



## Општи подаци и протокол истраживања

### Назив Пројекта :

УЛОГА РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА И ТН2 ПОСРЕДОВАНЕ ИМУНОРЕГУЛАЦИЈЕ У ДИЈАБЕТЕСУ ИНДУКОВАНОМ МАЛИМ ПОНОВЉЕНИМ ДОЗАМА СТРЕПТОЗОТОЦИНА

### Кључне речи :

дијабетес, Treg, ST2, стрептозотозин, циклофосфамид

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

Дијабетес типа 1 (Т1Д) је обољење проузроковано аутоимунским запаљењским процесом усмереним према Лангерхансовим острвцима панкреаса (1) што за последицу има апоптозу  $\beta$  ћелија (2). Индукција дијабетеса малим поновљеним дозама стрептозотоцина (MLD-STZ) је један од најприхваћених модела за испитивање утицаја имунорегулаторних механизма у настанку и развоју овог обољења. Вишедеценијским испитивањима имунопатогенезе многих обољења дошло се до закључка да баланс Th1/Th2 лимфоцита игра важну улогу у спречавању аутоимунског процеса. Данас је познато да CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити након активације могу да се диференцирају не само у две већ у најмање четири подгрупе: Th1, Th2, Th17 и Treg, што зависи од врсте антигена, активационог статуса APC и цитокинског окружења на месту индукције. Док су Th1/Th17 подгрупе лимфоцита повезане са настанком и развојем мултипле склерозе, реуматоидног артритиса, Т1Д и њиховим мишијим и пацовским експерименталним моделима, дотле се Treg/Th2 подгрупама генерално приписује заштитна улога у овим стањима (3-5). С обзиром, да је трансмембрански ST2 молекул (ST2L (IL-1R4)) селективани маркер Th2 лимфоцита, који није нађен на Th1 лимфоцитима (6-8), могуће је испитати улогу два регулаторна механизма у патогенези MLD-STZ дијабетеса типа 1. То су: активност CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регулаторне Т лимфоците (Treg) и сигнализација путем ST2 молекула. Занимљиво је да су ови регулаторни механизми оперативни, или барем мање-више значајни, у зависности од генетске основе мишева, јер урођене карактеристике испитиваних сојева мишева условљавају различите реакције у процесима који су у основи орган-специфичних аутоимунских болести посредованих Т лимфоцитима.

### Циљ истраживања

1. Утврдити дејство MLD-STZ на индукцију дијабетеса код BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.



2. Испитати дејство CY на Treg лимфоците у MLD-STZ индукованом дијабетесу код BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.
3. Испитати улогу Treg лимфоцита у развоју MLD-STZ дијабетеса код BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.
4. Испитати улогу ST2 гена у индукцији MLD-STZ дијабетеса код BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.
5. Испитати улогу проинфламаторних (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17) и антиинфламаторног цитокина (IL-10) у патогенези MLD-STZ дијабетеса код BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.

### Актуелност истраживања

Познавање морфологије и функције Treg лимфоцита је неопходно за разумевање њихове улоге у аутоимунском процесу (9,10). Иако су ефекти Treg лимфоцита на смањење Th1 и Th17 одговора показани (11), није још сасвим јасно у ком степену они имају улогу у генетски одређеној осетљивости различитих сојева мишева на настанак и развој инфламаторне аутоимуности. Односно није јасно у којој мери су Treg лимфоцити заслужни за релативну резистентност BALB/c мишева на Th1/Th17 посредовану имунопатологију, као ни да ли су одговорни за контролу Th1/Th17 индукованог  $\beta$  ћелијског оштећења код ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева. Да бисмо обрадили ова питања користићемо мале дозе циклофосфамида (CY), као модел елиминације Treg лимфоцита (12), како бисмо проценили њихову улогу у индукцији MLD-STZ дијабетеса код ST2<sup>+/+</sup> BALB/c и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c.

Недавно откриће да је ST2L mRNA присутна само у мишјим Th2 ћелијама D10 ћелијске линије, док није нађена у Th1 линијама (13) показују да је ST2L (IL-1R4) селективан маркер за Th2 лимфоците (6-8). Захваљујући овом открићу могуће је анализирати улогу Th2 одговора, односно ефекате смањења ST2 посредованог Th2 сигнализације на развој MLD-STZ дијабетеса код релативно резистентних BALB/c мишева. Пре само неколико година је пронађен IL-33 као специфични лиганд за ST2L (14). IL-33 индукује Th2 одговор кроз ST2L (15,16) и истовремено инхибира Th1 одговор (14,17). Уз наведено, скорија истраживања показују да ST2L може бити снажан негативни регулатор TLR сигнала и да његова повећана експресија на дендритичним ћелијама онемогућава њихову матурацију након проинфламаторних стимулуса (18). Због тога је значајно утврдити да ли овај пут може бити одговоран за релативну резистентност BALB/c мишева на индукцију MLD-STZ дијабетеса. Односно да ли се генетски условљена релативна резистентност на појаву дијабетеса код BALB/c мишева може приписати вишем Th2 посредованом имунском одговору и нижем Th1 посредованом инфламаторном одговору и/или активности Treg ћелија осетљивих на дејство мале дозе циклофосфамида. Такође је значајно проценити улогу Treg лимфоцита у контроли развоја MLD-STZ дијабетеса код ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева (код којих доминира Th1 одговор) коришћењем мале дозе CY, као модел за елиминацију Treg лимфоцита (19).



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

### **Мишеви**

BALB/c сој мишева на којима су извођени експерименти одгајани су у шталама Војномедицинске академије (ВМА, Београд), док су ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишеви набављени из мишијих одгајалишта у Глазгову захваљујући Др Лију (Liew FY, Glasgow Biomedical Research Centre, UK). У експериментима су коришћени 8-12 недеља стари мужјаци BALB/C, ST2<sup>-/-</sup> BALB/c мишева.

### **Изазивање и праћење дијабетеса**

Стрептозотозин (STZ) се раствара у цитратном пуферу са pH 4,5 и убризгава интраперитонеално у дози од 40mg/kg дневно током 5 узастопних дана. Нивои гликемије и гликозурије се мере свакодневно.

### **Убризавање циклофосамида (CY)**

CY је убризгаван у дози од 200mg/kg тежине два пута у интервалу од 1 недеље, почевши од дана 0. Прва ињекција CY је дата после приближно 8 сати од последњег убризгавања STZ како би се избегла могућа интеракција CY и STZ (20).

### **Проточна цитофлуорографска анализа Т лимфоцита**

Проточна цитофлуорографија је коришћена како би се одредила процентуална заступљеност различитих субпопулација Т лимфоцита у лимфним чворовима панкреаса. Анализа се ради из свеже изолованих лимфних чворова. Сви мишеви се жртвовају у етру након чега им се хируршким прибором извађени дренирајући лимфни чворови панкреаса. Прикупљени парапанкреатични лимфни чворови су пуловани према групама и стављани у RPMI-1640 (RPMI од енг. - Roswell Park Memorial Institute, Sigma-Aldrich, Germany) са 10% FCS. Затим су помоћу мрежица из панкреасних лимфних чворова изолују ћелије стављене у RPMI-1640 са 10% FCS и коришћене за дању анализу. У техници бојења мембранских и интрацелуларних маркера за детекцију Т и В лимфоцита су коришћена антимишја антитела обележена различитим флуоресцентним бојама. Анти-CD25 (IL-2R), анти-CD4, анти-CD8, анти-Foxp3, анти-CD19 антитела. Процедура бојења површинских и интрацелуларних маркера изведена је према упутству BD Pharmingen.



### Одређивање серумског нивоа IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ и IL-17 индиректном ELISA техником

Мишеви су жртвовани у етру, након чега им је крв извучена из абдоминалних аорти и центрифугирана 10 минута на 3000 грм. Серум је појединачним иглама и шприцевима одвојен из крви и одложен у замрзивач на  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализе. Мерени су серумски нивои три цитокина: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 коришћењем ензимоимунотест кита ( енг. – Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA); R&D Systems Minneapolis, MN) специфичног за мишје цитокине, уз сагласност са написаним протоколом. Стандард као и сви узорци су рађени у трипликату. За читавање резултата коришћен је ELISA читач (Zenyth, Anthos,UK). Непосредно пре мерења оптичке густине у сваком бунару микротитар плоче су остављене на шејкеру неколико минута. Оптичка густина је прочитана на 450nm таласне дужине.

### Значај истраживања

Значај истраживања је да се открију и утврде имунорегулаторни механизми у контроли настанка и развоја MLD-STZ дијабетеса код различитих сојева (BALB/C и ST2<sup>-/-</sup> BALB/c) мишева. Утврђивање имунорегулације се односи на разјашњавање улоге Трег лимфоцита и ST2 посредованог Th2 сигнала у ограничавању Th1/Th17 индукваног оштећења  $\beta$  ћелија панкреаса.

### Временски оквир

Истраживања ће се спровести у лабораторији за Клиничку и експерименталну имунологију, Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу у оквирном трајању од 2 године.

### Литература

1. Norman MU, Hickey MJ. Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. *Tissue Antigens* 2005;66:163–72.
2. Mensah-Brown EPK, Stosic Gruzicic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002;38:941–6.
3. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-95
4. Ria F, Penna G, Adorini L. Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998;28:2003–16.
5. Weiss L, Barak V, Zeira M, Abdul-Hai A, Raibstein I, Reich S, Hirschfeld E, Gross D, Slavin S. Cytokine production in Linomide nod mice and the potential role of a Th(1)/Th(2) shift on autoimmune and anti-inflammatory processes. *Cytokine* 2002;19:85–93.
6. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T. 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;95:6930–5.
7. Xu D, ChanWL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998;188:1485–92.
  8. Walzl G, Matthews S, Kendall S, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Openshaw PJ, Hussell T. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J Exp Med* 2001;193:785–92.
  9. Korn T, Oukka M. Dynamics of antigen-specific regulatory T-cells in the context of autoimmunity. *Semin Immunol* 2007;19:272–8.
  10. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8(5):457–62
  11. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 2008;75:373–5.
  12. Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol* 2008;28:109–26.
  13. Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, Arai T, Furukawa Y, Tomizuka H, et al. The expression of ST2 gene in helper T cells and binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *J Biochem* 1997;121:95–103.
  14. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479–90.
  15. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 2007;179: 2551–5.
  16. Ali S, HuberM, Kollwe C, Bischoff SC, FalkW, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:18660–5.
  17. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* 2008;180:2443–9.
  18. Turnquist HR, Sumpter TL, Tsung A, Zahorchak AF, Nakao A, Nau GJ, Liew FY, Geller DA, Thomson AW. IL-1beta-driven ST2L expression promotes maturation in rapamycin-conditioned dendritic cells. *J Immunol* 2008;181:62–72.
  19. Brode S, Raine T, Zacccone P, Cooke A. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+FoxP3+regulatory T cells. *J Immunol* 2006;177:6603–12.



20. Ablamunits V, Quintana F, Reshef T, Elias D, Cohen IR. Acceleration of autoimmune diabetes by cyclophosphamide is associated with an enhanced IFN- $\gamma$  secretion pathway. J Autoimmun 1999;13:383–92.

**Руководилац пројекта:**

Асс. др Немања Здравковић

**Главни истраживач:**

Асс. др Немања Здравковић

**Ангажовани истраживачи:**

Проф. др Миодраг Лукић

Проф. др Небојша Арсенијевић

Асс. Слађана Пајовић