2013) 9(9):e1003611. doi:10.1371/journal.ppat.1003611
47. Yang Y, Weiner J, Liu Y, Smith AJ, Huss DJ, Winger R, et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* (2009) 206(7):1549–64. doi:10.1084/jem.20082584
48. Lalor SJ, Segal BM. Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis is CXCR3 independent. *Eur J Immunol* (2013) 43(11):2866–74. doi:10.1002/eji.201343499
49. Carter SL, Müller M, Manders PM, Campbell IL. Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN- γ but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia *in vitro*. *Glia* (2007) 55(16):1728–39. doi:10.1002/glia.20587
50. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfield 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. *J Exp Med* (2000) 192(3):393–404. doi:10.1084/jem.192.3.393
51. Sporic R, Issekutz TB. CXCR3 blockade inhibits T-cell migration into the CNS during EAE and prevents development of adoptively transferred, but not actively induced, disease. *Eur J Immunol* (2010) 40(10):2751–61. doi:10.1002/eji.200939975
52. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* (2009) 10(5):514–23. doi:10.1038/ni.1716
53. Liston A, Kohler RE, Townley S, Haylock-Jacobs S, Comerford I, Caon AC, et al. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J Immunol* (2009) 182(5):3121–30. doi:10.4049/jimmunol.0713169
54. Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, et al. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* (2013) 123(1):247–60. doi:10.1172/JCI63681
55. Bantug GR, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *J Immunol* (2008) 181(3):2111–23. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2111
56. Ji Q, Castelli L, Goverman JM. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2013) 14(3):254–61. doi:10.1038/ni.2513
57. Saederup N, Aguirre SA, Sparer TE, Bouley DM, Mocarski ES. Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection. *J Virol* (2001) 75:9966–76. doi:10.1128/JVI.75.20.9966-9976.2001
58. 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) 107:30–8. doi:10.1182/blood-2005-05-1833
59. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* (2001) 194:1361–73. doi:10.1084/jem.194.9.1361


60. Daley-Bauer LP, Wynn GM, Mocarski ES. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity* (2012) 37(1):122–33. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.014
61. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* (2007) 447(7142):326–9. doi:10.1038/nature05762
62. Zinkernagel MS, Chinnery HR, Ong ML, Petitjean C, Voigt V, McLenachan S, et al. Interferon γ -dependent migration of microglial cells in the retina after systemic cytomegalovirus infection. *Am J Pathol* (2013) 182(3):875–85. doi:10.1016/j.ajpath.2012.11.031

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Milovanovic, Popovic, Milovanovic, Kvestak, Arsenijevic, Stojanovic, Tanaskovic, Krmpotic, Arsenijevic, Jonjic and Lukic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Short Communication

Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells

Bojan Stojanovic^{1,2}, Ivan Jovanovic¹, Bojana S. Stojanovic^{1,3},
Milica Dimitrijevic Stojanovic¹, Nevena Gajovic¹, Gordana Radosavljevic¹,
Jelena Pantic¹, Nebojsa Arsenijevic¹ and Miodrag L. Lukic¹ 

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

² Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³ Department of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Acute pancreatitis is characterized by autodigestion of pancreatic cells followed by acute inflammation leading to pathology and death. In experimental acute pancreatitis, pancreatic acinar cells and infiltrating macrophages express Galectin-3 but its role in pathology of this disease is unknown. Therefore, we studied its role using Galectin-3 deficient mice. Deletion of Galectin-3 prolonged the survival of mice, led to attenuation of histopathology, and decreased infiltration of mononuclear cells and neutrophils that express TLR-4, in particular, pro-inflammatory N1 neutrophils. Galectin-3 and TLR-4 are also colocalized on infiltrating cells. Lack of Galectin-3 reduced expression of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in F4/80⁺CD11c⁻ and CD11c⁺F4/80⁻ cells. Thus, deletion of Galectin-3 ameliorates acute pancreatitis by attenuating early influx of neutrophils and inflammatory mononuclear cells of innate immunity. These findings provide the basis to consider Galectin-3 as a therapeutic target in acute pancreatitis.

Keywords: acute pancreatitis · Galectin-3 · N1 neutrophils · TLR4

Introduction

Acute pancreatitis (AP) is an acute inflammation of pancreatic tissue initiated by intra-acinar activation of proteolytic enzymes in a cathepsin-B-dependent and calcium-dependent manner [1]. Activated proteolytic enzymes cause destruction of acinar cells and release of inflammatory cytokines [2]. Injured acinar cells also release intracellular content into the extracellular space that serves as damage-associated molecular patterns attracting inflammatory cells that can cause further damage of pancreas [2].

Galectin-3 (Gal-3) is a member of galectins family with a unique chimeric structure and plays important pro-inflammatory role in inflammatory and autoimmune diseases [3]. Under physiological conditions in mice, only duct epithelium cells of pancreas express Gal-3 [4]. After the induction of pancreatitis, acinar cells start to express Gal-3, and there is an increased expression of Gal-3 in infiltrating cells [4].

Here, we demonstrated that Gal-3 deficient mice survived longer after bile–pancreatic duct (BPD) ligation as a model of the severe and lethal form of AP. In addition, we showed that deletion of Gal-3 contributes to a significant attenuation of AP accompanied by decreased influx of neutrophils and mononuclear cells into the pancreas, and decreased accumulation of pro-inflammatory innate immune cells.

Correspondence: Prof. Miodrag L. Lukic
e-mail: miodrag.lukic@medf.kg.ac.rs

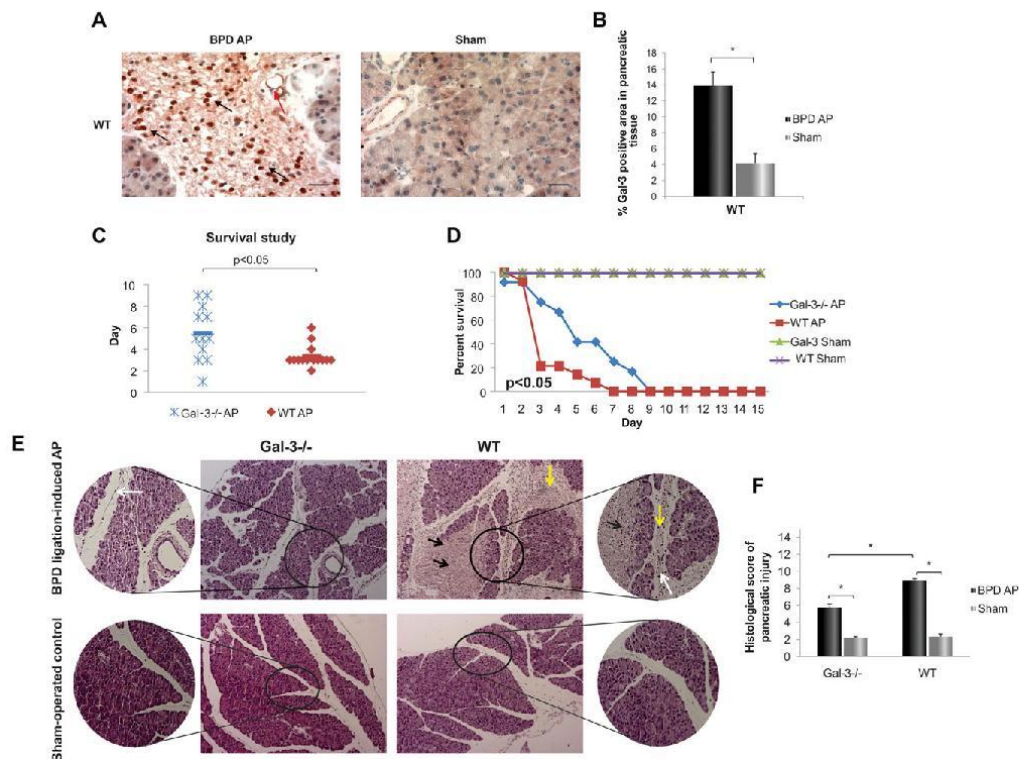


Figure 1. Target disruption of Gal-3 prolongs survival of mice with acute pancreatitis and suppresses disease induced by BPD ligation. (A) Immunohistochemical staining showing expression of Gal-3 in duct cells (red arrow) and infiltrating cells (black arrows) in the pancreas samples obtained from diseased (left panel) and control animals (right panel). Scale bar: 100 μ m. Images are representative of two independent experiments with 10 mice per group in each experiment. (B) Percentage of expression of Gal-3 in pancreata of diseased and control mice. (C) Scatter plot of mortality in mice with BPD ligation-induced AP. (D) Kaplan–Meier curve presents survival rate in BPD ligation model of AP. Data shown are pooled from two independent experiments with seven mice per group per experiment. (E) Photomicrographs of representative H&E-stained mouse pancreas 72 h after BPD ligation model of AP. Massive pancreatic necrosis (black arrows), massive inflammatory cell infiltration (yellow arrows) and intralobular edema (white arrows) were observed in WT mice in comparison, to a lesser extent of pancreatic damage observed in Gal-3^{-/-} mice characterized only with intralobular and inter-acinar edema (white arrows). Photomicrographs of representative H&E-stained mouse pancreas from sham-operated controls that were without signs of pancreatic injury. Scale bar: 200 μ m. Images are representative of two independent experiments (12 mice per group in each experiment). (F) Total histological score of AP, * $p < 0.05$, Mann–Whitney U-test.

Taken together, our data demonstrate that Gal-3 plays an important pro-inflammatory role and may be a potential therapeutic target in pancreatitis.

Results and discussion

Galectin-3 deletion prolongs survival of mice with acute pancreatitis and attenuates tissue damage

We found intracytoplasmic and intranuclear increased expression of Gal-3 in the infiltrating leukocytes within 72 h after AP induction by BPD ligation, indicating its involvement in pathology

(Fig. 1A and B). This correlates with previous reported enhanced expression of Gal-3 in experimental pancreatitis [4].

In accordance with previous findings [5], we showed that “wild-type” (WT) mice with a lethal form of AP-induced by BPD ligation showed 100% mortality within 5 days, with a median mortality at day 3 (Fig. 1C). However, Galectin-3 deficient (Gal-3^{-/-}) mice with a lethal form of AP-induced by BPD ligation showed 100% mortality within 9 days, with median mortality at day 5 (Fig. 1C). Thus, Gal-3^{-/-} mice with AP survived significantly longer in comparison to WT mice with AP (Fig. 1C). Also, Kaplan–Meier curves revealed significant difference in survival rate between WT and Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 1D). As expected, both sham-operated controls had 100% survival at 15 days (Fig. 1D). It appears that longer survival of Gal-3^{-/-} mice is

related to milder inflammatory response as illustrated in Figure 1E and G. Specifically, 72 h after BPD ligation, histological analysis of H&E-stained pancreatic section revealed that WT mice with AP showed significantly more severe edema, leukocyte infiltration, and widespread areas of necrosis and vacuolization of pancreatic parenchyma that were not seen in Gal-3^{-/-} mice (Fig. 1E). Total acute pancreatitis histological score was markedly lower in Gal-3^{-/-} mice with AP compared with WT mice (Fig. 1F). Our results are in line with those of Pan et al. [6] who showed that treatment with lactose, an inhibitor of galectins, alleviated the severity of experimental AP.

Gal-3 deficiency decreases early influx of TLR-4+ innate inflammatory cells in AP

Seventy-two hours after BPD ligation, total number of infiltrating leukocytes in pancreatic tissue was significantly higher in WT mice with AP compared with Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 2A). After induction of AP, there was significant influx of neutrophils into the pancreas (Fig. 2B). The total number of these cells was significantly higher in pancreata of WT mice than Gal-3^{-/-} mice (Fig. 2B), although the difference in the percentage of neutrophils did not reach statistical significance (Fig. 2C). The percentage of F4/80⁺CD11c⁻ cells and total number of these cells were significantly higher in WT mice compared to Gal-3^{-/-} mice (Fig. 2D and E). Immunohistochemical analysis confirmed increased infiltration of Ly-6G/Ly-6C⁺ cells (Fig. 2F) and F4/80⁺ cells (Fig. 2H), with significantly increased percentage of Ly-6G/Ly-6C⁺ cells (Fig. 2G) and F4/80⁺ cells (Fig. 2I) in pancreata of diseased WT mice compared to Gal-3 deficient mice. It is well known that Gal-3 promotes leukocyte recruitment and may act as an adhesion molecule when it is present in inflammatory exudates [7].

Also, Gal-3^{-/-} mice with AP exhibited significantly lower percentage (Fig. 2K) and total number of TLR-4-expressing neutrophils in comparison to WT mice (Fig. 2J). Similarly, level of TLR-4 expression was significantly decreased on individual neutrophils derived from diseased Gal-3^{-/-} mice in comparison to diseased WT mice (Fig. 2L). In line with these findings, we also performed immunofluorescent double staining with anti-TLR-4 and anti-F4/80 antibodies, as well as anti-Ly-6G/Ly-6C antibody. As expected, WT mice with AP had increased infiltration of Ly-6G/Ly-6C⁺ neutrophils that express TLR-4 (Fig. 2M) and F4/80⁺ cells that express TLR-4 (Fig. 2O). Quantitative immunofluorescence of the pancreatic tissue revealed significantly greater number of TLR-4-positive neutrophils (Fig. 2N) and TLR-4-positive F4/80 cells (Fig. 2P) in diseased WT animals compared to Gal-3^{-/-} animals. The analysis summarized in Figure 2Q shows colocalization of TLR-4 and Gal-3 on the same leukocytes in infiltrate. Consistent with these findings, it is shown that Gal-3 is ligand for TLR-4 in experimental neuroinflammation [8, 9]. Further, targeted deletion of TLR-4 gene ameliorates experimental AP by significantly reduced influx of neutrophil and tissue damage in severe AP [10].

Gal-3 deletion attenuates influx of N1 neutrophils and pro-inflammatory accessory cells

Neutrophils, key players in acute inflammation, play crucial role in a course of AP and infiltrate the pancreas within first hours after induction of experimental model of AP [11]. After the induction of AP, Gal-3^{-/-} mice had significantly lower number of neutrophils compared to WT mice (Fig. 2B). In tumor model, Fridlender et al. [12] described two types of neutrophils: N1 neutrophils and N2 neutrophils. N1 neutrophils secrete higher level of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , oxygen radicals, and are more potent in activating cytotoxic T lymphocytes. At the molecular level, N1 neutrophils express higher levels of FasL molecule. We found that the total number of FasL-expressing neutrophils was significantly higher in WT mice compared to Gal-3^{-/-} mice (Fig. 3A). Furthermore, we found significantly higher expression of FasL per neutrophils isolated from pancreata of WT mice compared to Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 3C). Importantly, pancreata of WT mice had significantly higher percentage and total number of IL-1 β -producing neutrophils (Fig. 3D and E).

As shown previously (Fig. 2D), the total number of F4/80⁺CD11c⁻ cells was significantly lower in pancreata of Gal-3^{-/-} mice. Intracellular staining shown significantly lower the total number of these cells that produce TNF- α in Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 3F). Also, the pancreata of Gal-3^{-/-} mice had lower total number of F4/80⁺CD11c⁻ cells that produce IL-1 β compared to WT mice with AP (Fig. 3H). Intracellular staining of CD11c⁺F4/80⁻ cells revealed that WT mice with AP had significantly increased total number of TNF- α -producing CD11c⁺F4/80⁻ cells (Fig. 3J). Furthermore, AP induction markedly decreased total number of IL-1 β -producing CD11c⁺F4/80⁻ cells in Gal-3^{-/-} mice in comparison to WT mice (Fig. 3L). Our results were also in accordance with those of Yip et al. [9] that have shown in the model of traumatic injury neutralizing anti-Gal-3 antibody decreased expression of IL-1 β and TNF- α .

Concluding remarks

In summing up, deletion of Gal-3 expressed in inflammatory cells ameliorates AP by attenuating inflammatory response after disease induction. This is evident by lower infiltration of innate immune cells. This is also supported by decreased production of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β .

Materials and methods

Animals

We used 6–8 weeks old Gal-3^{-/-} mice on C57BL/6 background and WT C57BL/6 mice in all experiments. Targeted deletion of Gal-3 gene was done in C57BL/6 embryonic stem cells by Hsu et al. as previously described [13]. Breeding pairs of Gal-3^{-/-}

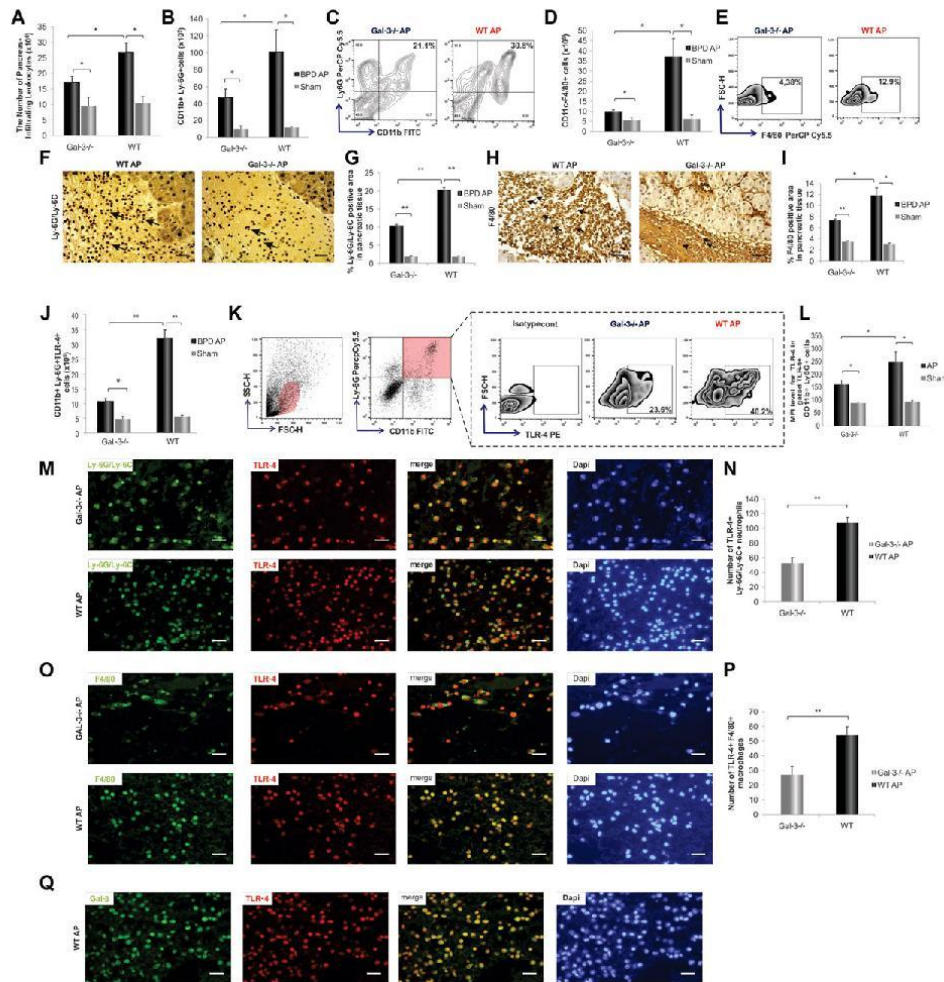


Figure 2. The number of infiltrating cells is lower in the pancreas of Gal-3^{-/-} mice with BPD ligation-induced acute pancreatitis. (A) The total number of pancreas-infiltrating leukocytes was determined by flow cytometry. The total number and representative flow cytometry plots illustrating percentages of neutrophils (B, C) and macrophages (D, E). The total number was calculated per pancreas. Data are shown as the mean \pm SEM of 12 mice per group per experiment and are pooled from two independent experiments. * $p < 0.05$; Student's *t*-test. (F) The representative immunohistochemical image of infiltration of Ly-6G/Ly-6c⁺ neutrophils (black arrows). Scale bar: 100 μ m. Images are representative of two independent experiments (12 mice per group in each experiment). (G) Immunohistochemical analyses of the amount of Ly-6G/Ly-6c⁺ positive areas were performed on pancreatic tissue sections. * $p < 0.05$; Student's *t*-test. (H) Representative immunohistochemical image of infiltration of F4/80⁺ cells (black arrows). Scale bar: 100 μ m. Images are representative of two independent experiments (12 mice per group in each experiment). (I) Quantitative immunohistochemistry of the F4/80-positive area in pancreata. * $p < 0.05$; Student's *t*-test. The total number and representative FACS plots illustrating percentages of TLR-4-expressing neutrophils (J and K). Data are shown as mean \pm SEM of 12 mice per group per experiment from two independent experiments, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, Student's *t*-test. (L) Quantification of mean fluorescence intensity (MFI) level for TLR-4 in gated CD11b⁺Ly6G⁺ cells. (M) Double immunofluorescent staining of Ly-6G/Ly-6C (green) and TLR-4 (red) together with DNA staining with DAPI (blue) in pancreata from representative Gal-3^{-/-} (top) and WT mice with AP (bottom). Scale bar: 25 μ m. Images are representative of two independent experiments (10 mice per group in each experiment). (N) Number of TLR-4⁺ neutrophils from pancreata 72 h after BPD ligation. Data are shown as the mean \pm SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; Student's *t*-test. (O) Immunofluorescent double staining using an anti-F4/80 antibody (red) and an anti-TLR-4 antibody (green) together with DNA staining with DAPI (blue) in pancreata from representative Gal-3^{-/-} (top) and WT mice with AP (bottom). Scale bar: 25 μ m. Images are representative of two independent experiments (10 mice per group in each experiment). (P) Number of TLR-4⁺ macrophages from pancreata of diseased animals 72 h after BPD ligation. Data are shown as the mean \pm SEM, ** $p < 0.001$; Student's *t*-test. (Q) Colocalization of Gal-3 and TLR-4 in infiltrating cell in pancreata 72h after induction of AP. Scale bar: 25 μ m. Images are representative of two independent experiments (10 mice per group in each experiment).

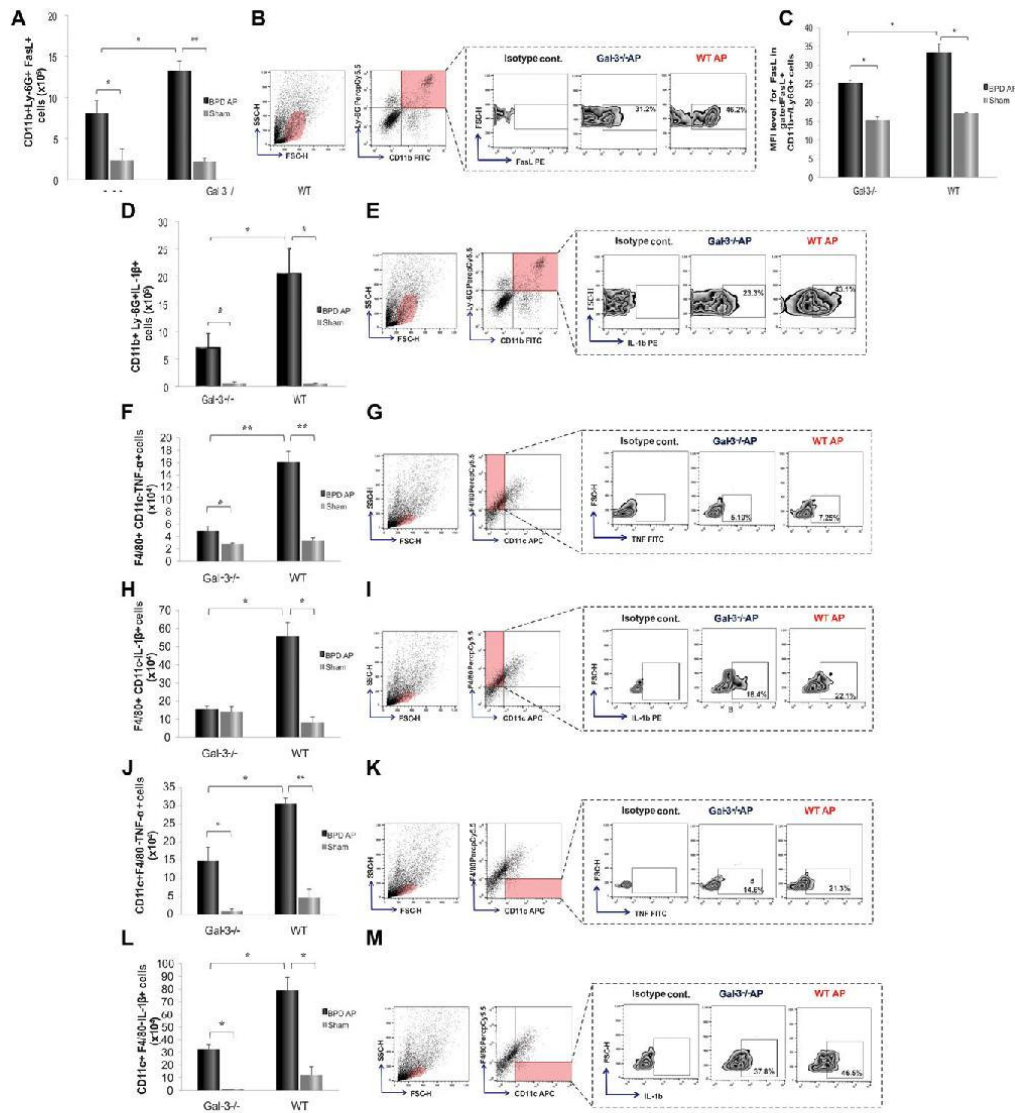


Figure 3. Galectin-3 deletion diminishes pro-inflammatory phenotypes of innate immune cells. The total number and representative flow cytometry plots displaying the frequency of FasL-expressing neutrophils (A, B), (C) Quantification of MFI level for FasL in gated CD11b⁺Ly6G⁺ cells. The total number and representative flow cytometry plots displaying the frequency of IL-1β-producing neutrophils (D, E), TNF-α-producing F4/80⁺CD11c⁺ cells (F, G), IL-1β-producing F4/80⁺CD11c⁺ cells (H, I), TNF-α-producing CD11c⁺F4/80⁺ cells (J, K), and IL-1β-producing CD11c⁺F4/80⁺ cells (L, M), derived from the pancreas. Data are shown as mean ± SEM of 12 mice per group per experiment and are pooled from two independent experiments, **p* < 0.05; ***p* < 0.001, two-tailed unpaired Student's *t*-test.

and WT C57BL/6 mice of the same substrain were housed in a temperature-regulated environment with 12-h light–dark cycle in conventional facilities of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All experiments were approved by the Ethics Board of Faculty of Medical Science and were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Induction of acute pancreatitis by BPD ligation

Acute pancreatitis was induced by BPD ligation to mimic severe gallstone-induced pancreatitis as described by Samuel et al. [5]. The groups in the experiment were: Gal-3^{-/-} mice with BPD ligation, WT mice with BPD ligation, Gal-3^{-/-} mice with sham operation, and WT mice with sham operation. For survival studies, we observed mice twice daily after BPD ligation. Mice were sacrificed by euthanasia when they showed signs of marked distress and suffering or on day 15 if without clinical signs of disease. For the determination of disease severity and analysis of infiltrating cells, mice were sacrificed 72 h after surgery.

Histopathological and cellular analysis of pancreas

Portions of pancreata from all animal groups were fixed in formalin and embedded in paraffin and 5 mm sections were stained with H&E. Sections were analyzed in a blindly fashion by two observers. The scoring system used as previously suggested.

Pancreatic leukocytes were isolated using collagenase digestion method, as previously described [14]. Flow cytometric analysis was performed as detailed in Cossarizza et al. [15]. The cells were labeled with the following monoclonal antibodies: anti-mouse CD11b, TNF- α , CTLA-4, and F4/80Abs conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ); anti-mouse FasL, and IL-1 β Abs conjugated with PE (BD Bioscience); anti-mouse Ly-6G, CD11c and F4/80 Abs conjugated with peridinin chlorophyll protein (PerCP, BD Biosciences); and anti-mouse and CD11b Abs conjugated with allophycocyanin (APC, BD Bioscience). For intracellular staining, the cells were activated as previously described [16]. Flow cytometric analysis was conducted on a BD Biosciences FACS Calibur and analyzed by using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Immunohistochemistry of mouse pancreatic samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded mouse pancreatic tissue sections were incubated with rabbit anti-mouse F4/80 (ab100790, Abcam, Cambridge, UK) and Gal-3 (ab53082, Abcam), and rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (RB6-8C5, Novusbio, Littleton, CO, USA). Sections were visualized by rabbit-specific conjugate (ZytoChem Plus HRP Kit; Zytomed, Berlin, Germany), and rat-specific HRP-conjugated antibody (HAF005, R&D Systems, D Systems, Minneapolis, MN) and photomicrographed with a digital camera mounted on the light microscope (Olympus BX51). The

cells stained brown were considered as positive and results are expressed as percent positive staining in the pancreata calculated using Image J software.

Immunofluorescent staining was performed using rabbit anti-mouse F4/80 (1:800), Gal-3 (1:500) antibodies (Abcam), followed by incubation with goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with FITC (1:1000; Abcam), then using rat anti-mouse TLR-4 antibody (1:10; R&D Systems), followed by incubation with donkey anti-rat IgG antibody conjugated with PE (1:150, Abcam); and using rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C Antibody (1:500, Novus Biologicals, CO, USA), followed by incubation with donkey anti-rat antibody conjugated with biotin (1:500, Abcam) and goat anti-biotin antibody conjugated with FITC (1:100, Abcam). The sections were mounted with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Images were obtained and analyzed using an immunofluorescence microscope (Olympus BX51). Only brightness and contrast were adjusted. Results are presented as a mean count of double-stained cells per field.

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm SEM. The normality of distribution was tested by Kolmogorov–Smirnov test. The two-tailed Student's *t*-test or nonparametric Mann–Whitney rank-sum test were used depending on the normality of distribution. The results were considered significantly different when $p < 0.05$. The data were analyzed using SPSS version 20, statistical package.

Acknowledgements: Funding for this work was provided by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175069, 175071 and 175103), Serbia and from the Faculty of medical sciences, Kragujevac (project JP 06/15), Serbia. The authors thank Professor Dr Irena Tamaskovic for assistance in histopathological assessment, and Aleksandar Ilic and Milena Jurisevic for excellent technical assistance.

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

- 1 Talukdar, R., Sareen, A., Zhu, H., Yuan, Z., Dixit, A., Cheema, H., George, J. et al., Release of Cathepsin B in Cytosol Causes Cell Death in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2016. **151**: 747–758.e745.
- 2 Lankisch, P. G., Apte, M. and Banks, P. A. Acute pancreatitis. *Lancet* 2015. **386**: 85–96.
- 3 Radosavljevic G.D., P. J., Jovanovic I., Lukic M.L. and Arsenijevic N. The two faces of galectin-3: roles in various pathological conditions. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 2016. **17**: 187–198.

- 4 Gebhardt, A., Ackermann, W., Unver, N. and Elsasser, H. P. Expression of galectin-3 in the rat pancreas during regeneration following hormone-induced pancreatitis. *Cell Tissue Res* 2004. **315**: 321–329.
- 5 Samuel, I., Yuan, Z., Meyerholz, D. K., Twait, E., Williard, D. E. and Kempuraj, D. A novel model of severe gallstone pancreatitis: murine pancreatic duct ligation results in systemic inflammation and substantial mortality. *Pancreatology* 2010. **10**: 536–544.
- 6 Pan, L. L., Deng, Y. Y., Wang, R., Wu, C., Li, J., Niu, W., Yang, Q. et al., Lactose induces phenotypic and functional changes of neutrophils and macrophages to alleviate acute pancreatitis in mice. *Front. Immunol.* 2018. **9**: 751.
- 7 Gittens, B. R., Bodkin, J. V., Nourshargh, S., Perretti, M. and Cooper, D. Galectin-3: a positive regulator of leukocyte recruitment in the inflamed microcirculation. *J. Immunol.* 2017. **198**: 4458–4469.
- 8 Burguillos, M. A., Svensson, M., Schulte, T., Boza-Serrano, A., Garcia-Quintanilla, A., Kavanagh, E., Santiago, M. et al., Microglia-secreted Galectin-3 acts as a Toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation. *Cell. Rep.* 2015. **10**: 1626–1638.
- 9 Yip, P. K., Carrillo-Jimenez, A., King, P., Vilalta, A., Nomura, K., Chau, C. C., Egerton, A. M. et al., Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration. *Sci. Rep.* 2017. **7**: 41689.
- 10 Awla, D., Abdulla, A., Regner, S. and Thorlacius, H. TLR4 but not TLR2 regulates inflammation and tissue damage in acute pancreatitis induced by retrograde infusion of taurocholate. *Inflamm. Res.* 2011. **60**: 1093–1098.
- 11 Merza, M., Hartman, H., Rahman, M., Hwaiz, R., Zhang, E., Renstrom, E., Luo, L. et al., Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2015. **149**: 1920–1931.e1928.
- 12 Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S. et al., Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009. **16**: 183–194.
- 13 Hsu, D. K., Yang, R. Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D. R., Fung-Leung, W. P. et al., Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 2000. **156**: 1073–1083.
- 14 Xue, J., Nguyen, D. T. and Habtezion, A. Aryl hydrocarbon receptor regulates pancreatic IL-22 production and protects mice from acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2012. **143**: 1670–1680.
- 15 Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Akdis, M., Andra, I., Annunziato, F., Bacher, P. et al., Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur. J. Immunol.* 2017. **47**: 1584–1797.
- 16 Volarevic, V., Milovanovic, M., Ljubic, B., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Nilsson, U., Leffler, H. et al., Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012. **55**: 1954–1964.

Abbreviations: AP: acute pancreatitis · BPD: bile-pancreatic duct · FasL: Fas ligand · Gal-3: Galectin-3 · Gal-3^{-/-}: Galectin-3 deficient · MFI: Mean Fluorescence Intensity · WT: wild type

Full correspondence: Prof. Miodrag L. Lukic, MD, PhD; Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
E-mail: miodrag.lukic@medf.kg.ac.rs

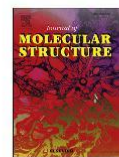
The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.201847890>

Received: 29/8/2018

Revised: 26/1/2019

Accepted: 18/3/2019

Accepted article online: 20/3/2019



Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid



Miloš V. Nikolić^a, Marina Ž. Mijajlović^a, Verica V. Jevtić^b, Zoran R. Ratković^b,
 Sladana B. Novaković^c, Goran A. Bogdanović^c, Jelena Milovanović^d,
 Aleksandar Arsenijević^d, Bojana Stojanović^d, Srećko R. Trifunović^b, Gordana P. Radić^{a,*}

^a Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Vinča Institute of Nuclear Sciences, Laboratory of Theoretical Physics and Condensed Matter Physics, University of Belgrade, PO Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

^d Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2015

Received in revised form

16 March 2016

Accepted 18 March 2016

Available online 21 March 2016

Keywords:

Binuclear copper(II)-complexes

Crystal structure

Cytotoxicity

ABSTRACT

The spectroscopically predicted structure of the obtained copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid was confirmed by X-ray structural study and compared to previously reported crystal structure of the Cu complex with S-methyl derivative. Single crystals suitable for X-ray measurements were obtained by slow crystallization from a water solution. Cytotoxic effects of S-alkyl (R = benzyl (**L1**), methyl (**L2**), ethyl (**L3**), propyl (**L4**) and butyl (**L5**)) derivatives of thiosalicylic acid and the corresponding binuclear copper(II)-complexes on murine colon carcinoma cell lines, CT26 and CT26.CL25 and human colon carcinoma cell line HCT-116 were reported here. The analysis of cancer cell viability showed that all the tested complexes had low cytotoxic effect on murine colon carcinoma cell lines, but several times higher cytotoxicity on normal human colon carcinoma cells.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The success of *cisplatin* in the treatment of various types of neoplasms has placed the coordination chemistry of metal-based drugs in the frontline in the cancer chemotherapy [1–3]. Although *cisplatin* is widely used as an anticancer drug, the treatment is still dose-limited by side effects, narrow therapeutic window and acquired resistance. These problems in the therapy have increased the interest in developing alternative strategies based on different metals with improved pharmacological properties. Over the years a large number of complexes containing platinum or non-platinum metals have been studied as potential cancer chemotherapeutic agents. Scientists synthesized and characterized various metal complexes, where the nature of both the metal and the ligand were varied. Investigations in this field are focused on

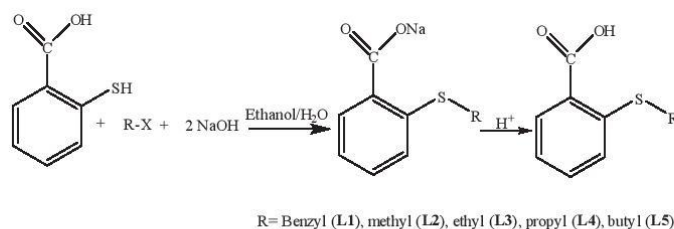
the use of biologically active complexes, such as copper coordination compounds [4,5].

Copper-based complexes have been investigated on the assumption that endogenous metals may be less toxic for normal cells compared to cancer cells. However, copper can also be toxic due to its redox activity and affinity for binding sites that should be occupied by other metals. The exact role of copper in cancer is not yet fully understood, but it is possible to be involved via oxidation processes and the production of ROS (ROS = Reactive oxygen species) and its involvement in angiogenic processes [6–8].

Numerous copper(II)-complexes exhibiting cytotoxic activity have been reviewed so far. Structurally, these compounds usually include a variety of aromatic molecules as ligands, which can be coordinated through N, S and O donor atoms [3]. The combination of copper(II) salts and specific copper chelators have been shown to suppress proliferation of different types of human cancer cells [1]. A great variety of copper complexes including different classes of ligands, such as derivatives of thiosemicarbazones, imidazole, purine, pyrrolidine and pyridine have been proposed as potential

* Corresponding author.

E-mail address: vasic_gordana@yahoo.com (G.P. Radić).



Scheme 1. The preparation of the benzyl (L1), methyl (L2), ethyl (L3), propyl (L4) and butyl (L5) derivatives of thiosalicylic acid.

Table 1
Crystallographic data for C3.

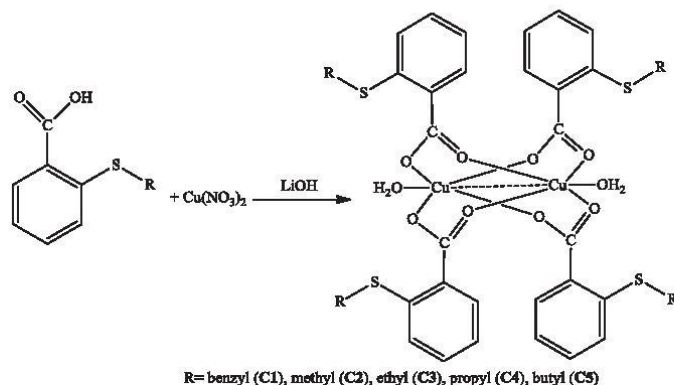
Empirical formula	C ₁₈ H ₂₀ CuO ₅ S ₂
Formula weight	444.00
Color, crystal shape	Green, prism
Crystal size (mm ³)	0.36 × 0.18 × 0.11
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	1.5418
Crystal system	Triclinic
Space group	P1–
Unit cell dimensions	
a (Å)	7.5102(3)
b (Å)	10.8709(5)
c (Å)	12.1557(6)
α (°)	83.578(4)
β (°)	89.304(3)
γ (°)	76.314(4)
V (Å ³)	958.09(8)
Z	2
D _{calc} (Mg/m ³)	1.539
μ (mm ⁻¹)	3.875
θ range for data collection (°)	3.66 to 72.64
Reflections collected	8944
Independent reflections, R _{int}	3804, 0.0185
Completeness (%) to θ = 67°	99.9
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	3804/0/245
Goodness-of-fit on F ²	1.049
Final R ₁ /wR ₂ indices [I > 2σ(I)]	0.0273/0.0748
Final R ₁ /wR ₂ indices (all data)	0.0292/0.0764
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.313/–0.279

anticancer agents [9–11]. Copper(II)-complexes with ligands from the group of NSAIDs (NSAIDs = Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) and other therapeutic ligands were also found to be cytotoxic [12].

Thiosalicylic acid and its derivatives are used for metal determination [13,14], as modifiers for graphite paste electrodes [15], as photoinitiators for free radical polymerization [16], in cosmetics [17], in inflammatory, allergic and respiratory diseases treatments [18], as well as Ras-tumor growth inhibitors [19]. In our previously published paper we investigated the antimicrobial activity of some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acids and the corresponding copper(II)-complexes. We concluded that all the tested compounds showed moderate or selective antimicrobial activity and low anti-fungal activity. The copper(II)-complexes showed similar or higher activity than the corresponding S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid [20].

The complex forming ability of thiosalicylic acid with copper(II) have been previously recorded. Subrahmanyam et al. reported the formation of a blue complex containing copper(II) with thiosalicylic acid in which the metal ion occupied only one of two potential sites of the ligand: the –SH group [21]. Anjaneyulu et al. reported the formation of a light green complex containing copper(II) with thiosalicylic acid and acetylacetone as bidentate ligands [22]. Then, Ferrer et al. reported synthesis and characterization of dimeric copper(II)-complex with thiosalicylic acid and pyridine [23]. Mawgoud et al. reported synthesis of copper(II) ternary complexes with thiosalicylic acid and amino acids as ligands [24]. Idriss et al. investigated spectrophotometrically the complex formation between copper(II)-mercaptonic acid and thiosalicylic acid [25].

The aim of this paper is to research the *in vitro* cytotoxic effects of the earlier synthesized S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid and the corresponding copper(II)-complexes. In this study, we report the cytotoxicity of five ligands precursors, S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid (L1–L5), and their corresponding five copper(II)-complexes (C1–C5) on murine colon carcinoma cell



Scheme 2. The preparation of the binuclear copper(II)-complex with S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid.

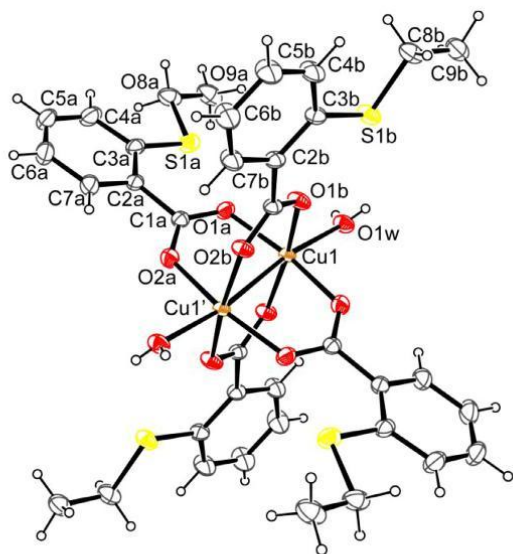


Fig. 1. Crystal structure and the atom numbering scheme of molecule **C3**. Displacement ellipsoids are drawn at the 30%.

lines, CT26 and CT26.CL25 and human colon carcinoma cell line HCT-116. We show here that our new copper(II)-complexes have low cytotoxic effect on murine colon carcinoma cell lines, but several times higher cytotoxicity on normal human colon carcinoma cells. In addition, we also report in this paper the new crystal structure of the Cu complex with ethyl derivative of thiosalicylic acid (**C3**) in order to compare the fine structural differences and the effects of intermolecular interactions with respect to previously reported Cu(II) complex with the methyl derivative of the same ligand (**C2**).

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

The reagents were obtained commercially and used without further purification. Elemental analyses were done on a Vario III CHNOS Elemental Analyzer, Elementar Analysensysteme GmbH. For infrared spectra a Perkin–Elmer FTIR 31725-X spectrophotometer and KBr pellet technique were employed.

2.2. Syntheses

2.2.1. General procedure for the synthesis of S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid (**L1**)–(**L5**)

The S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid ligands (alkyl = benzyl (**L1**), methyl (**L2**), ethyl (**L3**), propyl (**L4**), butyl (**L5**)) were prepared [26] by alkylation of thiosalicylic acid by means of the corresponding alkyl halides in alkaline water-ethanol solution (Scheme 1).

2.2.2. General procedure for the synthesis of copper(II)-complexes with S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid, (**C1**)–(**C5**)

Copper(II)-nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in 10.0 mL of water on a steam bath and S-alkyl thiosalicylate

Table 2

Selected bond lengths (Å) and angles (°) of **C3**.

Cu1–Cu1 ⁱ	2.611(1)	O1a–Cu1–O1b	86.18(6)
Cu1–O1a	1.988(1)	O1a–Cu1–O2b ⁱ	92.44(5)
Cu1–O2a	1.955(1)	O1b–Cu1–O2a ⁱ	91.29(6)
Cu1–O1b	1.982(1)	O2a ⁱ –Cu1–O2b ⁱ	87.84(5)
Cu1–O2b	1.958(1)	O1a–Cu1–O1w	99.05(6)
Cu1–O1w	2.135(1)	O1b–Cu1–O1w	97.18(6)
O1a–C1a	1.260(2)	O2a ⁱ –Cu1–O1w	92.42(6)
O2a–C1a	1.255(2)	O2b ⁱ –Cu1–O1w	94.15(6)
O1b–C1b	1.255(2)	O1a–Cu1–O2a ⁱ	168.48(5)
O2b–C1b	1.261(2)	O1b–Cu1–O2b ⁱ	168.66(5)
C3a–S1a	1.761(2)	C1a–C2a–C3a	124.31(16)
C8a–S1a	1.812(2)	C1a–C2a–C7a	115.94(17)
C3b–S1b	1.763(2)	C1b–C2b–C3b	124.36(15)
C8b–S1b	1.815(2)	C1b–C2b–C7b	116.57(15)

Symmetry codes: (i) $-x, -y, -z+1$.

(alkyl = benzyl (**L1**), methyl (**L2**), ethyl (**L3**), propyl (**L4**), butyl (**L5**)) was added. The reaction mixtures were heated for 3 h and during this period 10.0 mL of LiOH aqueous solution (0.0348 g, 0.8278 mmol) was added in small portions and the solutions were filtered and evaporated to a small volume. The blue precipitates of copper(II)-complexes were separated by filtration, washed with cold water and air-dried [20]. Single crystals of $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thio-sal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$, (**C3**) suitable for X-ray measurements were obtained by slow crystallization from a water solution by evaporation.

2.3. Single crystal X-ray crystallography

Single-crystal diffraction data for $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thio-sal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C3**) were collected at room temperature on an Agilent Gemini S diffractometer equipped with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Data reduction and empirical absorption corrections were performed with CrysAlisPro [27]. Crystal structure was solved by direct methods, using SIR2002 [28] and refined using SHELXL program [29]. The hydrogen atoms attached to C atoms were placed at geometrically idealized positions with C–H distances fixed to 0.93, 0.97 and 0.96 Å from phenyl, methylene and methyl C atoms, respectively. The isotropic displacement parameters were set equal to $1.2U_{\text{eq}}$ and $1.5U_{\text{eq}}$ of the parent C atoms. The hydrogen atoms of the apical water ligands were located in difference Fourier map and refined isotropically. The crystallographic data are listed in Table 1. The PARST [30] and PLATON [31] programs were used to perform geometrical calculation and the program ORTEP [32] was employed for molecular graphics.

2.4. In vitro cytotoxicity studies

2.4.1. Preparation of drug solutions

The complexes were dissolved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) in distilled water at a concentration of 10 mM and filtered through a

Table 3

Geometrical parameters (Å, °) of hydrogen bonding and weak intermolecular interactions in **C3**.

D–H...A	D–H	D...A	H...A	D–H...A
O1w–H1w...O1b ⁱⁱ	0.68(3)	3.058(2)	2.50(3)	140(3)
O1w–H2w...O1a ⁱⁱ	0.69(3)	3.127(2)	2.50(3)	151(3)
O1w–H1w...S1b ⁱⁱ	0.68(3)	3.412(2)	2.77(3)	155(3)
O1w–H2w...S1a ⁱⁱ	0.69(3)	3.487(2)	2.88(3)	147(3)
O9a–H9a1...O2a ⁱⁱⁱ	0.96	3.457(3)	2.56	155
O9b–H9b3...O2b ⁱⁱⁱ	0.96	3.404(3)	2.50	157
C4b–H4b...Cg1 ^{iv}	0.93	3.803(2)	3.12	131

Symmetry codes: (ii) $-x+1, -y, -z+1$; (iii) $x+1, y, z$; (iv) $1-x, -1-y, 1-z$. Cg1 refers to centroid of C2a/C7a ring.

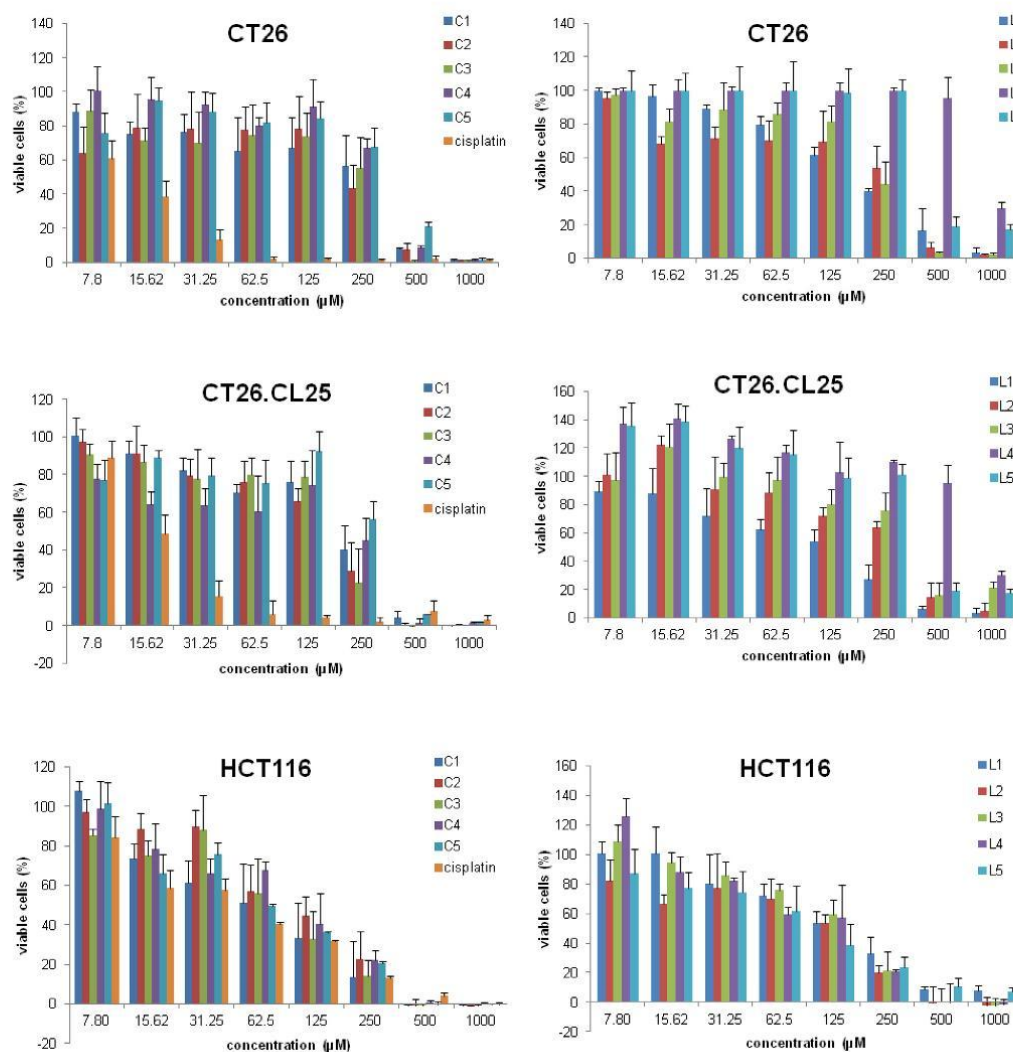


Fig. 2. Representative graphs of CT26, CT26.CL25, and HCT-116 cell survival after 72 h cell growth in the presence of copper(II)-complexes and ligand precursors. Each point represents a mean value and standard deviation of 3 experiments with 3 replicates per dose.

0.22 mm Millipore filter. These stock solutions were diluted in culture medium immediately before use. MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide was dissolved (5 mg/mL) in a phosphate buffer saline having a pH of 7.2, and filtered through the 0.22 mm Millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

2.4.2. Cell culture

CT26 and CT26.CL25 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). HCT-116 cells were kindly provided by Dr Danijela Vignjević (Institute Curie, Paris, France). The cells were maintained in DMEM (Sigma Aldrich, Munich, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany), penicillin (100 IU/mL),

streptomycin (100 µg/mL) in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂ at 37 °C. Subconfluent monolayers, in log growth phase, were harvested by brief treatment with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphatebuffered saline (PBS, PAA Laboratories GmbH) and washed three times in serum-free PBS. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion.

2.4.3. Cytotoxicity assays

The effects of the tested compounds on cell viability were determined using MTT colorimetric technique. CT26, CT26.CL25, and HCT116 cells were diluted with growth medium to 5 · 10⁴ cells/mL and aliquots (5 · 10³ cells/100 mL) were placed in individual wells in 96-multiplates. The next day the medium was exchanged with 100 µL of different compounds, which had been serially

Table 4

IC₅₀ (μM)^a for the 72 h of action of the investigated compounds, ligand precursors and copper(II)-complexes on CT26, CT26.CL25, and HCT-116 cell lines, determined by MTT assay.

Compound	CT26	CT26.CL25	HCT116
C1	295.65 ± 36.64	307.21 ± 44.87	60.17 ± 11.01
C2	279.16 ± 71.11	280.23 ± 79.81	67.21 ± 10.62
C3	291.92 ± 61.24	286.29 ± 52.19	75.34 ± 16.53
C4	407.58 ± 38.47	375.55 ± 25.31	91.59 ± 15.21
C5	402.29 ± 41.33	360.19 ± 18.08	59.32 ± 9.83
L1	374.46 ± 26.75	328.79 ± 13.74	137.01 ± 13.74
L2	331.84 ± 64.46	427.17 ± 32.27	143.14 ± 17.14
L3	349.14 ± 51.19	513.27 ± 79.50	171.24 ± 14.23
L4	848.83 ± 63.05	859.56 ± 67.93	130.89 ± 19.13
L5	585.70 ± 38.58	584.53 ± 40.47	82.65 ± 11.07
Cisplatin	9.45 ± 3.06	21.21 ± 8.19	25.41 ± 7.14

^a Mean values ± standard deviation from four independent experiments.

diluted 2-fold in the medium to concentrations ranging from 1000 μM to 7.8 μM in growth medium. Each compound was tested in triplicate. The cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ for 72 h. After incubation the supernatant was removed and 15% MTT solution (5 mg/mL in PBS, 10 μL) in DMEM medium without FBS was added to each well. After an additional 4 h of incubation at 37 °C in a 5% CO₂, the medium with MTT was removed and DMSO (150 μL) with glycine buffer (20 μL) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate Zenyth 3100 Multimode detector. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = 100 - ((E-B)/(S-B) · 100), where B is for background of medium alone, S is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for experimental well. Each of the tested complexes was evaluated for cytotoxicity in three separate experiments.

2.4.4. Apoptosis assay

For the detection of apoptosis, cells were plated at T25 culture flasks and allowed to grow overnight. After the cells reached sub-confluency, medium was replaced with tested complexes (15 μM). Exposed cells were placed at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 24 h. Cultured cells were washed twice with PBS, and resuspended in 1 × binding buffer (10 × binding buffer: 0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) at concentration 1 · 10⁶/mL. Annexin FITC and propidium iodide (PI) were added to the 100 μL of cell suspension and incubated for 15 min at room temperature (25 °C) in the dark. After incubation 400 μL of 1 × binding buffer was added to each tube and stained cells were analyzed within 1 h using FACS Calibur (BD, San Jose, USA) and Flow Jo software (Tri Star). Since, Annexin V FITC staining precedes the loss of membrane integrity that accompanies the later stage identified by PI, Annexin FITC positive, PI negative indicates early apoptosis, while viable cells are Annexin V FITC negative, PI negative. Cells that are in late apoptosis, or already dead are both Annexin V FITC and PI positive.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and chemical characterization

Copper(II)-complexes with S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid, [Cu₂(S-alkyl-thiosal)₄(H₂O)₂], were obtained by the direct reaction of copper(II)-nitrate with the S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid (in a molar ratio of 1:2) in water solution (Scheme 2), as described earlier [20]. Based on the content of the complex and the shape of their infrared spectra, it can not be concluded with certainty how S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid are coordinated to copper(II)-ion. The proper molecular structure was

obtained on the basis of X-ray analysis of [Cu₂(S-met-thiosal)₄(H₂O)₂] [20] and [Cu₂(S-et-thiosal)₄(H₂O)₂] complexes. Single crystals suitable for X-ray measurements were obtained by slow crystallization from a water solution. Based on crystal structures of the [Cu₂(S-met-thiosal)₄(H₂O)₂] and [Cu₂(S-et-thiosal)₄(H₂O)₂] complexes, it can be assumed that the other complexes have the binuclear molecular structure.

3.2. Structural description of the complex [Cu₂(S-et-thiosal)₄(H₂O)₂], (**C3**)

The single-crystal X-ray analysis showed that **C3** crystallizes in the triclinic *P*-1 space group. The crystal structure is built out of centrosymmetric, dinuclear complex molecules where the pairs of Cu(II) are bridged by four S-ethyl-thiosalicylate ligands forming the *paddle-wheel* type structure (Fig. 1). The Cu ... Cu distance of 2.611(1) is similar to 2.614 Å found in dimeric copper(II)-acetate [33]. In **C3** the Cu(II) is placed in a distorted square-pyramidal environment (Table 2), formed by oxygen atoms of carboxylate ligands in the basal plane, and water ligand in the apical position. Copper(II)-ion is displaced from the plane of the square base for 0.195(1) Å. The geometrical features of **C3** could be closely compared with those reported for Cu(II)-complex with S-methyl-thiosalicylate derivative, **C2** [20] containing two crystallographically independent molecules in the asymmetric unit. The Cu–O coordination bond lengths in **C3** are within the ranges observed in the independent molecules of structure **C2**. Similarly to the previous structure, each of thiosalicylate ligands (A and B, Fig. 1) shows unsymmetrical coordination to Cu(II)-ion. Thus, for two ligands of **C3** the Cu–O1 is longer than Cu–O2 bond for 0.028 Å in average (Table 2), while in **C2** the analogue coordination bonds in two independent molecules differ for 0.011 and 0.025 Å in average. The water oxygen atom in **C3** is placed at somewhat shorter distance from Cu(II)-ion [2.135(1) Å] in comparison to **C2** [2.146 Å in average]. Due to the free rotation around the single C1–C2 bonds in both ligands [1.502(2) and 1.502(3) Å in A and B, respectively], the dihedral angles between the planes of phenyl ring C2/C7 and carboxylate group are 16.0(2) and 16.6(2)° in A and B, respectively. For complex **C2**, with two independent molecules, the variation in these dihedral angles is more pronounced and it ranges from 5.8(2) to 24.3(2)°. It should be noticed that S-ethyl moieties in both ligands of **C3** are nearly coplanar with the phenyl rings with maximal deviation of terminal C9 atoms of 0.142(5) and 0.154(6) Å in A and B ligands, respectively.

In the crystal packing the molecules of **C3** are connected into a chain by two pairs of the O1w–H ... O1 hydrogen bonds which involve axially coordinated water molecule as a donor and two carbonyl oxygen atoms as acceptors (Table 3, Fig. S1). The chain of molecules involving similar donor and acceptor groups, which is also found in compound **C2**, appears to be rather common structural motif of *paddle-wheel* Cu(II)-complexes heaving the water molecule as axial ligand. In our previous paper [20] we analyzed the crystal structures of 26 similar [Cu₂(ArCOO)₄(H₂O)₂] (ArCOO is any aromatic carboxylate ligand) extracted from Cambridge Structural Database [34] in order to understand the factors influencing the deformation of the corresponding Cu₂C₄O₈ *paddle-wheel* cores. We found that 16 structures form similar chain of molecules via O1w–H ... O interactions between the water and carboxylate ligands. In such arrangement the deformation of *paddle-wheel* cores mainly arises i) from the engagement of the carboxylate O atoms as acceptors in hydrogen bonds and also ii) from the tendency of the closely adjacent and substituted phenyl rings to avoid the steric hindrance, particularly if their rotation is partly reduced. The Cu₂C₄O₈ core in **C3** is also noticeable distorted, as two Cu1–O1–C1 angles (118° in average) involving O1 acceptors of O1w–H ... O1 are

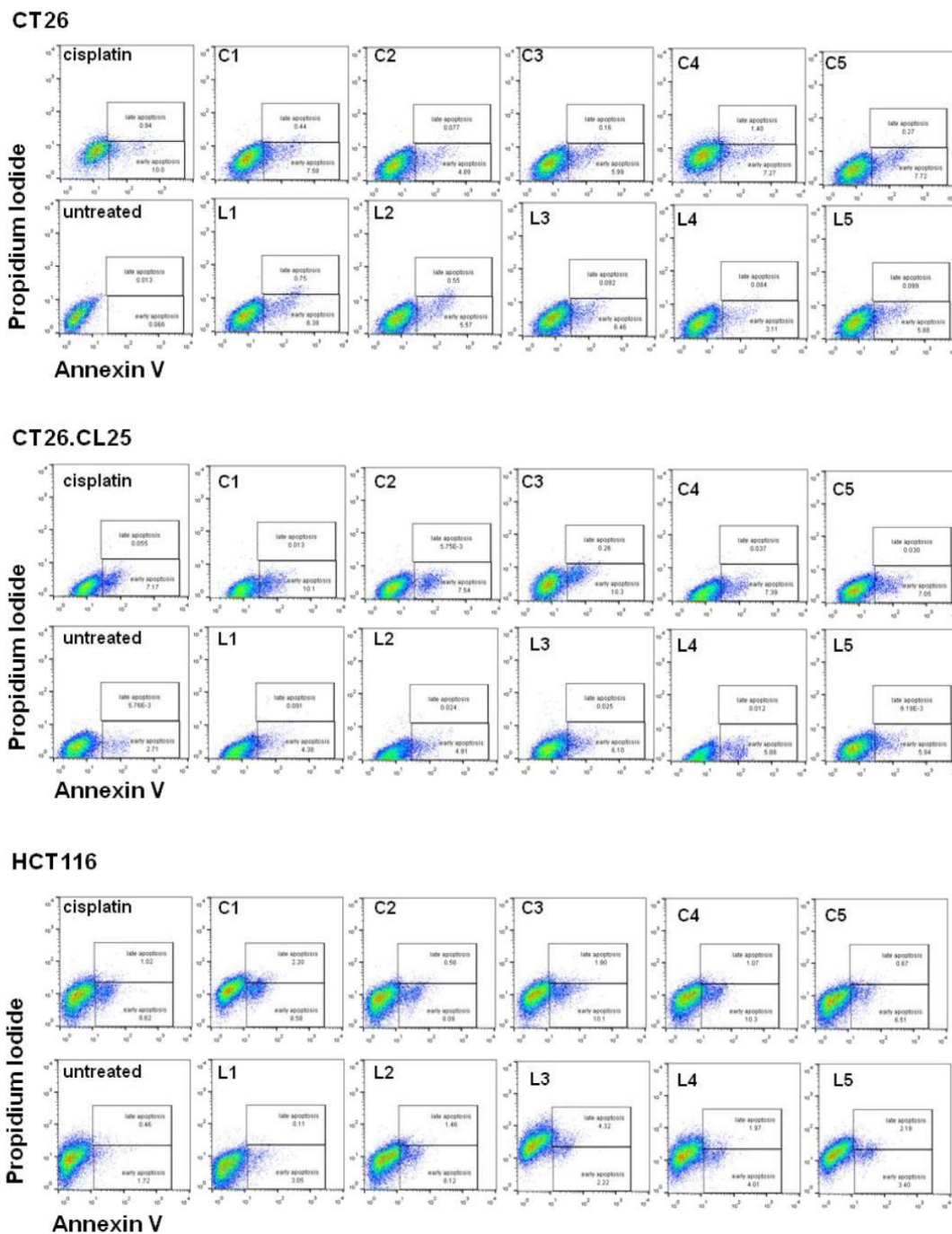


Fig. 3. Representative results of apoptotic assay of CT26, CT26.CL25, and HCT-116 cells treated with 15 μ M of cisplatin, copper(II)-complexes and ligand precursors for 24 h.

significantly smaller in comparison to angles Cu1–O2–C2 (128° in average).

In the chain the O1w–H ... O1 hydrogen bonds are assisted by the pairs of weaker O1w–H ... S1 and C9–H ... O2 interactions which also engage the acceptor and donor sites from the phenyl S-ethyl substituents (Fig. S1). It can be suggested that these interactions partly reduce the rotation of the *ortho*-substituted phenyl rings with respect to the corresponding carboxyl groups. Apart from the pair of C9–H ... O2 interactions no additional significant contacts can be found for the O2 acceptors. In the chain, the closest distance between the Cu(II) ions of the linked molecules is 5.117(1) Å, similarly to the distance found for **C2** (5.122(2) Å). The neighboring chains of **C3** are further connected by pairs of C–H ... π interactions involving the phenyl rings from both aromatic ligands (Table 3). Figs. S2 and S3 display the fragments of this two-dimensional molecule arrangement as viewed down *a* and *c* axis, respectively.

3.3. In vitro cytotoxic activity

The MTT assay for cell viability shows that five newly synthesized precursor S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid, and their corresponding copper(II)-complexes after 72 h exhibit relevant cytotoxic activity on human colon carcinoma cells, HCT-116 (Fig. 2), with significantly lower activity on murine colon carcinoma cell lines especially for concentrations from 31.25–250 μ M. The cytotoxic effect was dose-dependent: the decrease of concentration of the tested complexes was followed by marked increase of tumor cell viability. Cytotoxic effect of all tested ligands and complexes was stronger on HCT116 cell line compared to CT26 and CT26.CL25 cell lines. Copper(II)-complexes showed similar, slightly lower, cytotoxicity on human HCT116 cells compared with cisplatin. However cytotoxic effect of new copper(II)-complexes from concentrations 31.25–250 μ M on murine cell lines CT26 and CT26.CL25 was significantly lower compared to the activity of cisplatin. There was almost no differences in the cytotoxicity of ligands and complexes on two murine cell lines CT26 and CT26.CL25.

Among the tested ligand precursors the ligands with shorter alkyl side chain, **L1**, **L2**, and **L3** showed higher cytotoxic effect on CT26 and CT26.CL25 tumor cells (Fig. 2) compared to the ligands with longer alkyl side chains, **L4** and **L5**. Ligands **L4** and **L5** showed an important cytotoxic effect only at the higher concentrations (from 500 μ M to 1000 μ M). Such difference was not observed on HCT116 cell line. However, there was no striking difference in cytotoxic effect of all five tested complexes on all three tumor cell lines (Fig. 2).

All the tested complexes had lower cytotoxic effect on tumor cells after their exposure to complexes for 72 h when compared to cisplatin (Table 4). The analysis of IC₅₀ values showed that copper(II)-complexes had significantly stronger anti-proliferative effect on HCT116 cells compared to CT26 and CT26.CL25 cells (Table 4). Complexes **C1**, **C2**, and **C3** had lower cytotoxic effect towards CT26 and CT26.CL25 cells compared with **C4** and **C5** (Table 4). However, the greater difference in cytotoxicity on these two cell lines between the ligand and the corresponding complex was observed for complexes with longer side chains **C4** and **C5**. Copper(II)-complex **C1** and **C5** had almost the same cytotoxicity towards HCT116 cells (IC₅₀ = 60.17 μ M vs 59.32 μ M). Other three complexes had slightly lower cytotoxic effect on HCT116 cells, with the lowest effect of complex **C4** (IC₅₀ = 91.51 μ M) (Table 4).

Flow cytometry analysis was used to determine the potential for induction of apoptotic death of tested copper complexes. The percentage of apoptotic CT26, CT26.CL25, and HCT116 cells after treatment with copper complexes was determined by flow cytometric detection of Annexin V+ Propidium Iodide+ cells. Our results

indicate that tested complexes after 24 hours induce apoptotic death of CT26, CT26.CL25, and HCT116 cells, higher in comparison with corresponding ligands (Fig. 3). Mostly similar cytotoxic effects of all tested complexes and cisplatin (concentration 15 μ M) on all three cell lines was detected. This finding is in correlation with the results of cytotoxic effects of complexes with the same concentration (15 μ M) after 72 hours exposure measured by MTT assay.

4. Conclusion

Synthesized S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid, and their corresponding copper(II)-complexes demonstrated relevant cytotoxic activity on human colon carcinoma cells, HCT-116, with significantly lower activity on murine colon carcinoma cell lines. Cytotoxic effect of all the tested compounds was stronger on HCT116 cell line compared to CT26 and CT26.CL25 cell lines. Copper(II)-complexes showed slightly lower cytotoxicity on human HCT116 cells compared to cisplatin. Cytotoxic effect of new copper(II)-complexes on murine cell lines CT26 and CT26.CL25 was significantly lower compared to activity of cisplatin.

The spectroscopically predicted structure of the obtained copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid was confirmed by X-ray analysis. The crystal structure is built out of centrosymmetric, dinuclear complex molecules where the pairs of Cu(II) are bridged by four S-ethyl-thiosalicylate ligands forming the *paddle-wheel* type structure. In the crystal packing the molecules are connected into a chain by two pairs of the O1w–H ... O1 hydrogen bonds which involve axially coordinated water molecule as a donor and two carbonyl oxygen atoms as acceptors.

Acknowledgment

This work was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Projects 172016, 172034, 172035, 175069 and 175103) and Faculty of Medical Sciences for grant MP 2014/01.

Appendix A. Supplementary data

CCDC 1430504 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Appendix B. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.03.058>.

References

- [1] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Med. Res. Rev.* **30** (2010) 708.
- [2] C. Duncan, A.R. White, *Metallomics* **4** (2012) 127.
- [3] S. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chem. Rev.* **114** (2013) 815.
- [4] N. Gokhale, S. Padhye, D. Rathbone, D. Billington, P. Lowe, C. Schwalbe, C. Newton, *Inorg. Chem. Commun.* **4** (2001) 26.
- [5] D. Palanimuthu, S.V. Shinde, K. Somasundaram, A.G. Samuelson, *J. Med. Chem.* **56** (2013) 722.
- [6] I. Iakovidis, I. Delimaris, S.M. Piperakis, *Mol. Biol. Int.* **2011** (2011) 59452.
- [7] G.J. Brewer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2003) 207.
- [8] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, *Anticancer Agents Med. Chem.* **9** (2009) 185.
- [9] M. Gielen, E.R. Tiekink, *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents: the Use of Metals in Medicine*, Wiley, Chichester, 2005, p. 219.

- [10] Z. Trávníček, M. Maloň, Z. Sindelář, K. Doležal, J. Ročák, V. Krystof, J. Marek, *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 23.
- [11] V. Milacic, D. Chen, L. Giovagnini, A. Diez, D. Fregona, Q.P. Dou, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 231 (2008) 24.
- [12] P. Szymański, T. Frączek, M. Markowicz, E. Mikiciuk-Olasik, *Biomaterials* 25 (2012) 1089.
- [13] A. Kumar Chhakar, L. Rai Kakkar, *Fresenius J. Anal. Chem.* 347 (1993) 483.
- [14] G.R.E.C. Gregory, P.G. Jeffery, *Analyst* 92 (1967) 293.
- [15] M.J. Gismera, J.R. Procopio, M. Teresa-Sevilla, L. Hernández, *Electroanalysis* 15 (2003) 126.
- [16] M. Aydin, N. Arsu, Y. Yagci, *Macromol. Rapid Commun.* 24 (2003) 718.
- [17] D. Shander, G. Ahluwalia, D. Grosso, **US Patent 5411991**.
- [18] H. Jacobelli, **US Patent 20050267095**.
- [19] J. Halaschek-Wiener, Y. Kloog, V. Wacheck, B. Jansen, *J. Investigat. Dermat.* 120 (2003) 109.
- [20] M.V. Nikolić, M.Ž. Mijajlović, V.V. Jevtić, Z.R. Ratković, I.D. Radojević, L.J.R. Comić, S.B. Novaković, G.A. Bogdanović, S.R. Trifunović, *Polyhedron* 79 (2014) 80.
- [21] T. Subrahmanyam, *J. Indian Chem. Soc.* 65 (1988) 589.
- [22] Y. Anjaneyulu, R.P. Rao, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 16 (1986) 257.
- [23] E.G. Ferrer, P.A. Williams, *Polyhedron* 16 (1997) 3323.
- [24] A.M. Abdel-Mawgoud, R. Abdel-Hamid, *Monatsh. Chem.* 118 (1987) 1219.
- [25] K.A. Idriss, M.S. Saleh, M.M. Seleim, E.Y. Hashem, *J. Solut. Chem.* 22 (1993) 469.
- [26] G.P. Radić, V.V. Glodjović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, L.J.R. Comić, Z.R. Ratković, A. Valkonen, K. Rissanen, S.R. Trifunović, *Polyhedron* 31 (2012) 69.
- [27] Agilent, *CrysAlis PRO*, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England, 2013.
- [28] M.C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.* 36 (2003) 1103.
- [29] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112.
- [30] M. Nardelli, *J. Appl. Crystallogr.* 28 (1995) 659.
- [31] A.L. Spek, *J. Appl. Crystallogr.* 36 (2003) 7.
- [32] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849.
- [33] J.N. Van Niekerk, F.R.L. Schoening, *Acta Crystallogr.* 6 (1953) 227.
- [34] F.H. Allen, *Acta Crystallogr. B* 58 (2002) 380.

**CYTOTOXICITY OF PLATINUM(IV) AND PALLADIUM(II) COMPLEXES
WITH *meso*-1,2-DIPHENYL-ETHYLENEDIAMINE-*N,N'*-DI-3-PROPANOIC ACID.
CRYSTAL STRUCTURE OF [Pd(1,2-dpheddp)] COMPLEX**

**Marina Ž. Mijajlović¹, Miloš V. Nikolić¹, Verica V. Jevtić², Zoran R. Ratković², Jelena Milovanović¹,
Aleksandar Arsenijević¹, Bojana Stojanović¹, Slađana B. Novaković³, Goran A. Bogdanović³,
Srećko R. Trifunović², Gordana P. Radić^{1*}**

¹Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

²Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12,
34000 Kragujevac, Serbia

³VINČA Institute of Nuclear Sciences, Laboratory of Theoretical Physics and Condensed Matter Physics,
University of Belgrade, PO Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

vasic_gordana@yahoo.com

The syntheses of tetradentate ligand, *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid (H₂-1,2-dpheddp) and corresponding platinum(IV) and palladium(II) complexes are reported here. The spectroscopically predicted structure of the obtained palladium(II) complex was confirmed by X-ray analysis. Single crystals suitable for X-ray measurements were obtained by slow crystallization from a DMSO-water mixture. Cytotoxic effects of platinum(IV), palladium(II) complexes and *cisplatin* on the 4T1 and B16F1 cell lines were determined using the MTT colorimetric technique. The complexes showed a dose dependence on cytotoxic effect toward both cell lines. Both complexes were less active than *cisplatin*, the exception was concentrations above 62.5 μM of platinum(IV) complex in the B16F1 cell line.

Keywords: *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid; platinum(IV) complex; palladium(II) complex; crystal structure; cytotoxicity

**ЦИТОТОКСИЧНОСТ НА КОМПЛЕКСИТЕ НА ПЛАТИНА(IV) И ПАЛАДИЈУМ(II)
СО *meso*-1,2-ДИФЕНИЛ-ЕТИЛЕНДИАМИН-*N,N'*-ДИ-3-ПРОПАНОНСКА КИСЕЛИНА.
КРИСТАЛНА СТРУКТУРА НА КОМПЛЕКСОТ НА [Pd(1,2-dpheddp)]**

Во овој труд е опишана синтезата на тетрадентатниот лиганд, *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанонска киселина (H₂-1,2-dpheddp), со соодветните комплекси на платина(IV) и паладиум(II). Спектроскопски предвидената структура на добиениот комплекс на паладиум(II) е потврдена со рендгенска структурна анализа. Монокристалите соодветни за рендгенските испитувања се добиени со бавна кристализација од воден раствор на DMSO. Цитотоксичните ефекти на комплексите на платина(IV) и на паладиум(II) врз 4T1 и B16F1 типови на клетки се определени со MTT колориметрија и споредени со соодветните ефекти на *cisplatin*. Двата комплекса покажаа дозирачки зависен цитотоксичен ефект врз двата типа клетки. Двата комплекса покажаа послаба активност од онаа на *cisplatin*, со исклучок на повисоките концентрации (над 62,5 μM) на комплексот на платина(IV) спрема клетките B16F1.

Клучни зборови: *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанонска киселина; платина(IV) комплекс; паладиум(II) комплекс; кристална структура; цитотоксичност

1. INTRODUCTION

Since the seventies, when *cisplatin* with anti-tumor activity was discovered by Rosenberg and co-workers [1, 2], thousands of platinum complexes have been synthesized in order to obtain a new platinum(IV) compound with improved properties in comparison to the parent drug *cisplatin* [3–5]. Platinum(IV) compounds are more inert than platinum(II) species and this property may allow oral usage. Jolley *et al.* [6] reported the synthesis and cytotoxicity of several platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine derivatives, including the complex with the ethylenediamine-*N,N'*-diacetate ligand. The latter complex can be considered a variant of JM-216, having the carboxylate groups bonded to the amine ligands. The authors found that complexes of the type [PtCl₂(edda)] were less active than JM-216 (JM-216 is pharmaceutical abbreviation for the *trans,cis,cis*-diacetato-dichlorido-amminocyclohexylammino-platinum(IV)-complex, *trans,cis,cis* [Pt(CH₃COO)₂Cl₂(NH₃)(c-C₆H₁₁NH₂)] [6].

Natile and co-workers investigated how the substitution of edda with eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate ion) influenced their biological activity and concluded that eddp-Pt(IV) had lower activity than corresponding edda-Pt(IV) complex [7]. They supposed this fact due to the different complex geometry, *s-cis* in the case of edda and *trans* in the case of eddp.

We wanted to extend the investigation of platinum complexes with ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate derivatives. The initial idea of this work was to prepare a new linear edda-like ligand, *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid and corresponding platinum(IV) complexes in *s-cis* and/or *trans* geometries. In all of our attempts we prepared only the *s-cis* geometrical isomer, with a low solubility in water and common organic solvents.

The preparation and spectral characterization of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid and corresponding platinum(IV) and palladium(II) complexes were published earlier [8] using the same method as Liu [9]. In the present study, palladium(II) complex with *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid was characterized by X-ray analysis.

The aim of this paper is to synthesize palladium(II) and platinum(IV) complexes and research their cytotoxic effects *in vitro*.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials and measurements

The reagents were obtained commercially and used without further purification. Elemental analyses

were done on a Vario III CHNOS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme GmbH.

2.2. Syntheses

2.2.1. Preparation of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine, 1,2-dphen

The *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine was prepared according to the procedure described earlier [10]. Benzaldehyde (30.00 g) was refluxed with ammonium-acetate (60.00 g) for 3 h. The reaction mixture was cooled and the product was filtered and washed with ethanol. After recrystallization from 1-butanol *N*-benzoyl-*N'*-benzylidene-*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine was obtained. Hydrolysis of that compound with 70% sulfuric acid under reflux for 1 h produced *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine as the basic product of hydrolysis.

2.2.2. Preparation of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride-monohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O

3-Chloro-propanoic acid (4.34 g, 0.04 mol) was dissolved in 5.0 ml of water on ice and carefully neutralized with cold water solution of 5.0 ml NaOH (1.60 g, 0.04 mol). *Meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine (4.24 g, 0.02 mol) was added to this solution. The mixture was stirred for 4 h at 90°C, and during this period 5.0 ml NaOH water solution (1.60 g, 0.04 mol) was introduced. After that, 5.6 ml of 6 mol/l HCl was added and the resulting solution was evaporated to the volume of 7.0 ml; 6.0 ml *conc.* HCl, 6.0 ml of ethanol and 6.0 ml of ether were added to the mixture. The white precipitate of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride monohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O was separated by filtration and refined with solution water:ethanol = 1:2. Yield: 4.00 g, 44.69%. Anal. Calcd. for H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O = C₂₀H₂₈Cl₂N₂O₅ (*M_r* = 447.344): C, 53.69; H, 6.31; N, 6.28. Found: C, 53.88; H, 6.70; N, 6.08.

2.2.3. Preparation of *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-platinum(IV), *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)]

Potassium-hexachloridoplatinate(IV) (0.2000 g, 0.411 mmol) was dissolved in 10.0 ml water on a steam bath and *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride

monohydrate (0.1839 g, 0.411 mmol) was added. The reaction mixture was heated for 12 h; during this period, 10.0 ml of LiOH water solution (0.0394 g, 1.65 mmol) was added in small portions and the solution was filtered and evaporated to a small volume. The orange precipitate of *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] was separated by filtration, washed with cold water and air-dried. Yield: 0.095 g, 37.25%. Anal. Calcd. for *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] = C₂₀H₂₆Cl₂N₂O₄Pt (*M_r* = 620.396): C, 38.72; H, 3.57; N, 4.52. Found: C, 38.38; H, 3.81; N, 4.60.

2.2.4. Preparation of (meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate) palladium(II) complex trihydrate, [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O

K₂[PdCl₄] (0.2000 g, 0.613 mmol) was dissolved in 10.0 ml of water on a steam bath and meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride monohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O (0.2742 g, 0.613 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h and during this period water solution of LiOH (0.059 g, 2.452 mmol in 10.0 ml of water) was introduced. The complex [Pd(1,2-dpheddp)], as a yellow precipitate, was filtered, washed with cold water and air-dried. Yield: 0.25 g, 79.11%. Anal. Calcd. for [Pd(1,2-dpheddp)] = C₂₀H₂₈N₂O₇Pd (*M_r* = 514.864) (%): C, 46.65; H, 5.48; N, 5.44. Found: C, 46.64; H, 5.87; N, 5.31.

2.3. X-ray experiment

The diffraction data from a selected single crystal of [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O were collected at room temperature with an Oxford Diffraction Xcalibur Gemini S diffractometer equipped with CuK α radiation (λ = 1.5418 Å). Data were processed with CRYSTALIS software and corrected for absorption by numerical absorption correction method based on Gaussian integration over a multifaceted crystal model [11]. Crystal structure was solved by direct methods, using SHELXS [12] and refined using the SHELXL program [12].

Hydrogen atoms belonging to water molecules were located in different Fourier maps and refined as riding, with O—H = 0.85 Å and $U_{iso}(H)$ = 1.2 $U_{eq}(O)$. Hydrogen atoms attached to carbon and nitrogen atoms in the complex molecule were placed at geometrically calculated positions with C—H distances fixed to 0.98, 0.97 and 0.93 Å from methine, methylene and phenyl C atoms, respectively, and N—H distances fixed to 0.91 Å. The

corresponding isotropic displacement parameters of the hydrogen atoms were equal to 1.2 U_{eq} of the parent C and N atoms. The PARST [13] program was used to perform geometrical calculation and the program ORTEP [14] was employed for molecular graphics. The crystallographic data are listed in Table 1.

Table 1

Crystallographic data for [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O

Empirical formula	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₇ Pd
Formula weight	514.84
Color, crystal shape	Yellow, prism
Crystal size (mm ³)	0.38 × 0.23 × 0.14
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	1.5418
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>Pna</i> 2 ₁
Unit cell dimensions:	
<i>a</i> (Å)	20.8248(5)
<i>b</i> (Å)	8.9226(2)
<i>c</i> (Å)	11.2833(2)
<i>V</i> (Å ³)	2096.57(8)
<i>Z</i>	4
<i>D</i> _{calc} (Mg/m ³)	1.631
μ (mm ⁻¹)	7.534
θ range for data collection (°)	4.25 to 72.43
Reflections collected	4787
Independent reflections, <i>R</i> _{int}	2991, 0.0261
Completeness (%) to θ = 67°	100.0
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Data / restraints / parameters	2991 / 1 / 295
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.057
Final <i>R</i> ₁ / <i>wR</i> ₂ indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0.0283/0.0684
Absolute structure parameter [15]	-0.021(9)
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.490 -0.535

2.4. In vitro cytotoxicity studies

2.4.1. Preparation of drug solutions

Platinum complexes were dissolved in dimethylsulfoxide at a concentration of 20 mM and filtered through a 0.22 mm millipore filter. These stock solutions were diluted in culture medium immediately before use MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was dissolved (5 mg/ml) in phosphate-buffered saline with a pH of 7.2, and filtered through the 0.22 mm millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

2.4.2. Cell lines

The mouse breast tumor cell line 4T1 and mouse malignant melanoma cell line B16F1 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin G and 100 mg/ml streptomycin.

2.4.3. Assessment of cytotoxicity

Cytotoxic effects of platinum(IV) and palladium(II) complexes and cisplatin on 4T1 and B16F1 cell lines were determined using the MTT colorimetric technique [16]. The cells were diluted with medium to $5 \cdot 10^4$ cells/ml and aliquots ($5 \cdot 10^3$ cells/100 μ l) were placed in individual wells in 96-multiplates. Approximately 24 h after cell adherence, the medium was exchanged with 100 μ M of platinum(IV) and palladium(II) complexes, or cisplatin which had been serially diluted 2-fold in medium to concentrations ranging from 500 μ M to 3.9 μ M. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 72 h. After incubation supernatant was removed, 15% MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide) (5 mg/ml in phosphate buffered saline) was added to each well and the plates were incubated for an additional 4 h. Upon incubation the cell-free supernatants were suctioned off, and DMSO (150 μ l) and glycine buffer (20 μ l) were added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 minutes. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = $100 - ((TS - BG0) - E) / (TS - BG0) \times 100$, where "BG0" stands for background of medium alone, "TS" for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and "E" for experimental well.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Potassium-hexachloridoplatinate(IV) and potassium-tetrachloridopalladate(II) react with *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride monohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O in aqueous solution in the presence of lithium hydroxide to give the *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-platinum(IV), *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] and (*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)palladium(II) complex, [Pd (1,2-dpheddp)] respectively.

In the case of platinum(IV) complex with two additional monodentate ligands the linear edda-type tetradentate ligands can occupy four of the sites around a central metal ion.

3.1. Crystal and molecular structure of [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O

The crystal structure of [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O was determined by single-crystal X-ray analysis. The complex molecule together with the atom-labelling scheme is presented in Figure 1. The selected geometric parameters are listed in Table 2.

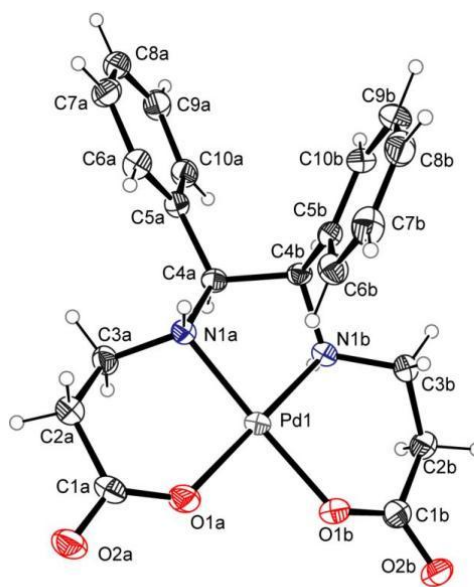


Fig. 1. Molecular structure and atom-numbering scheme of [Pd(1,2-dpheddp)]. Displacement ellipsoids are drawn at 30% probability level

The asymmetric unit consists of neutral complex molecule and three molecules of co-crystallized water. The 1,2-dpheddp ligand has two halves that are equivalent in composition and labelled in the following text as fragments A and B. The central palladium atom is placed in a deformed square-planar environment formed by two *N* and two *O* donor atoms of tetradentate eddp derivative. In this coordination, atoms Pd1, O1a, O1b, N1a and N1b deviate from the corresponding mean plane by $-0.008(2)$, $0.053(2)$, $-0.050(2)$, $-0.049(2)$ and $0.054(2)$ Å, respectively. The coordination bonds belonging to A and B fragments (Table 2)

show a noticeable difference in lengths which is more prominent for two Pd–N bonds (0.04 Å). The rest of the equivalent bonds in A and B halves of the molecule agree within the standard deviation limits. The coordination angles deviate from the ideal value of 90° by 4° on average.

Table 2

Selected bond lengths (Å) and angles (°) for [Pd(1,2-dpheddp)]. The values for two equivalent halves of the molecule are given in two columns labelled A and B.

Bond	A	B
Pd1–O1	2.004(4)	2.023(3)
Pd1–N1	2.041(4)	2.004(4)
N1–C3	1.490(5)	1.471(5)
N1–C4	1.482(5)	1.498(6)
C1–C2	1.534(7)	1.530(9)
C2–C3	1.515(7)	1.506(6)
O2–C1	1.233(6)	1.241(6)
C4–C5	1.521(6)	1.519(6)
C4a–C4b	1.537(6)	
Angle		
O1–Pd1–N1	94.98(14)	93.47(15)
C3–N1–Pd1	109.4(3)	115.5(3)
C1–O1–Pd1	128.7(3)	128.6(4)
N1–C3–C2	112.9(4)	110.6(4)
C1–C2–C3	118.7(4)	115.9(4)
O1a–Pd1–O1b	86.57(15)	
N1a–Pd1–N1b	85.12(15)	
O1a–Pd1–N1b	176.47(16)	
O1b–Pd1–N1a	177.25(14)	
N1a–C4a–C4b	108.2(4)	
N1b–C4b–C4a	102.9(3)	

According to the Cambridge Structural Database (CSD, Version 5.33 of 2012) [17], the present crystal structure is the only example of a palladium(II) complex with eddp derivative. In the case of the other metal atoms, there are two octahedral complexes of platinum(IV) [18, 19] and square-pyramidal complex of copper(II) with unmodified eddp ligand [20]. As previously observed in the complexes comprising propionate-chelates [18–21] the six-membered chelate rings of [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O are essentially planar in their carboxylate parts and puckered in their amino parts.

Two six-membered chelate rings in the present crystal structure exhibit some noteworthy structural differences. Regarding the mean plane defined by Pd1/O1/C1/C2 (r.m.s. of fitted atoms is 0.009 Å in both molecular halves), the atoms N1 and C3 significantly deviate *i.e.* to opposite sides of the mean plane for –0.250(8) and 0.528(9) Å in fragment A and to the same side of the mean plane for –0.153(7) and –0.801(8) Å in fragment B. The O1–C1–C2–C3 torsion angle has the values of 25.7(8) and 34.1(6)° in the fragments A and B respectively. The significant difference is also observed between the Pd–N1–C3 angles [109.4(3) and 115.5(5)° in A and B fragments, respectively], while the equivalent bonds in two chelate rings have similar lengths (Table 2).

The five-membered ring of the complex can be described as twisted on the C4a–C4b bond. Each of the C4 atoms attaches a phenyl substituent which takes equatorial and axial position in A and B parts of the ethylenediamine ring, respectively. This is described by torsion angle Pd1–N1–C4–C5, with corresponding values of –173.0(3) and 81.8(4)°. The presence of voluminous phenyl substituents with dissimilar orientation induce the noticeable difference between N1a–C4a–C4b and N1b–C4b–C4a angles [108.2(4) and 102.9(3)°]. In the complexes comprising unmodified eddp ligand [18–20], the distribution of the angles within the ethylenediamine fragment is more consistent (from 106.3 to 108.2°, not including the chelate angle).

The two phenyl rings in [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O are mutually inclined, forming the dihedral angle of 56.8(2)°. Although C4–C5 single bonds allow for free rotation, the axially positioned phenyl ring takes specific orientation with C6b–H6b group clearly directed towards Pd atom. The torsion angle Pd1–C4b–C5b–C6b has the value of –1.34(5)°, while H6b...Pd1 distance of 2.63 Å is significantly shorter than the sum of corresponding Van der Waals radii (3.50 Å).

In general, the molecules of co-crystallized water have the most important role in the extensive, three-dimensional hydrogen bonding network of [Pd(1,2-dpheddp)]·3H₂O (Table 3). Each complex unit interacts with six-molecules of co-crystallized water, where the water molecules serve either as donors toward the carboxylate O atoms or as acceptors engaging the N–H groups. The crystal structure is also stabilized by means of weak C–H...O and C–H... π .

Table 3

Hydrogen bonds and C–H... π interactions (\AA , $^\circ$)

D–H...A	D–H	D...A	H...A	D–H...A
N1a–H1a...O1w ⁱ	0.91	3.003(5)	2.12	163
N1b–H1b...O2w ⁱ	0.91	2.824(7)	1.94	163
O1w–H2w...O2a ⁱⁱ	0.85	2.760(6)	1.98	153
O2w–H3w...O3w ⁱⁱ	0.85	2.796(7)	1.95	171
O2w–H4w...O2b ⁱⁱⁱ	0.85	3.010(6)	2.19	160
O2w–H4w...O1b ⁱⁱⁱ	0.85	3.186(7)	2.49	139
O3w–H6w...O2b ^{iv}	0.85	2.918(9)	2.13	155
O3w–H5w...O1a ⁱⁱⁱ	0.85	3.113(7)	2.33	154
C–H... π	C–H	H...Cg	H...Perp	C–H...Cg
C2a–H2a1...Cg2 ^v	0.97	3.33	3.10	116
C3b–H3b1...Cg1 ^{iv}	0.97	2.97	2.97	126
C8a–H8a...Cg2 ^{vi}	0.93	3.07	2.99	121

Cg1 and Cg2 are centroids of phenyl rings in A and B fragments, respectively. Symmetry codes: (i) x, y, z; (ii) $-x+1, -y, z-1/2$; (iii) $-x+3/2, y-1/2, z-1/2$; (iv) x, y-1, z; (v) $-x+1, -y, z-1/2$; (vi) x, y+1, z.

3.2. *In vitro* cytotoxic activity

In order to investigate the *in vitro* cytotoxic potential of platinum and palladium complexes, various concentrations of complexes were added to target cells and the cell viability was determined after 72 h by MTT assay. The complexes showed a dose-dependence on cytotoxic effect toward both cell lines (Fig. 2 and Fig. 3). Platinum(IV) complex showed a higher cytotoxic effect compared to palladium complex on both cell lines. Both complexes were less active than cisplatin, except at concentrations of the platinum complex above 62.5 μM on the B16F1 cell line. Taking into consideration standard deviations, IC_{50} values for the B16F1 cell line were approximately the same (Pt–223.38 \pm 25.12, Pd–157.51 \pm 14.09, *cisplatin*–186.63 \pm 28.11).

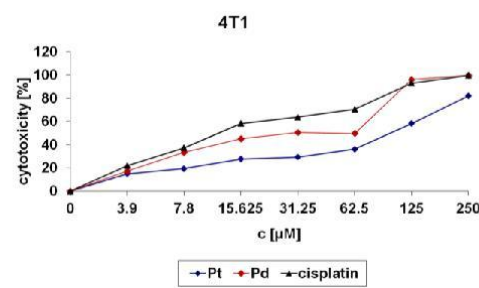


Fig. 2. Cytotoxicity of investigated complexes and cisplatin on 4T1 cells. Cytotoxicity was determined by MTT assay after 72 hours exposure to selected complexes. Data are presented as the means from three independent experiments.

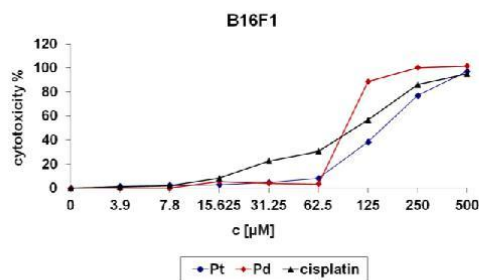


Fig. 3. Cytotoxicity of investigated complexes and cisplatin on B16F1 cells. Cytotoxicity was determined by MTT assay after 72 hours exposure to selected complexes. Data are presented as the means from three independent experiments.

The platinum complex showed a significantly higher cytotoxic effect on 4T1 cells (IC_{50} –144.69 \pm 55.3) in comparison to the palladium complex (IC_{50} –31.94 \pm 13.38) and *cisplatin* (IC_{50} –17.34 \pm 2.25) (Fig. 4 and Fig. 5).

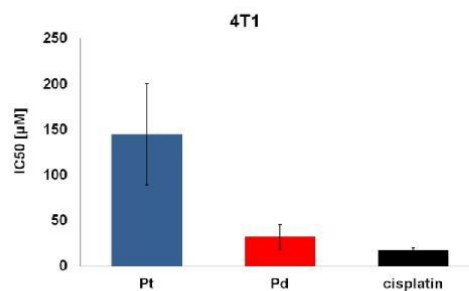


Fig. 4. IC_{50} (μM) for the 72 h of action of investigated compounds on 4T1 cells, determined by MTT assay

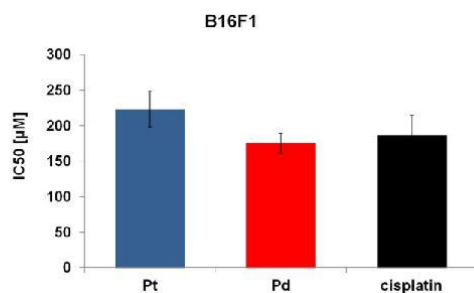


Fig. 5. IC₅₀ (µM) for the 72 h of action of investigated compounds on B16F1 cells, determined by MTT assay

4. CONCLUSION

In this paper, we reported the cytotoxicity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid and the crystal structure of the [Pd(1,2-dpheddp)] complex. Palladium(II) complex was crystallized in the form of the trihydrate. The cytotoxic effects of platinum(IV), palladium(II) complexes and cisplatin on 4T1 and B16F1 cell lines were determined using the MTT colorimetric technique. In general, investigated complexes were less active than *cisplatin*, except for the concentrations of platinum(IV) complex above 62.5 µM on the B16F1 cell line.

Acknowledgments. This work was supported by Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia, Projects No 172016, 172034, 172035, ON175069, ON175071, ON175103.

Appendix A. Supplementary data CCDC 930631 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

REFERENCES

- [1] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature*, **222**, 385–386 (1969).
- [2] B. Rosenberg, L. VanCamp, The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds, *Cancer Res.*, **6**, 1799–1802 (1970).
- [3] E. Wong, C. M. Giandomenico, Current status of platinum-based antitumor drugs, *Chem Rev.*, **99**, 2451–2466 (1999).
- [4] B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, VHCA/Wiley-VCH, Weinheim, 1999, pp. 497.
- [5] G. Natile, M. Coluccia, Current status of *trans*-platinum compounds in cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.*, **216**, 383–410 (2001).
- [6] J. N. Jolley, A. I. Yanovsky, L. R. Kelland, K. B. Nolan, Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL₄Cl₂]·H₂O where L₄ is ethylenediamine-*N,N'*-diacetate, *J. Inorg. Biochem.*, **83**, 91–100 (2001).
- [7] T. J. Sabo, G. N. Kaluđerović, D. Poletić, Lj. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionato ligand, *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1378–1384 (2004).
- [8] G. P. Radić, V. V. Glođović, Z. R. Ratković, S. B. Novaković, S. G. Granda, L. Roces, L. M. Taboada, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid – Crystal structure of H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O, *J. Mol. Struct.*, **1029**, 180–186 (2012).
- [9] C. F. Liu, C. H. Liu, Some homo- and heteropolynuclear chelates, *Inorg. Chem.*, **3**, 678–680 (1964).
- [10] S. J. Tripett, Notes, *Chem. Soc.*, 4407 (1957).
- [11] CrysAlisPro, Version 1.171.36.24, Oxford Diffraction Ltd. Abington, England, 2012.
- [12] G. M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr.*, **A64**, 112–122 (2008).
- [13] M. Nardelli, Parst: A system of fortran routines for calculating molecular structure parameters from results of crystal structure analyses, *Comput. Chem.*, **7**, 95–98 (1983).
- [14] L. J. Farrugia, ORTEP-3 for Windows – A version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.*, **30**, 565 (1997).
- [15] H. D. Flack, On enantiomorph-polarity estimation, *Acta Crystallogr.*, **A39**, 876–881 (1983).
- [16] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, **65**(1–2), 55–63 (1983).

- [17] F. H. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr.*, **B58**, 380–388 (2002).
- [18] G. N. Kaluderović, G. A. Bogdanović, T. J. Sabo, Synthesis and crystal structure of *trans*-dichloro(ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionato) platinum(IV) monohydrate, *J. Coord. Chem.*, **55**, 817–822 (2002); T. J. Sabo, G. N. Kaluderović, S. R. Grgurić-Šipka, F. W. Heinemann, S. R. Trifunović, Complex compounds of platinum(IV) and O,O-dialkyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate ligands. A structural evidence for geometry of hydrolytic product of some esters. *Inorg. Chem. Commun.*, **7**, 241–244 (2004).
- [19] T. J. Sabo, G. N. Kaluderović, D. Poletti, L.J. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionato ligand, *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1378–1384 (2004).
- [20] Z. D. Matović, G. Pelosi, S. Ianelli, G. Ponticelli, D. D. Radanović, D. J. Radanović, Square-pyramidal copper(II) complexes of linear tetradentate edda-type ligands forming six-membered rings. Molecular structures of [Cu(1,3-pdda)(H₂O)] and [Cu(eddp)(H₂O)]·3.5H₂O, *Inorg. Chim. Acta* **268**, 221–230 (1998).
- [21] S. Grubišić, M. Gruden-Pavlović, S. R. Niketić, N. Sakagami-Yoshida, S. Kaizaki, Structural characterization of the *trans*-equatorial isomer of (aqua) (ethylenediamine-*N,N,N'*-tri-propionato)chromium (III)trihydrate, [Cr(edtp)(H₂O)]·3H₂O, *Trans. Met. Chem.*, **28**, 37–42 (2003).

LATENT MURINE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION CONTRIBUTES TO EAE PATHOGENESIS

Jelena Milovanović¹, Aleksandar Arsenijević¹, Bojana Stojanović¹, Marija Milovanović¹, Stipan Jonjić², Branka Popović²,
Nebojša Arsenijević¹, Miodrag L. Lukić¹

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

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Rijeka, 51000 Rijeka, Croatia

LATENTNA INFEKCIJA MIŠJIM CITOMEGALOVIRUSOM IMA ULOGU U PATOGENEZI EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA

Jelena Milovanović¹, Aleksandar Arsenijević¹, Bojana Stojanović¹, Marija Milovanović¹, Stipan Jonjić², Branka Popović²,
Nebojša Arsenijević¹, Miodrag L. Lukić¹

¹Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

²Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Rijeci, 51000 Rijeka, Republika Hrvatska

Received / Primljen: 15.06.2014.

Accepted / Prihvaćen: 24.06.2014.

ABSTRACT

Viral infection has been identified as the most likely environmental trigger of multiple sclerosis (MS). There are conflicting data regarding the role of cytomegalovirus (CMV) in MS pathogenesis.

We utilised experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice and murine cytomegalovirus (MCMV), the murine homolog of CMV, to examine the mechanism by which viral infection enhances autoimmune neuroinflammation. Mice subjected to latent neonatal MCMV infection developed the typical characteristics of EAE. Similar to MS, the MCMV-infected EAE-induced mice developed infiltrates in the central nervous system (CNS) composed of similar percentages of CD4+ and CD8+ T cells. The influx of both Th1 and Th17 cells into the CNS of MCMV-infected EAE-induced mice was observed. Interestingly, the development of autoimmune neuroinflammation after latent MCMV infection was accompanied by a significant influx of Tc17 cells (CD8+IL-17+ and CD8+RoRyt+) but not Tc1, cells. Our results suggest that latent MCMV infection affects the development of inflammatory lymphocytes that exhibit encephalitogenic potential, thereby mediating increased CNS pathology following EAE induction, and that CMV represents a possible environmental factor in the pathogenesis of MS and other autoimmune diseases.

Key words: EAE, viral infection, CMV, BALB/c mice

SAŽETAK

Virusna infekcija se navodi kao najverovatniji faktor okoline koji utiče na razvoj multiple skleroze (MS). Postoje konfliktni podaci o ulozi infekcije citomegalovirusom (CMV) u patogenezi multiple skleroze. Koristili smo BALB/c miševe, rezistentne na indukciju eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE), i mišji citomegalovirus (MCMV), mišji homolog humanom citomegalovirusu da ispitamo kako virusna infekcija može da utiče na razvoj autoimunske neuroinflamacije. Miševi sa latentnom neonatalnom infekcijom mišjim citomegalovirusom su razvili tipičan EAE. Slično kao u MS, MCMV EAE miševi su razvili infiltrate u centralnom nervnom sistemu (CNS) sa sličnom zastupljenošću CD4+ i CD8+ T limfocita. Uočen je influks i Th1 i Th17 ćelija u CNS MCMV EAE miševa. Interesantno je da razvoj autoimunske inflamacije nakon latentne MCMV infekcije prati značajan influks samo Tc17 (CD8+IL-17+ i CD8+RoRyt+), a ne i Tc1 ćelija. Naši rezultati ukazuju da latentna MCMV infekcija verovatno utiče na razvoj inflamatornih limfocita koji mogu da indukuju autoimunski proces u CNS-u, direktno pojačava razvoj patoloških procesa u CNS-u nakon indukcije EAE i ukazuje na CMV kao na mogući faktor okoline koji utiče na razvoj multiple skleroze i drugih autoimunskih bolesti.

Ključne reči: EAE, virusna infekcija, CMV, BALB/c miševi



UDK: 616.832-004.2-02; 616.98 / Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (4): 183-190
DOI: 10.2478/SJECR-2014-0023

Correspondence to:

Marija Milovanovic, MD, PhD; Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; Phone: +38134306800; Fax: +38134306800112; E-mail: marijaposta@gmail.com

183



INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that is characterised by varied clinical courses, pathologies, and inflammatory patterns (1). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an experimental model of multiple sclerosis that is induced in susceptible animals via active immunisation with myelin antigens mixed with an adjuvant. MS is a multifactorial disease that develops in susceptible hosts after introduction to environmental factors which trigger MS by promoting the activation of myelin-specific T cells that typically circulate in the periphery (2). The most important environmental factor considered to play a causal role in MS pathogenesis is infection (2). It has been postulated that in susceptible individuals, alterations in the mechanisms regulating the immune response to viruses may contribute to MS pathogenesis. Among the various infective agents, Epstein–Barr virus (EBV) has been the most strongly associated with increased MS risk (2). It was shown that EBV infection polarises the adaptive immune response and heightens CNS pathology following EAE induction and likely influences MS pathogenesis (3). Additionally, an elevated CD8+ T cell response to EBV lytic antigens has recently been detected in active MS and during relapses (4).

Cytomegalovirus (CMV), which is classified into the Betherpesvirinae subfamily, is a species-specific herpes virus that establishes a life-long infection in its hosts. The CMV virion contains a double-stranded DNA viral genome whose latent and lytic types of genes encode approximately 230–250 proteins, many of which play immune-regulatory roles (5). CMV initially infects epithelial cells, and after cell-associated viremia, the virus infects different cells, including fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells, and smooth muscle cells (6). CMV persists in myeloid precursor cells, from CD34+ pluripotent stem cells to CD14+ monocytes, resulting in the latent infection of these cells (7). When these cells subsequently enter the visceral parenchyma and differentiate into macrophages or myeloid dendritic cells, the latent virus reactivates into the lytic phase, which activates T cell-mediated immunity to suppress the infection, indicating that CMV infection modulates the immune response of the host.

However, studies investigating the association between CMV and MS have been inconclusive due to conflicting findings of both a protective and harmful influence of CMV on MS, likely in part as a consequence of small sample sizes. A recent well-powered meta-analysis found no significant difference in the rate of CMV seropositivity between MS patients and healthy controls based on pooled samples from all studies to date (8). However, some evidence for a protective effect of CMV infection on MS risk was found when only prospective studies were included in the analysis. However, all of these studies contain limitations, as they did not assess the temporal relationship between CMV infection and MS onset or the influence of

CMV infection at specific time points on the MS risk. In all of these studies, CMV infection was confirmed only by detecting anti-CMV antibodies without any data demonstrating the presence of CMV DNA in the cells, the expression of lytic or latent viral genes or the temporal changes in their expression during different phases of MS.

We have recently reported that BALB/c mice, which are widely accepted as resistant to EAE induction using the peptide MOG₃₅₋₅₅, developed EAE when ST2 signalling was blocked (9, 10, 11, 12). In this study, we used newborn BALB/c mice subjected to infection with MCMV to explore possible effect of latent CMV infection on EAE development.

MATERIALS AND METHODS

Infection, Induction and Scoring of EAE

Female 6- to 8-week-old BALB/c mice were used throughout this study. New-born mice 6 to 12 h post-partum were inoculated i. p. with 200 PFU of wild-type MCMV (MW97. 01 strain) or 200 μ l of phosphate buffered saline (PBS) as a control. EAE was induced via subcutaneous administration of 200 μ L of a suspension at 2 sites above the hind flanks. The suspension consisted of 300 μ g of the peptide MOG₃₅₋₅₅ (Sigma Aldrich, Germany) in 100 μ L of PBS emulsified with 100 μ L of complete Freund's adjuvant (Sigma Aldrich, Germany) containing 0.7 mg of heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). Each mouse was immediately injected intraperitoneally and 48 hours later with 300 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, USA) in 100 μ L of 0.9% NaCl. Clinical signs of EAE were assessed daily using the following scoring system as previously described: grade 0, no signs; grade 1, paralysed tail; grade 2, ataxic; grade 2.5, one hind leg paralysed; grade 3, both hind legs paralysed; grade 3.5, 3 legs paralysed; grade 4, both hind legs completely paralysed and mild front limb paralysis; and grade 5, moribund (13). The mice were monitored daily and provided with administered fluids and mashed chow at the base of the cage for all mice displaying a clinical score of 3. The mice were maintained at our animal facilities in a temperature-controlled environment under a 12-hour light/12-hour dark cycle and were provided with standard laboratory food and water *ad libitum*. All experiments were approved by and conducted in accordance with the guidelines of the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine at the University of Kragujevac in Serbia.

Isolation of Mononuclear Cells from the CNS

At day 15 post-EAE induction (mean clinical score of 3 for the MCMV-infected EAE-induced mice), the mice were perfused with PBS, and the brain and the spinal cord were carefully removed. The mononuclear cells from the CNS were isolated as described previously (14). Briefly, the brains and spinal cords were separately homogenised



in RPMI 1640 (Sigma Aldrich) containing 10% FBS and 1 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C for 60 min. After digestion, the tissue was passed through a 70 mm mesh filter, pelleted, resuspended in 10 ml of 30% Percoll (Sigma-Aldrich), overlaid onto 5 ml of 70% Percoll and centrifuged at 390 g for 20 min. The myelin layer was removed, and the mononuclear cells, which accumulated in the intermediate phase, were collected, washed twice in PBS and resuspended in medium. The total cell numbers were determined by counting using a haemocytometer, and cell viability was assessed based on Trypan blue exclusion.

Flow Cytometry

For cytofluorometry, fluorochrome-conjugated antibodies against the following proteins were used: CD4, CD8, CD45, CCR6, CXCR3, T-bet, RoRyt, IL-17, IFN- γ , and TNF- α (BD Biosciences). The cells were incubated in the antibodies in PBS containing 2% FBS for 30 min at 4°C, followed by analysis. For intracellular staining of cytokines, the cells were stimulated for 4 hours in RPMI 1640 containing 10% FBS (Gibco), GolgiPlug (BD Biosciences), 10 ng/ml PMA and 500 ng/ml ionomycin. The antibodies for the cell surface markers were added to the cells in PBS containing 2% FBS for 30 min on ice. After washing, the cells were resuspended in Fix/Perm buffer (eBiosciences) for 30–45 min on ice, washed twice and incubated in the Abs for the intracellular antigens (cytokines) in Perm buffer (for 30 min on ice). For staining of transcription factors, unstimulated cells were used. The data were acquired using a FACSCalibur (BD Biosciences) and were analysed using FlowJo software (Tree Star).

Statistical Analysis

All statistical calculations were performed using SPSS 13.0 for Windows software. The results were analysed using Student's t and the Mann-Whitney U test. The data in this study were expressed as the means+SD or the means+SEM. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

MCMV Infection of Neonatal BALB/c Mice Facilitates the Development of EAE

We have previously shown that BALB/c mice, which are resistant to EAE induction using the peptide MOG₃₅₋₅₅ (11, 12), develop EAE in the absence of ST2 signalling. Because it was shown that altering the immune response modulates the susceptibility to EAE, we aimed to explore the role of latent viral infection in EAE pathogenesis. To study the possible effect of viral infection on EAE, we analysed the clinical characteristics of EAE in BALB/c mice neonatally infected with MCMV (Fig. 1). The absence of clinical signs of EAE in these BALB/c mice was consistent with the minimal total cell number isolated from the

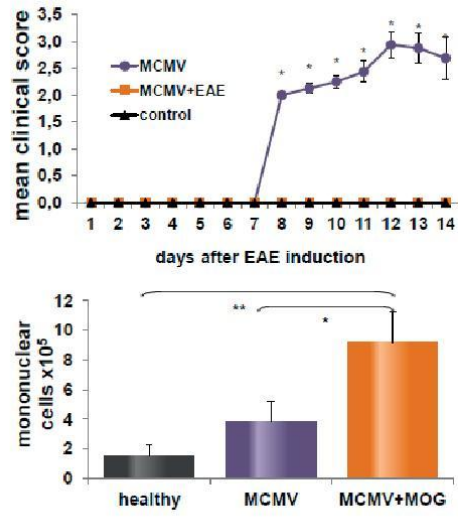


Figure 1. BALB/c mice subjected to neonatal MCMV infection are susceptible to EAE.

BALB/c mice and BALB/c mice subjected to neonatal MCMV infection were immunised with MOG₃₅₋₅₅/CFA and were monitored daily for clinical signs of EAE. The data presented were obtained from representative experiment that included eight mice per group (means \pm SEM). At the peak of EAE mononuclear cells from the spinal cord and the brain tissues were isolated, and the cells were counted after exclusion of dead cells, which were stained with Trypan blue. The total number of isolated mononuclear cells is presented as the mean \pm SD per group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$. Significance was assessed using Student's t-test.

CNS of these mice, in contrast to significant cell infiltration into the CNS of MCMV-infected BALB/c mice. The BALB/c mice subjected to neonatal MCMV infection but not to MOG₃₅₋₅₅ immunisation did not exhibit any signs of EAE but displayed a higher cell number isolated from the CNS than the BALB/c mice subjected to neonatal MCMV infection without MOG₃₅₋₅₅ immunisation.

BALB/c Mice Subjected to Neonatal MCMV Infection and EAE Display a Similar Percentage of Infiltrating CD4+ and CD8+ Lymphocytes in the CNS

To characterise the event at the level of the target tissue, we compared the cellular composition of the mononuclear cells in the three groups of mice (Fig. 2). Flow cytometric analysis revealed a significantly higher percentage of infiltrating CD45+CD4+ and CD45+CD8+ T lymphocytes in the CNS of MCMV-infected EAE-induced BALB/c mice compared with untreated BALB/c mice and with BALB/c mice subjected to neonatal CMV infection alone. Analysis of the expression of Th1- and Th17-related chemokine receptors (CXCR3 and CCR6) revealed significantly increased influx of CD4+CXCR3+ and CD4+CCR6+ T lymphocytes in the CNS of MCMV-infected EAE-induced

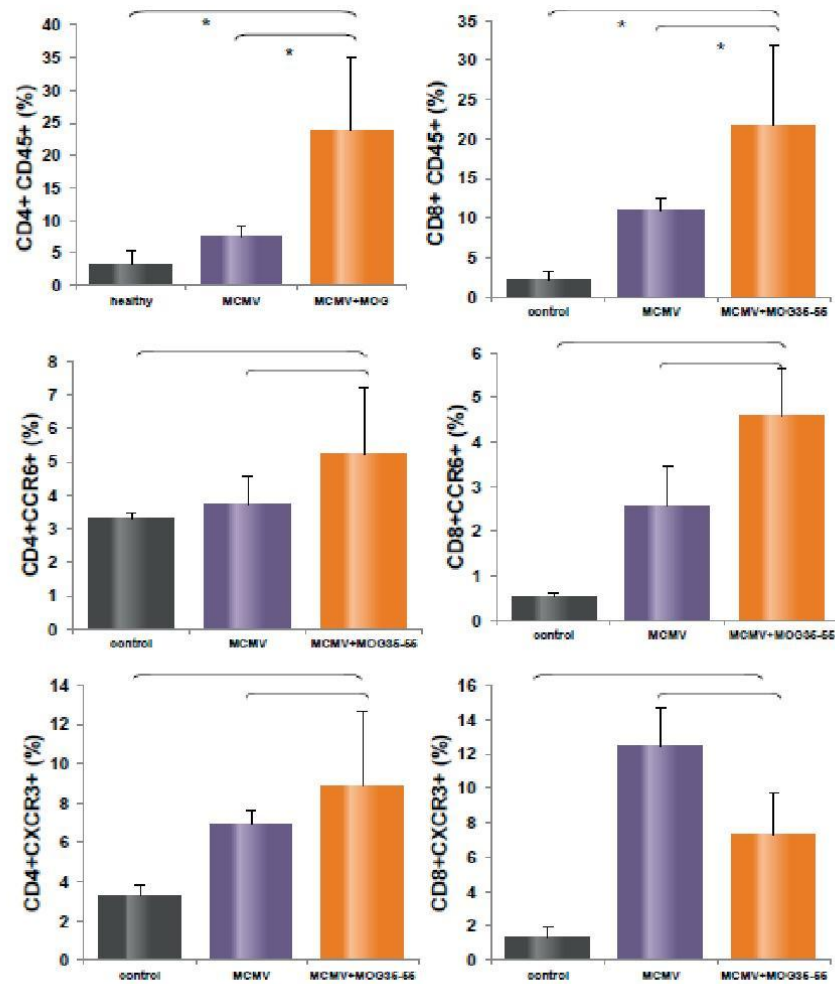


Figure 2. MCMV-infected EAE-induced mice display a similar percentage of CD4+ and CD8+ cells in the CNS. Fifteen days after immunisation, mononuclear cells were isolated from the spinal cords and the brains and were used for flow cytometric analysis of the percentages of CD45+CD4+, CD45+CD8+, CD4+CCR6+, CD4+CXCR3+, CD8+CCR6+ and CD8+CXCR3+ cells. The data presented were obtained from a representative experiment (means±SD; *P<0.05; **P<0.005). Significance was assessed using Student's t-test.

mice compared with untreated and MCMV-infected mice. However, the influx of CD8+ T lymphocytes expressing Th1-related chemokine receptors was significantly higher in the MCMV-infected mice than in the MCMV-infected EAE-induced mice, whereas the percentage of CD8+ T cells expressing the Th17-related chemokine receptors was significantly higher in the EAE-induced MCMV-infected mice (Fig. 2).

EAE Mice Subjected to Neonatal MCMV Infection Display an Increased Percentage of Infiltrating Tc17 Cells in the CNS

Further, we assessed the effects of viral infection on the influx of proinflammatory CD4+ and CD8+ T cells into the nervous tissue. Therefore, we quantified the number of Tbet- and RoRyt-expressing and IL-17-, IFN- γ -, and TNF- α -producing CD4+ T and CD8+ T cells that infiltrated



into the CNS at the peak of the disease. Flow cytometric analysis of the CNS mononuclear cells revealed that inflammatory CD4+ and CD8+ cells were nearly absent from the CNS of the BALB/c mice. Influx of Th1 and Th17 cells was significant only in the EAE-induced MCMV-infected BALB/c mice. The percentage of CD4+ T cells expressing Th1- (IFN- γ and TNF- α) and Th17-related cytokines (IL-17) and expressing Th1- (Tbet) and Th17-related transcription factors (RoRyt) was significantly higher in the MCMV-infected EAE-induced mice compared with the MCMV-infected and untreated mice. The influx of Tc1 cells (CD8+ cells expressing IFN- γ , TNF- α and Tbet) into the CNS was significant in the MCMV-infected mice. The percentages of Tc1 cells were slightly lower in the MCMV-infected EAE-induced mice than in the MCMV-infected mice. However, the percentages of Tc17 cells (CD8+ cells expressing RoRyt and IL-17) in the CNS were significantly higher in the MCMV-infected EAE-induced mice than in the MCMV-infected and untreated mice. Moreover, there were hardly very few Tc17 cells in the CNS of the MCMV-infected mice. Collectively, our results indicate significant influx of CD8+IL-17+ and CD8+RoRyt+ cells into the CNS of new-born MCMV-infected BALB/c mice after MOG₃₅₋₅₅ immunisation.

DISCUSSION

A very important difference between MS and EAE is the equivalent level of CD8+ and CD4+ T cell infiltration in MS plaques in contrast to the predominance of infiltrating CD4+ T cells in the CNS of mice with EAE (15). Analysis of the antigen receptor expression patterns of CD8+ T cells in the CNS infiltrates in MS suggests the local activation of antigen-induced immune responses (16). There is the lack of experimental models that are suitable to study the role of CD8+ cells in CNS autoimmunity. Recently, it was shown that latent EBV infection exacerbates EAE signs in mice and induces the infiltration of CD8+IFN- γ +granzyme+ cells into the brain parenchyma (3). In this model of EAE, no viral DNA was detected in the CNS (based on PCR) during EAE, and the virus was hypothesised to indirectly influence the autoimmune response. CMV shares homology with EBV and induces latent infections that can subsequently become reactivated, resulting in different consequences.

We demonstrated that latent neonatal infection with MCMV alters the susceptibility of BALB/c mice to EAE, leading to the equivalent infiltration of CD4+ and CD8+ T cells into the CNS after EAE induction, which activates a significant Tc17-mediated immune response in the CNS that is accompanied by typical EAE paralysis.

In our model of neonatal MCMV infection, the mice develop histopathological lesions that are characteristic of meningoencephalitis. Histopathological lesions are composed of infected cells associated with infiltrating mono- and polymorpho-nuclear leukocytes or activated resident

microglia (17, 18). This cell infiltration persists in the brain even after the termination of productive viral infection, when the replicating virus is no longer detected in the brain (19). The predominant immune cell population in MCMV-infected new-born brains is CD8+ T lymphocytes, and these cells persist in the CNS after the resolution of acute infection (20). Viral DNA persists in the mononuclear cells outside the CNS.

However, the MCMV-infected EAE-induced mice displayed significantly higher cell infiltration in the CNS than age-matched mice subjected to neonatal MCMV infection alone. EAE induction in the MCMV-infected mice was followed by the significant influx of CD4+ T cells and, importantly, CD8+ T cells. We detected the influx of CD4+ T cells expressing CXCR3, the chemokine receptor for CXCL10, and CD4+ T cells expressing CCR6, a receptor that is known to play a key role in the initial development of autoimmune infiltration into the CNS (21, 22). On the other hand, EAE induction in mice subjected to latent MCMV infection increased the influx of CD8+CCR6+ T cells and decreased the influx CD8+CXCR3+ T cells compared with MCMV infection alone. MCMV infection is known to attract CD8+CXCR3+ cells, and it appears that the newly developing autoimmune process attracts a different population of CD8+ cells (23). This result indicates that latent MCMV infection of BALB/c mice in the periphery affects the immune response to the myelin antigen, driving the immune cells towards an inflammatory phenotype that facilitates the entry of these cells into the CNS and the induction of autoimmune processes. Recently, it was reported that MCMV infection of murine fibroblasts altered the expression of 10748 genes (24). Among the most strongly induced genes were those corresponding to Interferon- β , the transcription factor Tbet, and the chemokine CXCL10. The expression levels of all proteins examined correlated with their transcript levels. The role of the chemokine CXCL10 and the transcription factor Tbet, which are markers of Th1 cells, in EAE pathogenesis is well known (25, 26, 27). Immune challenge (immunisation with MOG₃₅₋₅₅) is assumed to reactivate MCMV infection, leading to the expression of genes whose products affect the polarisation of the adaptive immune response.

We also found that the CNS infiltrates of mice subjected to latent MCMV infection followed by EAE induction contained a significantly higher percentage of Th1, Th17, and Tc17 cells compared with mice subjected to MCMV infection alone. No increase was detected in the percentage of CD8+ cells expressing Tbet and the Th1-related cytokines TNF- α and IFN- γ in the CNS with autoimmune process developed after viral infection compared with mice with new-born MCMV infection. Autoimmune neuroinflammation clearly developed after previous MCMV infection altered the dominant population of CD8+ cells in the CNS. Tc17 cells (IL-17- and RoRyt-expressing CD8+ cells) are required for Th17 accumulation and for the development of EAE (28). Patients with

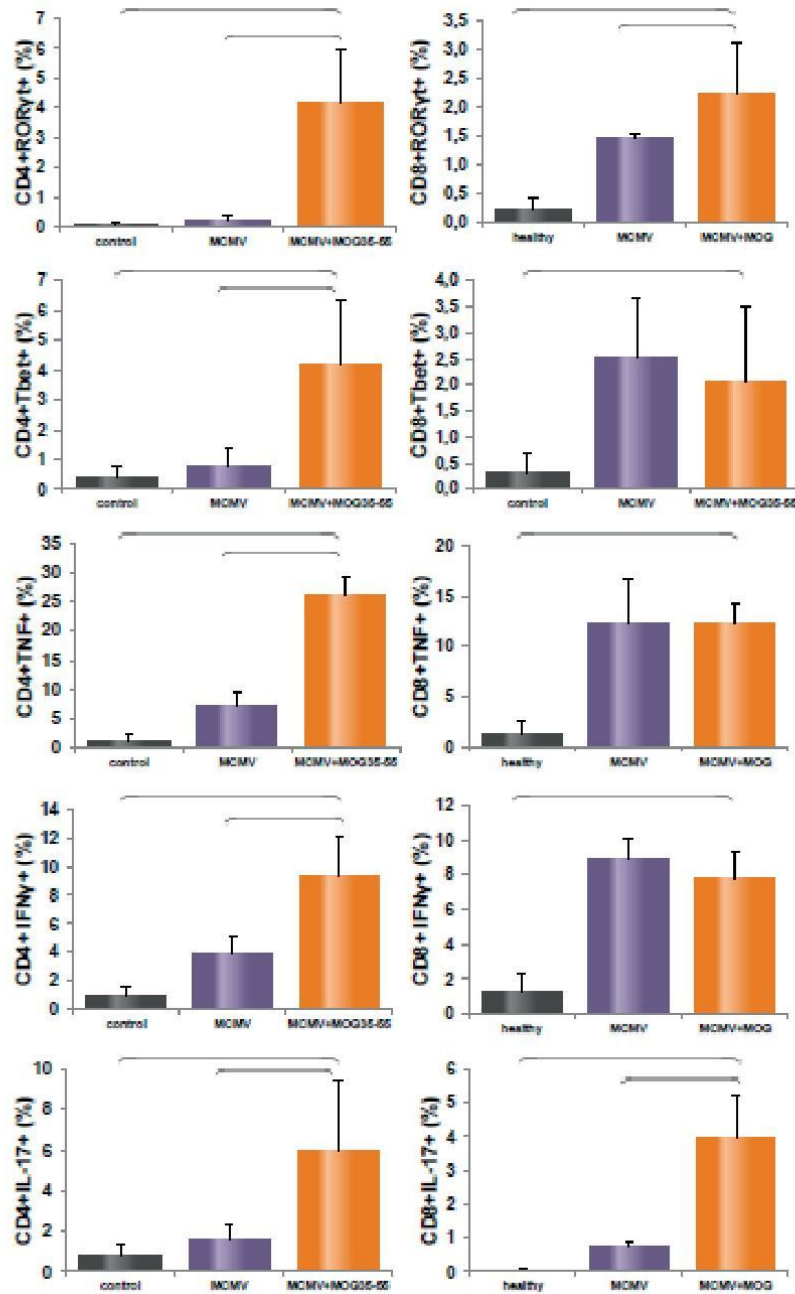


Figure 3. Influx of Tc17 cells following the induction of neuroinflammation in MCMV-infected mice. Fifteen days after immunisation, mononuclear cells were isolated from the spinal cords and the brains and were used for flow cytometric analysis of the percentages of CD4+Tbet+, CD4+CDR α R γ t+, CD4+TNF- α +, CD4+IFN- γ +, CD4+IL-17+, CD8+Tbet+, CD8+CDR α R γ t+, CD8+TNF- α +, CD8+IFN- γ +, and CD8+IL-17+ cells. The data presented were from a representative experiment (means+SD; *P<0.05; **P<0.005). Significance was assessed using Student's t-test.



early-stage MS harbour a greater number of Tc17 cells in the cerebrospinal fluid than in the peripheral blood. Tc17 cells contribute to the initiation of CNS autoimmunity by supporting Th17 cell pathogenicity. Our results indicate that latent MCMV infection contributes to the expansion of this subpopulation of CD8+ cells, which is known to play a role in autoimmune neuroinflammation, and the influx of these cells into the CNS.

CONCLUSION

Our findings suggest that latent CMV infection affects EAE development and, possibly, MS pathogenesis, likely via its influence on the initial development of inflammatory lymphocytes that display encephalitogenic potential. Furthermore, this model of EAE may be useful for the examination of the role of CD8+ T cells in CNS autoimmunity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grant Nos. ON175071, ON175069, and ON175103) and the Faculty of Medical Sciences at the University of Kragujevac in Serbia (MP 01/14). No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000; 343(13): 938-952.
2. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007; 61(4): 288-299.
3. Casiraghi C, Shanina I, Cho S, Freeman ML, Blackman MA, Horwitz MS. Gammaherpesvirus latency accentuates EAE pathogenesis: relevance to Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS Pathog*. 2012; 8(5): e1002715.
4. Angelini DF, Serafini B, Piras E, et al. Increased CD8+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus Lytic Antigens in the Active Phase of Multiple Sclerosis. *PLoS Pathog*. 2013; 9(4): e1003220.
5. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*. 2011; 121(5): 1673-1680.
6. Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yurochko AD. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J Virol*. 2006; 80(23): 11539-11555.
7. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(25): 11879-11883.
8. Pakpoor J, Pakpoor J, Disanto G, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. *J Neurol*. 2013; 260(6):1658-1660.
9. Bernard CC. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: genetic control of susceptibility. *J Immunogenet*. 1976; 3(4): 263-274.
10. Hurwitz AA, Sullivan TJ, Sobel RA, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(5): 3013-3017.
11. Milovanovic M, Volarevic V, Ljubic B, et al. Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45225.
12. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol*. 2012; 42(7): 1804-1814.
13. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006; 1(4): 1810-1819.
14. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, et al. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007; 178(1): 39-48.
15. Babbe H, Roers A, Waisman A, 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. *J Exp Med*. 2000; 192(3): 393-404.
16. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain*. 2007; 130(Pt 11): 2789-2799.
17. Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y. Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. *Am J Pathol*. 2002; 161(3): 919-928.
18. van den Pol AN, Reuter JD, Santarelli JG. Enhanced cytomegalovirus infection of developing brain independent of the adaptive immune system. *J Virol*. 2002; 76(17): 8842-8854.
19. Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, Britt WJ. Glucocorticoid treatment of MCMV infected newborn mice attenuates CNS inflammation and limits deficits in cerebellar development. *PLoS Pathog*. 2013; 9(3): e1003200.
20. Bantug GR, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *J Immunol*. 2008; 181(3): 2111-2123.



21. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.* 2009; 10(5): 514–523.
22. Liston A, Kohler RE, Townley S, et al. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J Immunol.* 2009; 182(5): 3121–3130.
23. Hokeness KL, Deweerd ES, Munks MW, Lewis CA, Gladue RP, Salazar-Mather TP. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J Virol.* 2007; 81(3): 1241–1250.
24. Juranic Lisnic V, Babic Cac M, Lisnic B, et al. Dual Analysis of the Murine Cytomegalovirus and Host Cell Transcriptomes Reveal New Aspects of the Virus-Host Cell Interface. *PLoS Pathog.* 2013; 9(9): e1003611.
25. Yang Y, Weiner J, Liu Y, et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med.* 2009; 206(7): 1549–1564.
26. Lalor SJ, Segal BM. Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis is CXCR3 independent. *Eur J Immunol.* 2013; 43(11): 2866–2874.
27. Carter SL, Müller M, Manders PM, Campbell IL. Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro. *Glia.* 2007; 55(16): 1728–1739.
28. Huber M, Heink S, Pagenstecher A, et al. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2013; 123(1): 247–60.

XENOBIOTIC INDUCED MODEL OF PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS

Aleksandar Arsenijević¹, Jelena Milovanović¹, Bojana Stojanović¹, Marija Milovanović¹, Eric M. Gershwin²,
Patrick Leung², Nebojsa Arsenijević¹, Miodrag L. Lukić¹

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

²Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology, University of California, Davis, CA, USA

PRIMARNA BILIJARNA CIROZA INDUKOVANA KSENOBIOTIKOM: EKSPERIMENTALNI MODEL

Aleksandar Arsenijević¹, Jelena Milovanović¹, Bojana Stojanović¹, Marija Milovanović¹, Eric M. Gershwin²,
Patrick Leung², Nebojsa Arsenijević¹, Miodrag L. Lukić¹

¹Centar za molekularnu medicinu i ispitivanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

²Odeljenje reumatologije, alergologije i kliničke imunologije, Univerzitet u Kaliforniji, SAD

Received / Primljen: 15.06.2014.

Accepted / Prihvaćen: 22.06.2014.

ABSTRACT

Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune disease of the liver that is, characterised by destruction of the intrahepatic bile ducts and the presence of antimitochondrial antibodies (AMAs). Several murine models of PBC, with similar serological, biochemical, and histological features to human PBC, have been developed in recent years. These animal models enable investigators to study the etiology and pathophysiologic mechanism of PBC. Immune response in PBC is directed towards E2 components of the 2-oxo-acid dehydrogenase family of enzymes, which is in located in mitochondria and is an immunodominant epitope (a lipoylated peptide sequence shared by enzymes). Immunisation of mice with 2-octynoic acid coupled to bovine serum albumin (2-OA-BSA) (which is an antigen that is structurally related to the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex [PDC-E2]) produces histologic features similar to those found in human PBC. This model of xenobiotic induced PBC is suitable for studying the early events in PBC pathogenesis and for developing new therapeutics in PBC.

Key words: PBC, xenobiotic, 2OA-BSA, C57BL/6 mice

SAŽETAK

Primarna bilijarna ciroza (PBC) je autoimunska bolest jetre koju karakteriše destrukcija intrahepatičnih žučnih kanalića i prisustvo antimitohondrijalnih antitela (AMAs). Poslednjih godina je razvijeno nekoliko mišjih modela PBC koji imaju slične serološke, biohemijske i histološke karakteristike kao i humana PBC. Ovi animalni modeli su omogućili ispitivanje etiologije i mehanizama uključenih u patogenezu PBC. U PBC imunski odgovor je usmeren na E2 komponentu 2-okso-kiseline dehidrogenaza familije enzima koji su locirani u mitohondrijama, a imunodominantni epitop je peptidna sekvenca sa lipidima koja je zajednička za ove enzime. Imunizacija miševa 2-oktinoičnom kisleinom vezanom za goveđi serumski albumin (2-OA-BSA), antigenom koji je strukturno sličan E2 subjedinici kompleksa piruvat dehidrogenaze (PDC-E2), omogućava razvoj histoloških promena koje karakterišu PBC kod ljudi. Ovaj model PBC indukovana ksenobiotikom je pogodan za ispitivanje početnih događaja u patogenezi PBC i za razvoj novih lekova za PBC.

Ključne reči: PBC, ksenobiotik, 2OA-BSA, C57BL/6 miševi

INTRODUCTION

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a liver-specific autoimmune disease (1). PBC has a long latency period, which is followed by the development of common symptoms: fatigue, pruritus hyperpigmentation, and (in the terminal stages) bleeding varices, and ascites (2). PBC is characterised by a multilineage humoral and cellular adaptive response against biliary epithelial cells (BECs) and destruction of small bile ducts by mechanisms that include innate immune responses (3; 4). Bile duct destruction leads to cholestasis, fibrosis, and ultimately liver cirrhosis (4). The typical characteristic of the disease is the presence of an-

timitochondrial autoantibodies (AMA), which are present in high amounts. The autoantigens to which the immune response is directed in PBC has been identified as the E2 subunits of the 2-oxo-acid dehydrogenase complexes (2OADC-E2), including the E2 subunits of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2), branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC-E2), and 2-oxo-glutarate dehydrogenase complex (OGDC-E2) (5). The immunodominant autoantigen within this group is PDC-E2 (6; 7). A multi-faceted immune response to the immunodominant mitochondrial autoantigen PDC-E2 in PBC



UDK: 616.36-097 / Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150
DOI: 10.2478/SJECR-2014-0019

Correspondence: Marija Milovanovic, MD PhD; Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; Phone: +38134306800, Fax: +38134306800112
E-mail: marijaposta@gmail.com

145



suggests that a loss of tolerance to PDC-E2 is the initiating event in the development of PBC; there is no significant evidence of epitope spreading, which is present in other autoimmune diseases (8).

ETIOPATHOGENESIS OF PBC

The etiology of PBC, including the loss of tolerance, is still unknown. However, as in all autoimmune diseases, it is likely that genetic susceptibility and environmental factors play a role in the pathogenesis (9). Environmental factors, including xenobiotics or microorganisms, modify the autoantigen and facilitate the breakdown of tolerance (10).

Molecular mimicry: Cross-reactivity between sera of PBC patients and *E. coli* has been shown, but stronger reactivity (1,000-fold stronger than with *E. coli*) has been demonstrated with the xenobiotic-metabolising gram-negative bacterium *Novosphingobium aromaticivorans* (a bacterium present in human fecal specimens) (11). *N. aromaticivorans* contains two proteins highly homologous to the immunodominant epitope of PDC-E2 and serum autoantibodies. Importantly, mice infected with *N. aromaticivorans* develop PBC-like liver lesions (12).

Xenobiotics: Because the liver plays a key role in the metabolism of toxins, the hepatocytes and BECs are continuously exposed to chemical by-products. Associations between PBC and the frequent use of nail polish support a xenobiotic pathogenesis hypothesis. 2-Octynoic acid is a food additive and xenobiotic that is present in cosmetic products, such as nail polish. The *in vitro* and *in vivo* data strongly support a potential role of 2-octynoic acid in PBC. Reactivity of 2-octynoic acid with AMAs and lipoic acid has been shown (13). Congenic nonobese diabetic NOD.1101 (NOD.B6 Idd10 Idd18r2) C57BL/6 mice, immunised with 2-octynoic acid conjugated with bovine serum albumin, develop histological features of autoimmune cholangitis (portal infiltrates enriched in CD8+ cells and liver granulomas); these mice demonstrated high titers of AMAs (14-17). This model provides convincing evidence that xenobiotics are causally related to the development of PBC.

Biliary epithelial cells

The most intriguing aspect of the pathogenesis of PBC remains the specific immune response directed at the small intrahepatic bile ducts, as all nucleated cells have mitochondria with 2-oxo-acid dehydrogenase complexes. These small biliary ducts are lined with biliary epithelial cells, BECs (i.e., cholangiocytes) and are destroyed by the immune response, mediated by specific CD4+ and CD8+ T cells (18; 19). This selective destruction indicates there are unique immunopathological characteristics of BECs. It is known that BECs are not passive bystanders in primary biliary cirrhosis; these cells can increase the expression of adhesion molecules and production of TNF- α , IFN- γ , and IL-1 upon stimulation with proinflammatory cytokines (20). Through the variable expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, BECs can modulate

the degree and localisation of the inflammatory process. Additionally, BECs have properties of antigen presenting cells by expressing HLA class II and costimulatory molecules CD80 and CD86. Based on these characteristics of BECs, it can be hypothesized that their interactions with T cells may be responsible for bile duct damage.

BECs of small bile ducts are very susceptible to apoptosis, more than epithelial cells of larger ducts (due to a lack of production of specific protease-resistant peptides, trefoils) (21). Moreover, unique characteristics of apoptosis in BECs indicate that this process most likely plays a part in the immunopathogenesis of PBC. Autoreactive lymphocytes may be activated with neo-antigens arise from apoptotic BECs (22). When BECs undergo apoptosis, the major mitochondrial autoantigen, PDC-E2, remains immunologically intact, whereas other cells following apoptosis present a form of PDC-E2 that cannot be detected by AMAs (23; 24). Persistent exposure to PDC-E2, as derived from BECs, is caused by a failure to covalently link PDC-E2 to glutathione during the course of apoptosis in these cells. Another important observation regarding the role of apoptotic BECs in the pathogenesis of PBC is the high degree of proinflammatory cytokine production in monocyte-derived macrophages that was found in PBC patients who were incubated with apoptotic bodies from BECs (in the presence of AMAs) (25). It is important to note that the BECs used in these experiments were derived from two normal donors, which implies that there is no phenotype of biliary epithelial cells specific for PBC; this could explain the recurrence of PBC following transplantation (26).

Immunostaining of PBC biliary tract with monoclonal antibodies against mitochondrial autoantigens demonstrated a high degree of expression of PDC-E2 at the apical surface of the small bile duct cells lining the bile duct lumen (27; 28). Cholangiocytes play a role in the transport of IgA antibodies in bile duct lumen. PDC-E2-specific IgA enters the BECs via a polyimmunoglobulin receptor and forms a complex with PDC-E2; it may thereby contribute to the exposure of PDC-E2 at the apical surface of BECs. Additionally, during transcytosis through cells expressing polyimmunoglobulin receptors, dimeric IgA can initiate the activation of caspases (29). The levels of anti-PDC-E2 IgA antibodies in PBC sera directly correlate with the level of caspase activation.

IMMUNE RESPONSE IN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS

The mechanism of biliary destruction has not been completely determined, but the specificity of pathological changes in the bile ducts, the presence of lymphoid infiltration in the portal tracts, and the presence of major-histocompatibility-complex class II antigens on the biliary epithelium indicate that an intense immune response is directed against the biliary epithelial cells. There are data suggesting that the destruction of biliary cells is mediated by liver-infiltrating autoreactive T cells (19; 30). CD4+ and



CD8⁺ T cells can be detected in the portal tracts of PBC patients (19; 31-33). An increased serum level of autoantibodies specific for PDC-E2 is accompanied by a 100 times higher frequency of antigen-specific CD4⁺ T cells and a 10 times higher frequency of antigen-specific CD8⁺ T cells in liver as compared to with draining lymph nodes. Two important T helper cell subpopulations shown to have a role in the pathogenesis of PBC are Th17 and Treg cells (34). Significantly lower levels of CD4⁺ CD25^{high} are detected in the peripheral blood of PBC patients and their family members. In addition, FoxP3⁺ Treg cells can be detected in the lymphoid infiltrates found in the portal tracts (35). Th17 cells have a pathogenic role in PBC: an increased frequency of IL-17-positive lymphocytes was found in liver tissues from patients with PBC, and in the IL-2R α KO mouse model of autoimmune biliary disease (36).

There is granulomatous inflammation in the liver of PBC patients that is accompanied by an increased production of polyclonal IgM antibodies. Cultured human BECs express toll like receptors (TLRs), lipopolysaccharide, and lipoteichoic acids, which are present in bile. The expression of TLRs in BECs is mediated through biliary injury via the NF- κ B pathway (37). In response to TLR stimulation, BECs may produce proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and chemokines IL-8 and CX3CL1. CX3CL1 is a chemoattractant for cells expressing its receptor, CX3CR1. In PBC patients, CX3CR1 expressing CD8⁺ and CD4⁺ T cells can be found in the portal tracts and within the biliary epithelial layer of injured bile ducts (38). Another cell type known to be involved in PBC pathogenesis are NKT cells. There is a higher frequency of CD1d-restricted NKTs in PBC patients. These cells are more frequently found in the liver than in the peripheral blood. An increased number of CD1d-restricted NKT cells was found in the liver of the dnTGF- β RII mouse model (39). These CD1d-restricted NKT cells in the liver had increased IFN- γ production following exposure to α -galactosylceramide; this was accompanied by a decrease in hepatic lymphoid cell infiltration and less cholangitis when compared to with the controls.

ANIMAL MODELS OF PBC

Over the past several years, several animal models for PBC have been developed. Severe combined immunodeficient (SCID) mice develop lymphocytic infiltration around small bile ducts and present with the anti-PDC-E2 antibodies following the transfer of lymphocytes from peripheral blood of PBC patients (40). Congenic NOD.c3c4 mice are obtained by replacing the diabetes-susceptibility genes on chromosomes 3 and 4 with the diabetes-resistance genes of B6 and B10 mice (41). Overall, 50% to 60% of these mice develop autoimmune cholangitis and demonstrate AMA antibodies in their serum. Histologically, however, the cyst-like dilatation of the affected bile duct, which is characteristic of these mice, is not observed in PBC patients; when the dilatation becomes severe, the biliary epithelium of NOD.c3c4 mice frequently exfoliates, which can trigger neutrophil in-

filtration that is not characteristic of human disease. Another mouse model for PBC is the dnTGF- β RII mouse. These mice over express the dominant-negative form of TGF- β receptor II under the control of the CD4 promoter. A deficiency of TGF- β signalling causes various immunological abnormalities, including colitis. dnTGF- β RII mice exhibit major serological and histological characteristics of human PBC (42), indicating an important role of the TGF- β signalling pathway in the pathogenesis of PBC. Serologically, specific AMA production occurs in all mice, and histologic hepatic lesions typical of PBC (lymphocytic infiltration, interlobular bile duct destruction, and granuloma formation in the portal tract) appear at an increased frequency. Immune infiltrating cells (including B cells, plasmacytoid dendritic cells, natural killer (NK) cells, and macrophages), CD4⁺ cells, and CD8⁺ T cells are found in the portal tracts. In IL-2R α -/- mice (43), the IL-2 signal, which is important for controlling the fate of mature T cells, is functionally blocked. These mice develop an inflammatory bowel disease and an autoimmune lymphoproliferative disease. Anti-PDC-E2 antibodies are present in the sera of all IL-2R α -/- mice. There is increased lymphocytic infiltration in the portal tract and damage of the interlobular bile duct. CD8⁺ T cells are predominant among the infiltrating lymphocytes, and there is an increase in the number of CD4⁺ T and B cells. In addition, a small number of granulomas is formed. Increased levels of inflammatory cytokines, including TNF- α , IFN- γ , IL-12p40, and IL-6, are also observed. Using a model produced by crossing IL-2R α -/- mice with CD4 KO and CD8 KO mice, Hsu et al. (44) showed that CD8⁺ T cells participate in the pathogenesis of PBC.

XENOBIOTIC INDUCED PBC

The autoantigens of the E2 enzymes have a common structure consisting of a single N-terminal catalytic domain, containing two binding sites for the covalently attached lipoic acid cofactor. These lipoyl binding domains are the epitopes that are recognized most often by AMAs (8), suggesting an essential role of the lipoic acid domain in the etiology of PBC. The immune reactivity of AMAs are directed against a conformational epitope that is susceptible to chemical modification. This finding indicates that self-tolerance may be interrupted by chemical modification of the lipoyl domain of PDC-E2 by xenobiotics. It has been demonstrated that the modified lipoyl domain of PDC-E2 specifically binds antibodies in PBC sera, often at levels higher than the native PDC-E2 molecule (45-47). These mimicking effects are found in compounds that are widely used in the environment (including perfumes, lipstick, and many common food flavorings) (45). Studies have shown that animals immunised with selected AMA-positive xenobiotics resulted in AMAs; these animals developed liver pathology similar to PBC (48; 49).

It has been reported that B6 and NOD.1101 (NOD. B6 Idd10 Idd18r2) mice immunised with 2-octynoic acid

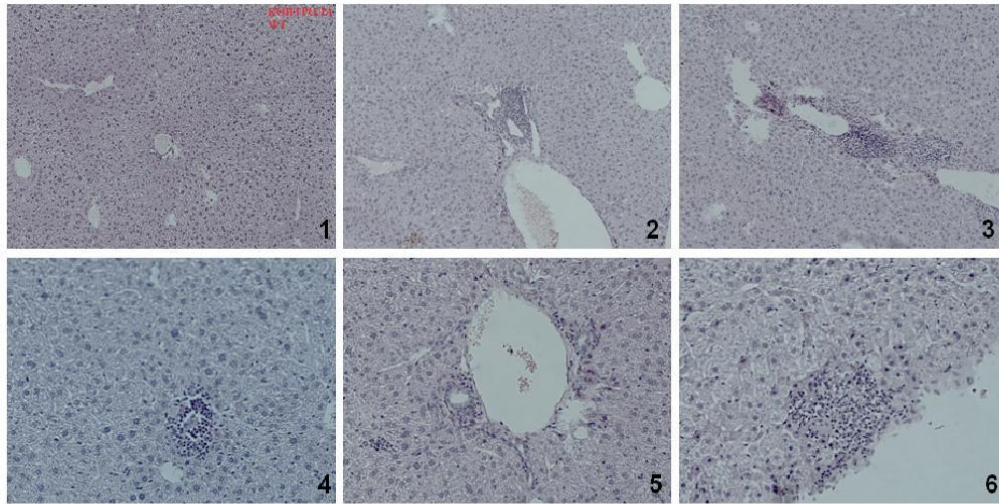


Figure 1. Histological features of the C57BL/6 mice 8 weeks after immunization with 2OA-BSA and control mice. Different degrees of lymphocytic infiltration: 1) untreated mice; 2) portal infiltration with granuloma formation; 3) parenchymal infiltration; 4) parenchymal granuloma; 5) moderate portal infiltration; 6) subcapsular abscess (H&E staining).

(2-OA), coupled to BSA, had high AMA titers, portal inflammation, and cholangitis similar to human PBC (14).

We used this xenobiotic induced PBC model to explore, in detail, the histological characteristics of the liver.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Female C57BL/6 mice were maintained at the animal facilities of the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac. All animal procedures were approved by the ethical committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

Primary biliary cirrhosis was induced as previously described (14). Briefly, a mixture of BSA conjugated 2-octynoic acid (2OA-BSA; 100 µg/100 µL in PBS) was injected

intraperitoneally with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), containing 1 mg/mL of Mycobacterium tuberculosis (strain H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). This was subsequently boosted every two weeks with 2OA-BSA in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Additionally, mice intraperitoneally received 100 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA) at the time of initial immunization with 2OA-BSA in Complete Freund's Adjuvant.

Immediately following sacrifice, liver tissue was harvested, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 4-µm sections for routine hematoxylin and eosin (H&E) staining. Evaluation under light microscopy and scoring of liver inflammation and bile duct damage was performed on coded H&E-stained sections in a

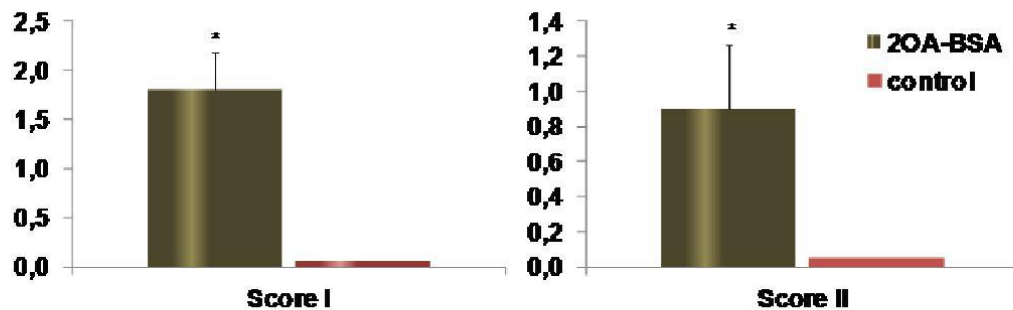


Figure 2. C57BL/6 mice immunized with 2OA-BSA develop significant infiltrates in the liver. Mean values + SD for histopathological scores I and II per group (2OA-BSA immunised and control) are presented. 0 = no significant change, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, and 4 = severe pathology * p<0.05.



blinded fashion. The images were captured with a light microscope (Olympus) equipped with a digital camera.

Sections were evaluated for periportal inflammation, infiltration of bile ducts without damage, infiltration and damage of bile ducts, and subcapsular infiltrates. Based on the level of pathology, the indices were scored as 0, no; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; or 4, very severe pathology. Score I was calculated as the mean value of each scored index. Granulomas, and fibrosis were scored as 0, no; 1, mild; 2, moderate; or 3, severe pathology; based on these values, score II was calculated.

All mice immunised with 2OA-BSA (9/9) developed histological findings typical of PBC (Figure 1). Our histological scoring clearly demonstrates the disease in the group of 2OA-BSA immunised mice (Figure 2).

The autoimmune cholangitis induced by 2OA-BSA immunisation recapitulates the histological features of human PBC: portal-tract inflammation with destruction bile ducts, focal-duct obliteration with granuloma formation, periportal extension of inflammation, and fibrosis. Importantly this model of autoimmune cholangitis gives us the opportunity to study the early events of PBC pathogenesis and to explore the possibility of new PBC therapeutics.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants No. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia and The Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14). No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005; 353(12): 1261-1273.
2. Bergasa NV. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003; 7: 879-900.
3. Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2011; 377: 1600-1609.
4. Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology.* 2008; 47(2): 737-745.
5. Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol.* 2013; 8: 303-330.
6. Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1965; 1: 827-831.
7. Fussey SP, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 8654-8658.
8. Moteki S, Leung PS, Dickson ER, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of

- 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology.* 1996; 23(3): 436-444.
9. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* 2012; 39(4): 259-271.
10. Selmi C, Leung PS, Sherr DH, Diaz et al. Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: a National Institute of Environmental Health Sciences expert panel workshop. *J Autoimmun.* 2012; 39(4): 272-284.
11. Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, et al. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology.* 2003; 38(5): 1250-1257.
12. Mattner J, Savage PB, Leung P, et al. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe.* 2008; 3(5): 304-315.
13. Rieger R, Leung PS, Jeddelloh MR, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006; 27(1): 7-16.
14. Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, et al. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology.* 2008; 48(2): 531-540.
15. Wakabayashi K, Yoshida K, Leung PS, et al. Induction of autoimmune cholangitis in non-obese diabetic (NOD).1101 mice following a chemical xenobiotic immunization. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155(3): 577-586.
16. Ambrosini YM, Yang GX, Zhang W, et al. The multi-hit hypothesis of primary biliary cirrhosis: polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol.* 2011; 166(1): 110-120.
17. Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, et al. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology.* 2011; 53(3): 915-925.
18. Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev.* 2000; 174: 210-225.
19. Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest.* 2002; 109(9): 1231-1240.
20. Chuang YH, Lan RY, Gershwin ME. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol.* 2009; 31(3): 323-331.
21. Kimura Y, Leung PS, Kenny TP, et al. Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2002; 36(5): 1227-1235.
22. Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(21): 3328-3337.



23. Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest.* 2001; 108(2): 223-232.
24. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, et al. Apoptoses and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2009; 49(3): 871-879.
25. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, et al. Biliary apoptoses and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 52(3): 987-998.
26. Van de Water J, Gerson LB, Ferrell LD, et al. Immunohistochemical evidence of disease recurrence after liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1996; 24(5): 1079-1084.
27. Van de Water J, Turchany J, Leung PS, et al. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest.* 1993; 91(6): 2653-2664.
28. Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, et al. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology.* 1995; 21(4): 1031-1037.
29. Matsumura S, Van De Water J, Leung P, et al. Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2004; 39(5): 1415-1422.
30. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology.* 2002; 123(4): 1031-1043.
31. Kita H, Lian ZX, Van de Water J, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195(1): 113-123.
32. Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2008; 31(2): 110-115.
33. Van de Water J, Ansari A, Prindiville T, et al. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp Med.* 1995; 181(2): 723-733.
34. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, et al. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol.* 2010; 184(6): 2886-2898.
35. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 43(4): 729-737.
36. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2009; 32(1): 43-51.
37. Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Interferon gamma accelerates NF-kappaB activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligand interaction. *J Clin Pathol.* 2006; 59(2): 184-190.
38. Shimoda S, Harada K, Niuro H, et al. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 51(2): 567-575.
39. Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, et al. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2008; 47(2): 571-580.
40. Krams SM, Dorshkind K, Gershwin ME. Generation of biliary lesions after transfer of human lymphocytes into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Exp Med.* 1989; 170(6): 1919-1930.
41. Irie J, Wu Y, Wicker LS, et al. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J Exp Med.* 2006; 203(5): 1209-1219.
42. Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, et al. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol.* 2006; 177(3): 1655-1660.
43. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, et al. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 44(5): 1240-1249.
44. Hsu W, Zhang W, Tsuneyama K, et al. Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology.* 2009; 49(1): 133-140.
45. Amano K, Leung PS, Rieger R, et al. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol.* 2005; 174(9): 5874-5883.
46. Naiyanetr P, Butler JD, Meng L, et al. Electrophile-modified lipoic derivatives of PDC-E2 elicits anti-mitochondrial antibody reactivity. *J Autoimmun.* 2011; 37(3): 209-216.
47. Rieger R, Leung PS, Jeddloh MR, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006; 27(1): 7-16.
48. Leung PS, Park O, Tsuneyama K, et al. Induction of primary biliary cirrhosis in guinea pigs following chemical xenobiotic immunization. *J Immunol.* 2007; 179(4): 2651-2657.
49. Leung PS, Quan C, Park O, et al. Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies. *J Immunol.* 2003; 170(10): 5326-5332.

REGULATORY ROLE OF PERITONEAL B CELLS IN EAE

Bojana Stojanović^{1,2}, Jelena Milovanović^{1,3}, Aleksandar Arsenijević¹, Marija Milovanović¹, and Miodrag L. Lukić¹¹Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medicine University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia²Department for Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia³Department for Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

REGULATORNA ULOGA PERITONEALNIH B LIMFOCITA U EAE

Bojana Stojanović^{1,2}, Jelena Milovanović^{1,3}, Aleksandar Arsenijević¹, Marija Milovanović¹ i Miodrag L. Lukić¹¹Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija²Katedra za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija³Katedra za histologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Primljen: 02.09.2015.

Accepted / Prihvaćen: 08.09.2015.

ABSTRACT

B cells play a dual role in the pathogenesis of autoimmune diseases. In experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an experimental model for multiple sclerosis, B cells contribute to disease progression, while their regulatory role predominates in the initial phases of disease development. Several studies have identified different subsets of regulatory B cells, mostly in the spleen, which are all sources of IL-10. However, peritoneal regulatory B cells are also important producers of IL-10, can migrate towards inflammatory stimuli, and could have an immunoregulatory function. As we have observed expansion of regulatory B cells in the peritoneum of resistant mice after EAE induction, herein we discuss the regulatory roles of B cells in EAE pathogenesis and the possible role of peritoneal regulatory B cells in resistance to EAE induction.

Keywords: multiple sclerosis, EAE, B cells, peritoneal regulatory B cells

SAŽETAK

B limfociti imaju dvojnju ulogu u patogenezi autoimunskih bolesti. B limfociti doprinose progresiji eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE), eksperimentalnog modela za multiplu sklerozu, a u inicijalnim fazama razvoja bolesti dominira njihova regulatorna uloga. U nekoliko studija je identifikovano nekoliko subpopulacija regulatornih B limfocita, uglavnom u slezini, a sve proizvode IL-10. Međutim i peritonealni B limfociti proizvode IL-10, migriraju ka inflamatornim stimulusima i mogu da imaju imunoregulatornu funkciju. Pošto smo uočili ekspanziju regulatornih B limfocita u peritoneumu miševa rezistentnih na indukciju EAE, ovde razmatramo regulatorne uloge B limfocita u patogenezi EAE i moguću ulogu peritonealnih regulatornih B limfocita u rezistenciji na indukciju EAE.

Cljučne reči: multipla skleroza, EAE, B limfociti, peritonealni regulatorni B limfociti

B cells are effector cells of the adaptive humoral immune system that act by producing specific antibodies. However, B cells express numerous innate immune receptors, including Toll-like receptor (TLR)-3, TLR4, TLR7, TLR8 and TLR9 (1,2); stimulation of these receptors also induces antibody production. It is well established that two populations of B cells exist—B1 and B2 cells—that can be distinguished according to their phenotype, ontogeny, anatomical location and function (3-5). B2 cells, which include follicular and marginal zone B cells, originate from bone marrow precursors and circulate throughout the blood and secondary lymphoid tissues. These cells respond to a broad range of T-dependent and T-independent antigens. In contrast to B2 cells, B1 cells develop during foetal and neonatal develop-

ment, have the capacity to self-renew, and predominantly localize to peritoneal and pleural cavities (3-5). B1 cells are innate immune cells that produce the majority of “natural” immunoglobulins, which are encoded by germline immunoglobulin genes. These natural immunoglobulins act as a first line of defence against pathogens, such as encapsulated polysaccharide-expressing bacteria (4, 5). There are two functionally distinct subsets of B1 cells that can be delineated by differential expression of CD5 (4). B1 cells that express CD5 are known as B1a cells, and those that lack CD5 expression, but have other hallmarks of B1 cells, are known as B1b cells. CD5⁺ peritoneal B1a cells produce an abundance of interleukin-10 (IL-10) following stimulation with TLR agonists, such as lipopolysaccharide (LPS) (6).

DE GRUYTER
OPENUDK: 612.112.062 / Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (2): 87-91
DOI: 10.1515/SJECR-2015-0048

Corresponding author: Marija Milovanovic, MD, PhD

Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medicine University of Kragujevac
Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; Tel +38134306800, Fax. +38134306800112; E-mail: marijaposta@gmail.com

87



B cells in multiple sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is classically viewed as a predominantly T cell-mediated autoimmune disease, based on the finding that the disease can be induced in healthy experimental animals by the adoptive transfer of T cells from diseased animals (7,8). T cells can also have a protective role in MS. A specialized population of T cells, CD4⁺ regulatory T cells, are critically important for disease attenuation by limiting the activation of T cells during MS and other autoimmune diseases (9,10), in part through the production of IL-10 (11). However, B cells also regulate immune responses and can contribute to MS pathogenesis (12,13) by functioning as antigen-presenting cells for CD4⁺ T cell activation (14) and by producing pro-inflammatory cytokines that affect T cell function (15). Recent clinical trials in MS patients that used depleting CD20 monoclonal antibody (Rituximab) suggest that pan-mature B cell depletion has clinical efficacy for the treatment of MS (16,17) in addition to demonstrated efficacy for other autoimmune disorders (13). Additionally, B cells, as with T cells, can have a regulatory role in autoimmune diseases. B cells from patients with multiple sclerosis produce decreased amounts of IL-10 (18). MS patients have significantly higher frequency of CD20⁺ B cells, but among B cell subsets they have a reduced frequency of B1 cells, which are known to have a regulatory role in immune responses (19).

Opposite roles of B cells have also been identified during the initiation and progression of an experimental model for MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (20). Depletion of mature B cell in mice before EAE induction significantly exacerbates disease symptoms, whereas B cell depletion during EAE progression dramatically inhibits these symptoms. Thereby, the balance between opposing positive and negative regulatory B cell functions shape the normal course of EAE immunopathogenesis. Mice lacking B cells develop an extremely severe and chronic form of EAE, which confirms the regulatory role of B cells in autoimmune diseases (21). The regulatory role of B cells in EAE results from the production of IL-10 (22). A suppressive function for IL-10 produced by B cells has also been demonstrated in a models of inflammatory bowel disease and collagen-induced arthritis (23,24), suggesting a general role for IL-10-producing B cells in immune homeostasis.

Regulatory B cells

B cell subsets that can down-regulate immune responses by secreting interleukin IL-10 are known as regulatory B cells. These regulatory B cells, which are functionally defined by their immune-suppressive action either *in vitro* or *in vivo* (25), include splenic CD-21^{hi}CD23^{hi}CD1d^{hi} transitional 2 marginal zone precur-

sor B cells described by the group of Mauri (26,27) and IL-10-producing B cells, termed B10 cells, characterized by the group of Tedder. The latter are mainly found within the CD1d^{hi}CD5⁺ splenic B cell subset (28,29). Regulatory B cells must be activated to exert suppressive functions, and the activation of regulatory B cells presumably occurs *in vivo* in the context of inflammation. Activated regulatory B cells are more potent suppressors of autoimmunity than their non-activated counterparts (27,30). CD1d^{hi}CD5⁺ B cells can be induced to express cytoplasmic IL-10 following 5 hours of *in vitro* stimulation with LPS, phorbol 12-myristate 13-acetate, and ionomycin, in the presence of monensin to block IL-10 secretion. Splenic B10 pro-B cells have also been functionally identified in mice and are found within the CD1d^{hi}CD5⁺ B cell subpopulation (31). These B10 pro-B cells require 48 hours of *in vitro* stimulation with LPS or via CD40 before they acquire the ability to express cytoplasmic IL-10 (31). Although B10 cells normally represent only 1–2% of splenic B cells, they significantly inhibit the induction of Ag-specific inflammatory reactions and autoimmunity (20,29). Depletion of B10 cells in mice before disease initiation accounts for exacerbated disease, which can be ameliorated by the adoptive transfer of splenic CD1d^{hi}CD5⁺ B cells (32). There is evidence that B regulatory cell-mediated protection in chronic inflammatory diseases is antigen-specific, as B regulatory cells that are *in vivo* activated by one antigen do not protect in inflammatory models induced by a second antigen (27,29). *In vitro*, B regulatory cells can be activated in an antigen-nonspecific manner to secrete IL-10 and suppress immune activation triggered by stimuli, including activation by TLR ligands (31,33–35), CD40 ligation (36,37), a combination of these two pathways (38), or the cytokine IL-21 (39).

Regulatory B cells in MS

B regulatory cell-mediated amelioration in EAE is dependent upon IL-10. Many reports indicate that B regulatory cells can influence T cell activation. B cell-deficient mice (40) and mice with IL-10-deficient B cells (22) exhibit heightened lymph node T helper 1 (Th1)-cell responses to immunization. B-cell-mediated regulation of EAE is also associated with the suppression of Th17 cells, suggesting that IL-10 from B cells influences disease progression by instructing T cell differentiation (33). The adoptive transfer of B regulatory cells often correlates with a reduction in the frequency of interferon (IFN)- γ , IL-17 and/or tumour necrosis factor- α positive T cells (27,39,41,42), and sometimes increased amounts of Foxp3⁺ regulatory T cells (43) or IL-10-producing T cells (44). IL-10-producing B cells may contribute to modulation of T-cell responses also indirectly by limiting dendritic cells function and by inhibition of the innate immune responses (45,46). IL-10 produced



by B cells can repress IL-6 and IL-12 production by DCs, thereby inhibiting the differentiation of Th17 and Th1 cells, respectively (33). Additionally, after immunization, DCs from B cell-deficient mice produce higher amounts of IL-12 compared with DCs from wild-type mice (40). Changes in the balance of IL-10 and IL-12 levels have important effects on the pathogenesis of EAE (47). Accordingly, B cell-mediated regulation of EAE begins in the draining lymph nodes within days of immunization. B cells can therefore orchestrate the regulation of autoimmune diseases from within secondary lymphoid organs both directly by inhibiting pathogenic cells (autoreactive T cells and innate immune cells) and indirectly by inducing regulatory activity in different T cell populations.

B1 cells in EAE

Although splenic regulatory B cells share some functional and phenotypical characteristics with B1a cells, as both cell populations produce IL-10 and express CD5, limited data are available about the regulatory role of B1 cells in EAE. One study showed a reduced severity of demyelination and overall pathology in the brain after the depletion of peritoneal B1 cells during the effector phase of EAE (48). Depletion during the induction phase of disease resulted in an increased incidence of progressive EAE. The experiments in this study were carried out with A.SW mice, which produce anti-MOG antibodies that contribute to EAE pathogenesis, rather than the C57BL/6 mice that are typically used. Attenuation of EAE induced by the depletion of B1 cells could be accounted for by changes in the production of natural antibodies. However, no data are yet available about the IL-10-mediated regulatory role of B1 cells in MS or EAE. It is known that components from *Mycobacterium tuberculosis* that are present in complete Freund's adjuvant, which is used to induce EAE, provide TLR agonists that can stimulate TLRs (22). Furthermore, the *in vitro* stimulation of B cells with TLR agonists produces a cytokine milieu that can inhibit T cell activation in an IL-10-dependent manner, whereas activation of DCs in the same manner induces very low amounts of IL-10 production that is not sufficient to inhibit T cell proliferation (33). Thus, stimulation with TLR agonists that are present in the adjuvants that are used for EAE induction can also trigger regulatory function in B1 cells. Our preliminary findings revealed a significantly higher percentage of CD5⁺ B1a lymphocytes in the peritoneum of BALB/c mice, which are resistant to EAE induction with MOG₃₅₋₅₅ peptide (49), compared to susceptible C57BL/6 mice. By contrast, there was no significant difference in the frequencies of B1a or B1b cells in the peritoneum of healthy C57BL/6 versus BALB/c mice (Fig. 1). This finding is in accord with previous findings that *in vivo* stimulation with different microbes (TLR agonists) could

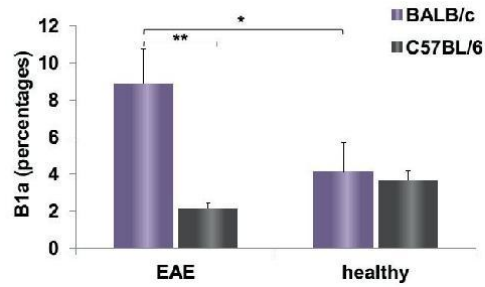


Figure 1. Immunization with MOG₃₅₋₅₅ induces a significant increase in peritoneal regulatory B1a cells. BALB/c and C57BL/6 mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅/CFA. Then, 7 days later, mononuclear cells from the peritoneum were isolated and analysed for the cell surface expression of CD19, CD5, and CD11b by flow cytometry. The frequencies of B1a cells (CD19⁺CD11b⁺CD5⁺ cells) are presented as the means from three independent experiments; 15 mice per group \pm SEM; *P<0.05; ** P<0.005. Statistical significance was assessed using Student's *t*-test.

induce the expansion of peritoneal B1 cells. It has been shown that among peritoneal cells, B1a cells are the main source of IL-10 after stimulation with TLR agonists (50). Immunization of susceptible strains, such as C57BL/6, with myelin antigens in adjuvants induces the expansion of inflammatory CD4⁺ T cells that gain the capacity to induce inflammation in the CNS. Modulation of immune responses has been suggested to exacerbate or attenuate EAE in susceptible strains of mice (51). Alternatively, our previous study recently showed that alteration of an immunoregulatory pathway by deleting components of the IL-33/ST2 axis may enhance susceptibility to EAE in the resistant BALB/c strain by inducing an inflammatory phenotype in antigen presenting cells (52, 53). In accord with the significantly increased expansion of IL-10-producing peritoneal B1a cells in BALB/c mice compared with susceptible C57BL/6 mice and the fact that peritoneal B cells migrate to lymph nodes (54), it could be assumed that the increased number of peritoneal B1 cells could contribute to the regulatory phenotype of dendritic cells in draining lymph nodes and the resistance of BALB/c mice to the development of EAE.

Further studies will be needed to explore in more detail the regulatory role of B1a cells in EAE and to assess the relative contribution of splenic B regulatory cells and peritoneal regulatory B cells in the pathogenesis of EAE.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants No. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia and The Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14). The authors report no potential conflicts of interest related to this article.



REFERENCES

- Crampton SP, Voynova E, Bolland S. Innate pathways to B-cell activation and tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1183: 58-68.
- Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008; 7(4): 313-316.
- Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 501-538.
- Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(1): 34-46.
- Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity.* 2012; 36(1): 13-21.
- O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol.* 1990; 2(9): 821-832.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 683-747.
- Ben-Nun A, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. *Eur J Immunol.* 1981; 11(11): 949-952.
- Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol.* 2008; 28(6): 697-706.
- O'Connor RA, Anderton SM. Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 2008; 193(1-2): 1-11.
- Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004; 16(2): 249-256.
- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008; 112(5): 1570-1580.
- Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008; 223: 284-299.
- Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4⁺ T cell activation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(52): 20878-20883.
- Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(3): 332-338.
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al., HERMES Trial Group. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008; 358(7): 676-688.
- Bar-Or A, Calabresi PA, Arnold D, et al. Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann Neurol.* 2008; 63(3): 395-400.
- Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007; 178(10): 6092-6099.
- Tørring C, Petersen CC, Bjerg L, Kofod-Olsen E, Petersen T, Höllsberg P. The B1-cell subpopulation is diminished in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013; 262(1-2): 92-99.
- Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 2008; 118(10): 3420-3430.
- Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1996; 184(6): 2271-2278.
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002; 3(10): 944-950.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002; 16(2): 219-230.
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 2003; 197(4): 489-501.
- Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(5): 391-397.
- Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30: 221-241.
- Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 2007; 178(12): 7868-7878.
- DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1183: 38-57.
- Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008; 28(5): 639-650.
- Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012; 491(7423): 264-268.
- Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* 2009; 182(12): 7459-7472.
- Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol.* 1998; 161(7): 3299-3306.



33. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol.* 2008; 180(7): 4763-4773.
34. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121(11): 4268-4280.
35. Miles K, Heaney J, Sibinska Z, et al. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(3): 887-892.
36. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 2003; 197(4): 489-501.
37. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2009; 182(6): 3492-3502.
38. Poe JC, Smith SH, Haas KM, et al. Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice. *PLoS One.* 2011; 6(7): e22464.
39. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012; 491(7423): 264-268.
40. Moulin V, Andris F, Thielemans K, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med.* 2000; 192(4): 475-482.
41. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol.* 2010; 185(4): 2240-2252.
42. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 2011; 186(10): 5569-5579.
43. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(5): 1114-1124.
44. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(35): 14080-14085.
45. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2001; 167(2): 1081-1089.
46. Byrne SN, Halliday GM. B cells activated in lymph nodes in response to ultraviolet irradiation or by interleukin-10 inhibit dendritic cell induction of immunity. *J Invest Dermatol.* 2005; 124(3): 570-578.
47. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med.* 1998; 187(4): 537-546.
48. Peterson LK, Tsunoda I, Fujinami RS. Role of CD5⁺ B-1 cells in EAE pathogenesis. *Autoimmunity.* 2008; 41(5): 353-362.
49. Hurwitz AA, Sullivan TJ, Sobel RA, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(5): 3013-3017.
50. Maseda D, Candando KM, Smith SH, et al. Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN- γ CD4⁺ T cell numbers during colitis development in mice. *J Immunol.* 2013; 191(5): 2780-2795.
51. Hurwitz AA, Sullivan TJ, Sobel RA, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(5): 3013-3017.
52. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol.* 2012; 42(7): 1804-1814.
53. Milovanovic M, Volarevic V, Ljubic B, et al. Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45225.
54. Itakura A, Szczepanik M, Campos RA, et al. An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J Immunol.* 2005; 175(11): 7170-7178.

PLATINUM COMPLEXES AND THEIR ANTI-TUMOUR ACTIVITY AGAINST CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA CELLS

Žana Besser Silconi¹, Saša Benazić², Jelena Milovanović^{3,5}, Aleksandar Arsenijević³, Bojana Stojanović^{3,6}, Marija Milovanović³, Tatjana Kanjevac⁴

¹Department of Clinical Cytology, Pula General Hospital, Croatia

²Department of Transfusiology, Pula General Hospital, Croatia

³Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁴Department for Preventive and Pediatric Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁵Department for Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁶Department for Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

ANTITUMORSKO DEJSTVO KOMPLEKSA PLATINE NA ČELIJE HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE

Žana Besser Silconi¹, Saša Benazić², Jelena Milovanović^{3,5}, Aleksandar Arsenijević³, Bojana Stojanović^{3,6}, Marija Milovanović³, Tatjana Kanjevac⁴

¹Odsjek za kliničku citologiju, Opšta bolnica u Puli, Hrvatska

²Odsjek za transfuziologiju, Opšta bolnica u Puli, Hrvatska

³Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

⁴Katedra za preventivnu i dječiju medicinu, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁵Katedra za histologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁶Katedra za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Primljen: 14.07.2015.

Accepted / Prihvaćen: 27.07.2015.

ABSTRACT

Since the discovery of the antitumor activity of cisplatin by Rosenberg and co-workers, the use of metal complexes in cancer treatment has caused a huge interest. Today, platinum-based drugs are part of standard chemotherapy in the management of a variety of cancers, germ cell tumours, sarcomas, and lymphomas. Unfortunately, toxicity and drug resistance are major obstacles to wider clinical application of these drugs. Their use is greatly limited by severe side effects such as nephrotoxicity, ototoxicity, and neurotoxicity. Although cisplatin is one of the most successful anticancer drugs to date, its biochemical mechanism of action is still unclear. Cisplatin is generally accepted as having the ability to interact with the purine bases on the DNA, causing DNA damage, interfering with DNA repair mechanisms, and subsequently inducing apoptosis in cancer cells.

Chronic lymphocytic leukaemia is a neoplastic B cell lymphoproliferative disease characterized by a highly variable clinical course. Clinical stage at the diagnosis and biological prognostic factors are the important predictors for survival. The Rai and Binet staging systems describe three major prognostic subgroups. Commonly used prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukaemia can be divided into genotypic, DNA-level changes and phenotypic, expression-level changes. For chronic lymphocytic leukaemia, substantial progress in therapy has not been made over the past 40 years. The main goal of future scientific research is to find new platinum complexes that have better efficacy in cancer treatment, the ability to be administered orally, without developing a cancer-drug resistance, and reduced toxic side effects.

Keywords: Platinum-based anticancer drugs, Chronic lymphocytic leukaemia, Cisplatin mechanisms of action, Cancer treatment

SAŽETAK

Otkad su Rosenberg i saradnici otkrili antitumorsko delovanje cisplatin, upotreba metalnih kompleksa u lečenju raka izazvala je veliki interes. Danas su lekovi bazirani na platini deo standardne hemoterapije u lečenju raznih karcinoma, tumora matičnih ćelija, sarkoma i limfoma. Nažalost, toksičnost i rezistencija glavne su prepreke za širu kliničku primenu tih lekova. Uprkos konzistentnoj brzini početnog odgovora, terapija cisplatinom često rezultira razvojem rezistencije, što dovodi do neuspeha u lečenju. Upotreba cisplatin značajno je ograničena jakim nuspojavama, kao što su nefrotoksičnost, ototoksičnost i neurotoksičnost. Iako je cisplatin jedan od najuspešnijih lekova protiv raka do danas, njen biohemijski mehanizam delovanja još uvek je nejasan. Opšte je prihvaćeno da cisplatin ima sposobnost interakcije s purinskim bazama DNA, uzrokuje oštećenja DNA, utiče na mehanizme popravka DNA, a nakon toga indukuje apoptozu u ćelijama raka. Hronična limfocitna leukemija je neoplastična limfoproliferativna bolest B limfocita koja se karakteriše vrlo promenljivim kliničkim tokom. Klinički stadijum bolesti i biološki prognostički faktori su važni prediktori za preživljenje bolesnika. Rai i Binet klasifikacija bolesti opisuje tri glavne prognostičke podskupine. Često korišćeni prognostički biomarkeri u hroničnoj limfocitnoj leukemiji mogu se podeliti u genotipske i fenotipske promene. Za hroničnu limfocitnu leukemiju značajnog napretka u terapiji nije zabeleženo zadnjih 40 godina. Buduća naučna istraživanja imaju za cilj da pronađu nove komplekse platine efikasnije u lečenju malignih tumora, koji se mogu oralno primenjivati, ne razvijaju rezistenciju na lek i imaju manje toksične nuspojave.

Ključne reči: Antitumorski lekovi, derivati platine, Hronična limfocitna leukemija, Cisplatin mehanizmi delovanja, Lecenje tumora



UDK: 615.277:546.92; 616.155.392-085.277 / Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181-186
DOI: 10.1515/SJECR-2015-0023

Corresponding author: Tatjana Kanjevac, DMD, PhD

Department for Preventive and Pediatric Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia;
Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; Tel +38134306800, Fax. +38134306800112; E-mail: tatjanakanjevac@yahoo.com

181



INTRODUCTION

Cancer is one of the most deadly diseases worldwide, and chemotherapy is a main strategy for the systemic treatment of cancer. Cancer patients are treated by repeated cycles of chemotherapy, but the clinical course in some patients is characterized by a series of relapses. Cisplatin was the first metal-based agent used in the clinics for the treatment of cancer. Platinum-based anticancer drugs are among the most potent chemotherapeutic agents for the treatment of various malignant tumours. At present, cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin are the only metal-based anticancer agents in worldwide clinical use (1). Platinum complexes are clinically used as adjuvant therapy of cancers aiming to induce tumour cell death (2). Platinum-based drugs are used for the treatment of human and animal tumours and are currently indicated for ovarian, testicular, bladder, colorectal, non-small cell and small cell lung cancers, as well as melanomas, lymphomas, and myelomas (3). There are currently six platinum drugs with marketing approval in various regions throughout the world: cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, nedaplatin, lobaplatin, and heptaplatin (3). Severe side effects, as well as drug resistance, have limited their clinical applications (4, 5).

The World Health Organization classification of hematopoietic malignancies describes chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) as a neoplasm composed of monomorphic small round to slightly irregular B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow, spleen and lymph nodes, admixed with prolymphocytes and paraimmunoblasts forming proliferation centres in tissue infiltrates (6). These two disorders are morphologically, phenotypically and genotypically indistinguishable, different only in the degree of peripheral blood lymphocytosis (7). The term SLL is used for non-leukemic cases with the tissue morphology and immunophenotype of CLL, and SLL requires lymphadenopathy, no cytopenias due to bone marrow infiltration by CLL/SLL and less than $5 \times 10^9/L$ B lymphocytes in peripheral blood (6). Chronic lymphocytic leukaemia is the most common type of leukaemia in the Western world, accounting for approximately 30% of all leukaemias (8). Individuals over 65 years of age account for 40% of cases, but CLL is extremely rare below the age of 30 years. The overall incidence is approximately three per 100,000 per year. Studies on the racial and geographic distribution show that CLL is 20-30 times more common in white and black populations of Europe, Australasia and North America than in populations of India, China and Japan. The male/female ratio in all populations is approximately 1.5-2:1 (6).

In 70-80% cases, CLL is diagnosed as an incidental finding on a routine full blood count. A definitive diagnosis of CLL is based on the combination of a lymphocytosis and characteristic lymphocyte morphology and immunophenotype. The predominant cell is a small lymphocyte with a narrow border of scanty cytoplasm and a dense nucleus with partially aggregated chromatin and without recogniz-

able nucleoli (perspectives). Gumprecht nuclear shadows, or smudge cells, found as cell debris, are characteristic findings in CLL (9). CLL/SLL has a distinctive immunophenotype. Using flow cytometry, the tumour cells express dim surface IgM/IgD, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD43, CD79a and CD11c (weak); however, CD10 is negative, and FMC-7 and CD79b are usually negative or weakly expressed in typical CLL (6). Unlike most other lymphoid malignancies, chromosomal translocations are rare in CLL/SLL but approximately 80% of the cases have cytogenetic abnormalities detected by FISH (10). Approximately 50% of CLL show del 13q14.3, approximately 20% trisomy 12, deletions in 10-20% of 11q22-23, and less commonly, deletions in 17p13 and 6q21 (6, 10). Somatic mutations of the Immunoglobulin Heavy Chain Variable (IGHV) genes are present in at least half of CLL patients, indicating that antigenic exposure may be relevant in the pathogenesis of CLL (11).

The clinical course of B-CLL shows a marked heterogeneity from an indolent type without need for treatment for a long period, to a rapidly progressing disease that requires immediate therapy. The decision to treat a patient is mainly based on clinical and laboratory features indicating active and advanced disease. The Rai and Binet clinical staging systems are used to define disease extent and prognosis, and this definition is based on the extent of lymphadenopathy, splenomegaly, and hepatomegaly, measured by palpation, and anaemia and thrombocytopenia measured by blood cell counts (12, 13). New biological prognostic factors have become important especially in the early stage (9). The expression of ZAP-70 and CD38 are both associated with an adverse prognosis. Deletions of 11q22-23, 17p13 and 6q21 are associated with worse outcome, and isolated del 13q14.3 is associated with a more favourable clinical course (6). Additional adverse predictive factors include a rapid lymphocyte doubling time in peripheral blood (<12 months) and serum markers of rapid cell turnover, including elevated thymidin kinase, sCD23 and β -2 microglobulin (9). Two subsets of CLL can be determined based on the presence or absence of somatic hypermutation by molecular sequencing methods (10). Patients with unmutated IGVH tend to have more advanced disease stages and a more aggressive clinical course and tend to acquire high-risk cytogenetic alterations associated with CD38 and ZAP-70 expression (10).

The standard first-line therapy includes a purine analogue-based combination (fludarabine, cladribine, and pentostatin) e.g., fludarabine, cyclophosphamide with or without rituximab or alkylating agent (chlorambucil in comorbid patients). The other protocol for CLL treatment includes steroids, vincristine, doxorubicine mitoxantrone and monoclonal antibodies (alemtuzumab) (14). Investigations on the intrinsic ability of B-CLL cells to avoid apoptosis have been mainly centred on the Bcl-2 gene product, which is the overexpressed prototype antidote to apoptosis. Targeting the apoptotic pathways may provide a new therapeutic approach. Identifying a new agent with novel



mechanism of action that complement cytotoxicity and fight the resistance will be necessary for the future therapy protocols.

Platinum - physical and chemical properties

Platinum is a transition metal located in the centre of the Periodic Table along with the other members of the group. These metals are less reactive than the typical metals (15). Because of the small energy differences between the valence shells, a number of oxidation states occur: 0, +2, +4, and +5. Cisplatin is a simple neutral inorganic compound having square planar geometry and containing a Pt (II) centre bonded to two non-labile ammine ligands and two labile chloride ligands (4).

When cisplatin enters the cell, it becomes aquated, meaning that the chloride ligands are exchanged for water. This is due to the lower concentration of NaCl in the cytoplasm compared to the blood plasma. The aquated molecule can cross-link DNA through a covalent coordinate bond to the nitrogen atom on guanine and also to a lesser extent, to adenine. This DNA damage prevents replication and transcription, which leads to apoptosis and cell death (16).

History of platinum-based therapy

Cisplatin was first synthesized in the late nineteenth century, after being described in 1845 by Michele Peyrone but its anticancer properties were accidentally discovered by Barnett Rosenberg in the 1960s while he was studying the effects of electric fields on the growth of *Escherichia coli* bacteria (3). Rosenberg and his group found that the electric current itself had no effect on cell division, but the current was causing a chemical reaction dissolving platinum from the electrodes into the medium. Cisplatin was approved for use as an anticancer drug in the 1970s. At that time, researchers focused their attention on identifying organic molecules as new anticancer agents, so cisplatin expanded the drug testing with metal-based molecules.

Carboplatin is the second-generation platinum anticancer drug. This drug was developed as a less-toxic derivative of cisplatin; it is equally effective and is used as the platinum drug of choice in the treatment of ovarian cancers (15). The main difference between carboplatin and cisplatin is the six-membered chelate ring that makes the drug less reactive and prone to hydrolase and thereby reduces some of the unwanted side reactions (15). Carboplatin was approved for clinical use in treating tumours in the 1980s.

Oxaliplatin is the third-generation platinum-based anticancer drug and it was approved in the 1990s for the treatment of colorectal carcinoma. Oxaliplatin has a more complex structure than previous platinum-based anticancer drugs and is also effective against some tumours that have become resistant to cisplatin and carboplatin (15).

Currently, there are many platinum-based drugs in various stages of clinical trials (3). Platinum (IV) complexes have greater inertness than the corresponding platinum (II) complexes. They have some advantages such as oral administration, reduced toxicity and a decrease in the amount of the complex that is lost or deactivated in the path to the target cell (17, 18).

Platinum-based drugs - mechanism of action

The target of platinum-based drugs is nuclear DNA. Once cisplatin has been intravenously administered to the patient, it rapidly diffuses into tissues and is highly bound to plasma proteins (19). The biochemical mechanism by which cisplatin crosses the cell membrane still remains unclear. Passive diffusion across the cellular membrane and active transport can both play a role in the cellular uptake of platinum-based antitumor drugs (4). Early studies noted that cellular uptake of cisplatin was linear, concentration dependent, and nonsaturable, and passively transported across the cellular membrane (20), whereas in higher concentration, endocytosis may contribute to cisplatin uptake (4, 20). In the cytoplasm, many cellular components that have soft nucleophilic sites, such as cytoskeletal microfilaments, thiol-containing peptides and proteins and RNA, may react with cisplatin (19). The most important non-DNA targets of cisplatin probably are the tripeptide glutathione and metallothioneins, and their binding has been associated with negative pharmacological properties including the development of resistance and toxicity (19). The first step in activation of cisplatin is aquation, where a chloride leaving group is replaced by water. Subsequent displacement of this water allows the platinum to coordinate to a nitrogen atom in DNA. The N7 atoms of guanine and adenine that are located in the major groove of the double helix are the most accessible and reactive nucleophilic sites for platinum coordination to DNA (19). Each platinum drug will bind two bases either through nucleosides on the same strand (intra-strand binding) or through individual bases on different strands (inter-strand binding) (19, 21). Intrastrand binding causes the DNA helix to unwind and bend, preventing DNA transcription and replication. This DNA damage initiates apoptosis.

Recently, active/facilitated transport pathways, such as copper transporter (Ctr1), have been identified. A connection between copper and platinum trafficking is bidirectional cross-resistance. Cells selected for resistance to high levels of copper were found to be resistant to platinum and vice versa. Human Ctr1 is a member of a highly conserved family of copper transporters that subdivide into three regions: 1) an extracellular N-terminal domain, 2) a membrane embedded domain composed of three transmembrane helices and 3) an intracellular C-terminal domain (4). If the mechanism of cisplatin uptake involves endocytosis of the drug bound to Ctr1 and degradation of the



cisplatin-Ctr1 complex, then additional steps are needed to complete the process; that is, cisplatin needs to be released from the endocytic vesicles into the cytosol or delivered to the nucleus, mitochondria, and microsomal compartments which are known to accumulate platinum after drug exposure. Endosome and lysosome compartments of mammalian contain a Ctr2 for the release of intracellular copper stores. Ctr2 has a large effect on the accumulation of cisplatin and carboplatin (4, 22).

Platinum complexes, protein interaction and toxicity

Cisplatin and related compounds are known to bind to several classes of proteins, affecting aspects as diverse as structural, antioxidant, electron transfer, small molecule or iron transport, or DNA processing (23). These interactions should be considered among the mechanism whereby platinum-containing drugs induce toxic side effects such as nausea, vomiting, fatigue, alopecia, haematological suppression, peripheral sensory neuropathy, renal damage, and others.

More than 95% of the cisplatin that enters a cell is estimated to bind to proteins and peptides, rather than to DNA (23). Platinum-based anticancer drugs can bind to a range of proteins, especially at sulphur atoms, affecting their conformation and functions. One possible mechanism of resistance and toxicity induced by these drugs may be explained according to this interaction (23). Cytotoxicity in cancer cells should always be viewed in relation to general toxicity and not be mistaken for anticancer activity.

Clinical resistance to platinum-based therapy

The major problem with platinum-based anticancer therapy is that cancer cell exposure to the drugs causes resistance, and tumours stop responding. Increasing the dose will increase the toxicity but not gain any anti-tumour effect (16). The resistance mechanism is multifactorial, and several causes have been proposed. From the molecular point of view, the resistance can be caused mainly in three ways (16). First, the cell can block the influx of the drug. Second, if the drug does enter, the cells can efflux it back outside or block it from reaching the target. Third, if the drug reaches the DNA, it can be removed by a repair system (2).

The pathway controlling the copper homeostasis in the cell becomes interesting when the cisplatin-resistant cancer cells show an over-expression of the copper transporting protein (Ctr1). Ctr1 is the main copper uptake transporter in human cells. It is positioned in the cell membrane where a central pore that functions as a canal has been formed. Studies of crystallized Ctr1 with electron microscopy showed a series of rings of methionines, histidines, and cysteines lingering on the inside of the pore to facili-

tate copper transport (16). Later studies have discovered a second potential copper transporter, Ctr2 (24). Ctr2 is not located in the plasma membrane like Ctr1 but is located mostly in the membranes of the intracellular compartments (16). Atox 1 is a copper chaperone that transports copper from Ctr1 to ATP7A/B (16). ATP7A and ATP7B are two homologous copper ATPases in human cells located at the trans-Golgi network. They use the energy of the ATP hydrolysis to transport Cu from the cytosol across the cellular membranes. More than likely, this is an indirect process. Several studies have shown the importance of the Ctr1 in cisplatin drug uptake, regulation of the cellular accumulation, and cytotoxicity. The overexpression of Ctr1 is found to sensitize cells to the toxic effects of platinum agents (16). After Ctr1 and ATP7A/B were found to mediate cisplatin resistance, Atox 1 has gained interest in case of platinum anticancer drugs resistance. The cells resistant to cisplatin had elevated levels of ATP7B, which suggest that copper ATPases are involved in resistance to platinum anticancer drugs.

Cisplatin and carboplatin generate mutual cross-resistant cells, but oxaliplatin-resistant cells are often not cross-resistant to cisplatin, pointing to a different mechanism of action. Cisplatin resistance occurs intrinsically (e.g., colon carcinomas) or is acquired (e.g., ovarian carcinomas), and some cancers show no tendency to acquire resistance at all (e.g., testicular cancer) (25). Platinum drugs have been found to overcome resistance in cell lines but have failed in clinics (26).

Cisplatin induced cell death pathways

DNA damage and subsequent induction of apoptosis may be the primary cytotoxic mechanism of cisplatin (27). Apoptosis is a built-in cell suicide program that serves to eliminate cells in the organism that are no longer needed or have sustained severe damage (28). Apoptosis is mediated by caspases, a specialized family of aspartate-specific cysteine proteases. The caspase death effector machinery is negatively controlled by members of the Bcl-2 family. Several independent functions of Bcl-2 have been demonstrated, including the abrogation of the mitochondrial release of caspase-activating factors (such as cytochrome c), the modulation of antioxidant pathways and the regulation of calcium homeostasis (29). There are two separate mechanisms that occur in apoptosis: the extrinsic pathway, activated by pro-apoptotic receptor signals at the cellular surface, and the intrinsic pathway, activated by mitochondrial signals (28). Conventional anticancer therapy seems to stimulate apoptosis primarily via the intrinsic pathway. The Bcl-2 proteins play important roles in the intrinsic pathway, and their elimination resulted in the prolonged survival and rapid loss of leukaemia cells (29).

A critical checkpoint for the activation of the intrinsic pathway is the tumour-suppressor p53 protein, a tran-



scription factor that is considered a 'guardian of the genome'. P53 has multiple functions, including cell-cycle control in response to DNA damage, induction of apoptosis, and DNA repair (30). Recent evidence suggests that genes that regulate apoptotic cell death may play a role in determining the sensitivity of tumour cells to chemotherapy (30). Inactivation of p53 is among the most common mutations, occurring in over half of cancers, and provides a key resistance mechanism that helps cancer to avoid apoptosis (28). Several studies have shown that sensitivity to cisplatin usually correlates with the presence of wild type p53, whereas the lack of functional p53 is related to cisplatin resistance (19).

There are four basic DNA repair pathways: nucleotide excision repair, base excision repair, mismatches repair and double-strand break repairs (31). Each pathway has its own set of proteins that function entirely independently of the other pathways. ERCC1 is an excision nuclease within the nucleotide excision repair pathway. ERCC1 is essential to life, and well preserved through nature (31). Cancer cell that express higher levels of ERCC1, also show higher resistance to platinum drug exposure (31), whereas higher levels of ERCC1 in CLL cells are accompanied with resistance to alkylating agents (33).

CONCLUSION

In spite of the widespread success of cisplatin, the search continues for new platinum drugs. This has been motivated by the desire to improve upon the clinical performance of cisplatin. The side effects associated with cisplatin treatment can be severe and may include toxicity to the kidney and nervous system. The goal is to obtain a compound with better activity and less toxicity than cisplatin (32). Rosenberg's original experiment identified both platinum (II) and platinum (IV) species as possessing anticancer activity. In spite of this fact, the vast majority of research since then has focused on platinum (II) compounds. Recognition of the enormous potential that platinum (IV) compounds possess as anticancer agents in terms of high activity, low toxicity, and perhaps the ability to be effective oral agents, has revived research in this area (32). An interesting therapeutic approach is the combination of cisplatin with two or more non-platinum antitumor drugs. An alternative approach in the treatment of fludarabine-resistant CLL is the inclusion of platinum-based therapy in protocols (34). Cisplatin and oxaliplatin have a synergistic cytotoxic effect with fludarabine on CLL cells (35, 36). However, platinum-based therapy increases the risk of haematological toxicity in patients with hematopoiesis that is already compromised.

Further studies are needed for the development of new generations of more efficient platinum-based anticancer drugs that will show better clinical activity and lower toxicity than the currently used platinum-based agents, even in multidrug-resistant cancers such as CLL.

REFERENCES

1. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG & Keppler BK. (2008). Antitumor metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 14;(2), 183-194.
2. Florea A & Büsselberg D. (2001). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers.* 15;3(1), 1351-1371.
3. Oun R. & Wheate NJ. (2013). Platinum Anticancer Drugs. In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp.1710-1714). New York, Heidelberg, Dordrecht, London:Springer.
4. Arnesano F. (2013). Platinum Complexes and Methionine Motif in Copper Transport Proteins Interaction In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp.1714-1723). New York, Heidelberg, Dordrecht, London:Springer.
5. Kostova I. (2006). Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 1(1), 1-22.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J & Vardiman JW. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* (4th ed.) (pp 180-184). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
7. Aster JC. (1999). Diseases of white blood cells, lymph nodes, spleen, and thymus In: Kumar V, Abbas AK & Fausto N. *Robbins and Cotran, Pathologic basis of disease* (7th ed.) (pp 661-709). Philadelphia: Elsevier Saunders.
8. Nahi H, Lehman S, Mollgard L, Bengtzen S, Selivanova G, Wiman KG, Paul C & Merup M. (2004). Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol.* 127(3), 285-291.
9. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson Bruce, Davis T, Dighiero G, Döhner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ & Rai K. (2006). Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 107(3), 859-861.
10. Chastain EC & Duncavage EJ. (2015). Clinical Prognostic Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 139(5), 602-607.
11. Caligaris-Cappio F. (2009). Chronic lymphocytic leukemia: "Cinderella" is becoming a star. *Mol Med.* 15(3-4), 67-69.
12. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN & Pasternack BS. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 46, 219-234.
13. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S & Gremy F. (1981). A new prognostic classification of chronic lym-



- phocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 48: 198-206.
14. Vujić JM, Kaluderović GN, Zmejkovski BB, Milovanović M, Volarević V, Arsenijević N, Stanojković TP & Trifunović S. (2012). Stereospecific ligands and their complexes: Part X: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum (IV) complexes with O,O'-dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl) pentanoate ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 390, 123-128.
 15. Habashi F. (2013) Platinum, Physical and Chemical Properties In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp.1741-1742). New York, Heidelberg, Dordrecht, London:Springer.
 16. Palm-Espling ME & Wittung-Stafshede P. (2013) Platinum Interaction with Copper Proteins. In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp.1723-1729). New York, Heidelberg, Dordrecht, London:Springer.
 17. Arsenijević M, Milovanović M, Volarević V, Čanović D, Arsenijević N, Soldatović T, Jovanović S & Bugarčić ŽD. (2012). Cytotoxic properties of platinum(IV) and dinuclear platinum (II) complexes and their ligand substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate. *Transition Metal Chemistry*. 37: 481-488.
 18. Vujić JM, Kaluderović GN, Milovanović M, Zmejkovski BB, Volarević V, Živić D, Đurđević P, Arsenijević N & Trifunović S. (2011). Stereospecific ligands and their complexes: Part VII Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl) pentanoic acid. *Eur J Med Chem*. 46(9), 4559-4565.
 19. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C & Peres JM. (2007). Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 7(1), 3-18.
 20. Gately DP & Howel SB. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br J Cancer*. 67(6), 1171-1176.
 21. Bordin DL, Lima M, Lenz G, Saffi J, Meira LB, Paul Me'sange P, Soares DH, Larsen AK, Escargueil AE & Henriques JAP. (2013). DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutat Res*. 753(2), 91-99.
 22. Blair BG, Larson CA & Howell SB. (2009). Copper-Transporter 2 Regulates the Cellular Accumulation and Cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res*. 15(13), 4312-4321.
 23. Silaghi-Dumitrescu R & Bischin C. (2013). Platinum-Containing Anticancer Drugs and Proteins, Interaction In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp.1742-1748). New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer.
 24. Kampfenkel K, Kushnir S, Babychuk E, Inze D & Van Montagu M. (1995). Molecular Characterization of a Putative Arabidopsis thaliana Copper Transporter and Its Yeast Homologue. *J Biol Chem*. 270(47), 28479-28486.
 25. Eckstein N & Hass B. (2013). Platinum-Resistant Cancer In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp.1748-1751). New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer.
 26. Boulikas T, Pantos A, Bellis E & Christofis P. (2007). Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanism. *Cancer Therapy*. 5, 537-583.
 27. Gonzales VM, Fuertes MA, Alonso C & Perez JM. (2001). Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Mol Pharmacol*. 59(4), 657-63.
 28. Ashkenazi A & Herbst R.S. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(8): 1979-1990.
 29. Del Bello B, Valentini MA, Yunino F, Comporti M & Maellaro E. (2001). Cleavage of Bcl-2 and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Onkogene*. 20(33), 4591-4595.
 30. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M & Kramer PH. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 188(11), 2033-2045.
 31. Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res*. 11(17), 6100-6102.
 32. Alderden AA, Hall M D. & Hambley TW. (2006). The discovery and Development of Cisplatin. *J Chem Educ*. 83(5), 728-734.
 33. Bou Samra E, Klein B, Commes T & Moreaux J. (2014). Identification of a 20-gene expression-based risk score as a predictor of clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia patients. *Biomed Res Int*. 2014, 423174.
 34. Tonino SH, van Gelder M, Eldering E, van Oers MH & Kater AP. R-DHAP is effective in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 24(3), 652-654.
 35. Tonino SH, van Laar J, van Oers MH, Wang JY, Eldering E & Kater AP. (2011). ROS-mediated upregulation of Noxa overcomes chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 30(6), 701-713.
 36. Zecevic A, Sampath D, Ewald B, Chen R, Wierda W & Plunkett W. (2011). Killing of chronic lymphocytic leukemia by the combination of fludarabine and oxaliplatin is dependent on the activity of XPF endonuclease. *Clin Cancer Res*. 17(14), 4731-4741.

ZINC AND GOLD COMPLEXES IN THE TREATMENT OF BREAST CANCER

Sasa Benazic¹, Zana Besser Silicon², Jelena Milovanovic^{3,5}, Aleksandar Arsenijevic³, Bojana Stojanovic^{3,6}, Marija Milovanovic³, Tatjana Kanjevac⁴

¹Department of Transfusiology, Pula General Hospital, Croatia

²Department of Clinical Cytology, Pula General Hospital, Croatia

³Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁴Department for Preventive and Pediatric Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁵Department for Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁶Department for Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

KOMPLEKSI CINKA I ZLATA U LEČENJU KARCINOMA DOJKE

¹Odsek za transfuziologiju, Opšta bolnica u Puli, Hrvatska

²Odsek za kliničku citologiju, Opšta bolnica u Puli, Hrvatska

³Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

⁴Katedra za preventivnu i dečiju medicinu, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁵Katedra za histologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁶Katedra za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Primljen: 22.07.2015

Accepted / Pribvačen: 22.07.2015

ABSTRACT

Metals are essential components in indispensable biochemical processes for living organisms. This review article highlights the metals zinc and gold in the development and treatment of breast cancer. Metal compounds offer many advantages as therapeutics due to their ability to coordinate ligands in a three-dimensional configuration. In aqueous solution, they form positively charged ions that can bind to negatively charged biological molecules. Metal complexes that contain metal ions such as zinc(II) and gold have received considerable attention as potential anticancer agents. Zinc is an essential trace element that plays a critical role in a wide range of cellular processes that include structural, signalling, catalytic and regulatory functions. Zinc acts as a key structural component in many proteins and enzymes, including transcription factors, cellular signalling proteins, and DNA repair enzymes, and perturbed levels of zinc in tissues may play a role in cancer aetiology and outcome. Unlike zinc, gold is feasible as a component of compounds for effective anticancer therapy. Some progress in anticancer therapy may include interactions between zinc and gold.

Keywords: Zinc, gold complexes, breast cancer, anticancer therapy

SAŽETAK

Metali su ključne komponente u svim važnim biohemijskim procesima u živim organizmima. Ovaj revijski članak opisuje najvažnije karakteristike određenih metala, cinka i zlata i njihovu ulogu u razvoju i lečenju karcinoma dojke. Kompleksi metala imaju značajne prednosti u odnosu na ostale terapeutike zbog sposobnosti da vezuju ligande i formiraju trodimenzionalne strukture. U vodenim rastvorima su u formi pozitivno naelektrisanih jona i tako mogu da vezuju negativno naelektrisane biomolekule. Metalni kompleksi koji sadrže jone metala kao što su cink(II) i zlato se intenzivno ispituju kao potencijalni antitumorski lekovi. Cink je esencijalni element koji ima ključnu ulogu u različitim procesima u ćeliji kojima se kontrolišu strukturne, signalne, katalitičke i regulatorne funkcije. Cink je sastavni deo mnogih proteina i enzima, uključujući transkripcione faktore, signalne proteine ćelije, enzime koji učestvuju u popravci DNA, a poremećena koncentracija cinka u tkivima može da ima ulogu u razvoju i ishodu tumora. Zlato se nalazi u sastavu različitih kompleksa koji pokazuju efikasan antitumorski odgovor. Neki od protokola koji se koriste za lečenje tumora uključuju kombinovanu primenu preparata koji sadrže cink i zlato.

Ključne reči: Cink, kompleksi zlata, tumor dojke, antitumorski lekovi



INTRODUCTION

According to the World Health Organization, breast cancer accounts for approximately 16% of all types of cancer deaths globally. It is the most frequently diagnosed solid tumour in women, and its incidence increases with age. Both molecular and genetic factors have been documented to play roles in the initiation and promotion of breast tissue oncogenesis (1). Among genetic factors, the most common cause is inherited mutation in the BRCA1 or BRCA2

genes (2). Deregulation of mechanisms that contribute to increased oxidative stress and the consequent genomic instability contribute to breast cancer development (3). The underlying mechanism may also rely on the ability of oestrogen and oestrogen metabolites to generate reactive oxygen species (ROS), which induce DNA synthesis, increased phosphorylation of kinases, and activation of transcription factors responsive to either oxidants (e.g., toxins,



Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (4): 10-10

DOI: 10.1515/SJECR-2015-0044

Corresponding author: Tatjana Kanjevac, DMD, PhD;

Department for Preventive and Pediatric Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia
Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; Tel +381 34306800, Fax +381 34306800112; E-mail: tatjanakanjevac@yahoo.com



including metal compounds) or oestrogen. Environmental factors such as nutrition (obesity and alcohol consumption), smoking, and exposure to carcinogens (e.g., metal compounds) also play a decisive role in breast carcinogenesis. Deficiencies in key micronutrients may contribute to increased cellular stress and associated DNA damage (4-6). In addition, multiple reports show that metallic compounds can function as oestrogen disruptors (7), while other studies emphasize the connection between exposure to metals or metal compounds and breast cancer risk (8,9).

The present review discusses the association of specific metals, zinc and gold, with regard to their effects in contributing to breast cancer oncogenesis and to the beneficial effects of these metals in treating the same cancer.

ZINC TRANSPORTERS IN BREAST CANCER AND ZINC CYTOTOXICITY

Metals and metal compounds have been implicated in breast cancer biology in a few ways. They can be a possible risk factor for development of breast cancer, while on the other hand, their ability to induce cytotoxicity and apoptosis in breast cancer cells can be used for anticancer therapy, or they can be used as diagnostic markers. Zinc is involved in many aspects of cellular metabolism. It is required for the catalytic activity of enzymes, it plays roles in immune function, protein synthesis, wound healing, DNA synthesis, and cell division, and it is critical for the functioning of greater than 3000 transcription factors (10-12). The role of zinc in cell growth and division as well as basal homeostasis is of key importance. Zinc is needed for the stabilization of the nucleic acids DNA and RNA (13). In fact, all RNA polymerases (I, II, and III) are zinc metalloenzymes. Substitution of zinc has been shown to advantage DNA synthesis, while deficiency in this mineral inhibits DNA synthesis (14).

The participation of zinc in a number of physiological processes requires strict control of cellular zinc levels (15). Zinc cannot passively diffuse through the cell membrane and requires transporters for its passage (16,17). In addition, the intracellular distribution of zinc is tightly regulated by a family of proteins that control the uptake, efflux, and compartmentalization of zinc. There are three known families of zinc transporters, the Zrt-Irt-like proteins (ZIP family), the Cation Diffusion Facilitator family, often called the ZnT family, and the zinc-sensitizing MTs (18). The MTs play an important regulatory role in zinc uptake, storage, distribution, and release (19). Transporters of the ZIP family are responsible for the uptake of zinc from outside the cell into the cytoplasm and also contribute to zinc efflux from subcellular organelles into the cytoplasm. Members of the ZnT family of transporters, however, perform the opposite role, functioning in the efflux of zinc from the cytoplasm out of the cell, as well as in the translocation of zinc from the cytoplasm into organelles, effectively decreasing the cytosolic zinc concentration (20). The expression and

cellular distribution of ZIPs and ZnTs are predominantly (but not always) regulated by changes in extracellular and intracellular zinc concentrations. The cellular distribution of zinc into organelles is precisely managed to provide the zinc concentration required by each cell compartment. There is evidence of ZnT and ZIP genetic polymorphisms, which could influence dietary zinc requirements and zinc metabolism (21).

Alterations of both cellular and serum zinc content have been shown in patients with breast cancer (22, 23). There is a 72% increase in zinc concentration in breast cancer tissue in comparison with normal tissue. This evidence regarding breast cancer is coupled with an observed reduction in serum zinc levels (24). In addition to the observed difference in zinc concentration within individual patients, cancerous breast cells tend to accumulate more zinc than ancillary non-cancerous breast cells (25). Significantly higher concentrations of zinc in breast cancer tissues compared to healthy breast tissue and lower levels in serum of patients with breast cancer seems to be due to altered expression of zinc transporters in breast cancer tissue (26-28).

The zinc transporter LIV-1 has been observed to be significant for breast cancer (29, 30). LIV-1 and ZIP10, both from the ZIP family, are associated with breast cancer metastasis to lymph nodes, and they may play a causal role in this process (31). The zinc transporter ZIP10 has been implicated in the migration and metastasis of breast cancer cells, and this invasive behaviour could be inhibited by the knockdown of ZIP10 expression (31). This study was consistent with findings from clinical samples showing that breast cancers with lymph node metastases expressed significantly higher levels of ZIP10 than those without lymph node metastases. Comparable results have been demonstrated with LIV-1 in HeLa cells (32).

ZIP6 is normally localized in the plasma membrane of mammary epithelial cells, where it imports zinc into the cytoplasm (33, 34). High levels of ZIP6 are found in metastatic breast cancer cells (35) and are positively correlated with lymph node metastasis (36), suggesting the possibility that it plays a role in tumour progression. A unique characteristic of ZIP6 is the highly conserved putative metalloprotease motif that resembles the active site found in matrix metalloproteinases (MMPs) (37). Increased expression of certain MMPs is associated with tumour growth, invasion, metastasis and angiogenesis and correlates with poor prognosis (38).

ZnT2 is abundantly expressed in the mammary gland and is over-expressed in ER+T47D cells (39). Hyperaccumulation of Zn in the malignant T47D breast tumour cells is correlated with ZnT2 overexpression and increased vesicular zinc pools. Further, attenuation of ZnT2 expression in malignant cells protects the metallothionein-null breast tumour cells from zinc-induced cytotoxicity by redirecting zinc into vesicular compartments (39). Because malignant breast cancer cells accumulate zinc, and exposure



to high levels of zinc activates apoptosis (40), mechanisms have evolved to protect cells against zinc-modulated cell death. Two genetic variants of ZnT2 have been characterized that may further implicate ZnT2 dysfunction in breast disease (41).

The broad involvement of zinc in biological processes indicates that aberrations in zinc status may play a significant role in cellular dysfunction, including the development and/or progression of cancer. Zinc is known to be essential for cell proliferation (42, 43) and may play a role in tumour growth (22-24). The effects of growth factors on proliferation are accompanied by an increase in the concentrations of labile zinc, whereas in the absence of zinc, cells are arrested in the S-phase, with cell proliferation being attenuated (10).

Opposing effects of exposure to zinc on cell survival have been described. Effects of high concentration of zinc in cells appear to be cell-type dependent. It has been reported that zinc induces apoptosis in different cells, including epithelial cells of prostate, ovaries, oesophagus, neurons, glial cells, and hepatoma cells. On the other hand, zinc has anti-apoptotic effects on breast and lung epithelial cells, renal cells, macrophages, lymphocytes, thymocytes, and pancreatic acinar cells (44). Further, it has been shown that exposure to low zinc levels induces apoptosis, whereas exposure to high zinc levels inhibits apoptosis (45). There is still no explanation for these apparently opposite actions of zinc. However, because of the critical role that zinc plays in biological systems and its unique properties, zinc has become a potential anticancer agent.

GOLD METALLOPROTEINS IN ANTICANCER THERAPY

Gold in solution exists as Au⁺ and Au³⁺. It has intriguing properties because gold does not react with water, air, oxygen, ozone, nitrogen, fluorine, hydrogen, sulfur, iodine or hydrogen sulfide under normal conditions.

An important issue, both theoretically and experimentally, is the interaction between gold and DNA. Recent experimental studies have shown that DNA bases, adenine (A), thymine (T), guanine (G), and cytosine (C), interact with Au surfaces in a specific and sequence-dependent manner. The relative binding affinities of these nucleobases for adsorption on polycrystalline Au films obey the following order: A > C ≥ G > T. Two key bonding ingredients underlie the base-gold and base pair-gold hybridizations: the anchoring, either of the Au-N or Au-O type, and the nonconventional N-H Au hydrogen bonding. The former is the leading bonding factor and results in stronger binding and coplanar coordination when the ring nitrogen atoms of the nucleobases are involved (46).

One of the most commonly proposed mechanisms for gold (III) compound-induced cytotoxicity is the induction

of apoptosis by mitochondrial death pathways related to reactive oxygen species (ROS) (47). Gold(III) tetraphenylporphyrin downregulates the expression of genes involved in angiogenesis and inhibits formation of microvessels by epithelial cells. Further, gold(III) tetraphenylporphyrin has been shown to inhibit migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells (48).

Several gold(I) and gold(III) complexes have shown *in vitro* anticancer properties against human cancer cell lines, including cell lines resistant to cisplatin. Cysteine-containing proteins appear to be likely targets for gold complexes due to the thiophilicity of gold. Among these proteins, Cys4 zinc finger domains have attracted significant attention because gold(I) and gold(III) complexes have been shown to inhibit poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase-1, an essential protein involved in DNA repair and cancer resistance to chemotherapies (49).

Gold(III) complexes have shown promising results as anticancer agents due to their high cytotoxic effects on tumour cells both *in vitro* in tumour cell lines and *in vivo*, but they show reduced or even absent systemic or renal toxicity (50). In the presence of aurothioglucose, A549 human lung cancer cells exhibited a marked reduction in growth kinetics.

GOLD NANOPARTICLES IN THERAPY FOR BREAST CANCER

Ultrasmall gold nanoparticles (GNPs) consisting of a few to roughly one hundred gold atoms are promising candidates for delivery vehicles for anticancer drugs (51). Colloidal gold nanoparticles have great potential to overcome delivery limitations because of their biocompatibility, low toxicity, small size, and tuneable surface functionalities. If they are exposed to the biologicals in fluid, a protein adsorption layer forms around them. Gold nanoparticles have been coated with different biological agents including tumour necrosis factor, paclitaxel, and docetaxel (52-55). It was shown that compared with free or liposomal doxorubicin, doxorubicin-conjugated hollow gold nanoshells (HAuNSs) stimulated with an NIR laser enhanced eradication of tumours *in vivo* and were less cardiotoxic, most likely because the conjugated form was associated with less free doxorubicin in the blood (56).

A number of studies have shown that gold nanoparticles conjugated with antibodies are efficient in targeting and destroying cancerous tissue (57). A 4-component antibody-phthalocyanine-polyethylene glycol-gold nanoparticle conjugate is described as a potential drug for targeted photodynamic therapy of breast cancer. Gold nanoparticles, stabilized with a self-assembled layer of a zinc-phthalocyanine derivative (photosensitizer) under irradiation with visible red light efficiently produced cytotoxic singlet oxygen. It was shown that these gold nanoparticles, when conjugated with anti-HER2 monoclonal antibody, could be



effective photodynamic therapy agents for breast cancer cells that overexpress HER2 (58).

Another form of nanoparticles, Au-Fe₃O₄ conjugated with anti-HER2 monoclonal antibody and cisplatin, allowed target-specific delivery of platinum compounds to HER2-positive cells. Cisplatin conjugated to nanoparticles is released in endosomes after uptake of the conjugates, and it is considered that intracellular release of cisplatin is stimulated by the lower pH in endosomes (59). The higher release of cisplatin is followed by higher cytotoxicity (60).

CONCLUSION

Metals and metal compounds interfere with breast cancer in several means. Under specific conditions, they can represent possible risk factors for development of breast cancer, but their cytotoxicity might also have beneficial effects in inducing apoptosis and cytotoxicity in breast cancer cells. These include zinc- and gold-containing complexes, which have allowed significant progress in the pursuit of developing novel anticancer drugs. Advantages of metal-containing compounds are based on their ability to coordinate ligands in three-dimensional configurations, thus allowing functionalization of groups that can be tailored to defined molecular targets.

REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100; 57–70.
- Sotiriou C, Pusztai L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 360; 790–800.
- Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. (2010). Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*. 3; 23–34.
- Milner JA. (2004). Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr*. 134; 2492S–2498S.
- Fenech M, Ferguson LR. (2001). Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mut Res*. 475; 1–6.
- Ivetic M, Velicki R, Popovic M, Cemerlic-Adjic N, Babovic SS, Velicki L. (2010). Dietary influence on breast cancer. *Journal of BUON*. 15(3); 455-461.
- Siewit CL, Gengler B, Vegas E, Puckett R, Louie MC. (2010). Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between Erα and c-Jun. *Molecular Mol Endocrinol*. 24(5); 981-992.
- Gallagher CM, Chen JJ, Kovach JS. (2010). Environmental cadmium and breast cancer risk. *Aging*. 2(11); 804-814.
- McElroy JA, Shafer MM, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA. (2006). Cadmium exposure and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 98(12); 896-873.
- Sandstead HH. (1994). Understanding zinc: recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med*. 124(3); 322-327.
- Heyneman CA. (1996). Zinc deficiency and taste disorders. *Ann Pharmacother*. 30(2); 186-187.
- HoE, Ames BN. (2002). Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFκappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(26); 16770-16775.
- Fuwa K, Wacker WE, Druyan R, Bartholomay AF, Vallee BL. (1960). Nucleic Acids and Metals II: Transition Metals as Determinants of the Conformation of Ribonucleic Acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 46; 1298-1307.
- Paski SC, Xu Z. (2001). Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. *J Nutr Biochem*. 12; 655-661.
- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*. 5; 196-201.
- Sekler I, Sensi SL, Hershinkel M, Silverman WF. (2007). Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med*. 13; 337-343.
- Gaither LA, Eide DJ. (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*. 14; 251-270.
- McClelland RA, Manning DL, Gee JM, Wishler P, Robertson JE, Ellis IO, Blamey RW, Nicholson RL. (1998). Oestrogen-regulated gene sin breast cancer: Association of pLIV1 with response to endocrine therapy. *Br J Cancer*. 77; 1653-1656.
- Vašák M, Hasler DW. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol*. 4(2); 177-183.
- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*. 5(1); 196-201.
- Liuzzi JP, Cousins RJ. (2004). Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr*. 24; 151-172.
- DeWys W, Pories W. (1972). Inhibition of spectrum of animal tumors by dietary zinc deficiency. *J Natl Cancer Inst*. 48(2); 375-381.
- McQuitty JT Jr, DeWys WD, Monaco L, Strain WH, Rob CG, Apgar J, Pories WJ. (1970). Inhibition of tumor growth by dietary zinc deficiency. *Cancer Res*. 30(5); 1387-1390.
- Chakravarty PK, GhoshA, Chowdhury JR. (1976). Zinc in human malignancies. *Neoplasma*. 33(1); 85-90.
- Mulay IL, Roy R, Knox BE, Suhr NH, Delaney WE. (1971). Trace-metal analysis of cancerous and non cancerous human tissues. *J Natl Cancer Inst*. 47(1); 1-13.
- Chasapis CT, Luotsidou AC, Spiliopoulou, Stefanidou ME. (2013). Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol*. 86(4); 521-534.
- Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. 1983. Cooper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*. 52(5); 866-872.
- Alam S, Kelleher SL. (2012). Cellular mechanisms of zinc dysregulation: a perspective on zinc homeostasis as an etiological factor in the development and progression of breast cancer. *Nutrients*. 4(8); 875-903.



29. El-Tanani MK, Green CD. (1995). Oestrogen-induced genes, pLIV-1 and pS2, respond divergently to other steroid hormones in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 111(1); 75-81.
30. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Hadley LJ, Nicholson RI. (2003); Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J.* 375(Pt1); 51-59.
31. Kagara N, Tanaka N, Noguchi S, Hirano T. (2007). Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 98(5); 692-697.
32. Zhao L, Chen W, Taylor KM, Cai B, Li X. (2007). LIV-1 suppression inhibits HeLa cell invasion by targeting ERK/2-Snail/Slug pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 363(1); 82-88.
33. Kelleher SL, Seo YA, Lopez V. (2009). Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes Nutr.* 4(2); 83-94.
34. Lichten LA, Cousins RJ. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu rev nutr.* 29; 153-176.
35. McClelland RA, Manning DL, Gee JM, Willsher P, Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW, Nicholson RI. (1998). Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with response to endocrine therapy. *Br J Cancer.* 77(10); 1653-1656.
36. Manning DL, McClelland RA, Gee JM, Chan Cm, Green CD, Blamey RW, Nicholson RI. (1993). The role of four oestrogen-responsive genes, pLIV1, pS2, pSYD3 and pSYD8, in predicting responsiveness to endocrine therapy in primary breast cancer. *Eur J Cancer.* 29A(10); 1462-1468.
37. Taylor KM, Nicholson RI. (2003). The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1611(1-2); 16-30.
38. Egeblad M, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2(3); 161-174.
39. Lopez V, Foolad F, Kelleher SL. (2011). ZnT2-overexpression represses the cytotoxic effects of zinc hyperaccumulation in malignant metallothionein-null T47D breast tumor cells. *Cancer Lett.* 304(1); 41-51.
40. Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, Zalewski PD. (2000). Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/genedirected cell death. *J Nutr.* 130(5S Suppl); 1459-1466.
41. Seo YA, Lopez V, Kelleher SL. (2011). A histidine-rich motif mediates mitochondrial localization of ZnT2 to modulate mitochondrial function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(6); 1479-1489.
42. Prasad AS, Beck FW, Endre L, Handschu W, Kukuruga M, Kumar G. (1996). Zinc deficiency affects cell cycle and deoxythymidine kinase gene expression in HUT-78 cells. *J Lab Clin Med.* 128(1); 51-60.
43. Paski SC, Xu Z. (2002). Growth factor stimulated cell proliferation is accompanied by an elevated labile intracellular pool of zinc in 3T3 cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 80(8); 790-795.
44. Franklin RB, Costello LC. (2009). The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *J Cell Biochem.* 106(5); 750-757.
45. Provinciali M, Di Stefano G, Fabris N. (1995). Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharmacol.* 17(9); 735-744.
46. Djeković A, Petrović B, Bugarić ZD, Puchta R, van Eldik R. (2012). Kinetics and mechanism of the reactions of Au(III) complexes with some biologically relevant molecules. *Dalton Trans.* 41(13); 3633-3641.
47. Wang Y, He QY, Sun RW, Che CM, Chiu JF. (2005). Gold(III) porphyrin 1a induced apoptosis by mitochondrial death pathways related to reactive oxygen species. *Cancer Res.* 65(24); 11553-11564.
48. Lum CT, Liu X, Sun RW, Li XP, Peng Y, He ML, Kung HF, Che CM, Lin MC. (2010). Gold(III) porphyrin 1a inhibited nasopharyngeal carcinoma metastasis in vivo and inhibited cell migration and invasion in vitro. *Cancer Lett.* 294(2); 159-166.
49. Jacques A, Lebrun C, Casini A, Kieffer I, Proux O, La-tour JM, Sénèque O. (2015). Reactivity of Cys4 zinc finger domains with gold(III) complexes: insights into the formation of „gold fingers“. *Inorg Chem.* 54(8); 4104-4113.
50. Arsenijević N. (2012). Biological Effects of Gold(III) Complexes Tested in Vitro and in Vivo. In: Kretsinger RH, Uversky VN & Permyakov EA. *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp. 933-935). New York, Heidelberg, Dordrecht, London:Springer.
51. Jain S, Coulter JA, Hounsell AR, Butterworth KT, McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Dickson GR, Prise KM, Currell FJ, O'Sullivan JM, Hirst DG. (2011). Cell-Specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radial Oncol Biol Phys.* 79(2); 531-539.
52. Paciotti GE, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L. (2004). Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 11(3); 169-183.
53. Huschka R, Zuloaga J, Knight MW, Brown LV, Nordlander P, Halas NJ. (2011). Light-induced release of DNA from gold nanoparticles: nanoshells and nanorods. *J Am Chem. Soc.* 133(31); 12247-12255.
54. Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER. (2007). Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 129(37); 11653-11661.
55. Liu H, Chen D, Li L, Liu T, Tan L, Wu X, Tang F. (2011). Multifunctional gold nanoshells on silica nanorattles: a platform for the combination of photothermal therapy and chemotherapy with low systemic toxicity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50(4); 891-895.
56. You J, Zhang R, Zhang G, Zhong M, Liu Y, Van Pelt CS, Liang D, Wei W, Sood AK, Li C. (2012). Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release. *J Control Release.* 158(2); 319-328.



57. Lee J, Chatterjee DK, Lee MH, Krishnan S. (2014). Gold nanoparticles in breast cancer treatment: promise and potential pitfalls. *Cancer Lett.* 347(1); 46-53.
58. Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. (2011). Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem Photobiol Sci.* 10(5); 822-831.
59. Xu C, Wang B, Sun S. (2009). Dumbbell-like Au-Fe₃O₄ nanoparticles for target-specific platinum delivery. *J Am Chem Soc.* 131(12); 4216–4217.
60. Joshi P, Chakraborti S, Ramirez-Vick JE, Ansari ZA, Shanker V, Chakrabarti P, Singh SP. (2012). The anticancer activity of chloroquine-gold nanoparticles against MCF-7 breast cancer cells. *Colloid Surf B Bio-interfaces.* 95; 195–200.

PLATINUM COMPLEXES WITH EDDA ETHYLENEDIAMINE *N,N'* DIACETATE LIGANDS AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS

Milena Jurišević¹, Gordana Radosavljević², Aleksandar Arsenijević², Marija Milovanović², Nevena Gajović², Dragana Djordjević², Jelena Milovanović^{2,3},
Bojana Stojanović^{2,4}, Aleksandar Ilić², Tibor Sabo⁵, Tatjana Kanjevac⁶

¹ Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

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

³ Department for Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁴ Department for Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

⁵ Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Serbia

⁶ Department for Preventive and Paediatric Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

KOMPLEKSI PLATINE SA EDDA ETILENDIAMIN *N,N'* DIACETAT LIGANDIMA KAO POTENCIJALNI ANTITUMORSKI AGENSI

Milena Jurišević¹, Gordana Radosavljević², Aleksandar Arsenijević², Marija Milovanović², Nevena Gajović², Dragana Djordjević², Jelena Milovanović^{2,3},
Bojana Stojanović^{2,4}, Aleksandar Ilić², Tibor Sabo⁵, Tatjana Kanjevac⁶

¹ Katedra za kliničku farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

² Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

³ Katedra za histologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁴ Katedra za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

⁵ Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

⁶ Katedra za preventivnu i dječiju medicinu, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Primljen: 18.05.2016.

Accepted / Prihvaćen: 23.05.2016.

ABSTRACT

The design of platinum based drugs is not a new field of interest. Platinum complexes are widely used as anticancer agents and currently, approximately 30 platinum(II) and platinum(IV) entered into some of the phases of clinical trials. A special place in today's research belongs to platinum complexes with diammine ligands. A large number of edda (ethylenediamine-*N,N'*-diacetate)-type ligands and their corresponding metal complexes has been successfully synthesized. This article summarizes recent progress in research on edda-type-platinum complexes. Some of these agents achieves better effect compared to the gold standard (cisplatin). It has been shown that there is a possible relationship between the length of the ligand ester group carbon chain and its cytotoxic effect. In most cases the longer the ester chain is the greater is the antitumor activity. Of particular interest are the noticeable effects of some new platinum compound with edda-type ligand on cell lines that are known to have a high level of cisplatin-resistance. Examine complexes appear to have a different mode of mechanism of action compared with cisplatin which includes apoptotic and necrotic cell death. There are indications that further investigations of these compounds may be very useful in overcoming the problems associated global cancer statistic.

Key words: platinum complexes, edda ligand, cytotoxicity

SAŽETAK

Kompleksi platine koriste se kao osnova za dizajn novih lekova. Oni su u širokoj upotrebi kao antitumorski agensi i do danas je oko 30 kompleksa platine(II) i platine(IV) u nekoj od faza kliničkog ispitivanja. Posebno mesto u današnjim istraživanjima zauzimaju kompleksi metala sa edda ligandima. Uspešno je sintetisan veliki broj novih edda liganda i odgovarajućih kompleksa. Neki od ovih agensa pokazuju bolju aktivnost od zlatnog standarda, cisplatin. Pokazano je da postoji moguća veza između dužine ugljovodoničnog lanca estraske grupe liganda i citotoksičnog efekta. U većini slučajeva dužina lanca direktno korelira sa antitumorskom aktivnošću. Zabeležena je efikasnija citotoksična aktivnost određenih kompleksa platine sa edda ligandima na ćelijskim linijama tumora koji pokazuju odgovarajući stepen rezistencije na cisplatinu. Ispitivani kompleksi imaju različiti mehanizam dejstva od cisplatin, koji uključuje elemente nekrotične i programirane ćelijske smrti. Postoje nagoveštaji da dalja istraživanja ovih agensa mogu biti značajna za prevazilaženje globalnog problema sa kojim se svet danas suočava, a koji se odnosi na stalni porast osoba obolelih od karcinoma.

Ključne reči: kompleksi platine, edda ligandi, citotoksičnost



UDK: 615.277.07:546.92 386 / SER,JEXP CLIN RES 2016;17 4 :285 295
DOI: 10.1515/SJECR 2016 0042

Corresponding author: Milena Jurišević
e Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Moravska 4, 34000 Kragujevac, Serbia
E-mail: milenajm@yahoo.com; Tel: +381 64 204 28 28

285



INTRODUCTION

The era of modern medical chemistry, which includes drugs based on metals, began with discovery of cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum(II)) (1). It appears that metal complexes are a solid basis for the design of new drugs. A vast number of geometric isomers and different coordination numbers of metallic ions enable fine-tuning of both kinetic (ligands substitution rate) and thermodynamic (strength of metal-ligand bonds, electrode potential) parameters during synthesis of metal complexes – a potential drug (2-5). Ligands play a significant role in design and synthesis of novel complexes, both due to their ability to recognize sites where a complex should bind in a target cell, and the redox processes involved when a ligand that may be released in the cell (6-10).

Platinum complexes are widely used as anticancer agents and currently, approximately 30 platinum(II) and platinum(IV) complexes have entered into some phase of clinical trial (11). A special place in current research belongs to platinum complexes with diamine ligands. A large number of edda (ethylenediamine-*N,N'*-diacetate)-type ligands and their corresponding metal complexes (platinum, ruthenium, cobalt and palladium) have been successfully synthesized (12). Among them, platinum and ruthenium complexes stand out due to their anticancer effects, which have been confirmed on a large panel of different tumour cell lines.

DESIGN AND BIOLOGICAL EVOLUTION OF PLATINUM BASED DRUG

Cisplatin is the first platinum-based drug with anticancer effect approved by the FDA (Food and Drug Administration) and it is most efficient in treatment of many tumors including testicular, ovarian, kidney and neck cancer (2,13). After intravenous administration, cisplatin remains structurally unaltered due to the high concentration of chloride in blood plasma (100 mM). It reaches tumor cells by either simple diffusion through cell membrane or active transport by copper transporter CTR1 (14-16). Due to much lower concentration of chloride ions in cytosol (3-20 mM) compared to extracellular fluid, there is rapid hydrolysis and substitution of chloride ligands by modified water molecules. After hydrolysis, the platinum cationic complex ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$) enters nucleus where it forms a coordinative bond with nitrogen atoms of nucleic bases of DNA, usually guanine (17,18). A bifunctional GG macrochelate is formed through coordination with guanine nitrogen atoms from adjacent DNA chains. $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ represents a chain between DNA strands. The modified DNA is permanently damaged and impossible to be used for transcription and replication, resulting cell cycle arrest and consequently apoptosis (18-21).

Despite extraordinary success of cisplatin, this drug has a number of drawbacks (22). For example cisplatin does

not show sufficient selectivity towards tumor cells and cause nephrotoxicity, ototoxicity, or anemia (23,24). However, from the chemical standpoint, the platinum(II) complex is highly reactive. It may react with sulphur-containing amino acids (Cys and Met), such as metallothionein and albumin. In the cell, in the $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ form, it can react with different chemical classes, carbonate ions, phosphates, methionine, glutathione or metallothioneins. All this greatly reduces efficiency and utilization of this drug (3,19,24-27). It has therefore been necessary to synthesize more selective and less reactive molecule. This led to platinum complexes of the second and third generation (28-30). Complexes of the second generation are structural analogs of cisplatin, designed to overcome the toxicity of cisplatin, while the third generation complexes were created as even more advanced analogues with the main task to act on tumor cells resistant to cisplatin. Since the FDA approved cisplatin as drug, seven more platinum(II) complexes have been introduced to clinical use: 2 of them worldwide (carboplatin and oxaliplatin) and 5 of them in certain countries (nedaplatin, loboplatin, heptaplatin, miriplatin and cycloplatin) (31-33).

It has been found that each ligand has a role in the structure-activity relationship of synthesized complex compound. L-ligands, permanent ligands, form the strongest bond with platinum and remain intact in the final compound of the complex and DNA (34,35). The resistance of tumor cells to the drug mainly depends on these ligands. Oxaliplatin is an analogue of cisplatin, which has a more voluminous and hydrophobic diaminocyclohexyl ligand that “fits” in a major DNA groove thus preventing access to enzymes which “fix” DNA. The main advantage of oxaliplatin compared to cisplatin is that it acts on tumor cells resistant to cisplatin. Currently, it is the drug of choice for colorectal cancer (21,36). Pt-X bond (X is an outgoing ligand) is the weakest, and this is the place of possible hydrolysis in the cell. Therefore, this ligand directly affects the kinetics of reaction between the drug and DNA (34). Modification of these X-ligands can be achieved by reducing the number of side reactions in the cell. Both L and X ligand groups affect lipophilicity and solubility of the complex. Carboplatin (*cis*-diammine-1,1-cyclobutanedicarboxylateplatinum(II)) has in its structure bidentate cyclobutane dicarboxylate ligand which has impact on reduction of number of side reactions of this drug in the cell. These changes eliminated nephrotoxicity of carboplatin (23).

Due to the many side reactions of cisplatin and its analogues in cells, QSAR (quantitative structure activity-relationship) assessments of platinum(IV) complex are beginning. These complexes, $5d^6$ low spin electron configurations of Pt(IV) ion have octahedral geometry, which compared to platinum(II) complexes provides two new axial ligands, thereby increasing the kinetic stability and reducing the reactivity of these complexes compared to platinum(II) complexes. These ligands should be lipophilic to facilitate easier complex passage through the membrane

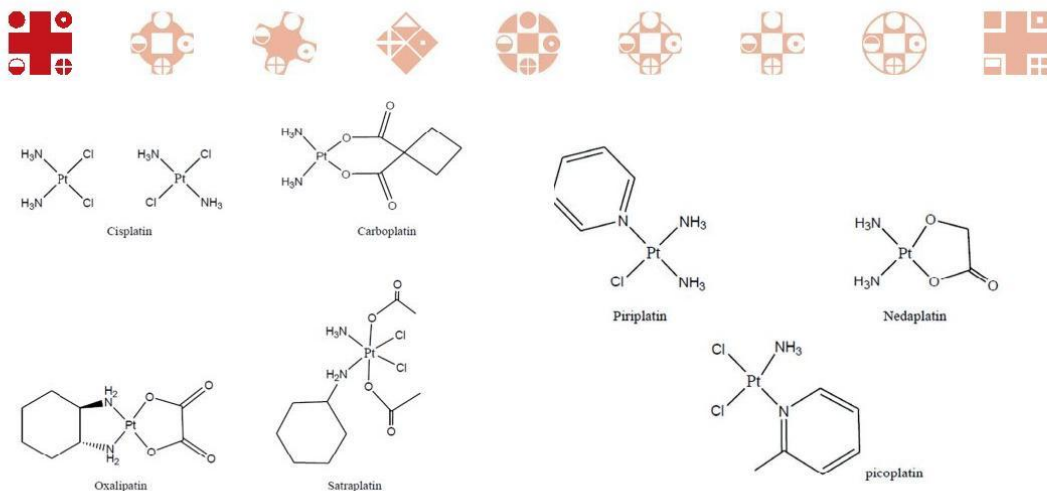


Figure 1. Structural formulae of platinum drug

and to make Pt-ligand bond stronger, so there would not be any hydrolysis and side reactions. Furthermore, these ligands are potential binding sites for so-called carriers in cells, nanoparticles that allow smooth passage of the drug to target site in a cell. It is assumed that this structure of platinum(IV) complex affects stability of the complex, which is the basis for their potential oral use (34, 37).

It was believed that octahedral platinum(IV) complexes are more inert in blood circulation and that they will be activated when they enter the cell. By cell entering Pt(IV) complexes will lose Pt(II) species which are responsible for cytotoxicity (38). It was believed that this fact will allow platinum(IV) complexes to be superior over the platinum(II) complexes regarding the degree of resistance, side effects and possible oral administration. The first attempt to synthesize a whole new drug platinum(IV) based line, in context of prodrugs, has been made by Rosenberg (6). Platinum(IV) complexes cis -[Pt(NH₃)₂Cl₄], $trans$ -[Pt(NH₃)₂Cl₄] and [Pt(en)Cl₄] were soon abandoned because they showed less anticancer activity than cisplatin. By today, two most prosperous agents are satraplatin (JM216) and LA-12 (Figure 1) (39, 40). The greatest success was with complex of JM216 - satraplatin. Satraplatin is a lipophilic molecule, easily enters the cell, it is inert and stable, and because of all this has potential for oral administration. It is reduced within the cell by the cytochrome C, and then by hemoglobin as well in the presence of NADH. Satraplatin is characterized by a comfort drug use (can be used orally) for patient unlike other Pt(II) drugs that can only be used intravenously. The presence of intracellular agents as glutathione, ascorbic acid and others is required for reduction of satraplatin and therefore for its activation (41). Also satraplatin can be used for treatment of prostate, lung and ovarian tumors with little signs of nephro-, neuro- and ototoxicity. LA12 is a satraplatin analogue and future investigation will probably demonstrate that it may be used for ovarian carcinoma resistant on cisplatin, or even colorectal tumors (42,43).

A series of platinum(IV) complexes similar to JM216 has also been synthesized, with aliphatic, aromatic and alicyclic amines, with straight and branched chain, which showed higher activity compared to cisplatin. Despite major efforts and detailed studies and predictions, none of platinum(IV) complexes, including JM216, has not been approved for clinical use. Very good results of biological tests of oxaliplatin and satraplatin encouraged the idea of synthesis of platinum(II) and platinum(IV) complex with edda type ligands as their analogues, in order to obtain better anti-cancer agents (42,43).

R₂EDDA TYPE LIGAND

Since the beginning of platinum derivatives exploration, less attention has been given to aminocarboxylate ligand complexes. Liu (44) was the first who showed the coordination of ethylenediamine-*N,N'*-diacetate with platinum(II). Unfortunately, he obtained [Pt(H₂edda)Cl₂] complex in which both carboxylate groups were protonate, mainly due to synthesis conditions, which left platinum(II) coordination sphere the same as in [Pt(en)Cl₂]. Over the coming years, investigations of complexes with edda and related ligands have attracted the attention, chiefly because the good chelating ability of the ligands which may indicate a variety of complexes' stereochemical and physical properties. Ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (edda) contains two nitrogens and also two oxygens as donor atoms. It acts as a tetradentate ligand in the case of complete coordination. R₂ edda ligand type belongs to the dialkyl esters group of ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (H₂edda), di(iso)propionic acid (H₂eddp, H₂eddip), di-2-(3-cyclohexyl)-propanoic acid (H₂eddch), di-2-(3-methyl)-butanoic acid (H₂eddv), di-2-(4-methyl)-pentanoic acid (H₂eddl), as well as propylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (H₂pdda) (Figure 2). Edda ligands can very easily be esterified, and during the complete coordination edda- ligands type esters mainly behave as

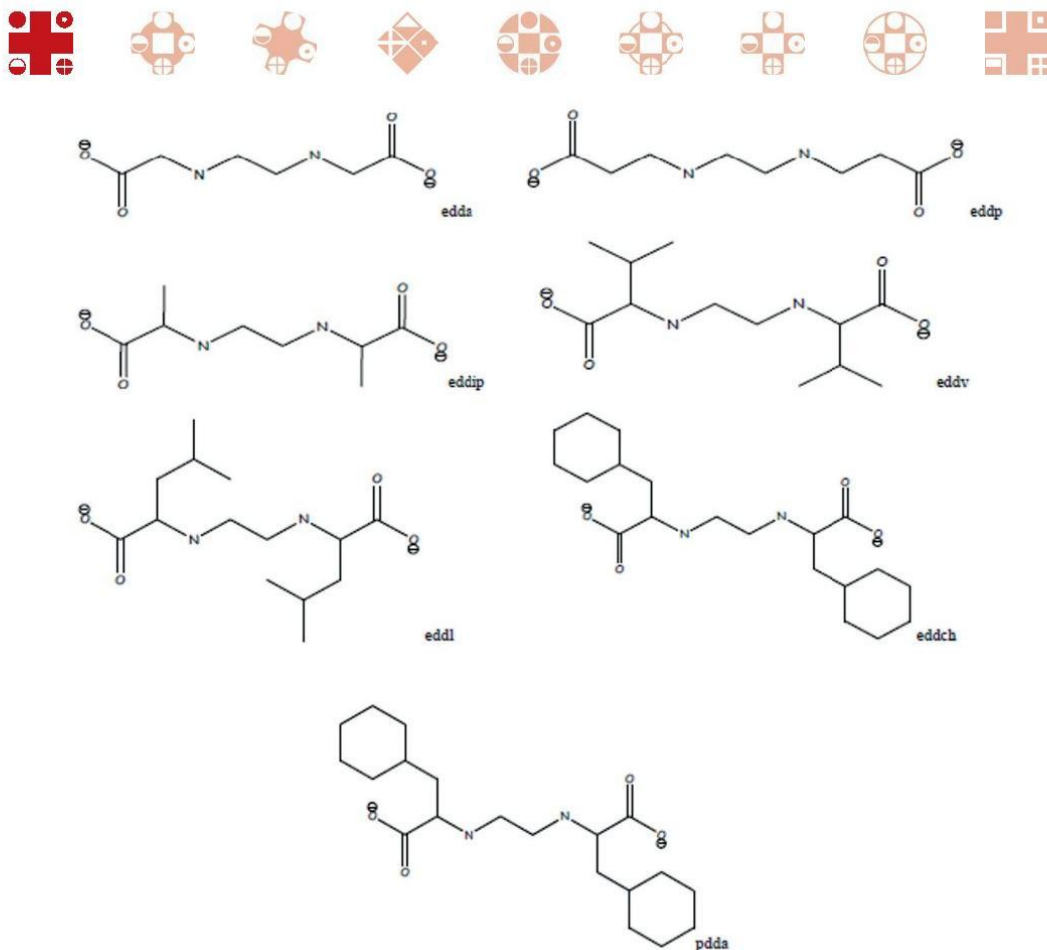


Figure 2. Structural formulae of edda acid types (anionic form)

bidentate ligands. In some cases, hydrolysis of one or both of ester groups occurs, thus the ligands may behave as bidentate or tridentate, respectively (45).

CYTOTOXICITY OF PLATINUM COMPLEXES WITH EDDA TYPE LIGANDS

Platinum complexes with edda-type ligands

Platinum(II) and platinum(IV) complexes with ethylenediamine ligands, *N*-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine (heen), *N,N'*-bis(2-hydroxyethyl)ethylenediamine (he2n), ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (H_2 edda) and ethylenediamine-*N*-monoacetic acid (hedma) were examined in order to reveal their cytotoxicity on different cell lines of human ovarian carcinoma (Table 1) (45). These complexes have temperate cytotoxic effects, through they were significantly lower than those of cisplatin and JM-216. It has been proven that platinum(II)/(IV) complexes with multidentate ligands *N*-(2-hydroxyethyl)ethane-1,2-diamine

(NNOH) and ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (H_2 edda) have a different influence on CH1, 41M and Skov-3 cell line than on cisplatin resistant cell lines (Table 1) (46). While platinum(IV) complex with *NN'* donor set is 2-5 five times more potent against cisplatin sensitive/resistant cell lines, in comparison with platinum(II) complex, but with complexes with edda ligand situation is entirely different - platinum(II) complexes are far more active. Platinum(IV) complexes with ligands dialkylesters of ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (R_2 edda) $[PtCl_4(R_2edda)] \times H_2O$ ($R = Me, Et, n-Pr$) were also investigated primarily to clarify influence at length of carbon chain in ester group on antiproliferative effect *in vitro* (Figure 3) (47). Examinations were performed on severe human tumor cell lines (Table 1). It was shown that by replacing methyl group in ester chain by ethyl or propyl group cytotoxic effect will be increased - the longer the ester chain is, the greater is the antitumor activity. The absence of this trend is observed on DLD-1 cell line. Complexes $[PtCl_4(Et_2edda)]$ and $[PtCl_4(Pr_2edda)]$ achieved highest cytotoxic activity on cisplatin-resistant



Table 1. Cytotoxic effect of Platinum complexes with edda ligand type

Ligand type	Pt complex	Carbon chain in ester group (R)	Cell line	Cytotoxic effect comparing to cisplatin		Study
edda	IV	Me, Et, <i>n</i> -Pr	testicular germ cell tumors (1411HP, H12.1), colon carcinoma (DLD-1), melanoma (518A2), liposarcoma and lung carcinoma (A549)	lower	stronger cytotoxic efficacy in cisplatin-resistant 1411HP cells (compared to other cell lines) [ca. 35–40 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 2.7 M])	Kaludjerovic et al (2008) ⁴⁷
	II	Me, Et, <i>n</i> -Pr	melanoma (5182A), human thyroid carcinoma (8505C), head and neck tumor (A253), cervix (A431), lung (A549), ovarian (A2780), breast (MCF-7) and all colon (HT-29, HCT-8, DLD-1, SW1736)	lower	<i>n</i> -Pr complex showed the highest action against ovarian (A2780) cells [IC ₅₀ value of 51 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 0.55 M])	Kaludjerovic et al (2014) ⁴⁸
eddp	IV	BrJ	human ovarian cancer (A2780/ A2780cisR)	lower	A2780 cell line: Pt complexes [IC ₅₀ value ca. 30–90 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 0.2 M]) A2780cisR cell line: Pt complexes [IC ₅₀ value ca. 90–270 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 3.5 M])	Sabo et al (2004) ⁴⁹
		Et and <i>n</i> -Pr	ovarian (A2780), cervix (A431), melanoma (518A2), lung (A549), head and neck (FaDu), colon (HT-29, HCT-8, DLD-1, 8505C, SW480)	lower	PtCl(<i>n</i> -Pr, eddp) has highest effect on A2780, 518A2 and A549 cell lines [IC ₅₀ value 8.6 M / 17.99 M / 20.81 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 0.5 M / 1.5 M / 1.5 M])	Kaludjerovic et al (2009) ⁴²
	II and IV	<i>n</i> -Bu	melanoma (B16)	more potently	N/A	Maksimovic-Ivanic et al (2012) ⁴³
		<i>n</i> -Bu, <i>n</i> -Pe/ BrJ	human cervix adenocarcinoma (HeLa), human myelogenous leukemia (K562)	lower	Pt(dveddp)Cl ₂ effect on K562 cell line is closest to cisplatin [IC ₅₀ value 5.87 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 5.0 M])	Kaludjerovic et al (2005) ⁵⁰
eddp and pdda	IV	<i>n</i> -Bu, <i>n</i> -Pe/ Br	mouse fibrosarcoma (L929), human astrocytoma (U251)	comparable	best results were gained with platinum(IV) complexes [PtCl ₂ (R, eddp) (K562 cell line [IC ₅₀ value 5.87 M] vs. cisplatin [IC ₅₀ 5.0 M])	Kaludjerovic et al (2005) ⁴⁴
(S,S) eddp	II and IV	<i>i</i> -Pr, <i>i</i> -Bu	human cervix adenocarcinoma (HeLa), human myelogenous leukemia (K562), malignant melanoma (Fem-x cell)	lower	Pt(IV) isopropyl (S,S) eddp complex is most active [IC ₅₀ value 30.48 M / 12.26 M / 13.68 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 4.47 M / 5.77 M / 4.7 M])	Krajcinovic et al (2008) ⁵⁶
		BrJ	rat glioma cell line (C6), human glioma cell line (U251), mouse fibrosarcoma cell line (L929)	lower	IC ₅₀ value of cisplatin 9.8 M / 23.6 M / 19.3 M vs. IC ₅₀ values of Pt(IV) complexes were over then 100 M	Djinovic et al (2010) ⁵⁵
	IV	<i>n</i> -Pr, <i>n</i> -Bu, <i>n</i> -Pe	the colon cancer adenocarcinoma cell line (HTC-116), breast cancer cell line (MDA-MB-231)	more potently (<i>n</i> -Pr and <i>n</i> -Pe)	<i>n</i> -Pr effect on HCT-116 cells - [IC ₅₀ value of 77.68 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 263.66 M]) and on MDA-MB-231 cells (72h) [IC ₅₀ value of 64.21 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 114.31 M]) <i>n</i> -Pe effect on HCT-116 cells - [IC ₅₀ value of 96.08 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 263.66 M]) and on MDA-MB-231 cells (24h) [IC ₅₀ value of 238.60 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 425.32 M])	Stojkovic et al (2014) ⁵⁴
eddp and (S,S) eddp	II and IV	<i>i</i> -Pr, <i>i</i> -Bu; cyclopentyl	mouse colon cancer (CT26CL25), colon cancer (HTC116 and SW620), prostate cancer (PC3 and LNCaP), glioblastoma (U251), human melanoma (A375), and murine melanoma (B16)	more potently (Platinum(IV) complexes)	IC ₅₀ value of platinum(IV) complexes is up to 31 times lower than that of the corresponding platinum(II) complexes Platinum(IV) complexes on CT26CL25, HCT116, SW620, and B16 cell lines [IC ₅₀ ca. 35–100 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ ca. 45–120 M])	Kaludjerovic et al (2012) ⁵⁷
eddp	II	Et, <i>n</i> -Pr, <i>n</i> -Bu, <i>n</i> -Pe	human colon cancer cell lines (HCT 116, SW480 and CaCo-2)	more potently	<i>n</i> -Bu Pt(II) complex has highest effect [IC ₅₀ value 11.23 M / 5.09 M / 4.02 M] (vs. cisplatin [IC ₅₀ 161.25 M / 51.64 M / 64.74 M])	Volarevic et al (2013) ³⁸
meddch	IV	H, Me, Et, <i>n</i> -Pr and <i>n</i> -Bu	Glioma (C6 and U251), fibrosarcoma (L929) and melanoma (B16)	more potently	IC ₅₀ value 1.9–8.7 M compare to cisplatin (IC ₅₀ 10.9–67.0 M)	Lazić et al (2010) ⁵⁹
		Me, Et, <i>n</i> -Pr and <i>n</i> -Bu	human melanoma (A375), human glioblastoma (U251), human prostate cancer (PC3), human colon cancer (HCT116), mouse melanoma (B16) and mouse colon cancer (CT26CL25) cells	more potently	IC ₅₀ value of Pt complexes ca. 2.9–21.3 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ ca. 12.5–120 M])	Mihajlovic et al (2012) ⁶⁰
eddl	II	Et, <i>n</i> -Pr, <i>n</i> -Bu, <i>n</i> -Pe	chronic lymphocytic leukemia (CLL)	more potently	IC ₅₀ value (form Et to <i>n</i> -Pe) 22.35 M / 9.85 M / 5.39 M / 10.37 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ 263.75 M])	Vujic et al (2011) ⁶⁶
	IV	Et, <i>n</i> -Pr, <i>n</i> -Bu, <i>n</i> -Pe	human breast cancer (MDA-MB-361 and MDA-MB-433), T-leukemia (Jurkat), chronic myelogenous leukemia (K562), colorectal cancer (SW480) and CLL lymphocytes	more potently only for SW480 cells, for other cell types lower or comparable	SW480 cells: IC ₅₀ value of Pt complexes (form Et to <i>n</i> -Pe) 5.09 M / 2.32 M / 3.95 M / 0.74 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ 31.92 M])	Vujic et al (2012) ⁶⁶
eddch	IV	Me, Et, <i>n</i> -Pr, <i>n</i> -Bu	human glioblastoma (U251), mouse melanoma (B16)	more potently	U251 cells: IC ₅₀ value of Pt complexes ca. 1.9–17.5 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ ca. 20.0 M]) B16 cells: IC ₅₀ value of Pt complexes ca. 3.1–21.3 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ ca. 94.3 M])	Mihajlovic et al (2013) ⁶⁴
(S,S)-1,3-propanediamine- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid	II	<i>i</i> -Bu; <i>n</i> -Pe and <i>i</i> -Pe/J	human neoplastic cell lines (HeLa, A549, MDA-MB-231, LS-174, EA.hy926), and human fetal lung fibroblast cell line (MRC-5)	more potently (<i>n</i> -Pe Pt(II) complex)	<i>n</i> -Pe Pt(II) complex IC ₅₀ value 5.4 M / 11.1 M / 11.9 M / 12.2 M / 5.9 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ 6.9 M / 17.2 M / 15.4 M / 21.9 M / 22.4 M])	Savic et al (2014) ⁶⁵
(S,S)-eddba	IV	H, <i>n</i> -Pr, <i>n</i> -Bu	chronic lymphocytic leukemia (CLL)	more potently	IC ₅₀ value of Pt complexes (form Et to <i>n</i> -Bu) 5.04 M / 6.08 M / 25.28 M (vs. cisplatin [IC ₅₀ 331.61 M])	Dimitrijević et al (2013) ⁶⁶

N/A- not applicable

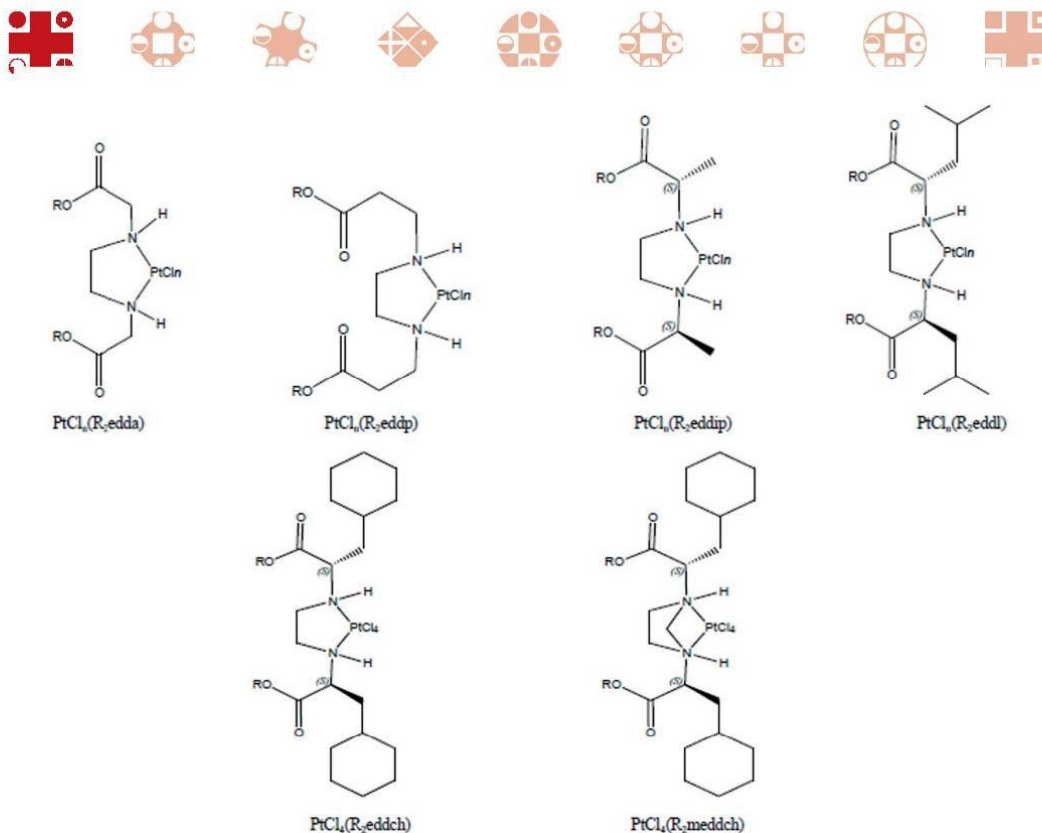


Figure 3. Structural formulae of platinum compounds with R2edda ligand type

1411HP cell line. All of them induce apoptosis and their effect is dose-dependent. Platinum(II) complexes with bidentate edda ligand type $[\text{PtCl}_2(\text{R}_2\text{edda})]$ ($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, n\text{-Pr}$; edda = ethylenediamine-*N, N'*-diacetate) were also questioned (48). *In vitro* cytotoxic effect was studied on various cell lines to generate new evidence regarding the cytotoxic effect of these complexes, (Table 1). The aforementioned trend of the impact of alkyl chain (in ester group) length on antitumor activity can also be applied in this case, except of HTC-8 and HT-29 cells. Thus, the highest cytotoxic effect has been achieved by $[\text{PtCl}_2(n\text{-Pr}_2\text{edda})]$ against A2780 cells. However, the activities of all these new platinum (II) compounds is lower compared to the appropriate platinum(IV) complexes, as well as cisplatin.

Platinum complexes with eddp and eddip-type ligands

Grow inhibition which had been provided by influence of two new platinum(IV) complexes $([\text{PtX}_2(\text{eddp})] \times n \text{H}_2\text{O})$; $\text{X} = \text{Cl}/\text{Br}$; $n = 1$ or $1,2,4$; eddp=ethylenediamine-*N, N'*-di-3-propionate) on A2780/A2780cisR pair of human ovarian cancer cell lines, showed that $\text{trans}-[\text{PtX}_2(\text{eddp})]$ ($\text{x} = \text{Cl}, \text{Br}$) complexes have far less cytotoxic affinity compared to

cisplatin and complexes with edda ligands ($\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{edda})]$) (49). There is a high probability that difference in effects stems from otherwise complex geometry. These two complexes will obtain dissimilar adducts with cell molecules (DNA nucleic bases) by direct interaction. However, if reduction process (Pt(IV) to Pt(II)) occurs before interaction with nucleic bases, $\text{trans}-[\text{PtX}_2(\text{eddp})]$ complexes will form tetracoordinated platinum(II) complexes where eddp ligand occupies all four coordination positions preventing in that way reaction with DNA nucleic bases (49). In the contrary, reduction of $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{edda})]$ complex, by forming tetracoordinated platinum(II) complexes which contain biscoordinated edda ligand and leaving two chloro ligands which could easily be replaced and make a link with DNA (49). Also, some studies of platinum(II)/(IV) complexes ($[\text{PtCl}_4(\text{Bu}_2\text{eddp})]$, $[\text{PtBr}_3\text{Cl}(\text{Bu}_2\text{eddp})]$, $[\text{PtCl}_2\text{I}_2(\text{Bu}_2\text{eddp})]$, $[\text{PtCl}_4(\text{Pe}_2\text{eddp})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{Bu}_2\text{eddp})]$) have demonstrated that these complexes had five times weaker cytotoxic effect on HeLa (human cervix adenocarcinoma) cell line compared to cisplatin, but the effect on K562 (human myelogenous leukemia) cell line was almost equal to the effect of cisplatin (Table 1) (50). It was concluded that the exchange of two chloro ions for two iodo ions in pres-



ent complexes will only decrease the antitumor activity of the complexes. It has been shown that these complexes induce apoptosis, but in some cells secondary necrosis was detected (50). Several complexes of platinum(II)/(IV) were investigated in the light of *in vitro* antitumor activity against some mouse and human cell lines (Table 1) (51). Of all of the complexes whose efficiency was studied (*trans*-[PtCl₂(pdda)], *trans*-[PtBr₂(pdda)], *trans*-[PtCl₂(eddp)], *trans*-[PtBr₂(eddp)], [PtCl₂(H₂eddp)], [PtCl₂(Pe₂eddp)], [PtCl₂(Bu₂eddp)], [PtCl₄(Bu₂eddp)]), best results were gained with platinum(IV) complexes [PtCl₄(R₂eddp)] (R= Bu or Pe). These two complexes showed the cytotoxic activity was dose-dependent and comparable with cisplatin, but also that they archive cytotoxic effect more rapidly than cisplatin. Further examination of toxicity of [PtCl₄(Pe₂eddp)] and [PtCl₄(Bu₂eddp)] pointed out that these complexes cause ROI (reactive oxygen intermediates)-dependent, ERK (extracellular signal-regulated kinase)-independent induction of tumor cell necrosis as opposed to cisplatin - it induced ROI-independent apoptotic death of tumor cells (48). Cytotoxic effect of two more platinum(IV) complexes, [PtCl₄(Et₂eddp)] and [PtCl₄(*n*-Pr₂eddp)], has been investigated on severe cell lines but each one of them showed less activity *in vitro* in regard to cisplatin (Table 1) (52). Kaludjerovic et al. (52) also established that there is an interaction between plasmid pBR322 DNA and platinum(II)/(IV) complexes, in the presence or absence of ascorbic acid. From all of the platinum (eddp) complexes, [PtCl₄(*n*-Bu₂eddp)] is the only one which has *in vivo* anti-tumor activity demonstrated (53). Cytotoxic effect of [PtCl₄(*n*-Bu₂eddp)] is dose and time dependent, and this complex shows its effect faster than cisplatin against B16 melanoma cells. Investigation on mice examined platinum(IV) complex demonstrated greater efficiency than cisplatin in terms of reducing volume of a tumor in its appropriate doses. The greater advantage over the cisplatin is reflected in the absence of kidney damage; [PtCl₄(*n*-Bu₂eddp)] did not show any sign of nephrotoxicity (53). A new modification of platinum(II/IV) complexes with R₂(*S,S*)eddp ligand type (*O,O'*-di-isopropyl or *O,O'*-diisobutyl- (*S,S*)-ethylenediamide-*N,N'*-di-2-propionate) were synthesized (Table 1) (54). The results showed that the Pt(IV) complexes were followed with better cytotoxic activity. Also, it has been noted that if in platinum(II) complexes with this ligand type occur the interchange isopropyl group for isobutyl group, cytotoxic activity will be increased. On the other hand, if this exchange occurs in platinum(IV) complexes, the cytotoxic activity will be decreased, regardless of the type of cell line. However, the best activity has been demonstrated by platinum(IV) complex with *O,O'*-di-isopropyl-(*S,S*)-ethylenediamide-*N,N'*-di-2-propionate ligand against K526 and Fem-x cell lines, unfortunately each one of these complexes had lower cytotoxic activity (2-5 times) in comparison to the corresponding cisplatin. Complexes [PtCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddp}], [PtCl₄{(*S,S*)-*i*Pr₂eddp}] and [PtCl₄{(*S,S*)-*i*Bu₂eddp}] induce apoptosis. Complex [PtCl₂{(*S,S*)-*i*Pr₂eddp}] led to chroma-

tin condensation in HeLa cells, but contrary to previous mentioned complexes which cause rounding of cells, this complex caused more irregular cell shapes which may indicate that disruption of cytoskeleton and/or plasma membrane may be occurred. Two new platinum(IV) complexes, and there *in vitro* activities, were demonstrated - [PtX₂(*S,S*-eddp)] x nH₂O (*S,S*-eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-2-propanoate ion, X = chlorido or bromido, n = 4, 0) (55). The complexes displayed significantly lower cytotoxicity on severe cell lines and have a quite different mechanism of action compared to cisplatin (Table 1). Also exchange of tetradentate eddp ligand with bidentate eddp ester ligand will lead to enhancement in cytotoxicity of platinum(IV) complexes. Stojkovic et al. (56) synthesized three new platinum(IV) complexes with bidentate *N,N'*-ligands, [PtCl₄(R₂-*S,S*-eddp)] (R=*n*-Pr, *n*-Bu, *n*-Pe). It has been shown that all three new complexes have a dose and time-dependent grow-inhibition effect. [PtCl₄(*n*-Pr₂-*S,S*-eddp)] and [PtCl₄(*n*-Pe₂-*S,S*-eddp)] had much higher antiproliferative activity in comparison with cisplatin. Also, MDA-MD-231 cell line showed to be less sensitive to the treatment with all these complexes, including cisplatin. The greatest cytotoxic effect on HTC-116 cell line was demonstrated by [PtCl₄(*n*-Pe₂-*S,S*-eddp)] and on the other side greatest effect on a MDA-MB-231 was made by [PtCl₄(*n*-Pr₂-*S,S*-eddp)]. All this compounds induced a type of programmed cell death, but the third complex ([PtCl₄(*n*-Pe₂-*S,S*-eddp)]) had highest proapoptotic effect. Cytotoxic effect of two platinum(IV) complexes ([PtCl₄(R₂eddp)]) (R= *i*Pr (isopropyl) or *i*Bu (isobutyl)) and three platinum(II)/(IV) complexes ([PtCl_{2/4}(R₂eddp)]) (R= isopropyl), *i*Bu (isobutyl) or *c*-Pe (cyclopentyl)) was examined on various cancer cell lines (Table 1) (57). Increasing the number of hydrophobic alkyl side chains appears to result in enhancement of cytotoxicity, in fact complexes with isopropyl group had less activity than those with isobutyl or cyclopentyl group. Platinum(II) (eddp) complexes with isobutyl group have proven to be more effective on HCT116 and SW620 cells than cisplatin, as was the effect of these types of complexes with cyclopentyl group on CT-26CL25, HCT116, SW6220 and B16 cells (Table 1). No signs of toxicity on normal primary cells (fibroblasts and keratinocytes) of complexes was found. All of these new platinum compounds induce caspase-dependent apoptosis. Moreover, ROS (reactive oxygen species) and RNS (reactive nitrogen species) are not being singled out as the main mediators of toxicity. On the same human colon cancer cell lines Volarevic et al. (58) examined the antiproliferative effect of four new platinum(II) complexes with *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl) pentanoic acid (alkyl, ethyl, propyl, *n*-butyl, *n*-pentyl). In comparison to cisplatin all these new complexes have shown a higher cytotoxic activity. Conclusion of this study indicated that the shorter the ester chain in complex is, the complex will show less cytotoxic activity. Thus, the greatest impact was expected from platinum(II) complex with *O,O'*-dipentyl esters. Still, highest impact on human



colon cancer cells (especially on HTC116) has been made by platinum(II) complex with *O,O'*-dibutyl esters. It is thought that the reason for this is the superior intercellular accumulation (59).

Platinum complexes with meddch-, eddl-, eddch and eddba- type ligands

Recently, platinum(II) and platinum(IV) complexes with (*S,S*)-R₂eddl ligand type have been synthesized (60,61). Highest activity had come from complexes with *n*-butyl group in ester chain [PtCl₂((*S,S*)-R₂eddl)] (R= Et, Pr, *n*-Bu or *n*-Pe; *n*=2 or 4; *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)platinum), although cytotoxic effect increases with the increase of ester chain length, as previously mentioned. This type of platinum(II) complexes were found to display much higher antitumor activities on CLL cells in comparison to cisplatin (60), especially [PtCl₂((*S,S*)-*n*-Bu₂eddl)], which is the bearer of the highest antitumor activity of them all. Platinum(IV) compounds with (*S,S*)-R₂eddl ligand type were appraised for their cytotoxic effect (Table 1) (61). Very potent complex was also the one with *n*-butyl group in ester chain [PtCl₄((*S,S*)-*n*-Bu₂eddl)]. It is interesting that CLL cells is the only cell line more sensitive on platinum(II) complex. Lazić et al. (59), synthesized a new platinum(IV) compound with tetradentate coordinated (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoate (cyclohexyl edda/eddch). The cytotoxic effect of these complexes [PtCl₄((*S,S*)-R₂eddch)] (R= Me, Et, *n*-Pr, *n*-Bu) were tested against various cell lines (Table 1). All compounds were clearly more cytotoxic than cisplatin, especially against cisplatin-resistant B16 cells. They also suggested that the length of alkyl chain has different effect than is the case with other platinum complexes. The longer the alkyl chain is, the poorer is the antitumor activity. They also cleared the difference which existed between mechanisms of action of these complexes and golden standard. Cisplatin brings about caspase-dependent apoptosis realized by an autophagy response. On the other hand, new octahedral platinum(IV) complexes induce necrosis like cell death. Soon after, there was a report of octahedral Pt(IV) complex with di-*n*-propyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate ligand and its effect on immune cells (SPC and LNC) (62). It has been shown that this platinum(IV) complex, in concentrations which have been proven effective on tumor cells, does not notably affect viability of immune cells. Also, this complex disables synthesis of IFN- γ , IL-17 and NO in immune cells. The new prospective platinum(IV) drugs were synthesized with the novel *N,N'*-methylene modified cyclohexyl ethylenediamine-*N,N'*-diacetate (edda)-type ligands, [PtCl₄((*S,S*)-R₂meddch)] (R= Me, Et, *n*-Pr, *n*-Bu) (63). All of these compounds, with the exemption of [PtCl₄((*S,S*)-Me-2meddch)], demonstrated higher cytotoxic activity than cisplatin on every cell line, especially on HCT116 and CT26CL25 cell lines resistant or poorly responsive to

treatment with cisplatin (Table 1). These platinum(IV) complexes with eddch ligand type induce apoptosis, but in lower dose range, and it has been shown that they affect primary keratinocytes and fibroblasts less than cisplatin, which may be indicative of their selectivity. Furthermore, series of complex electrochemical tests were performed by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry (64). This study indicated that the reduction of these complexes is performed as two-electron process followed by the loss of axial chloride ligand and the length of the C atom chain in esters part affects the reduction potential. Correlation between redox potentials and IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) values was not established. Pt(II)-iodido complexes with derivatives of ethylenediamine-*N,N'*-diacetate (edda)-type of ligands, (esters of (*S,S*)-1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid) are also a new potential anticancer substance (65). Cytotoxic effect of isobutyl, *n*-pentyl and isopentyl esters of these compounds were examined against various human cell lines (Table 1). Although summary effect of all these compounds was better in regard to cisplatin, in LS-174 cells effect was 3 to 4 times higher than golden standard. However, exanimato complexes seem to have a different mode of mechanism which includes apoptotic and necrotic elements of cell death. These complexes also evince better affinity for DNA binding than cisplatin and enter cells efficiently, which may be an important advantage in respect of avoiding cell resistance. Better intracellular accumulation and DNA binding are probably the result of substitution kinetics of iodide ligands and proper lipophilicity of an edda ligand type. The cytotoxic effect against freshly isolated CLL cells is achieved by [PtCl₄(R₂-*S,S*-eddba)] (R= Et, Pr or Bu) (eddba-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)acetic acid) complex, as reported by Dimitrijević et al. (66). The cytotoxic influence of [PtCl₄(Et₂-*S,S*-eddba)] and [PtCl₄(Pr₂-*S,S*-eddba)] was better than complex with *n*-butyl group in ester chain, but still, all of them have considerably higher antiproliferative ability against CLL cells than cisplatin (Table 1).

CONCLUSION

The design of platinum based drugs is not a new field of interest. This article summarizes recent research progress in research on edda-type-platinum complexes - new type of platinum based drugs. Some of these compounds achieves better effect compared with the gold standard (cisplatin). Of particular interest are the noticeable effect of some new platinum compound with edda ligand type on cell lines which are known to have a high level of cisplatin-resistance. There are indications that further investigations of these compounds may be very useful in overcoming the problems with global cancer statistic. Further preclinical and clinical researches might give some useful information which can help in overcoming the main problems related to platinum based drugs (including tumor resistance and less serious side effect).



Acknowledgments and Funding:

This work was funded by grants from the Ministry of education, science and technological development, Serbia (Grants ON 175071, ON 175069 and ON 175103) and by the Faculty of Medicine Sciences of the University of Kragujevac, Serbia (Grant MP 02/14, MP 01/14 and JP 08/15).

Conflicts of interest

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

REFERENCE

- Orvig, C. & Abrams, M.J. (1999). Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev.* 99, 2201-2203.
- Alderden, R.A., Hall, M.D., & Hambley, T.W. (2006). The Discovery and development of cis-platin. *J Chem Edu.* 83, 728-734.
- Sadler, P.J., Li, H., & Sun, H. (1999). Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coord Chem Rev.* 185-186, 689-709.
- Kaim, W. & Schwederski, B. (1993). *Bioinorganic chemistry: Inorganic element in the chemistry of life.* Wiley: Stuttgart.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 205, 698-699.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J.E., & Mansour, V.H. (1969). Platinum compounds - a new class of potent antitumor agents. *Nature.* 222, 385-386.
- Burger, H., Loos, W.J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen R.H.J. & Wiemer, E.A.C. (2011). Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Res Up.* 14, 22-34.
- Hartering, C.G., Groessl, M., Meier, S.M., Casinif, A., & Dyson, P.J. (2013). Application of mass spectrometric techniques to delineate the modes-of-action of anticancer metalodrugs. *Chem Soc Rev.* 42, 6186-6199.
- Quiroga, A.G. (2012). Understanding trans platinum complexes as potential antitumor drugs beyond targeting DNA. *J Inorg Biochem.* 114, 106-112.
- Chin, C.F., Wong, D.Y.Q., Jothibas, R., & Ang, W.H. (2011). Anticancer Platinum (IV) prodrugs with novel modes of activity. *Curr Top Med Chem.* 11, 2602-2612.
- Kauffman, G. (2010). Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Rev.* 54(4), 250-256.
- Sabo, T., Sipka-Grujicic, S., & Trifunovic S. (2002). Transition metal complexes with edda-type ligands—a review. *Synth React Inorg Met Org Chem.* 32(9), 1661-1717.
- Todd, R.C. & Lippard, S.J. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallo-mics.* 1, 280-291.
- Jung, Y.W., & Lippard, S.J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev.* 107, 1387-1407.
- Reedijk, J. (1999). Why Does Cisplatin Reach Guanine-N7 with Competing S-Donor Ligands Available in the Cell? *Chem Rev.* 99(9), 2499-2510.
- Barry, N.P., & Sadler, P.J. (2013). Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chem Commun (Camb).* 49, 5106-5131.
- Muggia, F.M., & Fojo, T. (2004). Platinum: Extending Their Therapeutic Spectrum. *J. Chemother.* 16 (Suppl. 4), 77-82.
- Kociba, R., Sleight, S.D., & Rosenberg, B. (1970). Inhibition of Dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinoma with cisdiamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother Rep.* 54, 325-328.
- Weiss, R.B., & Christian, M.C. (1993). New cis-platin analogues in development: A review. *Drugs.* 46, 360-377.
- Ali, I., Wani, W., Saleem, K., & Haque, A. (2013). Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 13, 296-306.
- Kostova, I. (2006). Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Rec Pat Anti-Canc Drug Disc.* 1, 1-22.
- Hamilton, G., & Olszewski, U. (2013). Picoplatin pharmacokinetics and chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Drug Evaluations.* 9(10), 1381-1390.
- Jakupec, M.A., Galanski, M., & Keppler, B.K. (2003). Tumor inhibiting platinum complexes- state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 146, 1-53.
- Armand, J.P., Bolgie, V., Raymond, E., Fizazi, K., Faivre, S., & Ducreux, M. (2000). Oxaliplatin in colorectal cancer: an overview. *Semin Oncol.* 27, 96-104.
- Kelland, L. (2007). The Resurgence of Platinum-based Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 7: 573-584.
- Boulikas, T., & Vougiouka, M. (2003). Cis-platin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol. Rep.* 10, 1663-1682.
- Martindale. (2007) *The complete drug reference;* 35th ed.; S.C. Sweetman, Ed.; Pharmaceutical Press: London.
- Cassidy, J., & Misset, J.L. (2002). Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol.* 29, 11-20.
- Alberto, E.M., Lucas, M.F.A., Pavelka, M., & Russo, N. (2009). The second generation anticancer drug nedaplatin: a theoretical investigation on the hydrolysis mechanism. *J Phys Chem. B.* 113, 14473-14479.
- Van Meerten, E., Eskens, F.A., van Gameren, E.C., Doorn, L., & van der Gaast, A. (2007). First-line treatment with oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced or metastatic oesophageal cancer: a phase II study. *Br J Cancer.* 96, 1348-1352.
- Gentzler, R.D., & Johnson, M.L. (2015). Complex decisions for first-line and maintenance treatment of advanced wild-type non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 20(3), 299-306.



31. Kelland, L. (2007). Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues, Satraplatin and picoplatin. *Expert Opin Investig Drugs*. 16, 1009–1021.
32. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 7, 573–584.
33. Wilson, J.J., & Lippard, S.J. (2014). Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. *Chem Rev*. 114(8), 4470–4495.
34. Welink, J., Boven, E., Ver Morken, J.B., Gall, H.E., & Vijgh WJF. (1999). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function. *Clin Cancer Res*. 5, 2349–2358.
35. Hall, M.D., Mellor, H.R., Callaghan, R., & Hambley, T.W. (2007). Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J Med Chem*. 50(15), 3403–3411.
36. Fuertes, M.A., Alonso, C., & Pérez, J.M. (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*. 103, 645–662.
37. Galanski, M., Jakupec, M.A., & Keppler, B.K. (2005). Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: Novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem*. 12: 2075–2094.
38. Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans* 39, 8113–8127.
39. Nafees, M., & Zijian, G. (2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol*. 19, 144–153.
40. Wesselblatt, E., & Gibson, D. (2012). What do we know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs? *J Inorg Biochem*. 117, 220–229.
41. Horváth, V., Blanárová, O., Sviháľková-Sindlerová, L., Soucek, K., Hofmanová, J., Sova, P., Kroutil, A., Fedorocko, P., & Kozubík, A. (2006). Platinum(IV) complex with adamantylamine overcomes intrinsic resistance to cisplatin in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 102(1), 32–40.
42. Sviháľková-Sindlerová, L., Foltinová, V., Vaculová, A., Horváth, V., Soucek, K., Sova, P., Hofmanová, J., & Kozubík, A. (2010). LA-12 overcomes confluence-dependent resistance of HT-29 colon cancer cells to Pt(II) compounds. *Anticancer Res*. 30(4), 1183–1188.
43. Liu, C.H. (1964). Some Homo- and Heteropolynuclear Chelates. *Inorg. Chem*. 3 (5), 678–680.
44. Jolley, J.N., Yanovsky, A.I., Kelland, L.R., & Nolan, K.B. (2001). Synthesis and antitumor activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL4Cl2]·H2O where L4 is ethylenediamine-N, N'-diacetate. *J Inorg Biochem*. 83(2–3), 91–100.
45. Davies, S.M., Wong, P.N., Battle, A.R., Haddad, G., McKeage, M.J., & Hambley, T.B. (2002). Examination of the effects of oxidation and ring closure on the cytotoxicities of the platinum complexes of N-(2-hydroxyethyl) ethane-1,2-diamine and ethane-1,2-diamine-N,N'-diacetic acid. *J Inorg Biochem*. 91(1), 205–211.
46. Kaludjerovic, G., Schmidt, H., Schwieger, S., Wagner, C., Paschke, R., Dietrich, A., Mueller, T., & Steinborn, D. (2008). Platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N, N'-diacetate diester (R2edda) ligands: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity. *Inorganica Chimica Acta* 361, 1395–1404.
47. Kaludjerovic, G., Pantelic, N., Eichhorn, T., Bette, M., Wagner, C., Zmejckovski, B., & Schmidt, H. (2014). Platinum(II) complexes with R2edda ligands (R = Me, Et, n-Pr; edda = ethylenediamine-N, N'-diacetate); Synthesis and characterization. *Polyhedron*. 80, 53–59.
48. Sabo, T., Kaludjerovic, G., Poleti, D., Karanovic, Lj., Boccarelli, A., Cannito, F., & Natile, G. (2004). Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N, N'-di-3-propionato ligand. *J Inorg Biochem*. 98, 1378–1384.
49. Kaludjerovic, G., Dinovic, V., Juranic, Z., Stanojkovic, T., & Sabo, T. (2005). Activity of some platinum(II/IV) complexes with O,O-n-butyl- and O,O-n-pentyl-ethylenediamine-N, N'-di-3-propionato and halogeno ligands against HeLa and K562 cell lines and human PBMC. *J Inorg Biochem*. 99, 488–496.
50. Kaludjerovic, G., Miljkovic, Dj., Momcilovic, M., Djinovic, V., Mostarica Stojkovic, M., Tibor, S., & Trajkovic, V. (2005). Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer*. 116, 479–486.
51. Kaludjerovic, G., Kommera, H., Schwieger, S., Paethanom, A., Kunze, M., Schmidt, H., Paschke, R., & Steinborn, D. (2009). Synthesis, characterization, in vitro antitumoral investigations and interaction with plasmid pBR322 DNA of R2eddp-platinum(IV) complexes (R = Et, n-Pr) *Dalton Trans*. 28(48), 10720–10726.
52. Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Mirkovic, I., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, Dj., Sabo, T., Trajkovic, V., & Kaludjerovic, G. (2012). Melanoma tumor inhibition by tetrachlorido(O,O'-dibutylethylenediamine-N, N'-di-3 propionate)platinum(IV) complex: in vitro and in vivo investigations. *Metallomics*, 4, 1155–1159.
53. Krajcinovic, B., Kaludjerovic, G., Steinborn, D., Schmidt, H., Wagner, C., Zizak, Z., Juranic, Z.D., Trifunovic, S.R., & Sabo, T.J. (2008). Synthesis and in vitro antitumoral activity of novel O,O'-di-2-alkyl-(S,S)-ethylenediamine-N-N'-di-2-propanoate ligands and corresponding platinum(II/IV) complexes. *J Inorg Biochem*. 102, 892–900.
54. Djinovic, V., Glodjovic, V., Vasic, G., Trajkovic, V., Klisuric, O., Stankovic, S., Sabo, T., & Trifunovic, S. (2010). Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) complexes with ethylenediamine-



- N,N'-di-S,S-2-propanoate and halogenido ligands: Crystal structure of *s-cis*-[Pt(S,S-eddp)Cl₂]*4H₂O and *uns-cis*-[Pt(S,S-eddp)Br₂]. *Polyhedron*. 29, 1933–1938.
55. Stojkovic, D., Jevtic, V., Radic, G., Dacic, D., Curcic, M., Markovic, S., Djinic, V.M., Petrovic, V., & Trifunovic, S. (2014). Synthesis, characterization and *in vitro* antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. *J Mol Struct*. 1062, 21–28.
 56. Kaludjerovic, G., Mijatovic, S., Zmejovski, B., Bulatovic, M., Gomez-Ruiz, S., Mojic, M., Steinborn, D., Miljkovic, D.M., Schmidt, H., Stosic-Grujicic, S.D., & Sabo, T.J. (2012). Platinum(II/IV) complexes containing ethylenediamine-N, N'-di-2/3-propionate ester ligands induced caspase-dependent apoptosis in cisplatin-resistant colon cancer cells. *Metalomics*. 4, 979–987.
 57. Volarevic, V., Vujic, J.M., Milovanovic, M., Kanjevac, T., Volarevic, A., Trifunovic, S., & Arsenijevic, N. (2013). Cytotoxic effects of palladium(II) and platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid on human colon cancer cell lines. *J BUON*. 18(1), 131-137.
 58. Lazić, J.M., Vucićević, L., Grgurić-Sipka, S., Janjetovic, K., Kaluderovic, G.N., Misirkic, M., Gruden-Pavlovic, M., Popadic, D., Paschke, R., Trajkovic, V., & Sabo, T.J. (2010). Synthesis and *in vitro* anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N, N'-diacetate-type ligands. *Chem Med Chem*. 5, 881-889.
 59. Vujic, J., Kaludjerovic, G., Milovanovic, M., Zmejovski, B., Volarevic, V., Zivic, D., Djurdjevic, P., Arsenijevic, N., & Trifunovic, S.R. (2011). Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid. *Eur J Med Chem*. 46, 4559-4565.
 60. Vujic, J., Kaludjerovic, G., Zmejovski, B., Milovanovic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., Stanojkovic, T., & Trifunovic, S. (2012). Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity of platinum(IV) complexes with O,O'-dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-(4-methyl)pentanoate ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 390, 123–128.
 61. Miljkovic, Dj., Poljarevic, J., Petkovic, F., Blazevski, J., Momcilovic, M., Nikolic, I., Saksida, T., Stosic-Grujicic, S., Grguric-Sipka, S., & Sabo, T.J. (2012). Novel octahedral Pt(IV) complex with di-n-propyl-(S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate ligand exerts potent immunomodulatory effects. *Eur J Med Chem*. 47, 194–201.
 62. Mihajlović, Lj., Savić, A., Poljarević, J., Vučković, I., Mojić, M., Bulatović, M., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Kaludjerovic, G.N., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, Dj., Grguric-Sipka, S., & Sabo, T.J. (2012). Novel methylene modified cyclohexyl ethylenediamine-N,N'-diacetate ligands and their platinum(IV) complexes. Influence on biological activity. *J Inorg Biochem*. 109, 40–48.
 63. Mihajlović, Lj., Stanković, D., Poljarević, J., Manojlović, D., Sabo, T., & Grgurić-Sipka, S. (2013). Electrochemistry and Bioactivity Relationship of Pt(IV) Complexes with Cyclohexyl-Functionalized Ethylenediamine-N, N'-Diacetate-Type Ligands. *Int J Electrochem Sci*. 8, 8433 – 8441.
 64. Savić, A., Filipović, L., Arandjelović, S., Dojčinović, B., Radulović, S., Sabo, T., & Grgurić-Sipka, S. (2014). Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum(II) iodido complexes. *Eur J Med Chem*. 82, 372-384.
 65. Dimitrijevic, D., Glodjovic, V., Radic, G., Garcia-Granda, S., Menendez-Taboada, L., Milovanovic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., Bogdanovic, G., & Trifunovic, S. (2013). Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) complexes with some esters of ethylenediamine-N, N'-di-S,S-(2,2'-dibenzyl)acetic acid. Crystal structure of O,O'-dipropyl-ethylenediamine-N, N'-di-S,S-(2,2'-dibenzyl)acetate dihydrochloride. *Inorganica Chimica Acta* 402, 83–89.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND CYTOTOXICITY OF BINUCLEAR COPPER(II)-COMPLEXES WITH SOME S-ALKENYL DERIVATIVES OF THIOSALICYLIC ACID

Dusan Lj. Tomović¹, Andriana M. Bukonjić¹, Aleksandar Kocović¹, Miloš V. Nikolić¹, Marina Z. Mijajlović¹, Verica V. Jevtić², Zoran R. Ratković²,
Aleksandar N. Arsenijević¹, Jelena Z. Milovanović¹, Bojana Stojanović¹, Srećko R. Trifunović², Gordana P. Radić¹

¹Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,

²Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac

³Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I CITOTOKSIČNOST BINUKLEARNIH BAKAR(II)-KOMPLEKSA

SA NEKIM S-ALKENIL DERIVATIMA TIOSALICILNE KISELINE

Dušan Lj. Tomović¹, Andriana M. Bukonjić¹, Aleksandar Kočović¹, Miloš V. Nikolić¹, Marina Z. Mijajlović¹, Verica V. Jevtić², Zoran R. Ratković²,
Aleksandar N. Arsenijević¹, Jelena Z. Milovanović¹, Bojana Stojanović¹, Srećko R. Trifunović², Gordana P. Radić¹

¹Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

²Institut za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

³Centar za molekulske medicine i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Received / Primljen: 12.07.2016.

Accepted / Prihvaćen: 25.07.2016.

ABSTRACT

New complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared spectra, magnetic measurements, and by NMR spectra. The cytotoxic activity of two newly synthesized precursor S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid were tested using an MTT colorimetric technique on HCT-116 human colon carcinoma cells. The cytotoxic effect of the copper(II)-complexes were higher compared to the cytotoxicity of the corresponding ligand (for concentrations from 31.25 to 250 μ M). Copper(II)-complexes showed a slightly lower cytotoxicity compared to cisplatin. Complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (at concentrations from 250 to 1000 μ M) had a cytotoxic effect on HCT-116 cells compared to cisplatin.

Keywords: S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, copper(II)-complexes, IR and NMR spectroscopy, cytotoxic activity

SAŽETAK

Novi bakar(II)-kompleksi sa nekim S-alkenil derivatima tiosalicilne kiseline (alkenil = propenil-(L1), izobutenil-(L2)) su sintetisani i okarakterisani na osnovu rezultata mikroanalize, infracrvenih spektara i magnetnih merenja, dok su odgovarajući S-alkenil derivati okarakterisani i na osnovu NMR spektara. Citotoksična aktivnost dva novosintetisana liganda S-alkenil derivata tiosalicilne kiseline je ispitivana pomoću MTT kolorimetrijske tehnike na humanim ćelijama karcinoma debelog creva, HCT-116. Citotoksični efekat bakar(II)-kompleksa je bio veći u poređenju sa citotoksičnošću odgovarajućih liganada (u koncentracijama od 31,25 do 250 μ M). Bakar(II)-kompleksi su pokazali neznatno nižu citotoksičnost u poređenju sa cisplatinom. Bakar(II)-kompleksi sa S-alkenil derivatima tiosalicilne kiseline (u koncentracijama od 250 do 1000 μ M) imali su citotoksični efekat na HCT-116 ćelijama kao cisplatin.

Ključne reči: S-alkenil derivati tiosalicilne kiseline, bakar(II)-kompleksi, IR i NMR spektroskopija, citotoksična aktivnost



ABBREVIATIONS

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

IR - infrared

NMR - nuclear magnetic resonance

Cu - copper

Zn - zinc

VD - Wilson's disease

MD - Menkes disease

ROS - reactive oxygen species

Cu(NO₃)₂ - copper(II)-nitrate trihydrate

LiOH - lithium hydroxide

DMSO - dimethyl sulfoxide

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS - fetal bovine serum

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

PBS - phosphatebuffered saline

BM - bending magnet



UDK: 616-099:546.562 / Ser J Exp Clin Res 2017; 18 (1): 13-18

DOI: 10.1515/SJECR-2016-0071

Corresponding author: Gordana Radić, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
Tel./fax: + 381 34306800; E-mail address: vasic_gordana@yahoo.com (G.P. Radić)

13



INTRODUCTION

After successful application of “cisplatin” (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)) to chemotherapy in cancer patients, the exploration of other metal-complexes as new anticancer agents has continued, to enhance their specificity towards cancer cells, reduce toxic side effects, and prevent the development of resistance in human cancer cells (1-5).

Copper is an essential element for all organisms who live in environments rich in oxygen. This redox active metal converts oxidation state easily from a Cu(I) to Cu(II), and vice versa, as in chemical reactions and in physiological conditions (6). Copper is essential for the function of several enzymes and proteins, such as cytochrome oxidase, Zn, Cu-superoxide dismutase, lysyl oxidase, tyrosinase, and dopamine- β -monooxygenase (1, 6, 7).

The importance of copper is also reflected in the fact that its deficiency leads to congenital genetic diseases, such as Wilson's disease (VD) and Menkes disease (MD) (8). Copper chelation therapy has attracted considerable attention for use in research and treatment of various neurodegenerative disorders (9).

The presence of proteins found in copper has been associated to metabolic changes in cancer cells. The exact role of copper in the treatment of cancer has not been sufficiently clarified (6, 10). It is assumed that copper is involved in the generation of ROS (reactive oxygen species) and the process of angiogenesis by stimulating the proliferation and migration of human endothelial cells (10-12).

Thiosalicylic acid and its derivatives have a wide range of applications. It has been used for the determination of metals (13, 14); as modifiers of graphite paste electrodes (15); as photoinitiators of free radical polymerization (16); in cosmetics (17); in the treatment of dermatological (18), inflammatory, allergic, and respiratory diseases (19); and as Ras-tumour growth inhibitors (20).

Copper(II)-complexes may exert cytotoxic activity on colon carcinoma cell lines. O'Halloran found that a copper complex ($\text{Cu}[\text{N-salicylidene-(glutamate)}(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$) at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ was shown to have distinct cytotoxic activity in human HT-29 colon cancer cells after 72 hours. Apoptosis was activated by the generation of large quantities of free radicals (21).

Various studies have confirmed the synthesis and structural characterization of different complexes of copper(II) with thiosalicylic acid as a ligand (22, 23). Complexes of copper(II) with the S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid showed moderate antimicrobial activity and low antifungal activity (24). With consideration for these effects, new research examining the cytotoxic potential of copper(II) with S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid has found that these derivatives exhibit a lower cytotoxicity compared to cisplatin in the human HCT-116 cell line and in murine cell lines CT26 and CT26.CL25 (25).

The first aim of our study was to synthesize two new ligands acting as S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)), and two corresponding copper(II)-complexes with these ligands. The composition and structure of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid was assumed on the basis of microanalysis, IR, and NMR spectroscopy. The composition and structure of synthesized complexes was confirmed based on the microanalysis, IR spectroscopy, and magnetic measurements. Another aim of our study was to investigate the cytotoxic potential of copper(II)-complexes with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid on the human colon cancer cell line HCT-116.

MATERIALS AND METHODS

Materials and measurements

The reagents were obtained commercially and used without further purification. Elemental analyses were conducted on a Vario III CHNOS Elemental Analyser, Elemental Analysensysteme GmbH. For infrared spectra, a Perkin-Elmer FTIR 31725-X spectrophotometer, and KBr pellet technique were employed.

Syntheses

General procedure for the synthesis of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

The S-alkenyl derivatives of the thiosalicylic acid ligand (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) were prepared (26) by alkylation of thiosalicylic acid using the corresponding alkenyl halides in alkaline water-ethanol solution.

S-propenyl derivative of thiosalicylic acid (S-propenyl-thiosal), (L1): M.p. 180-181°C, white powder, IR (KBr, cm^{-1}): 3446, 3075, 2917, 2654, 2557, 1680, 1586, 1562, 1465, 1415, 1314, 1273, 1256, 1153, 1061, 1045, 889, 741, 701, 651, and 551. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3.21 (d, 2H, CH_2), 5.92 (m, 1H, CH), 4.93 (m, 2H, CH_2) and 7.47-7.91 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 38.2 (CH_3), 115.9 (CH_2), 136.5 (CH), 125.3; 125.6; 130.2; 131.7; 133.8; 140.1 (Ar), and 172.0 (COOH).

S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid (S-isobutenyl-thiosal), (L2): M.p. 182-183°C, white powder, IR (KBr, cm^{-1}): 3445, 3076, 2967, 2647, 2556, 1676, 1585, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1253, 1154, 1061, 1046, 810, 743, 651, and 550. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1.82 (s, 3H, CH_3), 4.98 (m, 2H, CH_2), 3.44(t, 2H, CH_2), and 7.42-8.30 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 22.5 (CH_3), 46.1 (CH_2), 112.1 (CH_2), 125; 126.5; 126.7; 133.2; 134.1; 142.6 (Ar), and 168.1 (COOH).

Preparation of copper(II)-complex with S-propenyl derivative of thiosalicylic acid $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)

Copper(II)-nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in 10.0 mL of water on a steam bath, and S-propenyl derivative of thiosalicylate (0.1607 g, 0.8278



mmol) was subsequently added. The reaction mixture was heated for 3 h, and during this period 10.0 ml of LiOH water solution (0.0199 g, 0.8278 mmol) was added in small portions. The solution was filtered and evaporated to a small volume. The blue precipitate of copper(II)-complex was separated by filtration, washed with cold water, and air-dried. Yield: 0.1604 g (81.5%). Anal. Calc. for $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] = \text{Cu}_2\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{O}_{10}\text{S}_4$ (Mr = 951.126): C, 51.77; H, 4.56; and S, 13.49. Found: C, 51.54; H, 4.42; and S, 13.29. $\mu(294\text{ K}) = 1.84\ \mu_{\text{B}}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3441, 3076, 2918, 1610, 1549, 1460, 1435, 1400, 1281, 1258, 1229, 1156, 1062, 1044, 846, 744, 695, 658, and 556.

Preparation of copper(II)-complex with S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)

Copper(II)-nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in 10.0 mL of water on a steam bath, and S-isobutenyl derivative of thiosalicylate (0.1723 g, 0.8278 mmol) was subsequently added. The reaction mixture was heated for 3 h, and during this period 10.0 mL of LiOH water solution (0.0199 g, 0.8278 mmol) was added in small portions. The solution was filtered and evaporated to a small volume. The blue precipitate of copper(II)-complex was separated by filtration, washed with cold water, and air-dried. Yield: 0.2228 g (82.1%). Anal. Calc. for $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] = \text{Cu}_2\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{S}_4$ (Mr = 1007.232): C, 53.66; H, 5.10; and S, 12.73. Found: C, 53.47; H, 5.18; and S, 12.64. $\mu(294\text{ K}) = 1.86\ \mu_{\text{B}}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3446, 2969, 2915, 1613, 1589, 1400, 1281, 1257, 1157, 1062, 847, 744, 719, 656, and 510.

Preparation of drug solutions

Complexes were dissolved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) in distilled water at a concentration of 10 mM and filtered through a 0.22 mm Millipore filter. These stock solutions were diluted in culture medium immediately before use. MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was dissolved (5 mg/mL) in a phosphate buffer saline having a pH of 7.2, and filtered through the 0.22 mm Millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

Cell culture

HCT-116 cells were kindly provided by Dr Danijela Vignjević (Institute Curie, Paris, France). Cells were main-

tained in DMEM (Sigma Aldrich, Munich, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C. Subconfluent monolayers in the logarithmic growth phase were harvested by a brief treatment with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS, PAA Laboratories GmbH) and washed three times in serum-free PBS. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion.

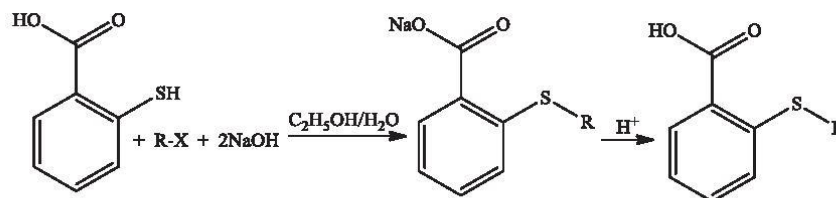
Cytotoxicity assays

The effects of the tested compounds on cell viability were determined using the MTT colorimetric technique (27). HCT-116 cells were diluted with growth medium to $5 \cdot 10^4$ cells/mL, and aliquots ($5 \cdot 10^3$ cells/100 mL) were placed in individual wells in 96-well plates. The next day the medium was exchanged with 100 μL of different compounds, which had been serially diluted 2-fold in the medium to concentrations ranging from 1000 μM to 7.8 μM in growth medium. Each compound was tested in triplicate. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 72 h. After incubation the supernatant was removed, and 15% MTT solution (5 mg/mL in PBS, 10 μL) in DMEM without FBS was added to each well. After an additional 4 h of incubation at 37°C in 5% CO_2 , the medium with MTT was removed and DMSO (150 μL) with glycine buffer (20 μL) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate Zenyth 3100 Multimode detector. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = $100 - ((E-B)/(S-B) \cdot 100)$, where B is the background of medium alone, S is total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is experimental well. Each of the tested complexes was evaluated for cytotoxicity in three separate experiments.

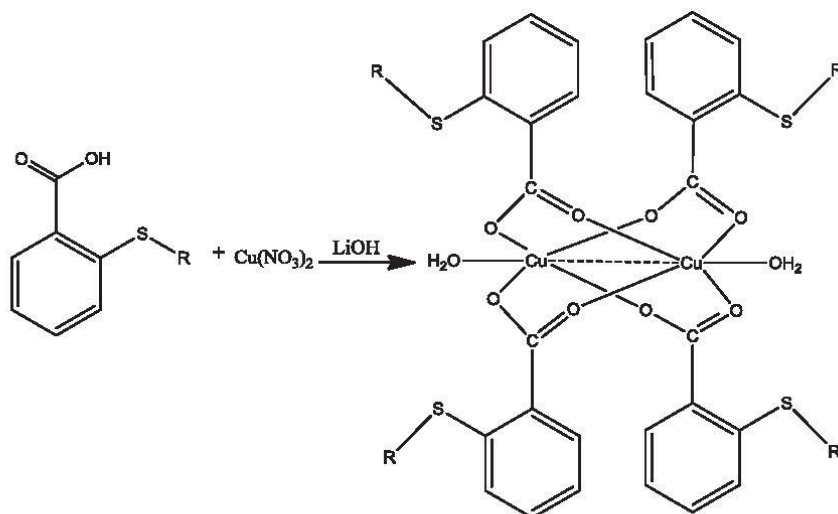
RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and chemical characterization

S-alkenyl (R = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) derivatives of thiosalicylic acid were prepared (26) by alkylation of thiosalicylic acid using the corresponding alkenyl halogenides in an alkaline water-ethanol solution (Scheme 1). The corresponding complexes were obtained by a direct



Scheme 1. Synthesis method of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, R = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2).



Scheme 2. Synthesis of copper(II)-complex with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, R = propenyl-(C1), isobutenyl-(C2).

Table 1. The most important infrared bands (cm^{-1}) of the investigated compounds.

Compound	-S-R	-COO (as)	-COO (sim)
S-propenyl-thiosal (L1)	702(m)	1680(s)	1415(s)
$[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	696(m)	1610(s) 1596(s)	1401(s)
S-isobutenyl-thiosal (L2)	702(m)	1676(s)	1412(s)
$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	697(m)	1613(s) 1589(s)	1400(s)

s-strong, m-medium

reaction of copper(II)-nitrate trihydrate with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (molar ratio 1:2) in a water solution with satisfactory yields (more than 80%) (Scheme 2).

Infrared spectra of the isolated complexes were measured to find the coordination mode of the S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. The asymmetric stretching frequencies of the carboxyl group were used to determine whether it was coordinated (the absorption bands are located in the region $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) or uncoordinated (the absorption bands are located in the region $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$) to the metal ion (28–30). The infrared spectra of complexes C1 and C2 indicated that the carboxyl groups of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic were definitely coordinated to the central copper(II)-complexes.

The isolated $(\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2)$ complexes show double sharp and strong asymmetric stretching frequencies of the carboxyl groups of the coordinated S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid to Cu(II)-ion at approximately $1548\text{--}1615\text{ cm}^{-1}$ (Table 1). The observed clear double bands for isolated complexes suggest small differences in the coordination of the carboxyl groups of the ligands to the copper(II)-ion. Based on previously published

results from structurally similar ligands, we can conclude that there was a coordination of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid with copper(II)-ions in forming binuclear complexes.

Additionally, the strong sharp single symmetric stretching bands of the coordinated carboxyl groups of the S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid lie in the expected region (approximately 1400 cm^{-1}).

Magnetic measurements

Binuclear copper(II)-complexes (31, 32) are stable in dimeric form. The low value of μ_{eff} at room temperature (approximately 1.86 BM) is indicative of an antiferromagnetic interaction between the two metal centres typical of binuclear carboxylates of copper(II) of the type: $[\text{Cu}(\text{R-COO})_2\text{L}]_2$ (33–35). The main factor determining the magnitude of the antiferromagnetic interaction in the dimeric copper(II) carboxylates is the electronic structure of the bridging OCO moiety, as published previously (31, 32–35).

Anticancer activity of copper(II)-complexes

The MTT assay for cell viability shows that the two newly synthesized precursor S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, as well as their corresponding copper(II)-complexes, exhibit cytotoxic activity in HCT-116 human colon carcinoma cells after 24 hours (Figure 1). The cytotoxic effect of the copper(II)-complexes was higher than the cytotoxicity of the corresponding ligands, especially for concentrations from 31.25 to $250\text{ }\mu\text{M}$. Copper complexes showed slightly lower cytotoxicity compared to cisplatin. However, higher concentrations of C2 ($250\text{--}1000\text{ }\mu\text{M}$) had an almost equal cytotoxic effect on HCT-116 cells, relative to cisplatin.

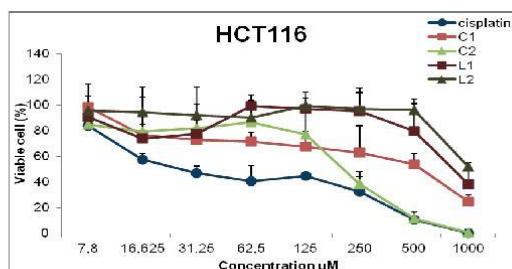


Figure 1. Representative graphs of HCT-116 cell survival after 24 h cell growth in the presence of copper(II) complexes and ligand precursors. Each point represents a mean value and standard deviation of 3 experiments with 3 replicates per dose.

CONCLUSION

The complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared spectroscopy, and magnetic measurements. The cytotoxic effect of the copper(II)-complex was higher compared to the cytotoxicity of the corresponding ligands. Copper(II)-complexes showed slightly lower cytotoxicity compared to cisplatin. Complexes with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid in concentrations from 250 to 1000 μM had a cytotoxic effect on HCT-116 cells that was similar to cisplatin.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Projects 172016, 172034, 175069 and 175103), and Faculty of Medical Sciences for grant MP 2014/01.

REFERENCES

1. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev.* 2010;30(4):708-49.
2. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009;9:185-211.
3. Prudhomme M. *Advances in Anticancer Agents in Medicinal Chemistry.* Clermont-Ferrand: Bentham Science Publishers; 2013(2).
4. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev.* 2014;114(1):815-62.
5. Marcel, Gielen, Tiekink, Edward. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005.
6. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(2):255-63.
7. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 1999;284:805-8.
8. Daniel KG, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Copper storage diseases: Menkes, Wilson's, and cancer. *Front Biosci.* 2004;9:2652-62.
9. Molina-Holgado F, Hider RC, Gaeta A, Williams R, Francis P. Metals ions and neurodegeneration. *Biometals.* 2007;20:639-54.
10. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011;2011:594529.
11. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med.* 1985;1:3-25.
12. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1139-51.
13. Chhakkar Ak, Kakkar LR. Extractive-spectrophotometric method for the determination of palladium using thiosalicylic acid and hexylamine. *Fresenius J Anal Chem.* 1993;347(12):483-5.
14. Gregory GREC and Jeffery PG. Salicylideneamino-2-thiophenol a new reagent for the photometric determination of tin: application to the analysis of ores, rocks and minerals. *Analyst.* 1967;92:293-9.
15. Gismera MJ, Procopio JR, Sevilla MT, Hernandez L. Copper(II) ion-selective electrodes based on dithiosalicylic and thiosalicylic acids. *Electroanalysis.* 2003;15(2):126-32.
16. Aydin M, Arsu N, Yagci Y. One-component biomolecular photoinitiating systems. *Macromol Rapid Commun.* 2003;24:718-23.
17. Shander D, Ahluwalia G, Grosso D. US Patent 5411991.
18. Tarbet B. Skin disorders, therapy using fungicides. U.S. Patent Application No. 10/706,708.
19. Jacobelli H. US Patent 20050267095.
20. Halaschek-Wiener J, Kloog Y, Wacheck V, Jansen B. Farnesyl thiosalicylic acid chemosensitizes human melanoma in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):109-15.
21. O'Halloran TV. Transition metals in control of gene expression. *Science.* 1993;261(5122):715-25.
22. Ferrer EG, Williams PAM. Synthesis and characterization of dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron.* 1997;16(19):3323-5.
23. Bott RC, Healy PC, Sagatys DS. Electrochemical synthesis and structural characterization of the trinuclear copper(I)-copper(II) complex: *bis[bis(triphenylphosphine)copper(I)][bis(thiosalicylate)copper(II)]*. *Chem Commun.* 1998;2403-4.



24. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-methyl derivatives of thiosalicylic acid. *Polyhedron*. 2014;79:80-7.
25. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivatives of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2016;1116:264-71.
26. Radić GP, Glodović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complex with same alkyl derivatives of thiosalicylic acids: Crystal structure of the *bis*(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II)-complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂]. *Polyhedron*. 2012;31(1):69-76.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
28. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF. Nuclear magnetic resonance determination of the absolute configuration of complexes of cobalt(III) with asymmetric tetradentate ligands. *Inorg Chem*. 1968;7:2386-93.
29. Swaminathan K, Busch DH. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *J Inorg Nucl Chem*. 1961;20(1):159-63.
30. Nakamoto K. *Infrared spectra of the inorganic and coordination compounds*. New York: Wiley; 1963.
31. Ferrer, EG, PAM Williams. Synthesis and characterization of a dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron*. 1997;16(19):3323-5.
32. Elmali A. The magnetic super-exchange coupling in copper(II) acetate monohydrate and a redetermination of the crystal structure. *Turkish Journal of Physics*. 2000;24:667-72.
33. Jotham RW, Kettle SFA, Marks JA. Antiferromagnetism in transition-metal complexes. Part VI. Low-lying excited states of dinuclear copper(II) complexes with bridging multidentate Schiff's base groups and some related compounds. *J Chem Soc, Dalton Trans*. 1974;2:125-8.
34. Meier JL, Coughenour CE, Carlisle JA, Carlisle GO. The magnetic properties of a series of copper(II) aspirinates. *Inorg Chim Acta*. 1985;106:159-63.
35. Underhill AE, Bougourd SA, Flugge ML, Gale SE, Gomm PS. Metal complexes of anti-inflammatory drugs. Part VIII: Suprofen complex of copper(II). *J Inorg Biochem*. 1993; 144:139-44.