



## Општи подаци и протокол истраживања

**Назив Пројекта :** УТИЦАЈ СИГНАЛНОГ ПУТА IL-33/ST2 НА НЕОАНГИОГЕНЕЗУ У КАРЦИНОМУ ДОЈКЕ

**Кључне речи :** неоангиогенеза, сигнални пут IL-33/ST2, карцином дојке

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

Раст тумора и развој метастаза детерминисан је карактеристикама ћелија карцинома, али и посредовањем ћелија строме и запаљенског инфилтрата. Интензиван раст туморског ткива праћен је хипоксијом тј. некрозом, што узрокује покретање механизма неоангиогенезе. Неоангиогенеза је, према томе, последица нарушеног баланса између фактора који промовишу и супримирају овај процес, а који настају у ћелијама тумора и/или перитуморског ткива. Новонастали крвни судови поред улоге у исхрани туморског ткива промовишу метастазирање, али и инфилтрацију туморског ткива запаљенским ћелијама.

Савремене студије су потврдиле да инфламација игра важну улогу у настанку карцинома (1), иако су многи од молекуларних и ћелијских механизма који посредују у овој спрези неразјашњени. Претходна истраживања су показала да урођена и стечена имуност могу посредовати у елиминацији туморских ћелија, као и да својом активношћу могу промовисати напредовање тумора (2). Другим речима, запаљенски инфилтрат у ткиву тумора може имати двојаку, протуморску или антитуморску улогу, што се позитивно или негативно одражава на туморску инвазију, раст тумора, метастазирање, исход лечења и ствара загонетке приликом испитивања механизма деловања (3). Сматра се да је двојака улога запаљенских ћелија резултат хетерогености тумора и разноврсности фенотипова инфламаторних ћелија које инфилтришу ове промене (4).

Истраживање нам може дати нове податке о могућим разликама у међусобној повезаности испитиваних серумских и имунохистохемијских маркера у карциному дојке. Такође, студија би могла да омогући боље разумевање биологије тумора и разјасни улогу и разлике испитиваних маркера у процесу неоангиогенезе. Позитивни резултати истраживања могли би да отворе врата, потенцијално, другачијем терапијском приступу у супримирању неоангиогенезе.



### Циљ истраживања

Основни циљ планираног истраживања је испитивање значаја сигналног пута IL-33/ST2 на факторе неоангиогенезе, као и његовог утицаја на заступљеност различитих типова моноклеарних ћелија у туморском и перитуморском запаљенском инфилтрату у мишијем моделу карцинома дојке.

У том циљу, поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Испитати присуство маркера неоангиогенезе у примарном тумору у зависности од постојања сигналног пута IL-33/ST2.
2. Испитати микроваскуларну густину (MVD) и експресију других фактора неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву код „*wild type*“ и мишева код којих је генетски елиминисан ST2 (IL-33) рецептор.
3. Одредити серумске концентрације релевантних регулаторних и проинфламаторних цитокина у зависности од присуства сигналног пута IL-33/ST2.
4. Одредити процентуални удео, укупан број као и разлике у заступљености испитиваних типова моноклеарних ћелија у туморском и перитуморском ткиву код „*wild type*“ и ST2 дефицијентних мишева.

У циљу корелације предвиђених истраживања са налазима у хуманој патологији тумора испитиваћемо:

5. Присуство ST2R и IL-33 у хуманом карциному дојке, као и повезаност ових маркера са стандарним патохистолошким параметрима и маркерима неоангиогенезе.

### Актуелност истраживања

Студијама у којима су анализирали све чланове IL-1 породице цитокина, Schmitz и сарадници су током 2005 године открили лиганд за ST2 рецептор и означили га као интерлеукин-33 (IL-33) (5). Даљим истраживањима утврђено је да је IL-33 идентичан продукту Dvs27 гена који је активиран у експерименталном моделу субарахноидалне хеморагије и нуклеарном фактору венула са високим ендотелом (NF-HEV енгл. *nuclear factor of high endothelial venules*) (6,7).

ST2 молекула се јавља у две форме: солубилној (sST2) и као мембрански рецептор (ST2L) присутан на мембрани Th2 лимфоцита, мастоцита, макрофага, базофила, еозинофила, iNKT ћелија, дендритских ћелија и NK ћелија. Везујући се за овај рецептор, IL-33 индукује секрецију IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 појачавајући Th2 имунски одговор.

У одсуству проинфламаторних цитокина и инфламације, IL-33 је локализован у једру (7,8) где је за хроматин везан својим аминокрајем (N terminus) названим LANA (енгл. *latency*



*associated nuclear antigen*) (9). Своју биолошку активност IL-33 остварује посредством IL-1-like домена локализованог на карбокситерминалном крају (C terminus). Интересантно је да током некротичне смрти ћелије долази до масовног ослобађања функционалног IL-33 (10,11) механизмом који је и даље непознат. Сматра се да је ослобађање велике количине IL-33 из некротичних ћелија заправо процес алармирања суседних ћелија, а да IL-33 има улогу алармина који упозорава остале ћелије да је дошло до деструкције ткива (8). Ослобођени IL-33 се затим разграђује дејством каспазе 7 и каспазе 3 (10,11) чиме настају биолошки инактивни продукти разграђеног IL-33.

Активација IL-33/ST2 сигналног пута регулисана је солубилним sST2. Овај молекул има могућност да блокира IL-33 у циркулацији и екстрацелуларном простору удаљених ткива и органа (5,12).

Обзиром да је ST2 рецептор експримиран на готово свим ћелијама имунског система, као и у многим ткивима и органима, IL-33/ST2 сигнални пут има важну улогу у патогенези бројних болести у којима активација IL-33/ST2 сигналног пута супримира Th1 и Th17, а подстиче Th2 имунски одговор (12). Изузетак је реуматоидни артритис у чијој патогенези је важан Th1 и/или Th17 имунски одговор, а примена IL-33 доводи до егзацербације колагеном индукованог артритиса поларизујући имунски одговор у Th1 и/или Th17 смеру (12).

Експресија нуклеарног IL-33 опада на почетку ангиогенезе током зарастања рана (13). Проинфламаторни цитокини (IL-1 $\beta$  и TNF) и проангиогени фактори раста (нпр. VEGF), чија је експресија индукована током зарастања рана супримирају експресију IL-33 у ендотелним ћелијама (13). У осталим студијама потврђено је да IL-33 промовише неоангиогенезу стимулишући пролиферацију, миграцију и диференцијацију ендотелних ћелија као и васкуларну пермеабилност редукцијом међућелијских веза (14).

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

#### **А. Испитивања на материјалу узетом од пацијената**

У студију ће бити укључено око 200 ткивних узорака пацијенткиња са карциномом дојке које су оперативно лечене у Клиници за хирургију Клиничког центра Крагујевац. Патохистолошка дијагноза, уз одређивање стандардних параметара биће постављена на H&E препаратима. Класификација тумора ће бити учињена према UICC-TNM критеријумима, а градирање према WHO класификацији.

#### **Имунохистохемијско испитивање**

За имунохистохемијско одређивање нивоа експресије испитиваних маркера (IL-33, ST2L, PDGF, IL-8, VEGF-A, CD34, CD105, D2-40) у ткивном материјалу биће коришћени фиксирани узорци ткива, укалупљени у парафин. Анализа ће бити обављена применом палете



моноклонских антитела различитих произвођача, према препорученим протоколима. Експресија испитиваних маркера биће анализирана на основу процента ћелија које експримирају одређени маркер, интензитета експресије, али и на основу скорa детерминисаног на основу претходних студија, специфичног за сваки маркер. Поред наведених моноклонских антитела, на ткивним пресецима пацијенткиња оперисаних од карцинома дојке, биће одређивана и експресија IL-33.

### Одређивање MVD

Микроваскуларну густину (MVD) процењиваћемо одвојено, имунохистохемијском методом, применом анти-CD34 и анти-CD105 моноклонских антитела. Анализа ће бити спроведена Carl Zeiss Axioskop 40 светлосним микроскопом. Појединачне ендотелне ћелије или кластери позитивни на CD34 и/или CD105 биће потврђени као крвни судови. Присуство крвних ћелија или фибрина без детектованих ендотелних ћелија неће бити анализирани као микроваскуларни елементи. Крвни судови са мишићним зидом неће бити бројани. Све плочице ће првобитно бити анализирани на микроскопском увећању 400x. На овај начин ће бити одређена три „жаришта“ (*eng. „hot spots“*) тј. поља са највећом микроваскуларном концентрацијом а затим ће ова поља бити фотографисана на 100x увећању применом Carl Zeiss AxioCam ICc1 дигиталне камере. Независно, два патолога ће применом Carl Zeiss AxioVision v.4.x software-а спровести анализу генерисаних фотографија и утврдити број микроваскуларних структура у претходно одабрана три „жаришта“. MVD (микроваскуларне структуре/ mm<sup>2</sup>) ће бити израчуната према критеријумима које су поставили Weidner и сарадници (17) тј. као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса.

Однос средњих вредности CD34 и CD105 (CD34/CD105) биће анализиран као посебна варијабла.

### В. Испитивања на WT и ST2<sup>-/-</sup> мишевима

Као експерименталне животиње користићемо мишеве чистог соја BALB/c ("wild type", WT) ST2<sup>+/+</sup> и knock-out или ST2<sup>-/-</sup> мишеве на BALB/c подлози, добијене циљаном делецијом гена за ST2 (18). Експерименталне и контролне групе у истраживању садржаће по 50 мишева, женског пола, старости од 8 до 10 недеља.

### Индуковање тумора

Индуковање тумора обавићемо апликацијом 4T1 ћелијске линије мишијег карцинома дојке добијене из спонтано насталог тумора дојке у BALB/c мишу. Малигне ћелије 4T1 (5x10<sup>4</sup>) ћемо ресуспендовати у 50µl PBS-а и инокулисати директним убризгавањем у масно јастуче 4. млечне жлезде.



### Апликација IL-33

BALB/c ("wild type", WT) ST2<sup>+/+</sup> мишеве ћемо поделити случајним узорковањем на две групе. Експерименталним групама мишева, интраперитонеално, апликоваћемо мишији интерлеукин 33, по моделу Miller-а и сарадника (15) (на 3-4 дана тј. укупно 5 доза до 16-ог дана експеримента), док ћемо контролним групама истовремено убризгавати PBS, почевши од нултог дана експеримента.

### Жртвовање, одвајање ткивног материјала и верификација индукованог тумора.

Мишеви ће бити жртвовани у продуженој етарској анестезији, након чега ћемо им узимати крв из абдоминалне аорте. Присуство индукованог тумора, верификоваћемо микроскопирањем препарата добијених сечењем узорака ткива, укалупљених у парафин, а затим бојених стандардним Н&Е бојењем.

### Одређивање величине примарног тумора

Раст палпабилног примарног тумора ће бити праћен свакодневно уз истовремено морфометријско одређивање његове величине. Запремину тумора ћемо израчунавати према формули (16):

$$V(\text{mm})^3 = \frac{L (\text{највећи пречник}) \times W^2 (\text{најмањи пречник})}{2}$$

### Мерење серумског нивоа цитокина

Вредности релевантних регулаторних и проинфламаторних цитокина у серуму одређиваћемо стандардном ELISA техником, уз примену ELISA сетова, према упутствима произвођача.

### Анализа популација мононуклеарних ћелија у тумору

Проточном цитометријом и коришћењем адекватних моноклонских антимишјих антитела, одредићемо процентуални удео и укупан број различитих популација мононуклеарних ћелија (CD4<sup>+</sup> лимфоцита, CD8<sup>+</sup> лимфоцита, В лимфоцита, NK ћелија, iNKT



ћелија, неутрофила, макрофага, мастоцита и еозинофила), у туморском и перитуморском ткиву.

### **Имунохистохемијско испитивање и одређивање MVD**

Имунохистохемијска анализа као и одређивање микроваскуларне густине (MVD) биће учињена применом исте палете антитела као и на претходно описан начин за материјал узет од пацијената.

### **Статистичка обрада података**

За статистичку обраду добијених резултата биће употребљен комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 15.0, SRSS Inc., Chicago, IL). За анализу добијених података, користићемо: методе дескриптивне статистике, Studentov T тест и/или Mann-Whitney-јев тест,  $\chi^2$  тест и Pearson-ов или Spearman-ов коефицијент корелације. Дефинитивни избор статистичких метода зависиће од природе добијених података. Праг значајности ( $\alpha$ ) за сва статистичка израчунавања биће 0,05.

### **Значај истраживања**

Истраживање нам може дати нове податке о значају ST2R и IL-33 у туморској ангиогенези као и о потенцијално новом приступу примени циљне терапије у супримирању неоангиогенезе.

### **Временски оквир**

Истраживање ће бити спроведено у периоду од две године.

### **Литература:**

1. Crowe SE. *Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy.* Curr Opin Gastroenterol 2005;21:32–38.
2. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4:11-22.
3. Ostrand-Rosenberg S. Cancer and complement. Nat Biotechnol 2008;26:1348-1349.



4. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: The roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006;90:1-50.
5. 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;23:479-490.
6. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1279-1288.
7. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 2003;163:69-79.
8. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 2008;3: e3331.
9. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* 2008;9:1006-1012.
10. Cayrol C, Girard J P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad. Sci USA* 2009;106:9021-9026.
11. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 2009;31:84-98.
12. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010;10:103-110.
13. KÜchler AM, Pollheimer J, Balogh J, Sponheim J, Manley L, Sorensen DR, De Angelis PM, Scott H, Haraldsen G. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol* 2008;173:1229-1242.
14. Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. IL-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6- mediated endothelial NO production. *Blood* 2009;114:3117-3126.
15. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. L-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 2008; 205:339-346.
16. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol* 2011;41:1902-1912.
17. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
18. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing