



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Невена Гајовић**

**Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег  
тумора дојке**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор др сци. мед. Иван П. Јовановић, ванредни професор**

**КРАГУЈЕВАЦ, 2018. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Невена Гајовић
Датум и место рођења: 04.04.1987. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Сарадник у звању асистента за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука у Крагујевцу;
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке
Број страница: 169
Број слика: 38
Број библиографских података: 491
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Иван П. Јовановић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 23.06.2016.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-1044/10 од 02.11.2016.године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Миодраг Лукић, редовни професор- емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан 3. доц. др Јелена Пантић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. проф. др Миодраг Лукић, редовни професор- емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан 3. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан 4. проф. др Срђан Нинковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан 5. доц. др Јелена Пантић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Датум одбране дисертације:

**Апстракт:**

**АП**

Особе оболеле од дијабетес мелитуса имају већу инциденцу и морталитет од тумора. Претходне студије су показале да оксидативни стрес, који настаје као последица хипергликемије, убрзава метастазирање. Циљ ове студије је био да се испитају ефекти дијабетес мелитуса на раст и метастазирање тумора и модулацију имунског одговора. Дијабетес мелитус, индукован једном високом дозом стрептозотоцина, је убрзао појаву, раст и масу примарног тумора што је праћено смањеном цитотоксичношћу NK ћелија према 4T1 ћелијама, *in vitro*. Дијабетес мелитус је значајно смањио процентуалну заступљеност NKG2D<sup>+</sup>, перфорин<sup>+</sup>, гранзим<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-17<sup>+</sup> NK ћелија, док је повећао експресију PD-1 молекула и продукцију IL-10 у NK ћелијама у слезини. Дијабетес је значајно смањио проценат NKG2D<sup>+</sup> NK ћелија и повећао проценат PD-1<sup>+</sup> NK ћелија и у примарном тумору. Дијабетично стање је повећало акумулацију IL-10<sup>+</sup> Tregs и TGF- $\beta$ <sup>+</sup> мијелоидних супресорских ћелија (MDSCs) у слезини и примарном тумору. Дијабетични серум је у *in vitro* условима значајно повећао проценат KLRG-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> NK ћелија, смањио проценат IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK ћелија, експресију NKp46 и продукцију перфорина, гранзима, CD107a и IL-17 у NK ћелијама у поређењу са серумом коме је додата глукоза односно са контролним серумом. Дијабетес мелитус је значајно повећао експресију индуцибилне азот моноксид синтазе (iNOS) и индоламин 2,3-диоксигеназе (IDO) у слезинским MDSCs и дендритским ћелијама (DC) мишева пре индукције тумора. Специфични инхибитор индоламин 2,3-диоксигеназе, 1-метил-DL-триптофан, је готово у потпуности повратио фенотип NK ћелија култивисаних у дијабетичном серуму. Ови резултати указују да дијабетес мелитус убрзава раст тумора повећаном акумулацијом имуносупресивних ћелија и супресијом NK ћелија активношћу ензима IDO.

**Abstract:**

**AB**

Diabetic patients have higher incidence and mortality of cancer. Recent study revealed that hyperglycemia-induced oxidative stress is involved in the acceleration of tumor metastasis. The aim of this study was to investigate the effects of diabetes-induced alteration of immune cells on tumor growth and metastasis. Diabetes induced by one high dose of streptozotocin accelerated tumor appearance, growth and weight, which was associated with decreased NK cells cytotoxicity against 4T1 tumor cells *in vitro*. Diabetes reduced frequencies of systemic NKG2D<sup>+</sup>, perforin<sup>+</sup>, granzyme<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup> NK cells, while increased level of PD-1 expression and production of IL-10 in NK cells. Diabetes decreased percentage of NKG2D<sup>+</sup>NK cells and increased percentage of PD-1<sup>+</sup> NK cells also in primary tumor. Diabetes increased accumulation of IL-10<sup>+</sup> Tregs and TGF- $\beta$ <sup>+</sup> myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in spleen and tumor. Diabetic sera *in vitro* significantly increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NK cells, decreased percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells, expression of NKp46 and production of perforin, granzyme, CD107a and IL-17 per NK cell in comparison to glucose added mouse sera and control sera. Significantly increased percentages of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) producing MDSCs and dendritic cells (DC) were found in the spleens of diabetic mice prior to tumor induction. 1-methyl-DL-tryptophan, specific IDO inhibitor, almost completely restored phenotype of NK cells cultivated in diabetic sera. These findings indicate that diabetes promotes breast cancer growth at least in part through increased accumulation of immunosuppressive cells and IDO mediated attenuation of NK cells.

*Због несебичног залагања, пренетог знања, пожртвованости, стрпљења и безрезервне подршке током израде ове докторске дисертације неизмерну захвалност дугујем свом ментору, проф. др Ивану Јовановићу.*

*Проф. др Миодрагу Лукићу и проф. др Небојши Арсенијевићу захваљујем на сугестијама, указаном поверењу и залагању у реализацији тезе.*

*Хвала мојој Милени Јуришевић на стручној помоћи и позитивној енергији.*

*Хвала мојој породици на огромној подршци, љубави и разумевању.*

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Дијабетес мелитус.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Класификација дијабетес мелитуса .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Дијабетес мелитус тип 1.....	2
1.2.2. Дијабетес мелитус тип 2.....	3
<b>1.3. Експериментални модели дијабетеса .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Ефекти дијабетес мелитуса на физиологију организма.....</b>	<b>7</b>
1.4.1. Појачан оксидативни стрес .....	8
1.4.2. Стрес ендоплазматског ретикулума.....	11
<b>1.5. Утицај дијабетес мелитуса на имунски систем .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Дијабетес мелитус и тумори .....</b>	<b>16</b>
<b>1.7. Карцином дојке и експериментални модел 4Т1 .....</b>	<b>19</b>
<b>1.8. Имуни одговор на тумор дојке.....</b>	<b>21</b>
1.8.1. Макрофаги .....	22
1.8.2. Дендритске ћелије.....	23
1.8.3. НК ћелије.....	24
1.8.4. НКТ ћелије .....	26
1.8.5. Цитотоксички Т лимфоцити .....	27
1.8.6. Мијелоидне супресорске ћелије .....	28
1.8.7. Регулаторни Т лимфоцити .....	29
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>31</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Експерименталне животиње .....</b>	<b>32</b>

3.2. Индукција <i>diabetes mellitus-a</i> .....	32
3.3. Ћелијска линија мишјег тумора дојке (4T1).....	32
3.4. Верификација примарног тумора .....	33
3.5. Анализа метастатских колонија.....	34
3.6. Варијабле које се мере у студији .....	34
3.7. Одређивање антиоксидативних ензима.....	35
3.8. Изолација леукоцита из слезине.....	38
3.9. Изолација ћелија из примарног тумора.....	38
3.10. Анализа популација моноклеарних ћелија слезине и примарног тумора проточном цитометријом.....	39
3.10.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера .....	39
3.10.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина.....	42
3.10.3. Квантитативно испитивање апоптозе .....	43
3.11. Издвајање CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита негативном селекцијом помоћу магнетних куглица .....	44
3.12. Издвајање NK ћелија негативном селекцијом помоћу магнетних куглица .....	45
3.13. Тест цитотоксичности .....	45
3.14. Деплеција NK ћелија .....	46
3.15. Мерење серумске концентрације IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$ и IL-13 .....	47
3.16. Култивација спленоцита у дијабетичном и хипергликемичном серуму ..	48
3.17. Инхибиција водоник пероксида .....	49
3.18. Инхибиција индоламин-2, 3 диоксигеназе.....	49
3.19. Инхибиција индуцибилне азот моноксид синтазе.....	50
3.20. Полимеризована ланчана реакција (PCR) .....	50
3.20.1. Изолација RNA из ткива слезине миша.....	50

3.20.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA.....	51
3.20.3. Квантификација експресије гена.....	51
3.21. Снага студије и величина узорка.....	52
3.22. Статистичка обрада података.....	53
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>54</b>
4.1. Ефекат стрептозотоцина на параметре гликорегулације.....	54
4.2. Дијабетес мелитус убрзава појаву и раст примарног тумора дојке.....	55
4.3. Смањена цитотоксичност NK ћелија изолованих из слезине мишева третираних STZ-ом.....	56
4.4. Деплеција NK ћелија убрзава појаву и раст примарног тумора и анулира убрзан раст тумора у дијабетичним мишевима.....	60
4.5. Дијабетес мелитус значајно смањује експресију NKG2D, перфорина, IFN- $\gamma$ , IL-17, а повећава експресију PD-1 молекула и IL-10 на спленичним NK ћелијама.....	62
4.6. Дијабетес мелитус не утиче значајно на фенотип CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита у моделу 4Т1 тумора дојке.....	66
4.7. Дијабетес мелитус повећава процентуалну заступљеност TGF- $\beta$ -продукујућих NKT ћелија.....	68
4.8. Повећана концентрација IL-10 у серуму мишева са дијабетесом.....	70
4.9. Дијабетес мелитус појачава акумулацију имуносупресивних ћелија у слезини мишева са тумором дојке.....	71
4.10. Смањена експресија NKG2D а повећана PD-1 на NK ћелијама у примарном тумору мишева са дијабетесом.....	76
4.11. Дијабетес мелитус фаворизује акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у туморску микросредину.....	78
4.12. Дијабетични серум мења функционални фенотип NK ћелија, <i>in vitro</i> .....	79
4.13. Серум дијабетичних мишева стимулише апоптозу спленоцита, <i>in vitro</i> ...	86
4.14. MDSCs и DCs супримирају NK ћелије активношћу ензима IDO.....	90



<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>97</b>
5.1. Дијабетес мелитус убрзава појаву и раст примарног тумора дојке .....	98
5.2. Дијабетес смањује антитуморску цитотоксичност NK ћелија .....	99
5.3. Дијабетес модулише функционални фенотип NK ћелија, <i>in vivo</i> .....	100
5.4. Култивација у серуму дијабетичних мишева модулише активациони фенотип NK ћелија, <i>in vitro</i> .....	104
5.5. Неутрализација појачаног оксидативног стреса не мења значајно функционални фенотип NK ћелија, <i>in vitro</i> .....	107
5.6. Дијабетес фаворизује акумулацију имуносупресивних ћелија у слезини и примарном тумору .....	108
5.7. Имуносупресивне ћелије у биологији тумора дојке у дијабетичним условима .....	109
5.8. Утицај блокаде IDO-а и iNOS-а на функционални фенотип NK ћелија, у дијабетичним условима, <i>in vitro</i> .....	110
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>111</b>
<b>7. СКРАЋЕНИЦЕ.....</b>	<b>113</b>
<b>8. РЕФЕРЕНЦЕ .....</b>	<b>115</b>
<b>9. ПРИЛОГ .....</b>	<b>163</b>
9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	163
9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION .....	167
9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА .....	171
9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА.....	173
9.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS.....	175
<b>РАДОВИ ИЗ ТЕЗЕ .....</b>	<b>180</b>

## 1. УВОД

Предмет овог рада су истраживања утицаја дијабетес мелитуса на раст и развој експерименталног модела тумора дојке. У уводном делу, пре описивања и дискусије добијених резултата, приказали смо опште биолошке ефекте дијабетес мелитуса, као и механизме имунског одговора на тумор који могу бити од значаја за разматрање наших резултата.

### 1.1. Дијабетес мелитус

Дијабетес мелитус представља хетерогену групу метаболичких поремећаја који настају услед хроничне хипергликемије. Физиолошке вредности концентрације глукозе у крви одржавају се ослобађањем инсулина из  $\beta$  ћелија панкреаса. Инсулин стимулише ћелије да преузму глукозу коју користе као енергију, а вишак глукозе се под дејством инсулина складишти у јетри, мишићима и масном ткиву. Недостатак инсулина у организму настаје деструкцијом  $\beta$  ћелија панкреаса што за последицу има развој хипергликемије и патолошких стања која највише погађају циљна ткива инсулина (јетра, мишићи, бубрези) и прате их акутне компликације (попут кетоацидозе) (1) или хроничне компликације (обољења срца и крвних судова, бубрега, ока, дијабетесне неуропатије) (2,3).

Апсолутни или релативни поремећај у продукцији инсулина и/или поремећај у дејству инсулина узрокује развој хроничне хипергликемије. Значајна дисфункција синтезе или ефекта инсулина као анаболичког хормона се огледа поремећајем у метаболизму угљених хидрата, масти и протеина. Метаболички поремећај настаје услед недовољне концентрације инсулина или услед инсулинске резистенције скелетних мишића, масног ткива и јетре због неадекватног функционисања инсулинских рецептора, сигналних молекула који учествују у преносу сигнала од рецептора до једра или услед мутације одређених гена. Тежина болести зависи од више фактора као што су тип дијабетес мелитуса, дужина трајања болести и коморбидитети (4).

Бројне епидемиолошке студије показују преваленцу од 382 милиона људи оболелих од дијабетес мелитуса у 2013. години (5). Очекује се да ће до 2035. године број оболелих порастати на 592 милиона (5). Етиолошка класификација дијабетеса је широко прихваћена. Дијабетес мелитус тип 1 и тип 2 су два главна типа овог обољења, при чему тип 2 дијабетес мелитуса чини већину (> 85%) укупне преваленце оболелих

од дијабетеса. Оба облика дијабетеса могу индуковати системске компликације попут микроваскуларних обољења, укључујући ретинопатију, нефропатију и неуропатију и макроваскуларних обољења као што су исхемијска болест срца, мождани удар и периферна васкуларна болест.

## 1.2. Класификација дијабетес мелитуса

Класична класификација дијабетеса подразумева дијабетес мелитус тип 1, тип 2 и гестациски дијабетес мелитус.

### 1.2.1. Дијабетес мелитус тип 1

Аутоимунски дијабетес мелитус тип 1, раније описан као инсулин-зависни дијабетес, настаје услед деструкције  $\beta$  ћелија панкреаса дејством различитих имунских механизма. Дијагностиковање аутоимунског процеса деструкције панкреаса обухвата детекцију аутоантитела која су специфична за панкреасна острвца, инсулин, глутамат декарбоксилазу 65 (енгл. *Glutamate decarboxylase 65*, GAD65) тирозин фосфатазе IA-2 и IA-2 $\beta$  (6).

Аутоимунски дијабетес се најчешће јавља код деце и адолесцената, мада се може развити и код старијих особа (7). Ово је најчешћи метаболички и ендокрини поремећај код деце (7). Инциденца дијабетеса расте сваке године, највише међу децом млађом од 15 година, а најчешће обољевају деца из развијених, западних земаља.

Генетска предиспозиција игра важну улогу у настанку дијабетес мелитуса тип 1. Мутације HLA гена, нарочито DR и DQ гена повећавају ризик за развој дијабетеса (8). Такође је показано да и мутације не-HLA гена попут гена за инсулин на хромозому 11p15, гена за протеин 4 удруженог са цитотоксичким Т лимфоцитом (CTLA4) на хромозому 2q33, гена за протеин тирозин фосфатазу на хромозому 1p13, гена за рецептор за интерлеукин 2 $\alpha$  такође у мањем проценту могу да фаворизују настанак дијабетеса типа 1 (9-12).

Поред значаја генетске предиспозиције, у развоју дијабетеса типа 1 важну улогу играју фактори средине (13). Сматра се да конгенитална рубела, ентеровируси, ротавирус, херпес вирус, цитомегаловирус, ретровируси фаворизују развој аутоимунског дијабетес мелитуса (13-17). Остали фактори средине обухватају низак

ниво витамина Д, пренаталну изложеност токсичним агенсима, побољшану хигијену и услове живота за које је познато да смањују учесталост инфекција у детињству што доприноси развоју аутоимунских болести (хигијенска хипотеза), као и прерани прекид дојења и употреба крављег млека (18-20). Утицај фактора окружења се и данас сматра контроверзним, јер постоје теорије да одређене инфекције могу деловати протективно у развоју ове аутоимунске болести (21-24).

Дијабетес типа 1 се манифестује симптомима и знацима попут полидипсије, полиурије, полифагије, енурезе, малаксалости, губитка тежине, учесталих инфекција као и тешком дехидратацијом и дијабетичном кетоацидозом код деце и адолесцената (8).

### 1.2.2. Дијабетес мелитус тип 2

Дијабетес мелитус тип 2, раније назван инсулин независним типом дијабетес мелитуса, се развија код пацијената који имају инсулинску резистенцију и самим тим релативни недостатак инсулина. Етиологија дијабетес мелитуса није у потпуности разјашњена. Доказано је да је полиморфизам гена за транскрипциони фактор 7 (енгл. *Transcription factor 7-like 2*) повезан са настанком дијабетеса типа 2 (8,25).

Велики број пацијената са овом формом дијабетеса су гојазни, а познато је да гојазност изазива одређени степен инсулинске резистенције. Пацијенти често имају висок проценат телесних масти дистрибуираних претежно у абдоминалном региону (централни тип гојазности). Кетоацидоза се ретко јавља спонтано код ове врсте дијабетеса. Међутим, ови пацијенти имају повећан ризик од развоја макроваскуларних и микроваскуларних компликација.

Инсулинска резистенција код пацијената са дијабетесом типа 2 повећава потребу за хипер-продукцијом инсулина. Временом, осим инсулинске резистенције, појачана секреција инсулина се смањује до постепеног исцрпљивања и уништавања  $\beta$  ћелија панкреаса (26,27).

Осим дијабетеса, резистенција на инсулин утиче на развој гојазности, нефропатије, есенцијалне хипертензије, дислипидемије (хипертриглицеридемија, низак HDL, смањен LDL, повећана постпрандијална липемија), хиперандрогенизма јајника, неалкохолне масне јетре и системског запаљења (28,29).

Иако код пацијената са развијеним дијабетесом типа 2 не постоји аутоимунско оштећење  $\beta$  ћелија панкреаса, недавна студија је потврдила да чак 7,1 % пацијената

оболелих од дијабетес мелитуса тип 2 у Европи имају неке карактеристике типа 1 укључујући присуство аутоантитела специфичних за антигене ћелија панкреасних острваца као и присуство анти-GAD65 аутоантитела због чега се овакав дијабетес класификује као посебан тип дијабетеса који се назива латентни аутоимунски дијабетес код одраслих (30,31).

Хипергликемија у трудноћи било да је у облику дијабетеса типа 2 дијагностикована пре или током трудноће било у облику гестацијског дијабетеса повећава ризик настанка компликација током развоја плода или након рођења детета. Хипергликемија у трудноћи фаворизује развој макрозомије (тежина на рођењу  $\geq 4,5$  kg), прееклампсију, превремено рођење и царски рез (32). Фактори ризика за гестацијски дијабетес укључују гојазност, породичну историју дијабетеса, старост мајке, синдром полицистичних јајника, статични начин живота и изложеност појединим токсичним факторима (33).

Дијабетес мелитус се дијагностикује на основу концентрације глукозе измерене наше или након оралног теста толеранције глукозе (ОГТТ) и на основу мерења HbA1c и то: концентрација глукозе  $\geq 7,0$  mmol /L, концентрација глукозе  $\geq 11,1$  mmol /L два сата након ОГТТ у комбинацији са HbA1c  $\geq 6,5\%$  (48 mmol / mol) (34).

Гестацијски дијабетес мелитус се потврђује анализом концентрације глукозе у крви: глукоза наше  $\geq 5,1$  mmol/L, концентрација глукоза у крви 10,0 mmol/L након првог часа од конзумирања 75g глукозе, односно уколико је глукоза у крви  $\geq 8,5$  mmol/L након два сата од конзумирања 75g глукозе (32,35).

### 1.3. Експериментални модели дијабетеса

Стрептозотонин и алоксан су две најчешће коришћене хемикалије за индукцију дијабетеса у експерименталним студијама.

Алоксан (2,4,5,6 тетраоксиимидин) је веома нестабилни токсични глукозни аналог специфичан за  $\beta$  ћелије панкреасних острваца (36-38). Алоксан је попут глукозе хидрофилан молекул, стога нема способност да прође кроз липидни двослој плазма мембране. Молекул алоксана је структурно јако сличан глукози, стога користи глукозни транспортер GLUT2 који се налази у плазма мембрани  $\beta$  ћелије панкреаса и транспортује се у цитоплазму (38-42). Време полураспада је кратко, у воденом раствору се спонтано распада у не-дијабетогену алоксанску киселину за свега пар минута, због чега се мора брзо депоновати у ћелијама панкреаса (36,43,44). Поред

алоксана, у експерименталним условима се за развој дијабетес мелитуса може користити и N-супституисани дериват алоксана са бочним угљенохидратним ланцем, попут бутилалоксана. Бутилалоксан делује аналогно алоксану и доминантно оштећује  $\beta$  ћелије панкреаса (45,46). Међутим, како бутилалоксан има липофилне карактеристике, он продире кроз плазма мембрану ћелија које не садрже транспортер GLUT2 (40). Зато у нежељене ефекте након системске примене липофилних деривата спада и нефротоксичност (46).

Селективна инхибиција секреције инсулина услед високе концентрације глукозе је главни патофизиолошки ефекат дејства тиолне групе алоксана (47-49). Инхибиција глукокиназе, сензора за глукозу у  $\beta$  ћелијама панкреаса, смањује оксидацију глукозе и генерацију настанак АТР-а, чиме се инхибира сигнал који подстиче секрецију инсулина. Инхибиција глукокиназе се постиже у року од 1 минута након апликације алоксана (50,51).

Поред директне блокаде глукокиназе, алоксан оштећује  $\beta$  ћелије панкреаса индукцијом настанка кисеоничних слободних радикала у цикличној реакцији са његовим редукционим производом, дијалуричном киселином (52-55). Процесом аутооксидације, алоксан се редукује у дијалуричну киселину а потом оксидује у алоксан, стварајући притом редокс циклус у коме настају супероксид анјон радикал и водоник пероксид у присуству одговарајућег металног катализатора (обично гвожђа) (53-55).

Стрептозотоцин (STZ) је глюкозамин-нитроуреа, једињење добијено из *Streptomyces achromogenes* које се користи као хемотерапеутски агенс у лечењу карцинома панкреаса (56). Нитрозоуреа је липофилно једињење, стога веома брзо дифундује кроз липидни двослој плазма мембране. Међутим, услед замене хексозом, стрептозотоцин је мање липофилан. Стрептозотоцин улази у  $\beta$  ћелије панкреаса, ћелије бубрега и јетре користећи транспортер GLUT2, док су све остале ћелије које производе инсулин а које не експримирају овај транспортер заштићене од дејства овог токсичног агенса (57-59).

Бројне анималне студије су показале да стрептозотоцин у зависности од дозе делује на различите начине. Једна велика доза стрептозототина остварује токсични ефекат тако што преноси своју метил групу на DNA, што даље проузрокује оштећене и последичну фрагментацију DNA (60). Поред метилације DNA, стрептозототин појачава свој токсични ефекат гликозилацијом протеина (56). У покушају да поправи оштећења DNA, поли ADP-рибоза полимеразе се појачано продукује, троши се ћелијски  $NAD^+$ , а

потом и АТР (56,61). Исцрпљивање ћелијских енергената резултује некрозом  $\beta$  ћелија панкреаса. Иако стрептозототин метилише протеине, сматра се да је метилација DNA кључна за смрт  $\beta$  ћелија (62,63). Током дејства стрептозотоцина, продукују се мале количине кисеоничних слободних радикала, доминантно супер оксид анјон и хидроксилни радикал, који убрзавају оштећење  $\beta$  ћелија панкреаса (64,65).

Уколико се даје у малим понављаним дозама, стрептозототин индукује имунски одговор и развој запаљенске реакције, највероватније услед ослобађања аутоантигена декарбоксилазе и глутаминске киселине. У оваквим околностима, деструкција  $\beta$  ћелија и настанак хипергликемије су удружени са појавом запаљенских инфилтрата који садрже лимфоците у панкреасним острвцима (66). Нежељени ефекти стрептозотоцина су нефротоксичност и хепатотоксичност (66-68).

Претходне студије су показале различиту ефикасност стрептозотоцина у зависности од соја миша као и од пола. На основу концентрације глукозе у крви након апликације токсичног агенса, сензитивност сојева је (од најосетљивијег до најрезистентнијег) DBA/2 > C57BL/6 > MRL/MP > 129/SvEv > BALB/c (69). Хајаши и сар. су показали да најмања доза неопходна за индукцију дијабетеса код мужјака C57BL/6, ICR, ddY, и BALB/c мишева износи 100, 100, 125 и 150 mg/kg (70). Такође је потврђено да су мишеви и пацови мушког пола осетљивији на дејство стрептозотоцина у односу на мишеве и пацове женског пола (71,72).

Збох својих хемијских својстава, пре свега знатно веће стабилности, стрептозототин је токсични агенс избора за индукцију дијабетес мелитуса и развој хипергликемије у експерименталним студијама (56).

Аутоимунски дијабетес се изазива интраперитонеалном или интравенском апликацијом вишеструких малих доза стрептозотоцина (20-40 mg / kg телесне масе) пет дана у низу, код миша или пацова који су подложни развоју ове болести. Овако примењен стрептозототин узрокује постепено оштећења  $\beta$  ћелија панкреаса, ослобађање аутоантигена и развој инсулитиса, где на даље проинфламацијски цитокини и инфламација прогресивно уништавају  $\beta$  ћелије панкреаса (478). Предност овог модела у односу на спонтане моделе развоја дијабетеса је у лакој и брзој изазивању болести, синхронизованом развоју хипергликемије код животиња, и нарочито је користан у истраживању превентивних мера у развоју аутоимунског дијабетеса (479,480).

Једна појединачна доза стрептозотоцина користи се за индуковање постепено

прогресивног дијабетес мелитуса. Исто и сарадници су уочили да су мужјаци ICR мишева који примају једну дозу стрептозотоцина од 100 mg/kg развили прогресивну хипергликемију са нормалним серумским нивоима инсулина и очуваним  $\beta$  ћелијама у панкреасу, што указује на развој инсулин независног дијабетес мелитуса (481). Једна велика доза стрептозотоцина остварује директан токсични ефекат на  $\beta$  ћелије панкреаса те се стога овај модел користи за развој тежих форми дијабетеса. За разлику од умерене дозе, велике дозе стрептозотоцина могу узроковати потпуно уништење  $\beta$  ћелије панкреаса што је праћено минималном продукцијом или чак потпуним изостанком продукције инсулина (35,481).

Поред хемијских модела, у експерименталне сврхе се користе и два главна спонтана модела аутоимунског дијабетеса: NOD (енгл. *Non obese diabetic*) миш и BB (енгл. *Bio Breeding*) пацов (482,483). Због могућности укршања са другим сојевима и манипулације и анализе генетског материјала, NOD мишеви су преузели примат као модел спонтаног дијабетес мелитуса тип 1 у односу на BB пацове. NOD мишеви развијају дијабетес у периоду између 18-30 недеља старости, и чешћи је код женки (484,485). NOD мишеви захтевају посебне услове за узгој. Инциденда развоја дијабетес мелитуса зависи од утицаја спољашњих фактора, стога се NOD мишеви морају узгајати у специјалним условима без присуства патогених микроорганизама (енгл. *Specific pathogen free*). Захваљујући NOD мишевима, бројне студије су доказале повезаност генетске предиспозиције и развоја аутоимунског дијабетеса као и важну улогу анализе MHC генског локуса у циљу предвиђања вероватноће обољевања од аутоимунског дијабетес мелитуса (486-489).

#### 1.4. Ефекти дијабетес мелитуса на физиологију организма

Постоји неколико теорија које објашњавају на који начин дијабетично стање узрокује развој компликација. Највећи број досадашњих публикација се бавио испитивањем утицаја појачаног оксидативног стреса који је један од главних последица пролонгираног нерегулисаног дијабетичног стања. Хипотеза из 2000. године тврди да хипергликемија и повећана продукција кисеоничних слободних радикала (енгл. *Reactive oxidative species*, ROS) узрокују активацију неколико механизма кључних за оштећење ћелија: повећан инфлукс глукозе у ћелију, повећана интрацелуларна продукција гликозилираних продуката, повећана експресија рецептора за AGE и његове активирајуће лиганде, активација протеин киназе C и прекомерно



деловање хексозоаминског пута (73,74).

#### 1.4.1. Појачан оксидативни стрес

Оксидативни стрес настаје када производња реактивних врста кисеоника (ROS) превазилази локални антиоксидативни капацитет. Када се то деси, покреће се оксидација важних макромолекула, укључујући протеине, липиде, угљене хидрате и DNA (74,75).

Кисеонични слободни радикали настају током митохондријалног респираторног процеса. Постоје четири протеинска комплекса у транспортном ланцу митохондрија, названи комплекс I, II, III и IV. Метаболизам глукозе кроз циклус трикарбоксилне киселине генерише доноре електрона. Главни донор електрона је NADH, који даје електроне комплексу I. Други донор електрона генерисан трикарбоксилним киселинским циклусом је FADH<sub>2</sub>, настао од сукцинат дехидрогеназе, који донира електроне до комплекса II. Електрони из оба ова комплекса преносе се у коензим Q, а затим из коензима Q преносе се на комплекс III, цитохром-C комплекс IV, и коначно до молекуларног кисеоника, који се потом редукује до воде. Систем транспорта електрона је организован тако да се ниво АТФ-а може прецизно регулисати (73,74).

Насупрот овоме, у дијабетичким ћелијама, у којима доминира висока концентрација глукозе, у трикарбоксилном киселинском циклусу се више оксидује глукоза, због чега се више донора електрона (NADH, FADH<sub>2</sub>) укључује у транспортни ланац електрона. Као резултат тога, градијент напона преко митохондријалне мембране се повећава све док се не достигне критични праг. У овом тренутку пренос електрона унутар комплекса III је блокиран, након чега се електрони повлаче до коензима Q, који потом донира по један електрон молекуларном кисеонику, стварајући на тај начин супероксид. Митохондријална изоформа ензима супероксид дисмутаза разлаже овај слободни радикал кисеоника у водоник пероксид, који се затим претвара у воду и кисеоник (73,74).

Полиол пут (сорбитол алдоза редуктаза пут) се заснива на активацији фамилије ензима алдо-кето редуктаза који уз утросак никотин амид аденин динуклеотид фосфата (NADPH) преводје карбонилна једињења у шећерне алкоhole (полиоле) (74).

Алдозна редуктаза је детектована у бројним ћелијама као што су нервне ћелије, ћелије ретине, сочива, гломерула бубрега и ендотелне ћелије (76). Како многе ћелије у организму не захтевају присуство GLUT 2 транспортера за унос глукозе, са порастом

концентрације глукозе у крви у дијабетичном стању расте и интрацелуларна концентрације глукозе.

Сматра се да је током хипергликемије у ћелији повећана потрошња кофактора NADPH. Међутим, NADPH кофактор је такође неопходан за продукцију редукованог глутатиона у ћелији. Редуковани глутатион је један од најзначајних антиоксидативних молекула неопходан за одржавање активности глутатион пероксидазе, услед чега се новонастали кисеонични слободни радикали елиминишу и тиме редукује оксидативни стрес. Како се већи део кофактора NADPH искоришћава за метаболизам глукозе у ћелији, смањује се продукција редукованог глутатиона и последично се повећава оксидативни стрес у ћелији (73,74,77). Експерименталне студије су и потврдиле да прекомерна експресија алдоза редуктазе олакшава развој атеросклерозе код дијабетичних мишева и смањује експресију гена који кодирају синтезу редукованог глутатиона (78). Такође је детектована смањена продукција редукованог глутатиона у сочиву трансгенских мишева који садрже високе концентрације алдоза редуктазе (79-82).

Након деловања алдоза редуктазе и превођења глукозе у сорбитол, у наредном кораку се сорбитол оксидише у фруктозу дејством сорбитол дехидрогеназе, при чему се  $\text{NAD}^+$  редукује до NADH, и обезбеђују се супстрати за комплекс I, први ензим митохондријалног респираторног ланца (74,83). Како се сматра да је митохондријални респираторни ланац главни извор продукције кисеоничних слободних радикала у дијабетичним условима, обезбеђивање додатних електрона за пренос на кисеоничне суперокиде појачава оксидативни стрес (84). Додатно, сорбитол нема способност да прође кроз липидни двослој ћелијске мембране, стога његова интрацелуларна акумулација резултује појачаним осмотским стресом. Осмотски стрес повећава ћелијску цитосолну продукцију водоник пероксида. У прилог томе говоре и резултати да примена осмотских диуретика штити ћелије проксималних тубула бубрега од апоптозе узрокуае дејством кисеоничних слободних радикала (74,85).

Гликозилирани продукти (енгл. *Advanced Glycation End-products*, AGE) настају процесом неензимске реакције глукозе и једињења добијених од глукозе и оксидисаних масних киселина (86,87). Доказано је да се велике количине AGE могу детектовати у екстрацелуларном матриксу у дијабетичним условима (88-92). Интрацелуларна продукција AGE општењује ћелију различитим механизмима. Интрацелуларни протеини модификовани дејством AGE губе своју основну функцију.

Затим, AGE модификују компоненте екстраћелијског матрикса које потом интерреагују са другим компонентама матрикса као и са адхезивним молекулима, пре свега интегринима, експримираним на површини ћелија. AGE имају способност да модификују и протеине плазме који се потом везују за рецепторе за AGE, експримиране на макрофагима, васкуларним ендотелним ћелијама и ћелијама васкуларних глатких мишића (93-95). Активација рецептора за AGE (енгл. *Receptor for Advanced Glycation End-products*, RAGE) индукује производњу ROS, што заузврат активира транскрипциони фактор, нуклеарни фактор капа В (NFκB), узрокујући експресију више гена и продукцију проинфламацијских цитокина и фактора раста (95-99).

Стална и прекомерна активација неколико изоформи РКС функционише као трећи заједнички пут који учествује у продукцији ROS у дијабетичним условима. Протеин киназа С (енгл. *Protein kinase C*, РКС) је ензим широко распрострањен у ћелијама сисара задужен за фосфорилацију различитих протеина. Активност класичних изоформи РКС-а зависи од  $Ca^{2+}$  јона и фосфатидил-серина, а значајно је побољшана присуством диацилглицерола (100). *De-novo* синтеза диацилглицерола из глукозе је у ћелијама у дијабетичним условима појачана, јер ROS инхибирају активност гликолитичког ензима GAPDH повећавајући на тај начин интрацелуларни ниво прекурсора диацилглицерола, триоза фосфата (101-104). Постоје докази да повећана активност РКС изоформи може такође резултовати интеракцијом између AGE и њихових рецептора на ћелијској мембрани (105).

Хипергликемија заједно са појачаном оксидацијом масних киселина, која настаје услед инсулинске резистенције, доприноси патогенези дијабетичких компликација повећањем инфлуksа фруктоза 6-фосфата у хексозамински пут (106-109). У овом процесу, глутамин-фруктоза-6-фосфат амидотрансфераза (GFAT) претвара фруктозу 6-фосфат у глукозамин 6-фосфат, који се затим претвара у UDP-N-ацетилглукозамин. Показано је да инхибиција глутамин-фруктоза-6-фосфат амидотрансферазе инхибира транскрипцију гена који кодирају TGF-α и TGF-β1 који су у стању хипергликемије појачано експримирани (106,107).

Студијом у којој је блокиран ген за UCP-1, митохондријални анјонски носач протеина, показано је да митохондријални ланац транспорта електрона продукује супероксид анјон радикал у хипергликемичним условима (110). Да би се потврдиле претпоставке да заиста кисеонични слободни радикали покрећу путеве кључне за оштећење ћелија у

хипергликемичним условима, митохондријална DNA је деплетирана у здравим ендотелним ћелијама како би се блокирао функционални транспортни ланац митохондријалних електрона. Уклањањем митохондријалног ланца блокиран је ефекат хипергликемије на производњу кисеоничних радикала. Такође, у оваквим ћелијама, хипергликемија није успела да активира полиолни пут, формирање AGE, прекомерну активацију РКС или хексозамински пут (74).

#### 1.4.2. Стрес ендоплазматског ретикулума

Други механизам који се сматра кључним у оштећењу ћелија у хипергликемичним условима је стрес ендоплазматског ретикулума. Ендоплазматски ретикулум (ER) је ћелијска органела која игра кључну улогу у биосинтези липида и протеина. ER производи трансмембранске протеине и липиде који улазе у састав готово свих органа и одговоран је за синтезу скоро свих секретованих протеина (111). ER такође игра важну улогу у складиштењу и сигнализацији  $Ca^{2+}$ . Концентрација  $Ca^{2+}$  у ендоплазматском ретикулуму је три до четири пута већа од цитоплазматске концентрације. Оваква разлика у концентрацији се остварује захваљујући  $Ca^{2+}$  АТФ-аза протеину, који пумпа  $Ca^{2+}$  у ендоплазматски ретикулум, као и инозитол трифосфату и рианодинским рецепторима који формирају калцијумске канале и ослобађају  $Ca^{2+}$  из ER (112). Захваљујући способности складиштења и ослобађања калцијума, ER контролише бројне процесе у ћелији као што су активност транскрипционих фактора, реакција на стрес и апоптоза (112).

Транслацију протеина обављају рибозоми смештени на цитоплазматској страни ER, а потом се линеарни полипептидни ланци премештају у лумен ER преко протеина носача Sec61 (113,114). У лумену ER ови полипептидни ланци су често N-гликозиловани и формирају секундарне и терцијарне структуре које се стабилизују стварањем дисулфидних веза (115). Јединствено оксидационо окружење ER и бројни протеини шаперони су неопходни за адекватно формирање секундарне и терцијарне структуре протеина и протеинских комплекса (116). За правилно формирање дисулфидних веза неопходан је ензим протеинска дисулфидна изомераза (117). Остали фактори укључени у адекватну синтезу протеина су аминокиселина цис-транс изомераза, шаперони GRP94 и протеин повезан са Ig тешким ланцем (енгл. *Ig heavy chain binding protein*, BiP), ензими важни за процес N-гликозилације као и лектини калнексин и калретикулин (118,119). Док помажу у склапању протеина, шаперони и

фолдазе такође задржавају протеине у лумену ER, док се не провери да су испуњени сви услови за секрецију протеина (120-122).

ER је изузетно осетљив на промене у хомеостази. Неки од фактора који могу утицати на неадекватну синтезу протеина јесу недостатак шаперона или енергије за адекватну интеракцију шаперона и протеина, пад нивоа калцијума, поремећај редокс стања, висока или ниска концентрација глукозе. Овакви поремећаји у ћелији ремете нормалну синтезу протеина што за последици има агрегацију неадекватно савијених протеина и стрес ендоплазматског ретикулума и настанак UPR (енгл. *Unfolded protein response*) (123-126). Циљ UPR процеса је смањивање стреса ER, елиминација фактора који је проузроковао нарушавање хомеостазе и спречавање ћелијске смрти. UPR покреће неколико процеса који обухватају смањену синтезу нових протеина чиме се спречава додатни губитак протеина и преоптерећење органела, повећану синтезу шаперона, покушавајући на тај начин да организује појачано савијање протеина у лумену, елиминацију и деградацију оштећених протеина у протеазому (111). Како је за ове процесе неопходна синтеза веће количине протеина шаперона а самим тим и пренос сигнала до једра, у овај процес укључени су и одређени трансмембрански протеини (111). Протеин IRE-1 (енгл. *Inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase 1*) након активације стиче ендорибонуклеазну активност и отклања 26 нуклеотида из информационе RNA која кодира XBP-1 (енгл. *X-box binding protein 1*). XBP-1 је протеин који игра важну улогу у синтези, савијању и секрецији новосинтетисаних протеина из лумена ER, као и у елиминацији и деградацији неформираних протеина (127-131). IRE-1- $\alpha$  такође може деградирати информационе RNA, чиме се смањује производња нових протеина (132,133). ATF-6 (енгл. *Activating transcription factor 6*) је протеин важан за синтезу кључних шаперона калнексина и калретинулина као и BiP/GRP94 (130,134,135). Поред ове функције, ATF-6 повећава синтезу информационе RNA која кодира XBP1, обезбеђујући на тај начин супстрат за стварање XBP1 дејством протеина IRE1 (129). PERK (енгл. *PKR-like ER kinase*) фосфорилише еукариотски транслациони иницијални фактор eIF (енгл. *Eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* , eIF) блокирајући на тај начин 80S субјединицу рибозома и даљу синтезу протеина (136). Уколико претходно наведени процеси не успеју да регулишу новонастали стрес у ER, ћелија умире апоптозом активацијом BH3 *only* протеина PUMA, Noxa, Bik и Bim и осталих проапоптотских чланова Bcl-2 фамилије протеина (137-142).

Бројне студије су се бавиле испитивањем утицаја хипергликемије на развој стреса ендоплазматског ретикулума као потенцијалног механизма за настанак дијабетичних компликација. Лиу и сарадници су показали да остеобласти дијабетичних мишева експримирају значајно више СНОР протеина, маркера стреса ендоплазматског ретикулума и активатора апоптозе, сугеришући да хипергликемија посредством стреса ендоплазматског ретикулума индукује развој остеопорозе у дијабетесу (143). Друга анимална студија је показала да стрес ендоплазматског ретикулума и активација ATF4 стимулишу развој инфламације у ретиналним ћелијама што узрокује развој дијабетичне ретинопатије (144). И недавно урађена клиничка студија је показала да смањена експресија активационих рецептора NKG2D и NKp46 настаје услед појачаног оксидативног стреса у НК ћелијама дијабетичних пацијената (145).

### **1.5. Утицај дијабетес мелитуса на имунски систем**

Скорија истраживања су указала на повезаност дијабетес мелитуса са дисфункцијом ћелија имунског система. Да дијабетес негативно утиче на имунски одговор потврђује већа учесталост инфекција и компликација инфекција код оболелих од дијабетес мелитуса, чиме се повећава морбидитет и морталитет. Бројне проспективне студије које су обухватиле оболеле од дијабетес мелитуса тип 1 и тип 2 су показале да су компликације дијабетеса проузроковане пре свега хипергликемијом и појачаним оксидативним стресом и да на степен оштећења ткива код особа с дијабетесом утичу како генетски фактори тако и хипертензија и дислипидемија (146-149).

Урађена су бројна истраживања која су се бавила испитивањем утицаја дијабетес мелитуса и хипергликемије на компоненте урођеног и стеченог имунског одговора.

Бројне клиничке и експерименталне студије су током протеклих деценија истакле везу између система комплемента и дијабетеса (150-155). Систем комплемента је једна од главних компоненти урођеног али и стеченог имунског одговора. Састоји се од више од 30 серумских и мембранских протеина чије су главне функције опсонизација и подстицање фагоцитозе микроорганизама. Поред ове функције, производи активације система комплемента обезбеђују други сигнал за активацију В-лимфоцита и продукцију антитела. Нови докази указују да је систем комплемента укључен у

неколико патолошких процеса, укључујући поремећај метаболизма у масном ткиву, запаљенски процес ниског степена, повећану експресију адхезивних молекула и повећану продукцију проинфламацијских цитокина у ендотелним ћелијама који доприносе ендотелној дисфункцији и инсулинској резистенцији (155). Неколико студија је показало да су серумске концентрације лектина који везује манозу (енгл. *Manose-binding lectin*, MBL), значајно повишене код пацијената са дијабетесом типа 1 као и код пацијената оболелих од дијабетичне нефропатије (156-162). Серумска концентрација MBL корелира са прогресијом и лошијом прогнозом дијабетичне нефропатије, код дијабетеса типа 1 (156-162). Ворониецка и сарадници показали су да повећана експресија информационе RNA за C3 компоненту комплемента у гломерулима позитивно корелира са тежином бубрежне инсуфицијенције код дијабетичних пацијената (163). Анализом еритроцита оболелих од дијабетеса показана је смањена активност регулаторног протеина CD59 те да су зато ћелије много подложније лизи услед уградње MAC комплекса у њихову мембрану у односу на еритроците здравих особа (164).

Иако су неке студије откриле недостатак C4 компоненте код оболелих од дијабетеса, сматра се да је смањење овог протеина вероватно удружено са дисфункцијом полиморфонуклеарних леукоцита и смањеном продукцијом цитокина (165,166).

Мононуклеарне ћелије особа са дијабетесом продукују значајно мање проинфламацијских цитокина интерлеукина-1 и интерлеукина-6 у одговору на стимулацију липополисахаридом (166,167). Друге студије су показале да повећана гликација може инхибирати продукцију интерферона гама (IFN- $\gamma$ ) и фактора некрозе тумора (TNF- $\alpha$ ) у Т лимфоцитима. Процес гликације такође смањује експресију МНС молекула I класе на мембрани мијелоидних ћелија, чиме се додатно ремети имунски одговор (168).

Смањена мобилизација, хемотакса и фагоцитна активност полиморфонуклеарних леукоцита је забележена у стању хипергликемије (167,169,170). Хипергликемија такође супримира антимикуробну функцију инхибирањем глукозо-6-фосфат дехидрогеназе, повећањем апоптозе полиморфонуклеарних леукоцита и смањењем трансмиграције полиморфонуклеарних леукоцита кроз ендотел (167). У ткивима којима није потребан инсулин за транспорт глукозе, хипергликемија повећава интрацелуларни ниво глукозе, које се потом метаболише искоришћавањем кофактора NADPH. Смањење нивоа NADPH спречава продукцију молекула који играју кључну

улогу у антиоксидативним процесима у ћелији, чиме се повећава осетљивост на оксидативни стрес, који доминира у дијабетичном стању (171).

Раније клиничке и експерименталне студије бавиле су се и анализом НК ћелија у дијабетес мелитусу. Осамдесетих година прошлог века, неколико група научника је истраживало број и активност НК ћелија код оболелих од дијабетеса тип 1, при чему су резултати ових студија углавном били опречни (163-166). Показано је да оболели од дијабетеса типа 1 имају знатно мањи број НК ћелија у периферној крви у односу на здраве (163,166). Друге студије су детектовале функционалне абнормалности НК ћелија (163,167). Анализа је показала да хумане НК ћелије изоловане из периферне крви оболелих од дијабетеса типа 1 показују значајно мању цитотоксичку активност према K562 ћелијској линији у поређењу са НК ћелијама изолованим из периферне крви контролних особа. Лорини и сарадници су уочили смањену цитотоксичку активност НК ћелија код дијабетичних пацијената, док је број НК ћелија био непромењен у односу на контролну групу (172). Док су одређене студије детектовале сталне промене како у броју тако и у функционалном фенотипу НК ћелија код оболелих од дијабетеса, у другим случајевима детектоване су пролазне абнормалности које су биле удружене са стадијумом болести (172-175). Родацки и сарадници су анализирали НК ћелије у зависности од стадијума дијабетес мелитуса тип 1, код људи. Показали су да је у почетној фази болести број НК ћелија незнатно снижен у крви, док се уочава њихова појачана активација која се огледа већом експресијом IFN- $\gamma$ . Насупрот томе, НК ћелије код оболелих са дуготрајним дијабетесом типа 1 имале су значајно мању експресију активационог молекула p30/p46, у поређењу са контролном групом. Значајно смањена експресија активационог рецептора NKG2D детектована је код свих пацијената са дијабетесом типа 1 независно од дужине трајања болести. Такође, показано је да су пацијенти са дијабетесом типа 1 имали повећану учесталост хаплотипа KIR гена који кодирају инхибиторне рецепторе на НК ћелијама важне за препознавање MHC молекула I класе (176).

Анимална студија на NOD мишевима је детектовала смањену функцију активационог рецептора NKG2D на НК ћелијама која се може повезати са спонтаним развојем дијабетес мелитуса у овом соју мишева. Оваква смањена експресија NKG2D рецептора је била удружена са смањеном цитотоксичком функцијом НК ћелија као и смањеном продукцијом цитокина (177). Такође је показано да смањење експресије лиганата за NKG2D рецептор услед апликације комплетног Фреундовога адјуванса



NOD мишевима корелира са повећањем експресије NKG2D рецептора и самим тим појачава активност NK ћелија (178,179). У складу са резултатима добијеним анализом NK ћелија NOD мишева, показано је да је проценат NK ћелија значајно нижи у периферној крви деце оболеле од дијабетес мелитуса типа 1 и да ове NK ћелије слабо реагују на стимулацију применом интерлеукина-2/интерлеукина-15. NK ћелије деце оболеле од дијабетеса су такође мање експримирале NKG2D рецептор и мање секретовале интерферон- $\gamma$ , а детектована је и смањена цитотоксичност NK ћелије зависна од NKG2D рецептора као и постојање дефекта у NKG2D- посредованој активацији фосфатидилинозитол 3-киназног-AKT пута (180).

Претходне студије су се бавиле и испитивањем утицаја дијабетес мелитуса на функционални фенотип антиген презентујућих ћелија. Резултати једне од анималних студија су показали да F4/80<sup>+</sup> перитонеални макрофаги изоловани из дијабетичних мишева експримирају значајно мање CD86 и CD54 молекуле и продукују мање фактора некрозе тумора- $\alpha$  и IL-6. Перитонелани макрофаги су продуковали више азот оксида у поређењу са контролним мишевима приликом третмана интерфероном- $\gamma$  и липополисахаридом, док је детектована значајно већа активност аргиназе у макрофагима дијабетичних мишева приликом стимулације интерлеукином-4 (181). Анализом хуманих дендритских ћелија показано је да деца оболела од дијабетеса типа 1 имају значајно мањи проценат плазмацитоидних и мијелоидних дендритских ћелија. Такође је уочена смањена експресија хемокинског рецептора CCR2 на мијелоидним и плазмацитоидним дендритским ћелијама што је потврђено и методом ланчане полимеризације на изолованим мијелоидним дендритским ћелијама (182).

Чен и сарадници су анализирали фенотип ћелија стечене имуности након апликације једне дозе стрептозотоцина на C57/B16 мишевима и уочили да CD8<sup>+</sup> CTL продукују мање перфорина, гранзима B и TNF- $\alpha$  и експримирају значајно мање CD103 молекула. Адоптивним трансфером CD8<sup>+</sup> CTL из дијабетичних мишева су показали смањену цитотоксичку активност према B16.gp33 туморским ћелијама меланома (183).

## 1.6. Дијабетес мелитус и тумори

Бројне епидемиолошке студије истичу да су пацијенти оболели од дијабетес мелитуса подложнији развоју тумора (184,185). Дијабетес тип 2 удружен је са повећаним ризиком од развоја карцинома попут карцинома дебелог црева, дојке, панкреаса, јетре, ендометријума, мокраћне бешике, не-Хочкиновог лимфома и

простате (186-193). Различити фактори доприносе повезаности ове две учестале болести. Постоје бројни заједнички фактори ризика који се убрајају у етиолошке факторе дијабетес мелитуса и тумора. То су старост, пол, етничка припадност, алкохол, дуван, начин исхране, гојазност, физичка активност, стил живота, индекс телесне масе (194). Велики број пацијената оболелих од дијабетеса има проблем са гојазношћу (195). Претходне студије су показале да код гојазних особа постоји већи ризик од развоја тумора дебелог црева, ректума, дојке, ендометријума, панкреаса, бубрега, јетре, жучне кесе и аденокарцинома једњака (196). Сматра се да пацијенти са индексом телесне масе  $> 30 \text{ kg/m}^2$  имају већи ризик за развој тумора од особа чији је индекс телесне масе између 18 и 25 (194,197). Гојазност је удружена и са продукцијом веће количине естрогена, што може повећати ризик од тумора зависних од естрогена. Значајно повећање телесне тежине удружено је и са повећаним ризиком од развоја тумора женских репродуктивних органа, карцинома ендометријума, дојке и грлића материце (198-200).

Канцерогенеза је сложен процес који захтева вишеструке генетске промене како би ћелија стекла неопластични фенотип, способност инвазије и метастазирања. Дијабетес може утицати на канцерогенезу на неколико начина: утицај хиперинсулинемије, утицај хипергликемије и утицај хроничне инфламације (194).

Познато је да туморске ћелије експримирају на мембрани рецепторе за факторе раста налик инсулину (енгл. *Insulin-like Growth Factor*, IGF). Везивање инсулина и активација изоформе А IGF рецептора може стимулирати митогенезу, пролиферацију туморских ћелија, заштиту од апоптотских стимулуса, развој инвазивног и метастатког фенотипа (201). Туморске ћелије имају способност да преузимају глукозу из спољашње средине независно од дејства инсулина, стога се сматра да је кључна улога инсулинских рецептора у преносу сигнала који подстичу преживљавање и митогенезу туморске ћелије (202).

Осим директних ефеката, хиперинсулинемија може индиректно подстицати канцерогенезу кроз своје ефекте на продукцију фактора раста налик инсулину I (енгл. *Insulin-like growth factor I*, IGF-I) (203). Инсулин смањује производњу IGF везујућег протеина тип 1 и 2 (204-206), што резултира повећањем нивоа слободног, IGF-I који циркулише путем крви. IGF-I има израженије митогене и анти-апоптотске активности од инсулина (207) и може деловати као стимулус раста у пренеопластичним и неопластичним ћелијама (208).

Други важан фактор којим дијабетично стање може створити погодне услове за развој тумора је хиперликемија. Двдесетих година прошлог века Ото Варбург и сарадници су уочили да туморске ћелије преузимају и искоришћавају знатно већу количину глукозе у односу на здраве ћелије. У туморским ћелијама глукоза се ферментује до лактата иако је кисеоник присутан, те је стога овај процес назван аеробна гликолиза (209,210). Како се у процесу оксидативне фосфорилације продукује много веће количина АТР-а из исте количине глукозе у односу на процес аеробне гликолизе, Варбург је закључио да је у основи овог процеса поремећена функција митохондрија у туморским ћелијама (211). Студије других истраживача су откриле да је покретање процеса гликолизе условљено дејством фактора раста, а откриће онкогена је навело на закључак да је аберантна регулација преноса сигнала услед дејства фактора раста иницијални корак у процесу онкогенезе (212,213). Иако је по јединици глукозе, аеробна гликолиза мање ефикасан механизам за стварање АТР-а, стопа метаболизма глукозе преко аеробне гликолизе је већа, тако да се производња лактата из глукозе одвија 10-100 пута брже од потпуне оксидације глукозе у митохондријама. Варбургов ефекат може бити предност за туморске ћелије које се труде да опстану и расту у мултицелуларном окружењу (214,215).

Хронична инфламација има плејотропни ефекат на развој карцинома: подстиче канцерогенезу, малигну трансформацију, раст тумора, инвазију и метастатско ширење туморских ћелија (216,217). У почетној фази развоја тумора, тумор-инфилтришући леукоцити продукују медијаторе запаљења попут цитокина као што су IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , и кисеоничних слободних радикала и реактивних азотних једињења који индукују епигенетске промене у пре-малигним лезијама и супримирају тумор супресор гене (218). У наредној фази развоја тумора, ћелије имунског система продукују цитокине и хемокине који фаворизују преживљавање и пролиферацију туморских ћелија. Током прогресије тумора и метастазирања, туморске и имунске ћелије производе цитокине и хемокине које узрокују развој покретљивости и инвазивног потенцијала туморских ћелија (219). У фази развоја инвазивности и метастазирања тумора кључан је процес епително-мезенхималне транзиције (220).

Веза онкогенезе и запаљења је посредована унутрашњим и спољашњим путевима (216). Унутрашњи пут се активира генетским променама попут активације прото-онкогена мутацијом, хромозомским преуређивањем или инактивацијом тумор супресор гена које изазивају инфламацију и развој неоплазије (216,221).

Трансформисане ћелије луче проинфламацијске медијаторе стварајући на тај начин инфламацијско подручје. Спољашњи пут подстиче развој инфекције која повећава ризик за развој карцинома. Оба пута индукују активацију неколико транскрипционих фактора као што су NF-κB, STAT-3 и HIF-1 што узрокује продукцију проинфламацијских цитокина и хемокина (216,221). Ови молекули регрутују и активирају различите популације леукоцита као што су макрофаги, мастоцити, еозинофили и неутрофили у туморску микросредину. Оваква заједничка активност туморских ћелија и туморске микросредине подстиче нагомилавање проинфламацијских медијатора који додатно подстичу раст тумора и инвазивност (216,219,221).

### 1.7. Карцином дојке и експериментални модел 4Т1

Карцином дојке је најчешћи малигнитет и други узрок смрти код жена широм света. Карцином дојке се може развити код оба пола, ипак, жене оболевају 100 пута чешће од мушкараца. Малигни тумори дојке најчешће настају из епителних ћелија каналића или режњева. У зависности од начина раста, карциноми дојке се могу поделити на неинфилтришуће (*Carcinoma in situ*) туморе који не пробијају базалну мембрану и инфилтришуће туморе који пробијају базалну мембрану и настављају да се шире у околне одељке и у удаљена ткива и органе лимфогеним и хематогеним путем. Идентификовани су бројни фактори који фаворизују развој карцинома дојке. Око 5 до 10% жена са раком дојке носи мутацију у једном од 2 гена, BRCA1 или BRCA2. Мутације у P53 тумор супресорском гену као и губитак експресије протеина ретинобластома (pRB) и амплификација циклина D1, мутације протеина који учествују у Ras сигналном путу и прекомерне експресије HER-2/neu гена се јављају у више од половине оболелих од карцинома дојке (222).

Хумане туморске ћелије се у анималним експерименталним моделима нису добро показале због метастазирања на неочекивана места. Међутим, показано је да су мишје туморске ћелијске линије погодне за експерименталне моделе јер показују метастатске карактеристике налик хуманим туморским ћелијама.

4Т1 туморску линију су изоловали Милер и сарадници и са годинама је ушла у широку употребу захваљујући развоју метастатских промена попут хуманих ћелија карцинома дојке. 4Т1 мишја туморска линија служи као модел за четврти стадијум тумора дојке (223). Ћелије се могу апликовати на више начина: директно у масно

јастуче млечне жлезде, интравенски у репну вену, артеријски хируршком катетеризацијом десне каротиде или инјекцијом у леву преткомору срца. Након убризгавања директно у ткиво дојке, 4Т1 ћелије формирају примарни тумор на месту апликације и дају метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу у периоду од 3 до 6 недеља након инокулисања (223-229). У шестој недељи након апликације, пречник тумора је био већи од 1 cm и уочене су метастазе у торакалном региону код већине животиња. Уочен је бифазан ток раста примарног тумора који се састоји од прогресивног раста током прве две недеље након апликације туморских ћелија, регресије између друге и четврте недеље и поновно убрзаног раста након пете недеље (226). Даље анализе су показале да су све животиње шест недеља након апликације развиле метастазе у плућима (6/6), у јетри (5/6), слезини (3/6) и мозгу (2/6). Метастазе су детектоване и у лимфним чворовима, бубрезима, мозгу, цревима и надбубрежним жлездама (226). Метастазе показују дистрибуцију сличну хуманом карциному дојке, а 4Т1 линија је једна од ретких која даје спонтане метастазе у костима (226, 227). Брз раст тумора и метастазирање у специфичне органе чине 4Т1 погодним моделом за испитивање прогресије и метастазирања тумора. Такође се показало да је овај модел одличан за испитивање утицаја имунског система на раст и развој тумора због чињенице да је 4Т1 модел синген са BALB/С мишевима (226,227).

Гени који су експримирани у 4Т1 туморским ћелијама анализиран су у односу на интраћелијску локацију и функцију. Бројни гени кодирају протеине важне за пролиферацију, адхезију и миграцију туморских ћелија, кодирају протеине који фацилитирају ангиогенезу и ремоделују екстраћелијски матрикс (227). Показано је да 4Т1 туморске ћелије појачано експримирају гене који кодирају међућелијске везе (Cldn3, Cldn4, Cldn7 и Tjp2), адхерине (Cdh1 и Vill1) и спојне филаменате (Krt1-18 и Krt2-7). Повећана продукција матрикс-протеиназа (енгл. *Matrix metalloproteinase*, ММТ) попут MMP3, MMP9 и MMP13 указује на изражено ремоделовање екстраћелијског матрикса.

У 4Т1 туморским ћелијама је најактивнији сигнални пут Jak/Stat што је и потврђено појачаном продукцијом Jak2 и Stat1 молекула и смањеном продукцијом Socs1, протеина инхибитор Jak/Stat сигналног пута. Такође, 4Т1 ћелије карактерише знатно смањење нивоа CDK2-асоцираног протеина 1 (CDK2ap1), p53 протеина као и инхибитора циклин-зависне киназе p21 (Cdkn1a) и циклина G (Ccng1). Сматра се да ове промене убрзавају почетну фазу ћелијског циклуса (G1 → S) и инхибирају одговор

ћелије на оштећење DNA.

### 1.8. Иmunски одговор на тумор дојке

Бројни фактори учествују у супресији раста тумора дојке. Пре свега, организација ткива дојке је таква да спречава раст и метастазирање туморских ћелија. Као препрека метастазирању, ћелије улазе у апоптозу када изгубе контакт са базалном мембраном, екстрацелуларним матриксом или суседним ћелијама. Овај процес смрти ћелије назван је “аноикис” (230). Међутим, туморске ћелије су развиле су механизме за преживљавање након одвајања од околног ткива и током проласка кроз лимфне и крвне судове. Дефекти у експресији рецептора смрти за активирање каспазе, као што је претерана експресија FLIP инхибитора каспазе-8, омогућавају ћелијама стицање отпорности на аноикис (230,231). Такође, блокирање унутрашњег пута апоптозе, попут претеране експресије антиапоптотских протеина из Bcl-2 фамилије супримира аноикис (230,232).

Иmunски систем игра битну улогу у превенцији настанка и раста тумора. Иmunски систем штити домаћина од тумора изазваних вирусима елиминацијом или сузбијањем вирусних инфекција. Правовремена елиминација патогена и брза резолуција инфламације могу спречити стварање хроничног инфламацијског окружења погодног за туморогенезу. И коначно, имунски систем има способност да препознаје и елиминише туморске ћелије на основу експресије тумор-специфичних антигена или молекула изазваних ћелијским стресом (233,234).

Способност имунског система да идентификује и елиминише новонастале туморске ћелије и на тај начин дејствује као прва линија одбране од настанка тумора се назива имунски надзор. Како се упркос присуства имунског надзора тумори ипак развијају, *immunoediting* тумора потпуније објашава улогу имунског система у борби против настанка тумора. *Immunoediting* тумора подељен је на 3 фазе: фаза елиминације, фаза еквилибриума и фаза избегавања имунског одговора (235,236). Фаза елиминације се поклапа са теоријом о постојању туморског имунског надзора, где имунски систем открива и елиминише туморске ћелије које су настале услед неадекватних интрацелуларних супресорских туморских механизма. Фаза елиминације може бити потпуна, када су све туморске ћелије уклоњене или непотпуна, када се елиминише само део туморских ћелија. У случају парцијалног елиминисања тумора, наступа привремено стање равнотеже између имунског система и развоја тумора (235,236).

Сматра се да током овог периода туморске ћелије остају неактивне или пак акумулирају даље генетске промене (мутације DNA, измене експресије гена) које индукују експресију тумор-специфичних антигена и антигена продукованих у стању стреса. Како се овај процес наставља, имунски систем покреће селективни притисак који је довољан да контролише прогресију тумора, међутим, уколико имунски одговор не елиминише све туморске ћелије, најотпорније туморске ћелије избегну елиминацију чиме наступа фаза избегавања имунског одговора. У току фазе „избегавања“, имунски систем више нема контролу над растом тумора (235-238).

Осим туморских ћелија, у тумору се могу детектовати и нетуморске ћелије које могу играти протуморску или антитуморску улогу (239). Интеракције између малигних и нетрансформисаних ћелија стварају туморску микросредину. Међућелијска комуникација се остварује посредством комплексне мреже цитокина, хемокина, фактора раста и ензима (239).

### 1.8.1. Макрофаги

Данас се зна да су тумор-асоцирани макрофаги (енгл. *Tumor-associated macrophages*, TAMs) део леукоцитне популације која доминира у туморској микросредини. Макрофаги представљају моноклеарне фагоците чија је примарна функција фагоцитоза. Иако припадају урођеној имуности, макрофаги играју значајну улогу у ефекторским механизмима стечене имуности. Макрофаги су хетерогена популација ткивно-резидентних, терминално диферентованих миелоидних ћелија које настају из моноцитних прекурсора пореклом из костне сржи (240). Макрофаги се могу детектовати на основу експресије површинских маркера, транскрипционих фактора, производње цитокина и специфичних ензима. Молекули карактеристични за мишје макрофаге су LY6C, МНС молекули II класе, хемокински рецептори CX3CR1 и CCR2, CD62L (L-селектин) и ангиопоетински рецептор TIE2 (241,242). Код људи, макрофаги се детектују на основу LPS корецептора (CD14), HLA-DR (МНС молекула II класе), CD312, CD115 и Fc $\gamma$ -рецептора Fc $\gamma$ RIII (CD16) (243). Специфични маркери обухватају и CD163, CD204, CD206 рецепторе чистаче које експримирају M2 макрофаги, као C тип лектинског рецептора CD301 (244,245).

Макрофаги показују висок степен пластичности у одговору на локално окружење и могу да делују као антиген презентујуће ћелије, у одбрани домаћина од микроорганизама, у развоју ткива, зарастању рана и регулацији имунског система (246-

249). У зависности од окружења и дејства цитокина, макрофаги се могу поделити на класично активирани макрофаге типа 1 (M1) и алтернативно активирани макрофаге типа 2 (M2) (250). Везивање молекулских образаца патогена за *Toll-like* рецепторе, и дејство интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) поларизирају макрофаге у M1 фенотип. Активирани M1 макрофаги фагоцитишу и елиминишу микроорганизме и туморске ћелије, презентују антигене Т лимфоцитима и производе велике количине про-инфламацијских цитокина (250,251). Макрофаги подстичу развој снажног акутног имунског одговора захваљујући продукцији индуцибилне азот-оксид синтетазе, реактивних врста кисеоника и производњи IL-12 који фаворизује развој Th1 имунског одговора (243). Насупрот овоме, излагање цитокинима IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  или простагландину E2 (PGE2) фаворизује настанак M2 макрофага (252). Ова популација макрофага учествује у Th2 имунском одговору, супримира развој Th1 имунског одговора продукцијом IL-10 и учествује у процесу ремоделовања ткива и зарастања рана. Макрофаги продукују матриксне металопроотеиназе којима разграђују компоненте екстрацелуларног матрикса, подстичу ангиогенезу продукцијом васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) и уклањају мртве ћелије (253,254).

У хуманом карциному дојке је уочено да се тумор асоцирани макрофаги акумулирају на такозваним вручим тачкама ангиогенезе и то пре свега у аваскуларним регионима тумора (255). Хипоксија или цитокини продуковани услед хипоскичног стања привлаче макрофаге који продукују индуцибилни фактор хипоксије 2- $\alpha$  (енгл. *Hypoxia inducible factor 2- $\alpha$* , HIF-2 $\alpha$ ) (256). HIF-2 $\alpha$  потом стимулише продукцију VEGF-а, чиме се подстиче формирање нових крвних судова (257). Поред тога, M2 макрофаги у близини крвних судова секретују епидермални фактор раста који подстиче миграцију туморских ћелија, секретују металопроотеиназе MMP-2 и MMP-9 које разарају базалну мембрану крвних судова и секретују TNF- $\alpha$ , који активира ендотелне ћелије, што све заједно олакшава улазак туморских ћелија у циркулацију (258,259).

### 1.8.2. Дендритске ћелије

Дендритске ћелије (DCs) су професионалне антиген презентујуће ћелије важне за покретање стеченог имунског одговора. У лимфном чвору DCs презентују антиген Т лимфоцитима (1. сигнал за активацију Т лимфоцита), обезбеђују костимулаторни



„сигнал 2“, као и додатни трећи сигнал у виду продукције цитокина који даље усмеравају поларизацију стеченог имунског одговора у Th1, Th2 или Th17 смеру (260-262). DCs су детектоване у туморској микросредини у карциному дојке, дебелог црева, плућа, бубрега, бешике, желуца и јајника (263). Поред покретања тумор-специфичног имунског одговора, интеракција зрелих дендритских ћелија и NK ћелија веома је важна за функционално сазревање NK ћелија и за појачавање њихове туморицидне функције (264,265). Са друге стране, неке студије су показале да тумор инфилтришуће DCs смањено експримирају и приказују антигене лимфоцитима, експримирају више PD-L1 и продукују IDO и на тај начин супримирају стечени антитуморски имунски одговор (266-268).

### 1.8.3. NK ћелије

NK ћелије су компонента урођене имуности. Приликом сусрета са инфицираним или трансформисаним ћелијама, NK ћелије се активирају због чега играју важну улогу у антимикубној и антитуморској имуности (269,270).

NK ћелије су велики гранулисани лимфоцити који воде порекло из костне сржи. Идентификују се на основу одсуства T ћелијског рецептора као CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> ћелије, код људи. На основу степена експресије CD56 молекула, NK ћелије се могу поделити на две подврсте: CD56<sup>dim</sup> и CD56<sup>bright</sup> (271). CD56<sup>dim</sup> NK ћелије обухватају 90% укупних NK ћелија у периферној крви. То су зреле ћелије које доминантно експримирају рецептор ћелија убица који је налик имунглобулину (енгл. *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*, KIR), цитотоксичке су, јако активне и продукују у малој мери проинфламацијски цитокин IFN- $\gamma$ . CD56<sup>bright</sup> NK ћелије се карактеришу ниским нивоом експресије или изостанком експресије KIR молекула и знатно већом продукцијом IFN- $\gamma$ . То су незреле NK ћелије које доминирају у производњи цитокина, док је њихова улога у цитотоксичној елиминацији ћелија ограничена (272).

Иако NK ћелије по препознавању туморски измењене ћелије брзо остварују цитолитичку активност, у многим случајевима оне морају бити функционално диференциране или стимулисане дејством цитокина које продукују околне ћелије попут дендритских ћелија како би постигле оптимални ефекторски одговор (273-279). Ово се углавном дешава у секундарним лимфним ткивима као што су слезина и лимфни чворови (276).

NK ћелије обично циркулишу у фази мировања, али могу да инфилтрирају ткива под дејством цитокина (277,278). Раније се сматрало да је активност NK ћелија контролисана искључиво инхибиторним механизмима. Са открићем активаторних рецептора на NK ћелијама, дошло се до закључка да је контрола цитотоксичности NK ћелија комплексан процес који зависи од баланса односно преминације активације инхибиторних и активаторних рецептора. Активаторни и инхибиторни рецептори препознају различите лиганде. Активаторни рецептори NK ћелија попут NKp30, NKp46 препознају измењене молекуле које експримира туморска или инфицирана ћелија на својој мембрани (279). Инхибиторни рецептори препознају сопствене протеине, пре свега MHC молекуле I класе који експримира свака ћелија са једром (280,281). Захваљујући оваквом комплексном механизму активације осигурано је да NK ћелије ефикасно елиминишу искључиво туморске и инфициране ћелије, али не и нормалне ћелије домаћина (280).

Препознавање оштећене или измењене ћелије активаторним рецепторима уз дејство одређених цитокина обезбеђује активацију NK ћелије (282). Када се активирају, NK ћелије индукују апоптозу циљних ћелија углавном кроз егзоцитозу перфорина и гранзима (283). Перфорин и гранзими су цитотоксични протеини смештени унутар секреторних гранула, специјализованих егзоцитозних органела познатих и као литичке грануле. Активација NK ћелија покреће поларизовану егзоцитозу секреторних лизозома, ослобађајући цитотоксичне молекуле који убијају циљну ћелију. Сигнал са активаторних рецептора индукује реорганизацију Голџијевог комплекса и транспротовање цитоплазматских гранула у зону имунске синапсе између NK ћелије и туморске ћелије (284). Перфорин образује поре на мембрани туморских ћелија. Цитолитички просец се наставља уласком јона  $Ca^{2+}$  и  $Na^{+}$ , а изласком  $K^{+}$  из туморске ћелије као и уласком гранзима. Најзначајније компоненте ових гранула су протеазе гранзим А и гранзим В. Гранзим В покреће апоптозу директном активацијом каспазе 3, 7, 8 и 10 или активацијом Bid протеина и следственим ослобађањем цитохрома С (285,286). Гранзим А је такође значајан за Т ћелијску цитотоксичност и активита каспаза независну апоптозу.

Осим тога, NK ћелије продукују и важне имунорегулаторне цитокине (287,288). IFN- $\gamma$  појачава урођени имунски одговор и стимулише антиген презентујуће ћелије чиме индиректно подстиче стечени одговор Т лимфоцита (289,290). Поред IFN- $\gamma$ , оне продукују и IL-5, IL-10, IL-13, IL-22, TNF- $\alpha$ , гранулоцитно макрофагни фактор

стимулације колонија (енгл. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulatory Factor*, GM-CSF), макрофагни инфламацијски протеин 1 $\alpha$  и 1 $\beta$  (енгл. *Macrophage inflammatory protein*, MIP) (291).

#### 1.8.4. NKT ћелије

Урођеноубилачки Т лимфоцити (енгл. *Natural Killer T cells*, NKT) су ћелије урођене имуности које играју значају улогу у регулацији имунског одговора (292). NKT ћелије су подтип Т лимфоцита и сходно томе експримирају Т ћелијски рецептор (енгл. *T cell receptor*, TCR), међутим оне експримирају и маркере који су карактеристика NK ћелија попут NK1.1, CD49b, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E и Ly49a (експримирани на мишијим ћелијама), односно CD161, CD56 и CD16 (експримирани на хуманим ћелијама) (293,294). За разлику од Т лимфоцита који препознају пептидне антигене у контексту главног комплекса хистокомпатибилности I или II класе, NKT ћелије препознају липидне антигене презентоване у склопу молекула CD1d на мембрани антиген-предентујућих ћелија (293). На основу карактеристика TCR-а и реактивности на липидне антигене, NKT ћелије су подељене на два подтипа (295). NKT ћелије тип I, назване и инваријантне NKT ћелије (енгл. *invariant NKT cells*, iNKT) експримирају инваријантни  $\alpha$  ланац TCR-а, који настаје реаранжирањем генских сегмената V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 8, V $\beta$ 7, и V $\beta$ 2 ланца код мишева, односно хомолог V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 ланца код људи (296). Инваријантни  $\alpha$  ланац TCR-а упарује се са  $\beta$  ланцем ограничене хетерогености (295). Главна карактеристика iNKT ћелија је препознавање  $\alpha$  галактоцерамида презентованог у склопу CD1d молекула (297). NKT ћелије тип II карактеришу се експресијом TCR-а који је кодиран V $\alpha$ 3.2-J $\alpha$ 9/V $\beta$ 8, V $\alpha$ 8/V $\beta$ 8 генским сегментима.

NKT ћелије се активирају након што својим TCR-ом препознају липидне антигене презентоване у склопу CD1 молекула на APC (298). CD1 је површински молекул изграђен од гликопротеина који је удружен са  $\beta$ 2 микроглобулинским ланцем и експримиран на мембрани APC. Структурно је јако сличан MHC молекулу I класе (енгл. *major histocompatibility complex*, MHC) (299). Код људи, CD1 молекул постоји у неколико изоформи (CD1a, -b, -c, -d и -e), док је код мишева присутан само као CD1d (299).

NKT ћелије играју значајну улогу у патогенези инфективних и аутоимунских болести, алергијских реакција и тумора (300-304). NKT се активирају препознавањем

различитих сопствених или страних липидних антигена. Хемијске структуре попут ендогених липида, сфинголипида и глицеролипида, као и егзогени липиди као што су анитигени микроорганизама *Sphingomonas spp*, *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium bovis*, *Leishmania donovani* презентују се у склопу CD1d молекула и стимулишу NKT ћелије (305).

У раној фази имунског одговора, продукују сет цитокина IFN- $\gamma$ , IL-4, а у неким ситуацијама и IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  (305). Поларизацијом у Th1, Th2 или Th17 цитокински профил, NKT ћелије модификују урођени и стечени имунски одговор (295,306,307). IFN- $\gamma$  који продукују NKT ћелије појачава фагоцитозну способност макрофага активира NK ћелије и CD8<sup>+</sup> Т лимфоците (308,309). Такође, *in vitro* је забележено да NKT ћелије активирају В лимфоците, промовишу њихову пролиферацију и продукцију антитела (310). Налик NK ћелијама, NKT ћелије након активације продукују цитотоксичне грануле- перфोरине и гранзиме и испоручују их у заражене и малигне ћелије узрокујући апоптозу (311,312). Цитотоксичка активност NKT ћелија подстиче локално запаљење, антитуморски имунски одговор и додатно сузбија ограничавање имунског одговора елиминацијом регулаторних Т лимфоцита (305).

Испитивање антитуморског ефекта  $\alpha$  галактоцерамида је потврдило да NKT ћелије играју значајну улогу у антитуморском имунском одговору. Након тога су експерименти на Ja18 и CD1d дефицијентним мишевима показали да су NKT ћелије важне у туморском имунском надзору у фибросаркому индукованом метилхолантrenom, код p53 дефицијентних мишева и у аденокарциному простате (313-316). Сматра се да NKT ћелије продукцијом IFN- $\gamma$  активирају NK ћелије и фаворизују елиминацију туморских ћелија (317,318).

Студије на хуманом материјалу су показале да број NKT ћелија негативно корелира са прогресијом карцинома плућа, дојке, колона и меланома и да пацијенти са већим бројем NKT ћелија имају бољу прогнозу болести (319,320).

#### 1.8.5. Цитотоксички Т лимфоцити

Цитотоксички Т лимфоцити (енгл. *Cytotoxic T lymphocyte*, CTL) су главна компонента стечене имуности у елиминацији туморских ћелија. За разлику од NK ћелија, CTLs су антиген специфични и препознају туморске пептидне антигене презентоване у склопу МНС молекула I класе (321).

CTLs елиминишу туморске ћелије на два различита начина. Попут НК ћелија, CTLs продукују перфторине и гранзиме. Перфторин формира трансмембранске канале сличне порамма који дозвољавају улазак гранзима В у цитоплазму где активира каспазе (322). Код људи и мишева, ово се углавном дешава активацијом митохондралног пута апоптозе захваљујући директној активацији протеина Bid (323,324) Други механизам који користе за елиминацију туморских ћелија је такозвани интеракција рецептор-лиганд смрти. Најбоље описани лиганди и рецептори смрти припадају фамилији фактора некрозе тумора (TNF) као што су TNF, Fas, CD40 (325). Ови рецептори играју важну улогу у преношењу сигнала смрти са ћелијске мембране на интрацелуларни сигнални систем. Од познатијих лиганата и одговарајућих рецептора смрти издвајамо FasL/ FasR, TNF- $\alpha$ / TNFR1, Apo3L/DR3 (326). Везивање лиганата смрти за рецептор смрти групише рецепторе смрти коришћењем адаптерног протеина FADD (енгл. *Fas-Associated- Death- Domain- Protein*) (327). FADD везује инактивну форму каспазе-8 и активира је (328). Активна каспаза-8 даље активира ефекторске каспазе које деградирају циљну ћелију.

### 1.8.6. Мијелоидне супресорске ћелије

Мијелоидне супресорске ћелије (енгл. *Myeloid-Derived Suppressor Cell*, MDSC) представљају малу популацију циркулишућих ћелија у крви које играју изузетно важну улогу у генези и прогресији тумора (329). MDSCs су хетерогена популација незрелих миелоидних ћелија које воде порекло од прекурсора за гранулоците, макрофаге или дендритске ћелије (330-332). Код мишева, MDSCs се идентификују на основу експресије CD11b и Gr1 маркера и могу се поделити на два подтипа: полиморфонуклеарне Ly6G<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>lo</sup> и моноцитне Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> ћелије (330-332). Не постоји консензус да ли је било која од ових подгрупа MDSCs више имуносупресивна.

Претходним студијама је детектована јака корелација између хроничне инфламације у туморској микросредини и настанка MDSCs (330-332). Туморске ћелије су способне да секретују разне проинфламацијске медијаторе попут фактора стимулације гранулоцитно-макрофагне колоније (енгл. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), фактора стимулације колоније гранулоцита (енгл. *Granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), фактора стимулације колоније макрофага (енгл. *Macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), фактора матичних ћелија, васкуларног ендотелног фактора раста, TGF- $\beta$ , фактор некрозе тумора TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

IL-6 и IL-10 (330-334). Показано је да GM-CSF игра кључну улогу у генерисању MDSCs у туморској микросредини и да показује дозно зависни ефекат: у ниским концентрацијама индукује стварање MDSCs и незрелих DCs, док у високим концентрацијама фаворизује стварање неутрофила и зрелих DCs (352-354). Хемокини су кључни молекули који наводе MDSCs у примарни тумор и метастатска жаришта (355,356). CCL2 и CCL5 су главни хемокини који обезбеђују миграцију моноцитних MDSCs. Показано је да хумане туморске ћелије карцинома дојке, јајника и желуца продукују хемокин CCL2 који интереагује са рецепторима за хемокине CCR2, CCR4 и CCR5 које експримирају новонастале MDSCs (335,336,357). Синергистичко дејство претходно наведених фактора подстиче настанак и акумулацију MDSCs у туморској микросредини.

MDSCs показују изузетне имуносупресивне и туморигене активности (331,332). MDSCs смањују доступност аргинина и цистеина, који су есенцијални за пролиферацију Т лимфоцита (331,337,338). Појачаном производњом азотног оксида и реактивних врста кисеоника, MDSCs индукују апоптозу Т лимфоцита и NK ћелија (331,332,339). MDSCs експримирају PD-1 молекул и продукују TGF- $\beta$  и IL-10 чиме значајно супримирају имунски одговор, секретују проангиогене факторе који промовишу неоваскуларизацију тумора, и факторе раста, матриксне металопротеиназе и цитокине који стимулишу раст тумора и поларизују имунску реакције у Th2 правцу (331,332,340-342). Недавне студије су потврдиле да MDSCs индукују развој и поспешују активацију регулаторних Т лимфоцита кроз интеракцију CD40-CD40L (358,359). Због тога се MDSCs могу сматрати главним играчима у имуносупресији у туморској микросредини.

### 1.8.7. Регулаторни Т лимфоцити

Регулаторни Т лимфоцити (енгл. *Regulatory T cells*, Treg) представљају субпопулацију Т лимфоцита која успоставља баланс између имунске активације и толеранције. Treg лимфоцити се могу поделити на Treg лимфоците које настају у тимусу током интеракције са сопственим антигенима и периферне Treg лимфоците који настају диференцијацијом CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита услед субоптималног излагања антигенима у периферним лимфним органима (343,344). Оба подтипа Treg лимфоцита карактерише експресија специфичног транскрипционог фактора Foxp3 (енгл. *Forkhead helix transcription factor p3*) као и експресија молекула CD25 ( $\alpha$  ланац

рецептора за интерлеукин 2) (345,346).

Акумулација Трег лимфоцита у туморском ткиву повезана је са лошијом прогнозом код оболелих од многих карцинома, укључујући рак јажника, панкреасног дукталног аденокарцинома, карцинома плућа, глиобластома, не-Хочкиновог лимфома, меланома (347). Трег лимфоцити остварују имуносупресивну активност кроз различите директне и индиректне механизме. Инхибирањем транскрипције гена за IL-2 као и гена за рецептор за IL-2, Трег лимфоцити спречавају пролиферацију ефекторских Т лимфоцита, док експресијом инхибиторног молекула CTLA-4 и PD-1 супримирају активацију лимфоцита (348,349). Показано је да TGF- $\beta$  везан за мембрану Трег лимфоцита супримира експресију активационог рецептора NKG2D на NK ћелијама (347). Трег лимфоцити продукују индоламин-2,3-диоксигеназу (енгл. *Indolamine 2,3-dyoxigenase*, IDO) који разграђује триптофан, аминокиселину неопходну за метаболичке процесе Т лимфоцита (350). Такође, посредством TGF- $\beta$  и IL-10, Трег лимфоцити подстичу сазревање и стварање толерогеног фенотипа дендритских ћелија (347). Осим поменутих имуномодулаторних ефеката, показано је да Трег лимфоцити поспешују раст тумора продукцијом проангиогеног васкуларног ендотелног фактора раста (351).

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај дијабетес мелитуса на раст и развој тумора дојке и на модулацију антитуморског имунског одговора у експерименталном мишјем моделу карцинома дојке.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Утврдити учинак експерименталног дијабетес мелитуса на раст примарног тумора дојке, инциденцу метастазирања и параметре оксидативног стреса;
2. Испитати утицај експерименталног дијабетес мелитуса на ћелијски састав слезине и субпопулације тумор-инфилтришућих леукоцита код мишева пре и после индукције тумора;
3. Испитати како експериментални дијабетес мелитус утиче на фенотипске и функционалне карактеристике и цитотоксички капацитет NK ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, пре и после индукције тумора;
4. Испитати повезаност појачаног оксидативног стреса и стреса ендоплазматског ретикулума са променом функционалног фенотипа NK ћелија, CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита и имуносупресивних ћелија мишева са хипергликемијом;
5. Испитати да ли је доминантан утицај хипергликемије или оксидативног стреса на промену функционалног фенотипа NK ћелија и CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита;

### ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Експериментали модел дијабетес мелитуса убрзава раст и метастазирање тумора дојке.
2. Хипергликемија смањује инфилтрацију туморицидних NK ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у примарни тумор.
3. Хипергликемија смањује цитотоксички капацитет NK ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита.



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Студија је спроведена у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у периоду од јуна 2015. године до децембра 2017. године.

Истраживање је одобрила Етичка комисија за добробит лабораторијских животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-6496 од 17.06.2015. године.

#### 3.1. Експерименталне животиње

Истраживање је спроведено на 6 до 8 недеља старим женкама, чистог соја BALB/c (енгл. *wild type*) мишева. У студију су укључене животиње усклађене старости и телесне масе између експерименталних група. Мишеви су узети из Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије (ВМА) у Београду и одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Током свих експеримената животиње су имале слободан приступ храни и води.

#### 3.2. Индукција *diabetes mellitus-a*

У индукцији дијабетес мелитуса коришћен је Стрептозотцин (STZ, *Sigma Chemical St. Louis, MO, USA*) који је токсичан за инсулин продукујуће  $\beta$  ћелије панкреаса. Налик глукози, користи GLUT2 транспортере за улазак у ћелију изазивајући оштећење ДНА (57-59). У свим експериментима мишевима је након четворочасовног гладовања интраперитонеално апликована једна сублетална доза STZ-а 170mg/kg раствореног у 100 $\mu$ l цитратног пуфера (енгл. *Citrate buffer, CB*) рН вредности 4,5.

#### 3.3. Ћелијска линија мишјег тумора дојке (4Т1)

У експериментима је коришћена 4Т1, ћелијска линија мишјег тумора дојке (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; CRL-2539*).

4Т1 туморска линија је добијена из спонтано насталог тумора дојке у BALB/С мишу. Након апликације у млечну жлезду BALB/С мишева, 4Т1 ћелије формирају примарни

тумор и метастазирају у плућа, јетру, лимфне чворове и мозак, налик хуманом карциному дојке (223-229).

Туморске ћелије 4Т1 су узгајане у DMEM медијуму (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са додатком 10% феталног телећег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 2 mmol/l L-глутамин, 1 mmol/l пеницилин/стрептомицин, 1 mmol/l не-есенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*). Ћелије извађене из контејнера са течним азотом су се одмрзавале 1 до 2 минута у воденом купатилу на температури од 37°C. Додавањем 9 ml комплетног медијума и центрифугирањем на 350 G 10 минута, уклоњен је крио-протективни медијум. Крио-протективни медијум јесте комплетан медијум за раст ћелија са додатком 5% DMSO (*Dimethylsulfoxide*). Након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума, пребачене у флак и култивисане у асептичним условима у инкубатору на температури од 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub>. Просечно време дуплирања броја ћелија износи од 24 до 48<sup>h</sup>.

Непосредно пре *in vivo* и *in vitro* експеримената, субконфлуентне ћелије (приближно 80% конфлуентности), одвајане су са дна флакса краткотрајним деловањем трипсином [0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, PAA Laboratories GmbH) раствореног у PBS-у (енгл. *Phosphate Buffered Saline*, PAA Laboratories GmbH). Ћелије су затим ресуспендоване у 6 ml DMEM-а са додатком 10% FBS-а, како би се неутралисао трипсин и спречило оштећење ћелија, а потом су центрифугиране 300 G 10 минута. Ћелије су додатно “пране” у PBS-у, без FBS-а, пре употребе у сваком *in vitro* и *in vivo* експерименту. Вијабилност ћелија је одређена помоћу *trypan-blue*-а и коришћене су само ћелијске суспензије са вијабилношћу већом од 95%.

У експериментима, бројни истраживачи су користили различит број туморских ћелија 4Т1 за индукцију болести, који се кретао од  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$  (360-362). У свим *in vivo* експериментима овог истраживања коришћено је  $5 \times 10^4$  туморских ћелија за индукцију тумора (380). Малигне ћелије 4Т1 ( $5 \times 10^4$ ) су ресуспендоване у 50µl PBS-а и убризгаване су инсулинским системом (шприц и игла 21G) директно у масно јастуче млечне жлезде број 4.

### 3.4. Верификација примарног тумора

Појава примарног тумора праћена је свакодневно, детекцијом палпабилног тумора, а његова величина одређивана је морфометријски, коришћењем нониуса.

### 3.5. Анализа метастатских колонија

Мишеви који су примили STZ односно СВ су жртвовани 28. дана након апликације 4T1 туморских ћелија, након чега су им плућа и јетре изоловане за патохистолошку анализу.

**Фиксација и дехидратација:** Непосредно након изолације, ткиво плућа и јетре је фиксирано у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени резови дебљине 5  $\mu\text{m}$ . Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником (H&E бојење).

**Бојење хематоксилином и еозином (H&E):** Криостатски ткивни пресеци су обојени методом хематоксилин-еозин (364). Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на  $+56^{\circ}\text{C}$  у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута а потом су испрани дестилованом, а онда и текућом водом 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*).

### 3.6. Варијабле које се мере у студији

**Независне варијабле:** хипергликемија, параметри оксидативног стреса

**Зависне варијабле:** величина примарног тумора, маса примарног тумора, број и величина метастатских колона, параметри оксидативног стреса и стреса

ендоплазматског ретикулума, ћелијски састав слезине и субпопулација тумор-инфилтришућих леукоцита, фенотипске и функционалне карактеристике и цитотоксички капацитет спленоцита, NK ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита.

**Збуњујуће варијабле:** не постоје

### 3.7. Одређивање антиоксидативних ензима

Еритроцити изловани из крви мишева који су примили STZ односно СВ су коришћени за мерење каталазе (енгл. *Catalase*, CAT), супероксид дизмутазе (енгл. *Superoxid dismutase*, SOD) и глутатиона (енгл. *Glutathione*, GLU) спектрофотометријом. Изоловани еритроцити су испрани три пута са 0.9 mmol/l NaCl и хемолизатом који садржи приближно 50 g Hb/l. Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а. Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник пероксид апсорбује светлост. Тачна концентрација водоник пероксида одређује се на следећи начин: у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1 : 10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0.9 ml разблаженог пуфера и 0.1 ml разблаженог 30 % раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 : 100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, на 230 nm, 0.071, по формули:

$$C = \frac{\Delta A}{0.071}$$

Добијена концентрација затим се разблажује до 10 mM. Реакциона смеша се добија тако што се у кварцну кивету у којој се налази 50 µl пуфера додаје између 5 и 50 µl узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току три минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, изражена у µM, у минути.

Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A * R}{0.071 * \text{Low} * V}$$

при чему је  $\Delta A$  – промена апсорбанце у минути,  $R$  – разблажење,  $V$  – запремина узорка (ml),  $\text{Low}$  – количина протеина (mg/ml сонификата).

Одређивање активности SOD врши се адреналинском методом. Ова метода припада групи метода „негативног“ типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од  $\text{O}_2^{\bullet}$  (363). Присутна SOD уклања  $\text{O}_2^{\bullet}$  и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на таласној дужини 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације адренохрома. Брзина аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Процент инхибиције користи се као мера каталитичке активности ензима. Брзина аутооксидације адреналина у одсуству ензима узима се као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности. У 3.2 ml реакционе смеше коју чине: 3 ml карбонатног буфера, pH = 10.2 и 0.1 ml раствора адреналина, додаје се 0.01 ml раније припремљеног супернатанта. Аутооксидација адреналина прати се у току четири минута на таласној дужини 480 nm. Реакција је стабилна у температурном опсегу од 26 – 30<sup>0</sup> C. Упоредо се ради и контролна реакција. Процент инхибиције аутооксидације адреналина у присуству SOD из узорка, у односу на контролну реакцију аутооксидације адреналина користи се за израчунавање SOD активности. Количина SOD изражена је у јединицама SOD активности по граму Hb (јед/g Hb). Јединица SOD активности дефинисана је као запремина, односно количина протеина која узрокује 50 % инхибиције брзине аутооксидације адреналина у линеарном делу пораста апсорпције.

Израчунава се по следећој једначини:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) * R}{2V * Hb * \Delta K}$$

при чему је  $\Delta K$  - промена апсорпције контролне реакције у минути,  $\Delta A$  - промена апсорпције реакције са узорком у минути,  $V$  - запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml),  $Hb$  - количина хемоглобина (g/100ml лизата),  $R$  – разблажење.

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми одређује се спектрофотометријски, а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензоевом киселином (DTNB). GSH се екстрахује тако што се у 0.1 ml 0.1 % EDTA дода 0.4 ml плазме и 0.75 ml раствора за преципитацију (1.67 g метафосфорне киселине, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, допунити до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан три недеље на +4<sup>0</sup>C). Након доброг мешања, смеша се екстрахује 15 минута на леду а потом центрифугира 10 минута на 4000 грм. Мерење се врши у кварцним киветама запремине 1 ml. У епрувете пипетира се 300  $\mu$ l венског ефлуента, 750  $\mu$ l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 100  $\mu$ l DTNB (1 mg DTNB/ml 1 % натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода. Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у венском ефлуенту одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни раствор редукованог глутатиона концентрације 1.5 nmol/l. У четири епрувете се пипетира (уместо венског ефлуента) 10, 20, 30 и 40  $\mu$ l 1 mM раствора GSH, 300  $\mu$ l хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Тако се одреди концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Апсорбанца (A) се мери на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{max}=420nm$ . Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту по формули:

$$F = \frac{\Delta A}{nmol\ GSH/cuv} \qquad \frac{nmol\ GSH}{ml\ плазме} = \frac{\Delta A}{F}$$

### 3.8. Изолација леукоцита из слезине

Мишеви третирани STZ-ом и третирани СВ-ом су жртвовани цервикалном дислокацијом 28. дана након апликације STZ/СВ или 15. дана после апликације  $5 \times 10^4$  4Т1 туморских ћелија у млечну жлезду. Свим мишевима су изоловане слезине, након чега је поступак изолације спленоцита спроведен на  $+4^\circ\text{C}$ . Најпре је клипом шприца протиснута слезина кроз ћелијско сито (енгл. *Cell strainer*, BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50ml уз додавање 5ml медијума (RPMI-1640; PAA Laboratories GmbH са додатком 10% FBS-a). Ћелије су центрифугиране 5 минута на 350 G. Супернатант је одливен, а на ћелијски талог је додато 5ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Er Lysing buffer*) (4mg EDTA, 100mg  $\text{NaHCO}_3$ , 826mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , растворено у 100ml ddH<sub>2</sub>O), и инкубирано 5 минута на леду. Након истека инкубације, додато је 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом чиме је заустављено даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране, супернатант је одливен а талог ресуспендован у 8ml RPMI-1640 (10% FBS). Ћелије су пропуштене кроз ћелијско сито, како би се избегла потенцијална контаминација хистиоцитима слезине. Након изолације, приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Овако добијена суспензија појединачних спленоцита коришћена је у експериментима (за проточну цитометрију, тест цитотоксичности и *in vitro* експерименте).

### 3.9. Изолација ћелија из примарног тумора

Мишеви који су развили дијабетес су жртвовани цервикалном дислокацијом 15. дана након апликације  $5 \times 10^4$  4Т1 туморских ћелија у млечну жлезду. Петнаестог дана после апликације  $5 \times 10^4$  4Т1 туморских ћелија су жртвовани и мишеви који су третирани само туморским ћелијама. Свим мишевима су изоловани примарни тумори, након чега је измерена њихова маса. Маказама су тумори уситњени а након тога опрани 2-3 пута у петри шољи коришћењем PBS-a. Уситњени тумори су потом ресуспендовани у 5ml медијума за дигестију. Медијум за дигестију туморског ткива садржи 1mg/ml колагеназе тип I, 1mM EDTA у 10 ml RPMI коме је додато 2% FBS. Дигестија тумора се одвија у трајању од два сата на  $37^\circ\text{C}$  уз мешање на шејкеру. Након дигестије, ћелије су центрифугиране 5 минута на 300 G, а потом је супернатант одливен пипетом. На талог је додато 10 ml претходно загрејаног трипсина, након чега је уследила инкубација у трајању од 3 минута на  $37^\circ\text{C}$ . Потом су садржаји у епруветама центрифугирани 10

минута на 300 G, након чега је супернатант одливен пипетом. На талог је додат 2.5 ml претходно припремљене и загрејане DNA-зе (10µg/ml) након чега је уследила инкубација у трајању од 1 минута на 37°C. Након инкубације, у епрувете је додато 7 ml комплетног медијума и садржај је центрифугиран 10 минута на 300 G. Из епрувета је супернатант одливен пипетом, а потом је додато 5 ml комплетног медијума. Садржај је пропуштен кроз ћелијско сито, а потом и центрифугиран 10 минута на 300 G. Ћелије су ресуспендоване у 0,5 ml комплетног медијума. Приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Овако добијена суспензија појединачних тумор инфилтришућих леукоцита коришћена је у експериментима (за проточну цитометрију).

### **3.10. Анализа популација моноклеарних ћелија слезине и примарног тумора проточном цитометријом**

Пре апликације туморских ћелија и 15. дана прогресије тумора, проточном цитометријом идентификоване су субпопулације лимфоцита и акцесорских ћелија слезине и примарног тумора и одређени њихови процентуални односи. Детектоване су: NK ћелије, NKT ћелије, субпопулације Т лимфоцита, макрофаги, дендритске ћелије, мијелоидне супресорске ћелије. Уз то, испитиван је и функционални фенотип Т лимфоцита, NK ћелија, NKT ћелија, макрофага, дендритских ћелија, мијелоидних супресорских ћелија.

#### **3.10.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера**

У идентификацији мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулација моноклеарних ћелија слезине и примарног тумора коришћена су анти-мишија моноклонска антитела (Табела 1). На  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD Biosciences) додата је одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за антигене различитих субпопулација моноклеарних ћелија.



Табела 1. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији

НАЗИВ	КЛОН	ИЗОТИП	ПРОИЗВОЂАЧ
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 anti-mouse CD3e	145-2C11	IgG1 κ	BD Pharmingen
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 anti-mouse CD4	RM4-5	IgG2a κ	BD Pharmingen
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 anti-mouse CD8a	53-6.7	IgG2a κ	BD Pharmingen
PerCP anti-mouse CD49b	HMα2	IgG	Biolegend
PE anti-mouse IL-4	BVD4-1D11	IgG2b	BD Pharmingen
PE anti-mouse IL-10	JES5-16E3	IgG2b	BD Pharmingen
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 anti-mouse CD335 (NKp46)	29A1.4	IgG2a κ	BD Pharmingen
PerCP-Cy <sup>™</sup> 5.5 anti-mouse CD335 (NKp46)	29A1.4	IgG2a κ	BD Pharmingen
PerCP labeled anti-mouse CD11c	HL3	IgG1 λ	BD Pharmingen
PE anti-mouse CD107a	1D4B	IgG2a κ	BD Pharmingen
APC anti-mouse IFN-γ	XMG1.2	IgG2a, κ	eBioscience
APC anti-mouse CD86	GL1	IgG2a κ	BD Pharmingen
PE anti-mouse Granzyme B	NGZB	IgG2a, κ	eBioscience
APC anti-mouse TGF-β	860206	Rat IgG2A	R&D Systems
APC anti-mouse Perforin	eBioOMAK-D	IgG2a, κ	eBioscience
PE anti-mouse CD69	H1.2F3	IgG1 λ	BD Pharmingen
FITC anti-mouse Fas Ligand (CD178)	MFL3	Armenian hamster / IgG	eBioscience
FITC labeled anti-mouse CD11b	M1/70	IgG2b κ	eBioscience
PE anti-mouse KLRG1	2F1	IgG	eBioscience
FITC labeled anti-mouse CD69	H1.2F3	IgG	eBioscience
PE anti-mouse CD314 (NKG2D)	C7	IgG	eBioscience

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишићег тумора дојке

APC anti-mouse CD335 (NKp46)	29A1.4	IgG	eBioscience
APC anti-mouse CD45	30-F11	IgG2b κ	BD Pharmingen
APC anti-mouse FoxP3	FJK-16s	IgG2a κ	eBioscience
APC anti-mouse IL-5	TRFK5	IgG1 κ	BD Pharmingen
PerCP anti-mouse Ly-6C/G (Gr-1)	RB6-8C5	IgG2b κ	Invitrogen
PE anti-mouse I-E(k)MHC class II	14-4-4S	IgG2a κ	eBioscience
PE anti-mouse IL-17A	eBio17B7	IgG2a κ	eBioscience
PE anti-mouse IDO	2E2/IDO1	IgG1 κ	BioLegend
PE anti-mouse INOS	CXNFT	IgG2a κ	eBioscience
PE anti-mouse CD279	J43	IgG2 κ	BD Pharmingen
FITC Annexin V			BD Pharmingen
PerCP anti-mouse IL-4	11B11	IgG1 κ	Invitrogen
PE anti-mouse IL-13	eBioI3A	IgG1 κ	Invitrogen

Ћелије изоловане из ткива слезине и примарног тумора су инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 2).

Табела 2. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћене у проточној цитометрији

назив	клон	изотип	произвођач
Alexa Fluor® 488 Hamster Isotype Control	A19-3	IgG1 κ	BD Pharmingen
PE Hamster Isotype Control	B81-3	IgG2a κ	BD Pharmingen
Alexa Fluor® 488 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
Alexa Fluor® 647 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen

FITC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
APC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
FITC Rat Isotype Control	B39-4	IgG1 λ	BD Pharmingen

Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле коришћене су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији ћелија буду 1:100. Након краткотрајног “вортексовања”, узорци су инкубирани 30 минута у мраку на температури +4°C. По истеку инкубације, ћелије су опране додавањем 2ml хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*) и центрифугирањем 5 минута на 250g. Потом је супернатант одливен и талог ћелија ресуспендован у 250μl пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру *FACSCalibur (BD Biosciences)* помоћу *CELLQUEST* софтвера (BD). За све анализе ћелија коришћен је регион (енгл. *Gate*) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани коришћењем *FlowJo (Tree Star)* софтвера.

### 3.10.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина

Бојење интрацелуларних молекула и цитокина изведено је по *BD Cytotfix/Cytoperm<sup>TM</sup>* методи. У овом истраживању ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma Aldrich*) и јономицином (енгл. *Ionomycin; Sigma Aldrich*), који активирају протеин киназе C (енгл. *Protein kinase C, PKC*) и покрећу инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује експресију цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима (365). Инкубација у трајању од 4 до 6 часова је адекватна за продукцију већине цитокина. Дужа инкубација је удружена са цитотоксичким дејством поменутих активатора. Током *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgyStop<sup>TM</sup>* (садржи моненсин) и *BD GolgyPlug<sup>TM</sup>* (садржи брефелдин А). Блокирање интрацелуларног транспорта

поменути инхибиторима омогућава акумулацију већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, чиме се повећава могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Како моненсин и брефелдин А имају дозно и временски зависан цитотоксички ефекат, излагање ћелија овим агенсима мора бити ограничено, не дуже од 12 часова. Након истека времена предвиђеног за активацију, ћелије су центрифугиране 5 минута на 250 G и ресуспендоване у пуферу за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*). Најпре је урађено бојење мембранских маркера према унапред описаној процедури. После истека инкубације ћелије су опране у 2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 250 G. Ћелије су затим фиксиране и пермеабелизоване коришћењем 250  $\mu$ l раствора за фиксацију и пермеабелизацију (*Fixation/Permeabilisation solution, BD Biosciences*) у трајању од 20 минута на +4°C. Пре и после додавања раствора за фиксацију и пермеабелизацију, сви узорци су добро вортексовани. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (*Perm/WashTM, BD Biosciences*) 5 минута на 250 G. После одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана 30 минута на +4°C. Примарно конјугована анти-мишја антитела примењена су у финалном разблажењу 1:100. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (*Perm/WashTM, BD Biosciences*) 5 минута на 250 G. Након испирања у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (*Perm/WashTM, BD Biosciences*) 5 минута на 250 G, ћелије су ресуспендоване у 250  $\mu$ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*). Непосредно након процедуре бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur (BD Biosciences)*.

### 3.10.3. Квантитативно испитивање апоптозе

Апоптозу карактерише транслокација негативно наелектисаног трансмембранског фосфолипида, фосфатидил-серина, са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Иако је интегритет ћелијске мембране у раној фази апоптотичне смрти очуван већ тада фосфатидил-серин бива изложен на спољашњу страну ћелијске мембране. *Annexin V* је протеин који има способност везивања за калцијум, фосфолипиде и фосфатидил-серин. У касним фазама апоптозе и у некротичном типу ћелијске смрти нарушен је интегритет ћелијске мембране, што

омогућава молекулима као што је пропидијум јодид (*PI* енгл. *propidium iodide*) везивање за DNA присутну у ћелији. Због тога се може сматрати да су *Annexin V* (-); *PI* (-) ћелије живе, *Annexin V* (+); *PI* (-) ћелије су у раним фазама апоптозе, *Annexin V* (+); *PI* (+) су у касним фазама апоптозе а *Annexin V* (-); *PI* (+) некротичне ћелије.

### 3.11. Издвајање CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита негативном селекцијом помоћу магнетних куглица

За издвајање CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита из слезине је коришћен *CD8a<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit mouse*, према утврђеном протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*). Први корак у сепарацији CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита је изолација спленоцита који су најпре избројани а онда је узето 10<sup>7</sup> ћелија. Ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а потом је одливен супернатант и талог ћелија ресуспендован у 40 µl пуфера (PBS (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). У ћелијску суспензију је додато 10µl CD8a<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse који садржи различита антитела (анти- CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, MHC Class II, Ter-119 и TCRγ/δ. антитело) којима се уклањају одређене популације ћелија. Талог ћелија је добро промешан и инкубиран 5 минута на температури од 2-8°C. Затим је у талог додато 30 µL пуфера, 20 µL *Anti-Biotin MicroBeads*. Талог је добро промешан и инкубиран 10 мин у фрижидеру 2-8° C. Након инкубације талог је ресуспендован у 500 µl пуфера. LS колона, постављена у магнетно поље MidiMACS сепаратора (*Miltenyi Biotec*) је припремљена испирањем са 3 ml пуфера. Након инкубације од 15 минута на температури од 2-8°C, ћелијска суспензија је пропуштена кроз LS колону у магнетном пољу и на тај начин су прикупљени необележени CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити. Колона је потом испрана коришћењем 3 ml пуфера након чега су прикупљени необележени CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити. По завршеном прикупљању негативно селекованих CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита додато је још 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом а затим су ћелије центрифугиране 10 минута на 300 G. Затим је одливен супернатант, талог ћелија је ресуспендован у 500µl RPMI-1640 са 10% FBS-ом и процењена је њихова вијабилност. Свеже изоловани CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити чији је принос износио између 90% и 95% су коришћени као ефекторске ћелије у тесту цитотоксичности.

### 3.12. Издвајање NK ћелија негативном селекцијом помоћу магнетних куглица

NK ћелије су издвојене из суспензије моноклеарних ћелија магнетном сепарацијом (енгл. *Magnetic Cell Sorting*) коришћењем моноклонског анти-мишијег CD49b антитела (*Clone DX5, Miltenyi Biotec*) конјугованог са магнетним куглицама, према утврђеном протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*). Након изолације свеже суспензије моноклеарних ћелија слезине, најпре је узето  $5 \times 10^7$  ћелија које су центрифугиране 10 минута на 300 G а потом је одливен супернатант. Талог ћелија је ресуспендован у 90 $\mu$ l пуфера (PBS (pH=7.2), 0.5% BSA и 2mM EDTA) након чега је додато 10 $\mu$ l CD49b (DX5) *MicroBeads*-а. Затим су спленоцити инкубирани са антителом специфичним за NK ћелије које је конјуговано са магнетним куглицама у трајању 15 минута на леду. Потом, ћелије су опране у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута на 300 G. Супернатант је уклоњен пипетом и ћелије су ресуспендоване у 500 $\mu$ l пуфера. LS колона је затим постављена у магнетно поље сепаратора (*Miltenyi Biotec*) и припремљена испирањем са 3 ml пуфера. Следећи корак је био пропуштање ћелијске суспензије кроз LS колону у магнетном пољу. NK ћелије су издвојене тиме што су се помоћу анти-CD49b антитела конјуговано магнетним куглицама везале за зидове колоне. LS магнетна колона у је уклоњена са MACS сепаратора и постављена у епрувету. Како би се овакве ћелије уклониле из колоне најпре је додато 5 ml пуфера а потом је садржај потиснут пластичним клипом. По завршеном прикупљању позитивно селекованих NK ћелија додато је још 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом а затим су ћелије центрифугиране 10 минута на 300 G. Затим је одливен супернатант, талог ћелија је ресуспендован у 500 $\mu$ l RPMI-1640 са 10% FBS-ом и процењена је њихова вијабилност. Свеже изоловане NK ћелија чији је принос износио између 90% и 95% су коришћене као ефекторске ћелије у тесту цитотоксичности.

### 3.13. Тест цитотоксичности

За одређивање цитотоксичке активности спленоцита, NK ћелија и CD8<sup>+</sup> T лимфоцита изолованих из слезине експерименталних животиња коришћена је DP верзија *xCELLigence* система, која садржи 3 микротитар плоче са по 16 бунарчића (E16) са златним дном. 100  $\mu$ l комплетног медијума је сипано у сваки бунарчић, након чега је извршена калибрација постављањем *xCELLigence* система у инкубатор на 37° у присуству 5% CO<sub>2</sub>. Као циљне ћелије коришћене су ћелије туморске линије 4T1

( $1 \times 10^4$ /по бунарчићу). Суспензија таргет ћелија (4T1) је припремљена на следећи начин: туморске ћелије су одвајане са дна флашка краткотрајним деловањем трипсином [0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA раствореног у PBS-у. Ћелије су затим ресуспендоване у у 6 ml DMEM-а са додатком 10% FBS-а, како би се неутралисао трипсин и спречило оштећење ћелија, а потом су центрифугиране на 300 G 10 минута. Ћелије су додатно пране у PBS-у, без FBS-а. Вијабилност ћелија је одређена помоћу *trypan-blue*-а и коришћене су само ћелијске суспензије са вијабилношћу већом од 95%. Потом је припремљена суспензија ћелија ( $1 \times 10^4$  ћелија/ml комплетног медијума) тако да је у свако бунарче E16 плоче сипано по 100 $\mu$ l медијума у коме се налазило  $1 \times 10^4$  туморских ћелија. E16 плоче су постављене у *xCELLigence* систем, након чега су таргет ћелије 4T1 инкубиране на температури од 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub> у трајању 36h. Ефекторске ћелије које су изоловане на претходно описан начин (спленоцити, NK ћелије, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити) су кокултивисане са таргет ћелијама и то у односу спленоцити:4T1=20:1, NK ћелије:4T1=5:1, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити:4T1=5:1. Ефекторске ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму ( $4 \times 10^6$  ћелија/ml комплетног медијума), а затим су у одговарајуће бунарчиће сипане у волумену од 100 $\mu$ l по истеку 36-часовне инкубације таргет ћелија. E16 плоче су постављене у *xCELLigence* систем којим је мерен ћелијски индекс на 15 минута током 24 сата (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Ћелијски индекс се дефинише као разлика у импеданци бунара који садржи ћелије и импеданце бунара са медијумом и репрезентује биолошки статус анализираних ћелија укључујући и број ћелија. Подаци су анализирани коришћењем програма *RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences)*.

### 3.14. Деплеција NK ћелија

За *in vivo* деплецију NK ћелија, мишевима је интраперитонеално апликовано 20 $\mu$ g анти-*asialo* GM1 моноклонских антитела (Waco. Bioproducts), дан пре и петог дана након инокулације туморских ћелија. Ефикасност деплеције потврђена је проточном цитометријом. Из једног миша изоловани су спленоцити и обојени анти мишјим NK моноклонским антителом (APC *Anti-Mouse* Cd49b, Rat IgG; Clone 29A1.4; eBioscience). Ефекат деплеције био је >95%.

### 3.15. Мерење серумске концентрације IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$ и IL-13

Двадесетосмог дана експеримента, након жртвовања животиња узета им је крв из трбушне аорте, инсулинским системом (шприц и игла G21), и центрифугирана 10 минута на 300 G. Затим је серум за сваког појединачног миша издвојен и остављен на -20°C до извођења анализе.

Концентрације цитокина (IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$  и IL-13) у серуму одређиване су комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишије цитокине (*Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IFN- $\gamma$  DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-1 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-12 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-17 DuoSet ELISA Development kit; mouse TNF- $\alpha$  /TNFSF1A DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-13 DuoSet ELISA Development kit; R&D Systems, USA*).

Према упутству произвођача, стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 2000pg/ml за TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-10, IL-12, IL-13, и 1000pg/ml за IL-17, IL-1 $\beta$ . У циљу добијања стандардне криве и одређивања једначине праве према којој ће бити прерачунате концентрације мерених цитокина, од припремљених штокова стандарда су направљена серијска двоструко опадајућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *Reagent Diluent* (PBS са 1%-тним BSA)). 100 $\mu$ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. *Microtiter Plate- MTP*) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене преко ноћи на собној температури. Ујутру су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*) у аутоматској машини за испирање МТП-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300 $\mu$ l и МТП су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у МТП, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања МТП, у све бунарчиће је додато 100 $\mu$ l радне концентрације детекционог антитела (енгл. *Detection Antibody*), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране, а у бунарчиће сипано 100 $\mu$ l радне



концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем МТР-а. У бунарчиће је сипано 100 $\mu$ l раствора субстрата (енгл. *Substrate Solution: Color reagent A + Color reagent B, 1:1*). Плоче су остављене двадесет минута касније, заклоњене од дневне светлости. Након тога додато је 50 $\mu$ l стоп раствора (енгл. *Stop Solution: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*) и апсорбанца је мерена одмах у сваком бунарчету коришћењем *Microplate reader*-а (*Zenyth, Anthos, UK*) на таласној дужини 450nm. Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

### **3.16. Култивација спленоцита у дијабетичном и хипергликемичном серуму**

Спленоцити су изоловани из слезине здравог миша на претходно описан начин. Након изолације, приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Из дијабетичних и здравих мишева је сакупљена крв пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (20 минута на 400 G). Измерена је концентрација глукозе у серуму изолованом из дијабетичних и здравих мишева. Потом је у сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара стављено 2 милиона спленоцита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*) до волумена 0,9 ml. Након тога је у бунаре додато 100 $\mu$ l серума и то тако што је у првих седам бунара додат серум изолован из дијабетичних мишева, у наредних седам бунара је додат серум изолован из здравог миша коме је додата глукоза (тако да је концентрација глукозе у дијабетичном серуму и серуму здравог миша коме је додата глукоза изједначена), док је трећој групи додат само серум изолован из здравих мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>, ћелије су центрифугиране, потом су „обојене“ примарно конјугованим моноклонским антителима и анализирани проточном цитометријом.

### 3.17. Инхибиција водоник пероксида

У циљу испитивања утицаја појачаног оксидативног стреса, који доминира у дијабетес мелитусу, на функционални фенотип НК ћелија, коришћен је инхибитор водоник-пероксида, пег-каталаза (*Sigma- Aldrich*). У сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено 2 милиона спленоцита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*). Петнаест минута пре додатка серума дијабетичног миша, спленоцити су инкубирани са 2000 U/ml пег-каталазе који конвертује  $H_2O_2$  у  $H_2O$  и  $O_2$ . Након тога је у бунаре додато 100 $\mu$ l серума изолованог из дијабетичних мишева. Контролну групу су сачињавали спленоцити инкубирани само у серуму дијабетичних мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5%  $CO_2$ , ћелије су центрифугиране, потом су „обојене“ примарно конјугованим моноклонским антителима и анализирани проточном цитометријом.

### 3.18. Инхибиција индоламин-2, 3 диоксигеназе

У експериментима у којима је испитивано да ли је IDO један од медијатора који супримира НК ћелије, коришћен је фармаколошки инхибитор IDO-а, 1-метил DL триптофан (1-MT, 860646, *Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*). 1-MT је смеша два стереоизомера, *levo*-1-метил триптофана, који компетитивно инхибира IDO 1 и *dextro*-1-метил триптофана који компетитивно инхибира IDO2. 1-MT је најпре растворен у 0.1 N NaOH чиме је направљен 1 mM шток. pH је коригована применом хлороводоничне киселине до 7,5.

У сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено је 2 милиона спленоцита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*). Након тога је у бунаре додато 100 $\mu$ l серума и то тако што је у првих седам бунара додат серум изолован из дијабетичних мишева коме је додат 1 mM 1-MT, другој групи додат је само серум изолован из дијабетичних мишева, док је трећој групи додат серум изолован из контролних здравих мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5%  $CO_2$ , ћелије су центрифугиране, потом су „обојене“ примарно конјугованим моноклонским антителима и анализирани проточном цитометријом.

### 3.19. Инхибиција индуцибилне азот монооксид синтазе

У експериментима у којима је испитивано да ли је iNOS један од медијатора који супримирају NK ћелије, коришћен је фармаколошки инхибитор L-N<sup>G</sup>-монометил аргинин цитрат (енгл. *L-N<sup>G</sup>-monomethyl Arginine citrate*, L-NMMA). L-NMMA је неселективни инхибитор ензима iNOS. L-NMMA (*Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*) је растворен у 1ml дестиловане воде до финалне концентрације 5mg/ml. У сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено је по 2 милиона спленоцита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma-Aldrich*). Након тога је у бунаре додато 100µl серума и то тако што је првој групи додат серум изолован из дијабетичних мишева коме је додат 1 mM L-NMMA, другој групи додат само серум изолован из изолован из дијабетичних мишева, док је трећој групи додат серум изолован из здравих мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>, ћелије су центрифугиране, потом су „обојене“ примарно конјугованим моноклонским антителима и анализирани проточном цитометријом.

### 3.20. Полимеризована ланчана реакција (PCR)

#### 3.20.1. Изолација RNA из ткива слезине миша

За изолацију укупне рибонуклеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid*.) из ткива јетре коришћен је тризол реагенс, који садржи раствор фенола и гуанидин изотиоцианата. Након изолације, део ткива слезине миша тежине приближно 100 mg је механички хомогенизован у 1 ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA*) коришћењем ручног хомогенизатора. Хомогенат је пребачен у епрувете величине 1,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубиран 5 минута на собној температури, а онда центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. На супернатант је додато 100 µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane*, ВСР, *Sigma Aldrich*), узорци су промешани, инкубирани 15 минута на собној температури, а затим центрифугирани 20 минута на 12000 rpm на +4°C. Након центрифугирања уочавају се раздвојена три слоја, а RNA је изолована из горњег провидног слоја. RNA је пребачена у нове епрувете у које је додато 500 µl расхлађеног изопропил алкохола да би се извршила преципитација RNA. Након што су промешани, узорци су инкубирани 15 минута на собној температури, а затим центрифугирани 8

минута на 12000 rpm на +4°C. Талог из епрувета је опран два пута са по 1 ml расхлађеног 70% етил алкохола и потом сушен 2 до 5 минута на собној температури. Осушени талог је разблажен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water, Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност RNA одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280 nm коришћењем апарата *Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)*.

### 3.20.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA

Реверзна транскрипција је процес у коме се једноланчана RNA преписује у комплементарну DNA (енгл. *Complementary DNA*). Процес реверзне транскрипције изведен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)*, према упутству произвођача. Транскрипција је изведена по следећој процедури: 10 µl узорка који садржи 2 µg укупне RNA изоловане из слезине инкубиран је са 10 µl главне мешавине (енгл. *Master mix*). *Master mix* се састоји из 2 µl пуфера (*RT Buffer*), 0,8 µl *dNTP Mix*-а, 2 µl хексамера (*Random Hexamer Primer*), 1 µl реверзне транскриптазе (*Multi Scribe™ Reverse Transcriptase*) и 3,2 µl воде која не садржи нуклеазе (*Nuclease-free water*). На растворени узорак RNA додат је *Master mix*, садржај је промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C. Реакција је заустављена грејањем 5 минута на 85°C, а узорци су затим охлађени на +4°C (*Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Добијена комплементарна DNA коришћена је за квантификацију експресије гена. Цео процес изолације RNA и њеног превођења у комплементарну DNA изведени су на леду, уколико у протоколу није другачије наведено.

### 3.20.3. Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR*) мерена је експресија жељених гена. Реакција qRT-PCR је изведена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) коришћењем микротитар плоча са 96 места (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Реакциона смеша је имала волумен од 20 µl по комори, а садржала је: 2 µl узорка комеплементарне DNA, 10 µl *Master mix (Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems)*, 2 µl смеше парова прајмера за

жељени ген („*forward*“ и „*reverse*“) као и 6  $\mu$ l воде која не садржи нуклеазе. Затим су плоче прелепљене оптичком адхезивном фолијом (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), центрифугиране 1 минут на 3000 rpm и смештене у qRT-PCR апарат (*Mastercycler® ep realplex*). Реакције qRT-PCR је изведена на основу температурне шеме: 4 минута на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Да би се одредила специфичност PCR продукта подешени су услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. Прајмери који су коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у табели (Табела 3).

**Табела 3: Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу**

	Forward	Reverse
<b>DAP10</b>	CCC AGG CTA CCT CCT GTT C	CTA CAA TTA GGA GTG ACA TGA CCG
<b>EDEM</b>	CTACCTGCGAAGAGGCCG	GTTCATGAGCTGCCCACTGA
<b>ATF4</b>	GGGTTCTGTCTTCCACTCCA	AAGCAGCAGAGTCAGGCTTTC
<b>CHOP</b>	CCACCACACCTGAAAGCAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<b>BiP</b>	TTCAGCCAATTATCAGCAAACCTC T	TTTTCTGATGTATCCTCTTCACCA GT
<b>GRP94</b>	AAGAATGAAGGAAAAACAGGAC AAAA	CAAATGGAGAAGATTCCGCC

### 3.21. Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је на основу студије Јовановић И и сарадника. из 2011. године. На основу учесталости појаве метастаза у плућима код WT мишева која је била 86% и учесталости код ST2-/- која је износила 25%, потребна величина узорка за ниво значајности  $\alpha=0,05$  и статистичку моћ теста  $1-\beta$  од 80% израчуната је потребна величина узорка од 20 експерименталних животиња. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student*-ов t тест за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе испитаника, са снагом студије  $\geq 80\%$ . За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 20.

### 3.22. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма IBM SPSS Statistics 20. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney U* тест. Резултати експеримента су изражени као вредност  $\pm$  стандардна грешка (енгл. *Standard error/Mean*, SEM). Статистички значајном разликом сматране су добијене вредности  $p < 0.05$ . *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикана и табела.

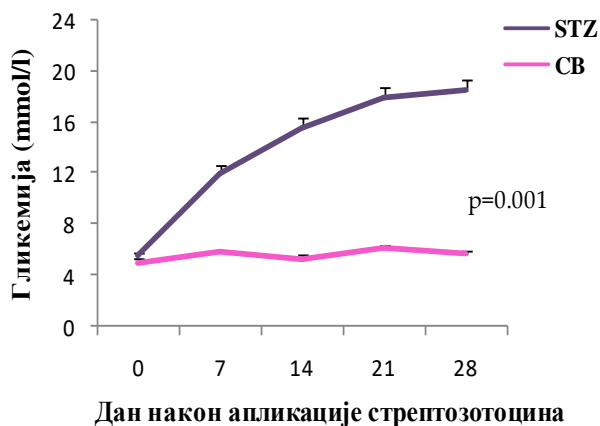
## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Ефекат стрептозотоцина на параметре гликорегулације

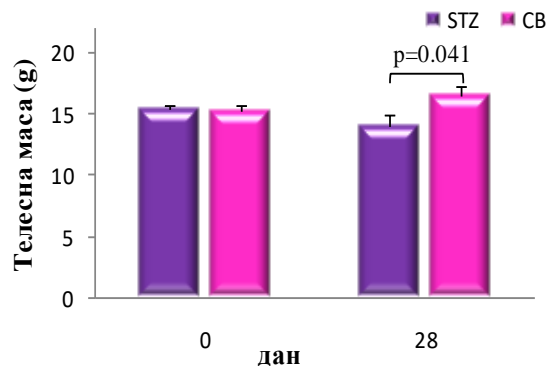
Једна сублетална доза стрептозотоцина (170mg/kg растворено у 100μl цитратног пуфера) је апликована интраперитонеално експерименталној групи BALB/с мишева, док је контролној групи BALB/с мишева апликован цитратни пуфер (100μl). Током трајања експеримента, мерена је концентрација глукозе у крви и телесна маса недељно, након четворочасовног гладовања.

Мишеви који су примили једну сублеталну дозу стрептозотоцина су имали значајно повећање вредности гликемије у односу на контролну групу мишева која је примила само цитратни пуфер ( $p=0.001$ ; Фигура 1а). Након 4 недеље, мишеви којима је дат стрептозотин су имали значајно мању телесну масу у поређењу са контролном групом мишева ( $p=0.041$ ; Фигура 1б).

а

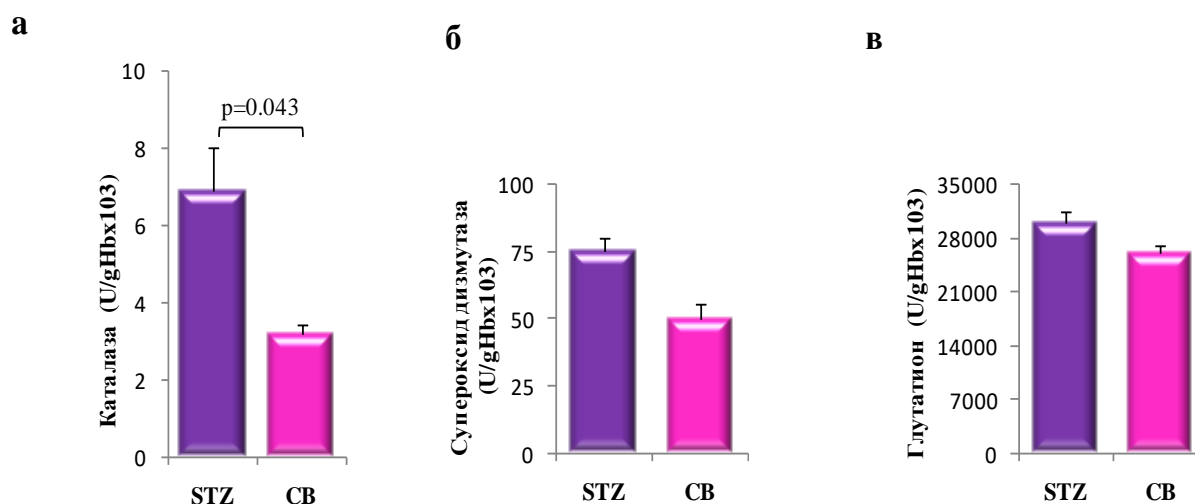


б



**Фигура 1: Повећан ниво гликемије наше код мишева који су примили стрептозотин.** Гликемија наше мерена је после четворочасовног гладовања из пуне крви добијене пункцијом репне вене, сваке недеље трајања експеримента (а). Телесна маса мерена је нултог и двадесетосмог дана експеримента (б). Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  SEM из 3 посебна експеримента (7 мишева по групи). Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

Мишеви третирани стрептозотоцином имали су значајно веће вредности антиоксиданса каталазе у еритроцитима у поређењу са контролним мишевима ( $p=0.043$ ; Фигура 2а). Такође, концентрације антиоксиданаса супероксид дизмутазе и глутатиона су биле повећане код мишева којима је дат стрептозотцин у односу на мишеве третиране цитраним пуфером, али ове разлике нису досегле статистичку значајност ( $p>0.05$ ; Фигуре 2б, 2в).



**Фигура 2. Повећана концентрација антиоксидативних молекула код мишева третираних стрептозотоцином.** Антиоксиданси, каталаза (а), супероксид дизмутаза (б) и глутатион (в) су мерени у еритроцитима крви мишева третираних стрептозотоцином односно цитратним пуфером. Постоји статистички значајна разлика у концентрацији каталазе између мишева који су третирани стрептозототицином и мишева који су примили цитратни пуфер. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацији супероксид дизмутазе и глутатиона између група. Приказане су аритметичке средине  $\pm$  SEM из два посебна експеримента (7 мишева по групи). Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

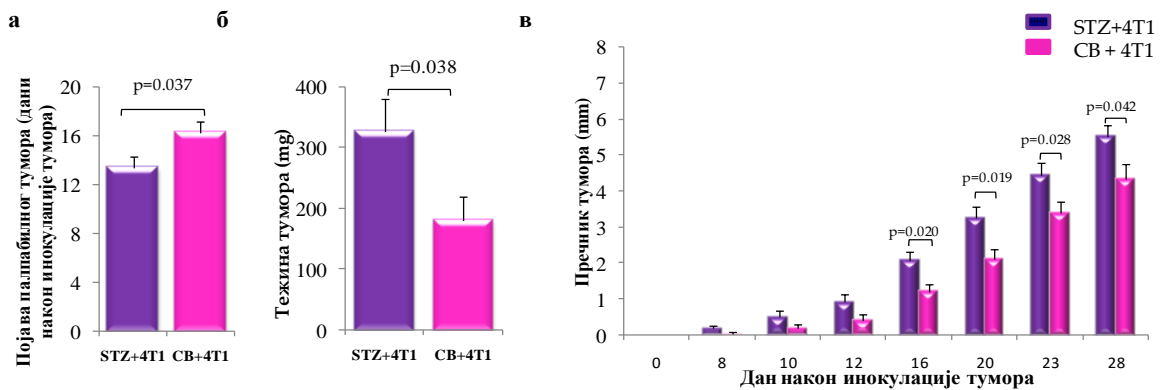
#### 4.2. Дијабетес мелитус убрзава појаву и раст примарног тумора дојке

Телије из културе 4Т1 тумора ( $5 \times 10^4$ ) су убризгане у четврту млечну жлезду BALB/с мишева 28. дана након апликације стрептозотоцина односно цитратног пуфера. Појава тумора је свакодневно регистрована палпацијом. Након појаве палпабилног тумора мерен је његов пречник док је тежина примарног тумора измерена 36-ог дана



експеримента, односно након жртвовања животиња.

Мишеви третирани стрептозотоцином су раније развили палпабилни тумор у поређењу са контролном групом мишева третираном цитратним пуфером ( $p=0.037$ ; Фигура 3а). Током периода од 28 дана, код дијабетичних мишева забележен је бржи раст тумора. Значајна разлика у пречнику палпабилног тумора утврђена је 16. дана од инокулације ( $p=0.020$ ; Фигура 3в). Такође, средња вредност масе примарног тумора, након екстирпације, је била значајно већа у групи мишева третираних стрептозотоцином у поређењу са групом мишева третираних цитратним пуфером ( $p=0.038$ ; Фигура 3б). Тридесетшестог дана експеримента сви мишеви из експерименталне и контролне групе су имали детектабилне метастазе у плућима (резултат није графички приказан).



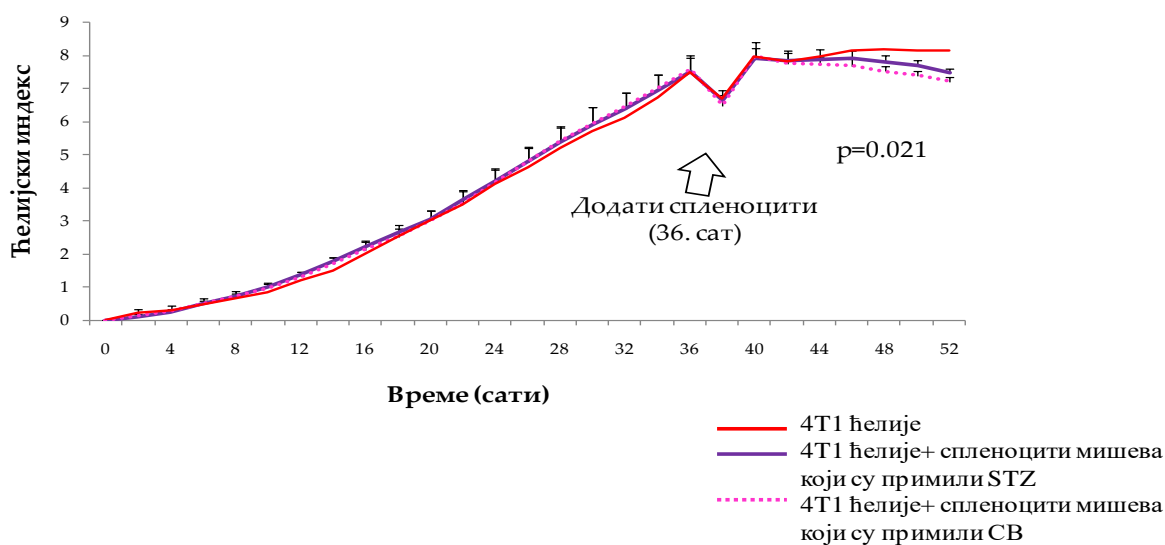
**Фигура 3. Убрзан раст 4Т1 тумора дојке код мишева третираних стрептозотоцином.** BALB/c мишевима убризгано је  $5 \times 10^4$  4Т1 туморских ћелија. Појава палпабилног тумора значајно је убрзана код мишева који су третирани STZ-ом (а). Маса примарних тумора знатно је већа код мишева који су примили STZ (б). Средња вредност пречника примарног тумора код мишева који су примили STZ је статистички значајно већа него код мишева који су третирани CB, двадесетог дана од инокулације тумора (в). Резултати су приказани као аритметичке средине  $\pm$  SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student's T* тестом.

### 4.3. Смањена цитотоксичност NK ћелија изолованих из слезине мишева третираних STZ-ом

Након налаза убрзане појаве и раста примарног тумора код мишева који су примили STZ, у даљем току истраживања испитана је цитотоксичност спленоцита, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и NK ћелија мишева који су примили STZ односно CB, према 4Т1

туморским ћелијама.

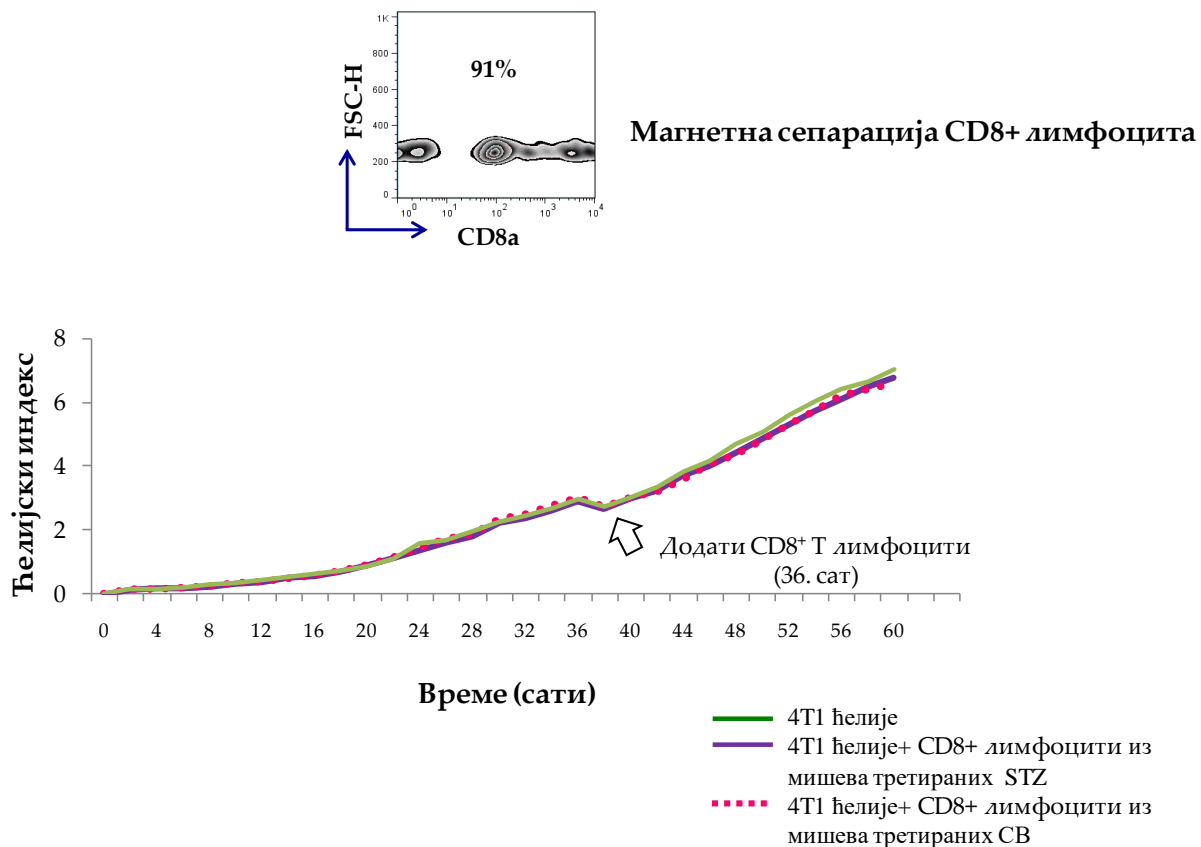
Двадесетосмог дана након апликације STZ-а односно СВ-а, мишеви су жртвовани и изоловане су слезине у циљу анализе цитотоксичности спленоцита према 4Т1 туморској линији. На фигури 4 се види да су 4Т1 ћелије култивисане са спленоцитима изолованим из мишева који су третирани STZ-ом имале значајно већи ћелијски индекс, што указује на значајно мању цитотоксичност према 4Т1 ћелијској линији у поређењу са спленоцитима мишева који су примили само СВ ( $p=0.021$ ; Фигура 4).



**Фигура 4. Интраперитонална апликација STZ смањује цитотоксичност спленоцита према 4Т1 туморским ћелијама.** Цитотоксичка активност спленоцита испитивана је праћењем ћелијског индекса 4Т1 таргет ћелија на *xCELLigence* систему у трајању од 52 сата, однос таргет:ефектор = 1:20. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Цитотоксичност спленоцита изолованих из мишева који су примили STZ је значајно мања у поређењу са спленоцитима изолованих из мишева који су примили само СВ. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност  $\pm$  SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређена је *Student's T* тестом.

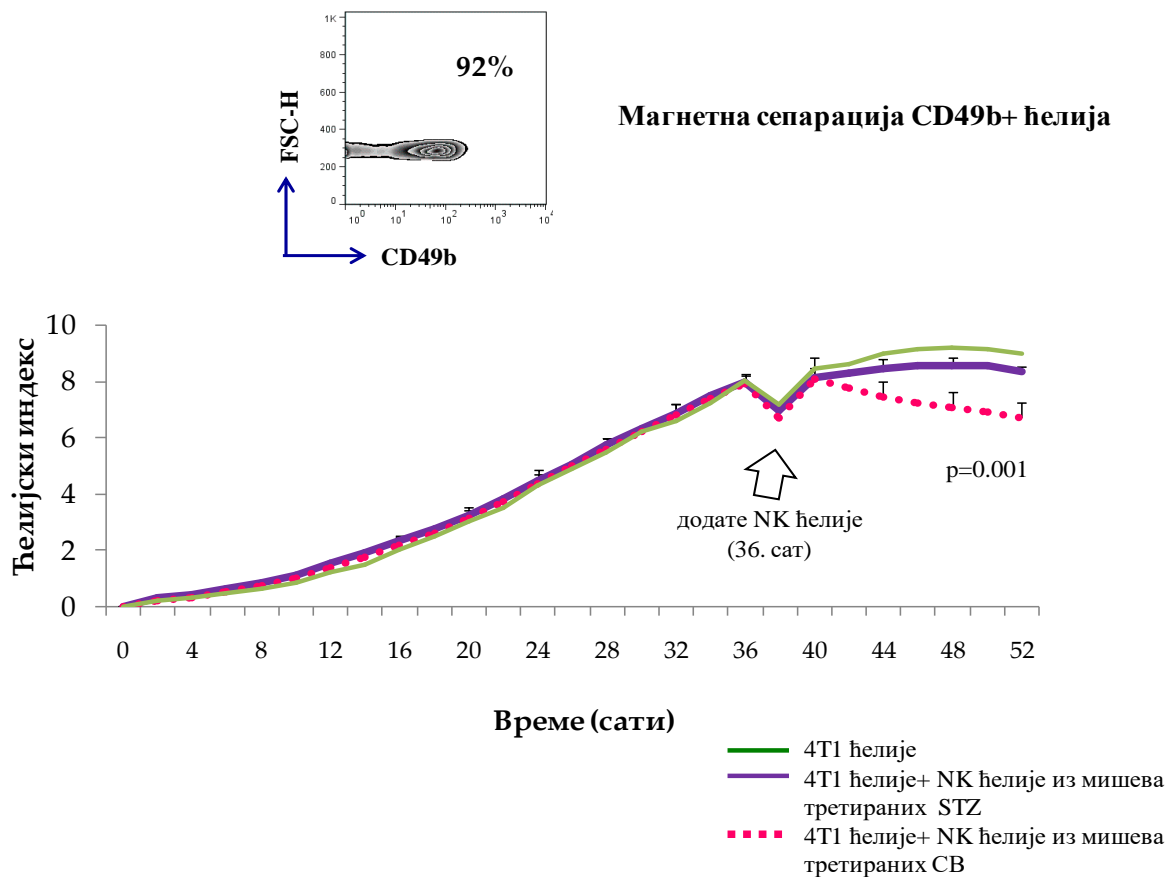
У циљу прецизније потврде које су то ћелије одговорне за смањену цитотоксичност према 4Т1 туморској линији, у наредном експерименту смо испитали цитотоксичност  $CD8^+$  Т лимфоцита. Мишевима су 28. дана након апликације STZ-а и односно СВ-а, убризгане 4Т1 туморске ћелије. Петнаест дана након индукције тумора, животиње су жртвоване и потом су изоловани  $CD8^+$  Т лимфоцити магнетном сепарацијом из слезина мишева третираних STZ-ом односно СВ-ом који су развили примарни тумор.

Експеримент је показао да нема разлике у ћелијском индексу 4Т1 ћелија између група па самим тим ни у цитотоксичности CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у групи мишева који су третирани STZ-ом и 4Т1 туморским ћелијама у односу на мишеве који су примили СВ и туморске 4Т1 ћелије (p>0.05; Фигура 5).



**Фигура 5. Интраперитонална апликација STZ не утиче на цитотоксичност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита према 4Т1 туморским ћелијама. CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити су изоловани магнетном сепарацијом из слезина мишева третираних STZ-ом односно СВ-ом који су развили примарни тумор (процент чистоће 91%).** Цитотоксичка активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита испитивана је праћењем ћелијског индекса 4Т1 таргет ћелија на *xCELLigence* систему у трајању од 60 сати, однос таргет:ефектор = 1:5. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Цитотоксичност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита изолованих из мишева који су примили STZ+4Т1 се не разликује у односу на CD8<sup>+</sup> Т лимфоците изоловане из мишева који су примили СВ+4Т1. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређена је *Student's T* тестом.

У даљем дефинисању ћелија одговорних за смањену цитотоксичност спленоцита у дијабетичних мишева, изоловали смо  $CD49b^+$  NK ћелије позитивном селекцијом на магнетним колонама из мишева третираних STZ-ом односно СВ-ом и испитали њихову цитотоксичност према 4T1 ћелијској линији. Ћелијски индекс 4T1 туморских ћелија култивисаних са NK ћелијама излованим из слезине мишева третираних STZ су имале значајно већи ћелијски индекс, што указује на значајно мању цитотоксичност NK ћелија према 4T1 ћелијама у односу на NK ћелије изловане из слезине мишева третираних СВ ( $p=0.001$ ; Фигура 6).

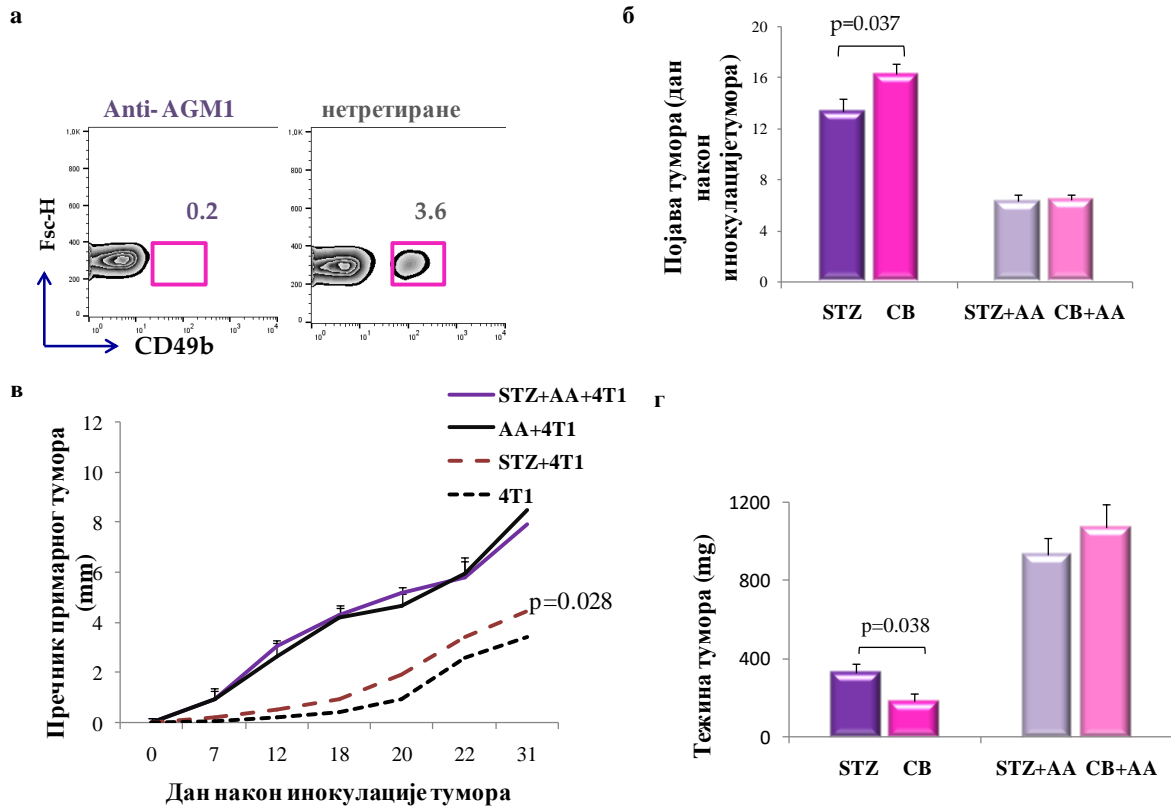


**Фигура 6. Интраперитонална апликација STZ смањује цитотоксичност NK ћелија према 4T1 туморским ћелијама.** NK ћелије су изоловане магнетном сепарацијом из слезина мишева третираних STZ-ом односно СВ-ом (процент чистоте 92%). Цитотоксичка активност NK ћелија испитивана је праћењем ћелијског индекса 4T1 таргет ћелија на *xCELLigence* систему у трајању од 52 сата, однос таргет : ефектор = 1:5. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Цитотоксичност NK ћелија изолованих из мишева који су примили STZ је значајно мања у односу на NK ћелија изоловане из мишева који су примили СВ. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност  $\pm$  SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређена је *Student's T* тестом.

#### 4.4. Деплеција NK ћелија убрзава појаву и раст примарног тумора и анулира убрзан раст тумора у дијабетичним мишевима

Да би се потврдио утицај NK ћелија у антитуморском имунском одговору на појаву и раст 4T1 карцинома дојке, уклонили смо популацију NK ћелија из мишева уз даљу индукцију дијабетес мелитуса и инокулацију тумора дојке. Мишеви су нултог дана експеримента примили STZ односно СВ. NK ћелије су деплетирани *in vivo* интраперитонеалном апликацијом анти-*asialo* GM1 антитела дан пре и 5 дана након апликације туморских 4T1 ћелија. Мишевима је 28. дана експеримента убризгано  $5 \times 10^4$  4T1 туморских ћелија и праћена је појава као и раст примарног тумора. Апликација анти-*asialo* GM1 антитела резултовала је значајном редукцијом NK ћелија у слезини, што је приказано на фигури 7а. Након уклањања NK ћелија *in vivo*, појава тумора је убрзана у обе експерименталне групе, а разлика у дијаметру и маси примарних тумора између STZ односно СВ третираних мишева је нестала (Фигуре 7б, 7в, 7г). Добијени резултати указују на важну улогу NK ћелија у анти-туморском имунском одговору на 4T1 карцином дојке.

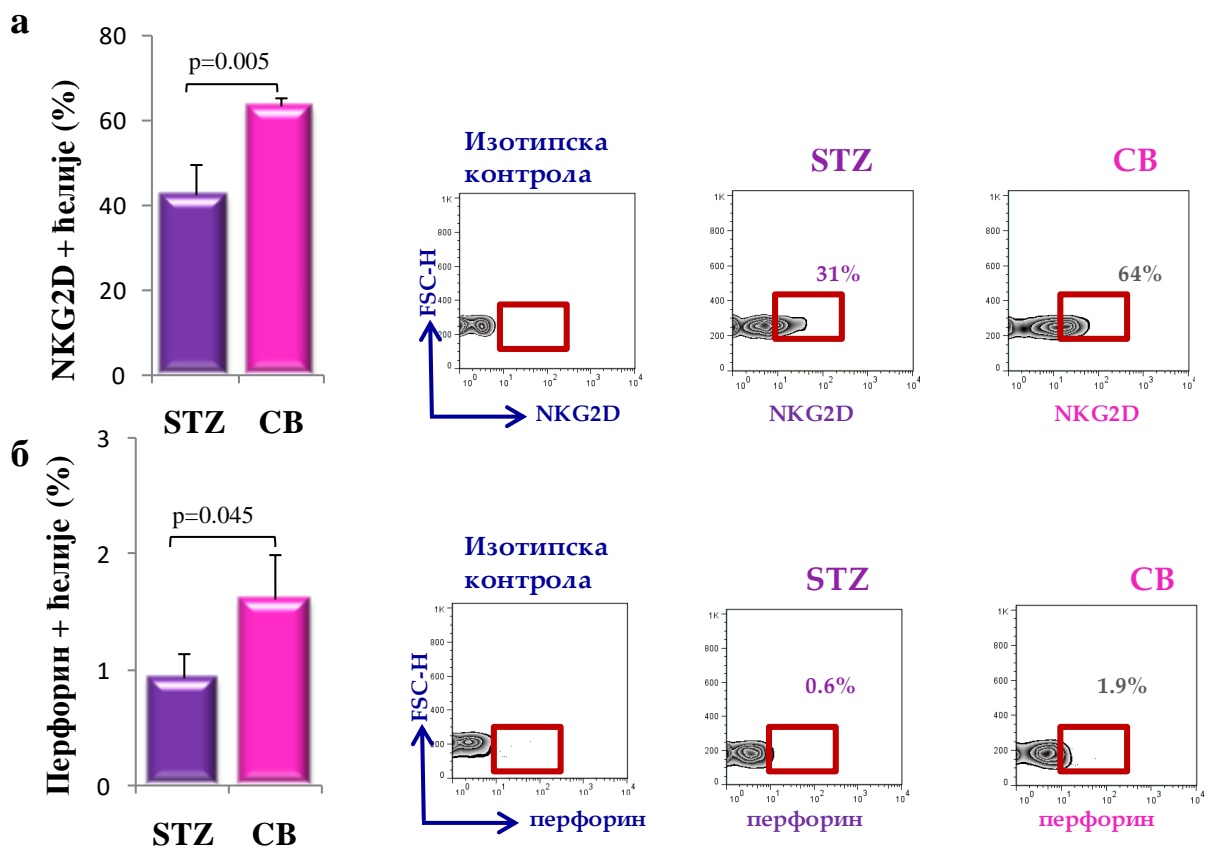
Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке



**Фигура 7.** Делепција НК ћелија анулира разлику у појави, пречнику и маси примарног тумора између дијабетичних и контролних мишева. Мишевима је индукован дијабетес а потом су инокулисани са  $5 \times 10^4$  4T1 туморских ћелија и праћена је појава и раст примарног тумора у мишевима са уклоњеним НК ћелијама. Репрезентативни цитометријски плотови показују проценат НК ћелија након *in vivo* давања анти-asialo GM1 mAb (а). Није детектована статистички значајна разлика у појави примарног тумора као ни у пречнику ни маси примарног тумора између дијабетичних и контролних мишева третираних анти-asialo GM1 mAb (б, в, г). Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је Student's *T* тестом.

#### 4.5. Дијабетес мелитус значајно смањује експресију NKG2D, перфорина, IFN- $\gamma$ , IL-17, а повећава експресију PD-1 молекула и IL-10 на спленичним NK ћелијама

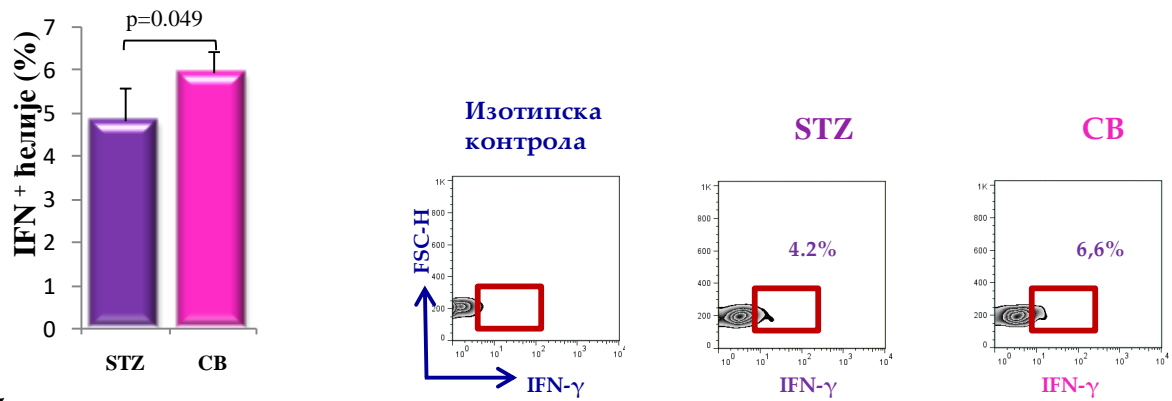
У циљу дефинисања могућих разлога смањене цитотоксичке активности NK ћелија, следећи корак у истраживању био је да се испита функционални фенотип NK ћелија у слезини мишева 28. дана након апликације STZ-а. У једноћелијској суспензији спленоцита, анализирана је експресија NKG2D, PD-1 (енгл. *Programmed cell death protein 1*), перфорина, гранзима, IFN- $\gamma$ , IL-17 и IL-10 у NK ћелијама. Резултати приказани на фигури 8а, јасно показују да дијабетично стање значајно смањује експресију NKG2D активационог рецептора на CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелијама у поређењу са NK ћелијама изолованим из слезина мишева третираних само СВ-ом ( $p=0.005$ ; Фигура 8а). Дијабетес мелитус је такође значајно смањио проценат перфорин<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија у слезини мишева ( $p=0.045$ ; Фигура 8б). Интрацелуларно бојење је показало да слезине дијабетичних мишева садрже значајно нижи проценат IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија ( $p=0.049$ ) као и IL-17<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија ( $p=0.032$ ) (Фигуре. 9а, 9б). Није уочена статистички значајна разлика у процентуалној заступљености PD-1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија ( $p>0.05$ ) као ни у процентуалној заступљености IL-10-продукујућих NK ћелија између дефинисаних група. Међутим анализа средње вредности интензитета флуоресценције (енгл. *Expression per cell*) је показала значајно већу експресију PD-1 молекула ( $p=0.017$ ; Фигура 10а) и IL-10 ( $p=0.049$ ; Фигура 10б) на NK ћелијама изолованим из слезина мишева са дијабетес мелитусом. Истовремено, није регистрована статистички значајна разлика у процентуалној заступљености гранзим-продукујућих NK ћелија ( $p>0.05$ ; Фигура 11а) као ни у односу IL-17/IL-10<sup>+</sup> ( $p>0.05$ ; Фигура 11б) IFN- $\gamma$ /IL-10<sup>+</sup> NK ћелија ( $p>0.05$ ; Фигура 11в) између дефинисаних група.



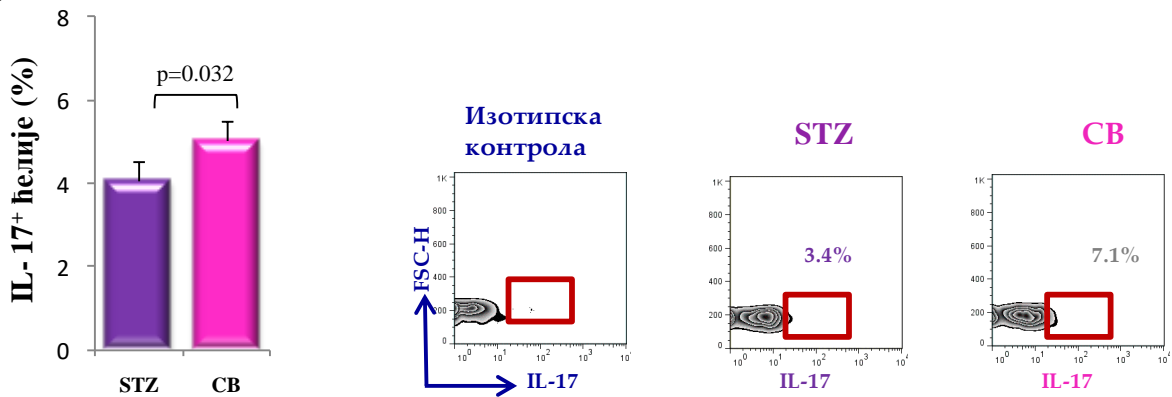
**Фигура 8.** Дијабетес мелитус смањује процентуалну заступљеност NKG2D<sup>+</sup> и перфорин<sup>+</sup> НК ћелија у слезини мишева. Мишеви који су примили једну дозу STZ, имају смањен проценат NKG2D<sup>+</sup> (а) и перфорин<sup>+</sup> (б) НК ћелија у поређењу са мишевима који су примили само CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student's T* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови NKG2D<sup>+</sup> и перфорин<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> НК ћелија за све експерименталне групе.



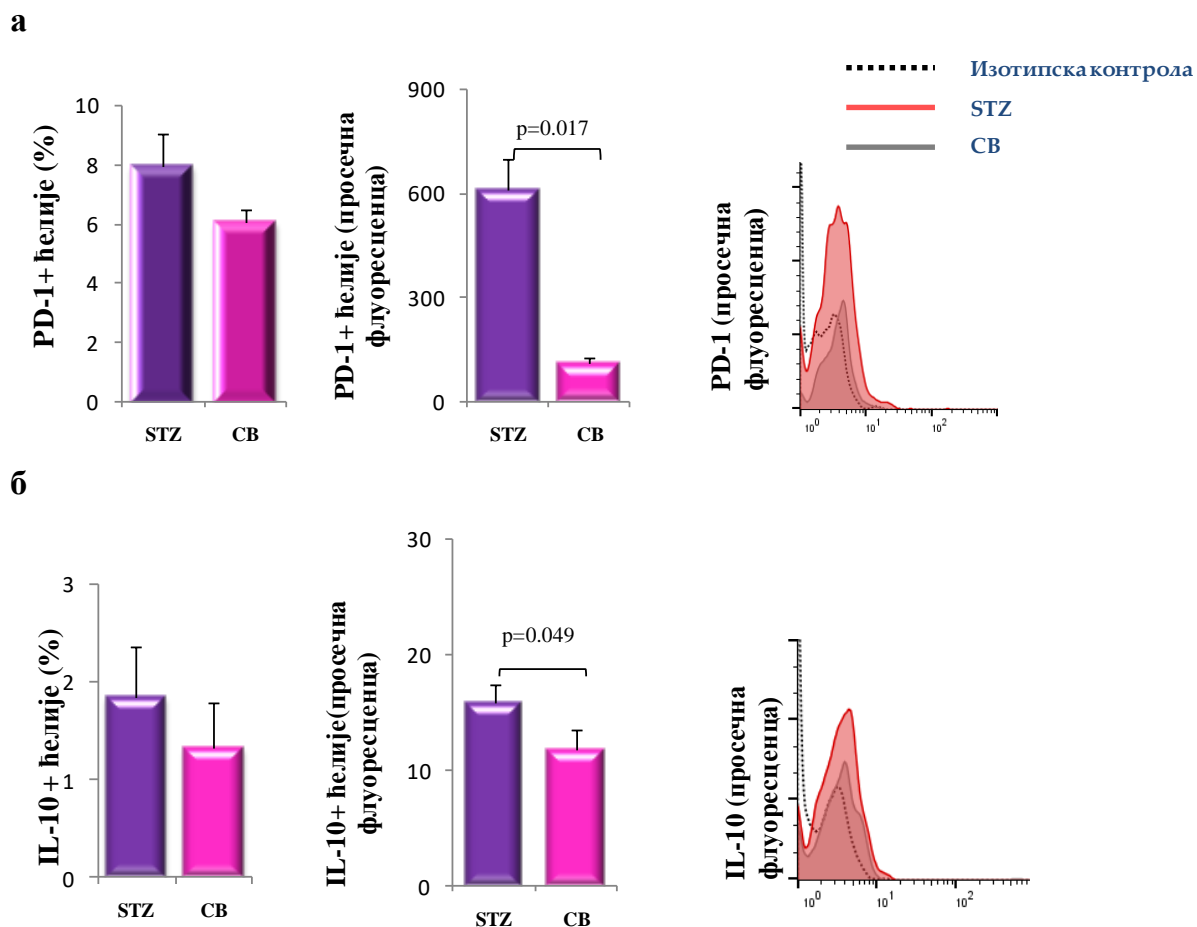
**а**



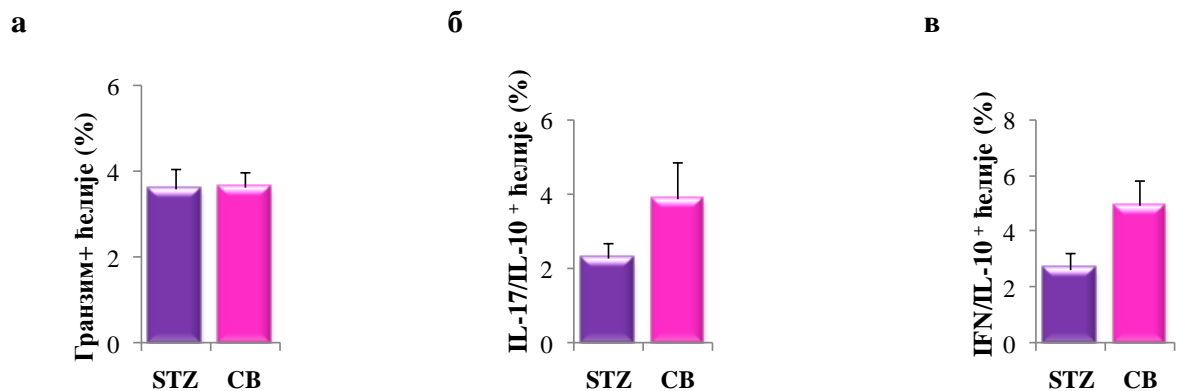
**б**



**Фигура 9.** Дијабетес мелитус смањује процентуалну заступљеност IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-17<sup>+</sup>NK ћелија у слезини мишева. Мишеви који су примили једну дозу STZ, имају смањен проценат IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK ћелија (а) и IL-17<sup>+</sup> NK ћелија (б) у поређењу са мишевима који су примили само CB. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија за све експерименталне групе.



**Фигура 10.** Дијабетес мелитус повећава експресију PD-1 молекула и IL-10 на NK ћелијама у слезини мишева. NK ћелије мишева са дијабетесом експримирају значајно више PD-1 молекула (а) и IL-10 (б) у поређењу са NK ћелијама изолованих из слезина мишева који су само примили CB. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-хистограми PD-1<sup>+</sup> и IL-10<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија за све експерименталне групе.

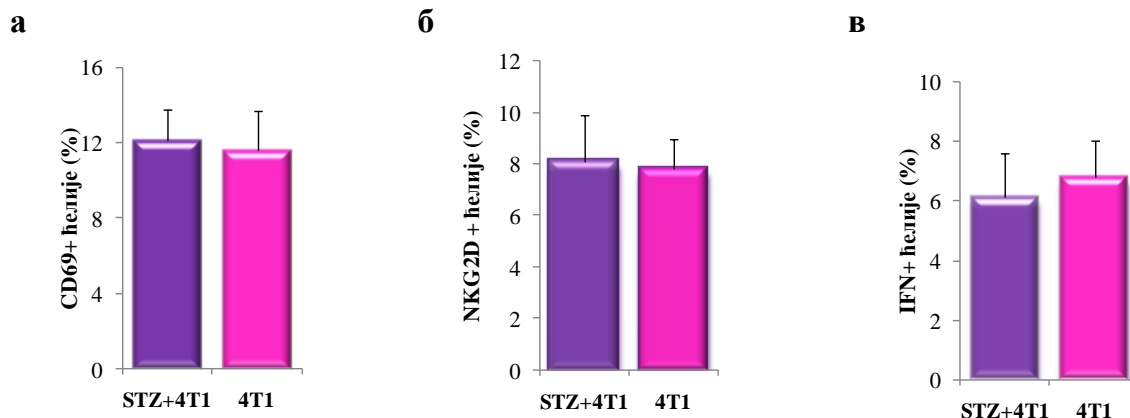


**Фигура 11.** Дијабетес мелитус не утиче значајно на проценат гранзим<sup>+</sup>NK ћелија, однос IL-17<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> NK ћелија ни однос IFN-γ/IL-10<sup>+</sup> NK ћелија у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености гранзим<sup>+</sup>NK ћелија (а), IL-17/IL-10<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија (б) ни IFN-γ/IL-10<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија (в) у слезинама мишева који су третирани STZ-ом у поређењу са NK ћелијама изолованих из слезина мишева који су само примили СВ. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

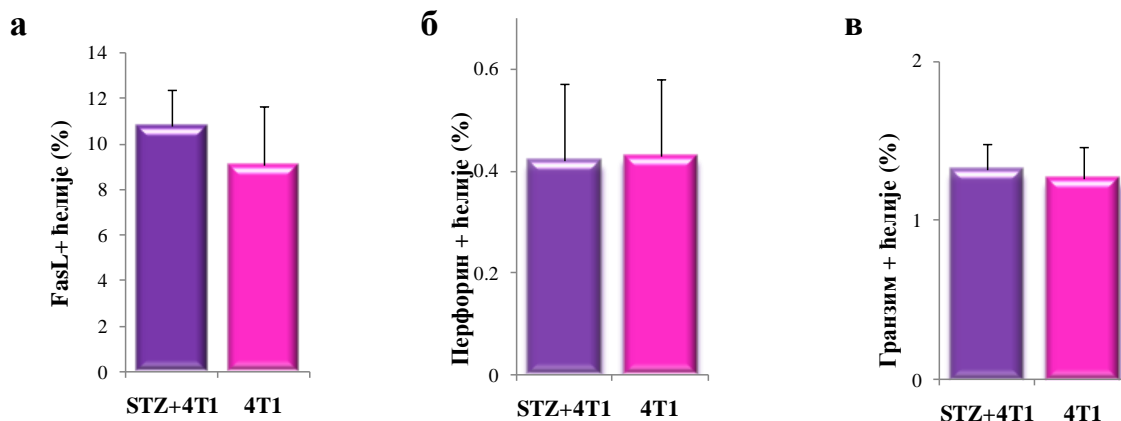
#### 4.6. Дијабетес мелитус не утиче значајно на фенотип CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у моделу 4Т1 тумора дојке

У циљу даљег испитивања утицаја дијабетес мелитуса на компоненте антитуморског имунског одговора, методом проточне цитометрије у слезини је анализиран фенотип CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита.

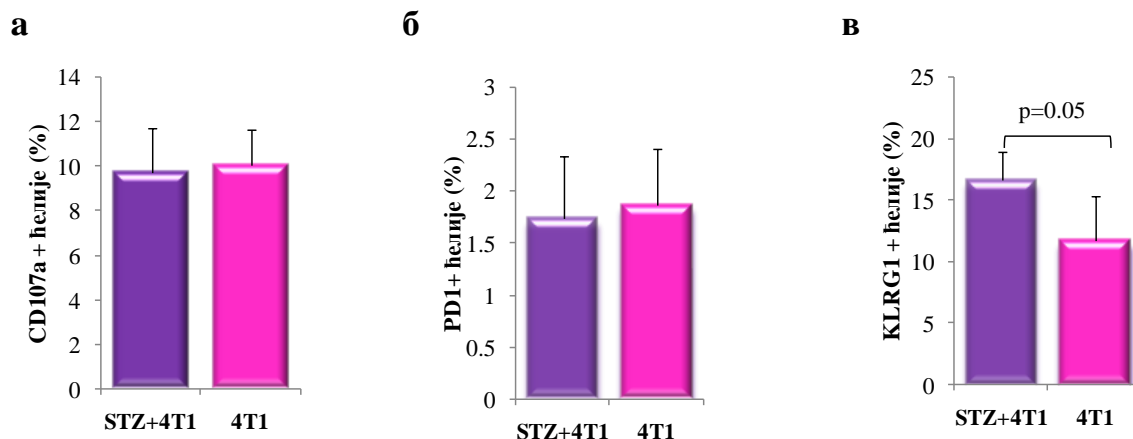
Интраперитонеална примена STZ није утицала на експресију CD69 ( $p > 0.05$ ; Фигура 12а), NKG2D ( $p > 0.05$ ; Фигура 12б) IFN-γ ( $p > 0.05$ ; Фигура 12в), FasL ( $p > 0.05$ ; Фигура 13а), перфорина ( $p > 0.05$ ; Фигура 13б), гранзима ( $p > 0.05$ ; Фигура 13в) на CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима у слезини мишева, 15 дана након индукције тумора. Такође, није уочена разлика у проценту CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који експримирају молекул CD107а ( $p > 0.05$ ; Фигура 14а) и PD-1 ( $p > 0.05$ ; Фигура 14б). Резултати приказани на фигури 14в показују да дијабетично стање значајно повећава експресију KLRG-1 на спленичним CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима у поређењу са CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима изолованим из слезина мишева третираних само СВ-ом, 15 дана након индукције тумора ( $p = 0.05$ ; Фигура 14в).



**Фигура 12.** Дијабетес мелитус не утиче на експресију CD69, NKG2D, IFN- $\gamma$  на CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености CD69<sup>+</sup> (а), NKG2D<sup>+</sup> (б), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (в) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита изолованих из слезина мишева који су примили само СВ. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.



**Фигура 13.** Дијабетес мелитус не утиче на експресију FasL, перфоруина и гранзима на CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености FasL<sup>+</sup> (а), перфорин<sup>+</sup> (б), гранзим<sup>+</sup> (в) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита изолованих из слезина мишева који су само примили СВ. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

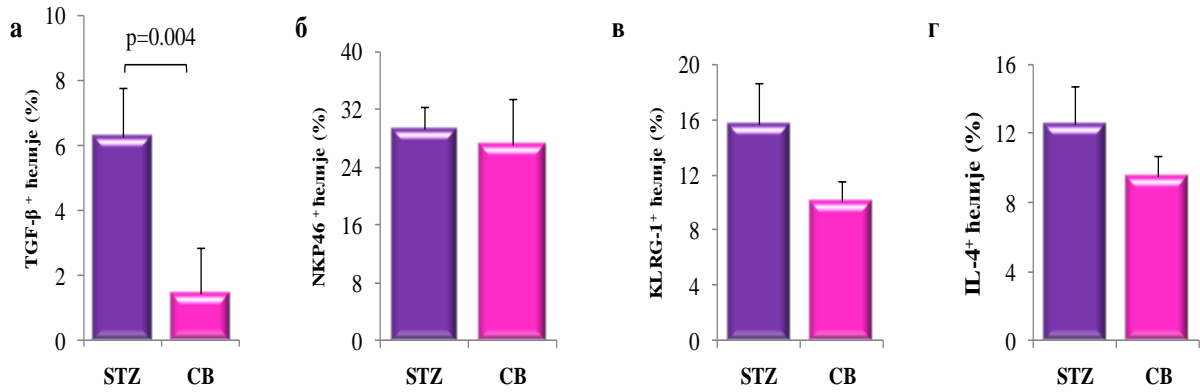


**Фигура 14.** Дијабетес мелитус повећава процентуалну заступљеност KLRG-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, а не утиче на проценат CD107a<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености CD107a<sup>+</sup> (а), PD-1<sup>+</sup> (б) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита изолованих из слезина мишева који су само примили СВ. Мишеви који су примили 45 STZ имају значајно већи проценат KLRG-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (в) у слезини у односу на мишеве који су примили само СВ. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

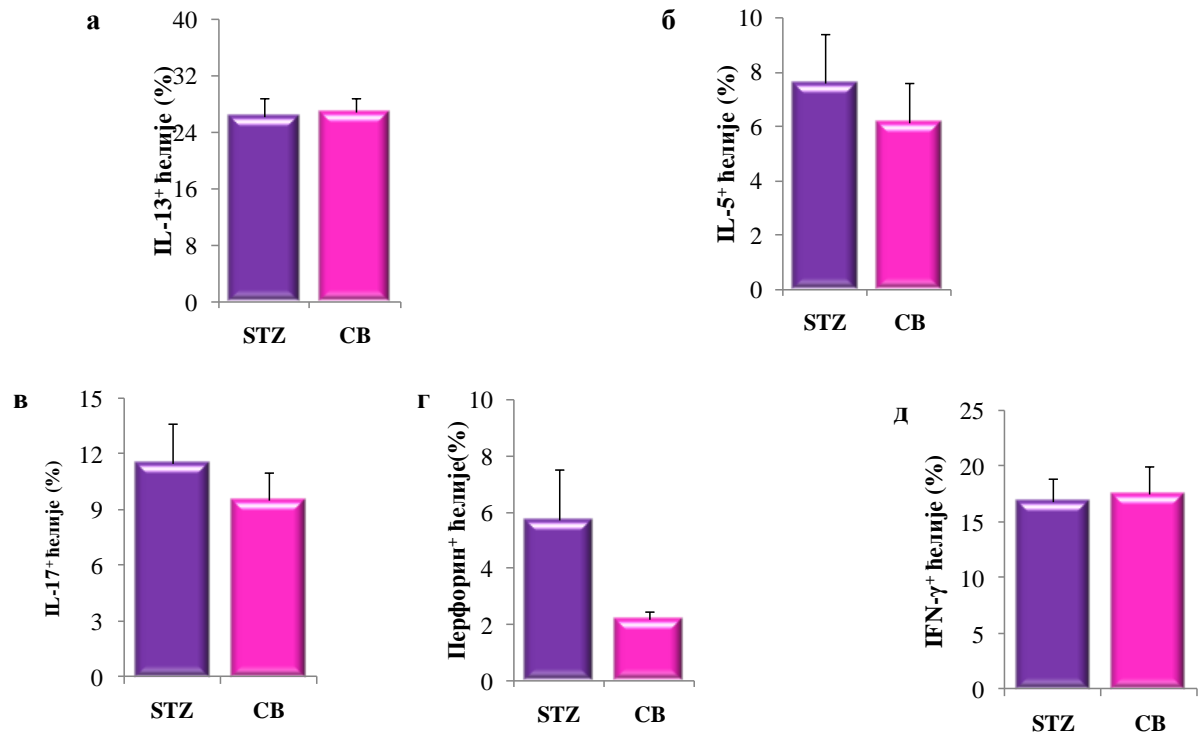
#### 4.7. Дијабетес мелитус повећава процентуалну заступљеност TGF-β-продукујућих NKT ћелија

Обзиром да је познато да и NKT ћелије играју важну улогу у анти-туморском имунском одговору, испитивали смо функционални фенотип NKT ћелија. Резултати приказани на фигури 15а указују да дијабетично стање значајно повећава процентуалну заступљеност TGF-β-продукујућих CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NKT ћелија (p=0.004; Фигура 15а). Дијабетес мелитус није утицао на експресију NKp46 (p>0.05; Фигура 15б), KLRG-1 (p>0.05; Фигура 15в) нити на продукцију IL-4 (p>0.05; Фигура 15г) у CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NKT ћелијама. Такође, није забележена значајна разлика (p>0.05) у продукцији IL-13, IL-5, IL-17, перфорино, IFN-γ у NKT ћелијама између дијабетичних и контролних мишева (Фигуре 16а, 16б, 16в, 16г, 16д).

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишијег тумора дојке



**Фигура 15.** Дијабетес мелитус повећава процентуалну заступљеност TGF-β<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија, а не утиче на експресију NKp46 и KLRG-1 нити на продукцију IL-4 у CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелијама у слезини мишева. Мишеви који су примили STZ имају значајно већи проценат KLRG-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија (а) у слезини у односу на мишеве који су примили само CB. Нема разлике у процентуалној заступљености NKp46<sup>+</sup> (б), KLRG-1<sup>+</sup> (в) и IL-4<sup>+</sup> (г) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са мишевима који су само примили CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је Student T тестом.

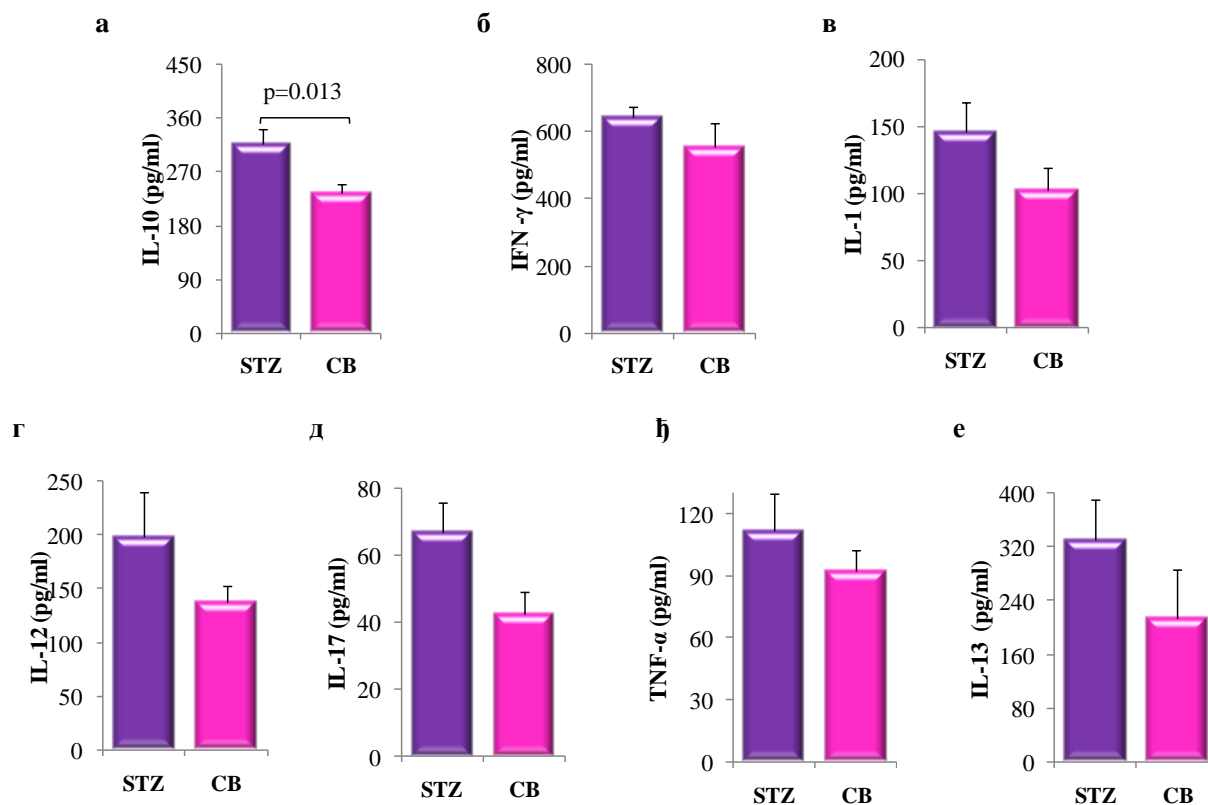


**Фигура 16.** Дијабетес мелитус не утиче процентуалну заступљеност IL-13<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>, перфорин<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија. Апликација STZ није утицала на проценат IL-13<sup>+</sup> (а), IL-5<sup>+</sup> (б), IL-17<sup>+</sup> (в), перфорин<sup>+</sup> (г), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (д) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија у слезинама мишева. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

#### 4.8. Повећана концентрација IL-10 у серуму мишева са дијабетесом

Обзиром да су резултати показали да дијабетично стање супримира цитотоксичку функцију NK ћелија, у наставку истраживања испитивано је да ли и како дијабетес утиче на продукцију цитокина..

Мерењем цитокина у серуму 28 дана након интраперитонеалне примене STZ утврђено је статистички значајно повећање концентрације IL-10 ( $p=0.013$ ; Фигура 17а) у серуму мишева који су примили STZ у поређењу са мишевима којима је дат само СВ. Као што се може видети на фигури 17, забележена статистички значајна разлика ( $p>0.05$ ) у концентрацији IFN- $\gamma$  ( $p>0.05$ ; Фигура 17б), IL-1 ( $p>0.05$ ; Фигура 17в), IL-12 ( $p>0.05$ ; Фигура 17г), IL-17 ( $p>0.05$ ; Фигура 17д), TNF- $\alpha$  ( $p>0.05$ ; Фигура 17ђ), IL-13 ( $p>0.05$ ; Фигура 17е) између испитиваних група.



**Фигура 17.** Серумске вредности цитокина након примене STZ. Концентрација серумског IL-10 (а) статистички значајно виша код мишева који су третирани STZ-ом у поређењу са мишевима којима је дат CB. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацији серумског IFN- $\gamma$  (б), IL-1 (в), IL-12 (г), IL-17 (д), TNF- $\alpha$  (ђ), IL-13 (е) између експерименталних група. Серумска концентрација цитокина је мерена 28. дана након интраперитонеалне апликације STZ-а, ELISA методом. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

#### 4.9. Дијабетес мелитус појачава акумулацију имуносупресивних ћелија у слезини мишева са тумором дојке

Анализа серумских цитокина је показала значајно већу концентрацију IL-10 у серуму мишева који су примили STZ у односу на мишеве којима је дат само CB (Фигура 17). Повећана системска вредност имуносупресивног цитокина навела нас је да, проточном цитометријом, анализирамо фенотипске и функционалне карактеристике имуносупресивних ћелија имунског система у слезини мишева који су примили STZ односно CB, пре и 15 дана након апликације 4T1 туморских ћелија.

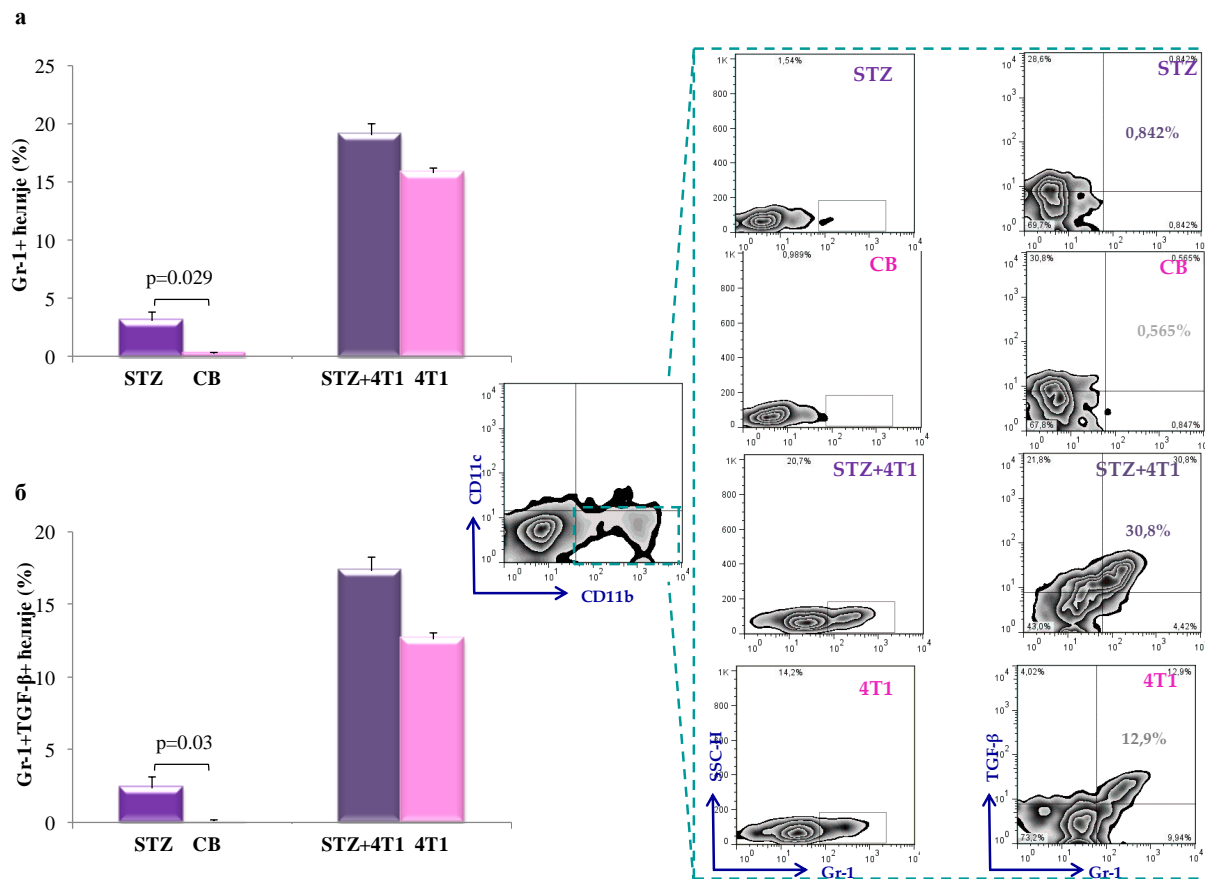


Прво смо анализирали функционални фенотип мијелоидних супресорских ћелија (енгл. *Myeloid-derived suppressor cell*, MDSC). На фигури 18а се јасно уочава статистички значајно већи проценат CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs у слезини мишева који су примили STZ у односу на контролну групу мишева (p=0.029; Фигура 18а). Тренд у разлици у процентуалној заступљености CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSCs одржава се и након апликације туморских 4Т1 ћелија, али разлика више није статистички значајна (p>0.05; Фигура 18а). Мишеви третирани STZ-ом су имали значајно већи проценат TGF-β-продукујућих CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (p=0.03; Фигура 18б) у поређењу са контролном групом.

Затим смо анализирали регулаторне Т лимфоците. Примена STZ-а значајно повећава проценат CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита у слезини мишева након индукције тумора. (p=0.029; Фигура 19а). Значајно је повећан и проценат субпопулације CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита које продукују IL-10 (p=0.048; Фигура 19б).

У даљем току истраживања је уочено да примена STZ-а не утиче значајно на акумулацију, фенотипске и функционалне карактеристике проинфламацијских CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија које експримирају МНС молекуле II и молекул С69 (p>0.05; Фигура 20а, 20б, 20в) као ни на процентуалну заступљеност МНС II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> дендритских ћелија (p>0.05; Фигура 20г) у слезини мишева пре и након индукције тумора.

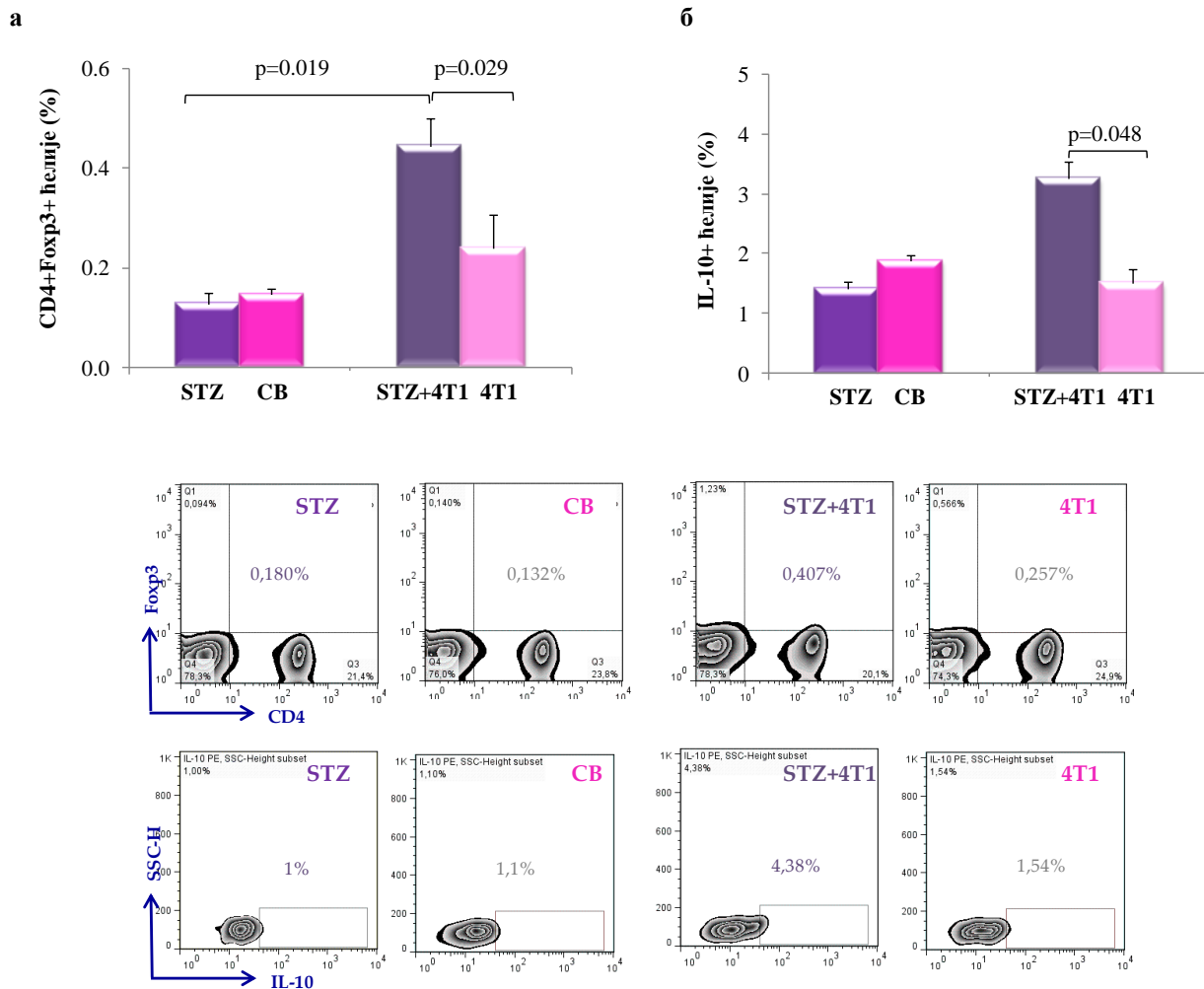
Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке



**Фигура 18.** Дијабетес мелитус повећава акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у слезини.

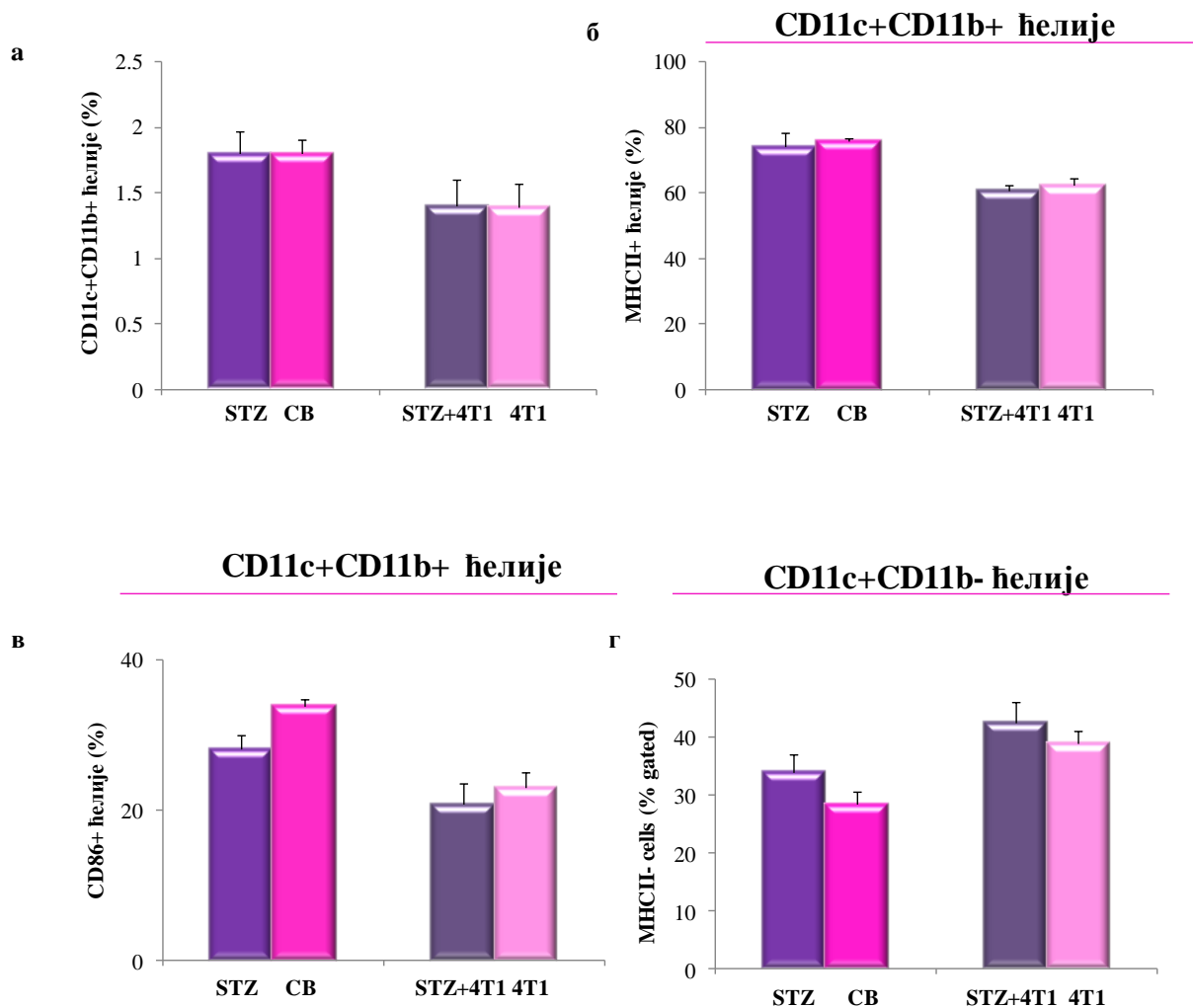
Процент CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (а) и TGF-β<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (б) је значајно већи у слезинама мишева који су примили STZ у поређењу са контролном групом мишева која је примила CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови Gr-1<sup>+</sup> и Gr-1<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> MDSC за све експерименталне групе.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишијег тумора дојке



**Фигура 19.** Дијабетес мелитус повећава акумулацију регулаторних Т лимфоцита у слезини мишева након индукције тумора. Апликација стрептозотоцина је значајно повећала процентуалну заступљеност CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита (а) и IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (б) регулаторних Т лимфоцита у слезини мишева након индукције тумора. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> и IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита за све експерименталне групе.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прог्रेसију мишјег тумора дојке

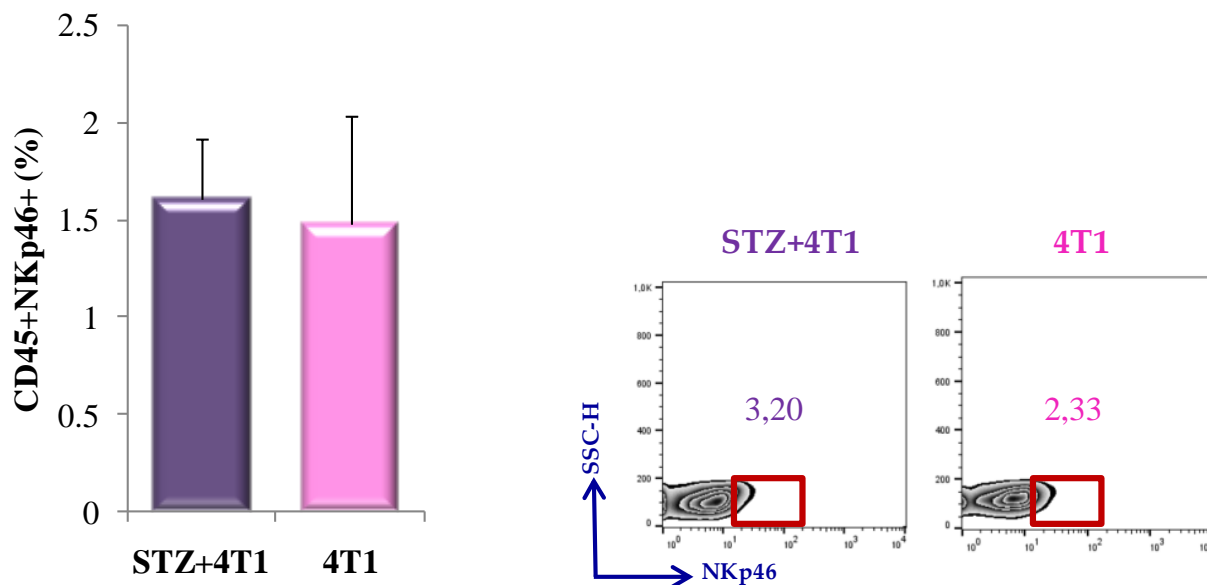


**Фигура 20.** Дијабетес мелитус не утиче на проценат и фенотип дендритских ћелија у слезини мишева пре ни након индукције тумора. Апликација стрептозотоцина није утицала на процентуалну заступљеност CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија (а), MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија (б), CD69<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија (в) као ни на процентуалну заступљеност MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> дендритских ћелија (г) у слезини мишева пре и након индукције тумора. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

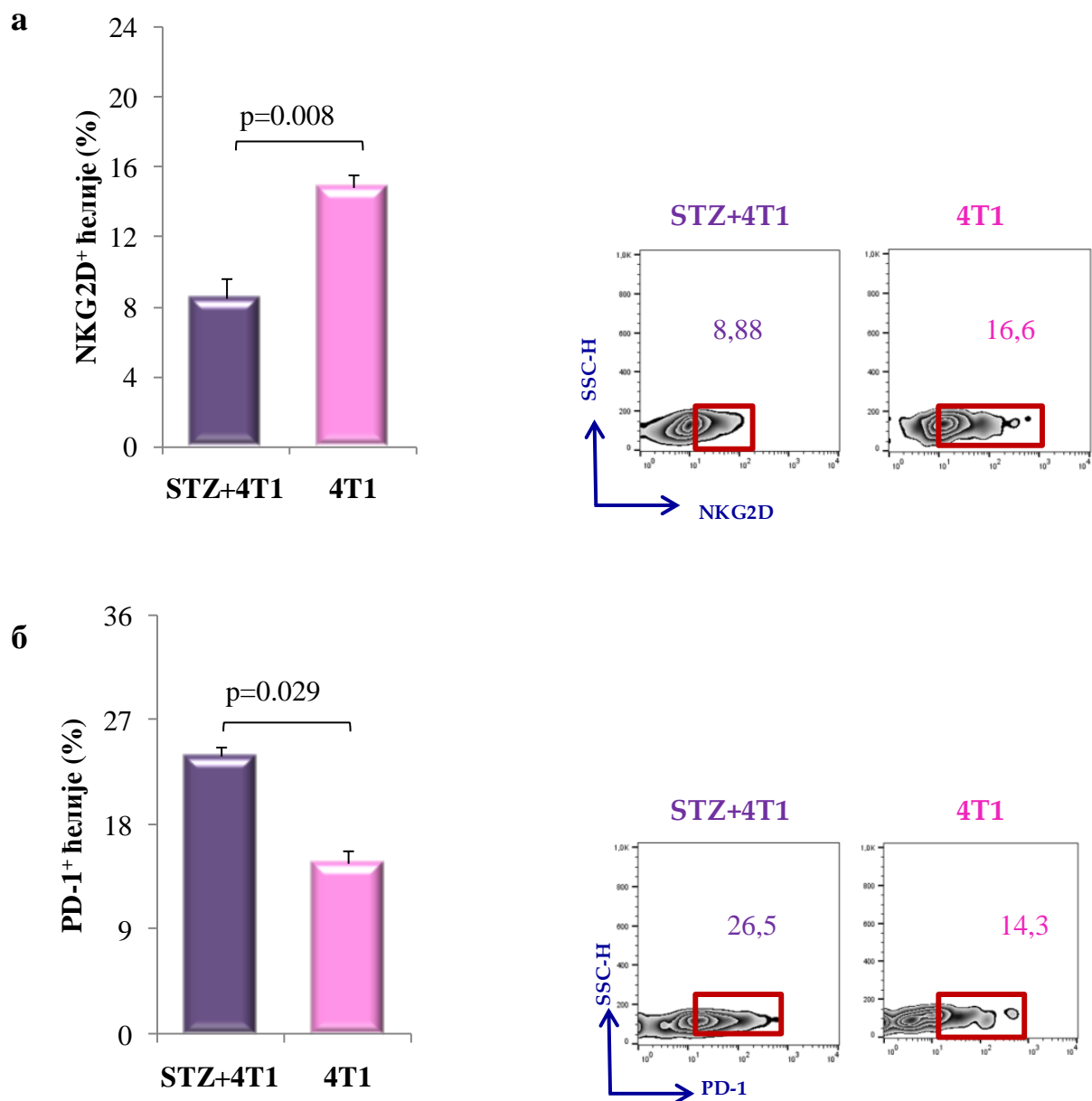
#### 4.10. Смањена експресија NKG2D а повећана PD-1 на NK ћелијама у примарном тумору мишева са дијабетесом

Након што је анализом функционалног фенотипа показано да примена STZ супримира проинфламацијски и антитуморски фенотип NK ћелија у слезини, следећи корак је била анализа фенотипа NK ћелија изолованих из примарног тумора мишева третираних STZ-ом.

Резултати приказани на фигури 21 указују да примена STZ-а није утицала на процентуалну заступљеност CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK ћелија у туморској микросредини (p>0.05; Фигура 21). Међутим, дијабетично стање је значајно смањило акумулацију CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>NK ћелија које експримирају активациони рецептор NKG2D (p=0.008; Фигура 22a). Такође је регистрован значајно већи проценат PD-1<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK ћелија у примарним туморима мишева третираних STZ (p=0.029; Фигура 22б).



**Фигура 21.** Дијабетес мелитус не утиче на акумулацију NK у туморску микросредину. Апликација стрептозотоцина није утицала на процентуалну заступљеност CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK ћелија у туморској микросредини мишева. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK ћелија за све експерименталне групе.

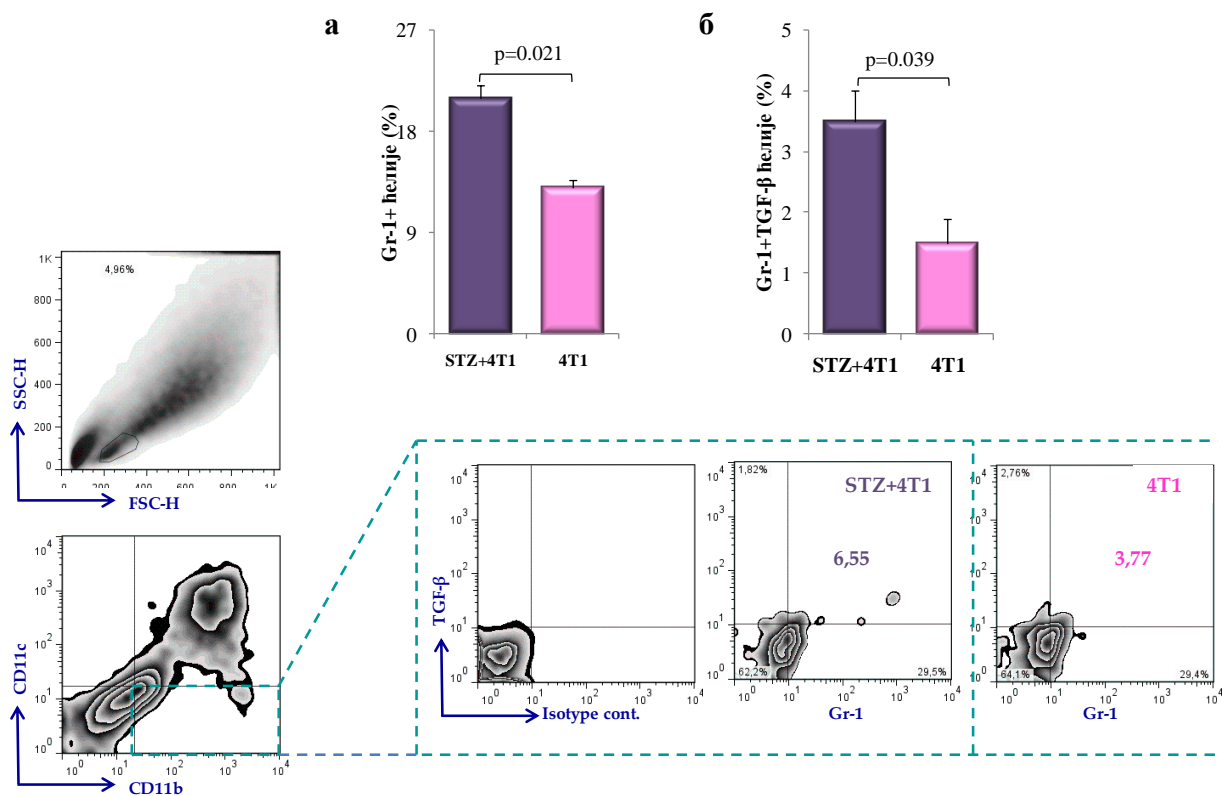


**Фигура 22.** Смањена експресија NKG2D а повећана PD-1 на NK ћелијама у примарном тумору дијабетичних мишева. Апликација стрептозотоцина је значајно смањила проценат NKG2D<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>NK ћелија (а) а повећала проценат CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>NK ћелија (б) у примарном тумору мишева. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK ћелија за све експерименталне групе.

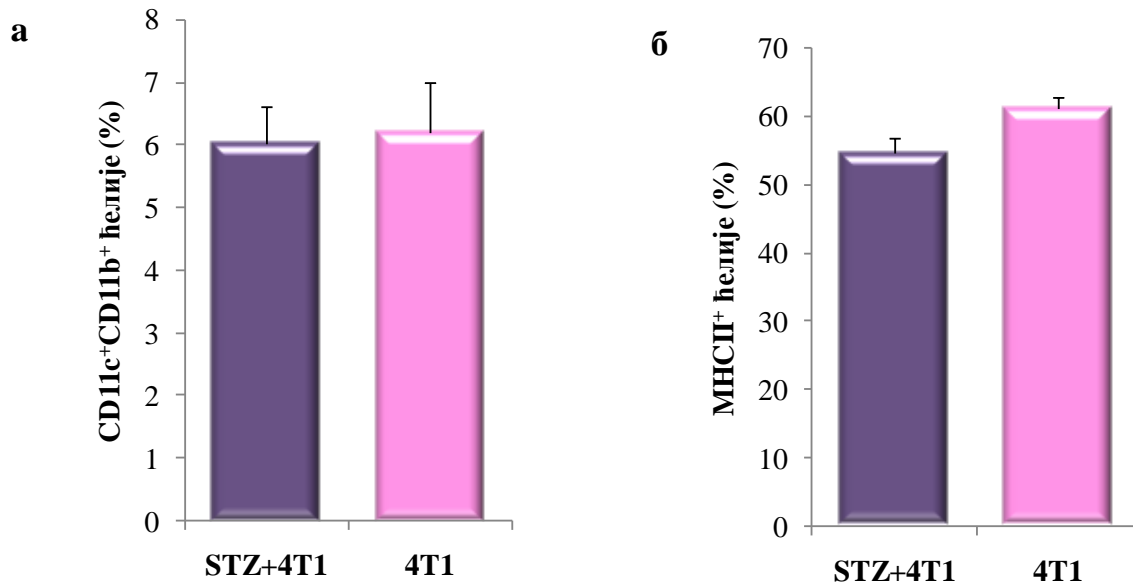
#### 4.11. Дијабетес мелитус фаворизује акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у туморску микросредину

У туморској микросредини смо методом проточне цитометрије анализирали функционални фенотип доминантних популација имуносупресивних ћелија. Анализа мијелоидних супресивних ћелија је показала значајно појачану акумулацију  $CD11b^+CD11c^-Gr-1^+$  MDSCs ( $p=0.021$ ; Фигура 23а) као и TGF- $\beta$  продукујућих  $CD11b^+CD11c^-Gr-1^+$  MDSCs ( $p=0.039$ ; Фигура 23б) у примарном тумору мишева третираних STZ-ом у поређењу са мишевима третираних СВ-ом.

Апликација STZ није утицала на акумулацију  $CD11c^+CD11b^+$  дендритских ћелија ( $p>0.05$ ; Фигура 24а) као ни на експресију МНС молекула II класе на популацији  $CD11c^+CD11b^+$  дендритских ћелија ( $p>0.05$ ; Фигура 24б) у примарном тумору мишева.



**Фигура 23.** Дијабетес мелитус повећава акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у примарном тумору мишева. Процент  $CD11b^+CD11c^-Gr-1^+$  MDSCs (а) и TGF- $\beta$  продукујућих  $CD11b^+CD11c^-Gr-1^+$  MDSCs (б) је значајно већи у примарном тумору мишева који су примили STZ у поређењу са контролном групом мишева која је примила СВ. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови  $CD11b^+CD11c^-Gr-1^+TGF-\beta^+$  MDSCs за све експерименталне групе.



**Фигура 24.** Дијабетес мелитус не утиче на акумулацију дендритских ћелија у примарном тумору мишева. Апликација стрептозотоцина није утицала на процентуалну заступљеност CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија (а), MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија (б) у туморској микросредини. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

#### 4.12. Дијабетични серум мења функционални фенотип NK ћелија, *in vitro*

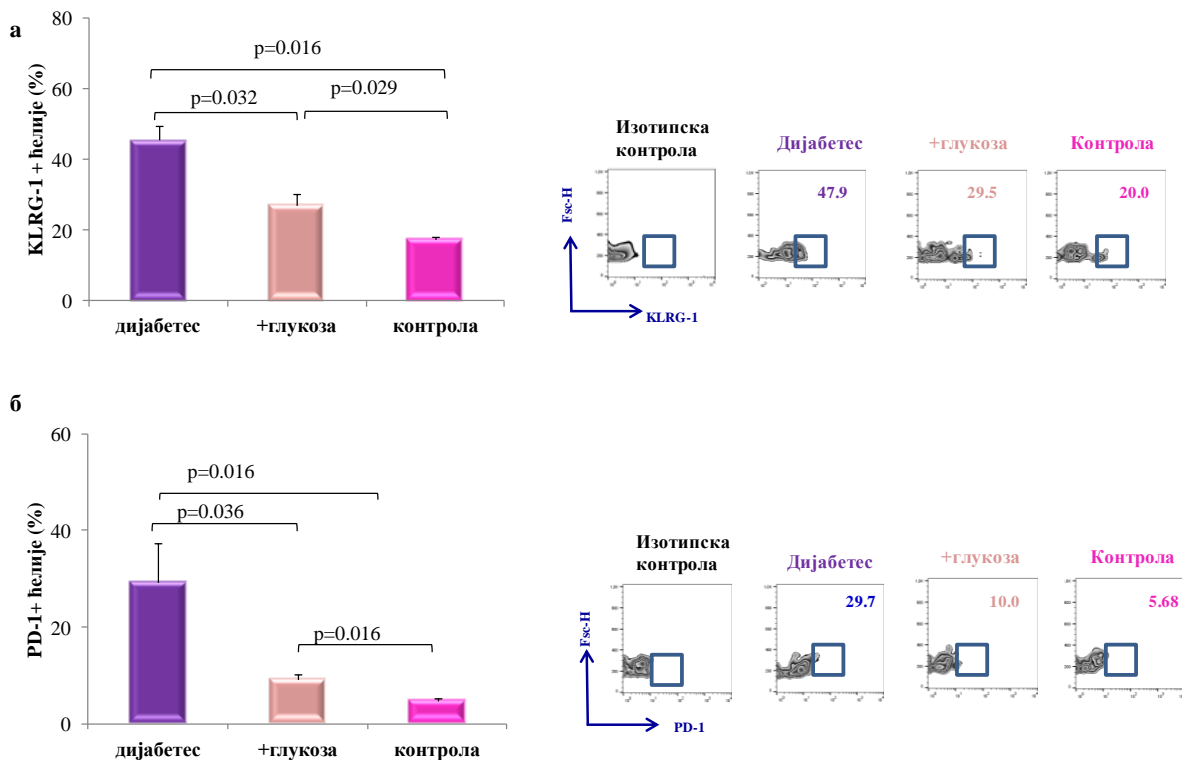
Обзиром да је показан измењен фенотип NK ћелија у слезини и примарном тумору мишева са дијабетесом, у следећем кораку је испитан ефекат солубилних фактора који настају током прогресије дијабетес мелитуса као и ефекат глукозе на функционални фенотип NK ћелија. Спленоцити изоловани из здравог миша су култивисани 24 часа у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, серум коме је додата глукоза или серум изолован из контролног миша. Унутар култивисане популације спленоцита, проточном цитометријом су анализирани CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> NK ћелије. Додатак глукозе у серум контролних животиња повећао је експресију KLRG-1 ( $p=0.029$ , Фигура 25а) и PD-1 ( $p=0.016$ ; Фигура 25б) на CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелијама. Иако није било разлике у процентуалној заступљености NKp46<sup>+</sup> и перфорин<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија, уочено је значајно нижа експресија ових молекула на NK ћелијама третираним глукозом ( $p=0.026$ ;  $p=0.017$ ; Фигуре 26а, 26б). Култивација



у дијабетичном серуму додатно је повећала експресију KLRG-1 ( $p=0.032$ ;  $p=0.016$ , Фигура 25а) и PD-1 ( $p=0.036$ ;  $p=0.016$ ; Фигура 25б) на CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелијама, а смањено је експресију NKp46 ( $p=0.038$ ;  $p=0.014$ , Фигура 25а) и продукцију перфорина ( $p=0.049$ ;  $p=0.012$ ; Фигура 25б) по CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелији у односу на ћелије култивисане у гликемичном серуму односно у контролном серуму. Дијабетични серум је такође значајно смањено проценат IFN- $\gamma$  продукујућих CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија ( $p=0.029$ ;  $p=0.029$ ; Фигура 27а), смањено је продукцију IL-17 ( $p=0.048$ ;  $p=0.032$ ; Фигура 27б) као и гранзима ( $p=0.004$ ;  $p=0.003$ ; Фигура 28а) и експресију CD107a ( $p=0.016$ ;  $p=0.014$ ; Фигура 28б) у CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелијама у поређењу са NK ћелијама третираним серумом са додатком глукозе односно контролним серумом.

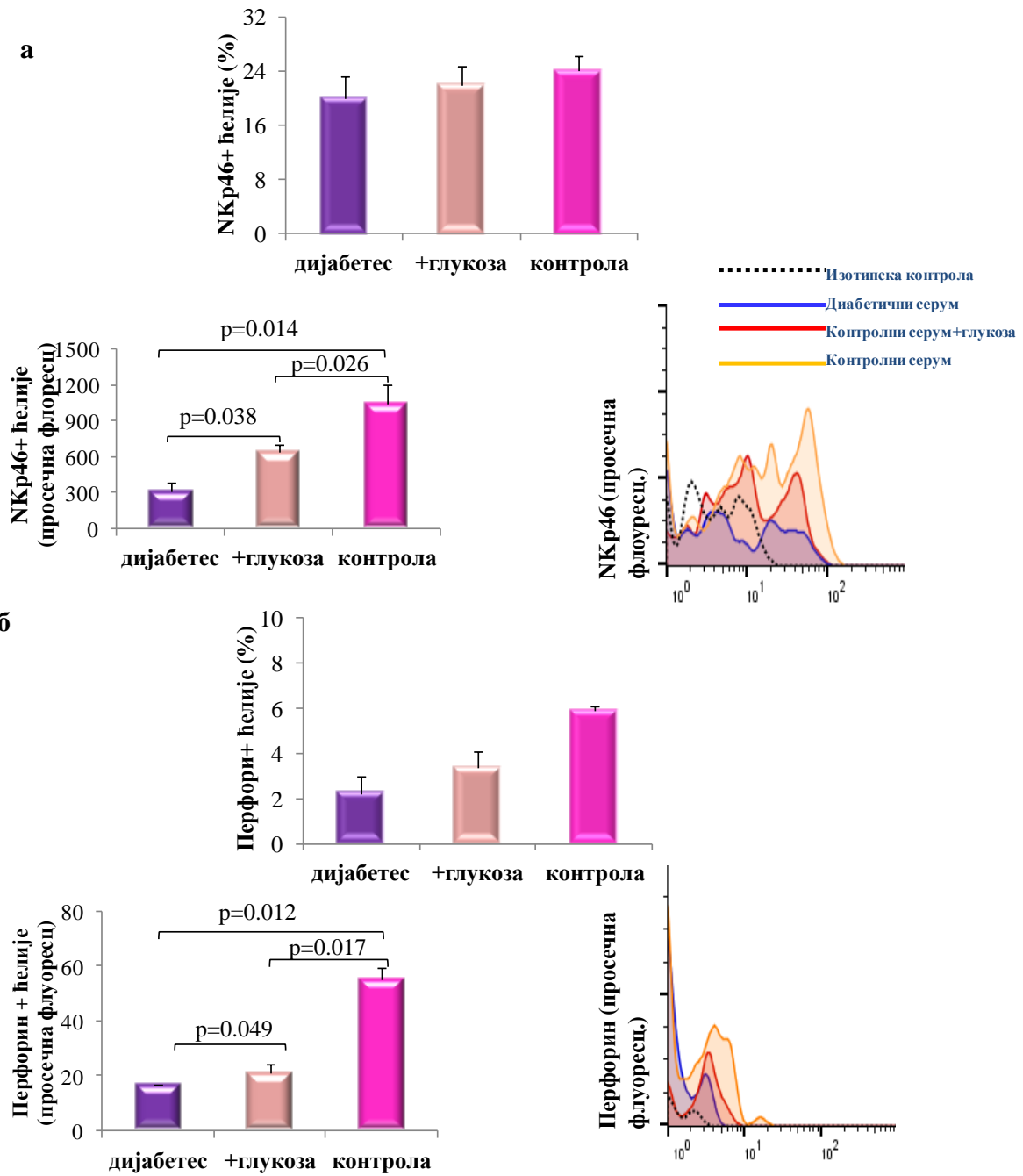
Познато је да висока концентрација глукозе може индуковати стрес ендоплазматског ретикулума онемогућавајући тиме нормално функционисање ћелије. У таквом стању, ћелија повећава синтезу молекула шаперона који у ендоплазматском ретикулуму везују неформиране протеине како би покушали да овај стрес у ћелији елиминирају. RT-PCR методом смо анализирали експресију гена који кодирају молекуле шаперона DAP10, EDEM, ATF4, CHOP, BiP, GRP94 у хомогенату слезина мишева третираних STZ-ом односно СВ-ом. Не постоји статистички значајна разлика у експресији шаперона DAP10, EDEM, ATF4, CHOP, BiP, GRP94 ( $p>0.05$ , Фигуре 29а, 29б, 29в, 29г, 29д, 29ђ) у спленоцитима мишева третираних STZ-ом у односу на контролну групу мишева чиме смо потврдили претходне резултате да висока концентрација глукозе у крви не игра кључну улогу у супресији NK ћелија.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишјег тумора дојке



**Фигура 25.** Серум дијабетичних мишева мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Спленцити изоловани из здравог миша култивани су у медијуму који садржи дијабетични серум, серум коме је додата глукоза и контролни серум. Дијабетични серум је значајно повећао процентуалну заступљеност KLRG-1<sup>+</sup> (а) и PD-1<sup>+</sup> (б) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија у односу на серум коме је додата глукоза и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови KLRG-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија за све експерименталне групе.

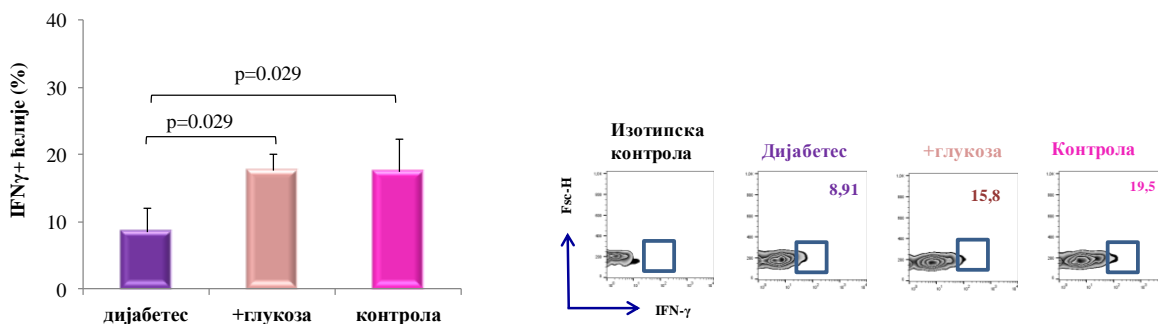
Утицај дијабетес мелитуса на раст и прог्रेसију мишјег тумора дојке



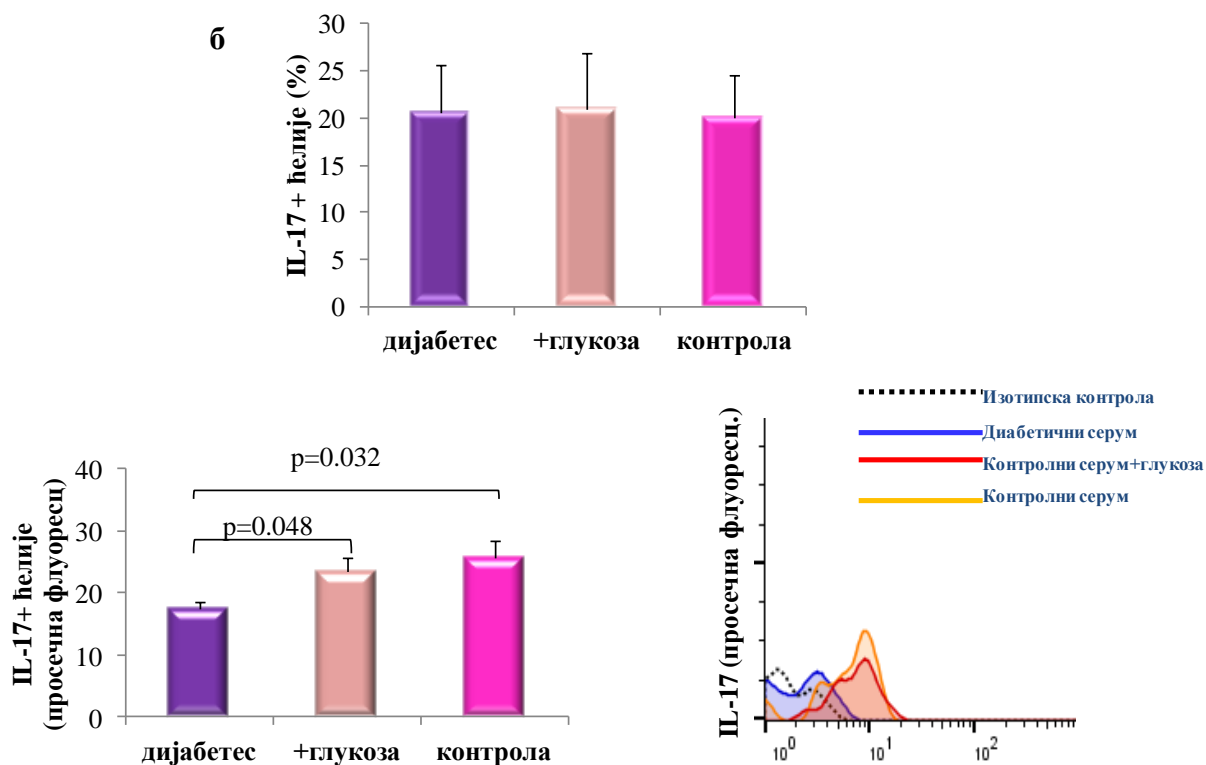
**Фигура 26.** Серум дијабетичних мишева мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Дијабетични серум је *in vitro* значајно смањено експресију рецептора NKp46 (а) и продукцију перфорина (б) у CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелијама у односу на серум коме је додата глукоза и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је Student T тестом. Приказани су репрезентативни FACS-хистограми NKp46<sup>+</sup> и перфорин<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија за све експерименталне групе.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишјег тумора дојке

а

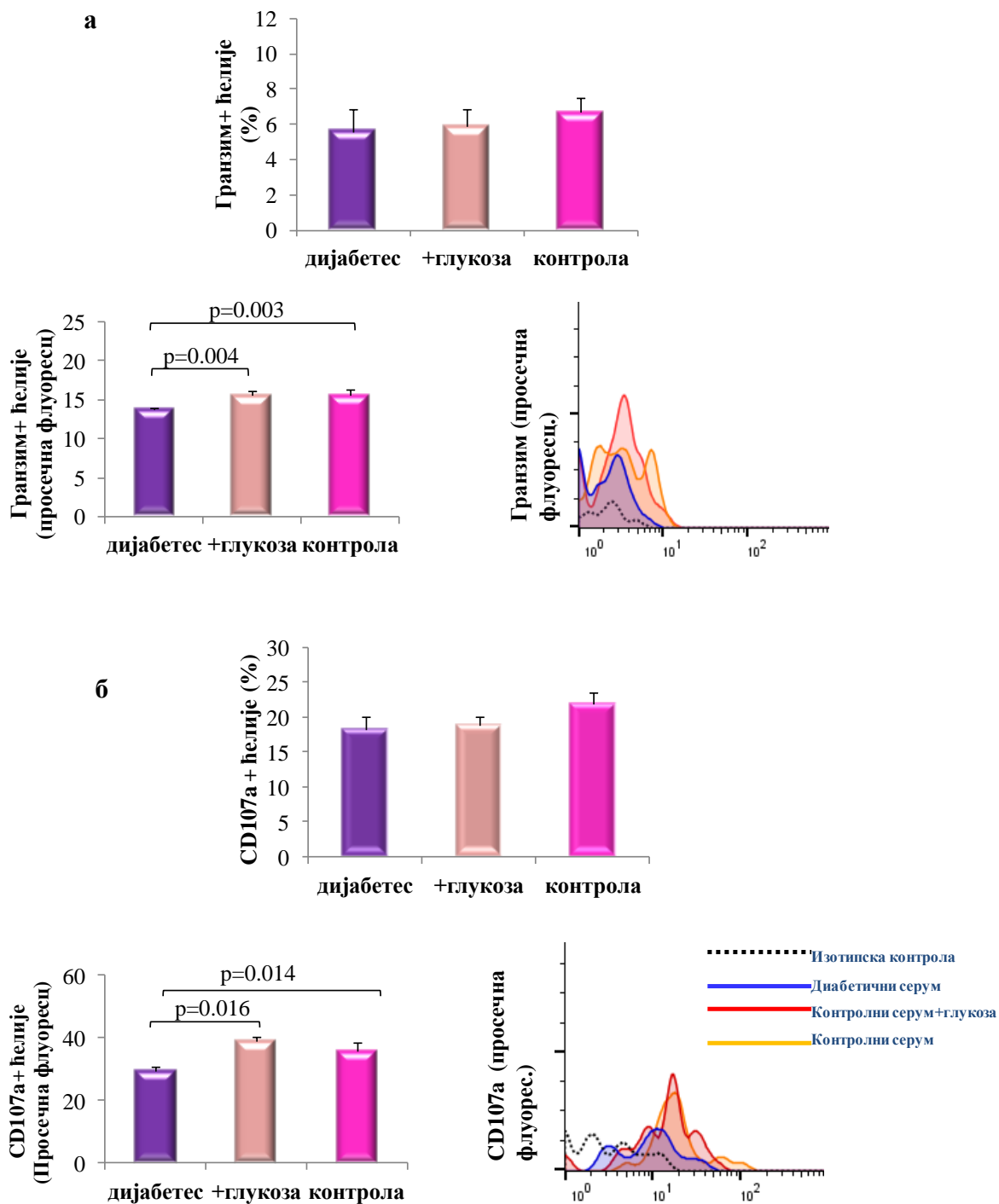


б

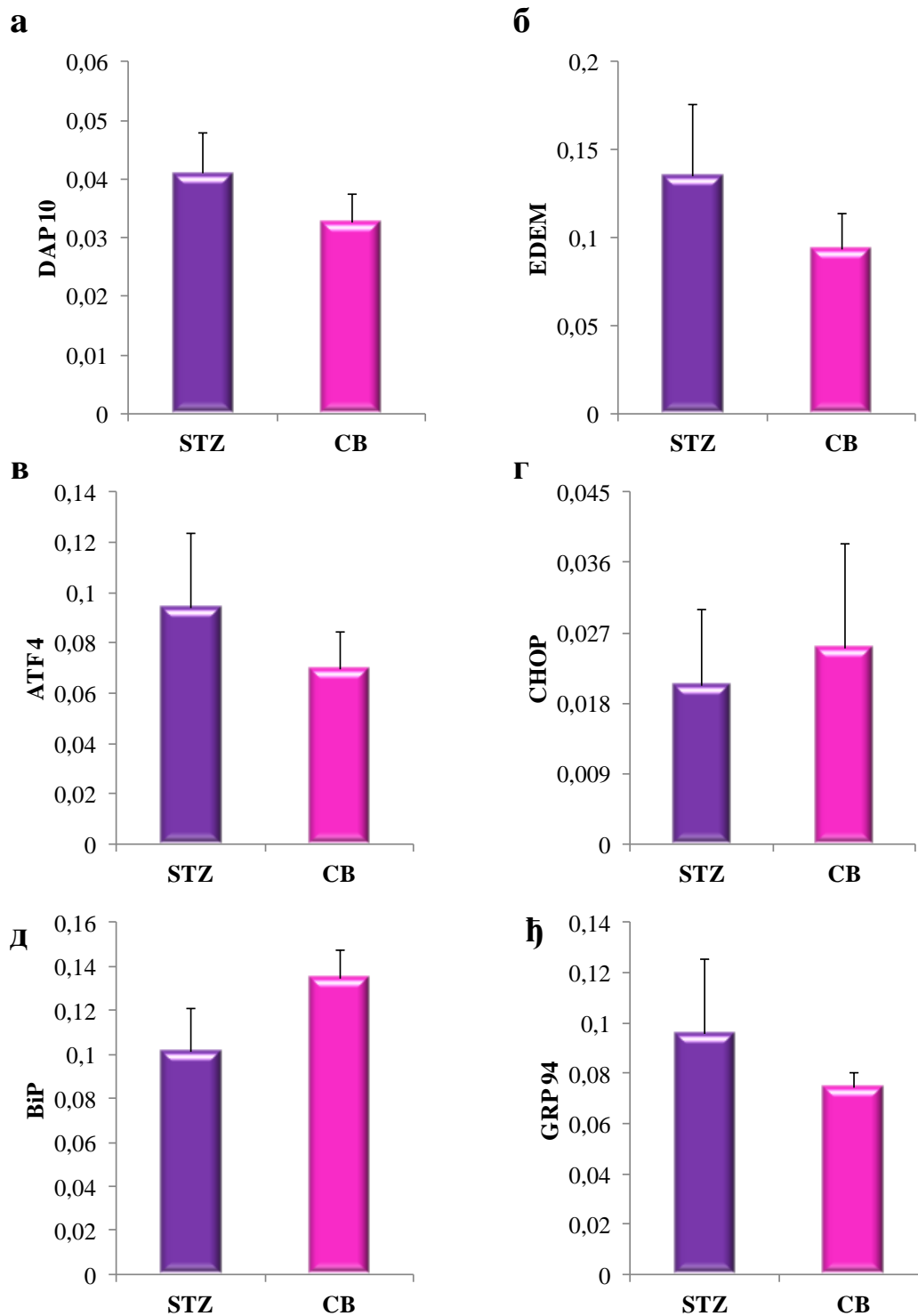


**Фигура 27.** Серум дијабетичних мишева мења фенотип НК ћелија у *in vitro* условима. Дијабетични серум је значајно смањio проценат IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија (а) и продукцију IL-17 (б) у CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелијама у односу на серум са глюкозом и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је Student T тестом. Приказани су репрезентативни FACS-хистограми IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-17<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија за све експерименталне групе.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишјег тумора дојке



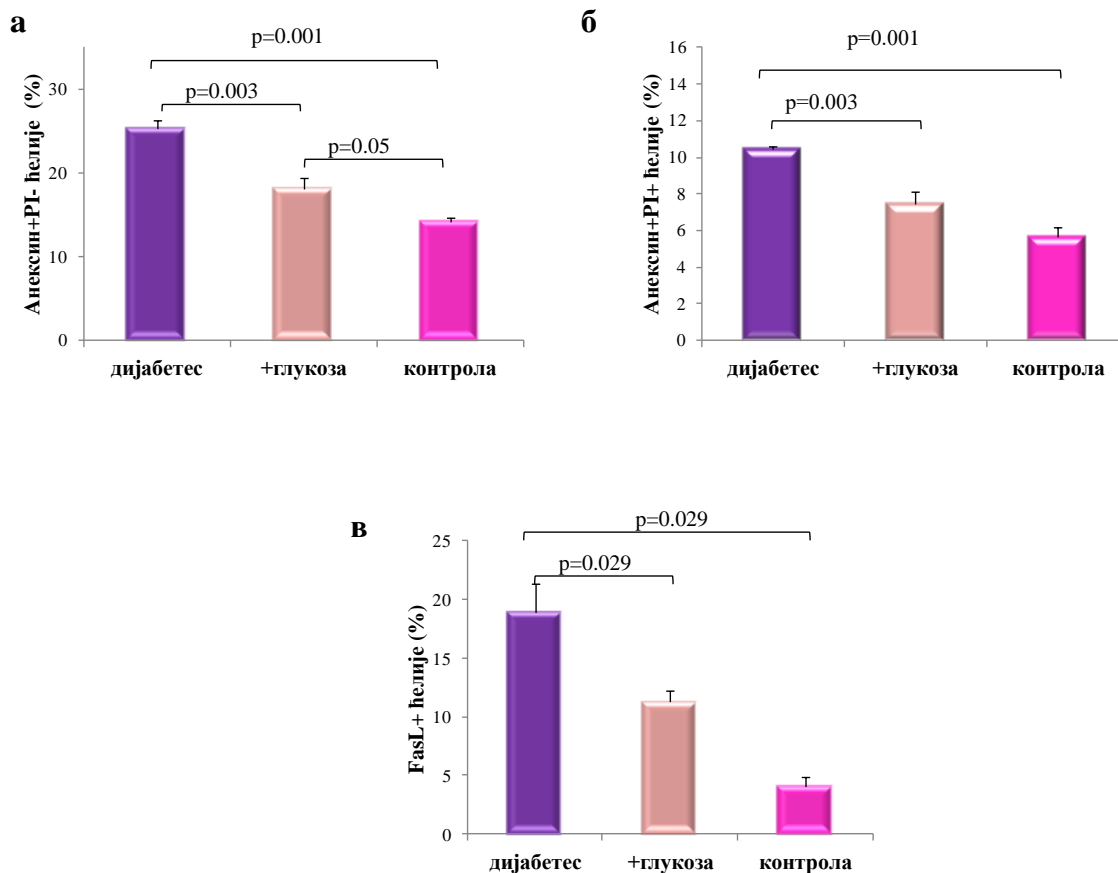
**Фигура 28.** Серум дијабетичних мишева мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Дијабетични серум је значајно смањио продукцију гранзима (а) и CD107а (б) у CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелијама у односу на серум са глюкозом и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-хистограми гранзим<sup>+</sup> и CD107a<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија за све експерименталне групе.



**Фигура 29. RT-PCR анализа експресије молекула шаперона у хомогенатима слезине након апликације STZ-а.** RT-PCR анализа није показала статистички значајну разлику у експресије гена за DAP10 (а), EDEM (б), ATF4 (в), CHOP (г), BiP (д), GRP94 (ђ) у хомгенатима слезина мишева третираних STZ-ом односно CB-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (\* $p < 0.05$ ).

#### 4.13. Серум дијабетичних мишева стимулише апоптозу спленоцита, *in vitro*

У наредном кораку желели смо да испитамо да ли дијабетични серум утиче на апоптозу спленоцита. Након двадесетчетворочасовне култивације спленоцита изолованих из здравог миша у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, серум коме је додата глукоза или серум изолован из контролног миша, анализирали смо експресију маркера апоптотоских ћелија, анексин и пропидијум јодид. На фигури 30а и 30б се јасно уочава да је дијабетични серум у *in vitro* условима значајно повећао процентуалну заступљеност анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>-</sup> спленоцита ( $p=0.003$ ;  $p=0.001$ ; Фигура 30а) као и анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>+</sup> спленоцита ( $p=0.003$ ;  $p=0.001$ ; Фигура 30б) у односу на спленоците култиване у серуму коме је додата глукоза односно на спленоците култиване у серуму изолованом из здравог миша. Додатно, анализа експресије FasL у популацији CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија је показала да дијабетични серум значајно повећава проценат FasL<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија ( $p=0.029$ ;  $p=0.029$ ; Фигура 30в) *in vitro* у односу на остале две експерименталне групе.



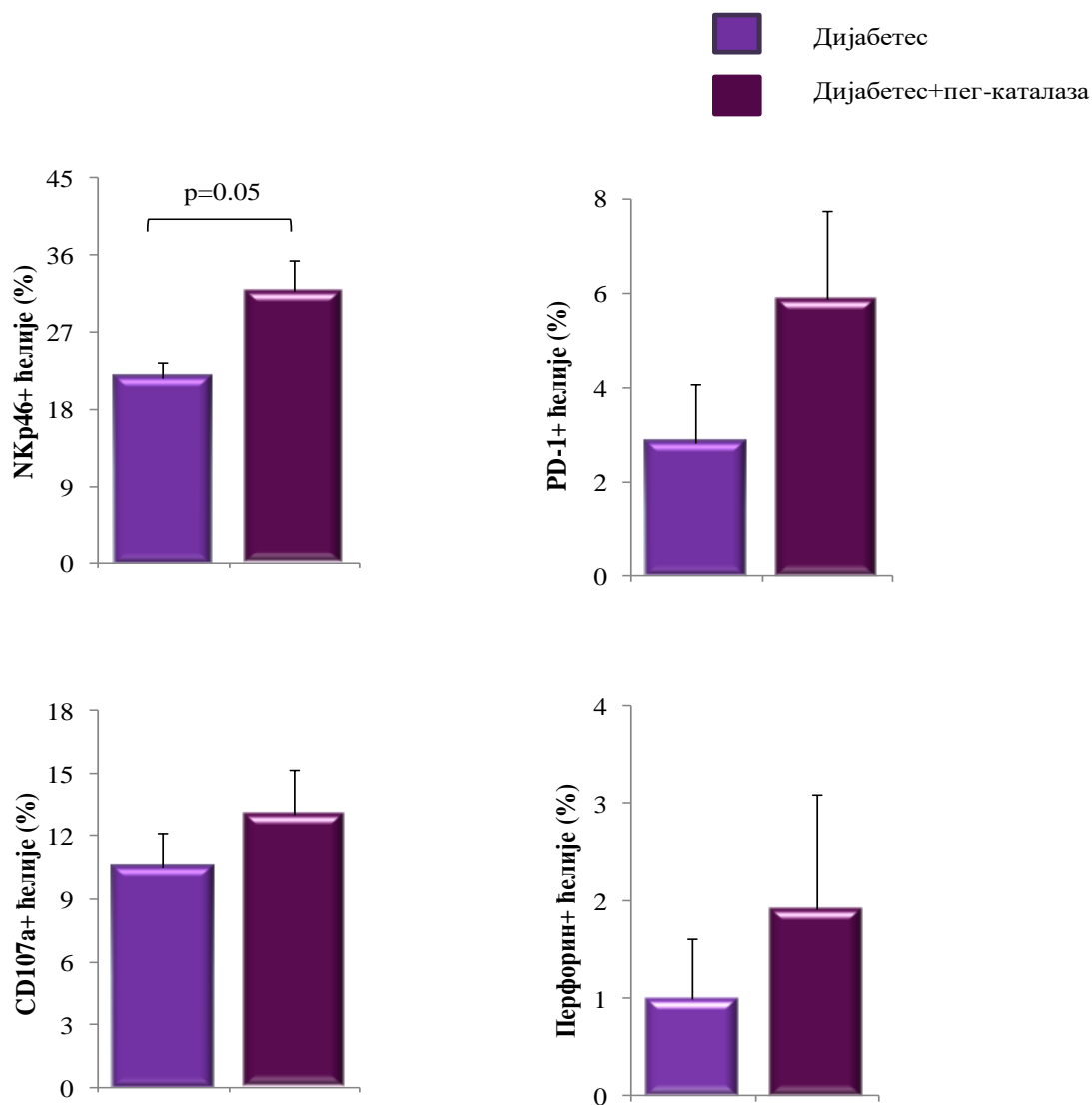
**Фигура 30. Дијабетични серум повећава експресију маркера апоптозе *in vitro* условима.**

Дијабетични серум је значајно повећао процентуалну заступљеност анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>-</sup> спленоцита (а) и анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>+</sup> спленоцита (б) у односу на спленоците култиване у серуму коме је додата глукоза односно у серуму изолованом из здравог миша. Дијабетични серум је значајно повећао проценат FasL<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија (в) у односу на остале две експерименталне групе. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

У циљу неутралисања ефекта појачаног оксидативног стреса, изведени су додатни *in vitro* експерименти. Спленоцити изоловани из здравог миша култивисани су у медијуму који садржи серум дијабетичног миша односно у медијуму који поред серума дијабетичног миша садржи и додату пег-каталазу. Додатак пег-каталазе је значајно повећао процентуални удео NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија ( $p=0.05$ ; Фигура 31а) у поређењу са NK ћелијама култивисаним у дијабетичном серуму. Међутим, није уочена разлика у експресији PD-1 ( $p>0.05$ ; Фигура 31б), CD107a ( $p>0.05$ ; Фигура 31в) и продукцији перфорина ( $p>0.05$ ; Фигура 31г) на NK ћелијама између поменутих група. Анализа експресије молекула који детерминишу ћелију у апоптози је показала да додатак пег-каталазе не утиче на процентуалну заступљеност анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>-</sup> спленоцита ( $p>0.05$ ; Фигура 32а) као и анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>+</sup> спленоцита ( $p>0.05$ ; Фигура 32б) у односу на спленоците култиване у серуму изолованом из дијабетичног миша. Такође, додатак пег-каталазе није утицао на проценат FasL<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија ( $p>0.05$ ; Фигура 32в).

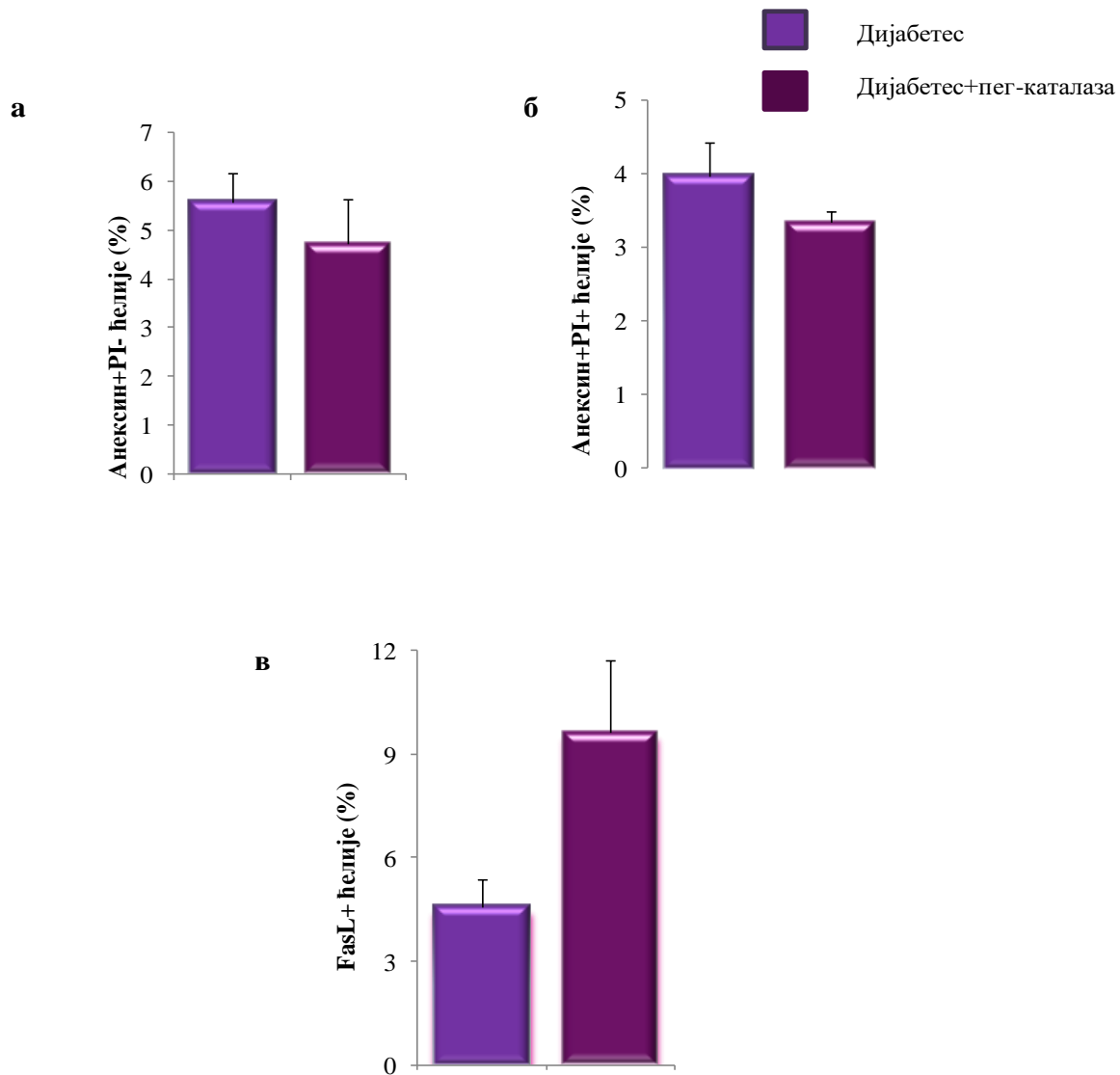


Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишићег тумора дојке



**Фигура 31.** Пег-каталаза повећава експресију NKp46 на CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелијама. Додатак пег-каталазе је значајно повећао проценат NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија (а) у односу на NK ћелије третиране дијабетичним серумом, док није утицао на проценат, PD-1<sup>+</sup> (б), CD107a<sup>+</sup> (в) и перфорин<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке



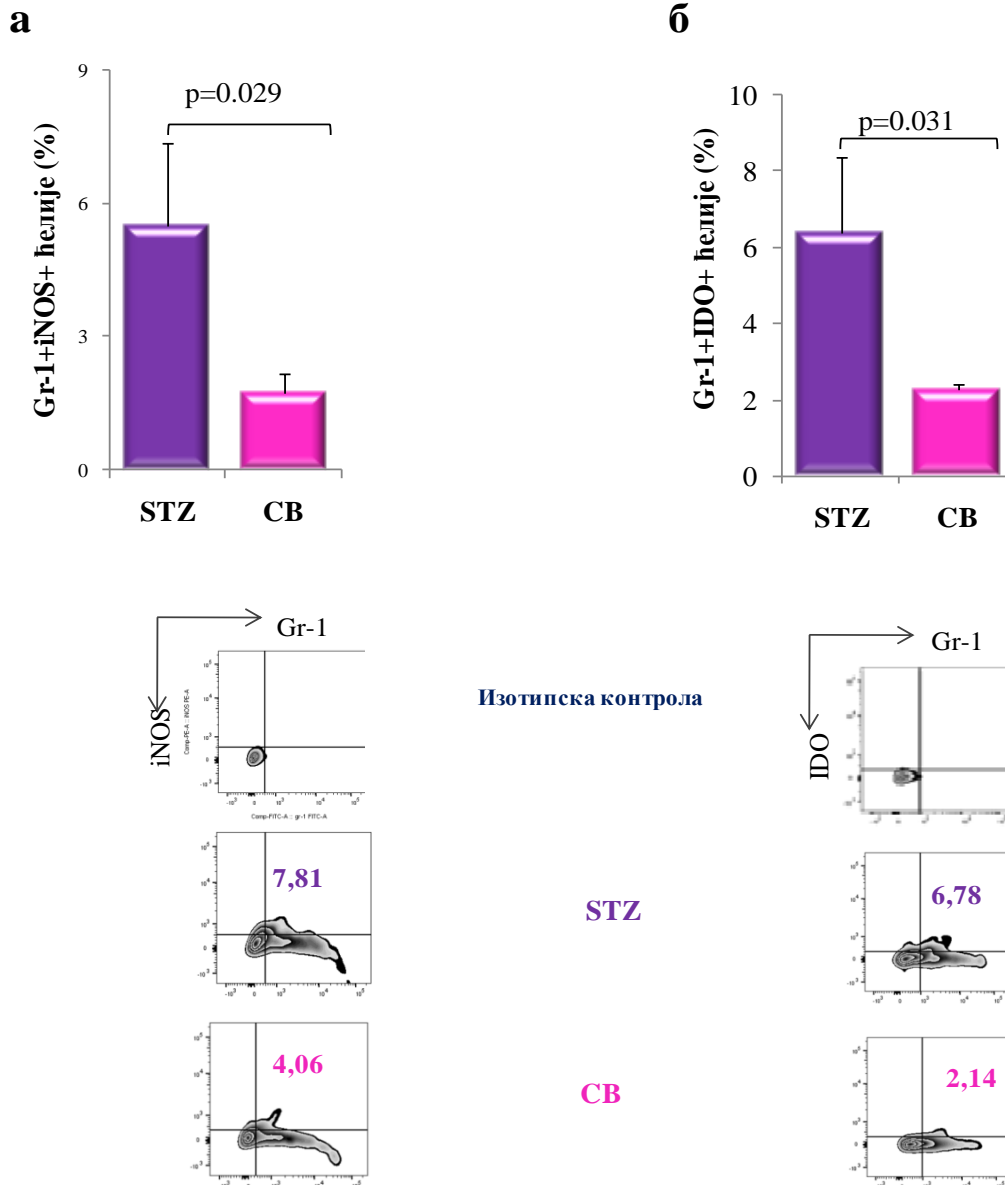
**Фигура 32. Пег-каталаза не утиче на експресију апоптотских молекула.** Додатак пег-каталазе дијабетичном серуму није изменио процентуалну заступљеност анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>-</sup> спленоцита (а) и анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>+</sup> спленоцита (б) у односу на спленоците култиване у дијабетичном серуму. Пег-каталаза није утицала на проценат FasL<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија (в) у односу на контролну групу. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

#### 4.14. MDSCs и DCs супримирају NK ћелије активношћу ензима IDO

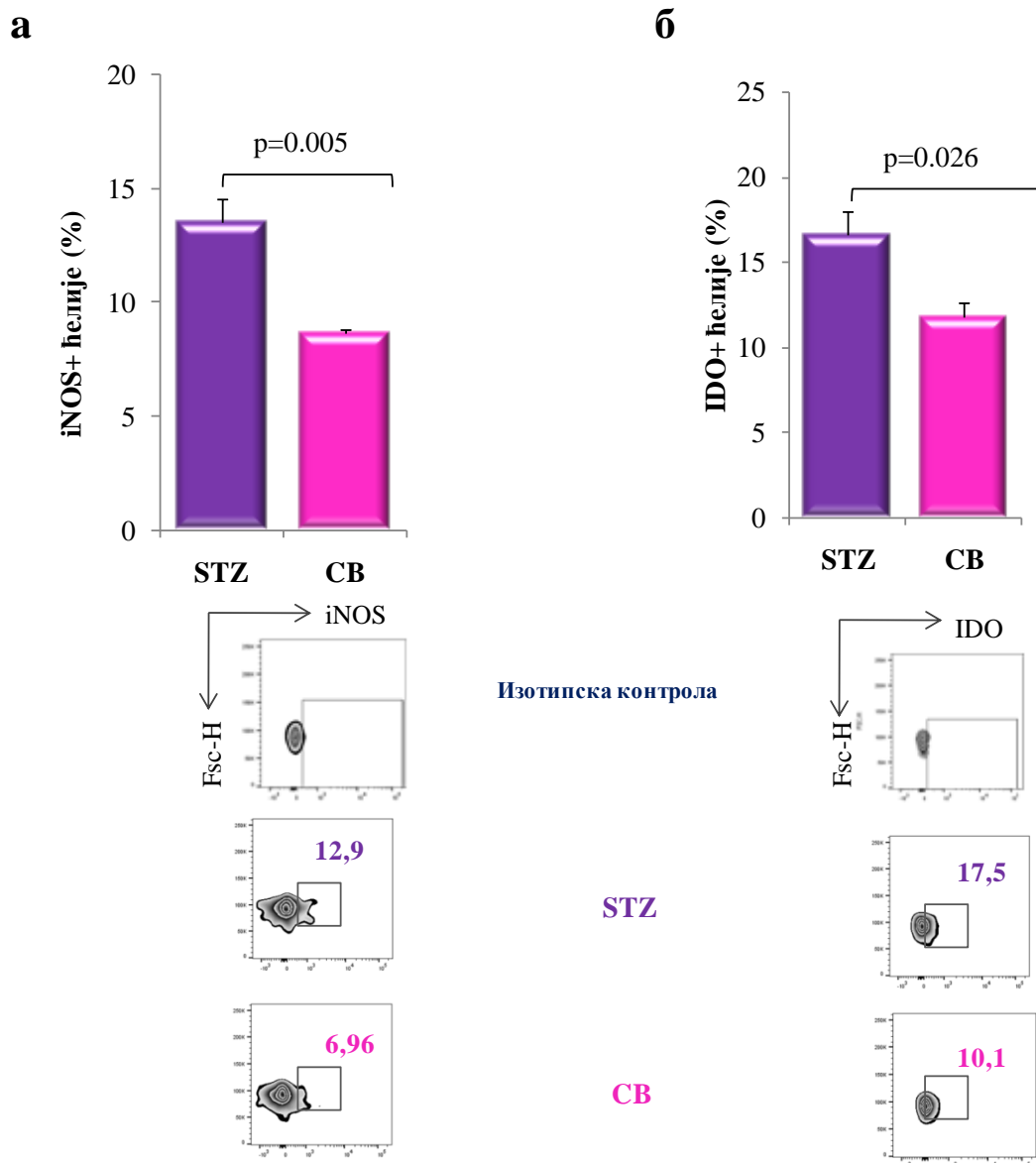
У циљу анализе који је то солубилни фактор заслужан за измену фенотипа NK ћелија, у даљем току истраживања смо анализирали продукцију индуцибилне азот моноксид синтазе (енгл. *Inducible nitric oxide synthase*, iNOS) и индоламин 2,3 диоксигеназе (енгл. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) различитих популација ћелија изолованих из слезине мишева који су третирани STZ-ом односно СВ-ом. Интраћелијско бојење мијелоидних супресорских ћелија MDSCs је показало значајно већи проценат iNOS<sup>+</sup> (p=0.029; Фигура 33а) и IDO<sup>+</sup> (p=0.031; Фигура 33б) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr<sup>+</sup>MDSCs у слезини мишева који су третирани STZ у односн на мишеве који су примили само СВ. Примена STZ је такође значајно повећала процентуалну заступљеност iNOS<sup>+</sup> (p=0.005; Фигура 34а) и IDO<sup>+</sup> (p=0.026; Фигура 34б) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs у односн на контролну групу.

Како би се испитао ефекат ензима iNOS на фенотип NK ћелија, спленцити изоловани из здравог миша су култивисани у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, уз присуство или одсуство L-N<sup>G</sup>-монометил аргинин цитрат (L-NMMA), селективног блокатора ензима iNOS, као и у серуму изолованом из здравих мишева. Додавање L-NMMA је значајно повећало проценат NKp46<sup>+</sup> (p=0.048; Фигура 35а), NKG2D<sup>+</sup> (p=0.038; Фигура 35б) CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup>bNK ћелија, а смањио проценат IL-10 продукујућих CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup>bNK ћелија (p=0.048; Фигура 35в) у поређењу са популацијом ћелија култивисаном у дијабетичном серуму без додатка L-NMMA. Блокада ензима iNOS није утицала на процентуалну заступљеност CD69<sup>+</sup> (p=0.004; Фигура 36а) PD-1<sup>+</sup> (p>0.05; Фигура 36б) CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелији као ни на процентуални удео перфорин продукујућих (p>0.05; Фигура 36в) и гранзим продукујућих (p>0.05; Фигура 36г) CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија у поређењу са популацијом ћелија култивисаном у дијабетичном серуму без додатка L-NMMA. У наредним *in vitro* експериментима, спленцити изоловани из здравог миша су култивисани у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, уз присуство или одсуство 1-метил триптофана (1-МТ), селективног блокатора IDO, и у серуму изолованом из здравих мишева. Додатак 1-МТ је значајно елиминисао супресивни ефекат дијабетичног серума: повећао је експресију NKG2D (p=0.016; Фигура 37а), NKp46 (p=0.038; Фигура 37б) и CD69 (p=0.004; Фигура 37в) као и перфорина (p=0.008; Фигура 37г) и гранзима (p=0.032; Фигура 38а) у CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> NK ћелија у поређењу са популацијом ћелија култивисаном у дијабетичном серуму без додатка 1-МТ. Додатак 1-МТ значајно је смањио процентуални удео IL-10

продукујућих  $CD3^+CD49^+bNK$  ћелија ( $p=0.041$ ; Фигура 38б) као и експресију PD-1 молекула по  $CD3^+CD49^+bNK$  ћелији ( $p=0.015$ ; Фигура 38в) у поређењу са NK ћелијама које су култивисане само у дијабетичном серуму. Узевши све у обзир, додаток 1-МТ модулише експресију маркера NK ћелија мењајући им функционални фенотип налик оном након култивације у контролном серуму здравих мишева.

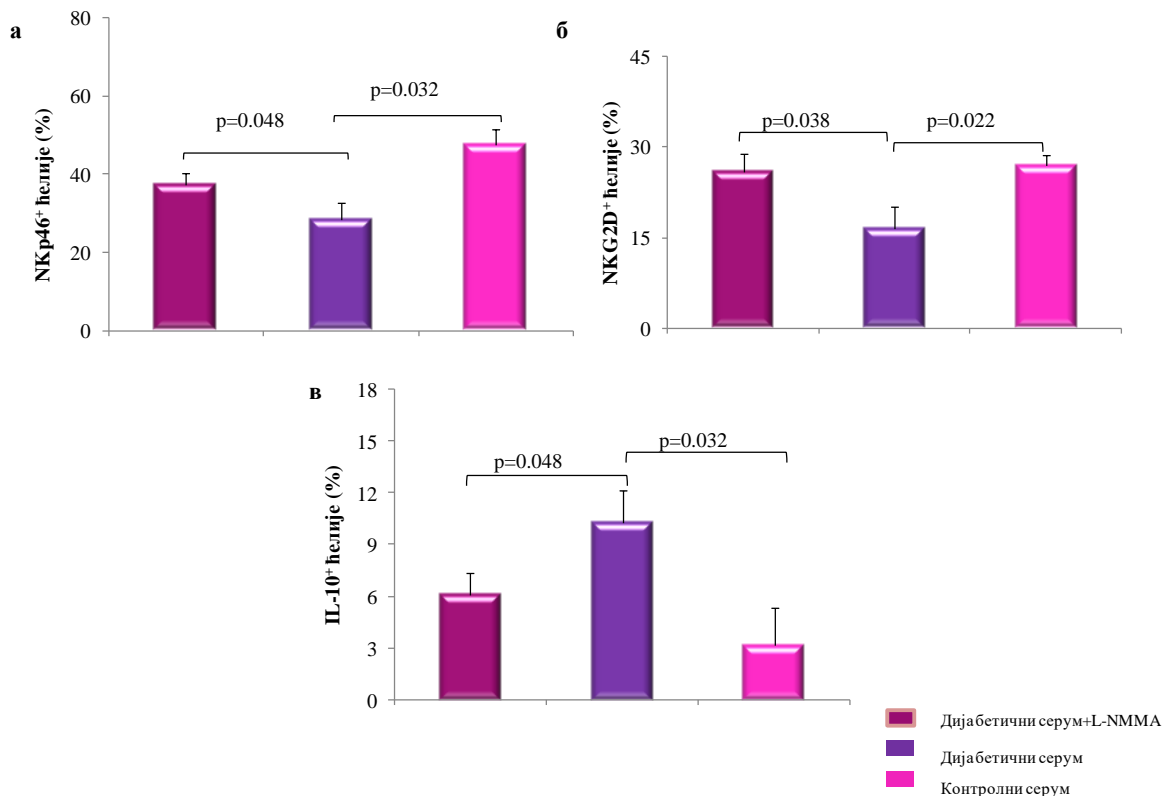


**Фигура 33.** Дијабетес мелитус повећава експресију iNOS и IDO у MDSCs. Мишеви који су примили STZ имају у слезини значајно већи проценат iNOS<sup>+</sup> (а) и IDO<sup>+</sup> (б) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr<sup>+</sup>MDSCs у односу на мишеве третиране CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је Student T тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови iNOS<sup>+</sup> и IDO<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr<sup>+</sup>MDSCs за све експерименталне групе.



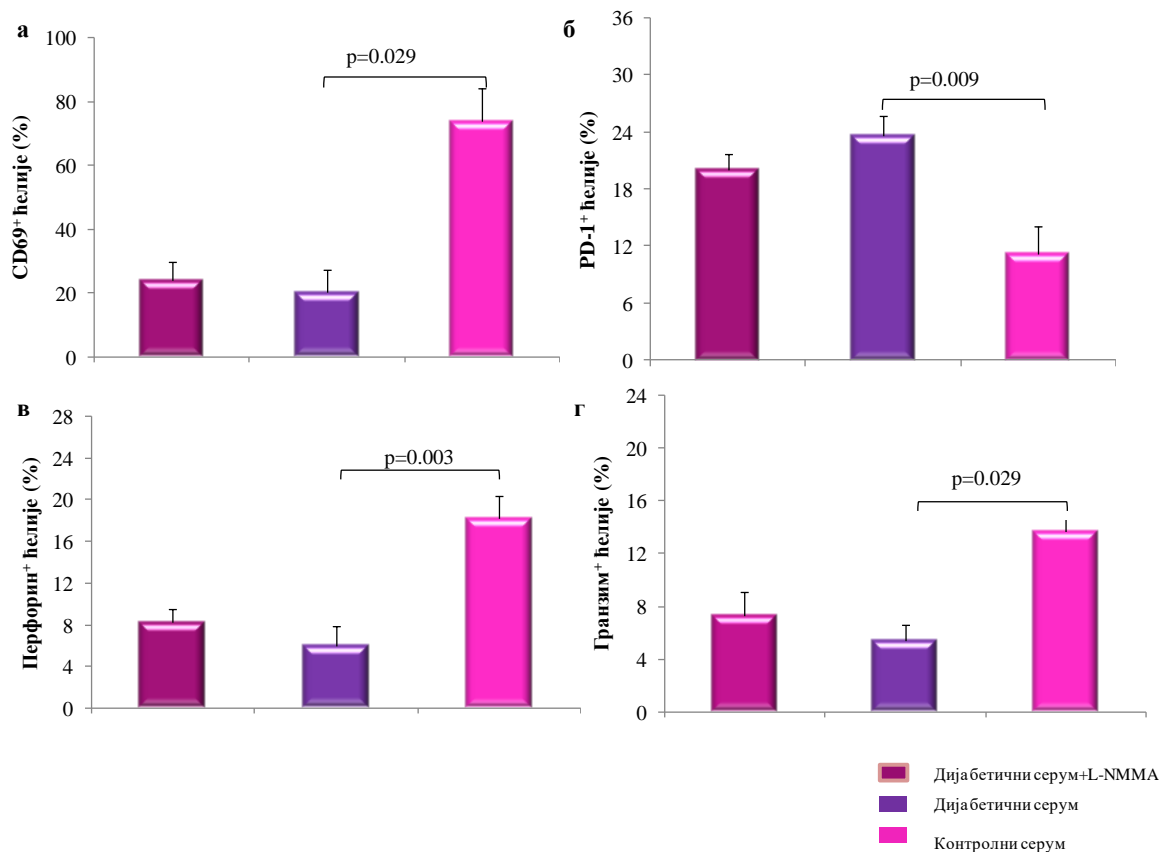
**Фигура 34.** Дијабетес мелитус повећава експресију iNOS и IDO у дендритским ћелијама. Мишеви који су примили STZ имају у слезини значајно већи проценат iNOS<sup>+</sup> (а) и IDO<sup>+</sup> (б) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs у односу на мишеве третиране CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом. Приказани су репрезентативни FACS-плотови iNOS<sup>+</sup> и IDO<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs за све експерименталне групе.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прог्रेसију мишјег тумора дојке



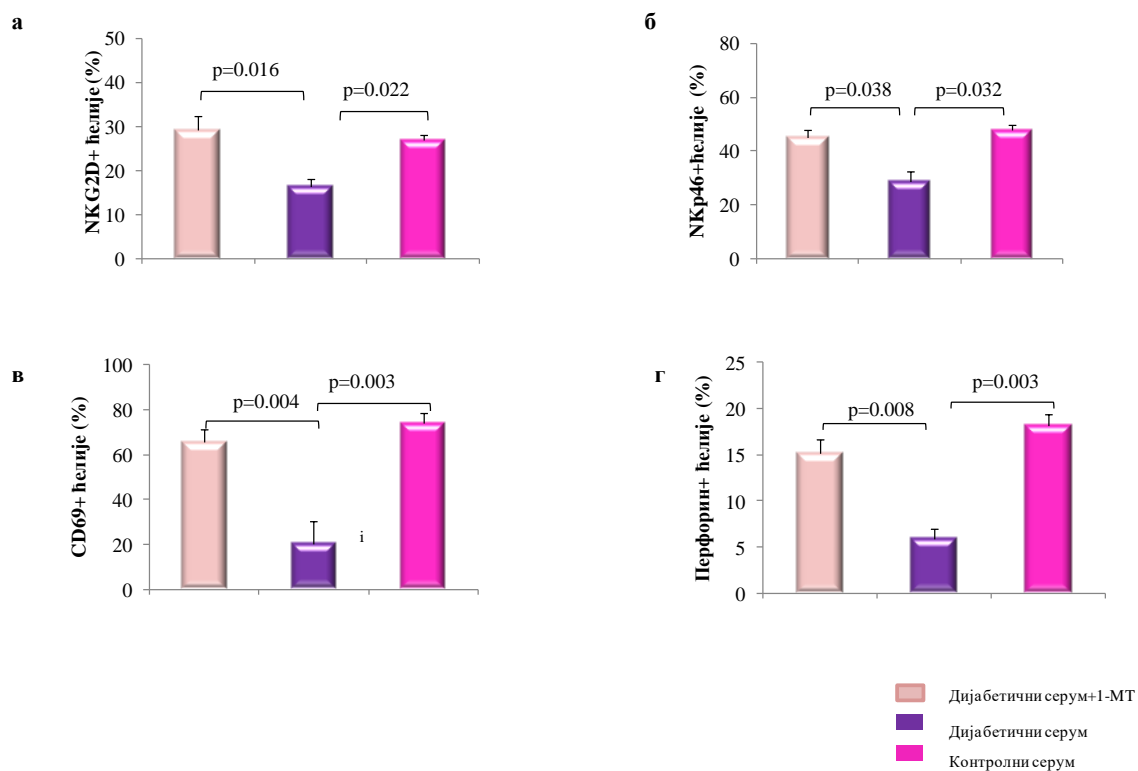
**Фигура 35: L-NMMA повећава експресију NKp46 и NKG2D а супримира продукцију IL-10.** Додатак L-NMMA је значајно повећао експресију NKp46 (а), NKG2D (б), а смањио продукцију IL-10 (в) у CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> NK ћелијама у поређењу са популацијом ћелија култивисаних у дијабетичном серуму без додатка L-NMMA. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке



**Фигура 36: L-NMMA не утиче на експресију CD69 и PD-1 као ни на продукцију перфорина и гранзима.** Додатак L-NMMA није утицао на експресију CD69 (а) и PD-1 (б) нити на продукцију перфорина (в) и гранзима (г) у CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> НК ћелијама у поређењу са популацијом ћелија култивисаних у дијабетичном серуму без додатка L-NMMA. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

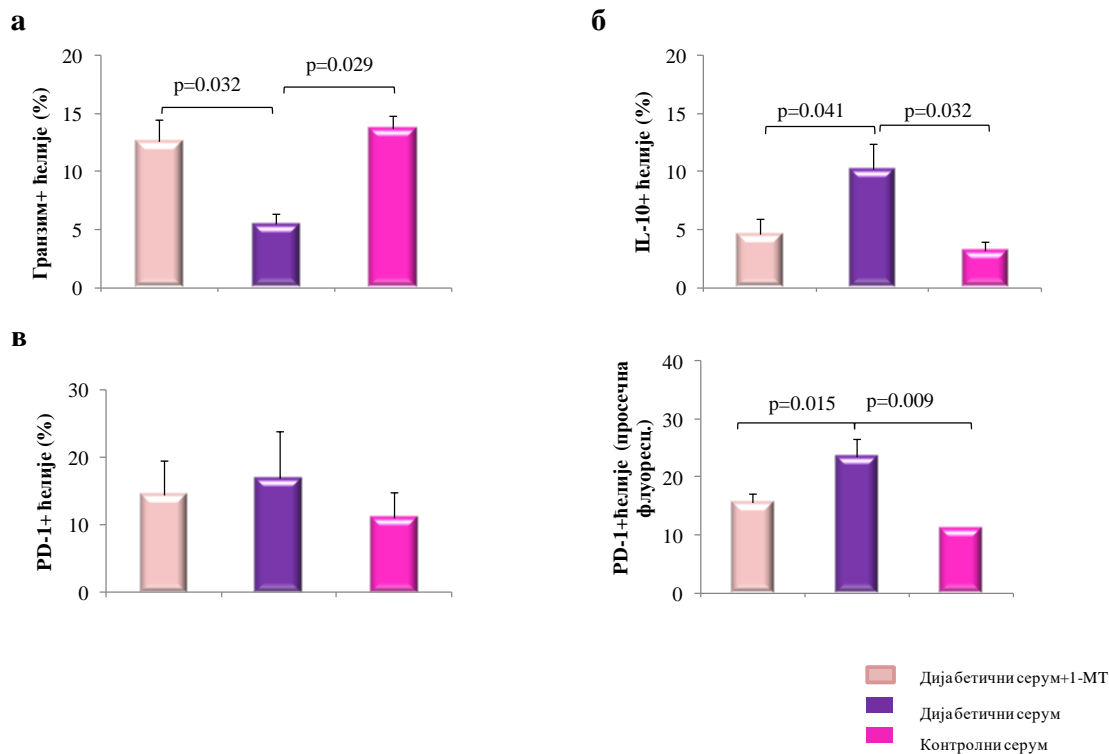
Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке



**Фигура 37: 1-МТ неутралише супресивни ефекат дијабетичног серума.** Додатак 1-МТ је значајно повећао експресију NKG2D (а), NKp46 (б) и CD69 (в) и перфорина (г) у CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> НК ћелијама у поређењу са популацијом ћелија култивисаних у дијабетичном серуму без додатка 1-МТ. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.



Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишићег тумора дојке



**Фигура 38: 1-МТ неутралише супресивни ефекат дијабетичног серума.** Додатак 1-МТ је значајно повећао проценат гранзим продукујућих CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> (а) NK ћелија у поређењу са ћелија култивисаним у дијабетичном серуму без додатка 1-МТ. Додатак 1-МТ је значајно смањило проценат IL-10 продукујућих CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелија (б) као и експресију PD-1 молекула по CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NK ћелији (в) у поређењу са NK ћелијама које су култивисане само у дијабетичном серуму. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

## 5. ДИСКУСИЈА

У овој студији испитиван је утицај дијабетес мелитуса на раст и развој тумора дојке и на модулацију антитуморског имунског одговора у експерименталном мишићем моделу карцинома дојке.

По први пут, показали смо да се код мишева третираних стрептозотоцином раније појављује палпабилан примарни тумор. Дијабетес убрзава и раст тумора, средња вредност пречника и масе примарног тумора је била значајно већа у групи мишева третираних стрептозотоцином у поређењу са групом мишева третираних цитратним пуфером.

У мишева третираних стрептозотоцином, детектована је значајно мања цитотоксичност спленоцита и НК ћелија према туморским ћелијама. Након уклањања НК ћелија *in vivo*, нестала је разлика у брзини раста и величини тумора између мишева третираних STZ-ом, односно СВ-ом, указујући да је модулација функције НК ћелија веома значајна за разлику у динамици раста и величини тумора у дијабетичних мишева.

У даљем истраживању, показано је да дијабетес мелитус значајно смањује експресију NKG2D, перфорина, IFN- $\gamma$ , IL-17, а повећава експресију PD-1 молекула и IL-10 на спленичним НК ћелијама. Такође је потврђено да дијабетес мелитус повећава системску концентрацију IL-10 и поспешује акумулацију имуносупресивних ћелија у слезину мишева са тумором дојке. Анализа туморске микросредине одражава ефекат забележен у периферним лимфним органима: дијабетес смањује акумулацију NKG2D<sup>+</sup> НК ћелија а повећава проценат PD-1<sup>+</sup> НК ћелија и фаворизује акумулацију мијелоидних супресорских ћелија у примарном тумору.

У наставку студије, серијом *in vitro* експеримената, показано је да дијабетични серум мења фенотип НК ћелија смањујући експресију активационих и повећавајући експресију инхибиционих рецептора. Пег-каталаза, која анулира ефекте оксидативног стреса није значајно изменила функционални фенотип НК ћелија, указујући на други механизам одговоран за измењен фенотип НК ћелија у дијабетичним условима.

Како је детектована већа експресија индуцибилне азот моноксид синатазе (iNOS) и индоламин 2,3 диоксигеназе (IDO) у слезинским MDSCs и DCs, у наредним *in vitro* експериментима, спленоцити су култивисани у присуству 1-метил триптофана (1-MT), селективног блокатора IDO, као и у присуству селективног блокатора iNOS. Блокада

iNOS-а мења фенотип NK ћелија: повећава експресију активационих и туморицидних а смањује експресију инхибиционих и имуносупресивних молекула, док блокада IDO-а у потпуности неутралише супресивни ефекат дијабетичног серума и враћа фенотип NK ћелија на ниво здравог миша.

### 5.1. Дијабетес мелитус убрзава појаву и раст примарног тумора дојке

Претходне клиничке и анималне студије су јасно указале на повезаност дијабетес мелитуса тип 1 и тип 2 и повећаног ризика од развоја карцинома, док су се друге студије бавиле испитивањем механизма укључених у ове процесе (366-372). Према Варбурговој хипотези, ћелије тумора користе далеко више глукозе за енергију и преживљавање него регуларне ћелије, имплицирајући да хипергликемија може олакшати раст тумора (209,210,373). Недавна студија показала је да појачан оксидативни стрес, који настаје као последица дијабетес мелитуса, поспешује експресују адхезивних молекула на ендотелним ћелијама крвних судова и тиме олакшава метастазирање ћелија меланома у плућа и јетру мишева (366). Предложени механизми објашњавају могућу везу између дијабетеса и убрзане генезе и прогресије тумора. Међутим, улога дијабетеса у расту примарног тумора и имунском одговору на тумор није испитана.

У овој студији мишевима је индукован дијабетес једном сублеталном дозом стрептозотоцина. Ти мишеви су имали значајно повећање вредности гликемије, а након 4 недеље и значајно мању телесну масу у поређењу са контролном групом мишева која је примила само цитратни пуфер (Фигура 1). Са циљем да се прати ефекат дијабетеса на биологију тумора дојке, 4Т1 ћелије карцинома дојке убризгане су у млечну жлезду мишева 28. дана након апликације стрептозотоцина односно цитратног пуфера.

Дијабетични мишеви су раније развили палпабилни примарни тумор и забележен је тренд знатно бржег туморског раста и значајно већи пречник палпабилног тумора у поређењу са контролном групом мишева (Фигуре 3а, 3в). Такође, средња вредност масе примарног тумора, након екстирпације, је била значајно већа у групи мишева третираних стрептозотоцином у поређењу са групом мишева третираних цитратним пуфером (Фигура 3б). Добијени резултати недвосмислено показују да дијабетес, изазван једном сублеталном дозом стрептозотоцина, убрзава појаву и раст тумора дојке.

## 5.2. Дијабетес смањује антитуморску цитотоксичност НК ћелија

Из ранијих студија је познато да у супресији раста тумора, поред унутрашњих ћелијских фактора као што су тумор супресор гени, значајну улогу игра антитуморски имунски одговор (374). НК ћелије, као представници урођене имуности, препознају измењене МНС молекуле I класе на туморским ћелијама или пак региструју недостатак МНС молекула I класе и убијају их.  $CD8^+$  Т лимфоцити детектују аберантне антигене настале услед мутација, претеране или ектопичне експресије гена (374,375). Такође је познато да супримиран имунски одговор и преминација имуносупресивних ћелија убрзава настанак и раст тумора. Скорашња студија је показала да трансфер мијелоидних супресивних ћелија узрокује развој хроничне инфламације и супресију  $CD8^+$  Т лимфоцита што за последицу има убрзан настанак, раст и прогресију карцинома у дебелом цреву (376,377).

Наша студија показује да дијабетес убрзава прогресију тумора дојке. Како у контроли раста и прогресије тумора кључну улогу игра антитуморска имуност, ми смо се у наставку истраживања фокусирали на испитивање утицаја дијабетеса на компоненте антитуморског имунског одговора. Претходне студије нису испитивале утицај дијабетеса на антитуморску имуност. Прво смо анализирали цитотоксичност укупних спленоцита према туморским ћелијама. Показали смо да су спленоцити изоловани из дијабетичних мишева који су развили тумор имали значајно мању цитотоксичку активност у поређењу са онима изолованим из контролних мишева са развијеним тумором (Фигура 4). Закључујемо да дијабетес смањује цитотоксичност спленоцита. У наредном кораку испитивали смо цитотоксичку активност изолованих НК ћелија и  $CD8^+$  Т лимфоцита, како бисмо испитали која је ћелијска популација „одговорна“ за смањену цитотоксичност.

Зна се да хипергликемија, гојазност, резистенција на инсулин и инфламација могу на различите начине утицати на ефекторске ћелије укључене у антитуморску имуност (145,378,379). Недавно, Чен и сарадници су показали да је цитотоксички капацитет  $CD8^+$  цитотоксичких Т лимфоцита смањен код мишева третираних STZ-ом који су развили меланом (367). Такође је показано да у дијабетичним условима  $CD8^+$  Т лимфоцити продукују значајно мање перфорина и  $TNF-\alpha$  (367). Међутим, у нашем истраживању није уочена значајна разлика у цитотоксичкој активности  $CD8^+$  Т лимфоцита према 4T1 туморским ћелијама, *in vitro* (Фигура 5). Док су у овом животињском моделу показали да  $CD8^+$  Т лимфоцити играју важну антитуморску

улогу, у нашим ранијим студијама активирани CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити нису играли запажену улогу (380,381). У складу са нашим резултатима је и чињеница да је 4Т1 слабо имуногена мишја ћелијска линија тумора дојке као и претходни налази који указују да је урођени имунски одговор важан у антитуморском одговору у овом туморском моделу (380,381). Показано је да је цитотоксичност НК ћелија важна у имунском надзору и имунском одговору на тумор, а такође смо потврдили измењен цитотоксички капацитет и фенотип НК ћелија код дијабетичних мишева пре индукције тумора (380,382,383). У нашој студији, НК ћелије изловане из слезине мишева третираних STZ-ом су показале значајно мању цитотоксичност према 4Т1 ћелијама у односу на НК ћелије изловане из слезине мишева третираних СВ-ом (Фигура 6).

Да би потврдили повезаност смањене цитотоксичности НК ћелија и смањене антитуморске имуности дијабетичних мишева *in vivo*, уклонили смо НК ћелије уз, инокулацију тумора у дијабетичним и контролним мишевима. Уклањањем НК ћелија *in vivo*, раст тумора је убрзан у обе експерименталне групе, а разлика у расту тумора између група мишева је анулирана, што је у складу са резултатима претходног *in vitro* експеримента (Фигура 7а-г). Ови налази указују на кључну улогу супримиране активности НК ћелија у убрзаној појави и расту тумора код дијабетичних мишева. Многа истраживања указују на важност цитотоксичке активности НК ћелија у контроли раста тумора дојке и метастазирања (384-388). Цитотоксичност НК ћелија била је знатно мања код особа са високом породичном туморском инциденцом (предиспозиција за развој тумора) у односу на особе са ниском инциденцом (389). Такође, резултати истраживања корелације ремисије леукемија код деце са цитотоксичном активношћу НК ћелија показују јаку везу појаве болести и смањене цитотоксичности НК ћелија (390).

### 5.3. Дијабетес модулише функционални фенотип НК ћелија, *in vivo*

До сада приказани резултати указују да дијабетес није значајно утицао на цитотоксичност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. Смањена цитотоксичност НК ћелија и анулирање динамике раста тумора након деплеције истих разлог су да се фокусирамо на утицај дијабетеса на фенотип НК ћелија.

Родацки и сар. показали су да НК ћелије код пацијената са дуготрајним дијабетесом типа 1 имају знатно мању експресију р30/р46 НК рецептора у односу на оболеле са контролисаним дијабетесом (176). Интересантно је да и NOD мишеви и

пацијенти са дијабетесом такође имају благо смањење експресије NKG2D активационог рецептора на НК ћелијама (391,392). У наставку истраживања смо испитали функционални фенотип НК ћелија изолованих из слезина мишева 28. дана након апликације стрептозотоцина. Познато је да је стрептозототин токсични глукозни аналог који се везује за глукозне транспортере на ћелијама панкреаса, првенствено, узрокујући његово оштећење, због чега се и користи за развијање анималног модела дијабетеса (56). Међутим, његово дејство је неселективно, стога се везује за све ћелије које на свој мембрани имају глукозне транспортере попут хепатоцита, скелетних мишићних ћелија, ћелија бубрега (56). Скорашња студија је анализирао ефекат овог дијабетогеног агенса и на ћелије имунског система. Показано је да узрокује лимфопенију како у крви тако и у слезини. Стрептозототин је повећао проценат регулаторних Т лимфоцита у крви и слезини мишева (укупан број регулаторних Т лимфоцита се није разликовао од контролне групе мишева) као и концентрацију TGF- $\beta$  мерену 3. и 7. дана након апликације стрептозотицина, док је директан токсични ефекат остварио на CD8<sup>+</sup> Т и В лимфоците искључиво у *in vitro* условима (393). Како је експериментима трансплантације панкреасних острваца показано да стрептозототин изазива супресију до 20 дана након апликације, ми смо животиње жртвовали најраније 28. дана након апликације (393), како бисмо избегли његов имуносупресивни ефекат. Анализирали смо експресију површинских молекула NKG2D и PD-1 као и интрацелуларну експресију перфорина, IFN- $\gamma$  и IL-17 и IL-10.

Активациони рецептор NKG2D је молекул експримиран на НК ћелијама, НК-Т ћелијама,  $\gamma\delta$  Т и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима као и на одређеним субпопулацијама CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита (394,395). NKG2D рецептор препознаје протеине који по својој структури наликују МНС молекулима I класе (енгл. *MHC class I-like proteins*) (396). Код људи, NKG2D рецептор најчешће препознаје МIС протеине које кодирају MICA и MICB гени (енгл. *MHC class-I polypeptide-related chain*) (394). Хумани NKG2D рецептор препознаје и везује јоше једну фамилију гликопротеина који су кодирани RAET1 (познати и као ULBP) генима. Код мишева NKG2D рецептор се везује за следеће лиганде: Rae1 $\alpha$ , Rae1 $\beta$ , Rae1 $\gamma$ , Rae1 $\delta$  и Rae1 $\epsilon$  (енгл. *Retinoic Acid Early Transcript 1*), MULT1, H60a, H60b и H60c (397-401). Експресија лиганата за NKG2D рецептор је регулисана транскрипционим, транслационим и посттранслационим механизмима (402). NKG2DL нису експримирани на здравим ћелијама и ткивима (изузев мишићег RAET1 који је конститутивно експримиран на ћелијама током развоја ембриона) (403).

Међутим, било која ћелија у стресу, инфицирана, измењена или оштећена ћелија може на својој мембрани експримирати један или више различитих NKG2DL (404,405). Аберантна експресија NKG2DL детектована је на ћелијама на местима инфламације у различитим аутоимунским болестима, попут реуматоидног артритиса, дијабетес мелитуса, целиакије, Кронове болести, атеросклерозе, алопеције и астме (406).

Многе туморске ћелије различитог порекла експримирају на својој мембрани различите NKG2DL (407). Фактори који доприносе експресији гена NKG2DL регулисани су како унутрашњим факторима туморске ћелије тако и факторима окружења. Ово чини туморске ћелије осетљивим на елиминацију, NKG2D посредованом активацијом NK ћелија. Везивање лиганда за NKG2D покреће активациони сигнал у NK ћелијама који резултира дегранулацијом, ослобађањем перфорина и гранзима и секрецијом цитокина (408).

Перфорин је гликопротеин неопходан за формирање пора на ћелијској мембрани циљне ћелије (409). Главни извори перфорина су NK ћелије и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити, иако у одређеним ситуацијама и одређене субпопулације CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита могу да продукују ове цитолитичке грануле уколико је цитотоксичност NK ћелија и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита неефикасна (410,411). По ослобађању, молекули перфорина полимеризују, инкорпорирају свој хидрофобни регион у липидну мембрану циљне ћелије и формирају цилиндричне отворе пречника 5-20nm који обезбеђују неометан пролаз воде, јона, молекула мале молекулске тежине и ензима (409,412). Наши налази показују да дијабетес смањује експресију активационог рецептора NKG2D као и продукцију перфорина у NK ћелијама изолованим из слезина мишева (Фигура 8). Овакав налаз смањене експресије активационог рецептора и смањене продукције цитолитичких молекула је у складу са налазом смањене цитотоксичке активности NK ћелија према 4Т1 туморским ћелијама, *in vitro*.

Интрацелуларно бојење је показало смањену продукцију проинфламацијских цитокина IFN- $\gamma$  и IL-17 у NK ћелијама изолованим из дијабетичног миша (Фигура 9). IFN- $\gamma$  је цитокин кључан за индуковање и модулацију имунског одговора (413). Извор IFN- $\gamma$  су бројне ћелије попут CD4<sup>+</sup> Th1 и CD8<sup>+</sup> лимфоцита, NKT и NK ћелија (414,415). IFN- $\gamma$  игра значајну улогу у антитуморском имунском одговору јер индукује активацију макрофага и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у туморском ткиву (416). IFN- $\gamma$  повећава експресију МНС молекула I класе на туморским ћелијама, што доприноси повећаној имуногености туморских ћелија (417). На овај начин се CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити активирани

дејством IFN- $\gamma$  регрутују у туморској микросредини, препознају антигене презентоване у склопу МНС молекула I класе на туморским ћелија и елиминишу их. Познато је и да рекомбинантни IFN- $\gamma$  остварује антипролиферативни, антиангиогени и проапоптотски ефекат у туморској микросредини (418-424).

IL-17 је проинфламацијски цитокин који доминантно продукују CD4<sup>+</sup> Th17 лимфоцити (425). У мањој мери извор IL-17 могу бити и ћелије које припадају урођеној имуности попут  $\gamma\delta$  Т лимфоцита и Th 17 лимфоидних ћелија (426-428). Пред значајне протективне улоге у борби против екстрацелуларних микроорганизама и гљивица, данас се IL-17 повезује са настанком бројних аутоимунских болести као што су инфламаторне болести црева, мултипла склероза, псоријаза, реуматоидни артритис (429). Улога IL-17 у антитуморском имунском одговору и даље је неразјашњена. Одређене студије су показале да IL-17 делује проангиогенетски на ендотелне ћелије и фибробласте, да концентрација овог цитокина корелира са микроваскуларном густином у туморима и да поспешује продукцију васкуларног ендотелног фактора раста (430,431). Међутим, спекулише се да овако настала ангиогенеза доприноси антитуморском имунском одговору јер омогућава допремање ћелија имунског система до унутрашње масе солидног тумора (425). Такође, бројне студије тврде да су CD4<sup>+</sup> Th17 лимфоцити много ефикаснији у елиминацији туморских ћелија од CD4<sup>+</sup> Th1 лимфоцита и да су важни за ефикасну активацију цитотоксичких Т лимфоцита (425). CD4<sup>+</sup> Th17 поспешује сазревање дендритских ћелија што узрокује и повећану експресију МНС молекула II класе и костимулаторних молекула, а самим тим и презентацију туморских антигена Т лимфоцитима (432).

У нашој студији, дијабетес је повећао проценат PD-1<sup>+</sup> NK ћелија и IL-10 продукујућих NK ћелија (Фигура 10). PD-1 молекул везујући се за рецептор на Т и В лимфоцитима инхибира пролиферацију ових ћелија и тиме супримира имунски одговора (433). IL-10 је имунорегулаторни цитокин који продукују бројне имуносупресивне ћелије. IL-10 остварује имуносупресивни ефекат блокадом макрофага и Т лимфоцита. Бројне студије описују плејотропну функцију IL-10 у туморској микросредини (434). Постоје докази да концентрација IL-10 корелира са лошијом клиничком сликом пацијената са развијеним тумором (435). Наши резултати су у складу са претходно поменути студијама које показују да се код људи с дијабетесом мења фенотип NK-ћелија (145,176).

Анализа функционалног фенотипа NK ћелија показала је да дијабетично стање смањује



експресију активационог рецептора као што је NKG2D, продукцију цитолитичких молекула као што је перфорин и проинфламацијских цитокина IFN- $\gamma$  и IL-17, док фаворизује експресију молекула PD-1 и продукцију имуносупресивног IL-10 у NK ћелијама изолованим из слезине. Ови налази, заједно са раније описаном смањеном цитотоксичком активношћу NK ћелија изолованих из STZ-третираних мишева указују да дијабетес супримира туморицидни фенотип NK ћелија.

Анализа функционалног фенотипа CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита показала је да дијабетично стање значајно повећава експресију само KLRG-1 на спленичним CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима мишева након индукције тумора, док није утицало на експресију и продукцију других цитолитичких и проинфламацијских молекула (Фигура 14в), што је у складу са раније описаном неизмењеном цитотоксичношћу CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита.

У наставку истраживања анализирали смо туморску микросредину, тачније функционални фенотип тумор инфилтришућих NK ћелија. Нисмо пронашли разлику у проценту тумор инфилтришућих NK ћелија. Дијабетично стање је значајно смањило акумулацију NK ћелија које експримирају активациони рецептор NKG2D (Фигура 22а). Такође је регистрован значајно већи проценат PD-1<sup>+</sup> NK ћелија у примарном тумору мишева третираних STZ-ом (Фигура 22б). Резултати указују на то да дијабетес фаворизује акумулацију слабо функционалних NK ћелија у примарном тумору.

#### **5.4. Култивација у серуму дијабетичних мишева модулише активациони фенотип NK ћелија, *in vitro***

У литератури су описани различити механизми који су одговорни за имуносупресивне ефекте дијабетеса. Ми смо тестирали неколико хипотеза да идентификујемо медијаторе одговорне за измењен функционални фенотип NK ћелија: утицај хипергликемије, оксидативног стреса или посредство имуносупресивних ћелија и њихових медијатора. Прво смо испитивали да ли је забележен феномен последица хипергликемије, за коју је познато да директно интерферира са функцијом ендоплазматичног ретикулума (ЕР), фаворизује акумулацију неисправних протеина у лумену, чиме се промовише стрес ЕР, који заузврат смањује експресију активационих рецептора на NK ћелијама (145). У литератури је познато је да стрес ендоплазматског ретикулума може бити одговоран за супресију функције ћелија имунског система. Ендоплазматски ретикулум игра кључну улогу у транслацији протеина, формирању

секундарне, терцијарне и кватерне структуре протеина као и у посттранслаторној модификацији протеина. Дејство различитих физичких и хемијских фактора може директно утицати на функцију ендоплазматског ретикулума, реметити адекватну синтезу протеина, што за последицу има нагомилавање несавијених протена (436,437).

Спленоцити изоловани из здравог миша су култивисани 24 часа у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, серум коме је додата глукоза или серум изолован из контролног миша. Унутар култивисане популације спленоцита анализиран је функционални фенотип НК ћелија: експресија KLRG-1, PD-1, NKp46, CD107a и продукција перфорина, гранзима, IFN- $\gamma$  и IL-17.

KLRG1 рецептор (енгл. *Killer Cell Lectin-like Receptor G1*) је трансмембрански протеин који припада фамилији С-типа лектинских рецептора. Овај рецептор преобладајуће експримирају НК ћелије и меморијски Т лимфоцити и код људи и мишева (438). Експресија овог рецептора се повећава са годинама али и са степеном диференцијације ћелија, тако да се највећи проценат експресије уочава на меморијским ћелијама и терминално диферентованим ћелијама (439). KLRG1 рецептор поседује инхибиторни тирозински рецепторски домен (енгл. *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) на интрацитоплазматском сегменту. Претходне анималне студије су показале да унакрсно повезивање TCR и KLRG-1 смањује инфлукс калцијума у Т лимфоцит и самим тим супримира продукцију IL-2 (440). Познато је да су N- и E-кадхерини главни лиганди за KLRG-1 рецептор (441). N- и E-кадхерини су калцијум зависни гликопротеини значајни за међућелијске адхезију, ћелијску миграцију и инвазивност туморских ћелија (442). Експерименти у којима су коришћени KLRG-1 трансгени мишева су показали да присуство E кадхерина инхибира пролиферативни капацитет CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. Познато је да инвазивне форме туморских ћелијских линија експримирају N- и E-кадхерине. Раније студије су показале да истовремена активација KLRG1 рецептора инхибира цитолитичку активност НК ћелија и продукцију IFN- $\gamma$ . Хумане студије су потврдиле претходне резултате добијане у анималним моделима да интеракција KLRG-1 рецептора и лиганда инхибира цитолитичку активност хуманих НК ћелија супримирајући и дегранулацију и ослобађање IFN- $\gamma$  (443). Скорашња испитивања су такође потврдила да везивање лиганда за KLRG-1 рецептор на Т лимфоциту инхибира NFAT сигнални пут и лизу посредовану молекулом CD95 (444). Блокада сигнализације са KLRG-1 рецептора, применом антитела против E-кадхерина, повећава пролиферативну активност која се

огледа повећаном синтезом циклина D и E, а смањеном синтезом инхибитора циклина P27 (438). Према томе, сматра се да интеракција кадхерина и KLRG-1 рецептора супримира урођени и стечени имунски одговор и смањује ефикасност антитуморског имунског одговора.

Мембрански протеин 1 удружен са лизозомом (енгл. *Lysosome-Associated Membrane Protein 1*, LAMP-1 (CD107a)) је гликопротеин који припада фамилији мембранских гликопротеина удружених са лизозомом (445). CD107a је трансмембрански протеин који представља маркер дегранулације NK ћелија и цитотоксичких Т лимфоцита (446). Он одржава стабилност лизозомалне мембране. Такође, он облаже и унутрашњу површину цитолитичких гранула. Након дегранулације, CD107a се екпримира на површини NK ћелија и цитотоксичких Т лимфоцита и штити спољашњу мембрану од дејства ослобођеног перфорина (447).

Додатак глукозе у серум контролних животиња повећао је експресију KLRG-1 (Фигура 25а) и PD-1 (Фигура 25б) на NK ћелијама, а смањио НКр46 и перфорина (Фигуре 26а, 26б). Култивација у дијабетичном серуму додатно је повећала експресију KLRG-1 (Фигура 25а) и PD-1 (Фигура 25б) на NK ћелијама, а смањила је експресију НКр46 (Фигура 25а) и продукцију перфорина (Фигура 25б). Дијабетични серум је такође значајно смањио проценат IFN- $\gamma$  продукујућих NK ћелија (Фигура 27а), смањио је продукцију IL-17 (Фигура 27б) као и гранзима (Фигура 28а) и експресију CD107a (Фигура 28б). Ови резултати показују да сама хипергликемија није кључна за промену фенотипа NK ћелија код дијабетеса што оставља најмање две могућности које не искључују једна другу: дејство појачаног оксидативног стреса и дејство имуносупресивних ћелија.

Познато је да хипергликемија покреће стрес ендоплазматског ретикулума и онемогућава функционисање ћелије те ћелија повећава синтезу молекула шаперона који у енплазматском ретикулуму везују неформиране протеине. Стога смо у наставку студије анализирали експресију гена који кодирају молекуле шаперона, у хомогенату слезина мишева третираних STZ-ом односно СВ-ом. Одсуство разлике у експресији шаперона DAP10, EDEM, ATF4, CHOP, BiP, GRP94 (Фигуре 29а-ђ) у спленоцитима мишева третираних STZ-ом у односу на контролну групу мишева показује да нема разлике у стресу ендоплазматског ретикулума спленоцита и потврђује нашу тврдњу да висока концентрација глукозе у крви не игра кључну улогу у модулацији функционалног фенотипа спленоцита.

Анализирали смо и утицај дијабетеса на апоптозу спленоцита. Дијабетични серум је у *in vitro* условима значајно повећао процентуалну заступљеност анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>-</sup> спленоцита (Фигура 30а) као и анексин<sup>+</sup>пропидијум јодид<sup>+</sup> спленоцита (Фигура 30б) у односу на спленоците култиване у серуму коме је додата глукоза односно на спленоците култиване у серуму изолованом из здравог миша. Истраживања других група показују да оксидативни стрес директно индукује активацију унутрашњег митохондријалног пута, ослобађањем цитохрома С и активацијом каспазе 3 што резултира апоптозом (490). Друга студија сугерише да хипергликемија индукује апоптозу ћелија гломерула бубрега и повећава експресију Fas рецептора, Fas лиганда на ћелијама гломерула и тубула бубрега (491). У складу са резултатима других студија, значајно повећање процентуалне заступљености рано и касно апоптогичних ћелија након култивације у дијабетичном серуму указује на доминантан утицај дијабетичног серума, али не и саме хипергликемије на вијабилност спленоцита.

#### **5.5. Неутрализација појачаног оксидативног стреса не мења значајно функционални фенотип NK ћелија, *in vitro***

У нашој студији, повећање концентрације каталазе указује на повећане системске вредности H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, једног од главних кисеоничних слободних радикала (ROS), у дијабетичних мишева (Фигура 2а). Раније студије су показале да реактивни кисеонични радикали, којима је богат серум дијабетичних мишева, могу супримирати активност NK ћелија кроз смањење експресије активирајућих рецептора као што је NKG2D (448,449). Такође је показано да ROS супримирају имунски одговор деплетирајући у ћелијама цистин и цистеин који су неопходни за синтезу антиоксиданса глутатиона (450,451). У циљу испитивања ефекта кисеоничних слободних радикала у нашем моделу, спленоцити изоловани из здравог миша су култивисани 24 часа у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша коме је додата пег-каталаза како би се неутралисао ефекат појачаног оксидативног стреса, док су контролну групу сачињавали спленоцити култивисани у медијуму који садржи само серум изолован из дијабетичног миша. Унутар култивисане популације спленоцита анализиран је функционални фенотип NK ћелија: експресија NKp46, и продукција перфорина, гранзима, IFN- $\gamma$  и IL-17.

Додавање пег-каталазе и следствено блокирање појачаног оксидативног стреса прати повећање експресије само NKp46, док није утицало на експресију или производњу других маркера NK ћелијске активности као што су CD107a, PD-1 и перфорин (Фигура 31). Недавна студија је показала да је *in vivo* третман са пег-каталазом значајно смањио број туморских ћелија у плућима и јетри у контролним и мишевима третираним STZ-ом (1). Међутим, наши резултати указују на неке друге медијаторе који супримирају туморицидни фенотип NK ћелија.

### 5.6. Дијабетес фаворизује акумулацију имуносупресивних ћелија у слезини и примарном тумору

У наставку студије фокус истраживања су биле имуносупресивне ћелије. Анималне и хумане студије су показале да дијабетично стање узрокује имуносупресију тиме што инхибира фагоцитну способност и миграцију и хемотаксу неутрофила и смањује продукцију проинфламацијских цитокина, фаворизује преминацију Th2 имунског одговора (167,452). У складу са ранијим резултатима о генерализованој имуносупресији је и наш резултат који показује да је ниво IL-10 значајно повећан у серуму дијабетичких мишева (Фигура 17). Познато је да су имуносупресивне ћелије као што су MDSCs, Tregs и незреле DCs важни регулатори урођене и стечене имуности и све могу бити извор IL-10 (453,454). Такође је познато да имуносупресивне ћелије продукујући различите солубилне факторе попут TGF- $\beta$ , IL-10, аргиназе-1, азот оксида, индоламин 2,3-диоксигеназе (IDO), простагландина E2 и реактивних кисеоничних једињења онемогућавају цитотоксичку функцију NK ћелија инхибицијом продукције IFN- $\gamma$  и експресије активационих рецептора (241,455-457). Изгледа да дијабетични услови олакшавају акумулацију супресивних CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs у слезину, пре инокулације тумора (Фигура 18a). Током раста тумора регрутоване MDSCs омогућавају настанак, поларизацију, активацију и миграцију Tregs (56,392,393). Тако је дијабетично стање значајно повећало акумулацију TGF- $\beta$  продукујућих MDSCs у слезиној (Фигура 18b). Штавише, детектована је повећана акумулација CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs лимфоцита. (Фигура 19a) као и IL-10 продукујућих CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs лимфоцита у слезини дијабетичних мишева са тумором (Фигура 19b). Уочили смо и да дијабетес мелитус повећава акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у примарном тумору мишева. Процент CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs и TGF- $\beta$  продукујућих CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs је значајно већи у примарном тумору дијабетичних мишева (Фигуре 23a,

236). Ситрин и колеге тврде да Tregs лимфоцити контролишу функцију NK ћелија контролом биорасположивости ограничене количине IL-2, у острвцима панкреаса, насталог претежно у CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима који инфилтрирају острвца у BDC2.5/NOD мишевима (458). Међутим, у нашем моделу, ово би требало да има врло ограничен ефекат јер је једна висока доза STZ токсична за β ћелије панкреаса, и не изазива значајну инфилтрацију острваца.

### 5.7. Имуносупресивне ћелије у биологији тумора дојке у дијабетичним условима

Налаз повећане акумулације имуносупресивних ћелија у слезини и примарном тумору дијабетичних мишева навео нас је да испитамо механизме којима ове ћелије могу да утичу на функционални фенотип NK ћелија. Данас је познато неколико механизма којим MDSCs супримирају NK ћелије. Оне инхибирају NK ћелије директним ћелијским контактом, преко мембрански везаног TGF-β или препознавањем активационих рецептора на NK ћелијама (459). Такође је познато да MDSCs, да би генерисале имуносупресивну туморску микросредину, производе аргиназу 1, индуцибилну азот-моноксид синтазу (iNOS), индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO), NADPH оксидазу и имуносупресивне цитокине (460). iNOS је један од производа имуносупресивних ћелија важан за синтезу NO који на даље директно супримира пролиферацију лимфоцита (461,462). Недавна студија открива већу активност iNOS-а код дијабетичара (463). Наши резултати показују да дијабетес значајно повећава процентуалну заспуљеност iNOS<sup>+</sup> MDSCs као и iNOS<sup>+</sup> DCs (Фигуре 33а, 34а). Запаљење ниског интензитета, једна од карактеристика дијабетес мелитуса, индукује активацију iNOS и следствену производњу NO која на даље повећава активност IDO-а (464,465). IDO, ензим који производе многе ћелије имунског система и строме, има снажне имуномодулаторне ефекте (466). IDO је укључен у катаболизам есенцијалне аминокиселине L-триптофана до L-кинурина, а следствени метаболити L- L-кинурина делују имуносупресивно (467-469). IDO инхибира пролиферацију и фацитира апоптозу Т лимфоцита, смањује експресију активационих рецептора на NK ћелијама изазвану IL-2, инхибира продукцију IFN-γ и фаворизује апоптозу NK ћелија (470-472). У складу са тим, у овој студији показали смо значајно повећање процента MDSCs и DCs које производе IDO у мишевима са дијабетесом (Фигуре 33б,34б).

### 5.8. Утицај блокаде IDO-а и iNOS-а на функционални фенотип НК ћелија, у дијабетичним условима, *in vitro*

Да бисмо потврдили могући имуносупресивни ефекат MDSCs и DCs преко IDO-а, блокирали смо ефекат IDO-а користећи фармаколошки инхибитор 1-MT, *in vitro*. Додавање 1-MT у дијабетични серум повећало је проценат NKG2D<sup>+</sup>, NKp46<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, перфорин и гранзим продукујућих НК ћелија (Фигуре 37а-г, 38а). Поред тога, инхибиција IDO-а у дијабетичним условима значајно смањује проценат IL-10 продукујућих CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> НК ћелија као и експресију PD-1 молекула на ћелијама CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> НК ћелијама (Фигура 38б, 38в). У поређењу са контролним серумом, додавање 1-MT у серум дијабетичних мишева скоро у потпуности обнавља функционални фенотип НК ћелија, указујући на важну улогу IDO сигналне каскаде у супресији НК ћелија у дијабетичком стању.

Азот моноксид (NO) је брзо дифундујући гас значајан у регулацији имунског одговора. Овај биоактивни молекул настаје из аминокиселине L-аргинин дејством једне од три изоформе азот синтазе (NOS): неуронске NOS (NOS1), ендотелне NOS (NOS3) и индуцибилне NOS (iNOS или NOS2) (473,474). Настали NO и реактивни азотни радикали модулишу имунски одговор инхибицијом пролиферације и диференцијације Т лимфоцита, инхибицијом пролиферације В лимфоцита и продукције антитела и цитокина (475,476). Познато је и да овај оксид утиче на активност НК ћелија супримирајући њихову цитотоксичку активност (477). Да бисмо испитали имуносупресивни ефекат азот монооксида, блокирали смо ефекат ензима iNOS додавањем инхибитора L-NG-монометил-аргинин цитрата (L-NMMA) у медијум у коме смо култивисали здраве спленоците у дијабетичном серуму. Додатак L-NMMA је значајно повећао експресију активационих рецептора NKp46 и NKG2D а смањио продукцију IL-10 у НК ћелијама у поређењу са популацијом ћелија култивисаних у дијабетичном серуму без додатка L-NMMA (Фигуре 35а, 35б, 35в). Међутим, уочава се да ефекат iNOS-NO није толико доминантан јер блокада iNOS-а није утицала на експресију CD69 и PD-1 као ни на продукцију перфорина и гранзима у НК ћелијама (Фигуре 36а, 36б, 36в, 36г). Блокада iNOS-а, *in vitro*, мења фенотип НК ћелија: повећава експресију активационих и туморицидних а смањује експресију инхибиционих и имуносупресивних молекула, али овај ефекат није значајан као блокада IDO-а.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати приказани у овом раду по први пут показују да дијабетес промовише раст тумора дојке кроз супресију антитуморског имунског одговора. Дијабетес појачава акумулацију iNOS и IDO продукујућих имуносупресивних ћелија урођене имуности и следствену инхибицију туморицидног фенотипа NK ћелија. Раст тумора дојке у дијабетичном стању би се могао контролисати развојем нових агенаса базираним на селективној блокади iNOS-а и IDO-а.

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

1. Дијабетес мелитус убрзава појаву палпабилног тумора и раст примарног тумора;
2. Дијабетес мелитус смањује цитотоксичност укупних спленочита и посебно NK ћелија;
3. Деплеција NK ћелија *in vivo* анулира разлику у динамици раста примарног тумора између контролних и мишева са дијабетесом;
4. Смањена експресија NKG2D, перфорино, IFN- $\gamma$ , IL-17, а повећана експресија PD-1 молекула и IL-10 на спленичним NK ћелијама мишева са дијабетесом;
5. Мања процентуална заступљеност NKG2D<sup>+</sup> NK ћелија и већи проценат PD-1<sup>+</sup> NK ћелија у туморској микросредини мишева са дијабетесом;
6. Култивација у серуму мишева са дијабетесом повећава проценат KLRG-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> NK ћелија, смањује експресију NKp46, CD107a и производњу перфорино, гранзима, IFN- $\gamma$  и IL-17 по NK ћелији у поређењу са серумом са додатом глукозом и контролним серумом, *in vitro*;
7. Неутрализација појачаног оксидативног стреса пег-каталазом не мења значајно функционални фенотип NK ћелија, *in vitro*;
8. Дијабетес мелитус повећава системску концентрацију IL-10 и појачава акумулацију TGF- $\beta$  продукујућих MDSCs и IL-10 продукујућих CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs, у слезини и примарном тумору мишева.
9. Дијабетес значајно повећава процентуалну заступљеност iNOS<sup>+</sup>, односно IDO<sup>+</sup> MDSCs и DCs;
10. Инхибиција iNOS-а у дијабетичним условима повећава проценат NKG2D<sup>+</sup>, NKp46<sup>+</sup> NK ћелија, а смањује проценат IL-10 продукујућих NK ћелија, *in vitro*;



11. Инхибиција IDO-а у дијабетичним условима повећава проценат NKG2D<sup>+</sup>, NKp46<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, перфорин и гранзим продукујућих NK ћелија, а смањује проценат PD-1<sup>+</sup> и IL-10 продукујућих NK ћелија, *in vitro*.

## 7. СКРАЋЕНИЦЕ

Скраћеница	Појашњење
<b>ADCC</b>	цитотоксичност зависна од антитела
<b>AGE</b>	Гликозилирани продукти (енгл. <i>Advanced Glycation End-products</i> )
<b>CB</b>	Цитратни пуфер (енгл. Citrate buffer)
<b>CTL</b>	Цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T Lymphocytes)
<b>DCs</b>	Дендритске ћелије
<b>DMSO</b>	(енгл. <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
<b>DNA</b>	(енгл. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>EDTA</b>	(енгл. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ELISA</b>	(енгл. <i>EnzymeLinkedImmunsorbentAssay</i> )
<b>FBS</b>	(енгл. <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>FADD</b>	(енгл. Fas- Associated- Death- Domain- Protein)
<b>H&amp;E</b>	хематоксилин и еозин (енгл. Hematoxylin & Eosin)
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	(енгл. <i>Hypoxia inducible factor 2-<math>\alpha</math></i> )
<b>IL</b>	Интерлеукин (енгл. <i>Interleukin</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Интерферон гама (енгл. <i>Interferon-gama</i> )
<b>iNKT</b>	инваријантне NKT ћелије
<b>IGF</b>	(енгл. <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
<b>GM-CSF</b>	(енгл. <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulatory Factor</i> )
<b>KLRG1</b>	инхибиторни рецептор (енгл. Killer Cell Lectin-Like Receptor G1)
<b>Lamp</b>	мембрански гликопротеин удружен са лизозомима (енгл. Lysosomal associated membrane glycoproteins)
<b>LPS</b>	липополисахарид
<b>MBL</b>	(енгл. <i>Manose-binding lectin</i> )
<b>MAPK</b>	протеин киназа активирана митогеном (енгл. Mitogen Activated Protein Kinase)
<b>MCs</b>	мастоцити (енгл. Mast cells)
<b>M1</b>	класично активирани макрофаги
<b>M2</b>	алтернативно активирани макрофаги
<b>MLD-STZ</b>	вишеструке мале дозе стрептозотоцина (енгл. multiple low dose)
<b>MMP</b>	металопротеиназе матрикса (енгл. Matrix Metalloproteinase)
<b>mRNA</b>	информациона рибонуклеинска киселина
<b>MTP</b>	микротитар плоча (енгл. MicroTiter Plate)
<b>MHC</b>	главни комплекс гена ткивне подударности (енгл. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>MDSC</b>	(енгл. <i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i> )
<b>NK ћелије</b>	урођене убилачке ћелије (енгл. <i>Natural Killer Cells</i> )
<b>NKG2D</b>	активациони рецептор (енгл. <i>Natural Killer Group 2, Member D</i> )
<b>iNOS</b>	Индучибилна азот моноксид синтетаза (енгл. <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>IDO</b>	Индоламин 2,3 диоксигеназа
<b>NKT</b>	(енгл. <i>Natural killer T cell</i> )
<b>PKC</b>	Протеин киназа C (енгл. <i>Proteine kinase C</i> )

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишићег тумора дојке

<b>PAMPs</b>	(енгл. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>PCR</b>	реакција ланчаног умножавања (енгл. <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>PBS</b>	(енгл. <i>Phosphate Buffered Salline</i> )
<b>RNK</b>	Рибонуклеинска киселина
<b>ROS</b>	Кисеонични слободни радикали (енгл. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>Th ћелије</b>	Помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper cells</i> )
<b>TLR</b>	(енгл. <i>Toll like receptor</i> )
<b>Treg</b>	Регулаторни Т лимфоцити
<b>TNF</b>	Фактор некрозе тумора (енгл. <i>Tumor necrosis factor</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Трансформишући фактор раста бета (енгл. <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TAM</b>	тумор асоцирани макрофаги (енгл. <i>Tumor Assosiated Macrophages</i> )
<b>TIL</b>	тумор-инфилтришући лимфоцити (енгл. <i>Tumour Infiltrating Lymphocytes</i> )
<b>VEGF</b>	Фактор раста васкуларног ендотела (енгл. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>STZ</b>	Стрептозотоцин
<b>UPR</b>	(енгл. <i>Unfolded protein responce</i> )

## 8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Vauzelle-Kervroedan F, Delcourt C, Forhan A, Jouglu E, Hatton F, Papoz L. Analysis of mortality in French diabetic patients from death certificates: a comparative study. *Diabetes Metab* 1999; 25: 404–411.
2. Maahs D M & Rewers M. Editorial: mortality and renal disease in type 1 diabetes mellitus—progress made, more to be done. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3757–3759.
3. Steffes MW et al. (EDIC Research Group). Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *J Am Med Assoc* 2003; 290: 2159–2167.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27(suppl 1): s5-s10.
5. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon)*. 2014;42(12):698-702.
6. Vermeulen I, Weets I, Asanghanwa M, Ruige J, Van Gaal L, Mathieu C, Keymeulen B, Lampasona V, Wenzlau JM, Hutton JC, et al. Contribution of antibodies against IA-2 $\beta$  and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age. *Diabetes Care*. 2011;34:1760–1765.
7. Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P & Nerup J. Long-term risk of IDDM in first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetology* 1994; 37: 321–327.
8. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S81–S90.
9. Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984;33:176–83.
10. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, VanderAuwera B, Giovannini C, Bosi E, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*. 1996;5:1075–80.

11. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* 2004;36:337–8.
12. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007;39:857–64.
13. Canivell S, Gomis R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun Rev.* 2014;13:403–407.
14. Couper J, Donaghue KC. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2009;10 Suppl 12:13–16.
15. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Fedun B, Taub F, Dobersen MJ, McEvoy RC, Cooper LZ, Notkins AL, Rubinstein P. Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with the congenital rubella syndrome. *Rev Infect Dis.* 1985;7 Suppl 1:S170–S176.
16. McIntosh ED, Menser MA. A fifty-year follow-up of congenital rubella. *Lancet.* 1992;340:414–415.
17. Stene LC, Oikarinen S, Hyöty H, Barriga KJ, Norris JM, Klingensmith G, Hutton JC, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY) Diabetes. 2010;59:3174–3180.
18. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ.* 2011;342:d35.
19. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet.* 2001;358:1500–1503.
20. Knip M, Virtanen SM, Seppä K, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O, Reunanen A, Teramo K, Hämäläinen AM, Paronen J, et al. Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. *N Engl J Med.* 2010;363:1900–1908.

21. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18:248–251.
22. Ferreira RC, Guo H, Coulson RM, Smyth DJ, Pekalski ML, Burren OS, Cutler AJ, Doecke JD, Flint S, McKinney EF, et al. A type I interferon transcriptional signature precedes autoimmunity in children genetically at risk for type 1 diabetes. *Diabetes.* 2014;63:2538–2550.
23. Kallionpää H, Elo LL, Laajala E, Mykkänen J, Ricaño-Ponce I, Vaarma M, Laajala TD, Hyöty H, Ilonen J, Veijola R, et al. Innate immune activity is detected prior to seroconversion in children with HLA-conferred type 1 diabetes susceptibility. *Diabetes.* 2014;63:2402–2414.
24. Richardson SJ, Horwitz MS. Is type 1 diabetes “going viral”? *Diabetes.* 2014;63:2203–2205.
25. Saadi H, Nagelkerke N, Carruthers SG, Benedict S, Abdulkhalek S, Reed R, Lukic M, Nicholls MG. Association of TCF7L2 polymorphism with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and markers of beta cell function and insulin resistance in a population-based sample of Emirati subjects. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;80:392–398.
26. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, Powers AC, Rhodes CJ, Sussel L, Weir GC.  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care.* 2014;37:1751–1758.
27. Druet C, Tubiana-Rufi N, Chevenne D, Rigal O, Polak M, Levy-Marchal C. Characterization of insulin secretion and resistance in type 2 diabetes of adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:401–404.
28. Rosenbloom AL, Silverstein JH, Amemiya S, Zeitler P, Klingensmith GJ. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2009;10 Suppl 12:17–32.
29. Kraemer FB, Ginsberg HN, Gerald M, Reaven, MD: Demonstration of the central role of insulin resistance in type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 2014;37:1178–1181.

30. Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care*. 2001;24:1460–1467.
31. Hawa MI, Buchan AP, Ola T, Wun CC, DeMicco DA, Bao W, Betteridge DJ, Durrington PN, Fuller JH, Neil HA, et al. LADA and CARDS: a prospective study of clinical outcome in established adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37:1643–1649.
32. HAPO Study Cooperative Research Group., Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DAN *Engl J Med*. 2008; 358(19):1991-2002.
33. Galtier F. Definition, epidemiology, risk factors. *Diabetes Metab*. 2010;36:628–651.
34. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;6(6):850-67.
35. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 103(3):341-63.
36. Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol*. 1991;42:1385–1391
37. Weaver DC, Barry CD, McDaniel ML, Marshall GR, Lacy PE. Molecular requirements for recognition at glucoreceptor for insulin release. *Mol Pharmacol*. 1979;16:361–368.
38. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J*. 1982;208:513–515.
39. Weaver DC, McDaniel ML, Lacy PE. Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology*. 1978;102:1847–1855

40. Elsner M, Tiedge M, Guldbakke B, Munday R, Lenzen S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia*. 2002; 45:1542–1549
41. Boquist L, Nelson L, Lorentzon R. Uptake of labeled alloxan in mouse organs and mitochondria in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 1983; 113:943–948
42. Malaisse WJ, Doherty M, Ladriere L, Malaisse-Lagae F. Pancreatic uptake of [2-14C]alloxan. *Int J Mol Med*. 2001;7:311–315.
43. Hammarström L, Hellman B, Ullberg S. On the accumulation of alloxan in the pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 1967;3:340–344.
44. Patterson JW, Lazarow A, Levey S. Alloxan and dialuric acid: their stabilities and ultraviolet absorption spectra. *J Biol Chem*. 1949;177:187–196.
45. Jörns A, Munday R, Tiedge M, Lenzen S (1997) Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J Endocrinol*. 1997; 155:283–293.
46. Brückmann G, Wertheimer E. Alloxan studies: the action of alloxan homologues and related compounds. *J Biol Chem*. 1947;168:241–256.
47. Hara H, Miwa I, Okuda J. Inhibition of rat liver glucokinase by alloxan and ninhydrin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1986;34:4731–4737.
48. Meglasson MD, Burch PT, Berner DK, Najafi H, Matschinsky FM (1986) Identification of glucokinase as an alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 1986; 35:1163–1173.
49. Lenzen S, Tiedge M, Panten U. Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1987;115:21–29.
50. Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 1988;31:337–342.
51. Gunnarsson R, Hellerström C. Acute effects of alloxan on the metabolism and insulin secretion of the pancreatic B-cell. *Horm Metab Res* 1973;5:404–409.
52. Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1974;249:2447–2452.



53. Munday R. Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of 'active oxygen' species. *Biochem Pharmacol*. 1988; 37:409–413.
54. Winterbourn CC, Cowden WB, Sutton HC. Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 1989;38:611–618.
55. Winterbourn CC, Munday R. Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH· formation. *Biochem Pharmacol*. 1989;38:271–277.
56. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216–226.
57. Tjälve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol* 1976; 69:455–456.
58. Karunanayake EH, Baker JR, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia* 1976;12:123–128.
59. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000;43:1528–1533.
60. Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs, primates): role of GLUT2 transporter and  $\beta$ -cell plasticity. *Transplantation* 2006;81:36–45.
61. Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:881–887.
62. Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes* 1988;37:213–216.
63. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res* 1981;41:2786–2790.

64. Strandell E, Eizirik DL, Korsgren O, Sandler S. Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. *Mol Cell Endocrinol* 1988;59:83–91.
65. Lenzen S. Alloxan and streptozotocin diabetes. In: Peschke E (ed) *Endokrinologie III Vorträge im Rahmen des Projektes 'Zeitstrukturen endokriner Systeme'*. [Endocrinology III lectures within the 'time structures of endocrine systems' project framework]. *Abhandlung der Sächs. Akad. Wiss., Math-naturwiss Klasse, Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften, Leipzig, commissioned by S. Hirzel Verlag, Stuttgart/Leipzig, 2007; pp 119–138.*
66. Paik SG, Fleischer N, Shin SI. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6129–6133.
67. Palm F, Ortsäter H, Hansell P, Liss P, Carlsson PO. Differentiating between effects of streptozotocin per se and subsequent hyperglycemia on renal function and metabolism in the streptozotocin-diabetic rat model. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:452–459.
68. Szerlip HM. *Metabolic acidosis*,: Greenberg A, Cheung AK, editors. *Primer on kidney diseases*. Philadelphia (PA): Saunders 2009; p 78.
69. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*. 2011;45(3):131-40.
70. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(6):1110–9.
71. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001;50(6):537–46.

72. Leiter EH. Differential susceptibility of BALB/c sublines to diabetes induction by multi-dose streptozotocin treatment. *Current topics in microbiology and immunology*. 1985;122:78–85.
73. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058–1070.
74. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(6):1446-54.
75. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8.
76. Ramasamy R, Goldberg IJ. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circ Res*. 2010;106:1449–58.
77. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:61038.
78. Vikramadithyan RK, Hu Y, Noh HL, Liang CP, Hallam K, Tall AR, Ramasamy R, Goldberg IJ. Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2005:2434–43.
79. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*. 1999;13:23–30.
80. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S233–6.
81. Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275:40042–7.
82. Ii S, Ohta M, Kudo E, Yamaoka T, Tachikawa T, Moritani M, Itakura M, Yoshimoto K. Redox state-dependent and sorbitol accumulation-independent diabetic albuminuria in mice with transgene-derived human aldose reductase and sorbitol dehydrogenase deficiency. *Diabetologia*. 2004;47:541–8.
83. Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem*. 2009;16(10):1266-77.

84. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(4):537-77.
85. Pingle SC, Mishra S, Marcuzzi A, Bhat SG, Sekino Y, Rybak LP, Ramkumar V: Osmotic diuretics induce adenosine A1 receptor expression and protect renal proximal tubular epithelial cells against cisplatin-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279 :43157 –43167.
86. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004;95:233–8.
87. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, Tikellis C, Ritchie RH, Twigg SM, Cooper ME, Burrell LM. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res*. 2003;92:785–92.
88. Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DA, Bucala R, Vlassara H, Archer DB. Advanced glycation end products in vitreous: structural and functional implications for diabetic vitreopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:2517–23.
89. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol*. 1997;150:523–3125.
90. Nishino T, Horii Y, Shiiki H, Yamamoto H, Makita Z, Bucala R, Dohi K. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum Pathol*. 1995;26:308–13.
91. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersole de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions: implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest*. 1997;100:2995–3004.

92. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest.* 1997;99:1272–80.
93. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH: Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 1994;87: 21–29.
94. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC: Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1990;39: 807–814.
95. Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H: Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 11047–11052.
96. Smedsrod B, Melkko J, Araki N, Sano H, Horiuchi S: Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* 1997;322: 567–573.
97. Abordo EA, Thornalley PJ: Synthesis and secretion of tumour necrosis factor-alpha by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunol Lett* 1997;58: 139–147.
98. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D: Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995;96: 1395–1403.
99. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114:597–605.

100. Geraldес P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.* 2010;106:1319–31.
101. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:11059–63
102. Craven PA, Davidson CM, DeRubertis FR. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes.* 1990;39:667–74.
103. Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, King GL. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol.* 1993;265:E783–93.
104. Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol.* 2000;278:F676–83.
105. Derubertis FR, Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes: mechanism and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 1994;43:1–8.
106. Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem.* 1996;271:15237–43.
107. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1998;101:160–9.
108. Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:8225–31.
109. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1

expression by increasing Sp1 glycosylation. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:12222–6.

110. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404: 787–790.
111. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008;29(1):42-61.
112. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002;32:235-249.
113. Adesnik M, Lande M, Martin T, Sabatini DD. Retention of mRNA on the endoplasmic reticulum membranes after in vivo disassembly of polysomes by an inhibitor of initiation. *J Cell Biol* 1976;71:307–313.
114. Pilon M, Romisch K, Quach D, Schekman R. Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 1998; 9:3455–3473.
115. Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985;54:631–664.
116. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33–45.
117. Bulleid NJ, Freedman RB 1988 Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes. *Nature* 1988;335:649–651.
118. van Anken E, Braakman I. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005;40:191–228.
119. Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM 2002 A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 2002;13:4456–4469.
120. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:181–191.

- 121.Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739–789.
- 122.Brodsky JL. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem J* 2007;404:353–363.
- 123.Patil C, Walter P 2001 Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:349–355.
- 124.Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006;86:1133–1149.
- 125.Zhang K, Kaufman RJ. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Handb Exp Pharmacol* 2006;172:69–91.
- 126.Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519–529
- 127.Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881–891.
- 128.Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;415:92–96.
- 129.Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 2002;16:452–466.
- 130.Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003;23:7448–7459.
- 131.Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 2003;4:265–271.



- 132.Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006;313:104–107.
- 133.Pirot P, Naamane N, Libert F, Magnusson NE, Orntoft TF, Cardozo AK, Eizirik DL. Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$  cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia* 2007;50:1006–1014.
- 134.Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 2002;366:585–594.
- 135.Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007;581:3641–3651
- 136.Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397:271–274.
- 137.Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003;112:481–490.
- 138.Oakes SA, Lin SS, Bassik MC. The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr Mol Med* 2006;6:99–109.
- 139.Reimertz C, Kogel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JH. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol* 2003;162:587–597.
- 140.Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:50375–50381.
- 141.Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX, BAK-dependent release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2005;280:23829–23836.

- 142.Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 2006;281:7260–7270.
- 143.Liu W, Zhu X, Wang Q, Wang L. Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. *Exp Ther Med*. 2013;5(5):1289-1292.
- 144.Zhong Y, Li J, Chen Y, Wang JJ, Ratan R, Zhang SX. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Müller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes*. 2012;61(2):492-504.
- 145.Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A, Peraldi MN. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(4):e62418.
- 146.Effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the Diabetes Control and Complications Trial. *Am J Cardiol*. 1995;75:894–903.
- 147.Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. *Kidney Int*. 1995;47:1703–1720.
- 148.Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352:837–853.
- 149.Pedersen O, Gaede P. Intensified multifactorial intervention and cardiovascular outcome in type 2 diabetes: the Steno-2 study. *Metabolism*. 2003;52:19–23.
- 150.Acosta J, Hettinga J, Flückiger R, et al. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:5450–5455.

- 151.Zhang J, Gerhardinger C, Lorenzi M. Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2002;51:3499–3504.
- 152.Flyvbjerg A. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6:94–101.
- 153.Mellbin LG, Bjerre M, Thiel S, Hansen TK. Complement activation and prognosis in patients with type 2 diabetes and myocardial infarction: a report from the DIGAMI 2 trial. *Diabetes Care*. 2012;35:911–917.
- 154.Hansen TK, Tarnow L, Thiel S, et al. Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:1570–1576.
- 155.Hertle E, Stehouwer CD, van Greevenbroek MM. The complement system in human cardiometabolic disease. *Mol Immunol*. 2014;61:135–148.
- 156.Hansen TK, Tarnow L, Thiel S, et al. Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:1570–1576.
- 157.Hansen TK, Forsblom C, Saraheimo M, et al. Association between mannose-binding lectin, high-sensitivity C-reactive protein and the progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53:1517–1524.
158. Bouwman LH, Eerligh P, Terpstra OT, et al. Elevated levels of mannose-binding lectin at clinical manifestation of type 1 diabetes in juveniles. *Diabetes*. 2005;54:3002–3006.
- 159.Hansen TK, Thiel S, Knudsen ST, et al. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4857–4861.
- 160.Saraheimo M, Forsblom C, Hansen TK, et al. Increased levels of mannan-binding lectin in type 1 diabetic patients with incipient and overt nephropathy. *Diabetologia*. 2005;48:198–202.

- 161.Hovind P, Hansen TK, Tarnow L, et al. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes*. 2005;54:1523–1527.
- 162.Kaunisto MA, Sjölin L, Sallinen R, et al. Elevated MBL concentrations are not an indication of association between the MBL2 gene and type 1 diabetes or diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2009;58:1710–1714.
- 163.Woroniccka KI, Park AS, Mohtat D, Thomas DB, Pullman JM, Susztak K. Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. *Diabetes*. 2011;60:2354–2369.
- 164.Qin X, Goldfine A, Krumrei N, et al. Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: a possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes. *Diabetes*. 2004;53:2653–2661.
- 165.Flyvbjerg A. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6:94–101.
- 166.Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM) *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26:256–65.
- 167.Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: Pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23:3–13.
- 168.Price CL, Al Hassi HO, English NR, Blakemore AI, Stagg AJ, Knight SC. Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. *J Cell Mol Med*. 2010;14:1806–15.
- 169.Nirmal J, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341:1906–12.
- 170.Vardakas KZ, Siempos II, Falagas ME. Diabetes mellitus as a risk factor for nosocomial pneumonia and associated mortality. *Diabet Med*. 2007;24:1168–71.
- 171.Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012 Mar;16 Suppl 1:S27-36.

- 172.Lorini R, Moretta A, Valtorta A, d'Annunzio G, Cortona L, Vitali L, Bozzola M, Severi F: Cytotoxic activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*1994;23 :37 –42.
- 173.Negishi K, Waldeck N, Chandy G, Buckingham B, Kershner A, Fisher L, Gupta S, Charles MA: Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*1986;29 :352 –357.
- 174.Hussain MJ, Alviggi L, Millward BA, Leslie RD, Pyke DA, Vergani D: Evidence that the reduced number of natural killer cells in type 1 (insulin-dependent) diabetes may be genetically determined. *Diabetologia* 1987;30 :907 – 911.
- 175.Wilson RG, Anderson J, Shenton BK, White MD, Taylor RM, Proud G: Natural killer cells in insulin dependent diabetes mellitus. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;293 :244.
- 176.Rodacki M, Svoren B, Butty V, Besse W, Laffel L, Benoist C, Mathis D. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes*. 2007;56(1):177-85.
- 177.Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, et al. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 2003;18:41–51.
- 178.Lee IF, Qin H, Priatel JJ, Tan R. Critical role for IFN-gamma in natural killer cell-mediated protection from diabetes. *Eur J Immunol* 2008;38:82–89.
- 179.Lee IF, Qin H, Trudeau J, Dutz J, Tan R. Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells. *J Immunol* 2004;172:937– 942.
- 180.Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, Priatel JJ, Tan R. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes*. 2011;60(3):857-66.
- 181.Sun C, Sun L, Ma H, Peng J, Zhen Y, Duan K, Liu G, Ding W, Zhao Y. The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. *J Cell Physiol*. 2012;227(4):1670-9.

- 182.Nieminen JK, Vakkila J, Salo HM, Ekström N, Härkönen T, Ilonen J, Knip M, Vaarala O. Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2303-10.
- 183.Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN, Lai YP. Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8+ cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One*. 2014;9(11):e109961.
- 184.de Kort S, Masclee AAM, Sanduleanu S, Weijenberg MP, van Herk-Sukel MPP, Oldenhof NJJ, van den Bergh JPW, Haak HR, Janssen-Heijnen ML. Higher risk of colorectal cancer in patients with newly diagnosed diabetes mellitus before the age of colorectal cancer screening initiation. *Sci Rep*. 2017;24;7:46527.
- 185.Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, Ntzani EE, Ioannidis JP. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ*. 2015;2;350:g7607.
- 186.Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J: Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol* 2011;26:863–876.
- 187.Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A: Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2007;121:856–862.
- 188.Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z: Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* 2011;47:1928–1937.
- 189.Wang C, Wang X, Gong G, Ben Q, Qiu W, Chen Y, Li G, Wang L: Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2012;130:1639–1648.
- 190.Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A: Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* 2007;50:1365–1374.
- 191.Larsson SC, Orsini N, Brismar K, Wolk A: Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* 2006;49:2819–2823.
- 192.Mitri J, Castillo J, Pittas AG: Diabetes and risk of Non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Care* 2008;31:2391–2397.

- 193.Kasper JS, Giovannucci E: A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2056–2062.
- 194.Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2010;60(4):207–221.
- 195.Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes—United States, 1988–1994 and 1999–2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2004;53(45):1066–1068.
- 196.Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene*. 2004;23(38):6365–6378.
- 197.Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(8):579–591.
- 198.Kulie T, Slattengren A, Redmer J, Counts H, Eglash A, Schrager S. Obesity and women’s health: an evidence-based review. *Journal of the American Board of Family Medicine*. 2011;24(1):75–85.
- 199.Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *The Journal of the American Medical Association*. 2006;296(2):193–201.
- 200.La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *Oncologist*. 2011;16(6):726–729.
- 201.Denley A, Carroll JM, Brierley GV, Cosgrove L, Wallace J, Forbes B, Roberts CT, Jr.: Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3569–3577.
- 202.Zhang H, Pelzer AM, Kiang DT, Yee D: Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res* 2007; 67: 391–397.
- 203.Giovannucci E: Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001; 131: 3109S–3120S.

- 204.Ooi GT, Tseng LY, Tran MQ, Rechler MM: Insulin rapidly decreases insulin-like growth factor-binding protein-1 gene transcription in streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 2219–2228.
- 205.Powell DR, Suwanichkul A, Cabbage ML, DePaolis LA, Snuggs MB, Lee PD: Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Biol Chem* 1991; 266: 18868–18876.
- 206.Renehan AG, Frystyk J, Flyvbjerg A: Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 328–336.
- 207.Weinstein D, Simon M, Yehezkel E, Laron Z, Werner H: Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells. *Diabete Metab Res Rev* 2009; 25: 41–49.
- 208.Pollak M: Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008;8:915–928.
- 209.Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*. 1925;9(1):148–163.
- 210.Warburg O, Posener K, Negelein E. Ueber den stoffwechsel der tumoren. *Biochemische Zeitschrift*. 1924;152(1):319–344.
- 211.Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309–314.
- 212.Boerner P, Resnick RJ, Racker E. Stimulation of glycolysis and amino acid uptake in NRK-49F cells by transforming growth factor beta and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(5):1350–3.
- 213.Flier JS, et al. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science*. 1987;235(4795):1492–5.
- 214.Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*. 2009;324(5930):1029–1033.
- 215.Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell metabolism*. 2011;14(4):443–451.
- 216.Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Nature*. 2008; 454(7203):436-44.



217. Aggarwal B. B., Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 351–36910.
218. Grivennikov S. I., Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010;20:65–7110.
219. DeNardo D. G., Johansson M., Coussens L. M. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:11–1810.
220. Yang J., Weinberg R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 2008;14:818–82910.
221. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol.* 2012 Jan 12;2:98.
222. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* 2001;15(1):50-65.
223. Aslakson CJ, Miller FR., Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992;52: 1399-1405.
224. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA., "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." *Cell.* 2004; 117: 927-939.
225. Li J, Sahagian GG. "Demonstration of tumor suppression by Man-6-P/IGF-2 Receptor." *Oncogene* 2004; 23:9359-68.
226. Tao K, Alroy J, Sahagian GG. "Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer.", *BMC Cancer* 2008; 8: 228.
227. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Nioewolna M, Hiraga T. Actions of Biphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2979-2988.

228. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R and Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1978; 38: 3174-3181.
229. Miller FR, Miller BE and Heppner GH. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis.* 1983;3:22-31.
230. Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.* 2008;18;272(2):177-85.
231. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3481-3498.
232. Youle, R.J., Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9:47–59.
233. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1137-46.
234. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002;3:991–998.
235. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 2004;22:329–360.
236. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
237. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331:1565–1570.
238. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21:137–148.
239. Hanahan, D. and Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21:309–322.

240. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958–969.
241. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:253–268.
242. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stange G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 2010;70:5728–5739.
243. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141:39–51.
244. Prokop S, Heppner FL, Goebel HH, Stenzel W. M2 Polarized Macrophages and Giant Cells Contribute to Myofibrosis in Neuromuscular Sarcoidosis. *The American Journal of Pathology.* 2011;178:1279–1286.
245. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noël W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJM, De Baetselier P, Ghassabeh GH. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 2005;77:321–327.
246. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11:889–896.
247. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958–969.
248. Laoui D, Van Overmeire E, Movahedi K, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, Nikolaou A, Morias Y, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Mononuclear phagocyte heterogeneity in cancer: different subsets and activation states reaching out at the tumor site. *Immunobiology.* 2011;216:1192–1202.
249. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32:593–604.

- 250.Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23:549–555.
- 251.Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010;22:231–237.
- 252.Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett.* 2009;123:97–102.
- 253.Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32:593–604.
- 254.Heusinkveld M, de Vos vS, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol.* 2011;187:1157–1165.
- 255.Leek RD. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:4625–4629.
- 256.Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:618–631.
- 257.Lewis CE, Hughes R. Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2. *Breast Cancer Res.* 2007;9:209.
- 258.van der Bij GJ, Oosterling SJ, Meijer S, Beelen RH, van Egmond M. The role of macrophages in tumor development. *Cell Oncol.* 2005; 27: 203-213.
- 259.Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-266.
- 260.Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
- 261.Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15: 138-147.

- 262.Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: The concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20: 561-567.
- 263.Jochems C., J. Schlom. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2011;236: 567–579.
- 264.Gustafsson K, Ingelsten M, Bergqvist L, Nyström J, Andersson B, Karlsson-Parra A. Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2008; 68: 5965-5971.
- 265.Foti M, Granucci F and Ricciardi-Castagnoli P. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends. Immunol.* 2004; 25: 650-654.
- 266.Stoitzner P., L. K. Green, J. Y. Jung, K. M. Price, H. Atarea, B. Kivell, F. Ronchese. Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2008;57: 1665–1673.
- 267.Curiel T. J., S. Wei, H. Dong, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, R. Krzysiek, K. L. Knutson, B. Daniel, M. C. Zimmermann, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* 2003;9: 562–567.
- 268.Hargadon K. M. Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity. *Front. Immunol.* 2013;4: 192.
- 269.Kiessling R., Klein E., Pross H., Wigzell H. “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* 1975;5:117–121.
- 270.Atkinson M.A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2:a007641.
- 271.Cooper M.A., Elliott J.M., Keyel P.A., Yang L., Carrero J.A., Yokoyama W.M. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106:1915–1919.
- 272.Yu J., Mao H.C., Wei M., Hughes T., Zhang J., Park I.K., Liu S., McClory S., Marcucci G., Trotta R., et al. CD94 surface density identifies a functional

- intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood*. 2010;115:274–281.
273. Bezman N.A., Kim C.C., Sun J.C., Min-Oo G., Hendricks D.W., Kamimura Y., Best J.A., Goldrath A.W., Lanier L.L. Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2012;13:1000–1009.
274. Vivier E. What is natural in natural killer cells? *Immunol. Lett.* 2006;107:1–7.
275. Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P., Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007;26:503–517.
276. Gianchecchi E., Delfino D.V., Fierabracci A. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive responses. *Autoimmun. Rev.* 2017;17:142–157.
277. Fogler W.E., Volker K., McCormick K.L., Watanabe M., Ortaldo J.R., Wiltrott R.H. NK cell infiltration into lung, liver, and subcutaneous B16 melanoma is mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction. *J. Immunol.* 1996;156:4707–4714.
278. Glas R., Franksson L., Une C., Eloranta M.L., Ohlén C., Orn A., Kärre K. Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell mediated responses. *J. Exp. Med.* 2000;191:129–138.
279. Cheent K and Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 2009; 126: 449-457.
280. Lanier L.L. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 2008;9:495–502.
281. Pegram H.J., Andrews D.M., Smyth M.J., Darcy P.K., Kershaw M.H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell. Biol.* 2011;89:216–224.
282. Spada R., Rojas J.M., Barber D.F. Recent findings on the role of natural killer cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Leukoc. Biol.* 2015;98:479–487.

- 283.Smith H.R., Heusel J.W., Mehta I.K., Kim S., Dorner B.G., Naidenko O.V., Iizuka K., Furukawa H., Beckman D.L., Pingel J.T., et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99:8826–8831.
- 284.Vujanovic NL, Basse P, Herberman RB and Whiteside TL. Antitumor Functions of Natural Killer Cells and Control of Metastases. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1996; 9: 394-408.
- 285.Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 401-409.
- 286.Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 323-327.
- 287.Vitale M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Romagnani C., Thiel A., Moretta L., Moretta A. The small subset of CD56brightCD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2004;34:1715–1722.
- 288.Moretta L., Locatelli F. Innate lymphoid cells in normal and disease: An introductory overview. *Immunol. Lett.* 2016;179:1.
- 289.Strowig T., Brilot F., Munz C. Noncytotoxic functions of NK cells: Direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J. Immunol.* 2008;180:7785–7791.
- 290.Yokoyama W.M. Mistaken notions about natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2008;9:481–485.
- 291.Backstrom E., Kristensson K., Ljunggren H.G. Activation of natural killer cells: Underlying molecular mechanisms revealed. *Scand. J. Immunol.* 2004;60:14–22.
- 292.Girardi E, Zajonc DM. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol Rev* 2012; 250:167-179.
- 293.Ridgway WM, Gershwin ME. Prometheus unbound: NKT cells inhibit hepatic regeneration. *Hepatology* 2014; 60:1133-1135.

294. Yin S, Wang H, Bertola A, Feng D, Xu MJ, Wang Y, Gao B. *Hepatology* 2014; 60:1356-1366.
295. Bendelac, A.; Savage, P.B.; Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2007, 25, 297–336.
296. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:1330-1338.
297. Yu KOA, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunology Letters*, 2005; 100:42-55.
298. Moody, D.B.; Zajonc, D.M.; Wilson, I.A. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 2005, 5, 387–399.
299. Porcelli, S.A.; Segelke, B.W.; Sugita, M.; Wilson, I.A.; Brenner, M.B. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol. Today* 1998, 19, 362–368.
300. Cohen, N.R.; Garg, S.; Brenner, M.B. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv. Immunol.* 2009, 102, 1–94.
301. Godo, M.; Sessler, T.; Hamar, P. Role of invariant natural killer T (iNKT) cells in systemic lupus erythematosus. *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 1778–1787.
302. Thomas, S.Y.; Lilly, C.M.; Luster, A.D. Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354, 2613–2616.
303. Vivier, E.; Ugolini, S.; Blaise, D.; Chabannon, C.; Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, 12, 239–252.
304. Fox, L.M., Cox, D.G, Lockridge, J.L, Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D.L., Ndonge, R.M., Veerapen, N., Besra, G.S.; et al. Recognition of lysophospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol.* 2009, 7, e1000228.
305. Cianferoni A. Invariant Natural Killer T Cells. *Antibodies* 2014, 3, 16-36.
306. Kronenberg, M. Toward an understanding of NKT cell biology: Progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23, 877–900.



307. Matsuda JL, Mallevey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:358-368.
308. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol* 1999; 163:4647-4650.
309. Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH, Okusa MD. NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- $\gamma$  Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol* 2007; 178:5899-5911.
310. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S. CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. *J Exp Med* 2003; 197:1051-1057.
311. McCarthy, C.; Shepherd, D.; Fleire, S.; Stronge, V.S.; Koch, M.; Illarionov, P.A.; Bossi, G.; Salio, M.; Denkberg, G.; Reddington, F.; et al. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J. Exp. Med.* 2007, 204, 1131–1144.
312. Nguyen, K.D.; Vanichsarn, C.; Nadeau, K.C. Increased cytotoxicity of CD4+ invariant NKT cells against CD4+CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo/-</sup> regulatory T cells in allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* 2008, 38, 2034–2045.
313. Smyth, M.J.; Godfrey, D.I. NKT cells and tumor immunity—a double-edged sword. *Nat. Immunol.* 2000, 1, 459–460.
314. Swann, J.B.; Uldrich, A.P.; van Dommelen, S.; Sharkey, J.; Murray, W.K.; Godfrey, D.I.; Smyth, M.J. Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* 2009, 113, 6382–6385.
315. Nowak, M.; Arredouani, M.S.; Tun-Kyi, A.; Schmidt-Wolf, I.; Sanda, M.G.; Balk, S.P.; Exley, M.A. Defective NKT cell activation by CD1d+ TRAMP prostate tumor cells is corrected by interleukin-12 with alpha-galactosylceramide. *PLoS One* 2010, 5, e11311.
316. Bellone, M.; Ceccon, M.; Grioni, M.; Jachetti, E.; Calcinotto, A.; Napolitano, A.; Freschi, M.; Casorati, G.; Dellabona, P. iNKT cells control mouse

- spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells. *PLoS One* 2010, 5, e8646.
- 317.Swann, J.B.; Coquet, J.M.; Smyth, M.J.; Godfrey, D.I. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007, 314, 293–323.
- 318.Crowe, N.Y.; Smyth, M.J.; Godfrey, D.I. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Exp. Med.* 2002, 196, 119–127.
- 319.Tachibana, T.; Onodera, H.; Tsuruyama, T.; Mori, A.; Nagayama, S.; Hiai, H.; Imamura, M. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: A prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 7322–7327.
- 320.Tahir, S.M.; Cheng, O.; Shaulov, A.; Koezuka, Y.; Bublely, G.J.; Wilson, S.B.; Balk, S.P.; Exley, M.A. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J. Immunol.* 2001, 167, 4046–4050.
- 321.Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 29-70.
- 322.Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol* 2012; 33:406-12.
- 323.Kaiserman D, Bird CH, Sun J, Matthews A, Ung K, Whisstock JC, Thompson P E, Trapani JA, Bird PI. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *J Cell Biol* 2006; 175:619-30.
- 324.Andoniou CE, Sutton VR, Wikstrom ME, Fleming P, Thia KY, Matthews AY, Kaiserman D, Schuster IS, Coudert JD, Eldi P et al. A natural genetic variant of granzyme B confers lethality to a common viral infection. *PLoS Pathog* 2014; 10:e1004526.
- 325.Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
- 326.Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.

327. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635-1636.
328. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995; 14: 5579-5588.
329. Anani W, Shurin MR. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1036:105-128.
330. Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gaborilovich D.I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 2016;37:208–220.
331. Parker K.H., Beury D.W., Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv. Cancer Res.* 2015;128:95–139.
332. Meirow Y., Kanterman J., Baniyash M. Paving the Road to Tumor Development and Spreading: Myeloid–Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. *Front. Immunol.* 2015 doi: 10.3389/fimmu.2015.00523.
333. Navarini-Meury A.A., Conrad C. Melanoma and innate immunity—Active inflammation or just erroneous attraction?: Melanoma as the source of leukocyte-attracting chemokines. *Semin. Cancer Biol.* 2009;19:84–9127.
334. Meyer C., Sevko A., Ramacher M., Bazhin A.V., Falk C.S., Osen W., Borrello I., Kato M., Schadendorf D., Baniyash M., et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:17111–17116.
335. Lesokhin A.M., Hohl T.M., Kitano S., Cortez C., Hirschhorn-Cymerman D., Avogadri F., Rizzuto G.A., Lazarus J.J., Pamer E.G., Houghton A.N., et al. Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012;72:876–886.

- 336.Zhang J., Patel L., Pienta K.J. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:41–48.
- 337.Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: More mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010;59:1593–1600.
- 338.Raber P., Ochoa A.C., Rodríguez P.C. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: Mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol. Invest.* 2012;41:614–634.
- 339.Molon B., Ugel S., Del Pozzo F., Soldani C., Zilio S., Avella D., De Palma A., Mauri P., Monegal A., Rescigno M., et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* 2011;208:1949–1962.
- 340.Pickup M., Novitskiy S., Moses H.L. The roles of TGF $\beta$  in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer.* 2013;13:788–799.
- 341.Tartour E., Pere H., Maillere B., Terme M., Merillon N., Taieb J., Sandoval F., Quintin-Colonna F., Lacerda K., Karadimou A., et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30:83–95.
- 342.Binsfeld M., Muller J., Lamour V., De Veirman K., De Raeve H., Bellahcène A., Van Valckenborgh E., Baron F., Beguin Y., Caers J., et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells promote angiogenesis in the context of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2016 doi: 10.18632/oncotarget.9270.
- 343.Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-52.
- 344.Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:217-23.

345. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775–787.
346. Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T., Nomura T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2006;212:8–27.
347. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines (Basel)*. 2016 6;4(3).
348. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 13:108-116.
349. D'Abrosio D. Regulatory T cells: how do they find their space in the immunological arena? *Semin Cancer Biol* 2006; 16:91-97.
350. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P.. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:1206-1212.
351. Facciabene A., Peng X., Hagemann I.S., Balint K., Barchetti A., Wang L.P., Gimotty P.A., Gilks C.B., Lal P., Zhang L., et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. 2011;475:226–230.
352. Dolcetti L., Peranzoni E., Ugel S., Marigo I., Fernandez Gomez A., Mesa C., Geilich M., Winkels G., Traggiai E., Casati A., et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* 2010;40:22–35.
353. Morales J.K., Kmiecik M., Knutson K.L., Bear H.D., Manjili M.H. GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1-bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010;123:39–49.

354. Ribechini E., Greifenberg V., Sandwick S., Lutz M.B. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010;199:273–281.
355. Murdoch C, et al. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood.* 2004;104:2224–2234.
356. Qian BZ, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011;475:222–225.
357. Huang B, et al. CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Letters.* 2007;252:86–92.
358. Pan PY, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010;70:99–108.
359. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66:1123–31.
360. Stuelten CH, Barbul A, Busch JI, Sutton E, Katz R, Sato M, Wakefield LM, Roberts AB, Niederhuber JE. Acute wounds accelerate tumorigenesis by a T cell-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2008; 68: 7278-7282.
361. DuPre' SA, Hunter KW Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol.* 2007; 82: 12-24.
362. Kershaw MH, Jackson JT, Haynes NM, Teng MW, Moeller M, Hayakawa Y, Street SE, Cameron R, Tanner JE, Trapani JA, Smyth MJ, Darcy PK. Gene-engineered T cells as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer. *J Immunol.* 2004; 173: 2143-2150.
363. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-5.

364. Heidenhain M. Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eisenhamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk.* 1896; 13: 186.
365. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124.
366. Ikemura M, Nishikawa M, Kusamori K, Fukuoka M, Yamashita F, Hashida M. Pivotal role of oxidative stress in tumor metastasis under diabetic conditions in mice. *J Control Release* 2013; 170: 191-7.
367. Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN, Lai YP. Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8+ cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One* 2014; 9: e109961. doi: 10.1371/journal.pone.0109961.
368. Goto Y, Nagasawa H, Iguchi T. (1995) Streptozotocin-induced diabetes accelerates mammary tumorigenesis in shn and sln mice. *Oncol Rep* 2 37-40.
369. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 1103-23.
370. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergental RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care* 2010; 33: 1674-1685.
371. Cohen DH, LeRoith D. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: F27-45.
372. Shi Y, Hu FB. The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* 2014; 383: 1947-8.
373. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-33.
374. Tsukumo SI, Yasutomo K. Regulation of CD8(+) T Cells and Antitumor Immunity by Notch Signaling. *Front Immunol.* 2018;9:101.

- 375.Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* (2011) 29:235–71.
- 376.Katoh H, Wang D, Daikoku T, Sun H, Dey SK, Dubois RN. CXCR2-expressing myeloid-derived suppressor cells are essential to promote colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2013;24(5):631-44.
- 377.Wang D, DuBois RN. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*. 2015;36(10):1085-93.
- 378.Sell H, Habich C, Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 709-16.
- 379.Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, Nave H. Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E108-16.
- 380.Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S. and Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur J Immunol* 2011; 41: 1902-1912.
- 381.Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. *Int J Cancer* 2014; 134: 1669-16682.
- 382.Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 2005; 202: 583-8.
- 383.Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N, Raulet DH. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol* 2014;122:91-128.
- 384.Dewan MZ, Takada M, Terunuma H, Deng X, Ahmed S, Yamamoto N, Toi M. Natural killer activity of peripheral-blood mononuclear cells in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother*. 2009;63:703-706.



- 385.Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000;356:1795-1799.
- 386.Dewan MZ, Terunuma H, Takada M, Tanaka Y, Abe H, Sata T et al. Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;104:267-275.
- 387.Dewan MZ, Terunuma H, Tanaka Y, Katano H, Deng X et al. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci.* 2006;97:1381-1387.
- 388.Standish LJ, Sweet ES, Novack J, Wenner CA, Bridge C, Nelson A, Martzen M, Torkelson C. Breast cancer and the immune system. *J Soc Integr Oncol.* 2008; 6: 158-168.
- 389.Strayer DR, Carter WA, Mayberry SD et al. Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. *Cancer Res.* 1984;44:370-374.
- 390.Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, Prentice HG. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol.* 2002;117:821-827.
- 391.Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, Priatel JJ, Tan R. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes* 2011; 60: 857-66.
- 392.Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, Pertel T, Carnaud C, Bluestone JA, Lanier LL. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 2003;18:41-51.
- 393.Muller YD, Golshayan D, Ehrchiou D, Wyss JC, Giovannoni L, Meier R, Serre-Beinier V, Puga Yung G, Morel P, Bühler LH, Seebach JD. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. *Diabetes.* 2011;60(9):2331-40.

- 394.Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(6):575-82.
- 395.Obeidy P, Sharland AF. NKG2D and its ligands. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(12):2364-7.
- 396.Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 2009;128: 1-6.
- 397.Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, Clement O, Wicker S, Gilfillan S, et al. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics.* 2002;79:114–23.
- 398.Fernandez-Messina L, Ashiru O, Aguera-Gonzalez S, Reyburn HT, Vales-Gomez M. The human NKG2D ligand ULBP2 can be expressed at the cell surface with or without a GPI anchor and both forms can activate NK cells. *J Cell Sci.* 2011;124:321–7.
- 399.Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1:119–26.
- 400.Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting Edge: Murine UL16-Binding Protein-Like Transcript 1: A Newly Described Transcript Encoding a High-Affinity Ligand for Murine NKG2D. *J Immunol.* 2002;169:4079–83.
- 401.Takada A, Yoshida S, Kajikawa M, Miyatake Y, Tomaru U, Sakai M, et al. Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D. *J Immunol.* 2008;180:1678–85.
- 402.Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:413–41.
- 403.Zou Z, Nomura M, Takihara Y, Yasunaga T, Shimada K. Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules. *J Biochem (Tokyo)* 1996;119:319–28.

- 404.Ogasawara K, Benjamin J, Takaki R, Phillips JH, Lanier LL. Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol.* 2005;6:938–45.
- 405.Jung H, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Raulet DH. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med.* 2012;209:2409–22.
- 406.Guerra N, Pestal K, Juarez T, Beck J, Tkach K, Wang L, et al. A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Immunol.* 2013;149:432–9.
- 407.Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6879-6884.
- 408.Noam Stern-Ginossar and Ofer Mandelboim. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 2009;128:1-6.
- 409.Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol.* 2014;39(1):109-15.
- 410.Williams NS, Engelhard VH. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. *J Immunol.* 1997;159:2091–2099.
- 411.Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin:structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.* 2010;235(1):35-54.
- 412.Liu CC, Young LH, Young JD. Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *N Engl J Med.* 1996 28;335(22):1651-9.
- 413.Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy.* 1999;54(12):1233-51.
- 414.Bach EA, Aguet M and Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-591.
- 415.Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-795.

416. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med.* 1999; 190:617-627.
417. Martini M, Testi MG, Pasetto M, Picchio MC, Innamorati G, Mazzocco M, Ugel S, Cingarlini S, Bronte V, Zanovello P, Krampera M, Mosna F, Cestari T, Riviera AP, Brutti N, Barbieri O, Matera L, Tridente G, Colombatti M, Sartoris S. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine.* 2010 30;28(20):3548-57.
418. Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, Johnson HM, Subramaniam PS. IFN-gamma induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(12):1351–61.
419. Plataniias LC, Uddin S, Bruno E, Korkmaz M, Ahmad S, Alsayed Y, et al. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp Hematol.* 1999;27(8):1315–21.
420. Beatty G, Paterson Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. *J Immunol.* 2001;166(4):2276–82.
421. Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, et al. Tumor cell responses to IFN-gamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity.* 1998;9(1):25–34.
422. Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat Med.* 1998;4(4):408–14.
423. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 2003;8(3):237–49.
424. Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 1;17(19):6118-24.

425. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol.* 2009 1;183(7):4169-75.
426. Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, A. C. Keller, M. Lochner, E. Schneider, M. Dy, G. Eberl, and M. C. Leite-de-Moraes. Critical role of ROR- $\gamma$  in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008;105:19845–19850.
427. Ciric, B., M. El-behi, R. Cabrera, G. X. Zhang, and A. Rostami. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8 T cells. *J. Immunol.* 2009. 182: 5296 –5305.
428. O'Brien, R. L., C. L. Roark, and W. K. Born. IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 2009;39:662– 666.
429. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation Emerging Microbes & Infections 2013 2:e60.doi:10.1038/emi.2013.58
430. Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavodny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara, and M. T. Lotze. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003;101:2620 –2627.
431. Honorati, M. C., S. Neri, L. Cattini, and A. Facchini. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:345–352.
432. Antonyamy, M. A., W. C. Fanslow, F. Fu, W. Li, S. Qian, A. B. Troutt, and A. W. Thomson. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J. Immunol.* 1999;162:577–584.
433. Shi L, Chen S, Yang L, Li Y. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2013 30;6(1):74.
434. Oft M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(3):194-9.
435. Zhao S, Wu D, Wu P, Wang Z, Huang J. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139598.

- 436.Oslowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* 2011;490:71-92.
- 437.Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3460-3470.
- 438.Henson SM, Akbar AN. KLRG1--more than a marker for T cell senescence. *Age (Dordr).* 2009;31(4):285-91.
- 439.Voehringer D, Koschella M, Pircher H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood.* 2002 15;100(10):3698-702.
- 440.Tessmer MS, Fugere C, Stevenaert F, Naidenko OV, Chong HJ, Leclercq G, Brossay L. KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *Int Immunol.* 2007;19(4):391-400.
- 441.Gründemann C, Bauer M, Schweier O, von Oppen N, Lässig U, Saudan P, Becker KF, Karp K, Hanke T, Bachmann MF, Pircher H. Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1. *J Immunol.* 2006 1;176(3):1311-5.
- 442.Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 2000;148(4):779-90.
- 443.Schwartzkopff S, Gründemann C, Schweier O, Rosshart S, Karjalainen KE, Becker KF, Pircher H. Tumor-associated E-cadherin mutations affect binding to the killer cell lectin-like receptor G1 in humans. *J Immunol.* 2007 15;179(2):1022-9.
- 444.Rosshart S, Hofmann M, Schweier O, Pfaff AK, Yoshimoto K, Takeuchi T, Molnar E, Schamel WW, Pircher H. Interaction of KLRG1 with E-cadherin: new functional and structural insights. *Eur J Immunol.* 2008;38(12):3354-64.
- 445.Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med.* 2005; 202: 1001-1012.

- 446.Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22.
- 447.Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, Janßen O, Cerwenka A, Bryceson YT, Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*. 2013 22;122(8):1411-8.
- 448.Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med* 2008;44:1217-31.
- 449.Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, et al. Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J Immunol* 2009;182:1696-705.
- 450.Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*. 2010;70(1):68-77.
- 451.Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1580967.
- 452.Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16 Suppl 1:S27-36.
- 453.Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol* 2012; 3: 208.
- 454.Yang WC. Myeloid-derived Suppressor Cells in Autoimmune Diabetes: Their Anti-diabetic Potential and Mechanism. *J Diabetes Metab* 2013; S12:004. doi:10.4172/2155-6156.S12-004
- 455.Murray S, Lundqvist A. Targeting the tumor microenvironment to improve natural killer cell-based immunotherapies: On being in the right place at the right time, with resilience. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(3):607-11.

456. Ghiringhelli, F., M'énard, C., Martin, F. and Zitvogel, L., The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol. Rev.* 2006. 214: 229–238. 40
457. Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E. et al., CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* 2005. 202: 1075–1085.
458. Sitrin J, Ring A, Garcia KC, Benoist C, Mathis D. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *J Exp Med* 2013; 210: 1153-65.
459. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2012; 22: 275-81.
460. Wesolowski R, Markowitz J, Carson WE 3rd. Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *J Immunother Cancer* 2013; 1: 10.
461. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 162-74.
462. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol Biol* 2011; 677:375-93.
463. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN, Banerjee SK. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PLoS One* 2015; 10: e0125270.
464. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 5698931.
465. Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; doi: 10.1002/term.2452.



466. Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, Yu W, Shen C, Liu J, Ren X. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol* 2013; 190: 3783-97.
467. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002;107:452-460.
468. Sucher R, Kurz K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D, Brandacher G. IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the Pathogenesis of Malignant Tumor Disease. *International Journal of Tryptophan Research* 2010;3:113-120.
469. Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Dendritic Cell Tolerogenicity. *Immunological investigations* 2012;41:738-764.
470. Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A, Vitale M. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 2006;108:4118-25.
471. Li R, Wei F, Yu J, Li H, Ren X, Hao X. IDO inhibits T-cell function through suppressing Vav1 expression and activation. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1402-8.
472. Kramer J, Moeller EL, Hachey A, Mansfield KG, Wachtman LM. Differential expression of GLUT2 in pancreatic islets and kidneys of New and Old World nonhuman primates. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296 (3): R786-93.
473. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;109:228–234.
474. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 1995 1;375(6530):408-11.
475. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:iii37–iii40.

- 476.Hoffman RA, Mahidhara RS, Wolf-Johnston AS, Lu L, Thomson AW, Simmons RL. Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation* 2002; 74:836–845.
- 477.Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol.* 2014;44(6):1582-92.
- 478.Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunolo* 1998;6:119-28.
- 479.Citro A, Valle A, Cantarelli E, Mercalli A, Pellegrini S, Liberati D, Daffonchio L, Kastsiuchenka O, Ruffini PA, Battaglia M, Allegretti M, Piemonti L. 106 CXCR1/2 inhibition blocks and reverses type 1 diabetes in mice. *Diabetes* 2015; 64:1329-40.
- 480.Flodstrom M, Tyrberg B, Eizirik DL, Sandler S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1999;48:706-13.
- 481.Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Naruse A. New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 1999;22(9):988–9.
- 482.Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu* 1980; 29: 1-13.
- 483.Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. *Metabolic and morphologic studies.* *Diabetes* 1977; 26: 100-12.
- 484.Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunology today* 1993;14:193-6.
- 485.Hanafusa T, Miyagawa J, Nakajima H, Tomita K, Kuwajima M, Matsuzawa Y, Tarui S. The NOD mouse. *Diabetes res clin pract* 1994; 24 Suppl: S307-11.

486. Jayasimhan A, Mansour KP, Slattery RM. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clin sci* 2014;126:1-18.
487. Burren OS, Adlem EC, Achuthan P, Christensen M, Coulson RM, Todd JA. T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. *Nucleic acids res* 2011;39:D997-1001.
488. Driver JP, Chen YG, Mathews CE. Comparative genetics: synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud* 2012;9:169-87.
489. Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopath* 2011;33:67-87.
490. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*. 2002;51(6):1938-48.
491. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, Rastaldi MP, Villaggio B, Gianiorio F, Giannoni M, Rimoldi L, Lauria F, Miji M, Deferrari G, Garibotto G. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2007;72(10):1262-72.

## 9. ПРИЛОГ

### 9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

Монографска публикација

ТД

Тип записа:

Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада:

Докторска дисертација

ВР

Аутор:

Невена М. Гајовић

АУ

Ментор/коментор

проф. др Иван П. Јовановић

Наслов рада:

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију  
мишјег тумора дојке

Језик публикације:

Српски (ћирилица)

ЈП

Језик извода:

Српски/енглески

ЈИ

Земља публикавања:

Србија

ЗП

<b>Уже географско подручје:</b> УГП	Србија
<b>Година:</b> ГО	2018.
<b>Издавач:</b> ИЗ	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> МС	34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
<b>Физички опис рада:</b> ФО	Дисертација има 169 стране, 9 поглавља, 3 табеле, 38 фигура и 491 референцу
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b> ДИ	Имунологија, инфекција, инфламација
<b>Предметна одредница/кључне речи:</b>	Тумор дојке, дијабетес мелитус, имунски одговор
<b>УДК:</b>	
<b>Чува се:</b> ЧУ	У Библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац Србија, Светозара Марковића 69
<b>Важна напомена:</b> МН	
<b>Извод:</b> ИД	Особе оболеле од дијабетес мелитуса имају већу инциденцу и морталитет од тумора. Претходне студије су показале да оксидативни стрес, који настаје као последица хипергликемије, убрзава

метастазирање. У овом истраживању дијабетес је индукован једном високом дозом стрептозотоцина у циљу испитивања утицаја дијабетес мелитуса на раст тумора и модулацију антитуморског имунског одговора, у моделу 4Т1 карцинома дојке у BALB/с мишева. Дијабетес мелитус је убрзао појаву, раст и масу примарног тумора што је праћено смањеном цитотоксичношћу NK ћелија према 4Т1 ћелијама, *in vitro*. Дијабетес мелитус је значајно смањио процентуалну заступљеност NKG2D<sup>+</sup>, перфорин<sup>+</sup>, гранзим<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-17<sup>+</sup> NK ћелија, док је повећао експресију PD-1 молекула и продукцију IL-10 у NK ћелијама у слезини. Дијабетес је значајно смањио проценат NKG2D<sup>+</sup> NK ћелија и повећао проценат PD-1<sup>+</sup> NK ћелија и у примарном тумору. Дијабетично стање је повећало акумулацију IL-10<sup>+</sup> Tregs и TGF- $\beta$ <sup>+</sup> мијелоидних супресорских ћелија (MDSCs) у слезини и примарном тумору. Дијабетични серум је у *in vitro* условима значајно повећао проценат KLRG-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> NK ћелија, смањио проценат IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK ћелија, експресију NKp46 и продукцију перфорина, гранзима, CD107a и IL-17 у NK ћелијама у поређењу са серумом коме је додата глукоза односно са контролним серумом. Дијабетес мелитус је значајно повећао експресију индуцибилне азот моноксид синтазе (iNOS) и индоламин 2,3-диоксигеназе (IDO) у слезинским MDSCs и дендритским ћелијама (DC) мишева пре индукције тумора. Специфични инхибитор индоламин 2,3-диоксигеназе, 1-метил-DL-триптофан, је готово у потпуности повратио фенотип NK ћелија култивисаних у дијабетичном серуму. Ови резултати указују да дијабетес мелитус убрзава раст тумора повећаном акумулацијом имуносупресивних ћелија и супресијом NK ћелија активношћу ензима IDO.

Датум прихватања теме од стране **26.10.2016.г.**

**ННВ:**

**ДП**

Датум одбране:

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

**Председник:**

**Проф. др Миодраг Лукић**, редовни професор-емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

**Ментор:**

**проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија

**Члан:**

**проф. др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија

**Члан:**

**проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија

**Члан:**

**проф. др Срђан Нинковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија

**Члан:**

**доц. др Јелена Пантић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

## 9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

Monographic publication

DT

**Type of record:**

Textual printed material

TR

**Contents code:**

PhD thesis

CC

**Author:**

Nevena M. Gajović

AU

**Menthor/co-mentor:**

Ivan P. Jovanović, MD PhD

MN

**Title:**

The influence of diabetes mellitus on growth and progression of murine mammary carcinoma

TI

**Language of text:**

Serbian (Cyrillic)

LT

**Language of abstract:**

Serbian/English



<b>Country of publication:</b> CP	Serbia
<b>Locality of publication:</b> LP	Serbia
<b>Publication year:</b> PY	2018.
<b>Publisher:</b> PU	Author reprint
<b>Publication place:</b> PP	34000 Kragujevac, Serbia Svetozara Markovića 69
<b>Physical description:</b>	Thesis contains 169 pages, 9 chapters, 3 tables, 38 figures and 491 citations
<b>Scientific field:</b> SF	Medicine
<b>Scientific discipline:</b> SD	Immunology, Infection, Inflammation
<b>Subject/key words:</b> SKW	Mammary carcinoma, diabetes melitus, immune response
<b>UDC:</b>	
<b>Holding data:</b>	Library of Faculty of medical sciences Kragujevac, 34000 Kragujevac Serbia, Svetozara Markovića 69
<b>Note:</b> N	Diabetic patients have higher incidence and mortality of cancer. Recent study revealed that hyperglycemia- induced oxidative stress is involved in the acceleration

of tumor metastasis. We used model of high dose streptozotocin-induced diabetes to investigate its effect on tumor growth and modulation of antitumor immune response of 4T1 murine breast cancer in BALB/c mice. Diabetes accelerated tumor appearance, growth and weight, which was associated with decreased NK cells cytotoxicity against 4T1 tumor cells *in vitro*. Diabetes reduced frequencies of systemic NKG2D<sup>+</sup>, perforin<sup>+</sup>, granzyme<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup> NK cells, while increased level of PD-1 expression and production of IL-10 in NK cells. Diabetes decreased percentage of NKG2D<sup>+</sup>NK cells and increased percentage of PD-1<sup>+</sup> NK cells also in primary tumor. Diabetes increased accumulation of IL-10<sup>+</sup> Tregs and TGF- $\beta$ <sup>+</sup> myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in spleen and tumor. Diabetic sera *in vitro* significantly increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NK cells, decreased percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells, expression of NKp46 and production of perforin, granzyme, CD107a and IL-17 per NK cell in comparison to glucose added mouse sera and control sera. Significantly increased percentages of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) producing MDSCs and dendritic cells (DC) were found in the spleens of diabetic mice prior to tumor induction. 1-methyl-DL-tryptophan, specific IDO inhibitor, almost completely restored phenotype of NK cells cultivated in diabetic sera. These findings indicate that diabetes promotes breast cancer growth at least in part through increased accumulation of immunosuppressive cells and IDO mediated attenuation of NK cells.

**Accepted by the Scientific Board on: 26.10.2016.g.**

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty)**

**DB**

**President:**

**Miodrag Lukić MD PhD**, Professor emeritus of  
Microbiology and Immunology,  
University of Kragujevac

**Menthor:**

**Ivan Jovanović MD PhD**, Associate Professor of  
Microbiology and immunology and Oncology, Faculty  
of Medical sciences, University of Kragujevac

**Member:**

**Aleksandar Đukić MD PhD**, Professor of  
Pathophysiology, Faculty of Medical sciences,  
University of Kragujevac

**Member:**

**Danilo Vojvodić MD PhD**, Professor of Immunology,  
Medical faculty, University of Defense, Belgrade

**Member:**

**Srđan Ninković MD PhD**, Associate Professor of  
Surgery, Medical faculty, University of Kragujevac

**Member:**

**Jelena Pantić MD PhD**, Assistant Professor of  
Microbiology and immunology, Faculty of Medical  
sciences, University of Kragujevac

### 9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Невена Гајовић рођена је 04.04.1987. године у Крагујевцу, где је похађала основну школу и Прву крагујевачку гимназију. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2006/2007. године, а дипломирала је 30.07.2013. године са просечном оценом 9,22 (девет и 22/100), чиме је стекла стручно звање доктор медицине. У току студирања, школске 2007/08. и 2008/09. године била је демонстратор на предмету Хистологија и ембриологија. Обавезан лекарски стаж обавила је у КЦ Крагујевац и ДЗ Крагујевац у трајању од 6 месеци, и положила стручни испит за доктора медицине. Од 2014. године запослена је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где данас обавља послове сарадника у звању асистента за ужу научну област Микробиологија и имунологија.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација уписала је 2013/2014. године. Усмени докторски испит је положила у фебруару 2016. године.

Започела је специјалистички стаж из Имунологије 11. октобра 2016., на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Активно учествује у истраживачком раду у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Руководилац је јуниор пројекта под називом “Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке” који се реализује на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Аутор је и коаутор више радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом.

Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

## BIOGRAPHY

### Author Biography

Nevena Gajovic was born on April 4, 1987. in Kragujevac, where she finished elementary school and Grammar school. She enrolled Integrated academic studies of medicine at the Faculty of Medicine in Kragujevac in 2006/2007, and graduated at the same faculty on 30.07.2013. with an average grade of 9.22 (nine and 22/100), thus gaining the professional title of a doctor of medicine. During the course of study, the school year 2007/08. and 2008/09. she was a demonstrator on the subject Histology and Embryology. Upon completion of her basic studies, she completed her doctor's internship in Clinical center for 6 months, and passed the professional examination for the doctor of medicine. Since 2014, she has been employed at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac, where she has been working as an associate in teaching in field of Microbiology and immunology.

She enrolled Doctoral academic studies at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac, the elective area of Immunology, infection and inflammation, in 2013. She passed the oral doctoral examination in February 2016. She started a specialist internship in Immunology on October 11, 2016, at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac. She is actively participating in the research work at the Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac. She is the manager of a junior project titled „Effect of diabetes mellitus on growth and progression of murine mammary tumor“, at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac. She is the author and co-author of several works in journals of international and national significance with a review.

She speaks English and knows to work on a computer.

#### 9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

##### Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Gajovic N**, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML and Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocrine-related cancer* 2018; 25: 493-507
2. Jovanovic M, **Gajovic N**, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A and Jovanovic I. Fecal galectin-3: A new promising biomarker for severity and progression of colorectal carcinoma. *Mediators of Inflammation* 2018; DOI: 10.1155/2018/8031328
3. Jovanovic M, **Gajovic N**, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Mirkovic D, Milev B, Maric V, Arsenijevic N. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit Pregl.* (2018); DOI: 10.2298/VSP171201007J
4. Jovanovic M, **Gajovic N**, Jurisevic M, Simovic Markovic B, Maric V, Jovanovic M, Arsenijevic N, Zdravkovic N. Fecal sST2 correlates with disease severity of ulcerative colitis. *Vojnosanit Pregl.* 2019; Novemer vol. 76 (No.11): pp. DOI: 10.2298/VSP171225026J
5. Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Gajovic NM**, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. The frog skin host-defense peptide frenatin 2.1S enhances recruitment, activation and tumoricidal capacity of NK cells. *Peptides* 2017; 93:44-50.
6. Lukic R, **Gajovic N**, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, Popovska Jovicic B, Arsenijevic N. Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Disease Markers* doi:10.1155/2017/6275987
7. Vasovic M, **Gajovic N**, Brajkovic D, Jovanovic M, Zdravkovic N, Kanjevac T. The relationship between the immune system and oral manifestations of Inflammatory bowel disease: a review. *Central European Journal of Immunology* 10.5114/ceji.2015.55684
8. **Gajovic N**, Jovanovic I, Ilic A, Jeremic N, Jakovljevic V, Arsenijevic N, Lukic M. Diabetes mellitus directs NKT cells toward type 2 and regulatory phenotype *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17 (1): 35-41
9. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, **Gajovic N**, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Serb J Exp Clin Res.* DOI: 10.1515/SJECR-2016-0042
10. Lukic R, Lukovic B, **Gajović N**, Prljic S, Đukic S Mechanism of intracellular

chlamydiae survival Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (2): 145-151.

11. Jovanović I, **Gajović N**, Radosavljević G, Pantić J, Pejnović N, Arsenijević N, Lukić M. Innate lymphoid cells: roles in tumour genesis and progression Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (2): 85-90
12. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, **Gajovic N**, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- $\beta$  as a marker of ulcerative colitis and disease severity. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019

## 9.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

### The published paper in extenso in international journals

1. **Gajovic N**, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML and Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocrine-related cancer* 2018; 25: 493-507
2. Jovanovic M, **Gajovic N**, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A and Jovanovic I. Fecal galectin-3: A new promising biomarker for severity and progression of colorectal carcinoma. *Mediators of Inflammation* 2018; DOI: 10.1155/2018/8031328
3. Jovanovic M, **Gajovic N**, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Mirkovic D, Milev B, Maric V, Arsenijevic N. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit Pregl.* (2018); DOI: 10.2298/VSP171201007J
4. Jovanovic M, **Gajovic N**, Jurisevic M, Simovic Markovic B, Maric V, Jovanovic M, Arsenijevic N, Zdravkovic N. Fecal sST2 correlates with disease severity of ulcerative colitis. *Vojnosanit Pregl.* 2019; Novemer vol. 76 (No.11): pp. DOI: 10.2298/VSP171225026J
5. Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Gajovic NM**, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. The frog skin host-defense peptide frenatin 2.1S enhances recruitment, activation and tumoricidal capacity of NK cells. *Peptides* 2017; 93:44-50.
6. Lukic R, **Gajovic N**, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, Popovska Jovicic B, Arsenijevic N. Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Disease Markers* doi:10.1155/2017/6275987
7. Vasovic M, **Gajovic N**, Brajkovic D, Jovanovic M, Zdravkovic N, Kanjevac T. The relationship between the immune system and oral manifestations of Inflammatory bowel disease: a review. *Central European Journal of Immunology* 10.5114/ceji.2015.55684
8. **Gajovic N**, Jovanovic I, Ilic A, Jeremic N, Jakovljevic V, Arsenijevic N, Lukic M. Diabetes mellitus directs NKT cells toward type 2 and regulatory phenotype *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17 (1): 35-41
9. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, **Gajovic N**, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Serb J Exp Clin Res.* DOI: 10.1515/SJECR-2016-0042
10. Lukic R, Lukovic B, **Gajović N**, Prljic S, Đukic S Mechanism of intracellular



chlamydiae survival Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (2): 145-151.

11. Jovanović I, **Gajović N**, Radosavljević G, Pantić J, Pejnović N, Arsenijević N, Lukić M. Innate lymphoid cells: roles in tumour genesis and progression Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (2): 85-90
12. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, **Gajovic N**, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- $\beta$  as a marker of ulcerative colitis and disease severity. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Невена Гајовић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 30.5.2018. године,

Н Гајовић

потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Невена Гајовић \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам


не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 30.5.2018. године,

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



## RESEARCH

# Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice

Nevena Gajovic, Milena Jurisevic, Jelena Pantic, Gordana Radosavljevic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L Lukic and Ivan Jovanovic

Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence should be addressed to I Jovanovic: [ivan.jovanovic@medf.kg.ac.rs](mailto:ivan.jovanovic@medf.kg.ac.rs)

## Abstract

Diabetic patients have higher incidence and mortality of cancer. Recent study revealed that hyperglycemia-induced oxidative stress is involved in the acceleration of tumor metastasis. We used model of high-dose streptozotocin-induced diabetes to investigate its effect on tumor growth and modulation of antitumor immune response of 4T1 murine breast cancer in BALB/c mice. Diabetes accelerated tumor appearance, growth and weight, which was associated with decreased NK cells cytotoxicity against 4T1 tumor cells *in vitro*. Diabetes reduced frequencies of systemic NKG2D<sup>+</sup>, perforin<sup>+</sup>, granzyme<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup> NK cells, while increased level of PD-1 expression and production of IL-10 in NK cells. Diabetes decreased percentage of NKG2D<sup>+</sup>NK cells and increased percentage of PD-1<sup>+</sup> NK cells also in primary tumor. Diabetes increased accumulation of IL-10<sup>+</sup> Tregs and TGF- $\beta$ <sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in spleen and tumor. Diabetic sera *in vitro* significantly increased the percentage of KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NK cells, decreased the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells, expression of NKp46 and production of perforin, granzyme, CD107a and IL-17 per NK cell in comparison to glucose-added mouse sera and control sera. Significantly increased percentages of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) producing MDSCs and dendritic cells (DC) were found in the spleens of diabetic mice prior to tumor induction. 1-methyl-DL-tryptophan, specific IDO inhibitor, almost completely restored phenotype of NK cells cultivated in diabetic sera. These findings indicate that diabetes promotes breast cancer growth at least in part through increased accumulation of immunosuppressive cells and IDO-mediated attenuation of NK cells.

## Key Words

- ▶ diabetes mellitus
- ▶ breast cancer
- ▶ NK cells
- ▶ myeloid-derived suppressor cells
- ▶ indoleamine 2,3-dioxygenase

Endocrine-Related Cancer  
(2018) 25, 493–507

## Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women and one of the leading causes of death related to tumors (DeSantis et al. 2014, Tao et al. 2015). Diabetes mellitus is metabolic disease, mainly characterized by hyperglycemia, resulting due to lack of insulin secretion

or insulin action (American Diabetes Association 2014). Beside very important role of hyperglycemia, the other factors such as oxidative stress and hyperlipidemia are also involved in the development of diabetic complications (Kangralkar et al. 2010).

Previous animal and human studies indicate that diabetes is associated with increased risk of breast cancer development because of many shared risk factors (Goto *et al.* 1995, Vigneri *et al.* 2009, Giovannucci *et al.* 2010, Cohen & LeRoith 2012, Shi & Hu 2014). Diabetes may influence tumor genesis and progression by several mechanisms (Shi & Hu 2014). According to Warburg's hypothesis, cancer cells use far more glucose for energy and survival than regular cells, implicating that hyperglycemia could facilitate tumor growth (Vander Heiden *et al.* 2009). Abundant reactive oxidative species, one of the main characteristics of diabetes, are involved in both, the initiation and progression of cancer (Waris & Ahsan 2006). Recent study indicated that a hyperglycemia-mediated enhanced oxidative stress increased the expression of adhesive molecules on endothelial cells thus accelerating melanoma metastasis and that nullifying systemic oxidative stress suppressed progression of tumor metastasis in diabetes (Ikemura *et al.* 2013). These suggested mechanisms explain the possible linkage between diabetes and accelerated genesis and progression of tumors. However, the role of diabetes in primary tumor growth and immune response to tumor is incompletely understood.

There is evidence that diabetes compromises defense to infection and immune response in general, including NK cells. Type 1 diabetic patients have decreased expression and aberrant signaling through the NKG2D receptor as well as markedly lower expression of p30/p46 NK-activating receptor molecules (Rodacki *et al.* 2007, Qin *et al.* 2011). Chen and coworkers have shown that stimulated streptozotocin (STZ)-diabetic cytotoxic T cells produce less perforin and TNF- $\alpha$  and thus they have no capability to eliminate melanoma cells and improve the survival of tumor-bearing mice (Chen *et al.* 2014). Other studies have shown that diabetes decreases total percentage and also impairs the expression of chemokine receptors and costimulatory molecules and decreases the production of proinflammatory cytokines in professional antigen-presenting cells (Nieminen *et al.* 2012, Sun *et al.* 2012). To our knowledge, there are no data about immunosuppressive cells, important players in biology of tumor, in diabetic condition. As mammary cancer is one of the most frequent tumors in population, the aim of our study was to investigate the effects of diabetes on murine 4T1 breast cancer growth and alteration of antitumor immune response.

Herewith, we provide the evidence that diabetic condition accelerates murine breast cancer growth, promotes suppressive activity of MDSC and regulatory T cells (Treg) affecting NK cells activity at least in part by enhancing 2,3-dioxygenase (IDO) production.

## Material and methods

### Mice

Six-to-eight-week-old female BALB/C mice used in all experiments were obtained from Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. Mice were housed under standard laboratory conditions ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative humidity  $51 \pm 5\%$  and a 12-h light-dark cycle) and were administered standard laboratory chow and water *ad libitum*. All experiments were approved by the Animal Ethics Board of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

### Induction of diabetes

BALB/C mice received an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, obtained from Sigma Chemical) dissolved in sodium citrate buffer (CB, pH 4.5) at a single dose of 170 mg/kg body weight. Control group of mice received only 100  $\mu\text{L}$  of CB.

### Induction of mammary carcinoma

The mouse mammary carcinoma cell line 4T1, syngenic to the BALB/c background, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). 4T1 cells were maintained in culture medium (Dulbecco's-modified Eagle's medium added with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L L-glutamine, 1 mmol/L penicillin-streptomycin and 1 mmol/L mixed nonessential amino acids (Sigma). Subconfluent monolayers, in log growth phase, were harvested by brief treatment with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS, PAA Laboratories GmbH, Etobicoke, Canada) and washed three times in serum-free PBS before use in all *in vivo* and *in vitro* experiments. The number of passage of 4T1 cell line was 7–10 in all experiments. The number of viable tumor cells was determined by trypan blue exclusion. Suspensions only with >95% viable cells were used in experiments. After 4 of weeks STZ or CB injection, each mouse was inoculated with  $5 \times 10^4$  4T1 tumor cells orthotopically into the 4th mammary fat pad.

### Estimation of *in vivo* 4T1 tumor appearance and growth

Appearance of primary tumor and tumor diameter were assessed during experiment. The size of primary 4T1 mammary tumors was assessed morphometrically

from the day of tumor appearance, two times per week, using electronic calipers in two dimensions. Thirty-six days after tumor cell injection, mice were killed and the primary tumors were surgically removed and measured their weight. Blood was taken from the abdominal aorta.

### Determination of catalase

Red blood cells (RBC) isolated from the blood of STZ-treated and CB-treated mice were used for measuring antioxidative enzyme, catalase (CAT). RBCs were treated as previously described, and the activity of CAT in RBCs are presented in units per gram of hemoglobin  $\times 10^3$  (U/g Hb  $\times 10^3$ ) (Gajovic *et al.* 2016).

### Purification of CD8<sup>+</sup> T cells

CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens of tumor-bearing mice treated with STZ or CB, respectively using magnetic cell separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously described (Jovanovic *et al.* 2014). After negative selection, unlabeled cells were highly enriched with CD8<sup>+</sup> T cells.

### Purification of NK cells

NK49b<sup>+</sup> cells were purified from spleens of diabetic and control group of mice using magnetic cell separation kit (Miltenyi Biotec) as previously described (Jovanovic *et al.* 2014). After positive selection, labeled cells were highly enriched with NK cells.

### Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay was determined by the xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) DP (Dual Plate) Instrument (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. 100  $\mu$ L of complete medium were added to each well and background impedance on the plates was measured on the xCELLigence RTCA DP instrument at 37° and 5% CO<sub>2</sub>. The E-plate 16 were placed in the xCELLigence RTCA DP, and impedance measurements were recorded every 15 min for 60h. 4T1 cells ( $1 \times 10^4$ /well) were seeded in plate and used as target cells. After 36h, splenocytes (ratio of target to effector cells (T:E=1:20), purified CD8<sup>+</sup> T cells (T:E=1:5) and NK cells (T:E=1:5) derived from spleen of experimental and control group of mice, respectively, were added in plates as effector cells. Splenocytes, CD8<sup>+</sup> T-cell and NK cell-mediated death of tumor cells were

monitored in real time and was indicated by a decrease in cell index. Data were analyzed with RTCA Software 1.2 (ACEA Biosciences).

### Flow cytometric analyses of splenocytes and tumor-infiltrating leukocytes

Single-cell suspensions of spleens were obtained by mechanical dispersion. Single-cell suspensions of primary tumors were obtained by enzymatic digestion as previously described (Jovanovic *et al.* 2014). Fluorochrome-labeled anti-mouse mAbs specific for CD3 (145-2C11), CD49b (HMa2), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), NKp46 (29A1.4), CD69 (H1.2F3), CD11b (M1/70), CD11c (N418), MHC class II (14-4-4S), CD86 (GL1), CD279 (J43), Ly-6C/G (RB6/8C5), NKG2D (CX5), KLRG-1 (2F1) or isotype-matched controls (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA; Invitrogen) were used. For intracellular staining, cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/mL, Sigma-Aldrich), ionomycin (500 ng/mL, Sigma-Aldrich) and GolgiStop (BD Pharmingen) for 4h and stained with fluorochrome-labeled anti-mouse mAbs specific for perforin (eBio0MAK-D), granzyme (16g6; NGZB), CD107a (1D4B), Foxp3 (MF23), IFN- $\gamma$  (XMG1.2), IL-10 (JES5-16E3), IL-17 (C15.6) and TGF- $\beta$  (141231), IDO (2E2/IDO1) and iNOS (CXNFT) (BD Pharmingen; BioLegend, San Diego, CA, USA; eBiosciences, San Diego, CA, USA). Flow cytometry was conducted on FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the data were analyzed using FlowJo (Tree Star).

### In vivo depletion of NK cells

For *in vivo* depletion of NK cells, mice were treated i.p. with 100  $\mu$ g of anti-GM1b anti-asialo antibody (Waco Chemicals, Richmond, VA, USA) 1 day prior and 5 days after 4T1 tumor cell application. Efficacy of depletion of NK cells was >95%.

### In vitro experiments on splenocytes

Freshly isolated splenocytes derived from healthy mice were cultured for 24h in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% of serum isolated from diabetic mice, serum isolated from control mice with added glucose (glucose level was equal ( $16.7 \pm 0.8$  mmol/L) to the glucose concentration in serum of diabetic mice) and serum isolated from control mice, respectively. After incubation, cells were harvested and stained with appropriate antibodies for FACS and evaluated by flow cytometry.



### Measurement of cytokines

Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, IL-17 and IL-10 in the mouse serum were measured using ELISA kits specific for the mouse cytokines (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

### *In vitro* inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Freshly isolated splenocytes derived from healthy mice were cultured for 24 h in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% of serum isolated from diabetic mice, serum isolated from diabetic mice with added peg-catalase (Sigma-Aldrich) and serum isolated from control mice, respectively. Fifteen minutes prior the addition of serum diabetic mice, splenocytes were incubated with 2000 U/mL catalase, which converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> (Peraldi et al. 2009). After incubation, cells were harvested and stained with appropriate antibodies for FACS and evaluated by flow cytometry.

### *In vitro* pharmacological inhibition of IDO

Freshly isolated splenocytes from healthy mice were cultured for 24 h in RPMI medium containing 10% of serum isolated from diabetic mice with or without addition of inhibitor of IDO enzymatic activity, 1 mM 1-methyltryptophan, (1-MT, Sigma-Aldrich) and 10% of serum isolated from healthy mice, respectively. After incubation, cells were harvested, stained with appropriate antibodies for FACS and analyzed by flow cytometry.

### Statistical analysis

The data were analyzed using commercially available software (SPSS, version 20). Results were analyzed using the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test where appropriate. Difference in appearance of primary tumor was assessed using Kaplan-Meier analysis and was evaluated using the log-rank test. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Enhancement of tumor growth in hyperglycemic mice

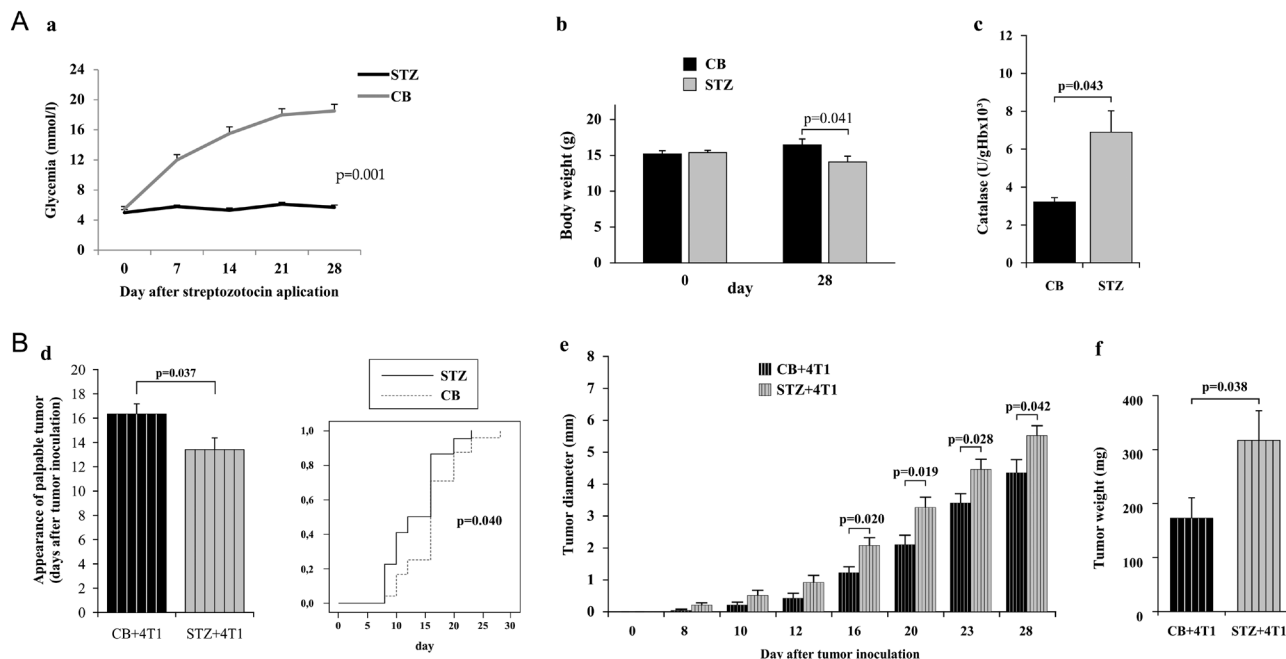
Glycemia and body weight were measured weekly after treatment with STZ. As shown in Fig. 1a and b, glycemia was significantly increased ( $P = 0.001$ ) while the

body weight was significantly decreased ( $P = 0.041$ ) in STZ-treated group of mice compared to control group on the 28th day after STZ injection. STZ-treated mice had significantly increased catalase activity compared to control mice ( $P = 0.043$ ; Fig. 1c). At that time, 4T1 mammary carcinoma cells were inoculated and tumor appearance and tumor diameter were monitored three times per week while tumor weight was measured after mice were killed. The appearance of palpable tumor was significantly accelerated in STZ-treated mice ( $P = 0.037$ ; Fig. 1d). Log-rank test confirmed significant difference in tumor appearance between defined groups, which was illustrated using Kaplan-Meier curves ( $P = 0.040$ ; Fig. 1d). Primary tumor diameters were increased in STZ-treated mice in comparison to control mice and the difference reached statistical significance 16 days after tumor induction ( $P = 0.020$ ; Fig. 1e). Thirty-five days after tumor cell application, mice were killed, and tumors were isolated and measured. Tumor weights were significantly increased in mice treated with STZ compared to controls ( $P = 0.038$ ; Fig. 1f).

### Altered NK but not cytotoxic T cells activity contributes to enhanced tumor growth in diabetic mice

In order to test cells important for enhanced tumor growth of STZ-treated animals, we evaluated the cytotoxicity of splenocytes and isolated NK cells and CD8<sup>+</sup>T cells against 4T1 tumor cell line, *in vitro*. The results obtained by xCELLigence system for monitoring real-time cytotoxicity showed that diabetes led to decreased cytotoxic activity of splenocytes ( $P = 0.021$ ; Fig. 2A). In order to define the effector cells responsible for diminished cytotoxic activity of splenocytes, we isolated splenic CD8<sup>+</sup> T cells from tumor-bearing mice and tested their effect on 4T1 cells. There were no differences in cytotoxicity between CD8<sup>+</sup> T lymphocytes derived from STZ-treated and control mice (Fig. 2B). Further, we tested cytotoxic activity of isolated CD49b<sup>+</sup> NK cells against tumor cells, at same target:effector ratio as for CD8<sup>+</sup> T cells (1:5). As shown in Fig. 2C, splenic NK cells isolated from STZ-treated mice were significantly less cytotoxic against 4T1 cells ( $P = 0.001$ ), indicating that diabetes significantly reduced cytotoxic potential of NK cell population.

Further, we depleted NK cells in STZ and CB-treated mice by *in vivo* administration of an antiasialo-GM1 antibody, following tumor challenge. After antiasialo-GM1 treatment, tumor appearance was significantly accelerated in both groups of mice in comparison to non-treated



**Figure 1**

Diabetes accelerates tumor appearance and growth. (A) Metabolic parameters prior to tumor induction. Mice were injected intraperitoneally with STZ at a single dose of 170 mg/kg bodyweight or 100  $\mu$ L of CB only. Glycemia and body weight were measured weekly (a and b). Catalase was measured by spectrophotometry in red blood cells derived from STZ-treated and control mice (c). (B) Appearance and growth of mammary tumor inoculated 28 days after STZ-induced diabetes. Mice were inoculated with  $5 \times 10^4$  4T1 cells. Palpable tumors were monitored for 36 days (d and e). Tumor weight was measured on day 36 (f). Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. of seven mice per group and are representative of three separate experiments. Statistical significance was tested by Mann–Whitney rank-sum test or Student’s unpaired *t*-test and log-rank test where appropriate.

animals, which is confirmed by log-rank test (CB vs CB+AA  $P=0.001$ ; STZ vs STZ+AA  $P=0.001$ ; Fig. 2D). Moreover, after NK cells depletion, the difference in dynamic of tumor appearance as well as in tumor diameter and tumor weight in STZ and CB-treated mice could no longer be registered (Fig. 2D, E and F).

### Diabetes alters functional phenotype of NK cells in spleen

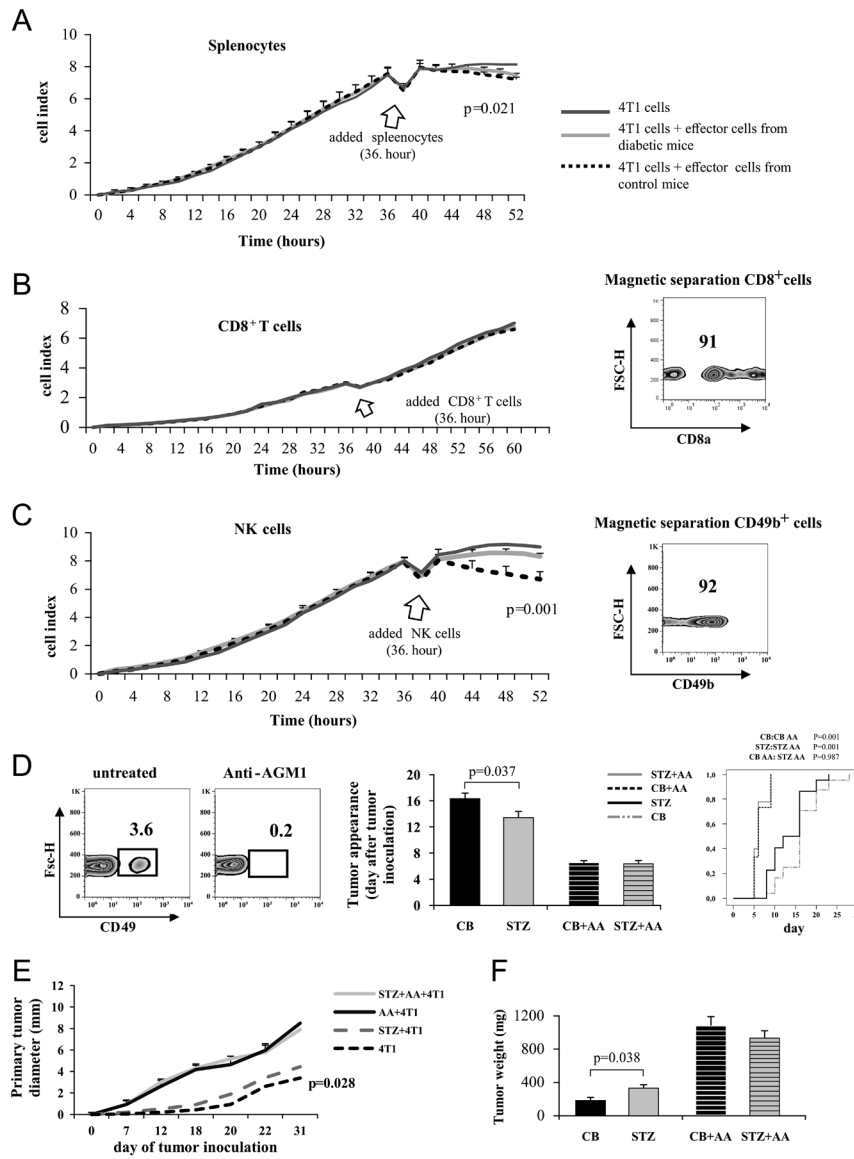
We further examined phenotype of splenic NK cells on the 28th day after STZ induction, prior to tumor induction. Diabetic condition decreased expression of NKG2D-activating receptor on CD3-CD49b<sup>+</sup>NK cells compared to NK cells derived from control mice ( $P=0.005$ ; Fig. 3A). There was no significant difference in percentage of PD-1<sup>+</sup>CD3-CD49b<sup>+</sup>NK cells. However, level of PD-1 expression was significantly increased on individually NK cell derived from STZ-treated mice in comparison to controls ( $P=0.017$ ; Fig. 3B). Intracellular staining of NK cells revealed significantly lower percentage of perforin ( $P=0.045$ ), IFN- $\gamma$  ( $P=0.049$ ) and IL-17 ( $P=0.032$ ) producing CD3-CD49b<sup>+</sup>NK cells in STZ-induced mice

(Fig. 3C, D and E). There was no significant difference ( $P>0.05$ ) in the percentage of IL-10-producing NK cells between groups; however, we found significantly higher expression of IL-10 per NK cell isolated from STZ-treated mice ( $P=0.049$ ; Fig. 3F).

Interestingly, there were no differences in the phenotype of splenic CD8<sup>+</sup> T cells between STZ- and CB-treated tumor-bearing mice, respectively. Analyses revealed insignificant increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in STZ-treated tumor-bearing mice while we did not find any differences in the expression of other surface markers of interest: NKG2D, CD69, Cd107a and PD-1 or in the production of IFN- $\gamma$ , IL-17, perforin and granzyme (data not shown).

### Diabetes facilitates accumulation of innate and acquired immunosuppressive cells in tumor-bearing mice

Analysis of serum cytokines have shown increased concentration of IL-10 in the sera of STZ-treated mice in comparison to control group (Fig. 4A), while there were no differences in the level of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12 and



**Figure 2**

Diabetes diminishes NK cell cytotoxicity. The results obtained by xCELLigence system showed cytotoxic activity of splenocytes (A), CD8<sup>+</sup>T cells (B) and NK cells (C) isolated from mice treated with STZ and CB, respectively. Data are presented as means ± s.e.m. of two individual experiments, each carried out with seven mice per group. Statistical significance was tested by unpaired Student's t-test. NK cells were depleted by administration of anti-sialo GM1 mAb (AA). Representative flow cytometry plots show percentage of splenic NK cells after *in vivo* depletion (D). NK-depleted diabetic and control mice were injected with 5 × 10<sup>4</sup> 4T1 tumor cells. Palpable tumors (E), tumor diameter (F) and tumor weight (G) were measured up to day 36 from the inoculation of 4T1 tumor cells. Data are presented as mean ± s.e.m. of seven mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was tested by Student's unpaired t-test and log-rank test, where appropriate.

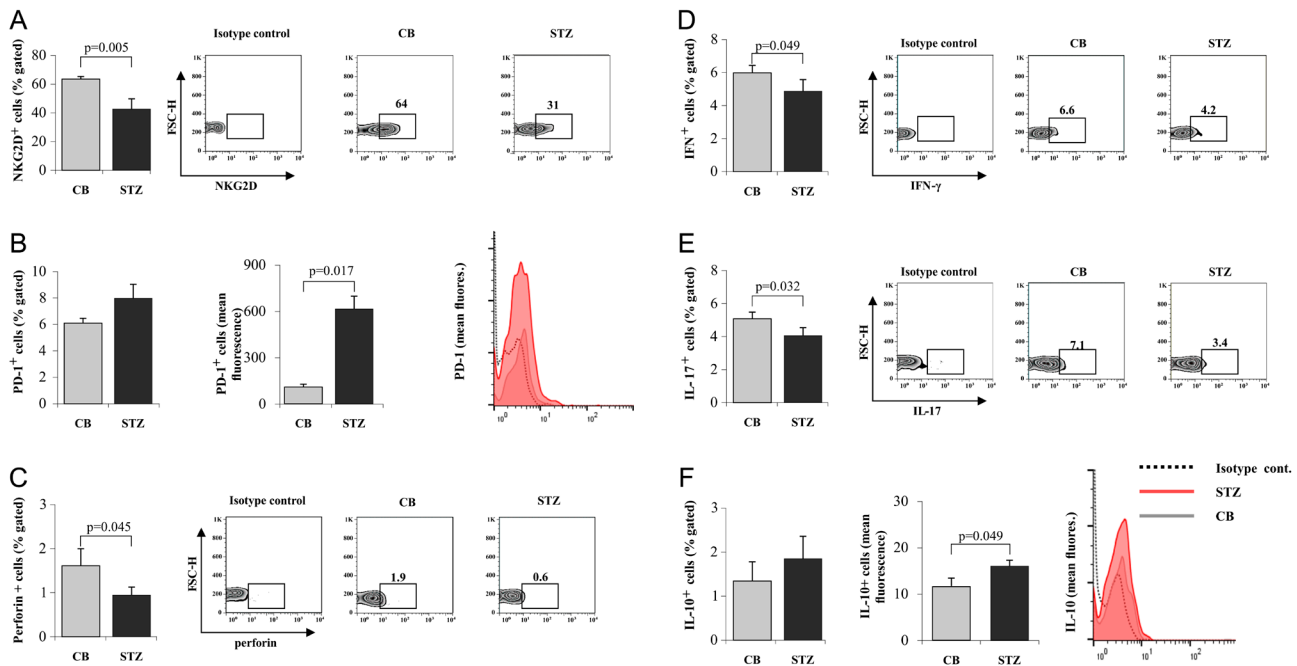
IL-17 between two groups (data not shown). According to these results, we further analyzed immunosuppressive cells in spleens of STZ-treated and CB-treated mice, respectively, prior and 15 days after 4T1 tumor cell application. STZ-treated mice exhibited pronounced increase in percentage of splenic CD11b<sup>+</sup>CD11c-Gr-1<sup>+</sup> MDSCs compared with control mice ( $P=0.029$ ; Fig. 4B). Moreover, STZ-treated mice exhibited increased percentage of splenic CD11b<sup>+</sup>CD11c-Gr-1<sup>+</sup> MDSCs that produce TGF- $\beta$  ( $P=0.03$ ; Fig. 4C). Percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells ( $P=0.029$ ) as well as percentage of IL-10-producing CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells ( $P=0.048$ ) were significantly increased in spleens of diabetic tumor-bearing mice (Fig. 4D and E).

Analyses of dendritic cells (DCs) revealed that there were no differences in the percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells in spleen derived from STZ-treated and CB-treated

mice prior and after tumor challenge (data not shown). There were no differences in expression of MHC II and CD86<sup>+</sup> on CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells derived from spleen of animals from previously defined groups (data not shown).

**Diabetes modulates innate lymphoid and myeloid cells phenotype in primary tumor**

Analysis of NK cells in tumor tissue did not show differences in percentage of CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK cells (Fig. 5A). Analyses of functional phenotype revealed significantly lower percentage of NKG2D<sup>+</sup> ( $P=0.008$ ) and higher percentage of PD-1<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.029$ ) in the tumors of STZ-treated mice compared to animals treated with CB only (Fig. 5B and C).



**Figure 3** Diabetes alters functional phenotype of NK cells in spleen. The graphs and representative facs plots displaying the percentage of NKG2D (A), PD-1 (B), perforin (C), IFN-γ<sup>+</sup> (D), IL-17<sup>+</sup> (E) and IL-10<sup>+</sup> (F) NK cell derived from spleens of STZ and control, respectively. Data are shown as mean ± s.e.m. of seven mice per group and are representative of three separate experiments. Statistical significance was tested by Mann-Whitney rank-sum test or Student's unpaired t-test, where appropriate. A full color version of this figure is available at <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0529>.

We found increased percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs ( $P=0.021$ ) as well as TGF-β<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs ( $P=0.039$ ) in primary tumor of STZ-treated mice compared to control mice (Fig. 5D and E).

### Diabetic serum altered NK cell phenotype *in vitro*

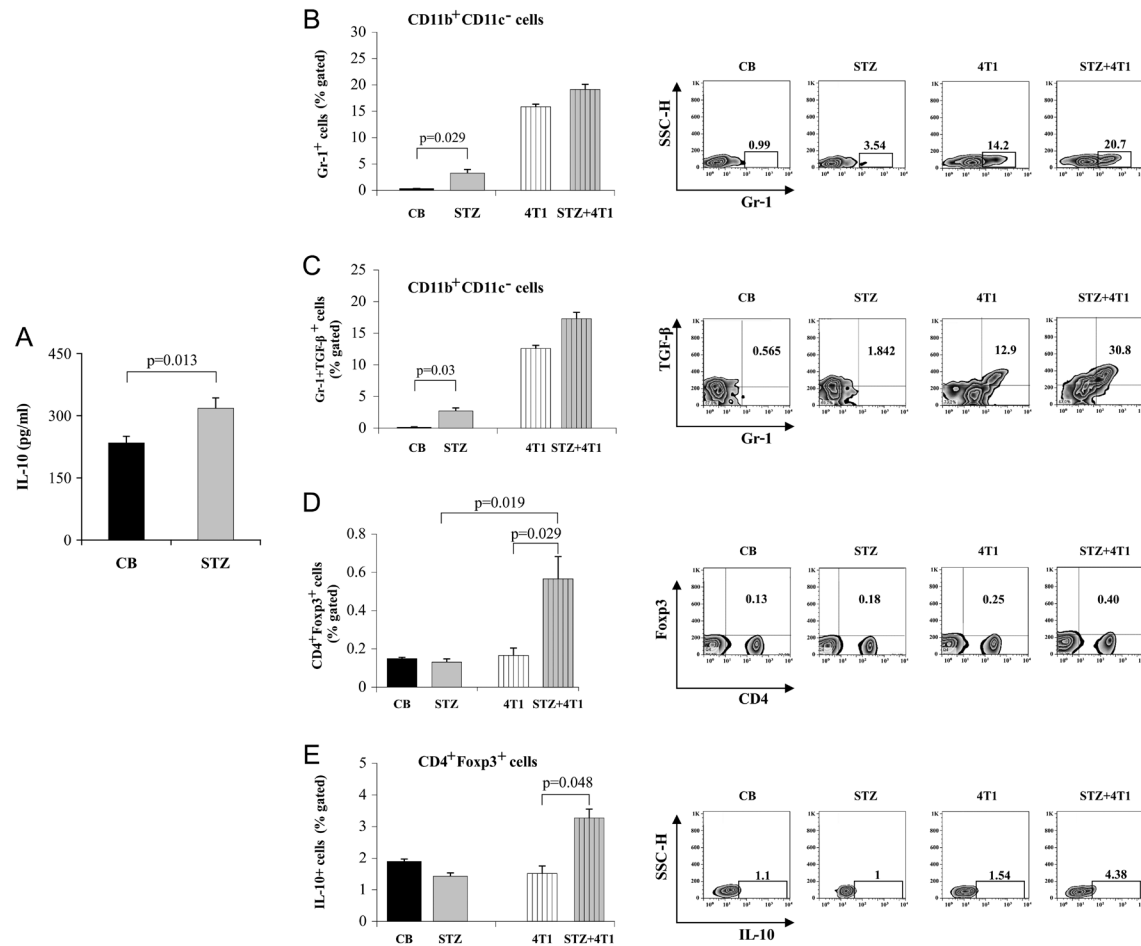
Further, we investigated the effects of diabetes-mediated soluble factors and glucose on functional phenotype of NK cells. Splenocytes isolated from healthy mouse were seeded for 24 h in medium containing serum derived from diabetic mice, serum derived from healthy mice with added glucose or serum derived from healthy mice only, and CD3-CD49<sup>+</sup> NK cells were analyzed within cultivated population of splenocytes. Addition of glucose increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> ( $P=0.029$ ) and PD-1<sup>+</sup> ( $P=0.016$ ) CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells (Fig. 6A and B). Although there were no differences in the percentage of NKp46 and perforin, there was significant decrement in the level of expression of these molecules in NK cells treated with glucose added sera ( $P=0.026$ ;  $P=0.017$ ; Fig. 6C and D). Cultivation in diabetic sera additionally increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> ( $P=0.032$ ;  $P=0.016$ ) and PD-1<sup>+</sup> ( $P=0.036$ ;  $P=0.016$ ) CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells and decreased expression of NKp46 ( $P=0.038$ ;  $P=0.014$ ) and production of perforin ( $P=0.049$ ;

$P=0.012$ ) per CD3-CD49<sup>+</sup>NK cell in comparison to glucose added sera and control sera (Fig. 6A, B, C and D). Diabetic sera decreased percentage of IFN-γ-producing CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.029$ ;  $P=0.029$ ) decreased expression of CD107a ( $P=0.016$ ;  $P=0.014$ ), and production of granzyme ( $P=0.004$ ;  $P=0.003$ ) and IL-17 ( $P=0.048$ ;  $P=0.032$ ) in CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells compared to glucose added sera and control sera (Fig. 6E, F, G and H).

In order to nullify enhanced oxidative stress, we performed additional *in vitro* experiments. Freshly isolated splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing serum derived from diabetic mice, serum derived from diabetic mice with added peg-catalase, and serum derived from healthy mice, respectively. Addition of peg-catalase significantly increased the percentage of NKp46<sup>+</sup>CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.05$ ) but did not affect the expression of PD-1, KLRG-1 and NKG2D molecules in comparison to NK cells cultivated in diabetic sera (Table 1).

### NK cell function is suppressed in IDO-dependent manner

Further, we analyzed the production of iNOS and IDO in different cell populations. Intracellular staining of



**Figure 4**

Diabetic condition favors immunosuppressive phenotypes of spleen cells. The level of IL-10 in the sera of diabetic and control group of mice (A). The percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (B) and TGF-β<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (C), CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (D), IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (E) in the spleen of STZ-treated and control mice, respectively, prior and 15 days after 4T1 tumor cell application were determined by flow cytometry and displayed on graphs and representative facs plots. Data are mean ± s.e.m. from six mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was determined by Mann–Whitney rank-sum test.

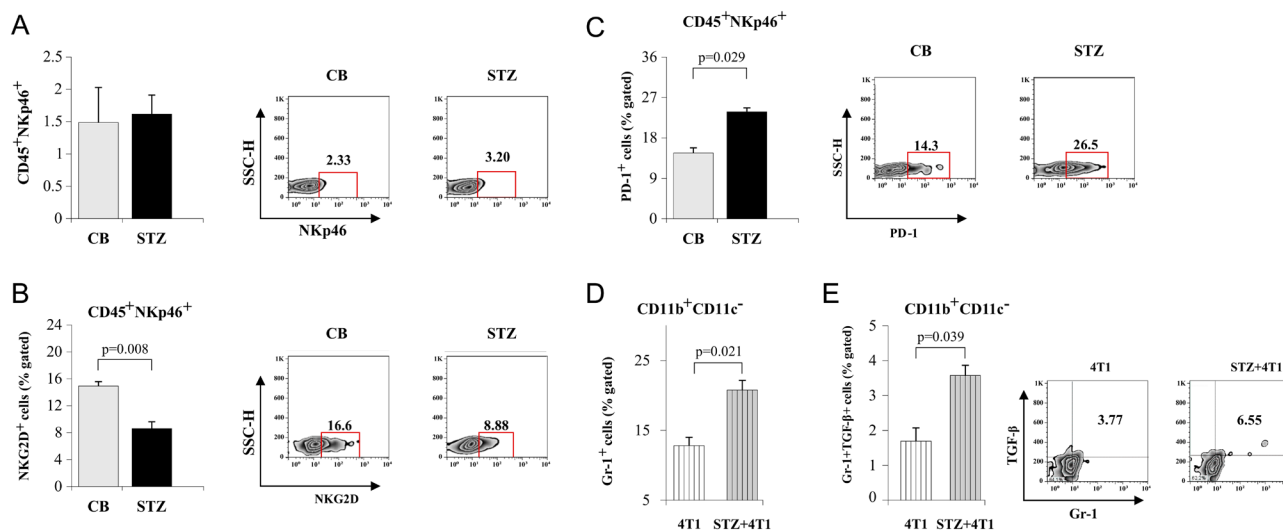
splenic MDSCs and DCs revealed significantly higher percentages of iNOS<sup>+</sup> ( $P=0.029$ ) and IDO<sup>+</sup> ( $P=0.031$ ) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSCs as well as iNOS<sup>+</sup> ( $P=0.005$ ) and IDO<sup>+</sup> ( $P=0.026$ ) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs in STZ-treated mice in comparison to control group (Fig. 7A, B, C and D). Next, in *in vitro* experiments, splenocytes isolated from healthy mouse have been cultivated in medium containing serum derived from diabetic mice with and without added 1-MT, selective blocker of IDO, and in sera isolated from healthy mice, respectively, for 24h. Addition of 1-MT in diabetic sera abrogates suppressive effect on percentage of NKG2D<sup>+</sup> ( $P=0.016$ ), NKp46<sup>+</sup> ( $P=0.038$ ) and CD69<sup>+</sup> ( $P=0.004$ ), perforin-producing ( $P=0.008$ ) and granzyme-producing ( $P=0.032$ ) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> cells compared to the same population of cells cultivated in diabetic sera without addition of 1-MT (Fig. 7E, F, G, H and I). Addition of 1-MT

decreased percentage of IL-10-producing CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.041$ ) and expression of PD-1 per CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> cells ( $P=0.015$ ) in comparison to NK cells cultivated in diabetic serum only (Fig. 7J and K).

## Discussion

Previous evidence in mice and humans clearly demonstrated the relationship between type 1 and type 2 diabetes and malignancy and some studies have investigated the underlying mechanisms (Ikemura et al. 2013, Chen et al. 2014). The study by Goto and coworkers demonstrated that STZ-induced diabetes accelerates mammary tumor genesis; however, the cellular basis of this effect was not explored (Goto et al. 1995). It is also obvious that effector cells involved in antitumor immunity may





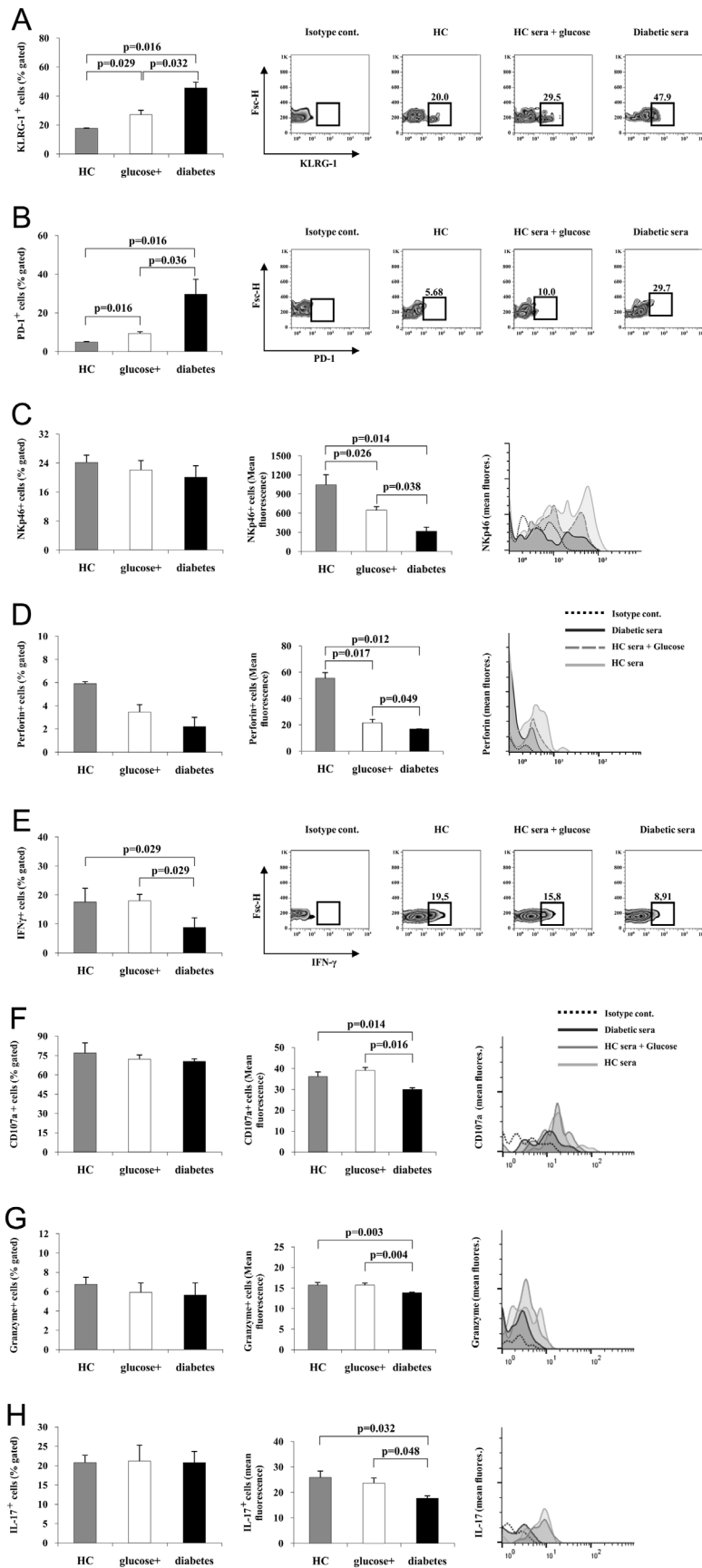
**Figure 5** Diabetes affects the phenotype of NK cells and Tregs in primary tumor. The graphs and representative facs plots displaying the percentage of CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK cells (A) as well as NKG2D<sup>+</sup> (B) and PD-1<sup>+</sup> (C) NK cells, derived from primary tumor of STZ and control mice, respectively, 15 days after 4T1 tumor cell application. The percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (D) as well as TGF-β<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (E) in the primary tumor of STZ-treated mice and control mice were determined by flow cytometry 15 days after 4T1 tumor cell application. Data are mean ± s.e.m. from seven mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney rank-sum test. A full color version of this figure is available at <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0529>.

be differently affected by hyperglycemia and pathologies in obesity, insulin resistance and inflammation (Sell et al. 2012, Wrann et al. 2012, Berrou et al. 2013). In this paper, we have demonstrated the accelerated growth of mammary carcinoma in mice made hyperglycemic by a single 'high'-dose injection of STZ.

We found that splenocytes derived from tumor-bearing diabetic mice had significantly lower cytotoxic activity in comparison to those isolated from control tumor-bearing mice (Fig. 2A). Further, we tested the cytotoxicity of isolated CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells. Recently, using melanoma model, Chen and coworkers have shown that the acquisition of tumor-killing capacity of CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells is diminished in melanoma-bearing STZ-diabetic mice (Chen et al. 2014). However, we did not find any significant difference in cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells to mammary tumor cells *in vitro* (Fig. 2B). While in these animal model, CD8<sup>+</sup> T cells have been shown to play an important antitumor role, our previous studies revealed a nonessential role of CD8<sup>+</sup> T cells-mediated cytotoxic antitumor activity (Jovanovic et al. 2011, 2014). The fact that 4T1 is weakly immunogenic mouse breast tumor cell line and previous findings that innate immunity is essential in antitumor response in this tumor model are in line with our results (Jovanovic et al. 2011, 2014). As we and others have shown previously that NK cells cytotoxicity is important in immunological surveillance

and immune response to established tumor, we found cytotoxic capacity and phenotypic alteration of NK cells in diabetic mice as shown prior to tumor induction (Smyth et al. 2005, Jovanovic et al. 2011, Marcus et al. 2014). These findings demonstrated lower cytotoxicity of NK cells of mice treated with STZ (Fig. 2C). *In vivo* depletion of NK cells nullified the difference in tumor appearance and growth which is in line with *in vitro* experiment (Fig. 2D, E and F). These findings suggest on essential role of diminished NK cells activity in accelerated tumor growth phenomenon in diabetic mice.

Rodacki and coworkers reported that NK cells in patients with long-standing type 1 diabetes had markedly lower expression of p30/p46 NK receptors compared with those of control subjects (Rodacki et al. 2007). Interestingly, both NOD mice and patients with diabetes also have slightly decreased expression of NKG2D (Ogasawara et al. 2003, Qin et al. 2011). Accordingly, our findings show that diabetic condition attenuates expression of activating receptor such as NKG2D, production of cytolytic molecules such as perforin and proinflammatory cytokines IFN-γ and IL-17, while favors expression of PD-1 molecule and production of IL-10 in splenic NK cells (Fig. 3). These findings together with diminished cytotoxic activity of NK cells derived from STZ-treated mice, as previously described (Fig. 2), implicate that diabetes attenuates



**Figure 6** Diabetic serum induces alteration of NK cells phenotype, *in vitro*. Splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing diabetic sera, glucose added sera and control sera, respectively. The graphs and representative facs plots displaying the percentage of KLRG-1<sup>+</sup> (A), PD-1<sup>+</sup> (B), Nkp46<sup>+</sup> (C), perforin (D), IFN-γ (E), Cd107a<sup>+</sup> (F), granzyme<sup>+</sup> (G), IL-17<sup>+</sup> (H) NK cells. Data are shown as mean ± S.E.M. of six mice per group and are representative of three separate experiments. Statistical significance was tested by Mann-Whitney rank-sum test or Student's unpaired t-test, where appropriate.

**Table 1** Effect of catalase, *in vitro*.

	Diabetic sera	Diabetic sera +peg-catalase	Control sera	
KLRG-1	39.85 ± 0.21	36.13 ± 2.12	27.82 ± 3.24	<i>P</i> > 0.05
PD-1	31.95 ± 2.62	29.15 ± 2.39	13.52 ± 3.57	<i>P</i> > 0.05
NKG2D	8.13 ± 0.85	9.15 ± 0.96	10.44 ± 1.33	<i>P</i> > 0.05
NKp46	13.28 ± 0.85*	20.02 ± 1.01*	22.36 ± 1.37	<i>P</i> = 0.05

Splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing diabetic sera, diabetic sera with added peg-catalase and control sera, respectively. The table displays the percentage of KLRG-1<sup>+</sup>, NKG2D<sup>+</sup> and NKp46<sup>+</sup> NK cells. Data are shown as mean ± s.e.m. of seven mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was tested by Mann–Whitney rank-sum test or Student's unpaired *t*-test, where appropriate. \*Statistical significance in NKp46 expression between diabetic sera and diabetic sera+peg-catalase is 0.05.

tumoricidal phenotype of NK cells. Our results are in line with previously mentioned studies claiming alteration of NK cells phenotype in humans with diabetes (Rodacki *et al.* 2007, Berrou *et al.* 2013). Similar phenomenon was obtained in tumor microenvironment. Although we did not find difference in percentage of tumor-infiltrating NK cells, significantly lower percentage of NKG2D<sup>+</sup> NK cells and higher percentage of PD-1<sup>+</sup> NK cells suggest that diabetes favors accumulation of poorly functional NK cells in primary tumor (Fig. 5A, B, C and D).

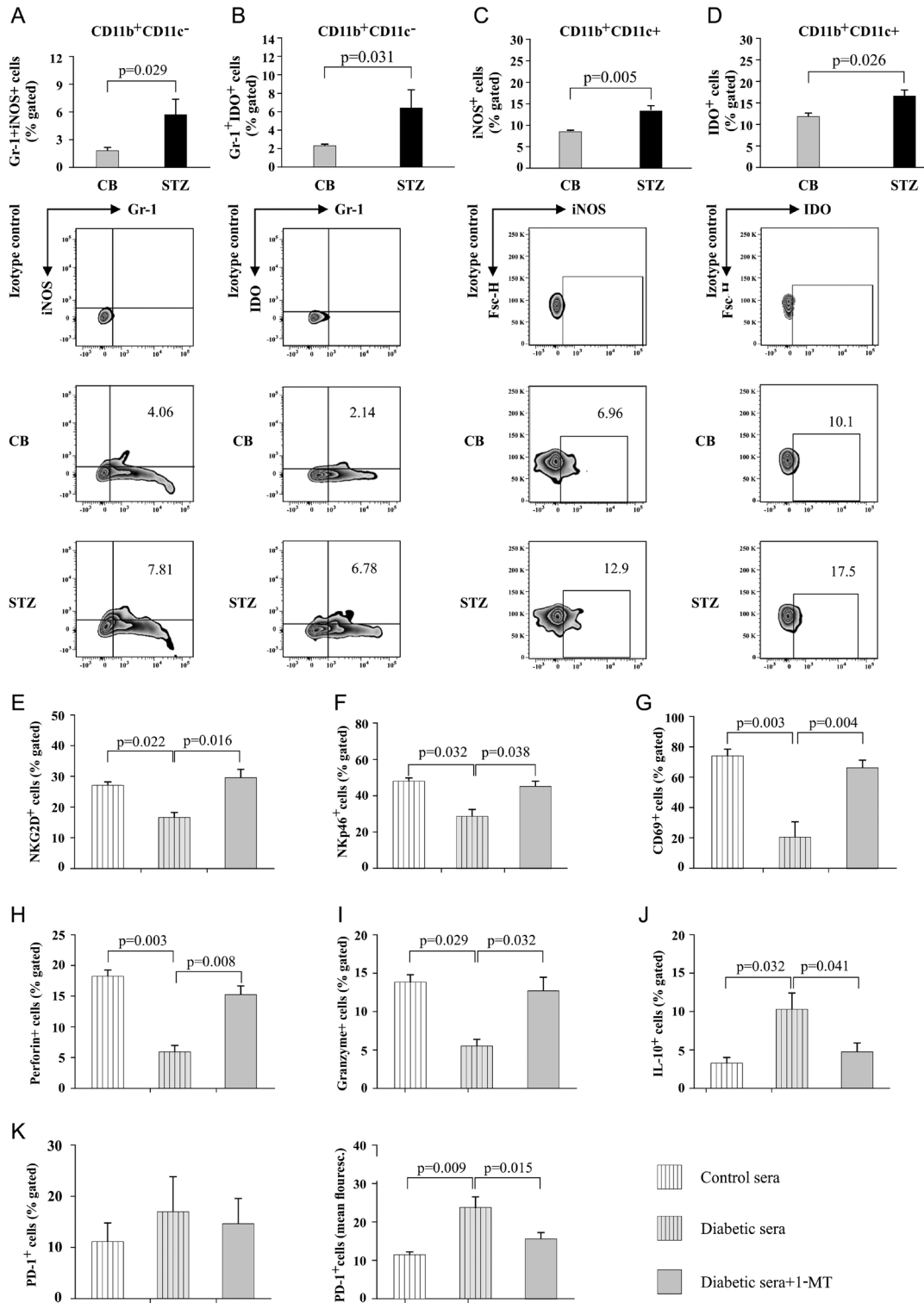
As various mechanisms are proposed to be responsible for the immunosuppressive effects of diabetes, we tested several hypotheses to identify agents responsible for suppression of NK cells. First, we examined the possibility that this is mediated by hyperglycemia, which is known to directly disturb endoplasmic reticulum (ER) function, favor accumulation of misfolded proteins in the lumen thus promoting ER stress, which in turn decreases the expression of activating receptors on NK cells (Berrou *et al.* 2013). Diabetic sera increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NK cells, decreased the expression of NKp46, CD107a and production of perforin, granzyme, IFN- $\gamma$  and IL-17 per NK cell compared to glucose added sera and control sera (Fig. 6A, B, C, D, E, F, G and H). These results suggest that hyperglycemia is not crucial for altered NK cell phenotype in diabetes and left at least two nonexclusive possibilities. First, reactive oxidative species, which are abundant in the sera of diabetic mice, may suppress NK cell activity through diminished expression of activating receptors such as NKG2D, as previously reported (Choi *et al.* 2008, Peraldi *et al.* 2009). In our study, increment in catalase concentration indicates on higher systemic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, one of the major ROSs, in serum of diabetic mice (Fig. 1c). However, addition of peg-catalase and subsequently blocking of enhanced oxidative stress revealed increment of NKp46 expression only but did not affect the expression or production of other markers of NK cell activity such as NKG2D, KLRG-1 and PD-1 (Table 1). Recent study has shown that *in vivo* treatment with peg-catalase significantly reduced the number of tumor cells

in the lung and liver in both untreated and STZ-treated mice however, our results are implicating on some other mediators that suppress tumoricidal phenotype of NK cells (Ikemura *et al.* 2013).

Level of IL-10 was significantly increased in the sera of diabetic mice (Fig. 4A). It is known that immunosuppressive cells such as MDSCs, Tregs and immature DCs are important regulators of innate and adaptive immunity and all may produce IL-10 (Dilek *et al.* 2012, Yang 2013). It appears that diabetic condition facilitated accumulation of suppressive CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs in spleen, prior to tumor injection (Fig. 4B and C). During tumor growth, recruited MDSCs promote generation, polarization, activation and migration of Tregs (Huang *et al.* 2006, Hoechst *et al.* 2009, Vitale *et al.* 2014). Indeed, diabetic condition led to significant increased accumulation of TGF- $\beta$  producing MDSCs both in spleen and mammary tumor (Figs 4C and 5E). Moreover, increased accumulation of IL-10 producing CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs was detected in spleen of tumor-bearing diabetic mice (Fig. 4E). Sitrin and coworkers argue that Tregs control NK cell function by controlling bioavailability of limited amount of IL-2 in the islets generated mainly by CD4<sup>+</sup> T cells infiltrating the islets in BDC2.5/NOD mice (Sitrin *et al.* 2013). However, in our model, this should be of very limited effect as the single high dose of STZ is toxic for  $\beta$  cells but does not induce significant islet infiltration.

Few possible mechanisms of MDSC-mediated NK cell suppression are known. They inhibit NK cells through a cell-contact-dependent mechanism via membrane-bound TGF- $\beta$  or recognition of the NK cell-activating receptors (Ostrand-Rosenberg *et al.* 2012). It is also known that in order to make immunosuppressive tumor microenvironment, activated MDSCs produce arginase 1, inducible nitric oxide synthase (iNOS), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), NADPH oxidase and immunosuppressive cytokines (Wesolowski *et al.* 2013). iNOS is one of the products of immunosuppressive cells important for producing NO that further directly





**Figure 7**

Diabetic condition suppresses NK cells function in IDO-dependent manner. The graphs and facs plots display percentage of iNOS<sup>+</sup> MDSCs (A) and IDO<sup>+</sup> MDSCs, respectively, as well as iNOS<sup>+</sup> (C) and IDO<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (D) DCs, respectively, in the spleens of experimental and control mice. Splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing diabetic sera with added 1-MT, diabetic sera and control sera. The percentage of NKG2D<sup>+</sup> (E), NKp46<sup>+</sup> (F) and CD69<sup>+</sup> (G), perforin (H) and granzyme (I), IL-10 (J) and PD-1<sup>+</sup> (K) CD3-CD49b<sup>+</sup> cells were determined by flow cytometry. Data are mean ± s.e.m. from six mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney rank-sum test or Student's unpaired *t*-test, where appropriate.

suppress proliferation of lymphocytes (Gabrilovich & Nagaraj 2009, Bogdan 2011). Recent study revealed higher iNOS activity in diabetic patients (Adela *et al.* 2015). Diabetic condition significantly increased percentage of iNOS<sup>+</sup> MDSCs as well as iNOS<sup>+</sup> DCs (Fig. 7A and C). Low-grade inflammation, one of the diabetes hallmarks, provoke iNOS expression and subsequent NO production that leads to increased IDO activity (Biswas 2016, Gazdic *et al.* 2017). IDO, an enzyme produced by variety of immune and stromal cells, has powerful immunomodulatory effects (Yu *et al.* 2013). IDO is involved in the catabolism of the essential amino acid L-tryptophan to L-kynurenine, while further metabolites of the L-kynurenine act in the immunosuppressive manner (Lee *et al.* 2002, Sucher *et al.* 2010, Harden & Egilmez 2012). IDO inhibits proliferation and increased apoptosis of T cells, interferes with the IL-2-induced expression of activating receptors on NK cells, inhibits IFN- $\gamma$  production and favors apoptosis of NK cells (Della Chiesa *et al.* 2006, Li *et al.* 2009, Cacalano 2016).

Accordingly, herewith we showed significantly increment in percentages of IDO producing MDSCs and DCs in diabetic mice (Fig. 7B and D). In order to confirm the possible immunosuppressive MDSCs/DCs-IDO pathway, we blocked effect of IDO using pharmacological inhibitor 1-MT *in vitro*. Addition of 1-MT in diabetic serum increased percentage of NKG2D<sup>+</sup>, NKp46<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, perforin and granzyme producing NK cells (Fig. 7E, F, G, H and I). Moreover, inhibition of IDO in diabetic condition has significantly decreased percentage of IL-10 producing CD3-CD49<sup>+</sup> NK cells as well as expression of PD-1 molecule on CD3-CD49<sup>+</sup> cells (Fig. 7J and K). In comparison to control serum, 1-MT treatment almost completely restored the phenotype of NK cells indicating on important role of IDO signaling pathway in the suppression of NK cells in diabetic condition.

Collectively, diabetic condition promotes breast cancer growth through suppression of antitumor immunity. Diabetes favors accumulation of iNOS and IDO-producing innate immunosuppressive cells and subsequent attenuation of NK cells tumoricidal phenotype in at least in part through IDO-dependent manner. The growth of breast cancer in diabetic condition might thereby be controlled by the development of new IDO based biologics.

#### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### Funding

This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071, 175069 and 175103), Serbia and from the Faculty of Medical Sciences Kragujevac (project JP 06/15), Serbia.

#### Author contribution statement

N G, M L L and I J wrote the manuscript. N G, M J and I J collected the data. N G, M J, J P, G R and I J were involved in the analysis and interpretation of the data. N G, N A, M L L and I J contributed toward conception and design. All the authors have approved the final version of this manuscript.

#### Acknowledgements

The authors thank Ivana Milovanovic, Sandra Nikolic, Katerina Martinova, Aleksandar Ilic and Milan Milojevic for excellent technical assistance.

#### References

- Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN & Banerjee SK 2015 Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PLoS ONE* **10** e0125270. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125270>)
- American Diabetes Association 2014 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37** S81–S90. (<https://doi.org/10.2337/dc14-S081>)
- Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A & Peraldi MN 2013 Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS ONE* **8** e62418. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062418>)
- Biswas SK 2016 Does the Interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016** 5698931. (<https://doi.org/10.1155/2016/5698931>)
- Bogdan C 2011 Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods in Molecular Biology* **677** 375–393. ([https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_24))
- Cacalano NA 2016 Regulation of natural killer cell function by STAT3. *Frontiers in Immunology* **7** 128. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00128>)
- Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN & Lai YP 2014 Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS ONE* **9** e109961. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109961>)
- Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ & Hannigan BM 2008 Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radical Biology and Medicine* **44** 1217–1231. (<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.005>)
- Cohen DH & LeRoith D 2012 Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocrine-Related Cancer* **19** F27–F45. (<https://doi.org/10.1530/ERC-11-0374>)
- Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A & Vitale M 2006 The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* **108** 4118–4125. (<https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006700>)
- DeSantis C, Ma J, Bryan L & Jemal A 2014 Breast cancer statistics 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **64** 52–62. (<https://doi.org/10.3322/caac.21203>)

- Dilek N, Vuillefroy de Sully R, Blancho G & Vanhove B 2012 Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Frontiers in Immunology* **3** 208. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00208>)
- Gabrilovich DI & Nagaraj S 2009 Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology* **9** 162–174. (<https://doi.org/10.1038/nri2506>)
- Gajovic N, Jovanovic I, Ilic A, Jeremic N, Jakovljevic V, Arsenijevic N & Lukic ML 2016 Diabetes mellitus directs NKT cells toward type 2 and regulatory phenotype Ser. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **17** 35–41. (<https://doi.org/10.1515/sjccr-2016-0005>)
- Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML & Volarevic V 2017 Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **12** e1173–e1185. (<https://doi.org/10.1002/term.2452>)
- Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG & Yee D 2010 Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* **33** 1674–1685. (<https://doi.org/10.2337/dc10-0666>)
- Goto Y, Nagasawa H & Iguchi T 1995 Streptozotocin-induced diabetes accelerates mammary tumorigenesis in shn and sln mice. *Oncology Reports* **2** 37–40. (<https://doi.org/10.3892/or.2.1.37>)
- Harden JL & Egilmez NK 2012 Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunological Investigations* **41** 738–764. (<https://doi.org/10.3109/08820139.2012.676122>)
- Hoehchst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Greten TF & Korangy F 2009 Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the Nkp30 receptor. *Hepatology* **50** 799–807. (<https://doi.org/10.1002/hep.23054>)
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM & Chen SH 2006 Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research* **66** 1123–1131. (<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>)
- Ikemura M, Nishikawa M, Kusamori K, Fukuoka M, Yamashita F & Hashida M 2013 Pivotal role of oxidative stress in tumor metastasis under diabetic conditions in mice. *Journal of Controlled Release* **170** 191–197. (<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.028>)
- Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S & Lukic ML 2011 ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *European Journal of Immunology* **41** 1902–1912. (<https://doi.org/10.1002/eji.201141417>)
- Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N & Lukic M 2014 Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoural accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *International Journal of Cancer* **134** 1669–16682. (<https://doi.org/10.1002/ijc.28481>)
- Kangralkar VA, Patil SD & Bandivadekar RM 2010 Oxidative stress and diabetes: a review. *International Journal of Pharmaceutical Applications* **1** 38–45.
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH & Mellor AL 2002 Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* **107** 452–460. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01526.x>)
- Li R, Wei F, Yu J, Li H, Ren X & Hao X 2009 IDO inhibits T-cell function through suppressing Vav1 expression and activation. *Cancer Biology and Therapy* **8** 1402–1408. (<https://doi.org/10.4161/cbt.8.14.8882>)
- Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N & Raulet DH 2014 Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Advances in Immunology* **122** 91–128. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00003-1>)
- Nieminen JK, Vakkila J, Salo HM, Ekström N, Härkönen T, Ilonen J, Knip M & Vaarala O 2012 Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care* **35** 2303–2310. (<https://doi.org/10.2337/dc11-2460>)
- Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, Pertel T, Carnaud C, Bluestone JA & Lanier LL 2003 Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* **18** 41–51. ([https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00505-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00505-8))
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW & Clements VK 2012 Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in Cancer Biology* **22** 275–281. (<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.011>)
- Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, et al. 2009 Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *Journal of Immunology* **182** 1696–1705. (<https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1696>)
- Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, Priatel JJ & Tan R 2011 Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes* **60** 857–866. (<https://doi.org/10.2337/db09-1706>)
- Rodacki M, Svoren B, Butty V, Besse W, Laffel L, Benoist C & Mathis D 2007 Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes* **56** 177–185. (<https://doi.org/10.2337/db06-0493>)
- Sell H, Habich C & Eckel J 2012 Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology* **8** 709–716. (<https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.114>)
- Shi Y & Hu FB 2014 The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* **383** 1947–1948. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60886-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60886-2))
- Sitrin J, Ring A, Garcia KC, Benoist C & Mathis D 2013 Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *Journal of Experimental Medicine* **210** 1153–1165. (<https://doi.org/10.1084/jem.20122248>)
- Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM & Hayakawa Y 2005 NKG2D function protects the host from tumor initiation. *Journal of Experimental Medicine* **202** 583–588. (<https://doi.org/10.1084/jem.20050994>)
- Sucher R, Kurz K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D & Brandacher G 2010 IDO-mediated tryptophan degradation in the pathogenesis of malignant tumor disease. *International Journal of Tryptophan Research* **3** 113–120. (<https://doi.org/10.4137/IJTR.S4157>)
- Sun C, Sun L, Ma H, Peng J, Zhen Y, Duan K, Liu G, Ding W & Zhao Y 2012 The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. *Journal of Cellular Physiology* **227** 1670–1679. (<https://doi.org/10.1002/jcp.22891>)
- Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z & Zhao J 2015 Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics* **72** 333–338. (<https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>)
- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB 2009 Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324** 1029–1033. (<https://doi.org/10.1126/science.1160809>)
- Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G & Vigneri R 2009 Diabetes and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **16** 1103–1123. (<https://doi.org/10.1677/ERC-09-0087>)
- Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC & Moretta L 2014 Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European Journal of Immunology* **44** 1582–1592. (<https://doi.org/10.1002/eji.201344272>)

- Waris G & Ahsan H 2006 Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5** 14. (<https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>)
- Wesolowski R, Markowitz J & Carson WE 3rd 2013 Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **1** 10. (<https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-10>)
- Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L & Nave H 2012 Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* **302** E108–E116. (<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00057.2011>)
- Yang WC 2013 Myeloid-derived suppressor cells in autoimmune diabetes: their anti-diabetic potential and mechanism. *Journal of Diabetes and Metabolism* **12** 2. (<https://doi.org/10.4172/2155-6156.S12-004>)
- Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, Yu W, Shen C, Liu J & Ren X 2013 Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Journal of Immunology* **190** 3783–3797. (<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449>)

Received in final form 8 February 2018

Accepted 19 February 2018

Accepted Preprint published online 19 February 2018



## DIABETES MELLITUS DIRECTS NKT CELLS TOWARD TYPE 2 AND REGULATORY PHENOTYPE

Nevena Gajović<sup>1</sup>, Ivan Jovanović<sup>1</sup>, Aleksandar Ilić<sup>1</sup>, Nevena Jeremić<sup>2</sup>, Vladimir Jakovljević<sup>3</sup>, Nebojša Arsenijević<sup>1</sup>, Miodrag L. Lukić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

## DIABETES MELITUS USMERAVA DIFERENCIJACIJU NKT ČELIJA U PRAVCU TIP 2 I REGULATORNOG FENOTIPA

Nevena Gajović<sup>1</sup>, Ivan Jovanović<sup>1</sup>, Aleksandar Ilić<sup>1</sup>, Nevena Jeremić<sup>2</sup>, Vladimir Jakovljević<sup>3</sup>, Nebojša Arsenijević<sup>1</sup>, Miodrag L. Lukić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

<sup>2</sup>Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

<sup>3</sup>Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

Received / Priljen: 17.12.2015.

Accepted / Prihvaćen: 05.01.2016.

### ABSTRACT

*Diabetes mellitus is chronic disorder characterized by hyperglycaemia. Hyperglycaemia induces mitochondrial dysfunction, enhances oxidative stress and thus promotes reactive oxygen species (ROS) production. Earlier studies suggested that reactive oxygen species (ROS) are involved in the pathogenesis of many diseases. Previous studies have revealed that hyperglycaemia changes the functional phenotype of monocytes, macrophages, neutrophils, NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells. The aim of this study was to investigate whether diabetes affects the functional phenotype of NKT cells.*

*Diabetes mellitus was induced in BALB/c mice by intraperitoneal injection of streptozotocin at a single dose of 170 mg/kg body weight. The number and functional phenotype of splenic NKT cells was assessed by flow cytometry, 28 days after diabetes induction.*

*The diabetic condition facilitated the production of anti-oxidant enzymes, including catalase ( $p < 0.05$ ) and superoxide dismutase. Hyperglycaemia enhanced oxidative stress and thus decreased the number of splenic NKT cells but did not change the percentage of splenic CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells that express the activatory receptor NKP46 or produce IFN- $\gamma$ . However, hyperglycaemia increased the frequency of splenic NKT cells that express KLRG-1 and produce TGF- $\beta$ , IL-4, and IL-5, and it decreased the frequency of IL-17<sup>+</sup> NKT cells.*

*Our study indicates that diabetes mellitus induces oxidative stress and switches the functional phenotype of NKT cells towards type 2 (IL-4 and IL-5 producing NKTs) and regulatory (TGF- $\beta$  producing NKTs) phenotypes. These findings are correlated with the clinical observation in humans that diabetic patients are more prone to infections and tumours.*

**Keywords:** diabetes, hyperglycaemia, oxidative stress, NKT cells

### SAŽETAK

*Dijabetes melitus je hronično oboljenje koje se karakteriše hiperglikemijom. Hiperglikemija utiče na funkciju mitohondrija, pojačava oksidativni stres i time podstiče produkciju kiseoničnih slobodnih radikala. Ranije studije su pokazale da kiseonični slobodni radikali igraju važnu ulogu u razvoju mnogih bolesti. Hiperglikemija utiče na funkcionalni fenotip monocita, makrofaga, NK ćelija i CD8<sup>+</sup> T limfocita. Cilj istraživanja je bio ispitati da li hiperglikemija utiče na funkcionalni fenotip NKT ćelija.*

*Dijabetes melitus je indukovao BALB/C miševima jednom dozom streptozotocina intraperitonealno u dozi od 170 mg/kg. Broj i funkcionalni fenotip NKT ćelija je analiziran protočnom citometrijom 28. dana nakon indukcije dijabetesa.*

*Dijabetes je povećao produkciju antioksidantnih enzima, katalaze i superoksid dizmutaze. Dijabetes i pojačan oksidativni stres su smanjili ukupan broj NKT ćelija u slezini hiperglikemičnih miševa, dok se procenat NKp46<sup>+</sup>NKT ćelija i NKT ćelija koje proizvode IFN- $\gamma$  u slezini nije značajno razlikovao u poređenju sa normoglikemičnim miševima. Međutim, hiperglikemični miševi su imali veću procentualnu zastupljenost NKT ćelija koje ekspimiraju KLRG-1 i proizvode TGF- $\beta$ , IL-4, and IL-5, dok je učestalost IL-17<sup>+</sup> NKT ćelija bila značajno manja u poređenju sa normoglikemičnim miševima.*

*Rezultati ukazuju da dijabetes melitus pojačava oksidativni stres i usmerava polarizaciju NKT ćelija ka tipu 2 i regulatornom fenotipu, što je u skladu sa kliničkim studijama koje potvrđuju da su osobe sa dijabetesom sklone razvoju infekcija i tumora.*

**Ključne reči:** dijabetes, hiperglikemija, oksidativni stres, NKT ćelije





## INTRODUCTION

Diabetes mellitus, one of the most common chronic diseases, increases the susceptibility to obesity and many other diseases (1). The major characteristic of diabetes mellitus is hyperglycaemia (2). Hyperglycaemia is usually caused by low insulin levels or insulin resistance and is associated with the damage of many tissues and organs, especially nerves, blood vessels, kidneys and eyes (2). One of the major effects of hyperglycaemia is increased production of reactive oxidative species (3, 4). Excess glucose in cells is involved in glucose oxidation and the nonenzymatic glycation of proteins (5). The final products of these pathways are reactive oxidative species (5). Increases of reactive oxidative species harm cellular organelles and increase lipid peroxidation (6).

Many studies have shown that immune system function is impaired in individuals with diabetes mellitus (7). The immune system can be subdivided to innate and acquired immunity (8). The innate immune system is characterized by rapid responses to pathogens and is mediated mainly by macrophages, dendritic cells, granulocytes, natural killer (NK) cells and natural killer T (NKT) cells, while the acquired immune system is composed of T and B lymphocytes (8). Earlier studies have shown that hyperglycaemia changes effector functions of innate immune cells. The decreased expression of MHC class II on circulating monocytes, reduced response of macrophages to multiple TLR ligands, reduced neutrophil degranulation, impaired  $\gamma\delta$  T cell proliferation (9), significant decrease in the expression of activating receptors NKG2D, NKp30, and NKp46, and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and perforin production in NK cells (10, 11) are all described as phenomena that accompany diabetes.

Natural killer T (NKT) cells constitute a subset of T cells that serve as a bridge between innate and adaptive immunity (12-14). NKT cells recognize exogenous and endogenous lipid antigens presented in the context of the MHC class I-like molecule CD1d (15). One of the main functions of NKT cells is cytokine production (13). Thus, NKT cells play an important modulatory role in the induction or prevention of many pathogenic conditions (12-14). NKT cells can be subdivided according to transcriptional factor expression and subsequent cytokine production, such as IFN $\gamma$ , interleukin IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, and IL-22; tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ); and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), which modulate the innate and adaptive immune response (13, 16).

In the available literature, there is no evidence of the effect of diabetes on NKT cells. The aim of our study is to investigate the effect of the diabetic condition on the functional phenotype of NKT cells in mice.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

BALB/C mice (female, 6-8 weeks old) were used in all experiments. Animals were maintained under standard lab-

oratory conditions. The protocols for animal experiments were approved by the Animal Ethics Board of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

### Induction of diabetes

Mice were divided randomly into two groups: the experimental and control group. Diabetes was induced in the experimental group by the intraperitoneal injection of streptozotocin dissolved in a sodium citrate buffer (pH=4.5) at a single dose of 170 mg/kg body weight, while the control group was given a sodium citrate buffer (pH=4.5). Blood samples were obtained from the lateral tail vein after four hours of starvation. Blood glucose levels were determined twice a week with *Accu-Chek Performa, Roche*.

### Determination of antioxidant enzymes

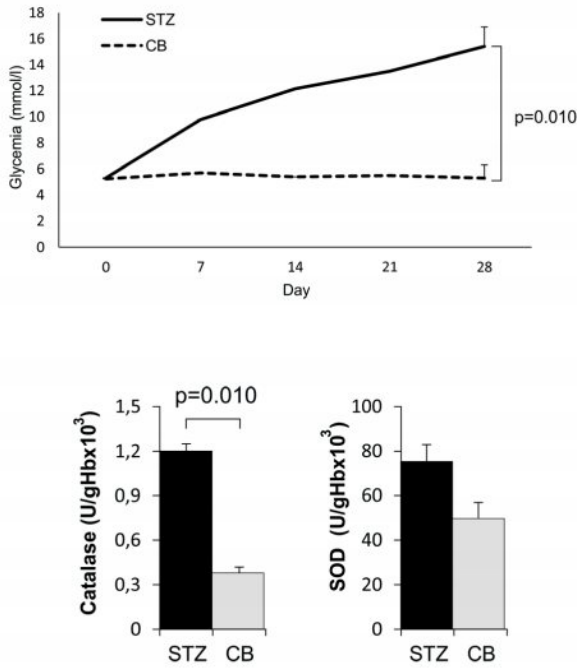
Isolated RBCs were washed three times with 3 volumes of ice-cold 0.9 mmol/l NaCl and haemolysates containing approximately 50 g of Hb/l (17), which were used for the determination of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity by spectrophotometry. According to Beutler, for the determination of CAT activity, lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v) to remove haemoglobin. Then, 100  $\mu$ l of a sample and 1 ml of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to a 50  $\mu$ l catalase buffer (18). Detection was performed at 360 nm. According to the methods of Misra and Fridovich, superoxide dismutase (SOD) activity was determined using epinephrine. Approximately 100  $\mu$ l of lysate and 1 ml of carbonate buffer were mixed, and then 100  $\mu$ l of epinephrine was added (19). Detection was performed at 470 nm. The activities of SOD and CAT in red blood cells (RBCs) are presented in units per gram of haemoglobin  $\times 10^3$  (U/g Hb  $\times 10^3$ ).

### Cell preparation

Mice were sacrificed on day 28 after diabetes induction, and their spleens were isolated. Single-cell suspensions were obtained from the spleens by mechanical dispersion through a cell strainer (BD Pharmingen, USA) in a complete growth medium (Dulbecco's-Modified Eagles Medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mmol/L L-glutamine, 1 mmol/L penicillin-streptomycin, 1 mmol/L mixed nonessential amino acids (Sigma, USA)). Erythrocytes were removed from the splenocyte cell suspension by a lysing solution (BD Pharmingen), and cells were resuspended in complete growth medium. The number of viable cells was determined by trypan blue staining, and only cell suspensions with > 90% viable cells were used.

### Flow cytometry

Single-cell suspensions from spleens were incubated with mAbs that were specific for mouse CD3, CD49, NKp46, IFN $\gamma$ , KLRG1, IL-4, IL-5, IL-17 and TGF- $\beta$  or isotype-matched controls (BD Pharmingen/BioLegend); they were then analysed using a FACSCalibur flow cytometer



**Figure 1. STZ application increases glycaemia and oxidative stress.** Experimental diabetes was induced in BALB/c mice by intraperitoneal injection of streptozotocin dissolved in sodium citrate at a single dose of 170 mg/kg body weight. Hyperglycaemia was measured twice a week. Mice were sacrificed on the 28<sup>th</sup> day after streptozotocin application. The activity of antioxidative enzymes was measured in the isolated RBCs. Data are presented as the mean+SEM from two experiments. Statistical significance was tested by Mann–Whitney rank-sum test or Student's unpaired t-test where appropriate ( $p < 0,05$ ).

(BD). Dead cells were excluded from the analysis by positive propidium-iodide staining. The gate used for FACS analysis was the mononuclear cell region in FSC/SSC plots (20000 events were acquired). Data were analysed using CELLQUEST (BD) and FlowJo (Tristar) software.

### Intracellular cytokine staining

For the analysis of IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17 and TGF- $\beta$  expression, splenocytes were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/ml, Sigma), ionomycin (500 ng/ml, Sigma) with GolgiStop (BD Pharmingen) and incubated for 4 h at 37°C, 5% CO $_2$ . After fixation and permeabilisation, intracellular staining was performed using anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-17 and anti-TGF- $\beta$  anti mAb (BD Pharmingen) and analysed by flow cytometry (20).

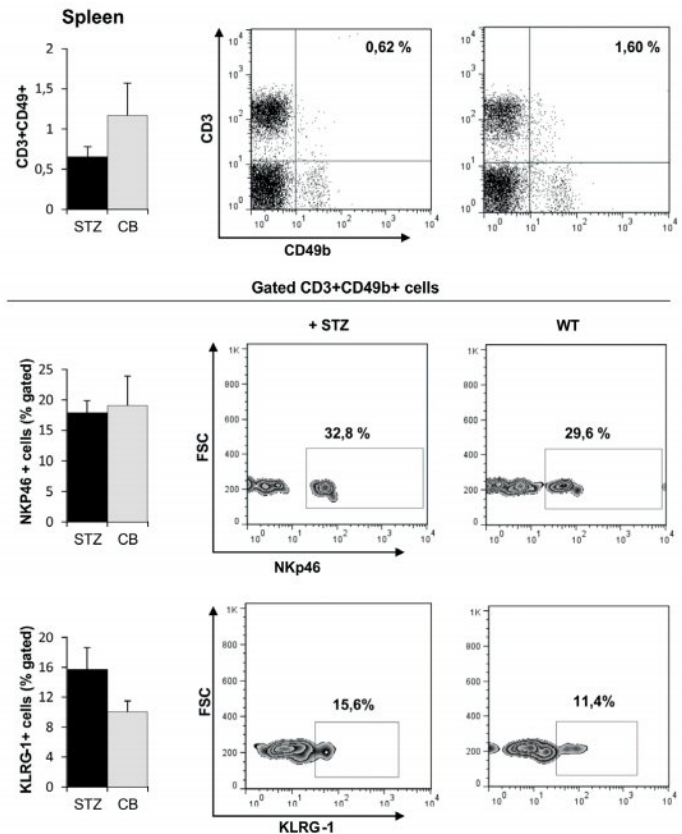
### Statistical analysis

The data were analysed using the statistical package SPSS version 20. The normality of the distribution was tested by the Kolmogorov–Smirnov test. The two-tailed Student's t-test or the nonparametric Mann–Whitney U test were used. The results were considered significantly different when  $p < 0,05$ .

## RESULTS

### Diabetes increases the production of catalase and superoxide dismutase

Glycaemia was measured twice a week during all experiments. As shown in figure 1, the blood glucose level was significantly increased in mice treated with streptozotocin compared to CB-treated mice at day 28. Twenty-eight days after diabetes induction, we measured antioxidant enzyme activity in erythrocytes. The activity of antioxidant enzymes did not differ among the experimental and control groups on day 0 (data not shown). Hyperglycaemic mice had significantly increased activity of catalase compared to normoglycaemic mice ( $p=0,03$ , Figure 1). The activity of superoxide dismutase was also measured; our data showed that hyperglycaemic mice have increased activity of superoxide dismutase, but the difference did not reach statistical significance (Figure 1).



**Figure 2. Diabetes decreases the total number of splenic NKT cells and increases the number of KLRG1<sup>+</sup>NKT cells in the spleen.** Mononuclear cells were isolated from spleens of streptozotocin-injected mice, and non-treated mice were determined on day 28 of the experiment. Mononuclear cells were labelled with fluorochrome-conjugated anti-mouse antibodies and analysed by flow cytometry. Data are presented as the mean+SEM of two separate experiments, and each was carried out with seven mice per group. Statistical significance was tested by the Student's unpaired t-test ( $p < 0,05$ ).





### Diabetes decreases the total number of spleen NKT cells and increases the number of KLRG-1<sup>+</sup> NKT cells

We assessed the frequency and functional phenotype of NKT cells in the spleens of hyperglycaemic and normoglycaemic mice at the 28<sup>th</sup> day after streptozotocin induction. Our results showed that the frequency of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells was decreased in spleens of hyperglycaemic mice compared to normoglycaemic mice, but the difference did not reach statistical significance (figure 2). Further, we analysed the expression of activatory and inhibitory receptors on NKT cells. Diabetes increased the incidence of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells expressing KLRG1<sup>+</sup> (which did not reach statistical significance), but it did not affect the percentage of NKP46<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells (Figure 2).

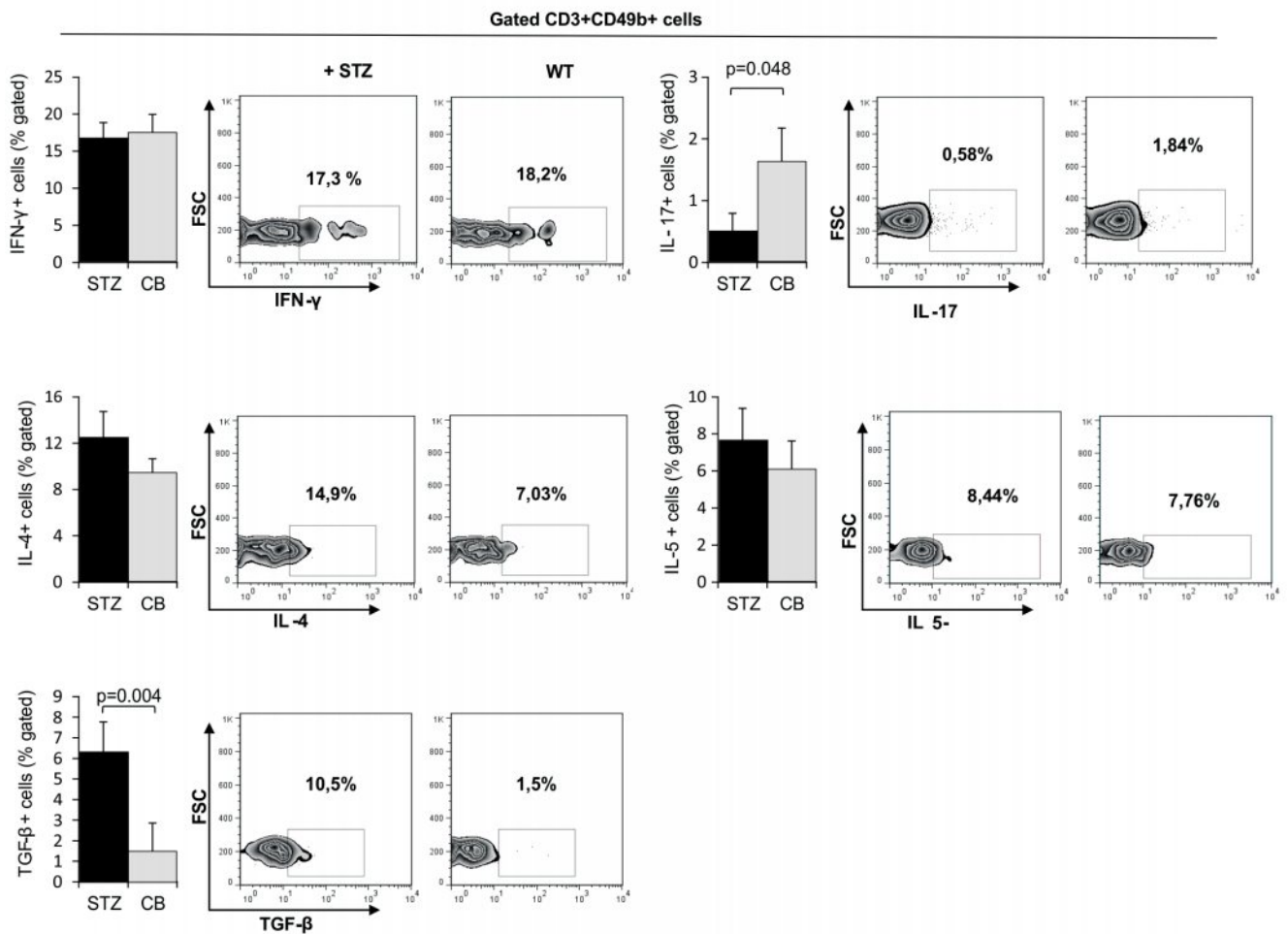
### Diabetes increases IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> and TGF- $\beta$ <sup>+</sup> NKT cells and decreases IL-17<sup>+</sup> NKT cells

To further determinate the functional phenotype of NKT cells, we analysed cytokine production. As shown in

figure 3, hyperglycaemia increased the frequency of splenic IL-4<sup>+</sup> and IL-5<sup>+</sup> NKT cells (which did not reach statistical significance, respectively) and NKT cells producing TGF- $\beta$ <sup>+</sup> ( $p=0.004$ ). Diabetic conditions also decreased the percentage of IL-17<sup>+</sup>-producing NKT cells ( $p=0.004$ ), while it did not affect the number of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NKT cells (Figure 3).

## DISCUSSION

The aim of this study was to investigate whether diabetic conditions changed the functional phenotype of NKT cells. For this purpose, hyperglycaemia was induced in one group of mice by intraperitoneal injection of streptozotocin, while the other group served as healthy controls. Streptozotocin-treated mice exhibited significantly higher levels of glycaemia in comparison to CB-treated mice on the 28<sup>th</sup> day of the experiment (Figure 1). We also reported that hyperglycaemic mice had increased systemic levels of catalase ( $p=0,03$ ) and superoxide dismutase (level of superoxide dismutase was not statistically significant) in



**Figure 3. Diabetes increases IL-4<sup>+</sup> and IL-5<sup>+</sup> and TGF- $\beta$ <sup>+</sup> NKT cells and decreases IL-17<sup>+</sup> NKT cells in the spleen.** Mononuclear cells isolated from spleens of streptozotocin-injected mice (7 mice per group) and non-treated mice (7 mice per group) were determined on day 28 of the experiment using fluorochrome-labelled Abs and analysed on a FACS Aria. Mononuclear cells were gated by size and granularity on FSC/SSC. Results are presented as the mean+SEM of two separate experiments. Statistical significance was tested by the Student's unpaired t-test ( $p<0,05$ ).





comparison to normoglycaemic mice (Figure 1). The frequency of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells was decreased, while the incidence of NKT subpopulations that express KLRG-1 or produce IL-4, IL-5 and TGF- $\beta$  were higher in the spleens of hyperglycaemic mice (Figure 2 and 3). Furthermore, the percentage of IL-17-producing NKT cells was lower in mice injected with streptozotocin (Figure 3).

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycaemia (5). One of the major phenomena caused by hyperglycaemia is the production of reactive oxidative species (21). Excess glucose in cells activates the polyol pathway, the hexosamine pathway, protein kinase C (PKC) activation, and the formation of advanced glycation end products; it thus accelerates the production of reactive oxygen species, hydroxyl radicals, superoxide anion, hydrogen peroxide and nitric oxide (21). Oxidative stress occurs when the production of free radicals exceeds the antioxidant defence mechanism (6). If cellular antioxidants do not remove free radicals, abnormally high levels of ROS harm DNA, lipids, and proteins, which leads to the accumulation of damaged molecules (6, 22). Additionally, ROS are known as inducers of cell apoptosis and regulators of gene expression (23). Although hyperglycaemia increases the production of free radicals, it also aggravates the endogenous antioxidant system (5). Antioxidants, such as the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase, as well as vitamins A, C, and E, work in synergy against different free radicals (24). The focus of our investigation was on two important antioxidant enzymes: catalase and glutathione reductase. Catalase enzyme, present in the peroxisome, converts hydrogen peroxide to water and oxygen and thus neutralises its toxic effects (25). Superoxide dismutase converts superoxide anion radicals to hydrogen peroxide, which is further detoxified to water (H<sub>2</sub>O) by catalase or glutathione peroxidase (26). In this study, we reported the increased activity of antioxidant enzymes, catalase and superoxide dismutase, which was derived from erythrocytes of streptozotocin-treated mice on the 28<sup>th</sup> day of the experiment in comparison to CB-treated mice (Figure 1). Our results are in line with other studies that confirmed that hyperglycaemia increases the production of reactive oxidative species and thus increases the production of antioxidant enzymes (27).

Natural killer T (NKT) cells lie at the interface between innate and adaptive immunity and are important mediators of immune responses and tumour immunosurveillance (28). Two major subsets of NKT cells can be distinguished based on their TCR repertoire and lipid reactivity (12). Type I or invariant NKT (iNKT) cells express an invariant TCR $\alpha$  paired with a restricted repertoire of V $\beta$  chains (12), while type II NKT cells express a more variable TCR repertoire (29, 30) and can modulate immune responses, suppress autoimmunity and inhibit tumour rejection (16). Additionally, functionally heterogeneous NKT cells (28) can be subdivided according to the expression of transcription factors and subsequent cytokine production (31). T-bet<sup>high</sup> NKT1 cells are capable of

producing large amounts of IFN- $\gamma$ , while alternatively polarized NKT2 cells express a GATA3 transcription factor and produce IL-4, IL-5 and IL13 (31, 32). Recent studies have revealed a new type NKT17 cell that, like CD4<sup>+</sup>Th17 cells, constitutively expresses the ROR $\gamma$ -t transcription factor and IL-23R and produces high levels of IL-17 (33). The other studies defined Foxp3-type INKT cells that, similarly to Tregs, suppress the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells (28). To evaluate the influence of diabetic conditions, we analysed the expression of NKp46 and KLRG-1 receptors on NKT cells. NKp46, a transmembrane type I glycoprotein, is a major activating receptor that is important in the elimination of virally infected cells and tumour cells (34, 35). NKp46 triggers lysis by recognizing membrane ligands on infected and tumour cells (34, 35). KLRG1 is an inhibitory lectin-like receptor, predominantly expressed on NK cells that produce lower levels of IFN- $\gamma$  (36). Our results show that hyperglycaemia decreased the percentage of total CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT. Further, hyperglycaemia did not affect the percentage of splenic CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells that express activatory receptor NKp46, while it increased the frequency of NKT cells that express inhibitory receptor KLRG1 (Figure 2). Shimizu et al. showed that KLRG1<sup>+</sup> iNKT cells coexpress CD49d and granzyme A live longer than conventional NKT cells and have the potential to be involved in a second immune response on the same antigen (37). In our study, we focused on all subpopulations of NKT cells, not only iNKT cells. Thus, our data suggest that hyperglycaemic mice have a lower percentage of highly active and functional NKT cells capable of dealing with infections or tumour cells.

In further analyses of the functional phenotype of NKT cells, we investigated the production of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17 and TGF- $\beta$  by NKT cells. There was no statistically significant difference in the percentage of IFN- $\gamma$ -producing NKT cells between hyperglycaemic and normoglycaemic mice on the 28<sup>th</sup> day of the experiment (Figure 3). We also measured the production of cytokines that are markers of type 2 immune responses. Hyperglycaemic mice had higher frequencies of splenic CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup>NKT cells that produce IL-4 and IL-5 compared to normoglycaemic mice (Figure 3). Finally, we analysed the production of IL-17 and TGF- $\beta$  by NKT cells. Diabetic conditions significantly decreased the percentage of IL-17-producing NKT cells in the spleen, while it significantly increased the percentage of TGF- $\beta$ -producing NKT cells in comparison to normoglycaemic animals.

Earlier studies have shown that immune deviation towards a type 1 response and the production of IFN- $\gamma$  promotes tumour rejection, while a type 2 immune response prevents tumour rejection (38, 39). Additionally, IFN- $\gamma$  is an important cytokine in combating intracellular pathogens (8). IL-4 can be marked as the most critical cytokine in the induction of type 2 immune responses (38, 39). The development of a type 2 immune response is followed by GATA3 expression, and GATA3 inhibits type 1 immune responses by the down-regulation of the STAT 4 tran-



scriptional factor (40). Thus, our data suggest that diabetic conditions facilitate the development of type 2 NKT cells, which suppress the type 1 immune response and make these mice more *prone to developing cancer and more susceptible to infections with intracellular microorganisms*.

IL-17 plays a vital role in protecting the host from infection, primarily extracellular bacterial infections and fungal infections, but it is also important for protection against intracellular bacteria and some viruses (41). IL-17 has potent pro-inflammatory functions, including the induction of IL-6 and TNF- $\alpha$ , that increase the recruitment of neutrophils and regulate the production of anti-microbial peptides, which contribute to the host defence (28, 41, 42). Our data indicate that hyperglycaemic mice with a significantly lower percentage of type 17 NKT can be highly susceptible to infection by extracellular pathogens.

Earlier studies showed that NKT cells produce TGF- $\beta$  and thus suppress anti-tumour immunity (43). NK1.1<sup>+</sup> T cells in TIL show immunosuppressive activity in the anti-tumour immune response through the production of TGF- $\beta$  and the preferential cytolysis of B7-expressing cells (44). Earlier studies have shown that TGF- $\beta$  plays an important role in tumour escape from immune surveillance via the down-regulation of CD8<sup>+</sup>CTL and the suppression of antitumour cell activity, which results in the uncontrolled growth of tumour cells (45). TGF- $\beta$  also affects myeloid cells, which modulate host immune surveillance and the tumour microenvironment and thus facilitate tumour growth and metastasis (46). TGF- $\beta$  also inhibits the proliferation and effector functions of macrophages, neutrophils and T lymphocytes and thus suppresses the innate and adaptive immune responses (8).

In line with these studies, our results revealed that diabetic mice had higher percentages of TGF- $\beta$ -producing NKT cells, which can make them more susceptible to developing cancer and infections in comparison to normoglycaemic mice.

### Conclusion

Collectively, diabetes mellitus can modulate NKT cells' functional phenotype in at least two ways: through enhanced expression of the inhibitory receptor KLRG1 and direction toward type 2 and regulatory phenotypes. These findings are in line with data that show that diabetic patients are more prone to infections and tumours.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175069, 175071 and 175103), Serbia and from the Faculty of Medical Sciences, Kragujevac (project MP 01/12), Serbia. The authors are grateful for the excellent technical assistance of Milan Milojevic.

### Conflicts of interest

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

### REFERENCES:

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 87(1), 4-14.
2. American diabetes association. (2008). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care* 31(1), 55-60.
3. Ceriello A. (2000). Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism.* 49(2, Suppl 1):27-29.
4. Baynes JW, Thorpe SR. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9.
5. Maritim AC, Sanders RA, and Watkins JB III. (2003). Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J biochem molecular toxicology.* 17(1), 24-38.
6. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 25(4), 612-28.
7. Geerlings S, Hoepelman A. (1999). Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 26(3-4), 259-65.
8. Abbas A, Lichtman A, Pillai S Cellular and molecular immunology, 8edition
9. Xiu F, Stanojcic M, Diao L, Jeschke M. (2014). Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. *Int J Endocrinol.* 2014:486403. doi: 10.1155/2014/486403.
10. Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A, Peraldi MN. (2013). Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes *Plos One.* 8(4):e62418. doi: 10.1371/journal.pone.0062418.
11. Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, Priatel JJ, Tan R. (2011). Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes.* 60(3), 857-66.
12. Slauenwhite D, Johnston B. (2015). Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. *Frontiers in Immunology* 6:255. doi: 10.3389/fimmu.2015.00255.
13. Kumar V, Delovitch TL. (2014). Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology.* 142(3), 321-36.
14. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. (2007). IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 178(5), 2827-34.
15. Marrero I, Ware R, Kumar V. (2015). Type II NKT cells in inflammation, autoimmunity, microbial immunity, and cancer. *Front Immunol.* 17:6:316. doi: 10.3389/fimmu.2015.00316.
16. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. (2010). Raising the NKT cell family. *Nat Immunol.* 11(3), 197-206.
17. McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244(22), 6056-6063.



18. Beutler E (1982) Catalase. In: Beutler E (ed) Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York, pp 105–106
19. Misra HP, Fridovich I. (1972). The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247, 3170–3175.
20. Jovanovic I, Radosavljevic G, Milovanovic M, Martinova K, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic M. (2012). Suppressed innate immune response against mammary carcinoma in balb/c mice. *Ser J Exp Clin Res.* 13 (2), 55-61.
21. Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM. (2008). Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med.* 44(7), 1217-31.
22. Jakus V. (2000). The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy.* 101(10), 541-51.
23. Verhasselt V, Goldman M, Willems F. (1998). Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 28(11), 3886-90.
24. Matés JM. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 153(1-3), 83-104.
25. Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho YS, Ha H. (2012). Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes.* 61(3), 728-38.
26. Fujita H, Fujishima H, Chida S, Takahashi K, Qi Z, Kanetsuna Y, Breyer MD, Harris RC, Yamada Y, Takahashi T. (2009). Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 20(6), 1303-13.
27. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23(5), 599-622.
28. Robertson FC, Berzofsky JA, Terabe M. (2014). NKT cell networks in the regulation of tumor immunity. *Front Immunol.* 5:543. doi: 10.3389/fimmu.2014.00543.
29. Girardi E, Maricic I, Wang J, Mac TT, Iyer P, Kumar V, Zajonc DM. (2012). Type II natural killer T cells use features of both innate-like and conventional T cells to recognize sulfatide self antigens. *Nat Immunol.* 13(9), 851-6.
30. Terabe M, Berzofsky JA. (2007). NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol.* 28(11), 491-6.
31. Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. (2007). Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J Immunol.* 179(6), 3452-62.
32. Constantinides M, Bendelac A. (2013). Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr Opin Immunol.* 25(2), 161–167.
33. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. (2008). Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(32), 11287-92.
34. Hadad U, Thauland T, Butte M, Porgador A, Krams S. (2014). NKp46 modulates NK immune synapse function (INC6P.346). *The Journal of Immunology.* 192 (1 Supplement) 121.13
35. Yu J, Mitsui T, Wei M, Mao H, Butchar JP, Shah MV, Zhang J, Mishra A, Alvarez-Breckenridge C, Liu X, Liu S, Yokohama A, Trotta R, Marcucci G Jr, Benson DM, Loughran TP Jr, Tridandapani S, Caligiuri MA. (2011). NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J Clin Invest.* 121(4):1456-70.
36. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. (2011). ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur J Immunol.* 41: 1902-1912.
37. Shimizu K, Sato Y, Shinga J, Watanabe T, Endo T, Asakura M, Yamasaki S, Kawahara K, Kinjo Y, Kitamura H, Watarai H, Ishii Y, Tsuji M, Taniguchi M, Ohara O, Fujii S. (2014). KLRG+ invariant natural killer T cells are long-lived effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(34), 12474-9.
38. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. (2004). Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 53(2), 79-85.
39. Oki S, Chiba A, Yamamura T, and Miyake S. (2004). The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest.* 113(11), 1631–1640.
40. Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity.* 18(3), 415-28.
41. Onishi R, Gaffen S. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 129(3), 311–321.
42. Gaffen S. (2008). An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine.* 43(3), 402–407.
43. Terabe M, Berzofsky JA. (2008). The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res.* 101:277-348.
44. Tamada K, Harada M, Abe K, Li T, Tada H, Onoe Y, Nomoto K. (1997). Immunosuppressive activity of cloned natural killer (NK1.1+) T cells established from murine tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 158(10), 4846-54.
45. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, Berzofsky JA. (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 198(11), 1741-52.
46. Pang Y, Gara SK, Achyut BR, Li Z, Yan HH, Day CP, Weiss JM, Trinchieri G, Morris JC, Yang L. (2013). TGF-β signaling in myeloid cells is required for tumor metastasis. *Cancer Discov.* 3(8), 936-51.