



Лични подаци руководиоца пројекта

Име : Немања

Презиме : Јовичић

Е-маил адреса: nemanjajovicic.kg@gmail.com

Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : Улога IL-33/ST2 сигналног пута у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности

Кључне речи : IL-33, ST2 , стеатохепатитис, стеатоза, фиброза, гојазност

Сажетак

Неалкохолна масна болест јетре (енгл. *NAFLD - Nonalcoholic fatty liver disease*) подразумева широк опсег поремећаја које карактерише повећана акумулација липида унутар јетре. Ови поремећаји, који се крећу у распону од бенигне статозе јетре до неалкохолног стеатохепатитиса (енгл. *NASH - Nonalcoholic steatohepatitis*), цирозе и хепатоцелуларног карцинома, представљају водећи узрок хроничне болести јетре у развијеним земљама¹. Сматра се да је преваленца NAFLD 20-30% у општој популацији,



а чак 75-100% код гојазних особа. Код 20% пацијената са NAFLD развија се хронична инфламација у јетри односно NASH². И поред ових чињеница, узрочници који изазивају прогресију болести и NASH још увек нису довољно разјашњени. Експериментални подаци показују да инфламацију у NASH-у узрокују различити фактори: инсулинска резистенција, системска липотоксичност због прекомерног уноса хране, продукти метаболизма липида, проинфламаторни цитокини, адипокини и други фактори³.

BALB/c сој мишева представља фенотип који је умерено осетљив на развој гојазности. Молекуларни механизми развоја гојазности, стеатозе/стеатохепатитиса и фиброзе јетре применом дијете са високим садржајем масти у овом соју мишева су недовољно испитани. Студије су до сада показале да код BALB/c мишева, иако мање осетљивих на развој гојазности, исхрана HFD дијетом изазива веће акумулирање масти у јетри у односу на, гојазности подложније C57Bl/6 мишеве. Претпоставка је да је то последица различитог метаболизма масти у јетри код ова два соја, али још увек нису разјашњени метаболички путеви одговорни за овај феномен⁴.

Досадашње студије су показале да IL-33/ST2 сигнални пут може имати протективну или проинфламаторну улогу у зависности од локализације и природе патофизиолошког процеса. Сматра се да IL-33 у хроничном хепатитису има профибротски ефекат^{5,6}. Такође је показано да IL-33 има протективну улогу у развоју инфламације у масном ткиву у мишијем моделу гојазности⁷.

Циљ истраживања

Циљ истраживања је да испитамо улогу IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези стеатозе/стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти. Такође је циљ да испитамо утицај IL-33 на депоновање и метаболизам липида у културама хепатоцита *in vitro*.

Актуелност истраживања

Молекулска патогенеза NASH-а је још увек у великој мери непозната. Деј и Џејмс (енг. Day, James) су 1998. поставили хипотезу „два удараца“³. „Први ударац“ представља екцесивну акумулацију липида у хепатоцитима која је последица инсулинске резистенције. „Други ударац“ који изазива оштећење хепатоцита, инфламацију, након тога и фиброзу, настаје под утицајем различитих фактора. Сматра се да су најзначајнији фактори оксидативни стрес као последица митохондријалне β-оксидације масних киселина, продукција проинфламаторних цитокина и адипокина од стране висцералног адипозног ткива (ВАТ), ендотоксин из бактерија пореклом из



гастроинтестиналног тракта (ГИТ), активација инфлазома.¹⁰ Досадашња истраживања мишијег модела индуковане гојазности су показала да се хронична инфламација ниског степена (енгл. *low-grade inflammation*) у ВАТ-у развија у периоду од 6. до 16. недеље, а у јетри између 16. и 26. недеље. Најзначајнији показатељи инфламације у јетри су интерлеукин (IL)-1 β , фактор некрозе тумора (енгл. *tumor necrosis factor, TNF*) – α и CD11c⁺ и CD11b⁺ макрофаги¹¹. Такође активација *Toll-like* рецептора 4 (TLR - enгл. *Toll-like receptor*) слободним масним киселинама или ендотоксином пореклом из ГИТ-а, изазива активацију NF κ B (енгл. *Nuclear factor- κ B*) укљученог у регулацију експресије проинфламаторних гена. Услед тога настаје продукција проинфламаторних хемокина и цитокина који имају снажан ефекат на регрутовање циркулишућих макрофага у јетру, као и на активацију Купферових и стелатних ћелија јетре, кључних ћелија у процесу фиброгенезе¹². Поред тога, студије су показале да хепатоцити изложени дејству палмитинске киселине у садејству липополисахарида продукују IL-1 β ¹³. Болест може напредовати у правцу цирозе при чему велики значај има „трећи ударац“ који, индукцијом диференцијације стелатних ћелија и њиховом трансформацијом у миофибробласте промовише фиброзу. Иmunски одговор се у току овог процеса померау правцу Th2, а макрофаги се поларизују у правцу M2 фенотипа¹⁴. IL-13 има велики значај у развоју фиброзе јетре у NASH-у¹⁵. Механизам којим IL-13 фаворизује процес фиброзе подразумева стимулацију продукције TGF- β 1¹⁶.

Интерлеукин 33 (IL-33) припада IL-1 фамилији цитокина. IL-33 може имати улогу алармина, када се пасивно отпушта из ћелије након њеног оштећења или некрозе и има такозвану "некротину" активност, или може бити интракритички негативни регулатор транскрипције NF κ B гена^{6,8,9}. IL-33 се везује за рецепторски комплекс на плазма мембрани који чине ST2L и IL-1R молекули. ST2L је експримиран на различитим ћелијама имунског система али и на многим другим типовима ћелија. IL-33/ST2 сигнални пут може промовисати Th1 или Th2 имунски одговор у зависности од типа активираних ћелија, микрооколине и цитокинска мреже у оштећеном ткиву⁶.

Ендотелне ћелије синусоида јетре и васкуларне ендотелне ћелије конститутивно експримирају IL-33. У току акутног оштећења јетре конкавалином-А (ConA) показано је да хепатоцити експримирају IL-33⁶. Осовина IL-33/ ST2 има протективну улогу у моделу ConA индукованог хепатитиса^{5,6,15}. У хроничном хепатитису, клиничке и експерименталне студије су показале позитивну корелацију експресије IL-33 и фиброзе јетре односно, показан је профибротски ефекат IL-33^{5,6}. Такође је показано да IL-33 има протективну улогу у развоју инфламације масног ткива у мишијем моделу гојазности⁷.



Предмет и опис истраживања:

задачи, методологија, очекивани резултати

Главни циљ истраживања:

Испитати улогу IL-33/ ST2 сигналног пута у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти;

У складу са основним циљем поставили смо следеће **експерименталне задатке:**

- Пратити развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести;
- Дефинисати и квантификовати масну инфилтрацију јетре (стеатозу јетре) коришћењем селективног хистохемијског бојења;
- Дефинисати и квантификовати фиброзу јетре коришћењем селективног хистохемијског бојења;
- Дефинисати и квантификовати стеатохепатитис применом бодовног система усклађеног са експерименталним моделом болести (инфилтрација 0-3, стеатоза 0-4, фиброза 0-4, "балон" дегенерација хепатоцита 0-1)
- Испитати биохемијске параметре оштећења јетре одређивањем концентрације АЛТ и АСТ у серуму;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и процесу фиброзе у јетри;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у панкреасу;
- Испитати концентрације цитокина IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-33, IL-13, и TGF- β у системској циркулацији;
- Одредити нивое експресије гена значајних за метаболизам масти у јетри и висцералном масном ткиву методом ланчане реакције полимеразе;



- Одредити нивое експресије гена значајних за развој инфламације у јетри и висцералном масном ткиву методом ланчане реакције полимеразе;
- Одредити нивое експресије гена значајних за развој фиброзе у јетри методом ланчане реакције полимеразе;

Експерименталне животиње:

Као експерименталне животиње биће коришћени ST2 дефицијентни (енгл. knockout, ST2^{-/-}) и ST2 позитивни мишеви соја BALB/c (енгл. wild-type, WT), мушког пола, старости од 6 до 8 недеља. Гојазност ће бити индукована применом дијете са високим садржајем масти (60%) у трајању 24 недеље. Метаболички параметри развоја болести (телесна тежина, ниво глукозе у крви) биће праћени периодично.

Хистолошка анализа:

Морфологију јетре и степен инфламације испитаћемо на препаратима бојеним хематоксилин-еозин техником (HE). Масну инфилтрацију јетре испитаћемо селективном *Oil Red O* методом за бојење масти. Степен фиброзе испитаћемо селективним методама за бојење колагена, *Picro Sirius Red* и *Trichrome Masson*. Коришћењем програма за анализу фотомикрографија *ImageJ* извршићемо семиквантитативну анализу количине липида и колагена у ткиву.

Имунохистохемија:

На препаратима јетре, масног ткива и панкреаса испитаћемо експримирање следећих молекула: IL-33, ST2, α -SMA, IL-13, F4/80, CD68, NLRP3 инфламазом, LXR α/β .

Одређивање трансминаза:

Трансминазе (AST, ALT) из серума жртвованих животиња биће одређене применом *Olympus* китова за одређивање трансминаза и коришћењем *AU 400 Olympus chemistry analyzer-a*.

ELISA:

Нивои цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-33, IL-13, и TGF- β) и инсулина у серуму биће одређивани ELISA тестом.

Проточна цитометрија:

Параметри инфламације (степен и фенотип инфилтрованих инфламаторних ћелија и експресија интраћелијских цитокина) биће одређивани у циљним методом проточне



цитометрије. Одредићемо проценат и укупан број Th1/Th2/Th17 Т лимфоцита, М1/М2 макрофага (експресија IL-13, TGF- β , IL-1 β , NLRP3 инфламазома), NKT ћелија. Испитаћемо и експресију одговарајућих хемокинских рецептора на Т лимфоцитима.

RT-PCR:

Методом ланчане реакције полимеразе (Realtime polymerase chain reaction-RT-PCR ћемо испитати нивое експресије следећих гена: LXR α/β , ChREBP- β , Fasn, C/EBP α , Acaca, GLUT 2, CD11c, SREBP-1c, Abca 1, PPAR- γ , CD36, GLUT 4, TNF- α , collagen I, α -smooth muscle actin, IL-13, ASC, NLRP3, pro-caspase-1, pro-Collagen 1, pro-IL-1 β , pro-IL-18, pro-IL-33, TGF β 1, CCL2/5, Arginase1, IL-10, MMP9, VEGF, RAGE, F4/80, GFAP. Експресија гена ће бити нормализована у односу на експресију β актина.

Култура хепатоцита:

Изоловаћемо хепатоците на трокомпонентном градијенту *Percoll*-а, а затим ћемо поставити културу у медијуму са додатком олеинске, палмитинске и стеаринске киселине. Део ћелија ћемо третирати рекомбинантним IL-33. Након 24h-48h култивације ћемо применом Nile Red бојења имунофлуоресценцом и проточном цитометријом одредити количину депонованих липида у хепатоцитима. Такође ћемо квантификовати експресију гена значајних за метаболизам масти методом ланчане реакције полимеразе

Очекивани резултати:

На основу досадашњих студија, очекујемо да ћемо показати профибротски ефекат IL-33 у јетри. Такође очекујемо да ће IL-33 изазвати повећану акумулацију липида у хепатоцитима.

Значај истраживања

Значај предложеног истраживања се састоји у расветљавању механизма стеатохепатитиса и фиброзе јетре у условима гојазности након примене дијете са високим садржајем масти у BALB/c соју мишева. Посебано је значајно испитати улогу IL-33/ ST2 сигналног пута у овим процесима што може имати значај у креирању нових терапијских приступа.

Временски оквир

Планирано истраживање биће спроведено у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Очекивани временски оквир за реализацију пројекта је две године.



Литература

1. Cohen JC, Horton JD, Hobbs NH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332(6037):1519-23.
2. Henaо-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.
3. Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *Journal of gastroenterology*. 2012;47(3):215-25.
4. Nishikawa S, Sugimoto J, Okada M, Sakairi T, Takagi S. Gene expression in livers of BALB/C and C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Toxicologic pathology*. 2012;40(1):71-82.
5. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 2013;39(2):357-71.
6. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012;32(8):1200-10.
7. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circulation research*. 2010;107(5):650-8.
8. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunologic research*. 2012;52(1-2):89-99.
9. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *Journal of hepatology*. 2012;56(1):26-33.
10. Hideki F, Norifumi Kawada. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenetrology* 2012;47:215-225.
11. Stanton MC, Shen SC, Jakson JV, et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development iof steatohepatitis in mice. *J Inflamm* 2011;8:8-15



12. De Minicis S, Svegliati-Baroni G. Fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5:179-87.
13. Weng HL. et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor- β 1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology*. 2009; 50: 230-243.
14. Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:702–707.
15. Shimamura T. et al. Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. *J. Immunol*. 2008; 181: 4656-4665.
16. Csac T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Syabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 2011;54:133-144.