



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ИМУНСКИ ФЕНОМЕНИ КОД МАЛИГНИХ ОБОЉЕЊА

Кључне речи :

Мезенхималне матичне ћелије, гагактин 3, ST2, тумор дојке, малигни меланом, примарни тумор, метастазе

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Протеклих декада многе студије су биле усмерене на проучавање молекуларних и генетских промена у туморским ћелијама које се акумулирају временом и омогућавају раст, инвазију и метастазирање. Опстанак и раст тумора не зависи само од самих малигних ћелија, већ и од туморске микросредине коју чине различити типови молекула, ћелија и ткива (ендотелне ћелије, адхезивни молекули васкуларног ендотела, ћелије имунског система, стромалне ћелије и екстрацелуларни матрикс) (1). Ове тумор-асоциране ћелије нису кључне само за настанак и прогресију болести већ су и виђене као потенцијална терапијска места. Међу наведеним факторима који имају значајну улогу у канцерогенези посебну пажњу привлаче прогениторске ћелије строге, односно мезенхималне матичне ћелије (MSC) (2). У овом истраживању испитиваће се интеракције MSC са туморским ћелијама и евентуална улога MSC и адхезивног молекула, галектина 3, на развој и метастазирање тумора. Такође, тема истраживања је и испитивање улоге MSC, галектина 3 и ST2 молекула у имунском одговору на тумор. Испитивања ће се спровести на анималним моделима карцинома дојке и малигног меланом на мишевима сојева BALB/C и C57BL/6. Тумори ће се индуковати апликацијом малигних ћелијских линија: 4T1 и B16F1 и ко- трансплантацијом ових линија са MSC. Ефекти одсуства галектина 3 и ST2 молекула испитиваће се коришћењем нокаут мишева (Gal 3 -/- и ST2 -/-).

Циљ истраживања

1. Испитати ефекте ко- трансплантираних MSC, одсуства Gal3 и ST2 молекула на развој, раст и метастазирање тумора. Упоредити временске периоде од инокулације до појаве палпабилних тумора, величине примарних тумора, број и величину метастатских колонија.
2. Одредити број и фенотип леукоцита инфилтрисаних у примарном туморском ткиву, у дренажу лимфним чворовима и слезини.



3. Испитати улогу MSC, Gal3 и ST2 молекула на продукцију Th1/Th2/ Th3/Th17 цитокина у анималном моделу тумора.
4. Испитати, *in vitro*, улогу MSC, Gal3 и ST2 молекула на цитотоксичност моноцита и тумор специфичних лимфоцита .

Актуелност истраживања

MSC су адултне матичне ћелије које поседују клонску мултипотентност (3) . Ове ћелије су углавном локализоване у костној сржи и експримују различите површинске маркере као што су CD73/ SH-3 / SH-4 и ендголинCD105/ SH-2 али не и хематопоеетске маркере као што су CD34/ CD14 /CD45 или CD117/ c-kit.(4). Скорија истраживања су показала да MSC поседују имunosупресивне ефекте и способност миграције, што их чини јако атрактивним у алогеној терапиској примени. У *in vivo* мишијем моделу је показано да када се обележене MSC убризгају у миша оболелог од малигног меланома оне првенствено мигрирају на место тумора. Djouad et all. су 2003 год. показали да када се MSC ко-трансплантирају са ћелијама малигног меланома у мишевима се развија примарни тумор, исти резултат се добија и када се MSC трансплантирају у места која су удаљена од тумора (5). Међутим исти тим истраживача је показао да присуство MSC омогућава ранији раст тумора али да нема утицаја на метастазирање, док су Karnoub et all показали да када се MSC ко-трансплантирају заједно са малигним ћелијама повећавају метастатски потенцијал неколико ћелијских линија карцинома дојке (6).

Описани су бројни адхезивни молекули који везивањем за одговарајуће лиганде на циркулишућим малигним ћелијама омогућају њихово селективно преживљавање. Новија истраживања указују на потенцијалну улогу адхезивног молекула галактина 3 и то у почетном везивању циркулишућих малигних ћелија. Биолошка функција галактина 3 код малигних обољења још увек је недовољно разјашњена. Примећено је да је његова експресија током малигне трансформације измењена, и да је она у корелацији са инвазивношћу тумора и стицањем метастаског фенотипа. . Krishnan V. и његови сарадници сматрају да галактин-3 конститутивно експримиран на васкуларном ендотелу плућа, има кључну улогу у адхезији циркулишућих малигних ћелија мишијег меланома B16F10 за ендотел плућа (7). Поједине студије јасно доказују повећану експресију галактина 3 у култури ендотелних ћелија плућа, мозга и јетре код мишева, затим на HUVEC и ендотелним ћелијама микроциркулације коже (8,9,10). Поједине студије сматрају да галактин 3 није само молекул који учествује у адхезији малигних ћелија, већ је укључен и у каснијим процесима метастазирања на више начина: а) првенствено елиминацијом тумор инфилтришућих Т лимфоцита; б) стимулише инвазију и миграцију малигних ћелија повећавањем експресије $\alpha\beta 1$ интегрина; ц) стимулише ангиогенезу (11)

ST2L молекул представља селективни маркер Th2 лимфоцита. Појављују се први резултати који указују на могућу функционалну улогу ST2 у Th2 имунском одговору. Коришћењем анти-ST2 антитела успешно је индукована резистенција на бактерију *Leishmania* мајор код BALB/C мишева, преусмеравањем штетног Th2 у заштитни Th1 имунски одговор



(12). Давање ST2-IgG фузионог протеина значајно је смањило еозинофилно запаљење дисајних путева и супримирало *in vivo* продукцију Th2 цитокина, пре свега кроз ометање интеракције лиганда са ST2L рецептором (13). Док Th1 цитокини превасходно активирају макрофаге и посредују у деструкцији туморских ћелија, Th2 цитокини имају широк опсег ефеката: деактивација макрофага и активација Б лимфоцита (секретија IgE антитела), активација мастоцита, базофила и еозинофила. Па иако Th2 лимфоцити могу да индукују „регрутовање“ туморицидних еозинофила и макрофага у окружење тумора и тако доведу до акутног одбацивања тумора (14), Th1 лимфоцити обезбеђују далеко бољи антитуморски ефекат (15) и само могу да обезбеде дуготрајан антитуморски одговор CD8+T лимфоцита (CTLs; 16). Многа истраживања указују на повезаност Th1 имунског одговора и регресије тумора, док је одсуство регресије или прогресија тумора везана за Th2 имунски одговор (17, 18).

Предмет и опис истраживања, задачи, методологија, очекивани резултати:

Експерименталне животиње

Као експерименталне животиње користиће се мишеви сојева BALB/C, C57BL/6 и нокаут мишеви (Gal 3 ^{-/-} и ST2 ^{-/-}), старости од 8 до 12 недеља. Све експерименталне и контролне групе у истраживању садржаће по 20 мишева.

Индуковање тумора

Тумори ће се индуковати апликацијом малигнух ћелијских линија: 4T1 и B16F1 и ко-трансплантацијом ових линија са MSC. За индуковање примарног тумора ћелије ће се убризгавати субкутано. За модел експерименталне метастазе, ћелије ће се убризгавати интравенски, у латералну репну вену.

Мерење величине примарног тумора

Величина примарног тумора одређује се морфометријски. Запремина тумора се израчунава по формули $V (mm^3) = L (\text{ већи пречник}) \times W(\text{мањи пречник})/2$ (Carlsson et al., 1983).

Верификација броја и величине метастаских колонија

Стандардно патохистолошко бојење: ткивне исечке обојити хематоксилин-еозинским бојењем. Микроскопирањем одредити број и величину метастатских колонија

Одређивање фенотипа леукоцита

Имунохистохемијском методом и проточном цитометријом, моноклонским антимишјим антителима (CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, Foxp3, F4/80, ST2), одређиваћемо фенотип леукоцита у примарном туморском ткиву, у дренажућим лимфним чворовима, слезини, плућима и јетри.



Мерење нивоа цитокина у серуму и ткиву

Одређиваћемо серумске нивое цитокина (IL-17, IL-23, IL-5, IL-4, IL-12, IFN-gama, TNF- α , TGF- β) ELISA и ELISPOT техникама. Мерићемо и експресију цитокина у примарном тумору, регионалним лимфним чворовима и слезини, Real time PCR техником

Цитотоксичност моноцита и тумор специфичних лимфоцита

Цитотоксичност леукоцита одређиваће се МТТ- тестом цитотоксичности, након 24- часовне кокултивације са туморским ћелијама.

Статистичка обрада података

Разлике између група анализираћемо или не-параметријским Mann-Whitney тестом или параметријским независним Т- тестом., у зависности од нормалности расподеле. Нормалност расподеле вредности унутар група анализираћемо Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk тестовима. Упоредивање инциденца метастаза између група ивршиће се Chi-square тестом. Вредност p мању од 0.05 рачунаћемо као статистички значајну. За статистичку обраду свих података користиће се SPSS пакет, верзија 13.0

Значај истраживања

Ово истраживање нам може дати нове податке о механизмима туморгенезе, стицања метастатског потенцијала, самог метастазирање, као и механизмима неспецифичног и спечифичног имунског одговора на туморе. Добијањем одговарајућих резултата истраживања отварају се врата потенцијалној терапијској примени испитиваних ћелија и молекула.

Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од две године.

Литература

1. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 7: 139-147, 2007.
2. B. Linju Yen and Men-Luh Yen. Mesenchymal Stem Cells and Cancer — for Better or for Worse? *Journal of Cancer Molecules* 4(1): 5-9, 2008.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999
4. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226: 507-520, 2001.



5. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837-3844, 2003.
6. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557-563, 2007.
7. Krishnan V, Bane SM, Kawle PD. et al. Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. *Clin Exp Metastasis*. 2005; 22:11-24.).
8. Lotan R, Belloni PN, Tressler RJ. et al. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconj J* 1994; 11: 462-8;
9. Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA. et al. Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. *Glycobiology* 2006; 16:210-220;
10. Fukushi, Makagiansar IT. and Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 3580-90
11. Thijssen VL, Poirier F, Baum LG. and Griffioen AW. Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* 2007;110 (8): 2819-27.
12. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T Cells. *J Exp Med* 1998;187:787-94.
13. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 190:895-902.
14. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188: 2357–2368.
15. Fallarino, F., U. Grohmann, R. Bianchi, C. Vacca, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2000. Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8⁺ T cell-dependent tumor eradication in vivo. *J. Immunol.* 165:5495–5501.
16. Nishimura, T., M. Nakui, M. Sato, K. Iwakabe, H. Kitamura, M. Sekimoto, A. Ohta, T. Koda, and S. Nishimura. 2000. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46:S52–S61.



17. Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, et al. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1997;108:914–19.
18. Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C, et al. Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest* 1998;78:541–50

Руководилац пројекта:

Асс. Иван Јовановић

Главни истраживач:

Асс. Иван Јовановић

Ангажовани истраживачи:

Проф. др Миодраг Лукић

Проф. др Небојша Арсенијевић

Асс. Биљана Љујућ

Асс. Гордана Радосављевић