



Лични подаци руководиоца пројекта

Име: Нада
Презиме: Пејновић
E-mail адреса: nadap@ikomline.net

Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта:

Улога Интерлеукина-33 и Галектина-3 у инфламацији код болесника са симптоматском стенозом каротидне артерије

Кључне речи:

Интерлеукин-33, Галектин-3, цитокини, атеросклероза, стеноза каротидне артерије, ендартеректомија, qRT-PCR, имунохистохемија;

Сажетак (250 речи):

Кардиоваскуларна обољења представљају најчешћи узрок смртних случајева широм света, укључујући и нашу средину. Учесталост кардиоваскуларних обољења и компликација се не смањује упркос примени мера превенције и агресивне фармакотерапије, која често са собом носи гранично прихватљиве ризике по здравље болесника.

Током последње деценије атеросклероза се сматра хроничном инфламаторном болешћу која представља процес посредован имунским ћелијама и контролисан имунским регулаторним механизмима, што отвара простор за испитивање улоге новооткривених и мало истражених цитокина у атерогенези.

Овим радом желимо да истражимо посебно улогу Галектина-3 (Gal-3) и интерлеукина-33 (IL-33), али и других проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у атеросклеротском процесу. Ограничен је број радова који се баве улогама цитокина и њиховим интеракцијама у атеросклеротским обољењима каротидних артерија.

Циљ нашег истраживања је да одредимо серумске нивое циљаних проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина и медијатора, као што су Gal-3, IL-33, sST2, IL-5, IL-13, IL-18, IFN- γ , IL-6, high-sensitivity C-reactive protein, TNF- α , IL-32, IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10, IL-35 и Lipoprotein-associated phospholipase A2 код болесника подвргнутих хируршком лечењу, каротидној ендартеректомији, као и да пратимо њихов тренд у непосредном постоперативном току.

Такође нам је циљ да хистолошким, имунохистохемијским анализама, као и квантитативном real-time PCR-анализом, утврдимо присуство и ткивну дистрибуцију наведених цитокина и медијатора у атеромима каротидних артерија добијених током хируршког лечења ових болесника.

Испитиваћемо и повезаност серумских концентрација цитокина и њиховог присуства у атеромима са епидемиолошким подацима о хроничним незаразним



обољењима добијеним током хоспитализације болесника ради елективне хируршке интервенције.

Циљ истраживања (100 речи):

Циљ истраживања је да се одреди концентрација цитокина у серуму и њихово присуство у атеромима код болесника са симптоматском стенозом каротидне артерије и да се испита повезаност између нивоа цитокина и стадијума атеросклеротске болести, то јест претеће или постојеће руптуре атеросклеротског плака.

У складу са основним циљем постављени су специфични циљеви:

1. Одређивање серумских нивоа цитокина и медијатора Gal-3, IL-33, sST2, IL-5, IL-13, IL-18, IFN- γ , IL-6, high-sensitivity C-reactive protein, TNF- α , IL-32, IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10, IL-35 и Lipoprotein-associated phospholipase A2 код болесника подвргнутих каротидној ендартеректомији, праћење њиховог тренда у непосредном постоперативном току, као и у серуму 30 здравих контролних особа подударних по полу и старости.
2. Хистопатолошка анализа хематоксилин-еозин обојених смрзнутих исечака ткива интраоперативно одстрањених атеросклеротских плакова
3. Имунохистохемијско бојење смрзнутих исечака ткива интраоперативно одстрањених атеросклеротских плакова у циљу идентификације присуства и дистрибуције цитокина и медијатора Gal-3, IL-33, sST2, IL-5, IL-13, IL-18, IFN- γ , IL-6, high-sensitivity C-reactive protein, TNF- α , IL-32, IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10, IL-35 и Lipoprotein-associated phospholipase A2
4. Квантитавна PCR-анализа на присуство информационе РНК за наведене цитокине и медијаторе у ткиву одстрањених атерома
5. Испитивање корелације нивоа серумских цитокина, имунохистохемијских и хистолошких резултата, и резултата квантитавне RT-PCR-анализе са епидемиолошким подацима о хроничним незаразним обољењима који укључују присуство хипертензије, дијабетеса, системских болести везивног ткива, цереброваскуларних болести, и факторима ризика (гојазност, пушење, хиперлипидемија, унос алкохола) добијеним из историје болести болесника.

Актуелност истраживања (500 речи):

Атеросклероза је генерализован процес у коме су захваћени сви артеријски крвни судови у организму, и сматра се скоро конститутивним, јер не постоји људски организам апсолутно поштеђен овог процеса, и дегенеративним, јер прогредира са годинама, и учесталији је и израженији код старијих особа. Са друге стране, постоје фактори који доводе до убрзавања атеросклеротског процеса, и његовог интензивирања. Неки од тих фактора су добро познати, дефинисани великим епидемиолошким студијама као фактори ризика за клинички манифестно испољавање атеросклерозе (1).



Од свих крвних судова захваћених атеросклеротским процесом, каротидне артерије спадају у значајније из неколико разлога: 1) ова обољења су чест узрок морбидитета, са високом стопом морталитета и евентуалног инвалидитета; 2) захваћеност каротидних артерија атеросклеротским процесом је веома честа; 3) могућност утицаја на атеросклеротски процес на каротидним артеријама, било медикаментозно, било хируршком интервенцијом, је одавно показана.

Данас је опште прихваћена чињеница да је атеросклероза хронична инфламаторна болест (2). Сматра се да су проинфламаторни механизми имунског система доминантно заслужни за настанак и прогресију атеросклеротске болести, док се антиинфламаторни цитокини и алтернативна активација макрофага означавају факторима који успоравају раст атеросклеротских наслага (3-5).

Тако IL-18 и INF-gamma knock-out мишеви спорије развијају атеросклерозу, од нормалних мишева (6, 7). Код мишева којима је делимично подвезана АЦИ региструје се појава атеросклеротског плака са доминирањем инфламаторног одговора, праћеног порастом проинфламаторних цитокина, ТНФ-алфа, ИЛ-6, са инфилтрацијом предоминантно М1 поларизованих макрофага (8). Фосфолипаза А2 је у више радова наведена као фактор који разликује симптоматске стенозе каротидне артерије које одликује танка фиброзна капа изнад липидног центра плака, од стабилних плакова који су мање склони руптури (9, 10).

У центру наших истраживања су два молекула који су недавно откривени, и налазе се у центру многих научних истраживања. То су Галектин-3 и Интерлеукин-33, оба са јако разноликим и потенцијално дивергентним ефектима у зависности од патолошког процеса.

Галектин-3 је протеински молекул из фамилије лектина, молекула који везују угљене хидрате, првенствено бета-галактозиде, има chimera-like мотив, који му омогућава да ствара хомо-димере, чак и када се налази на две различите ћелије, омогућавајући тако различите комбинације ћелијских интеракција, као и интеракција бројних ћелија са екстраћелијским матриксом. Најчешћи стимулус који доводи до ослобађања овог молекула у екстраћелијски простор јесте траума ћелије, то јест свака врста повреде (11).

Ослобођени галектин-3 делује проинфламаторно, делује на фибробласте, доводи до њихове активације и пролиферације, и тако стимулише појачану синтезу компоненти екстраћелијског матрикса, последичну фиброзу, која у имунском одговору на микробе служи да ограничи место инфекције и тиме спречи њено ширење, али у болестима које прати измењена активација имунског система, у стерилним условима, доводи до замене племенитог матичног ткива нефункционалним фиброзним ткивом, тако реметећи нормалан рад органа захваћеног таквим процесом (12). Постоје радови који показују да галектин-3 убрзава процес атеросклерозе, то јест да његова делеција у експерименталних животиња успорава настанак атеросклеротских лезија (13), али има података да његова делеција погоршава атеросклерозу (14) што зависи од експерименталног модела атеросклерозе.

Са друге стране, интерлеукин-33 може имати двоструку улогу, иако је такође, по функцији алармин, то јест молекула којег секретује оштећена ћелија, или ћелија изложена стресном фактору. Интерлеукин-33 је протеински макромолекул сложене структуре, који се ослобађа из оштећених, некротичних ћелија, и везује за своје



рецепторе на мембрани ћелија, или за солубилне молекуле који имају афинитет за овај молекул (15).

Везивањем за своје рецепторе на мембрани лимфоцита, IL-33 индукује продукцију и секрецију Th-2 цитокина (интерлеукин-5, интерлеукин-13), чиме повећава серумске нивое имуноглобулина. Овакав ћелијски одговор, у склопу са поларизацијом макрофага у M2 правцу, доводи до ограничавања имунског одговора, репарације ткива, и одсуства израженог имунског ћелијског инфилтрата у захваћеним ткивима.

Овај цитокин се у свом активном облику налази у цитоплазми многих типова хуманих ћелија, чијим оштећењем се као активан ослобађа у екстраћелијску средину и тамо доводи до испољавања свог дејства. У случају апоптозе ћелије, или активације система каспаза, каспаза-1 модификује интерлеукин-33 тако да од њега формира неактивни цитокин, који не би имао адекватну биолошку функцију када би био ослобођен у ванћелијски простор (16). Постоје студије које показују протективни ефекат IL-33 у атеросклерози (17), али и његову проинфламаторну улогу (18), као и његово повећано присуство у артеријама захваћеним васкулитисом циновских ћелија (19).

Оваква врста дуализма у активности овог цитокина постоји и када је у питању његов рецептор. ST2, који се алтернативним путем посттранскрипционе модификације може појавити у два облика, као мембрански ST2 лиганд, који везује интерлеукин-33, и као секреторна форма, sST2, који представља компетитивни инхибитор интерлеукина-33, јер везивањем за солубилни интерлеукин-33 у серуму омета његово везивање за мембрански рецептор, и даље испољавање функције (20, 21).

Предмет и опис истраживања (500 речи):

Испитиваће се нивои наведених цитокина у серумима болесника подвргнутим хируршком лечењу симптоматске стенозе каротидне артерије, употребом комерцијалних ELISA-тестова. Такође ће се одређивати нивои ткивне експресије информационе РНК за поменуте цитокине употребом real-time PCR тестова, као и анализа ћелијског инфилтрата из атеросклеротског плака екстирпираниог хируршком интервенцијом.

У ову групу ћемо укључити 200 болесника оперисаних на Клиници за васкуларну хирургију Института за кардиоваскуларне болести “Дедиње”.

Преоперативно би сваки болесник био подвргнут ултразвучном прегледу врата ради процене степена стенозе каротидне артерије. Рутинским лабораторијским анализама би били одређени комплетна крвна слика, са бројем леукоцита и леукоцитарном формулом, као и серумски ниво CRP-а.

Узорци крви би болесницима били узимани нултог дана (преоперативно), затим првог и 7.-ог постоперативног дана, укупно три пута. Узимало би се по око 5мл крви, из које би се центрифугирањем добило око 2,5мл серума, који би био аликвотиран на пет приближно једнаких делова. Из поменутих узорака бисмо одређивали нивое следећих цитокина: Gal-3, IL-33, sST2, IL-5, IL-13, IL-18, IFN- γ , IL-6, high-sensitivity C-reactive protein, TNF- α , IL-32, IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10, IL-35 и Lipoprotein-associated phospholipase A2. Нивои поменутих цитокина ће бити



одређивани комерцијалним ELISA тестовима, према методологији произвођача са сваки молекула који се испитује.

Такође, материјал узет током операције, то јест атеросклеротски плак уклоњен оперативним захватом из каротидне артерије оперисаног болесника би био иницијално чуван у физиолошком раствору. Потом би био смештан у контејнере са сувим ледом и тако транспортован у Крагујевац на даљу анализу.

Исечци смрзнутих плакова ће се бојити хистолошким и имунохистохемијским методама (хематоксилин-еозин, ICH на цитокине и медијаторе Gal-3, IL-33, sST2, IL-5, IL-13, IL-18, IFN- γ , IL-6, high-sensitivity C-reactive protein, TNF- α , IL-32, IL-17A, IL-23, IL-27, IL-10, IL-35 и Lipoprotein-associated phospholipase A2 ради одређивања ткивне експресије и дистрибуције поменутих молекула у ћелијама, али и на ћелијској мембрани ћелија присутних у атеросклеротском плаку.

Део узетих атерома ће се обрадити FACS анализом, ради фенотипизације присутних имунских ћелија које представљају извор имуномодулаторних молекула.

Једну контролну групу ће сачињавати болесници са не-атеросклеротским обољењем каротидне артерије (kinking, coiling), као и здраве особе без ултразвучно откривене стенозе каротидне артерије.

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати нормалност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико добијени резултати буду имали нормалну расподелу користићемо параметарски Student's t тест, док ће се у противном применити непараметарски Mann-Whitney тест.

Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

Упоредиваћемо измерене вредности испитиваних цитокина у све три наведене групе испитаника. Утврђиваћемо и корелацију вредности измерених цитокина са присуством или одсуством коморбидитета и фактора ризика, са степеном стенозе каротидне артерије.

Значај истраживања (100 речи):

Обзиром на епидемиолошки значај, инциденцу и потенцијалну инвалидност болесника са церебро-васкуларним обољењима, као и на недовољно истражену етиологију и патогенезу атеросклеротског процеса на месту рачвања каротидних артерија, сматрамо неопходним да истражимо имунолошки аспект овог обољења. Посебно је значајно да се испита повезаност имунских механизма са настанком клинички манифестне компликације атеросклеротске болести, руптуре атеросклеротског плака, која доводи до исхемијских промена у свом сливу, са последичним неуролошким испадом, који и представља индикацију за оперативно лечење ових болесника, које има за циљ да превенира евентуалне будуће емболијске догађаје везане за истострану оштећену каротидну артерију. Сматрамо да постоји могућност и откривања нових потенцијалних терапијских циљних



молекула имунског система којима би се утицало на превенцију развоја потенцијално фаталних компликација атероклероског процеса на каротидним артеријама.

Временски оквир:

Истраживање ће се спровести у периоду од годину дана.

Литература: (200 речи)

1. Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297: E568–E577.
2. Libby P, Lichtman AH and Hansson GK. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity* 2013;38: 1092-1104.
3. Moore KJ and Tabas I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell* 2011;145 (3):341-55.
4. Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al. Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6:131-138.
5. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999;340: 115-126.
6. Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003;59(1):234-40.
7. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice through release of interferon- γ . *Circ Res.* 2002;90:E34–38.
8. Merino H, Parthasarathy S, Singla DK. Partial ligation-induced carotid artery occlusion induces leukocyte recruitment and lipid accumulation-a shear stress model of atherosclerosis. *Mol Cell Biochem.* 2013;372(1-2):267-73.
9. Mannheim D, Herrmann J, Versari D, Gössl M, Meyer FB, McConnell JP, Lerman LO, Lerman A. Enhanced Expression of Lp-PLA2 and Lysophosphatidylcholine in Symptomatic Carotid Atherosclerotic Plaques. *Stroke.* 2008;39: 1448-1455.
10. Gonçalves I, Edsfeldt A, Ko NY, Grufman H, Berg K, Björkbacka H, Nitulescu M, Persson A, Nilsson M, Prehn C, Adamski J, Nilsson J. Evidence Supporting a Key Role of Lp-PLA2-Generated Lysophosphatidylcholine in Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1505-1512.
11. Henderson, N. C. and Sethi, T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological Reviews.* 2009; 230: 160–171.
12. Hrynchyshyn N, Jourdain P, Desnos M, Diebold B, Funck F. Galectin-3: a new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 2013;106(10):541-6.
13. MacKinnon A C, Liu X, Hadoke P WF, Miller M, Newby D and Sethi T. Inhibition of galectin-3 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice *Glycobiology.* 2013; 23 (6): 654-663.
14. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Scipioni A, Sansoni V, Cordone S, Taurino M, Serino M, Marano G, Federici M, Pricci F, Pugliese G. Accelerated lipid-induced atherogenesis



- in galectin-3-deficient mice: role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(6):831-6.
15. Schmitz J, A. Owyang E. Oldham Y. Song E. Murphz T.K., McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1receptor related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23(5):479-90.
16. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M and Krejsek J. Paradoxes and Pitfalls of Interleukin-33 in Atherosclerosis. *The Open Clinical Chemistry Journal* 2012; 5: 13-20.
17. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, and Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 2008; 205: 339–346.
18. Demyanets S, Konya V, Kastl S, et al. Interleukin-33 Induces Expression of Adhesion Molecules and Inflammatory Activation in Human endothelial Cells and in Human Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2080-2089
19. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, et al. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:258-264.
20. Iqbal N, Wentworth B, Choudhary R, De La Parra Landa A, Kipper B, Fard A, Maisel AS. Cardiac biomarkers: New tools for heart failure management. *Cardiovasc Diagn Ther* 2012;2(2):147-164.
21. Willems S et al. Temporal changes of soluble ST2 after cardiovascular interventions. *Eur J Clin Invest* 2013; 43 (2):113–120.