

SPREMEMBE TUMORSKEGA ŽILJA PO RADIOTERAPIJI: AKTIVACIJA TUMORSKEGA ENDOTELIJA POVEČA INFILTRACIJO IMUNSKIH CELIC V TUMOR

Iva Šantek, Tim Božič, Gregor Serša, Boštjan Markelc

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: isantek@onko-i.si

Radioterapija (RT) ne vpliva samo na tumorske celice, ampak tudi na tumorsko mikrookolje, vključno z endotelijskimi celicami (EC), pri čemer je odziv tumorskega žilja na RT še vedno neznan. Poleg apoptoze tumorskih endotelijskih celic (TEC) lahko IR povzroči tudi aktivacijo TEC, kar lahko poveča infiltracijo imunskih celic. S tumorjem-povezane visoke endotelijske venule (TA-HEV, angl. Tumor-associated high endothelial venules) so bile nedavno identificirane kot specializirane žilne strukture, ki olajšujejo vstop limfocitov v tumorje; vendar pa ostaja odprto vprašanje, ali jih je mogoče aktivirati z obsevanjem (IR). Zato je bil namen naše raziskave določiti spremembe v žilni strukturi in endotelijski aktivaciji, ki jih povzroča obsevanje (IR), ter kako so le te povezane z infiltracijo imunskih celic v tumor pri raku debelega črevesa.

Učinke IR na EC in TEC smo določili na nivoju *in vitro* v celičnih 2D kulturah in v modelu 3D žilja na čipu, ter na nivoju *in vivo* v mišjih modelih raka debelega črevesa CT26 in MC38. V poskusih *in vitro* smo v mišjih (bEnd.3, 2H11, SVEC4-10) in humanih (HUVEC, EA.hy926, HULEC-5a) EC linijah določili proliferacijo ter celično smrt po IR z 2–10 Gy, ter z RNA sekvenciranjem HUVEC celic 24 in 72 h po IR z 2 ali 5 Gy. V celičnih 2D kulturah in modelu 3D žilja na čipu smo nato z imunofluorescenčnim barvanjem določili aktivacijo EC po IR z 2 ali 5 Gy. V poskusih *in vivo* smo vpliv IR na TEC določili s prostorsko transkriptomiko in imunofluorescenčnim barvanjem v mišjih tumorjih po enkratni RT z dozo 15 Gy ali frakcionirani RT dozo 5×5 Gy. Z intravitalno mikroskopijo v modelu dorzalnega okna smo nato določili vpliv IR na interakcije med TEC in CD8⁺ citotoksičnimi limfociti T. Nazadnje smo vpliv IR na TEC določili s prostorsko transkriptomiko in imunofluorescenčnim barvanjem na bioptičnih vzorcih pacientov pred neoadjuvantno RT in vzorcih tumorjev po neoadjuvantni RT.

V mišjih in človeških EC linijah je IR (2–10 Gy) zmanjšala njihovo proliferacijo in povečala celično smrt v odvisnosti od doze. Sekvenciranje RNA obsevanih HUVEC EC je pokazalo utišanje signalnih poti povezanih s celičnim ciklom in podvojevanjem DNA ter aktivacijo p53 in FoxO signalnih poti. Ravno tako je pokazalo na zgodnjo aktivacijo prirojenih (NF- κ B, TNF α) in adaptivnih (Th1/Th2/Th17) poti imunskega odziva. V modelih žilja na čipu je IR s 5 Gy povečalo izražanje proteinov VWF in ICAM-1, translokacijo IRF9 v jedro in povečano izražanje IFN α /B, kar kaže na z IR-inducirano aktivacijo EC kar se je pokazalo v povečani interakciji med EC in limfociti. In vivo je IR s frakcionirano dozo 5×5 Gy povzročilo večjo aktivacijo Vwf, Icam-1 in Irf9 v TEC, ki jo je spremljala povečana infiltracija CD8⁺ in CD4⁺ limfocitov T v tumor. Prostorska transkriptomika v mišjih tumorjih je pokazala na obogatitev markerjev TA-HEV v TEC-pozitivnih regijah, ki so kolokalizirale z markerji imunskega odziva. Podobni rezultati so bili določeni tudi v vzorcih tumorjev pacientov po neoadjuvantni RT, pri čemer so s TA-HEV povezani markerji kolokalizirali z markerji imunskega odziva.

IR inducira aktivacijo in funkcionalno reprogramiranje tumorskih endotelijskih celic v smeri proadhezivnega in imunskega podpornega fenotipa. RT prav tako spodbuja nastanek TA-HEV, kar lahko potencialno olajša infiltracijo limfocitov v tumorje.

p33