



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марина Јовановић

**Синергистички ефекат блокаде IL-33/ST2 и
PDL/PD-1 осовина на прогресију мишјег
карцинома дојке**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marina Jovanovic

**Synergistical effect of IL-33/ST2 and PDL/PD-1
blockage in a mammary carcinoma**

Doctoral Dissertation

KRAGUJEVAC, 2021.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Марина Јовановић
Датум и место рођења: 21.11.1991. Ћуприја
Садашње запослење: Клинички центар Крагујевац, специјализант оториноларингологије
Докторска дисертација
Наслов: Синергистички ефекат блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина на прогресију мишићег карцинома дојке
Број страница: 138
Број слика: 55 (53 графикона, 2 табеле)
Број библиографских података: 312
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија, Онкологија
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-65/21 од 04.09.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник 2. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан 3. Доц. др Милан Јовановић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

Doctoral dissertation identification page

Author
Name and surname: Marina Jovanovic
Date and place of birth: 21.11.1991. Cuprija
Current employment: Clinical Center Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Synergistical effect of IL-33/ST2 and PDL/PD-1 blockage in a mammary carcinoma
No. of pages: 138
No. of images: 55 (53 charts, 2 tables)
No. of bibliographic data: 312
Institution and place of work: Faculty of medical sciences Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine
Mentor: Ivan Jovanovic, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific fields of Microbiology and immunology, Oncology
Assessment and defense
Topic application date:
Decision number and date of acceptance of the doctoral topic: IV-03-65/21 from 04.09.2019.
Commission for the evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">1. Nebojsa Arsenijevic, MD, PhD, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, president;2. Gordana Radosavljević, MD, PhD, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, member3. Milan Jovanovic, MD, PhD, Assistant professor at the Military Medical Academy, University of Belgrade, for the narrower scientific field of Surgery, member
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
Date of defense of the dissertation:

Посебно се захваљујем свом ментору, професору Ивану Јовановићу, на показаној стручности, пренетом знању које далеко превазилази оквире овог доктората, бескрајном стрпљењу, разумевању и непрестаној подрици.

Посебну захвалност такође дугујем Невени Гајовић и Милени Јуришевић које су својим учешћем допринеле квалитету доктората уз много ентузијазма и позитивне енергије.

Захваљујем се и својој породици, а посебно свом оцу Зорану, на подрици коју ми је пружио на овом путу.

САЖЕТАК

Иако је добро познато да појединачна блокада било PDL/PD-1 било IL-33/ST2 осовине доприноси ефикаснијем анти-туморском одговору, симултанана блокада ових осовина није још увек изучена. Индуковали смо карцином дојке (4T1) или карцином колона (CT26) BALB/c или BALB/c ST2 нокаут мишевима, а потом су добијали анти PD-1 или анти IL-33 антитело. Симултана блокада IL33/ST2 и PDL/PD1 је одложила појаву палпабилног тумора и успорила раст тумора. Наши резултати такође указују појачану цитотоксичност NK ћелија према 4T1 туморским ћелијама код ST2 нокаут мишева који су третирани анти-PD-1 анителом. Код ST2 нокаут мишева који су третирани анти-PD-1 анителом је такође била повећана експресија miRNA-150 и miRNA-155, повећање експресије NFκB и STAT3, повећана експресија активационих маркера и смањена експресија имунсупресивних маркера код NK, NKT, T лимфоцита, у слезини и у примарном тумору. Такође, NK ћелије изоловане из BALB/cST2 нокаут мишева који су третирани анти-PD-1 анителом, имају већи степен пролиферације и мањи степен апоптозе у примарном тумору. Акумулација имусупресивних ћелијских популација мијелоидних супресорских ћелија ил иТ регулаторних лимфоцита, је код ST2 нокаут мишева који су третирани анти-PD-1 анителом била значајно мања и у слезини и уз приамрном тумору. Ови резултати показују уда симултанана блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина много ефикасније успорава прогресију тумора у односу на појединачну блокаду, отварајући нове могућности за терапијски приступ лечењу карцинома.

Кључне речи: IL-33/ST2, PDL-PD/1, карцином колона, карцином дојке, miRNA

ABSTRACT

Although separate blockage of either IL-33/ST2 or PDL/PD-1 axes has been shown to be beneficial in many tumors, co-blockage of IL33/ST2 and PDL/PD-1 hasn't been studied yet. 4T1 breast cancer and CT26 colon cancer were induced in BALB/C wild type (WT) and BALB/C ST2 knockout mice, after which mice underwent anti PD1 and anti IL-33 treatment. Co-blockage of IL33/ST2 and PDL/PD1 delayed tumor appearance and slowed tumor growth. Enhanced NK cell cytotoxicity against 4T1 tumor cells in ST2 knockout anti-PD1 treated mice was associated with overexpression of miRNA-150 and miRNA-155, upregulation of NFκB and STAT3, increased expression of activation markers and decreased expression of immunosuppressive markers in splenic and primary tumor derived NK cells. NK cells from ST2 knockout anti-PD1 treated mice tend to proliferate more and are less prone to apoptosis. Accumulation of immunosuppressive myeloid derived suppressor cells and regulatory T cells was significantly impaired in spleen and primary tumor of ST2 knockout anti-PD1 treated mice. Co-blockage of IL-33/ST2 and PDL/PD-1 axes impedes tumor progression more efficiently than single blockage of either axes, thus offering potential new approach to immunotherapy of tumors.

Keywords: PDL/PD-1, IL-33/ST2, breast carcinoma, colon carcinoma, miRNAs

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	8
1.1. PD-1 молекул.....	8
1.2. Лиганди за PD-1 молекул.....	9
1.3. PD-L1/PD-1 осовина.....	9
1.4. PD-L1/PD-1 осовина у имунском одговору на туморе.....	10
1.5. Имунотерапија карцинома (инхибиторима checkpoint молекула).....	11
1.6. Нежељена дејства блокаде checkpoint молекула.....	12
1.7. Интерлеукин-33.....	14
1.8. IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовине у карциному дојке.....	15
1.9. IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовине у карциному колона.....	16
1.10. Имуни одговор на туморе.....	17
1.11. Кратки некодирајући сегменти рибонуклеинске киселине.....	19
1.12. Улога микро RNA у ћелији.....	21
1.13. Утицај микро RNA на ћелије имунског система.....	21
1.14. Улога микро RNA на развој и функцију NK ћелија.....	22
2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ.....	25
2.1. ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	25
2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	26
3.1. Експерименталне животиње.....	26
3.2. Индукција тумора.....	27
3.3. Давање анти PD-1 антитела.....	27
3.4. Давање анти IL-33 антитела.....	27
3.5. Изолација NK ћелија.....	28
3.6. Тест цитотоксичности.....	28
3.7. Испитивање популација ћелија у слезини и туморској микросредини- проточна цитометрија.....	28
3.8. Инхибиција индоламин оксидазе(IDO) и индуцибилне нитритне оксидазе(iNOS) in vitro.....	29
3.9. Анализа цитотоксичности NK ћелија in vitro.....	29
3.10. Анализа серумског нивоа цитокина.....	30
3.11. Анализа експресије miRNA у NK ћелијама.....	30
3.12. Статистичка обрада података.....	31
4. РЕЗУЛТАТИ.....	32

4.1.	Блокада PDL/PD1 и IL33/ST2 осовина одлаже појаву и успорава раст карцинома дојке и колоне.....	32
4.2.	Примена анти-PD1 антитела појачава цитотоксичност и мења фенотип NK ћелија изолованих из слезине ST2-/- мишева.....	37
4.3.	Примена анти-PD1 антитела појачава акумулацију и значајно мења фенотип NK ћелија у туморској микросредини ST2-/- мишева.....	44
4.4.	Интензивнија пролиферација и смањен ниво апоптозе NK ћелија у туморској средини ST2-/- мишева на анти-PD1 терапији.....	50
4.5.	Већа транскрипциона активност NK ћелија примарног тумора ST2-/- мишева на анти-PD1 терапији.....	50
4.6.	Значајно смањена локална и системска имуносупресија код ST2-/- мишева на анти-PD1 терапији.....	52
4.7.	Већа експресија активационих маркера на NK ћелијама из слезине ST2-/- мишева третираних анти-PD1 терапијом без обзира на <i>in vitro</i> блокаду IDO и iNOS молекула 61	
4.8.	Одсуство IL-33/ST2 сигналног пута и PDL/PD1 осовине појачава NK ћелијску цитотоксичност преко унутрашњег пута апоптозе.....	63
4.9.	Промена експресије miRNA у NK ћелијама изолованих из слезине ST2 нокаут мишева након блокаде PDL/PD1.....	64
4.10.	Анти PD-1 терапија повећава акумулацију M1 макрофага у туморској микросредини ST2-/- мишева.....	66
4.11.	Примена анти- PD1 антитела повећава заступљеност NKT ћелија у слезини и мења њихов фенотип код ST2-/- мишева.....	68
4.12.	Повећана акумулација NKT ћелија у туморској микросредини код ST2-/- мишева на анти-PD-1 терапији је праћена повећаном експресијом активационих маркера.....	72
4.13.	Анти PD-1 терапија повећава заступљеност Т лимфоцита уз повећање експресије активационих молекула, у слезини ST2-/- мишева.....	74
4.14.	Анти PD-1 терапија мења фенотип Т лимфоцита у туморској средини ST2-/- мишева 76	
4.15.	Ефекат блокаде PDL/PD-1 на NK ћелије.....	79
4.16.	Ефекат блокаде PDL/PD-1 на NKT ћелије.....	82
4.17.	Ефекат блокаде PDL/PD-1 на макрофаге.....	88
4.18.	Ефекат блокаде PDL/PD-1 на дендритске ћелије.....	89
4.19.	Ефекат блокаде PDL/PD-1 на Т лимфоците.....	90
5.	ДИСКУСИЈА.....	92

1. УВОД

1.1. PD-1 молекула

Молекула програмиране ћелијске смрти 1 (енгл. *programmed cell death 1, PD-1, CD279*) је први пут изолован 1992, године, код мишјег хибридома Т лимфоцита и ћелијске линије хематопоетског прогенитора у фазама апоптозе (1). Наиме, анализом 2B4.11 и LyD9 ћелијских линија код који је индукована апоптоза, примећено је да се код ових ћелија синетише нова RNA која је задужена за експресију молекула PD-1, за коју се тада претпостављало да учествује у програмираној ћелијској смрти, одакле PD-1 добија назив (1). Данас се зна да PD-1 молекула има другачију ћелијску функцију и од тада је темељно изучаван (2,3,4).

PD-1 молекула својој структури је мономерни мембрански протеин који припада суперфамилији имунглобулина. Структурно је најсличнији ко-рецепторским протеинима. (5) Његова главна одлика је да на свом ванмембранском крају поседује један варијабилни (V) сегмент, а унутар ћелије поседује сигнални ланац са тирозинским доменима, аналогно антигенским рецепторима ефекторских ћелија(6,7). Унутарћелијски део PD-1 молекула се састоји из једног ИТИМ домена (енгл. *immunoreceptor tyrosinebased inhibiton motif, ИТИМ*) и једног ИТСМ домена (енгл. *immunoreceptor tyrosine based switch motif, ИТСМ*) уз који се налазе повезане фосфатазе које могу зауставити сигнале са TCR корцепторског комплекса спроведеног успомоћ киназа (8,9).

Експримиран је углавном на ефекторским ћелијама, пре свега на Т лимфоцитима, након антигенске стимулације (10,11). До скоро се сматрало да је PD-1 молекула везан искључиво за антигенску стимулацију Т лимфоцита, али се данас зна да је у великој мери експримиран и на NK и NKT ћелијама(12,13,14).

Главна функција PD-1 молекула је регулација имунског одговора, првенствено ефекторских ћелија.Приликом антигенске стимулације, повећана је експресија корцепторских молекула које, заједно уз сигнале за TCR рецептора, активирају ефекторску ћелију (15). Међутим, приликом активационих сигнала, у ефекторској ћелији је појачано синетишу и експримирају и инхибиторни молекули (16). Постоји више инхибиторних молекула који су експримирани на ефекторским Т, NK и NKT ћелија. Сви молекули који учествују у регулацији имунског одговора, било позитивној или негативној, једним именом се називају *checkpoint* молекули (17). По свом дејству, могу бити костимулаторни или инхибиторни (18, 19). PD-1 припада инхибиторним молекулима, то јест, сигнали са PD-1 молекула супримирају имунски одговор(20). Осим

PD-1 молекула, у инхибиторне *checkpoint* молекуле спадају и CTLA-4, TIGIT, CD96, NKG2A. (21-24)

1.2. Лиганди за PD-1 молекул

Идентификована су два типа лиганда за PD-1: PD-L1 (енгл. *Programmed death ligand 1, PD-L1, CD274*) и PD-L2 (енгл. *Programmed death ligand 2, PD-L2, CD273*) који се разликују пре свега по месту експресије (25,26). Наиме, PD-L1 је у нормалним условима експримиран на антиген-презентујућим ћелијама, као и у многим ткивима, док је PD-L2 експримиран углавном на антиген-презентујућим ћелијама (27).

PD-L1 и PD-L2 су трансмембрански гликопротеини који такође припадају суперфамилији B7 имуноглобулина (28). Структурна сличност у погледу редоследа аминокиселина износи свега 30-40% између PD-L1 и PD-L2 (29). PD-L1 има далеко значајнију улогу у контролисању имунског одговора, са обзиром да је експримиран на активираним Т и В лимфоцитима, НК ћелијама, макрофагима, дендритским ћелијама, мастоцитима, али и неимунским ћелијама, као што су ендотелне ћелије, непаренхимске ћелије јетре, мезенихималне матичне ћелије, ћелије панкреаса и кератиноцити (30). PD-L2 је експримиран углавном на активираним дендритским ћелијама, а у мањој мери може бити експримиран на макрофагима или перитонеланим В1 лимфоцитима (31,32).

1.3. PD-L1/PD-1 осовина

Када је активирана, PD-L1/PD-1 осовина има улогу у ограничавању имунског одговора. Интраћелијски део PD-1 молекула садржи инхибиторне тирозинске секвенце чијом се фосфорилацијом активирају фосфатазе које даље дефосфорилишу активационе сигналне молекуле нисходно од антигенског рецептора, чинећи их неактивним (33). За разлику од других инхибиторних *checkpoint* молекула који регулишу имунски одговор у раним фазама, PD-1 молекул учествује у регулацији имунског одговора у каснијим фазама. Зато је PD-L1/PD-1 осовина најактивнија приликом понављане или хроничне антигенске стимулације (34). Такође, за разлику од CTLA-4 који смањује активацију ефекторским ћелија у секундарним лимфним органима, PD-1 молекул инхибира имунски одговор у периферним ткивима, на месту јављања антигена (35).

1.4. PD-L1/PD-1 осовина у имунском одговору на туморе

PD-L1 је често, осим на имунским ћелијама, експримиран и на туморским ћелијама. До сада се зна да је у највећој мери експримиран на ћелијама реналног карцинома, карцинома дојке, паприларног тироидног карцинома и карцинома тестиса (36). Сматра се да повећана експресија PD-L1 корелира са лошијом прогнозом(37). Са обзиром на основну улогу PD-L1/PD-1 осовине, лако је закључити да туморске ћелије, путем повећане експресије PD-L1, инхибирају активацију, пре свега Т лимфоцита, и на тај начин избегавају анти-туморски имунски одговор(38). Осим експресије на ћелијама карцинома, PD-L1 може такође бити експримиран на ћелијама у туморској микросредини и дренажућим лимфним чворовима. PD-L1 могу експримирати дендритске ћелије, макрофаги, фибробласти, Т лимфоцити (39). Такође, постоје подаци да IFN γ може поцећати експресију PD-L1 на антиген-презентујућим ћелијама (40).

Сматра се да генетске мутације које настају приликом туморигенезе ћелије започињу повећану експресију PD-L1(41). Међутим, садашњим развојем тумора и секрецијом цитокина IFN γ , TNF α и IL-6 у туморској микросредини, експресија PD-L1 се повећава и подстиче даљу имуносупресију (42).

Неке од генетских мутација које подстичу повећану експресију PD-L1 су мутације JAK/STAT сигналног пута, амплификације и транслокације у самом гену за PD-L1 и PD-L2 (*CD274* и *PDCD1LG2*)(43). Повећана инциденца ових мутација се јавља нарочито у примарном медијастиналном лимфому крупноћелијских В лимфоцита, макроцитном карциному плућа, сквамозелуларном карциному и аденокарциному желуца (44,45).

Скорашња истраживања су показала да, осим мембранских, постоје и егзозомална и солубилна форма PD-L1 у ћелијама карцинома(46). Показано је да код пацијената оболелих од карцинома главе и врата постоји повећан проценат егзозомалне форме PD-L1, као и да тај повећан проценат указује на лошију прогнозу (47). Иако још увек постоји доста недоумица око егзозомалне форме PD-L1, сматра се да осим лошег прогностичног фактора, може варирати у односу на анти-туморску имуност(48). Када је у питању солубилна форма PD-L1 молекула, први пут је примећен код пацијената оболелих од узнапредовалих форми карцинома плућа (49). Слично као и егзозомални PD-L1, серумска концентрација солубилног PD-L1 корелира са лошијом прогнозом (49). На моделу мишијег меланома је показано да високе концентрације PD-L1 подстичу ставрање имуносупресије и у туморској микросредини, али могу подстицати и системску имуносупресију (50).

1.5. Имуноterapiја карцинома (инхибиторима checkpoint молекула)

Имајући у виду особености сигнализације PDL/PD-1 осовине, њена блокада је нашла примену у имуноterapiји карцинома. Коришћење блокирајућих антитела за *checkpoint* молекуле у терапији карцинома је показало веома значајне резултате, променило приступ терапији карцинома из корена, тако да је за откиће инхибитора *checkpoint* молекула додељена и Нобелова награда(51).Блокада CTLA-4 и PD-1 молекула успомоћ антитела је највише истраживана и данас има своју примену и у клиничкој пракси (52). Најпре је показано да анти-CTLA-4 смањује прогресију мишјег меланома, да би 2011. анти-CTLA-4 била званично одобрена за терапију меланома, што је уједно био и зачетак имуноterapiје карцинома (53). Развој анти-PD-1 терапије је уследио нешто касније, најпре у комбинацији са анти-CTLA-4, а потом је истраживан и засебно (54,55). Иако се често описују заједно, треба напоменути да анти-CTLA-4 и анти-PD-1 имају различит механизам дејства. Наиме, сматра се да блокада CTLA-4 у највећој мери делује у лимфним чворовима, док блокада PD-1 молекула углавном делује у туморској микросредини и дренирајућим лимфним чворовима тумора (56). У јеку су истраживања блокаде других *checkpoint* молекула, као што су TIGIT, CD96, NKG2A (57-60). PDL/PD-1 осовина се блокира антителом специфичним или за PD-L1 или за PD-1 молекул(табела 1). Од 2014. па до данас, оба типа блокирајућих антитела су одобрена за терапију меланома, карцинома бубрега, троструко негативног карцинома дојке, релапсирајућег карцинома главе и врата, примарног крупноћелиског медијастиналног лимфома В лимфоцита, релапсирајућег Хоџкин лимфома, микросателитног карцинома колона, као и локално узнапредовалог, иноперабилног, већ раније озраченог, метастатског сквамозног карцинома коже (61-67).

Инхибитори PD-1 молекула	Инхибитори PD-L1 молекула
Nivolumab	Atezolizumab
Pembrolizumab	Durvalumab
Семиплимаб	Avelumab

Табела 1. Моноклонска антитела која се у клиничкој пракси користе за блокаду PD-1 или PD-L1 молекула.

На основу клиничких студија спроведених до сада, не може се јасно утврдити да ли је ефикасност анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитела већа (68). Терапијски одговор на било анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело зависи од много фактора, као што су пол, хистолошки тип тумора, тип генске мутације или транслокације, присуство/одсуство метастаза (69). Међутим, треба напоменути да је експресија PD-L1 врло хетерогена у туморском ткиву, то јест, у истој фази туморигенезе PD-L1 молекула може бити различито експримиран на ћелијама, а и може се мењати са прогресијом тумора (70). С друге стране, експресија PD-1 молекула у највећој мери зависи од стања имунског система појединца (71).

1.6. Нежељена дејства блокаде *checkpoint* молекула

Приликом блокаде *checkpoint* молекула су забележена многа нежељена дејства, која се једним именом називају нежељена дејства повезана са имуности (енгл. *immune-related adverse events*, *irAEs*)(72). Постоји велики број нежељених дејстава које захватају велики број органа, али се најчешће се јављају на кожи, гастроинтестиналном систему и јетри, ендокриним органима и плућима. Нешто ређе се јављају у нервном систему и срцу, али су тада врло често леталне (73). Доступни подаци показују да су нежељена дејства дозно зависна, као и да су далеко чешћа приликом комбинације анти-PD-1 и анти-CTLA-4 антитела (74,75). Од дерматолошких нежељених дејстава, најчешће се јављају неспецифични осипи, осећај сувоће устију, свраб коже, витилиго (76, 77). Дерматолошка нежељена дејства се могу јавити и у виду нешто озбиљнијих стања, као што су Стивен-Џонсон синдром, дерматомиозитис, булозни пемфигоид (78). Гастроинтестинална нежељена дејства се најчешће јављају у виду колитиса и/или поремећеним лабораторијским параметрима јетрине функције (79). Занимљиво је да се нежељена дејства у гастроинтестиналном тракту могу јавити и након завршетка терапије, то јест, могу имати тзв. „одложену токсичност“ (80).

Када су у питању ендокриног система приликом употребе *checkpoint* блокатора, најчешће се јављају поремећаји тироидне жлезде, дијабетес или хипофизитис (замањење предњег лобуса хипофизе) (81). Међу ендокриним поремећајима, најчешћи су поремећаји функције тироидне жлезде који могу бити у правцу хипер или хипофункције. Не тако ретко се развијају и оба поремећаја – најпре се развије хипертироидизам који је у каснијим фазама праћен хипотироидизмом (82). Нежељена дејства на миокард могу бити веома разнолика – од асимптоматских ЕКГ промена који указују на исхемију, до тешког

срчаног попуштања (83). На плућима се може развити токсични пнеумонитис, али далеко чешће се манифестује пролазним диспноичним тегобама (84).

Иако се ретко дешавају, након примене *checkpoint* се могу јавити и тешка нежељена дејства, као што су псеудопрогресија и хиперпрогресија малигне болести (85). Псеудопреогресија представља иницијано повећање тумора и/или секундарних депозита, потврђено радиографски. Хистопатолошки налаз увећаних лезија указује на то да су туморске лезије увећане углавном на рачун имунских ћелија пре свега CD8⁺ Т лимфоцита, али је присутан и локални едем и некроза туморског ткива (86). Након тога се смањује количина туморског ткива, а леукоцитни инфилтрати могу перзистирати још неко време. Иако постоји адекватан терапијски одговор чак и уз присуство псеудопреогресије, ипак је значајно одложен у односу на пацијенте код којих се не развија псеудопрогресија(87). Треба истаћи да се псеудопреогресија и хиперпрогресија чешће јављају када је малигнетет већ неуспешно третиран другим терапијским средствима, пре свега цитостатицима(88).

Осим псеудопрогресије, приликом примене анти-PD-1 терапије, забележена је и нагла прогресија болести. За сада су забележена два таква случаја, а спроводе се и ретроспективне студије како би се утврдила преваленца хиперпрогресије болести након употребе *checkpoint* инхибитора(89). Још увек не постоје јасни критеријуми за дијагностиковање хиперпрогресије, али се хиперпрогресијом сматра дупло радиографско повећање примарног тумора и/или појава нових метастаза у периоду трајања анти-PD-1 терапије у односу на период без анти-PD-1 терапије(90). Хиперпрогресија се може јавити и у току лечења меланома, карцинома уроепитела, јајника, билијарног тракта, карцинома главе и врата и макроцелуларног карцинома плућа, тако да хистопатолошке карактеристике карцинома немају утицај на настанак хиперпрогресије (91). Осим тога, код пацијентата са и без хиперпрогресије не постоји разлика у експресији лиганда за PD-1 у туморској микросредини. Иако постоји јако мало података, забележено је да неки фактори ризика за настанак хиперпрогресије могу бити старост и мутације рецептора за епидермални фактор раста. На основу доступних података, хиперпрогресија се јавља по правилу у већ раније озраченом карциному без задовољавајућег терапијског одговора. Разлог томе могу бити драстичне промене у туморској микросредини ка имуносупресији приликом радиотерапије (92,93).

1.7. Интерлеукин-33

Интерлеукин-33(IL-33) припада IL-1 групи цитокина у које спадају и IL-1 α и β , IL-18, IL-36 α , β , γ , IL-37, IL-38. Заједничка одлика им је присуство истоветних адаптерних протеина и сигналних молекула као што су MyD88, рецептор за IL-1(енгл.*IL-1 receptor, IL-1RI*) и IL-1RacP (енгл. *IL-1 receptor accessory protein, IL-1RAcP*) (94,95). Међутим, за разлику од осталих чланова IL-1 групе цитокина, IL-33 може деловати и као цитокин, алармин или чак као транскрипциони фактор (96,97).

IL-33 је експримирану многим ткивима. За разлику од других цитокина који се могу наћи углавном у претежно у ћелијама имунског система, IL-33 се може наћи и на ендотелним, епителним ћелијама и фибробластима (98,99). За сада се зна да IL-33 има значајну улогу у настанку алергијских болести, неких аутоимунских болести. Повезује се и са прогресијом неких инфективних болести и карцинома (100-103). IL-33 поседује свој рецептор ST2 (енгл. *Suppressor of Tumorigenicity 2. ST2*) који је експримиран на T регулаторним лимфоцитима, урођеним лимфоидним ћелијама тип 2, мијелоидним ћелијама, цитотоксичким NK ћелијама, помагачким T лимфоцитима, као и цитотоксичким T лимфоцитима(104).

Улога IL-33 је темељно изучавана у биологији тумора. Доступни подаци указују на то да улога IL-33 у туморигенези може бити двојака: IL-33 може подстицати и туморигенезу и анти-туморски имунски одговор (105,106).

Раније је већ показано да езогени IL-33 повећава инфилтрацију помагачких и цитотоксичких T лимфоцита у туморској микросредини меланома. Такође, показано је да постоји повећано стварање IFN- γ код цитотоксичких T лимфоцита који инфилтришу тумор (107,108,109). Друге студије показују да је IL-33 активира дендритске ћелије, подстиче експресију костимулаторних молекула, и на тај начин подстиче антитуморску имуност, преко активације цитотоксичких NK ћелија и T лимфоцита (110).

Такође, постоје и студије које указују на протуморску улогу IL-33/ST2 осовине. Наша истраживачка група је већ раније показала да у одсуству IL-33/ST2 сигнализације, примарни тумор се касније појављује, спорије расте, а метастазирање је мање изражено (111) У истој студији је показано да код одсуства IL-33/ST2 сигнализације, постоји повећан број ефекторских ћелија, а уз то, повећана је цитотоксичност и NK ћелија и T лимфоцита(111). У складу са нашим резултатима, друге студије су такође потврдиле протуморску улогу IL-33/ST2 осовине. Наиме, приликом администрације IL-33, повећан је метастатски потенцијал тумора, са обзиром на повећану активност матриксних металопроотеиназа или лизил-оксидаза чија је улога пресудна у метастазирању

тумора(112). Друфи аутори указују на то да IL-33/ST2 подстиче имуносупресију у туморској микросредини и самим тим нарушава ефикасан анти-туморски одговор(113). IL-33 стимулише мијелоидне супресивне ћелије и макрофаге M2 фенотипа који су неефикасни у анти-туморској имуности (114). По неким ауторима, примарни транскрипт IL-33 у једру ћелија може имати значајну улогу у туморигенези (115).

1.8. IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовине у карциному дојке

Иако је карцином дојке један од најчешћих малигнитета код жена, имунски одговор и имунотерапија још увек нису до краја разјашњени. За сада је познато да IL-33/ST2 осовина има значајан утицај на настанак карцинома дојке. Резултати наше истраживачке групе су показали да IL-33/ST2 осовина поспешује раст и развој карцинома дојке тако што стимулише акумулацију имуносупресивних ћелијских популација у туморској микросредини (116). Друге студије указују на то да, осим што поспешује раст карцинома дојке, стимулише и метастазирање (117). Наиме, са обзиром да IL-33 могу продуковати и фибробласти, у студији Shani и сарадника је показано да је експресија IL-33 у метастатским нишама плућа значајно већа у односу на околно ткиво. IL-33 стимулише Th2 тип имунског одговора, који погодује настанку секундарних депозита(107). Код пацијента оболелих од карцинома дојке серумски ниво IL-33 је значајно повишен, поготову у четвртном стадијуму болести. Повишене вредности серумског IL-33 корелирају са серумским нивоима VEGF (енгл. *vascular endothelial growth factor*), MMP-11 (енгл. *matrix metal proteinase -11*), PDGF (енгл. *platelet-derived growth factor*) који су предиктори лоше прогнозе(118). Такође, IL-33/ST2 подстиче и прогресију карцинома дојке тако што подстиче инфламацију у туморском ткиву, подстиче неоангиогенезу и на тај начин смањује некрозу тумора (119). Такође, постоје подаци да повећана експресија IL-33 може подстицати и резистенцију на терапију код хормон – зависног карцинома дојке (120). Осим тога, IL-33/ST2 сигнализација подстиче дедиференцијацију малигнућ ћелија карцинома дојке, чинећи га на тај начин агресивнијом формом болести(121).Повећан ниво IL-33 такође може убрзати прогресију карцинома дојке тако што индиректно, преко сигналних молекула као што је COT (енгл. *Carcinoma Osaka Thyroid*), подстиче инфламацију у туморској микросредини и стимулише малигну трансформацију епитела дојке (122). Истраживање Xiao и сарадника спроведено на 4T1 моделу карцинома дојке показује да је експресија IL-33 значајно већа у туморском ткиву у односу на саме 4T1 ћелије, сугеришући да су имунске ћелије, пре свега мијелоидне супресорске ћелије, главни извор IL-33 у туморској микросредини. Аутори наглашавају значај блокаде IL-

33/ST2 сигнализације у потенцијалне терапеутске сврхе, са обзиром да, као што је већ поменуто, имунохистохемјски повећана експресија IL-33 у туморском ткиву корелира са лошијом прогнозом (118, 123).

Блокада PD-1/PD-L1 осовине у карциному дојке је показала добре резултате. Анти-PD-1 терапија је од марта 2019. године одобрена у комбинацији са паклитакселом за лечење локално узнапредовалог, нересектабилног троструко негативног карцинома дојке. Оваква комбинација се користи само код пацијената код којих имунохистохемијски више од 1% експримира лиганде за PD-1 (124). Иако се сматра да експресија лиганда за PD-1 у туморској микросредини позитивно корелира са већом туморском масом, већем степену пролиферације туморских ћелија, само 20% троструко негативних карцинома дојке експримира PD-L1, те експресија PD-L1 лиганда није меродавна као предиктивни фактор за терапијски одговор анти-PD-1 терапије (125). Досадашња клиничка истраживања указују монотерапија анти-PD-L1 или анти-PD-1 антителима не показује довољну ефикасност (126). Разлог томе може бити да карцином дојке спада у слабо имуногене карциноме, те код њих доминира имуносупресивна микросредина у тумору (127). Комбиновање анти-PD-1 терапије са агенсима који смањују имуносупресију у туморској микросредини могу потенцијално отворити нове видове имунотерапије карцинома дојке (128, 129).

1.9. IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовине у карциному колона

Улога IL-33/ST2 осовине у настанку карцинома колона није довољно разјашњена (130). Иако се експресија IL-33 сматра маркером туморигенезе, и врло често је повећана у узорцима колоректалног карцинома, сматра се да је повећање експресије IL-33 махом последица повећања продукције у имунским ћелијама туморске микросредине (131, 132). Експресија IL-33 корелира са лошијом прогнозом метастатског карцинома колона (133). Истраживања су показала, да, с једне стране, IL-33 подстиче одлике матичних ћелија карцинома колона, а с друге стране, подстиче стварање имуносупресивних ћелија у туморској микросредини, поготову M2 макрофаге (134, 135). Такође је показано да повећана експресија IL-33 подстиче хроничну инфламацију у гастроинтестиналном тракту која погодује развоју карцинома (136). Показано је да са развојем хроничне инфламације, постоји повећање експресије IL-33 које поларизује имунски одговор ка Th2 одговору, стимулише инфилтрацију туморског ткива Т регулаторним лимфоцитима и самим тим индукује имуносупресију. Ово је посебно наглашено код пацијента који имају карцином колона коме је претходила хронична инфламаторна болест црева. (137).

Анти - PD-1 терапија се показала најефикаснијом за терапију карцинома колоне са великим степеном мутација, а који не одговара на стандардну хемиотерапију, за коју је и одобрена 2018.године(138). Са обзиром да се анти-PD-1 терапија не користи као монотерапија у лечењу карцинома колоне, данас су у току постоје бројна клиничка истраживања која истражују потенцијални адитивни ефекат других хемиотерапијеутика(139, 140, 141).

1.10. Иmunски одговор на туморе

Ћелије карцинома имају бројне механизме успомоћ којиг избегавају антитуморски имунски одговор и подстичу даљи развој малигне болести (142). За ефикасну терапије је потребно даље проучавање и разумевање анти-туморског имунског одговора. Тип имунског одговора, као и врста имунских ћелија која у њему доминантно учествује зависи од имуногености тумора (143) Имуногеност је способност тумора да подстакне анти-туморски имунски одговор и зависи од експресије антигена тумора, као и бројних имуномодулаторних фактора које туморске ћелије продукују у туморској микросредини (144). Туморски антигени могу се грубо поделити у две групе: неоантигени који потичу од мутираних протеина, и антигени који су специфични за тип тумора (145). Сматра се да у су анти туморској имуности главне ефекторске ћелије цитотоксички Т лимфоцити и помагачки Т лимфоцити(146,147).

Цитотоксички Т лимфоцити елиминишу туморске ћелија на два начина: егзоцитозом цитотоксичких супстанци које садрже перфорин и гранзим или путем индуковања апоптозе преко FasL. Помагачки, али цитотоксички Т лимфоцити производе велике количине IFN γ и TNF α , подстичу додатно цитотоксичност, али и стимулишу и друге имунске ћелије, као су макрофаги(148). Повећана продукција IFN γ у туморској микросредини може индуковати експресију лиганда за PD-1 и самим тим ограничити анти-туморски имунски одговор(149). Осим тога, и други инхибиторни молекули, као што је CTLA-4 могу се повећано експримирати и додатно изазвати имуносупресију у туморској микросредини (150). Помагачки Т лимфоцити у туморској микросредини стимулишу додатно ефекторске функције цитотоксичких Т лимфоцита успомоћ експресије костимулатора CD40L и цитокина. На основу цитокина које продукују, могу деловати и про-туморски и анти-туморски (151). Помагачки Т лимфоцити Тн1 и Тн17 фенотипа делују анти-туморски, стимулишу презентацију туморских антигена и активирају цитотоксичке лимфоците, док помагачки Тн2 лимфоцити стимулишу имуносупресију у туморској микросредини (146).

Осим ћелија стеченог имунског одговора, важну улогу имају и ћелије урођеног имунског одговора, фибробласти и антиген-презентујуће ћелије.

Антиген презентујуће ћелије, дендритске ћелије су прве ћелије које започињу и усмеравају анти-туморски имунски одговор (152). Конвенционалне дендритске ћелије препознају и прерађују туморске антигене, повећано експримирају костимулаторне молекуле, МНС молекуле, CD80/CD86 молекуле и активирајуће цитокине IL-12, мигрирају ка дренажућим лимфним чворовима где активирају Т лимфоците (153). Међутим, велики број дендритских ћелија не задобија ове карактеристике, остаје у туморској микросредини и ствара имуносупресивне молекуле (154). Потребна су даља истраживања како би се ефикасно могао повећати удео активираних дендритских ћелија у циљу побољшања анти-туморског имунског одговора (155).

Макрофаги такође имају незанемарљиву улогу у туморској имуности. Макрофаги туморске микросредине могу деловати двојачко: имуностимулативно (макрофаги М1 фенотипа) и имуносупресивно (макрофаги М2 фенотипа) (156). Зависно од типа и стадијума тумора, могу бити и добар прогностички фактор (157). Висок степен инфилтрације макрофага у туморској микросредини корелира са инвазивношћу тумора и лошијом прогнозом (158,159). Осим резидуланих дендритских ћелија и макрофага туморске микросредине, имуносупресију могу подстицати и мијелоидне супресорске ћелије (енгл. *myeloid derived-suppressor cells, MDSCs*). За сада су идентификована два типа мијелоидних супресорских ћелија: моноцитне мијелоидне супресорске ћелије и полиморфонуклеарне мијелоидне супресорске ћелије (160). Без обзира на фенотипске карактеристике, оба типа мијелиодних супресорских ћелија супримирају антитуморски имунски одговор кроз секрецију имуносупресивних молекула, али и кроз стимулацију неоангиогезе и формирања метастатских ниша (161). Имуносупресију у туморској микросредини могу подстицати и неимунске ћелије, као што су фибробласти. Фибробласти у туморској микросредини секретују велике количине TGF- β које могу индуковати ћелијску смрт ефektorских цитотоксичких лимфоцита тако што инхибирају експресију Vcl-2 протеина, битног за преживљавање Т лимфоцита (162).

Ћелије урођене имуности које учествују у антитуморској имуности су NKT и NK ћелије. По активацији, NKT ћелије велику количину цитокина које могу стимулирати и NK ћелије, Т лимфоците и макрофаге и на тај начин повезују урођену и стечену имуност(163). Осим тога, и саме NKT ћелије могу деловати цитотоксички на ћелије тумора, било путем Fas/FasL или преко перфорин/гранзим пута(164). NKT ћелије могу експримирати и костимулаторне молекуле и последично активирати Т лимфоците (23). NKT ћелије имају

централну улогу у повезивању урођене и стечене имуности у току анти-туморског имунског одговора. Новији подаци указују на то да НКТ ћелије у туморској микросредини могу спречити енергију Т лимфоцита и НК ћелија (165).

Поред цитотоксичких Т лимфоцита, НК заузимају све важније место у анти-туморском имунском одговору. Код пацијената оболелих од карцинома, показано је да је степен инфилтрације туморског ткива НК ћелијама добар прогностички знак, док смањена функција НК ћелија корелира са краћим преживљавањем (166). По неким ауторима, степен инфилтрације НК ћелија у туморско ткиво зависи о експресије појединих супстанци, као што је хепараназа (167).

Механизми на које НК ћелије побољшавају анти туморски имунски одговор су бројни. С једне стране, могу стимулирати миграцију Т лимфоцита у туморско ткиво и подстицати анти туморски одговор, али исто тако могу и директно елиминисати туморске ћелије (168). НК ћелије имају и могућност да елиминишу у туморске ћелије у циркулацији и самим тим спречити настанак метастаза (169). Као што је раније поменуто, за имунски одговор имуногених тумора главне ефекторске ћелије су цитотоксички Т лимфоцити. Међутим, имуногени тумори могу приликом прогресије постајати мање имуногени, и самим тим имунски одговор може ослабити. Узимајући у обзир да су ефекторске НК ћелије део урођене имуности које ефикасно уклањају туморске ћелије и имуногених и неимуногених тумора, НК ћелије могу бити кључне у иницијацији, али и одржавању ефикасног анти-туморског имунског одговора (170). Како би се што боље искористиле могућности НК ћелија у анти-туморском имунском одговору, потребно је боље разумевање контроле и регулације ефекторских функција НК ћелија, као и на које начине се могу стимулирати, у циљу развијања нових терапијских стратегија.

1.11. Кратки некодирајући сегменти рибонуклеинске киселине

Кратки некодирајући RNA сегменти су први пут откривени 1993. године код нематода (171). До сада се зна да постоје више класа кратих некодирајућих сегмената које имају важне улоге у епигенетској регулацији експресије многих гена. Подељене су на класе на основу структуре својих прекурсора у више група(172) :

- кратке интерферирајуће RNA (енгл. *small interfering RNAs, siRNAs*),
- микро RNA (енгл. *microRNAs, miRNAs*),
- PIWI-интереагујуће RNA (енгл. *P-element Induced Wimpy testis-interacting RNAs, piRNAs*),

- Ендогене кратке интерферирајуће RNA (енгл. *endogenous small interfering RNAs, endo-siRNAs, esiRNAs*),
- Кратке RNA повезане са промоторним протеинима (енгл. *promoter associate RNAs, pRNAs*),
- Кратке RNA нуклеолуса (енгл. *small nucleolar RNAs, snoRNAs*),
- Кратке RNA које настају из RNA нуклеолуса(енгл. *sno-derived RNAs*).

Микро RNA су за сада најбоље изучене и зна се да имају јако важне улоге унутар ћелије (173). Дужине су око 20-22 нуклеотида и налазе у свакој ћелији и имају важну улогу у контролисању експресије многих гена (174). У геному једне ћелије постоје високо конзервирани гени који кодирају микро RNA успомоћ RNA полимеразе II. Најпре се процесом транскрипције добија примарна RNA која је у једру супстрат за ензим *Drosha*, након чега настаје пре-микро-RNA. Оваква структура се транспортује у цитоплазму ћелије успомоћ протеина експортина 5(175). У цитоплазми се успомоћ ендорибонуклеазе *Dicer*, од пре-микро-RNA ствара кратка дволанчана микроRNA сегмент. Један ланац може везати за више информационих RNA присутних у цитоплазми. Заједно, информациона RNA, и микро RNA стварају комплекс са цитоплазматским протеином који се назива аргонаут протеин (176). Аргонаут протеини су цитоплазматски протеини који су јако конзервирани у свакој ћелији. Нађени су у прокариотској и еукариотској ћелији и архајским микроорганизмима (177). Постоји више типова аргонаут протеина који варирају од организма до организма. Код човека је идентификовано осам типова аргонаут протеина (178). Осим тога што учествују у регулацији генске експресије у комплексу са микро RNA, данас се зна да се аргонаут протеини могу транспортовати у једру ћелије и директно регулисати експресију гена. Сматра се да поједини аргонаут протеини могу допринети и туморигенези код људи (179, 180).

Микро RNA и аргонаут протеин стварају комплекс назван RISC комплекс (енгл. *RNA-induced silencing complex, RISC*) (181). Микро RNA се везује успомоћ 6-8 нуклеотида за информациону RNA у цитоплазми. Занимљиво је да без обзира на то да ли је микро RNA комплементарна у потпуности или не информационој RNA, она се разграђује. Код сисара, сам аргонаут протеин поседује каталитичку активност (182). Иста микро RNA се може везивати за више информационих RNA, што RISC комплексу омогућава серијску контролу транслације протеина. Такође, аргонаут протеин, осим што може поседовати каталитичку активност, такође и поседује везујућа места за друге сигналне протеине који учествују у регулацији транслације протеина и/или метаболизма RNA у ћелији(183).

1.12. Улога микро RNA у ћелији

За разлику од осталих врста, у цитоплазми сисара формирање минималног RISC комплекса (који се састоји од микро RNA везане и аргонаут протеина), не значи да је информациона RNA предодређена за разградњу. Судбина информационе RNA ће зависити од кофактора повезаних за аргонаут протеин. Формирање RISC комплекса може на тај начин и стимулирати и зауставити транслацију протеина за чију синтезу је информациона RNA из RISC комплекса задужена (184). Скорија истраживања показују, да осим цитоплазматске активности, RISC комплекс се може налазити и у једру и у једарцету ћелија(185,186). Треба напоменути да микро RNA сисара могу директно и активирати и инхибирати транскрипциону активност гена (187,188). У јеку су истраживања како микро RNA могу утицати и на физиолошку функцију ћелија, али и њихов утицај на бројна патолошка стања (189-193).

1.13. Утицај микро RNA на ћелије имунског система

Као и код свих осталих ћелија, микро RNA имају значајан утицај на развој и функцију ћелија имунског система. Постоји више начина на који микро RNA могу утицати на развој и „опредељење“ плурипотентних хематопоезних ћелија (194). Постоји више врста микро RNA које могу различито утицати на експресију једног циљног гена, али исто тако, једна микро RNA може регулисати експресију више гена (195, 196). Експресија микро RNA у плурипотентној хематопоезној ћелији варира у односу на околности – различите микро RNA су експримиране у периоду хомеостазе и у условима акутне инфекције. Такође, у току старења организма, мења се степен и врста микро RNA експримираних у ћелијама хематопоезе(197, 198). Неке од микро RNA за које се зна да регулишу експресију гена су miRNA-125a и miRNA125b (199). Повећана, неконтролисана експресија miRNA-125a може уједно изазвати и неконтролисану пролиферацију мијелоидних ћелија (200).

У свакој имунској ћелији било урођеног или стеченог имунитета, зависно од типа ћелије, експримиране су у различитој мери различите микро RNA. Тако, на пример, за развој макрофага је неопходна експресија miRNA-146a и miRNA-155, и оне су блиско повезани са активационим транскрипционим факторима AP-1 (енгл. *activator protein -1*) NFκB (енгл. *nuclear factor κ B*) и заједно учествују у имунском одговору који је започет са TLR (енгл. *Toll-like receptors*) рецептора (201). С друге стране, повећана експресија микро RNA

let-7e смањује запаљенски одговор макрофага (202). За развој гранулоцита је неопходна довољна експресија miRNA-223 уз експресију транскрипционог фактора NFI-A (енгл. *nuclear factor 1 A type*)(202). Такође, запажена је и повећана експресија miRNA-21 и miRNA-196b(163). Мање се зна о утицају микро RNA на развој и функцију еритроцита, еозинофила, базофила и мегакариоцита (203,204,205).

Епигенетска контрола развоја ефекторских ћелија, Т, В лимфоцита, NKT и NK ћелија је доста комплекснија и, зависно од фазе развоја или фазе имуског одговора, епигенетски миље може бити веома разноврстан у сваком подтипу ћелије (206-210)

1.14. Улога микро RNA на развој и функцију NK ћелија

Након почетног сазревања у косној сржи, NK ћелије додатно сазревају и диферентују се у периферним лимфним органима. Данас се зна да важну улогу у сазревању NK ћелија има група микро RNA означена као miRNA-15/16(211).miRNA-181a и miRNA-181b такође учествују у матурацији NK ћелија и подстичу секрецију IFN γ у примарним CD56⁺NK ћелијама (212). Бројне микро RNA су укључене и у регулацију функција NK ћелија (213). Постоје и подаци да многе микро RNA секвенце могу утицати и на експресију checkpoint молекула, и на тај начин, директно или индиректно, утицати на исход анти-туморског имунског одговора(214). Најистраженије су miRNA-150, miRNA-155 и miRNA-146a(214).

miRNA-150 је експримирана у зрелим NK и нешто у мањој мери у iNKT ћелијама. Приликом сазревања NK ћелија, експресија су miRNA-150 се повећава, то јест, повећана експресија miRNA-150 корелира са повећаном активношћу NK ћелија (215). Циљани ген за miRNA-150 је транскрипциони фактор c-Myb који стимулише транскрипцију *c-kit* и *Bcl2* гена пресудних за развој В лимфоцита(216). Међутим, у NK ћелијама је показано да c-Myb стимулише експресију инхибиторног рецептора Ly49A. Повећана експресија miRNA-150 смањује активност c-Myb фактора и на тај начин индиректно доприноси појачаној активацији NK ћелија(217). Још један циљни ген за miRNA-150 је *Prfl* који је заслужан за стварање перфорина (218). Показано је да повећана експресија miRNA-150 негативно корелира са продукцијом префорина и на тај начин потенцијално смањује цитотоксичност NK ћелија (219). Међутим, са обзиром да цитотоксичност NK ћелија се може одвијати и преко активирања рецептора смрти, Fas/CD95 молекула које miRNA-150 не утиче, приликом њене повећане експресије цитотоксичност није смањена у потпуности (220).Други аутори наглашавају важну улогу у супресији малигне трансформације NK

ћелија. Наиме, показано је да је експресија miRNA-150 значајно већа код здравих NK ћелија у односу на малигне ћелије NK/T лимфома (221). Ови подаци наглашавају јако значајну улогу miRNA-150 у нормалном развоју и сазревању ефекторских функција NK ћелија.

miRNA-155 има значајну улогу у активацији NK ћелија и продукцији IFN γ . Показано је да у условима хроничне инфекције, у основи смањене функције NK ћелија и смањене продукције IFN γ , постоји и чак десет пута снижена експресија miRNA-155 у односу на NK ћелије здравих појединаца (222). Циљни ген за miRNA-155 је *SHIP-1* који супримира продукцију интерферона. Осим тога, *SHIP-1* супримира полимеризацију актина, важног елемента цитоскелета. Када је полимеризација актина инхибирана, мотилитет ћелије је смањен, а самим тим и миграција ћелија. На моделу карцинома дојке је показано да, у условима повећане експресије miRNA-155 је повећана миграција ефекторских NK ћелија у туморску микросредину, а уз то, због утицаја miRNA-155 на продукцију IFN γ , NK ћелије имају и појачану цитотоксичност(223). Доступна литература показује повећана експресија такође утиче на сазревање и повећање броја NK ћелија у току имунског одговора (224). У складу са тим, нађено је да у току хроничних инфекција, када је функција NK ћелија умањена, постоји и смањена експресија miRNA-155(225). У истој истраживачкој студији је показано да повећана експресија miRNA-155 може значајно повећати продукцију других цитокина, као што је TNF α , али механизам није довољно разјашњен (225).

miRNA-146 фамилија микро RNA се састоји од две врсте високо конзервираних микро RNA - miRNA-146a и miRNA-146b. Гени за ове микро RNA се налазе на петом и десетом хромозому код човека (226). За сада се зна да miRNA-146b има значајну улогу у настајању малигнитета, посебно тироидног палипарног карцинома и карцинома желуца. Сматра се да стимулише епително-мезенхималну транзицију и позитивно корелира са агресивношћу малигнитета (227, 228).

miRNA-146a има, с друге стране, важну улогу у регулисању и урођеног и стеченог имунског одговора, анти-туморској и антивирусној имуности (229,230). Доступна литература показује да miRNA-146a смањује значајно стварање IFN γ у NK ћелијама. Међутим, у условима стимулације NK ћелија успомоћ интерлеукина 12 (IL-12) и/или интерлеукина 18 (IL-18) постоји минимално смањење продукције IFN γ , али мањег степена него без стимулације (231). Иако постоји доста података да miRNA-146a значајно смањује продукцију IFN γ , циљни ген на који miRNA-146a утиче није *IFNG*. Показано је да miRNA-146a смањује заступљеност фосфорилисаног, активiranог NF κ B, а да

значајније не утиче на NFκB у NK ћелија у стању мировања. miRNA-146a директно смањује експресију TRAF6 (енгл. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) и IRAK1 (енгл. *IL-1R-associated kinase -1*) који су важни молекули у преносу NFκB сигналног пута (231, 232). Резултати других експерименталних студија указују да miRNA-146a може смањивати експресију STAT-1 (енгл. *Signal transducer and activator of transcription 1*) који је заједнички сигнални молекул за више активационих сигналних путева у NK ћелијама (233). Са обзиром да miRNA-146a смањује активационе сигнале у NK ћелијама, испитивана је и њен утицај на експресију активационих рецептора у NK ћелијама као што су CD16, NKG2D, NKp46. Нађено је да miRNA-146a не утиче значајно на експресију активационих рецептора NK ћелија (234). Још увек није тачно утврђено који сигнали могу индуковати повећање експресије miRNA-146a у NK ћелијама. По неким ауторима, активациони IL-18 и IL-12 могу стимулисати повећање miRNA-146a у NK ћелијама, и на тај начин ограничити потенцијално прејак имунски одговор (234). Резултати других студија, са друге стране, указују да имуносупресивни IL-10 и TGFβ такође индукују повећање експресије miRNA-146a која додатно супримира активационе сигнале (234).

2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај синергистички ефекат блокаде IL33/ST2 и PDL1/PD1 сигналног пута на раст и развој мишјег карцинома дојке.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

Утврдити учинак анти – PD1 и блокаде IL33/ST2 сигналног пута терапије на:

1. Раст примарног тумора дојке и тумора колона;
2. Ћелијски састав слезине и субпопулације тумор-инфилтришућих леукоцита код мишева пре и после индукције тумора;
3. Фенотипске и функционалне карактеристике и цитотоксички капацитет NK ћелија и NKT лимфоцита, пре и после индукције тумора;
4. Фенотипске и функционалне карактеристике Tregs, MDSC лимфоцита, пре и после индукције тумора;
5. Транскрипциону активност и епигенетске промене NK ћелија, пре и после индукције тумора.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Давање анти PD-1 антитела уз блокаду IL33/ST2 сигналног пута успорава појаву и раст и тумора дојке и тумора колона;
2. Давање анти PD-1 антитела уз блокаду IL33/ST2 мења ћелијски састав слезине и субпопулације тумор-инфилтришућих леукоцита;
3. Давање анти PD-1 антитела уз блокаду IL33/ST2 мења транскрипциону активност и епигенетске карактеристике NK ћелија.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ова истраживачка студија је спроведена у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као и на Институту за медицинска истраживања Медицинског факултета Војномедицинске Академије у Београду, у периоду од 2018. до 2020. године.

Истраживање је одобрила надлежна Етичка комисија за добробит лабораторијских животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број одобрења: 01-12188 од 26.10.2018.)

3.1. Експерименталне животиње

За истраживачку студију смо користили сингене мишеве BALB/c (енгл. *wild type*, *WT*) и BALB/C *il1rl1* нокаут (енгл. *ST2 knockout*, *ST2^{-/-}*), мушког и женског пола, старости од 6 до 8 недеља. Животиње које су укључене у студију су најпре усклађене према полу, старости и телесној маси између свих експерименталних група. Мишеви су током експеримената били у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у складу са стандардним лабораторијским условима (22 ± 2 °C, релативна влажност $51 \pm 5\%$ и 12-часовни циклус светлост-тама). Животињама је све време трајања експеримента био доступан извор хране и воде. Експерименталне животиње су подељене у 12 експерименталних група:

- 1) BALB/c мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке;
- 2) BALB/c *ST2^{-/-}* мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке;
- 3) BALB/c мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке и који су третирани анти PD-1 антителом;
- 4) BALB/c *ST2^{-/-}* мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке и који су третирани анти PD-1 антителом;
- 5) BALB/c мишеви мушког пола којима је индукован карцином колона;
- 6) BALB/c *ST2^{-/-}* мишеви мушког пола којима је индукован карцином колона;
- 7) BALB/c мишеви мушког пола којима је индукован карцином колона и који су третирани анти PD-1 антителом;
- 8) BALB/c *ST2^{-/-}* мишеви мушког пола којима је индукован карцином колона и који су третирани анти PD-1 антителом.

- 9) BALB/c мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке
- 10) BALB/c мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке и који су третирани анти PD-1 антителом;
- 11) BALB/c мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке и који су третирани анти IL-33 антителом;
- 12) BALB/c мишеви женског пола којима је индукован карцином дојке и који су третирани анти PD-1 антителом и анти IL-33 антителом;

3.2. Индукција тумора

Слабо имуногене ћелијске линије карцинома дојке (4T1) и карцинома колона (CT26), обе компатибилне са BALB/c генетском подлогом, купљене су од ATCC (енгл. *American Type Culture Collection, ATCC, USA*). Обе ћелијске линије су пре апликације третиране према раније устаљеним правилима (235). За индуковање карцинома колона коришћена је доза од 2×10^3 CT26 ћелија, а за индукцију карцинома дојке је коришћено 5×10^3 4T1 ћелија. Ћелијска доза за индукцију карцинома колона је одређена на основу доступне литературе (236), а ћелијска доза за индукцију карцинома дојке је одређена на основу резултата серије предексперимената који су претходили овој истраживачкој студији. Праћење појаве палпабилног тумора и раста тумора је праћено раније описаним методама (237).

3.3. Давање анти PD-1 антитела

Мишје анти PD-1 антитело је купљено из *BioXcell*-а (број клона: RMP1-14). Антитело је апликовано интраперитонеално BALB/c и BALB/c ST2^{-/-} мишевима трећег, шестог, деветог и једанаестог дана, почевши од дана индукције тумора, у дози од 150 μ g растворених у 150 μ l PBS-а (енгл. *Phosphate-buffered saline*). Мишеви који нису добијали анти PD-1 антитело су истих дана добијали интраперитонеално 150 μ l PBS-а.

3.4. Давање анти IL-33 антитела

Анти IL-33 антитело је купљено из *Adipogen*-а (AG-27B-0013PF-C100). Анти IL-33 антитело је примењивано интраперитонеално BALB/c мишевима, самостално или у комбинацији са анти PD-1 антителом, трећег, шестог, деветог и једанаестог дана, почевши од дана индукције, у дози од 3,6 μ g по мишу, раствореног у 100 μ l PBS-а, као што је раније описано у студији *Liu* и сар. (238) .

3.5. Изолација НК ћелија

Изолација НК ћелија је извођена магнетним колонама са позитивном селекцијом CD49b маркера, по раније описаној процедури (237).

3.6. Тест цитотоксичности

За одређивање цитотоксичког потенцијала НК ћелија, користили смо Roche xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) DP (Dual Plate) Instrument (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) према претходно утврђеном протоколу (239).

3.7. Испитивање популација ћелија у слезини и туморској микросредини-проточна цитометрија

Једноћелијске суспензије ћелија слезине су добијене успомоћ механичке дисперзије, док су једноћелијске суспензије примарних тумора добијене процесом ензимског разлагања, као што је раније описано (237). У истраживању су коришћена анти-мишја антитела обележена флуорохромом која су специфична за CD4 (GK1 5), CD25 (M-A251), CD11b (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5), CD11c (14-0114-82), CD86 (FUN-1), CD45 (30-F11), CD49 (9F10), CD3 (PC3 188A), PD-1 (EH12.1), Anexin V (A35111), пропидијум јодид (7-AAD), KLRG-1 (17-5893-82), NKp46 (461-G1), NKG2D (14-5878-82) и изотипске контроле (BD Pharmingen, NJ/Invitrogen, Carlsbad, CA). За интрацелуларно бојење, које је изведено према већ установљеном протоколу (237), коришћена су анти-мишја антитела специфична за перфорин (eBio0MAK-D), грамзим (16g6; NGZB), CD107a (1D4B), Foxp3 (MF23), IFN- γ (XMG1.2), IL-10 (JES5-16E3), IL-17 (C15.6), TGF- β (141231), TNF α (MP6-XT22); STAT-3 (LUVNKLA), Ki67 (SolA15), IDO (12-9477-42) и iNOS (CXNFT) (BD Pharmingen/ BioLegend/eBiosciences). За детекцију транскрипционог фактора NF κ B коришћено је зечје анти-NF- κ B p65 антитело (Abscam), а потом је примењено секундарно анти- зечје антитело конјуговано FITC флуорохромом. Проточном цитометријом је анализирано од 20.000 до 100.000 ћелија по узорку. Проточна цитометрија је извођена на *FACSCalibur Flow Cytometer* (BD Biosciences, San Jose, CA) а подаци су анализирани користећи софтвер FlowJo (Tree Star).

3.8. Инхибиција индоламин оксидазе(IDO) и индуцибилне нитритне оксидазе(iNOS) in vitro

Свеже изоловани спленцити из BALB/c ST2^{-/-} мишева су инкубирани 24 часа у комплетном медијуму, и подељени и следеће групе:

- 1) група којој је додато 2,5 µg/ml анти PD-1 антитела;
- 2) група којој је додато 1mM 1-метилтриптофана, (1-МТ, Sigma-Aldrich), инхибитора активности IDO-а и 1mM NG-монометил-L-аргинина (LNMMA, Sigma-Aldrich); инхибитора активности iNOS-а;
- 3) група којој је додато 2,5 µg/ml анти PD-1 антитела, 1mM 1-метилтриптофана и 1mM NG-монометил-L-аргинина;
- 4) контролна група која је садржала само комплетни медијум и спленците.

Након инкубације и адекватне припреме, ћелије су, успомоћ флоурохромом обележених специфичних антитела анализирани проточном цитометријом.

3.9. Анализа цитотоксичности НК ћелија in vitro

Свеже НК ћелије су изоловане из здравих BALB/c и BALB/c ST2^{-/-} мишева према већ утврђеном протоколу. НК ћелије су најпре инкубирани са анти PD-1 антителом (10 µg/ml) 1 сат пре ко-културе са циљним, 4Т1 ћелијама. Контролну групу су чиниле НК ћелије изоловане из BALB/c ST2^{-/-} у ко-култури са комплетним медијумом са истим временом инкубације. Тест цитотоксичности је извођен на НК ћелијама BALB/c мишева и НК ћелијама BALB/c ST2^{-/-} мишева ради поређења. Потом су НК ћелије BALB/c ST2^{-/-} мишева додатно третиране са 2.5 µg/ml конканавалина (ConA; Sigma, St. Louis/ USA) у трајању од 2 часа, да би се инхибирао перфорин/грамзим (унутрашњи) пут апоптозе, док су циљне ћелије, 4Т1, инкубирани са 10 µM инхибитора каспазе 8 у трајању од 1 сат, пре додавања НК ћелија, као што је већ раније показано (240). Ћелијски индекс је праћен наредних 72 сата. Подаци су анализирани коришћењем RTCA софтвера, верзија 1.2 (ACEA Biosciences).

3.10. Анализа серумског нивоа цитокина

Нивои IFN- γ , IL-4 и IL-10 су мерени у серуму експерименталних животиња користећи специфичне ELISA китове, према упутствима произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (241).

3.11. Анализа експресије miRNA у NK ћелијама

За анализу експресије miRNA као узорак смо користили NK ћелије изоловане BALB/c мишева и NK ћелије изоловане из BALB/c ST2^{-/-} мишева које су инкубиране са анти PD-1 антителом (10 μ g/ml) у трајању од 1 сат.

miRNA	RNA секвенца
miRNA-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miRNA-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
miRNA-155	CUGUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGUUUUGGCCUCUGACUGACUCCUA CCUGUUAGCAUUAACAG

Табела 2. RNA секвенце испитиване у студији

Узорци су садржали 10^4 – 10^5 ћелија. Најпре је изолована укупна количина RNA користећи *Mirvana miRNA Isolation Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Узорак се најпре разлаже у пуферу за лизу који је који је доступан у киту. Потом се у узорке додаје раствор фенолне киселине и хлороформа који служи за грубо пречишћавање узорка и уклања DNA. Како у узорку остаје само укупна RNA, узорци се потом филтрирају преко филтера са стакленим нитима. Када се изолује укупна количина RNA, у узорке се додаје 100% етанол како би узорци садржали 25% етанола. Потом се наставља наставља поступак филтрирања преко стаклених нити који садрже имобилизујући кетриц за велике RNA секвенце. Филтер се испере више пута, и на тај начин кратке секвенце остају у филтрату, а велике секвенце RNA остају у филтеру. Потом се у филтрат додаје 100% етанол како би се подигла концентрација етанола на 55%, понавља се поступак филтрирања како би се кратке секвенце RNA имобилисале. Филтер се испира ниско-јонским раствором. Тако

добијени филтрат представља укупну количину кратких секвенци RNA. Потом следи поступак детекције RNA коришћењем qRT-PCR уз додавање прајмера за испитиване секвенце, по већ устаљеном протоколу (242).

3.12. Статистичка обрада података

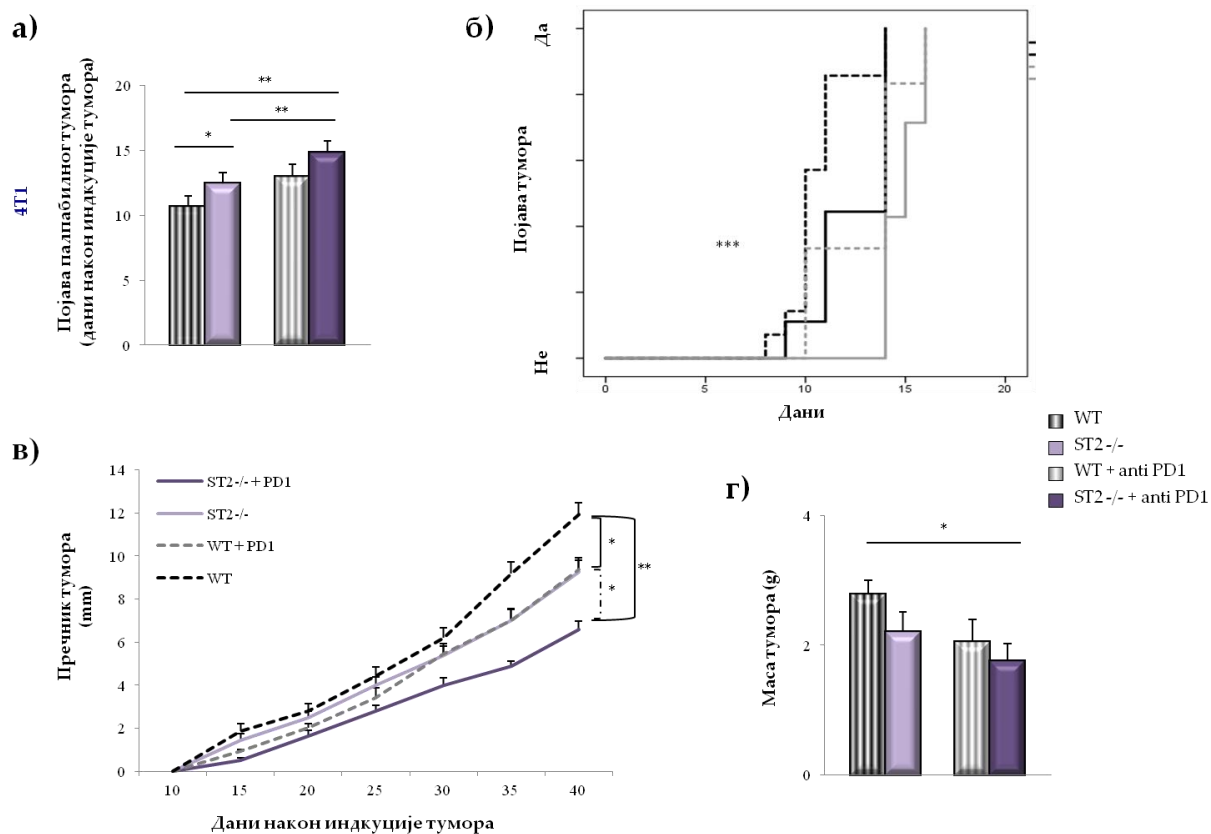
Сви добијени подаци су статистички обрађивани у 23.-ој софтверској верзије SPSS-а, коришћењем *Student's t test*, *Mann-Whitney U test*, *ANOVA* или *Kruskal–Wallis* тестова по потреби. Разлика у појави примарног тумора је анализирана успомоћ Калпан-Мајер кривуље и *log-rank* анализом.

4. РЕЗУЛТАТИ

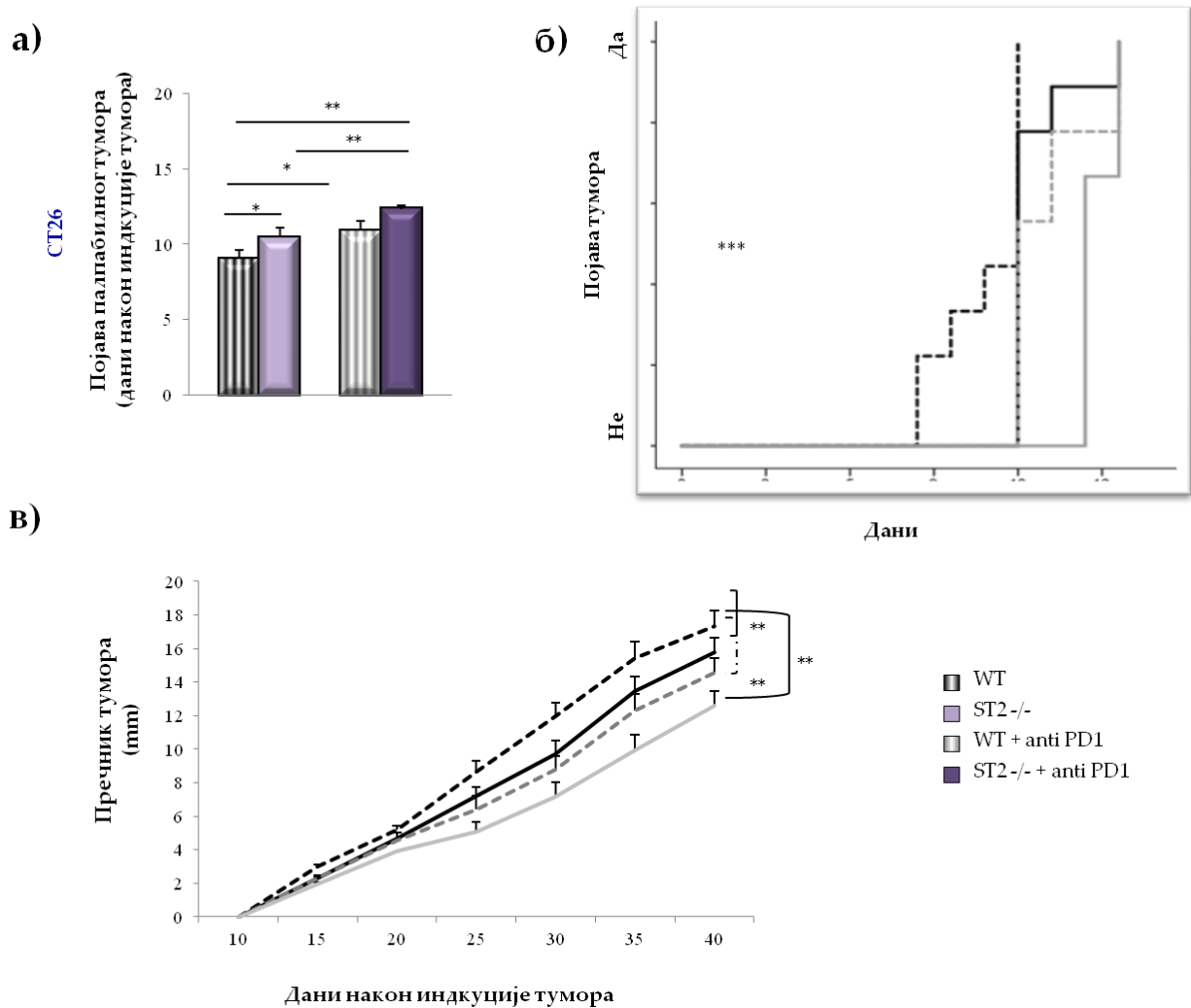
4.1. Блокада PDL/PD1 и IL33/ST2 осовина одлаже појаву и успорава раст карцинома дојке и колона

Након индукције 4T1/CT26 тумора, појава палпабилног тумора је праћена свакодневно. Појава палпабилног карцинома дојке значајно је одложена код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 1а). Разлика у појави тумора је илустрована Каплан-Мајлер графиконом (Фигура 1б). Након појаве тумора, мерили смо пречник примарног тумора кроз време. Пречник тумора је био значајно мањи код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 1в). Након жртвовања мишева, мерили смо и масе 4T1 тумора. Туморска маса је била значајно мања код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 1г).

Појава палпабилног карцинома колона је такође значајно одложена код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 2а). Разлика у појави тумора је илустрована Каплан-Мајлер графиконом ($p < 0.05$; Фигура 2б). Након појаве тумора, мерили смо пречник кроз време. Пречник тумора је био значајно мањи код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 2в).



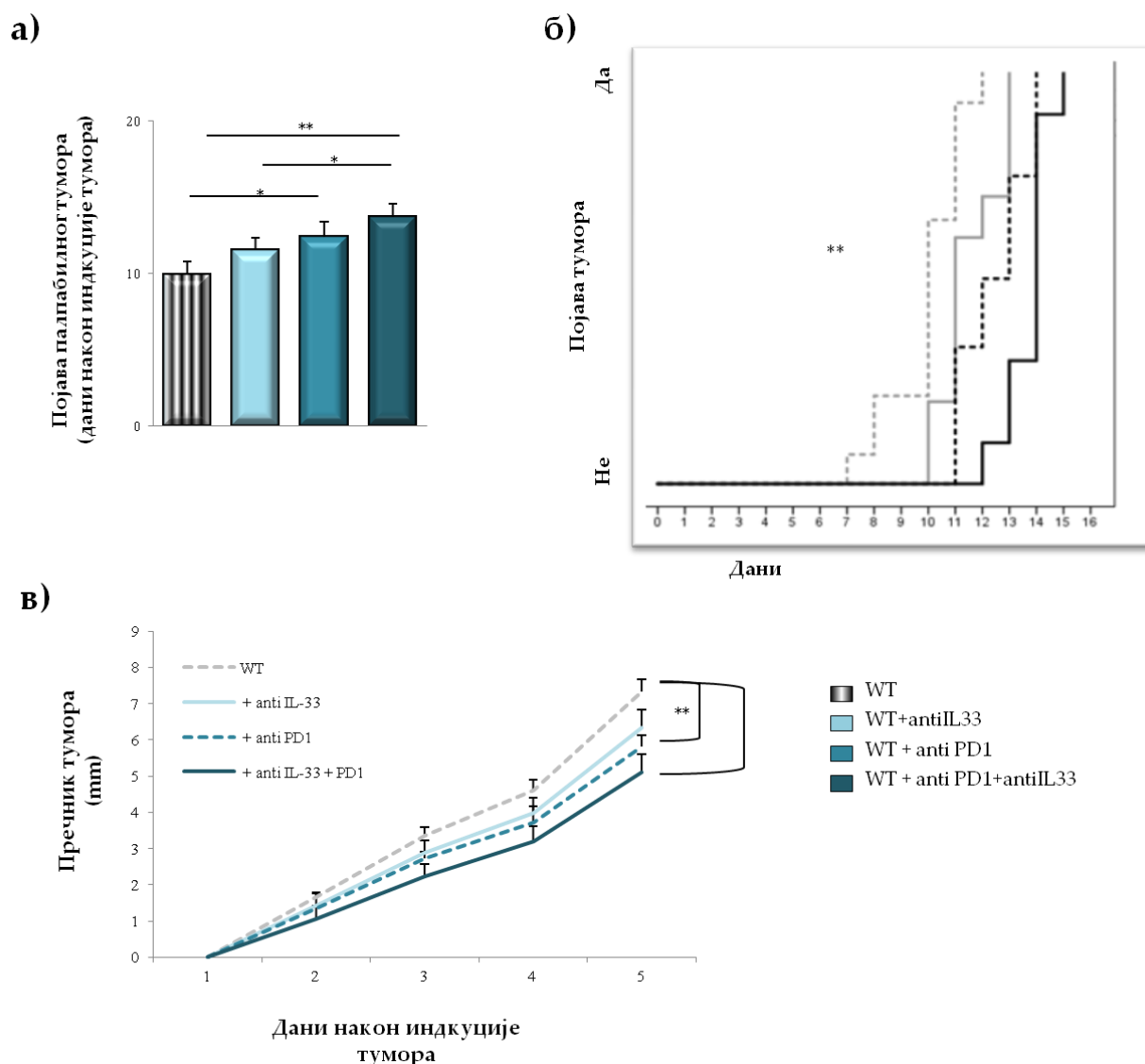
Фигура 1. Каснија појава примарног тумора и успорен раст 4T1 тумора код ST2^{-/-} мишева третираних анти-PD-1 антителом. BALB/c и BALB/c ST2^{-/-} мишевима је индукован 4T1 тумор (5×10^3 ћелија). Графикон а приказује значајно каснију појаву палпабилног тумора код ST2^{-/-} мишева који су третиран анти-PD-1 антителом. Исти феномен је илустрован и Каплан-Мајер кривуљом (б). Графикон в илуструје пречник тумора кроз време, са статистички значајно мањим пречником тумора код ST2^{-/-} мишева који су третиран анти-PD-1 антителом. Графиконг приказује статистички значајно мању масу тумора код ST2^{-/-} мишева који су третиран анти-PD-1 антителом. Резултати су приказани као аритметичке средине из два засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Man-Whitney тестом.



Фигура 2. Каснија појава примарног тумора и успорен раст СТ26 тумора код $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти-PD-1 антителом. BALB/c и BALB/c $ST2^{-/-}$ мишевима је индукован СТ26 тумор (2×10^3 ћелија). Графикон а приказује значајно каснију појаву палпабилног тумора код $ST2^{-/-}$ мишева који су третирани анти-PD-1 антителом. Исти феномен је илустрован и Каплан-Мајер кривуљом (б). Графикон в илуструје пречник тумора кроз време, са статистички значајно мањим пречником тумора код $ST2^{-/-}$ мишева који су третирани анти-PD-1 антителом. Резултати су приказани као аритметичке средине \pm SEM из два засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана *Man-Whitney* тестом.

У наставку истраживања тестиран је ефекат истовремене блокаде сигналних питева помоћу моноклонских антитела, *in vivo*. Истовремена примена анти-PD-1 и анти-IL33 антитела је значајно одложила појаву 4T1 тумора ($p < 0.05$; Фигура 3а). Каснија појава 4T1 тумора је илустрована Каплан-Мајер графиконом ($p < 0.05$; Фигура 3б). Пречници 4T1 тумора су били значајно мањи у експерименталној групи у којој су примењивана симултано анти-PD-1 и анти-IL33 антитела у поређењу са BALB/с мишевима, BALB/с мишевима на анти-PD-1 и BALB/с мишевима који су добијали анти-IL33 антитело ($p < 0.01$; Fig 3в).

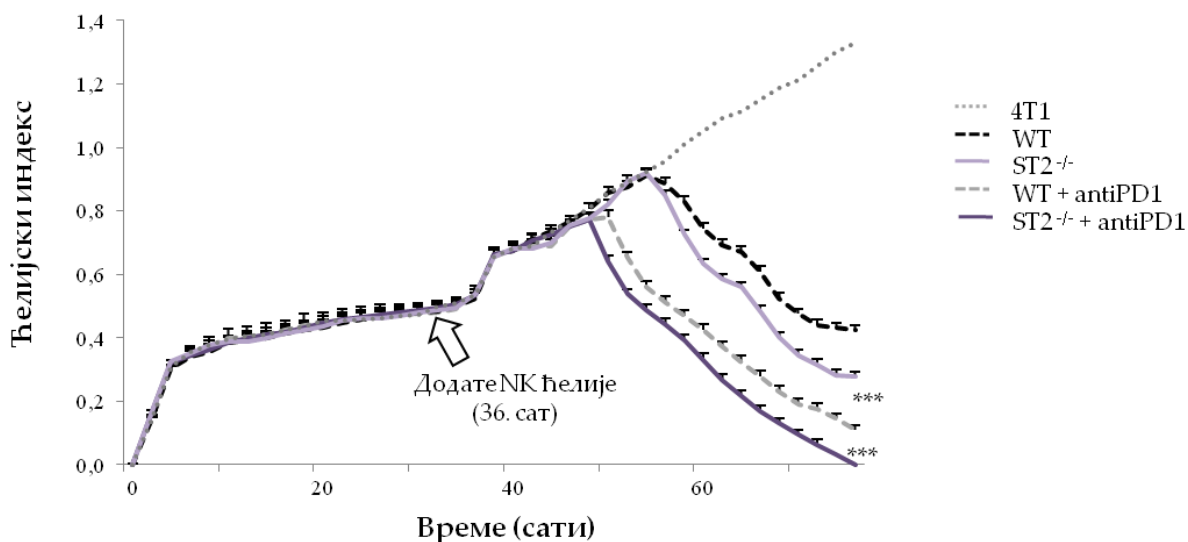
Како је двојна блокада имала већи утицај на карцином дојке, сва даља испитивања смо спровели на 4T1 ћелијској линији, а за IL33/ST2 блокаду су коришћени ST2^{-/-} мишеви.



Фигура 3. Каснија појава 4Т1 тумора код мишева који су третирани анти-IL-33 и анти-PD-1 антителом. BALB/c мишевима је индукован 4Т1 тумор (5×10^3 ћелија) Графикон а илустрuje статистички значајно каснију појаву примарног тумора код мишева који су симултано третирани анти-IL-33 и анти-PD-1 антителом. Исти феномен је илустрован Каплан-Мајер кривуљом (б). Графикон в илустрuje значајно мању средњу вредност пречника тумора код мишева који су третирани анти-IL-33 и анти-PD-1 антителом. Резултати су приказани као аритметичке средине \pm SEM из два засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана *Student's T* тестом.

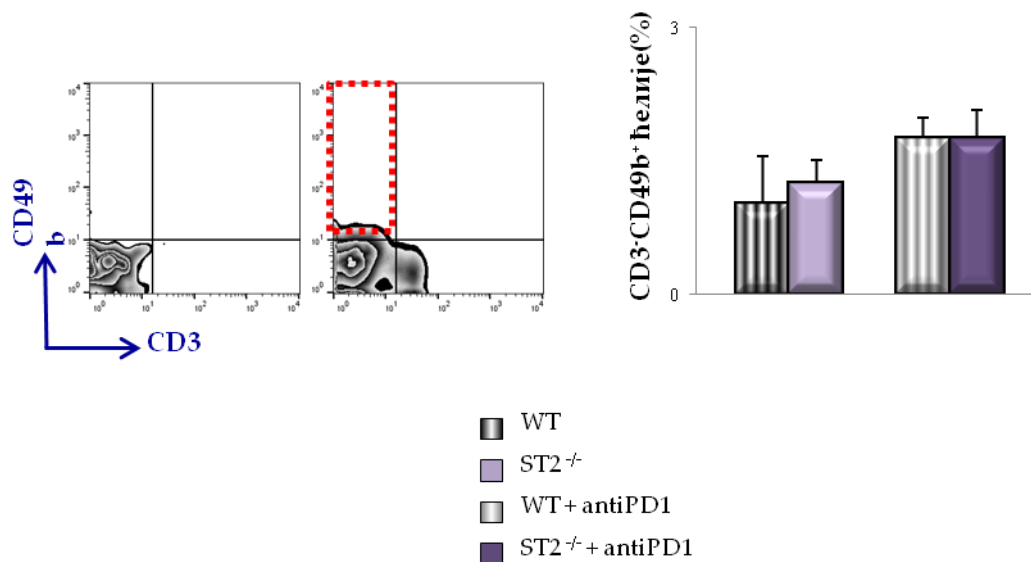
4.2. Примена анти-PD1 антитела појачава цитотоксичност и мења фенотип NK ћелија изолованих из слезине ST2^{-/-} мишева

У анализи антитуморске имуности најпре смо истражили цитотоксичност NK ћелија изолованих из слезина раније дефинисаних група мишева према 4T1 ћелијама. NK ћелије изоловане из слезине BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији су имале највећи цитотоксички потенцијал у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.001; Фигура 4).



Фигура 4. Анти- PD-1 терапија значајно повећава цитотоксичност NK ћелија изолованих из слезине ST2^{-/-} мишева. NK ћелије су изоловане магнетном сепарацијом из слезина мишева свих експерименталних група. Цитотоксичка активност је мерена xCELLigence системом, праћењем ћелијског индекса кроз 72 сата. Однос таргет : ефектор је био 1: 10. Цитотоксичност је значајно већа код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на остале експерименталне групе. Резултати су приказани као средња вредност ± SEM из два засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

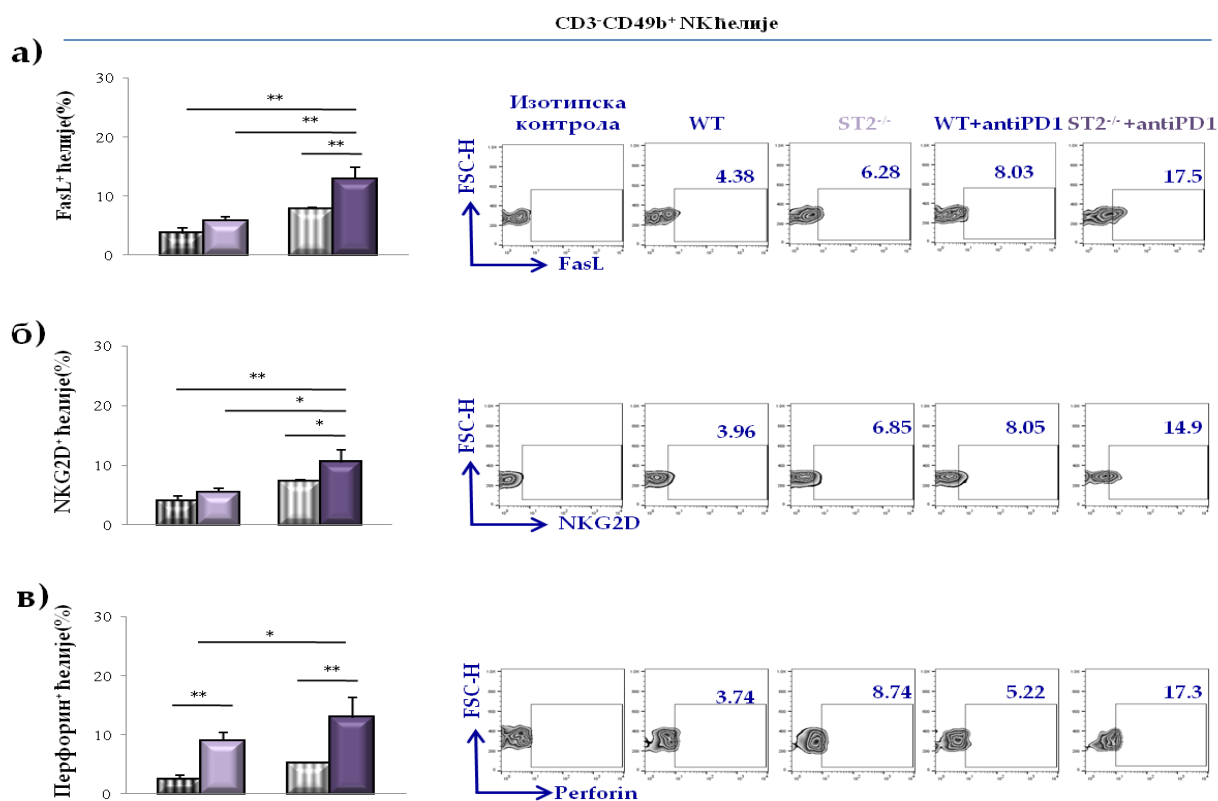
Затим смо анализирали функционални фенотип НК ћелија слезине. Процент $CD3^+CD49^+$ НК ћелија у слезини не разликује се значајно између експерименталних група (Фигура 5).



Фигура 5. Анти- PD-1 терапија не мења процентуалну заступљеност НК ћелија у слезини $ST2^{-/-}$ мишева. Примена анти-PD-1 терапије није значајно променила заступљеност $CD3^+CD49^+$ НК ћелија слезине између експерименталних група. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM из два засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

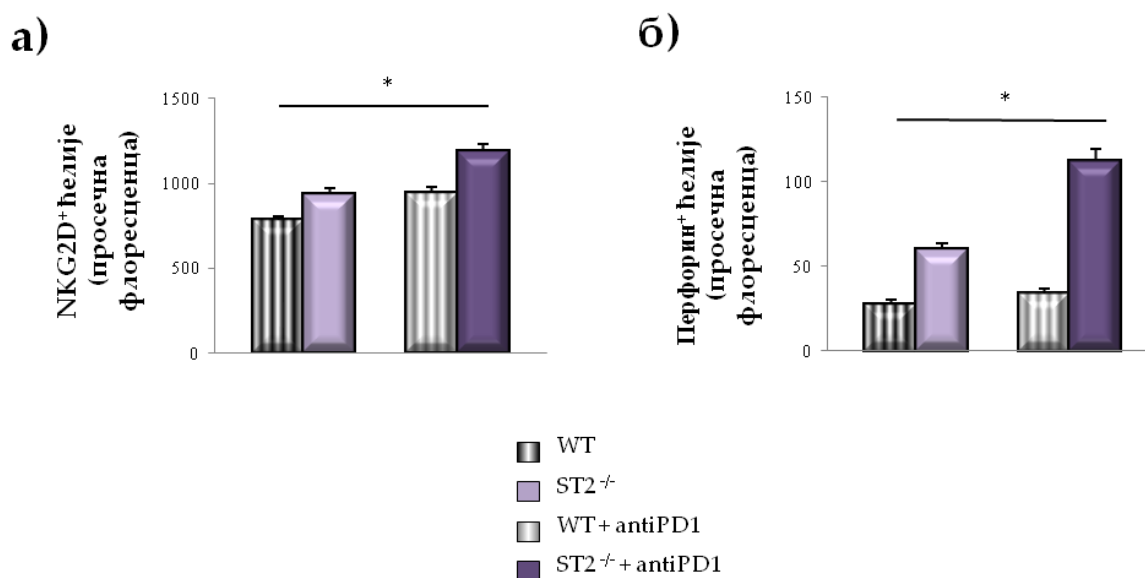
Процентуална заступљеност $FasL^+ CD3^+CD49^+$ НК ћелија слезине BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева који су добијали анти-PD1 терапију је значајно већа у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 6а). Није било значајне разлике између BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије. Процент $NKG2D^+ CD3^+CD49^+$ НК ћелија је такође био значајно већи у слезини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 6б). Процентуални удео $CD3^+CD49^+$ НК ћелија из слезине које експримирају перфорин је значајно већи у BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c

мишевима на анти-PD-1 терапији и BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 6в). Процент $CD3^+CD49b^+$ Perforin⁺ НК ћелија је значајно већи и код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p = 0.01$; Фигура 6б).



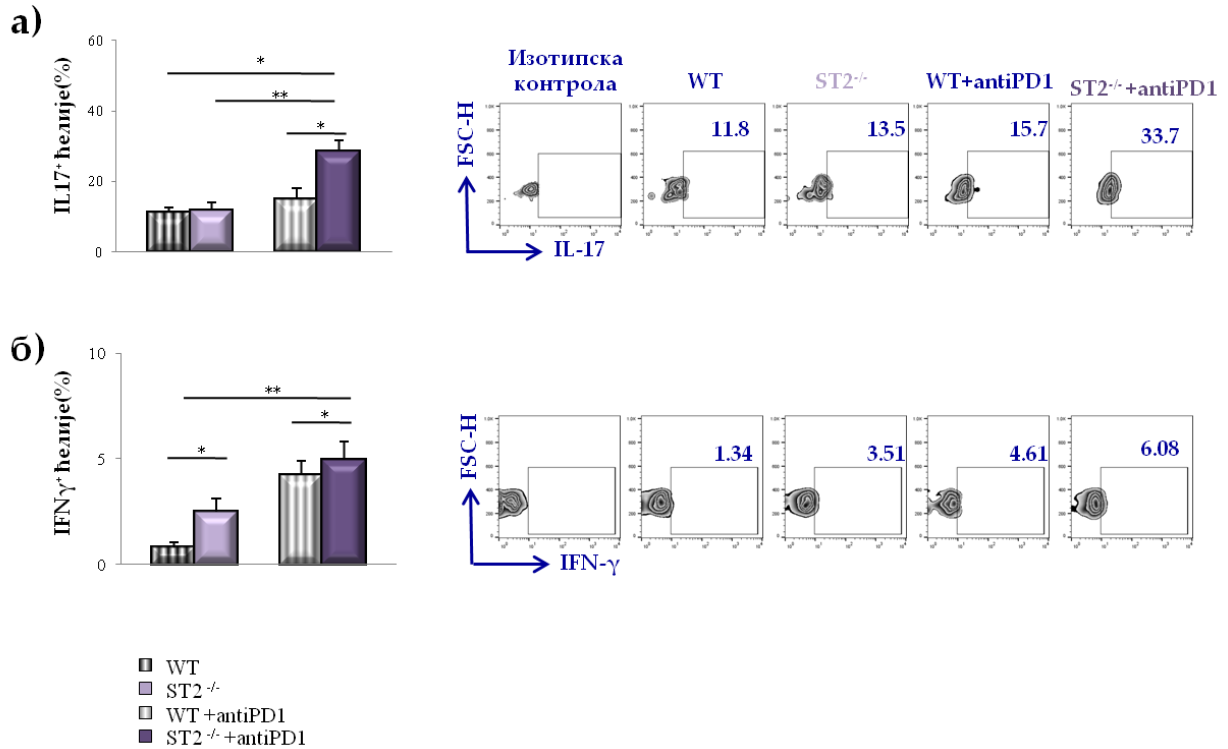
Фигура 6. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност FasL⁺, NKG2D⁺ и перфорин⁺ НК ћелија у слезини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} + анти- PD-1 третирани мишеви имају значајно већи проценат FasL⁺, NKG2D⁺ и перфорин⁺CD3⁺CD49b⁺ НК ћелија у односу на све остале експерименталне групе (а, б, в). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови FasL⁺, NKG2D⁺ и перфорин⁺ CD3⁺CD49b⁺ НК ћелија. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Значајна разлика у експресији NKG2D и перфорина у $CD3^+CD49b^+$ НК ћелијама је приказана и просечном флуоресценцом по ћелији ($p < 0.05$; Фигура 6а,б).



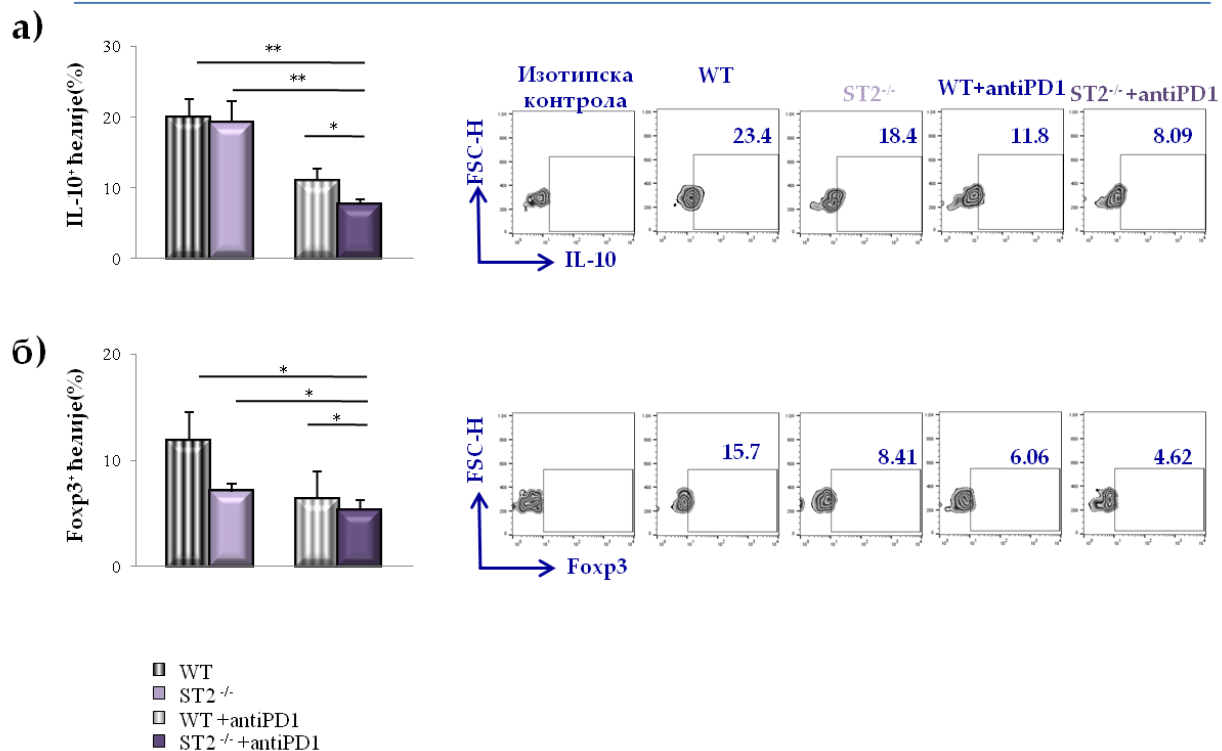
Фигура 7. Вредности просечне флуоресценце за NKG2D и перфорин у CD3⁺CD49b⁺ NK ћелијама слезине. Графикони а и б приказују значајно веће вредности просечне флуоресценце за NKG2D и перфорин код NK ћелија BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти PD-1 терапији. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Процент заступљености CD3⁺CD49⁺ NK ћелија које продукују IL-17 је био значајно већи у слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 8а). Није било значајне разлике између BALB/c мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије. Процент заступљености IFN- γ ⁺ CD3⁺CD49⁺ NK ћелија значајно је већи у слезини BALB/c мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 8б). Такође, проценат IFN- γ ⁺ CD3⁺CD49⁺ NK ћелија изолованих из слезине BALB/c ST2^{-/-} мишева без терапије је био значајно већи у поређењу са BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 8б).



Фигура 8. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност IL-17⁺ и IFN- γ ⁺ NK ћелија у слезини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већи проценат заступљености IL-17⁺ NK ћелија у односу на све остале експерименталне групе (a). Процентуална заступљеност IFN γ ⁺ NK ћелија је највећа код ST2^{-/-} мишева који су добијали анти- PD-1 антитела, са значајном разликом у поређењу на BALB/c мишеве који су добијали анти- PD-1 антитело, као и у односу на BALB/c мишеве без терапије. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови IL-17⁺ и IFN γ ⁺CD3⁺CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

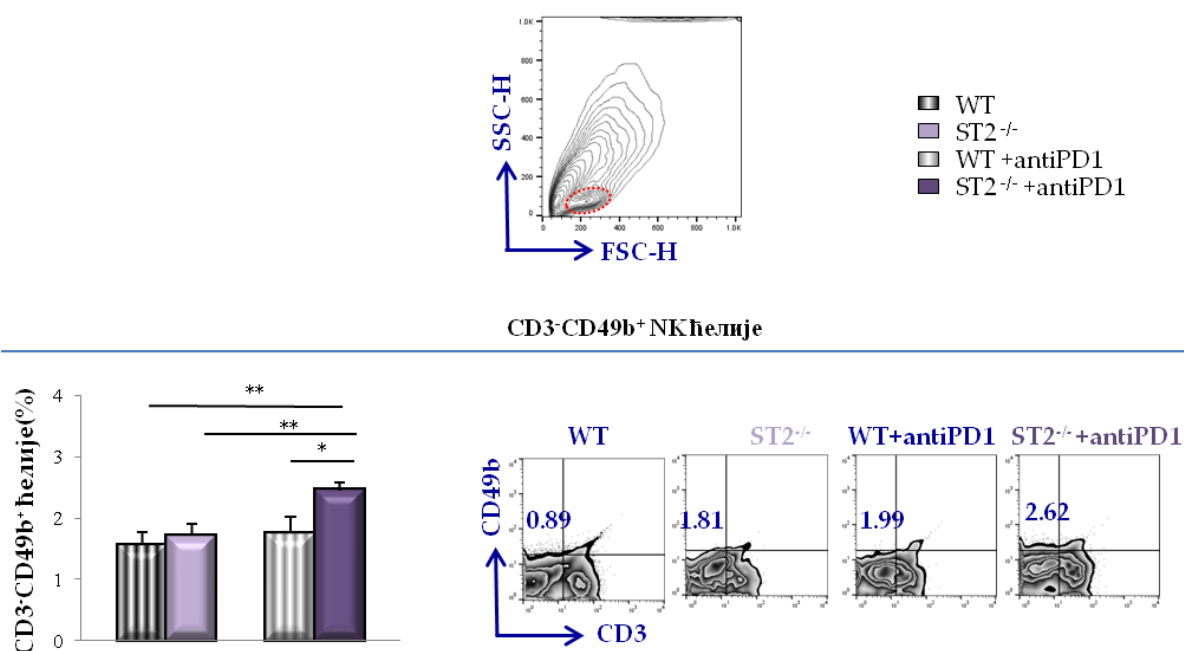
Процент заступљености $CD3^+CD49^+$ НК ћелија које продукују IL-10 је значајно мањи у слезини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 9а). Није било значајне разлике између BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији, BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева без терапије и BALB/c мишеве без терапије (Фигура 9а). Процент $FoxP3^+$ $CD3^+CD49^+$ НК ћелија је био значајно мањи у слезини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 9б). Није било значајне разлике између BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији, BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева без терапије и BALB/c мишеве без терапије (Фигура 9б).



Фигура 9. Анти- PD-1 терапија смањује заступљеност IL-10⁺ и Foxp3⁺ NK ћелија у слезини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно мањи проценат заступљености IL-10⁺ и Foxp3⁺ NK ћелија у односу на све остале експерименталне групе (а, б). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови IL-10⁺ и Foxp3⁺ CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

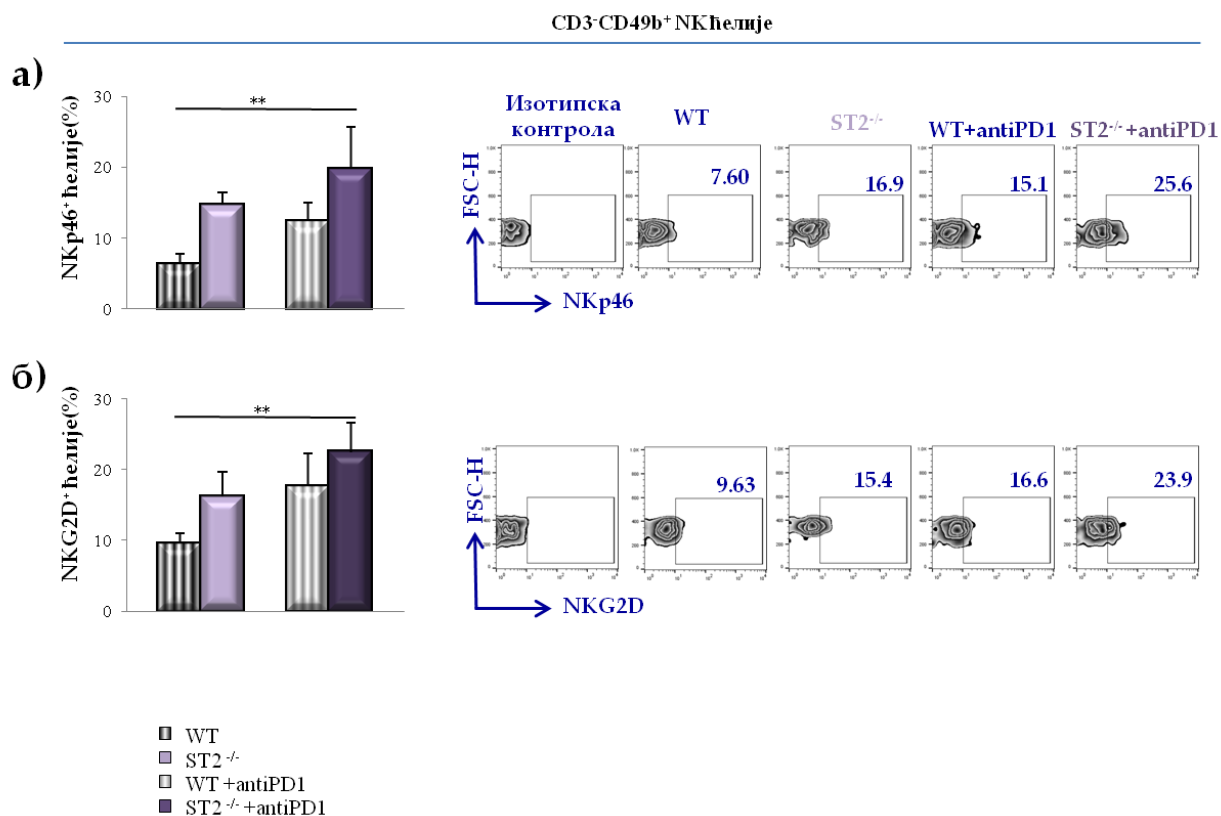
4.3. Примена анти-PD1 антитела појачава акумулацију и значајно мења фенотип NK ћелија у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева

Процент CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија је био значајно већи у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 10a). Није било значајне разлике између BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији, BALB/c ST2^{-/-} мишева без терапије и BALB/c мишеве без терапије (Фигура 10a).



Фигура 10. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти - PD-1 антитела имају значајно већу заступљеност CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија у односу на све остале експерименталне групе (a). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

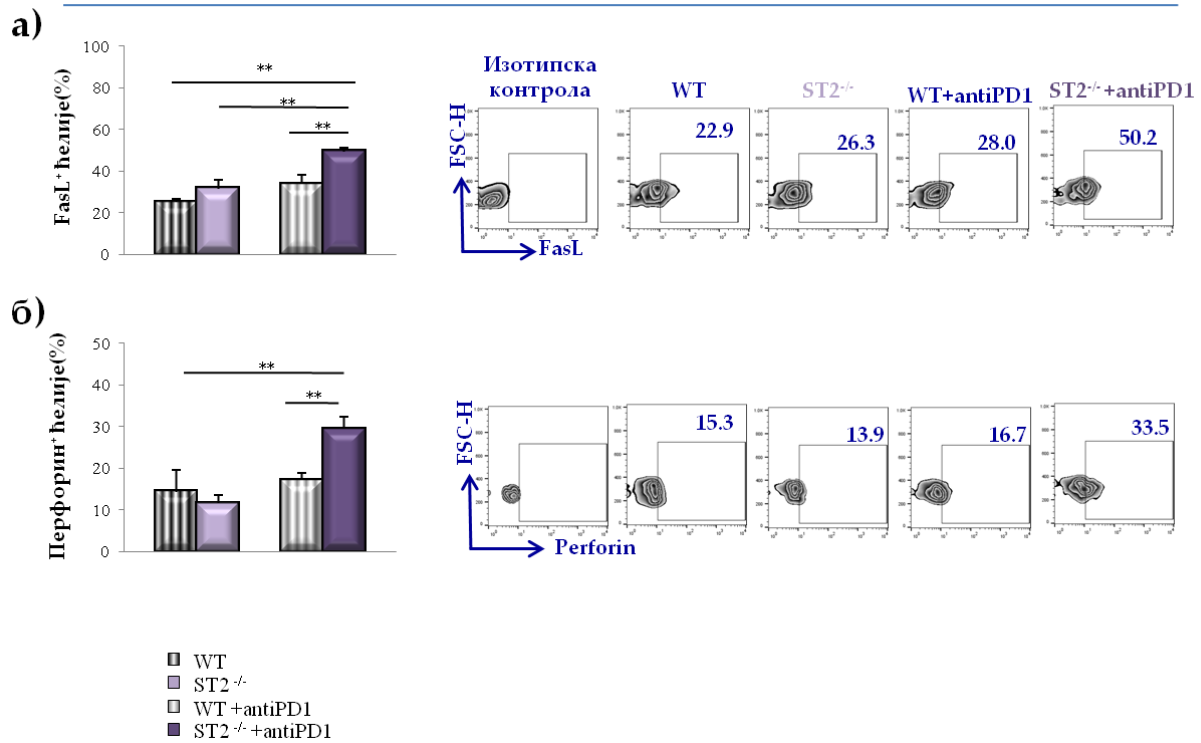
Заступљеност $CD3^+CD49b^+$ НК ћелија у туморској микросредини које експримирају НКр46 и NKG2D молекуле је била већа у BALB/c $ST2^{-/-}$ мишевима који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије, али је достигла статистичку значајност само у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 11).



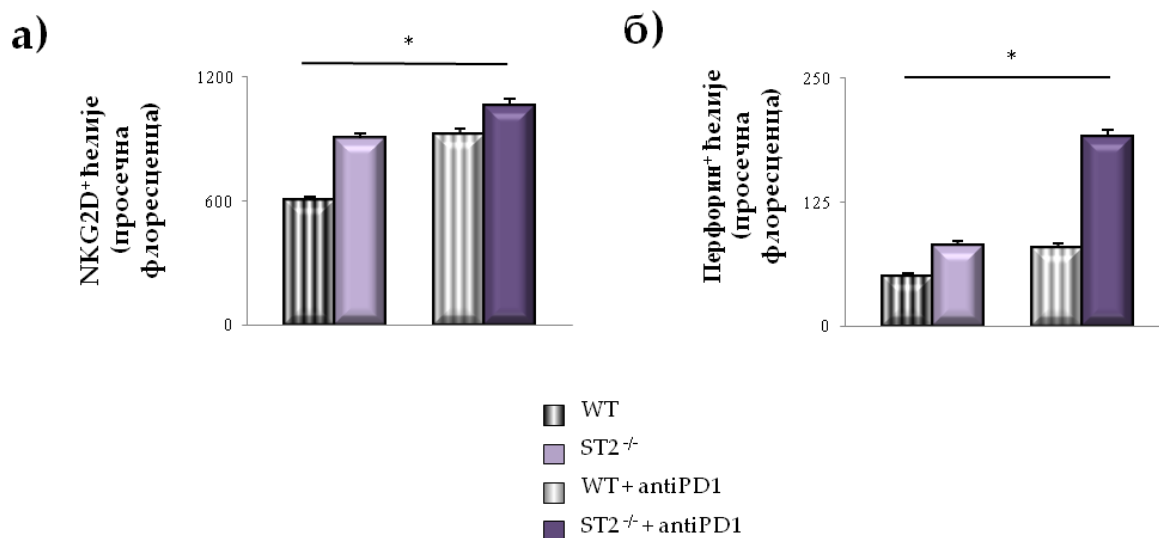
Фигура 11. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност НКр46⁺ и NKG2D⁺ НК ћелија у туморској средини $ST2^{-/-}$ мишева. BALB/c $ST2^{-/-}$ мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већи проценат заступљености НКр46⁺ и NKG2D⁺НК ћелија у односу на све остале експерименталне групе. (а, б). Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови FasL⁺и NKG2D⁺ и CD3⁺CD49b⁺НК ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Процентуална заступљеност CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија које експримирају FasL је била значајно већа у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 12а). Интрацелуларно бојење је показало да је удео CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија које експримирају перфорин био значајно већи у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 12б). Није било значајне разлике између BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији, BALB/c ST2^{-/-} мишева без терапије и BALB/c мишеве без терапије (Фигура 12б).

Значајност разлике у експресији NKG2D и перфорина у CD3⁻CD49b⁺ NK ћелијама туморске микросредине је приказана и вредностима просечне флоуресценце (p<0.05; Фигура 13).

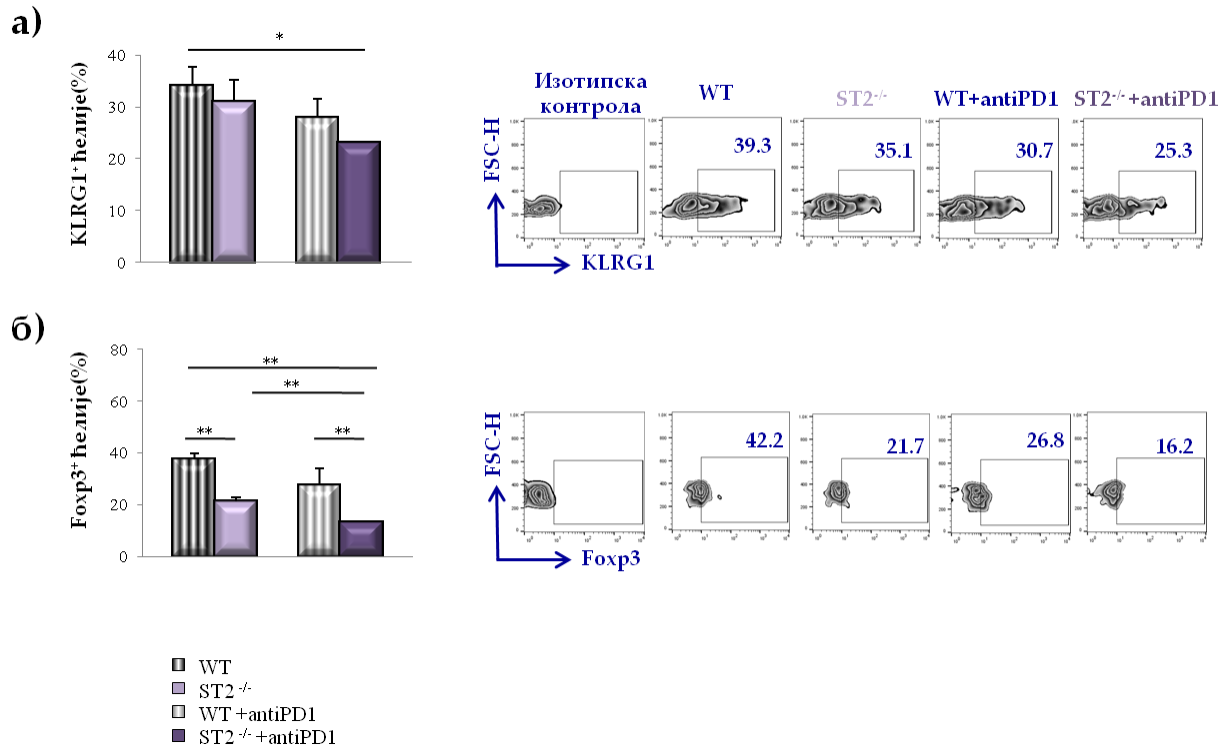


Фигура 12. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност FasL⁺ и перфорин⁺ NK ћелија у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већи проценат заступљености FasL⁺ NK ћелија у односу на све остале експерименталне групе (а). Процентуална заступљеност перфорин⁺ NK ћелија је такође највећа код ST2^{-/-} мишева који су добијали анти- PD-1 антитела, са значајном разликом у односу на BALB/c мишеве без терапије(б). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови FasL⁺ и перфорин⁺ CD3⁺CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.



Фигура 13. Вредности просечне флуоресценце за NKG2D и перфорин у CD3⁺CD49b⁺ NK ћелијама слезине. Графикони а и б приказују значајно веће вредности просечне флуоресценце за NKG2D и перфорин код NK ћелија BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти PD-1 терапији. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Експресија KLRG1 молекула на CD3⁺CD49b⁺ NK ћелијама је била најнижа у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије, али је достигла статистичку значајност само у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 14а). Процентуална заступљеност FoxP3⁺ CD3⁺CD49b⁺ NK ћелија је била значајно мања у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 14б). Такође, процентуална заступљеност FoxP3⁺ CD3⁺CD49b⁺ NK ћелија је била значајно мања код BALB/c ST2^{-/-} мишева без терапија у односу на BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 14б).



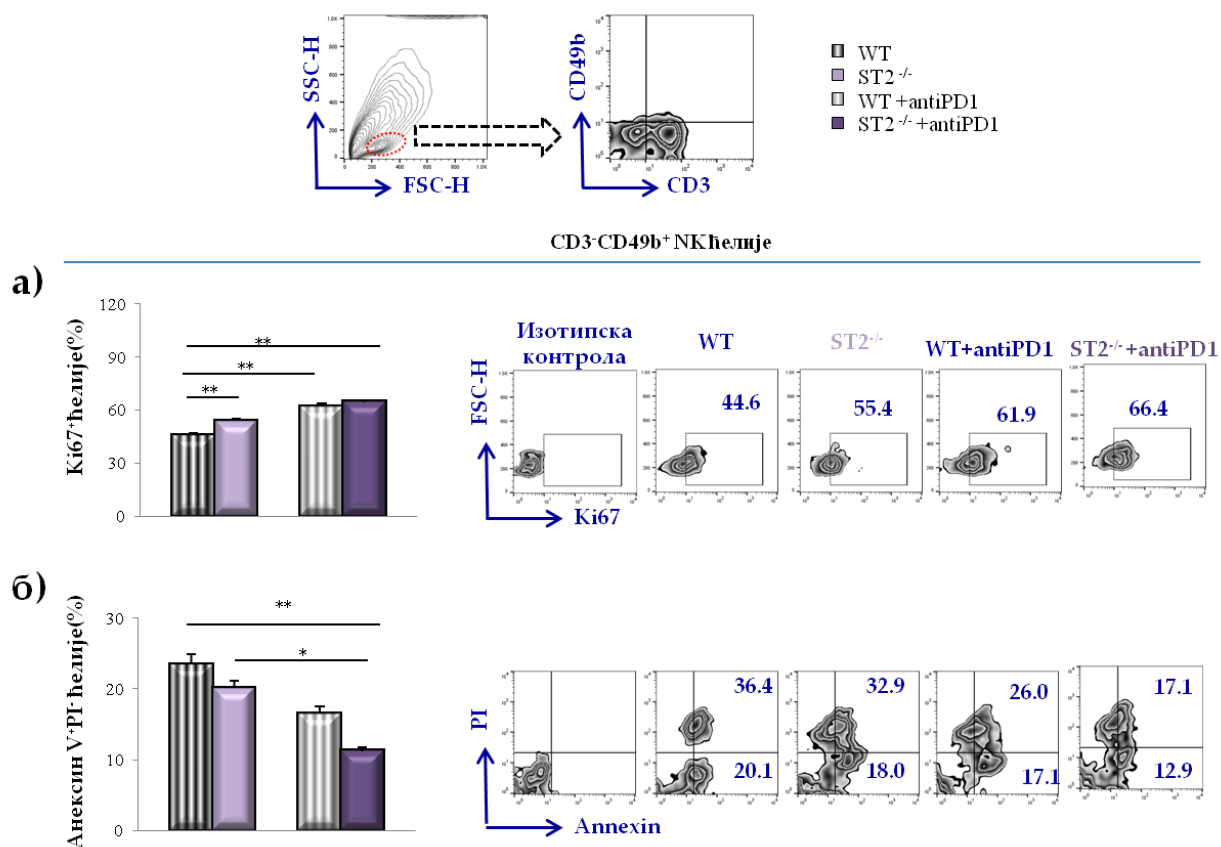
Фигура 14. Анти- PD-1 терапија смањује заступљеност KLRG1⁺ и Foxp3⁺ NK ћелија у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно мањи проценат заступљености KLRG1⁺ NK ћелија у односу на BALB/c мишеве без терапије (а). Процент заступљености Foxp3⁺ NK ћелија је значајно мањи у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти- PD-1 антитела у односу на све остале експерименталне групе (б). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови KLRG1⁺ и Foxp3⁺ CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.4. Интензивнија пролиферација и смањен ниво апоптозе НК ћелија у туморској средини $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији

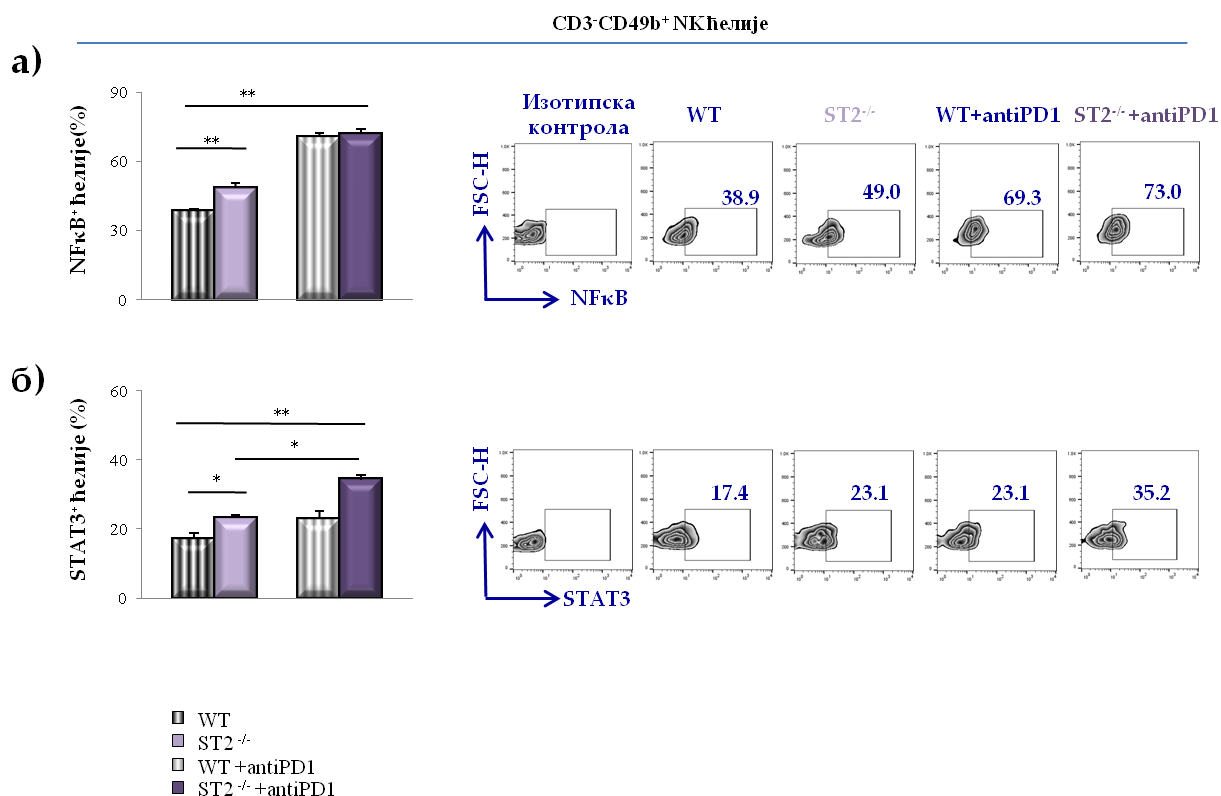
Експресија маркера пролиферације Ki67 у $CD3^{-}CD49b^{+}$ НК ћелијама изолованим из примарног тумора је већа код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији, BALB/c мишева на анти-PD1 терапији, BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева без терапије у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 15а). Експресија је била највећа у туморској средини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији (Фигура 15а). Апоптотске карактеристике $CD3^{-}CD49b^{+}$ НК ћелија у туморској средини анализирали смо помоћу експресије анексина V и пропидијум јодида. Процент НК ћелија у раној апоптози (анексин V⁺; пропидијум јодид⁻) је био значајно мањи у туморској средини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 15б).

4.5. Већа транскрипциона активност НК ћелија примарног тумора $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији

Процент NF κ B⁺ $CD3^{-}CD49b^{+}$ НК ћелија је већи у туморској средини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 16а). Такође, експресија NF κ B је била већа код BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 16а). Експресија STAT3 транскрипционог фактора у $CD3^{-}CD49b^{+}$ НК ћелијама је била значајно већа у туморској средини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 16б).



Фигура 15. Дуже преживљавање и повећан степен пролиферације NK ћелија у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији. Процент Ки67⁺ NK ћелија је значајно већи у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији (а). Процентуална заступљеност анексин V⁺ пропидијум јодид⁻ NK ћелија је била најнижа у туморској средини ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији (б). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови Ки67⁺ и анексин V⁺ пропидијум јодид⁻ CD3⁺CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

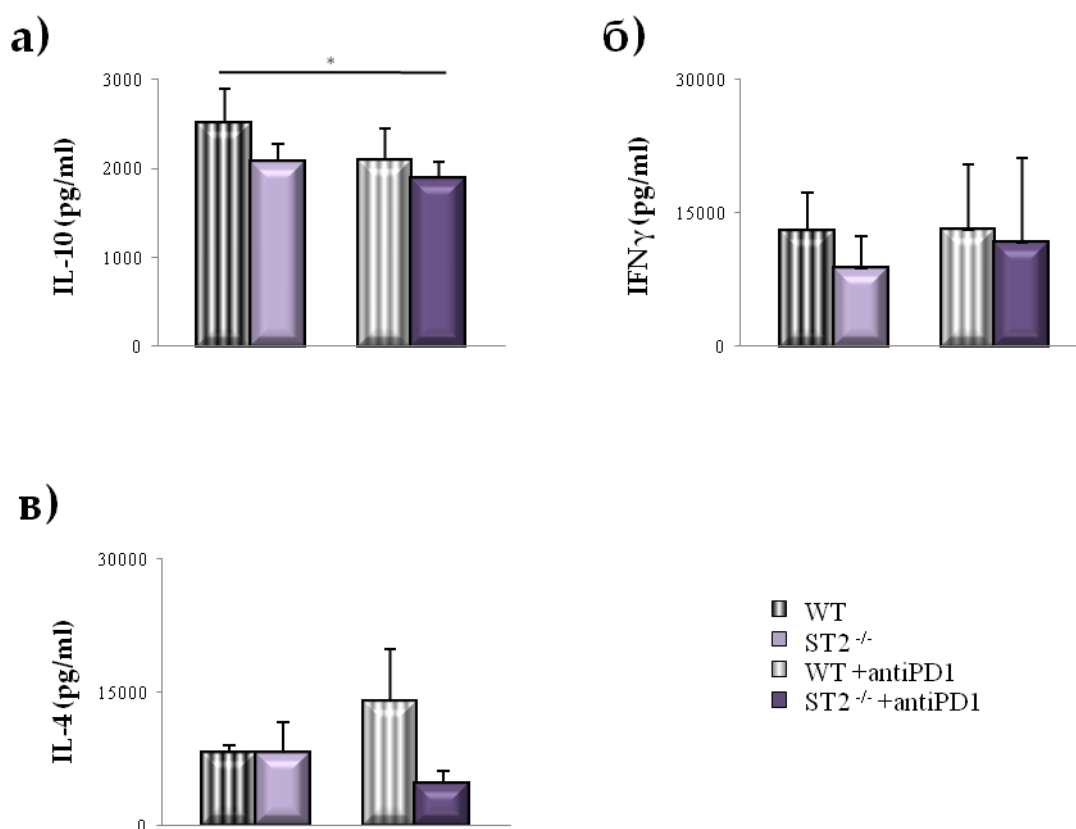


Фигура 16. Повећана транскрипциона активност NK ћелија изолованих из примарног тумора ST2^{-/-} мишева на анти- PD-1 терапији. Процент NFκB⁺ (а) и STAT3⁺ (б) NK ћелија је значајно већи у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти- PD-1 антитела у односу на BALB/c и BALB/c ST2^{-/-} експерименталне групе. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS-плотови NFκB⁺ и STAT3⁺ CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.6. Значајно смањена локална и системска имуносупресија код ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији

Анализа серумских концентрација цитокина је показала значајно смањење концентрације IL-10 у серуму BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c мишевима без терапије (p<0.05, Фигура 17а). Концентрација IL-10 у серуму BALB/c мишева на анти-PD1 терапији и BALB/c ST2^{-/-} мишева без терапије је била на истом нивоу као у контролној групи, BALB/c мишеве без терапије. Није било значајне разлике у

серумским концентрацијама IFN- γ и IL-4 између свих експерименталних група (Фигура 17 б,в).



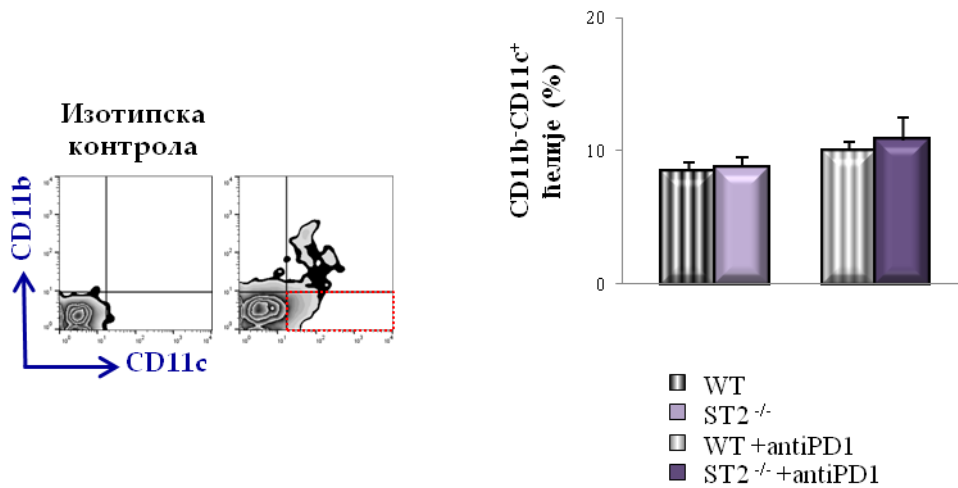
Фигура 17. Смањена концентрација серумског IL-10 код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти -PD-1 терапији. Анализа серумских концентрација цитокина је показала значајно снижење концентрације IL-10 код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти -PD-1 терапији, док није било значајне измене у серумским концентрацијама IFN- γ и IL-4. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Руководећи се добијеним резултатима, даље смо анализирали антиген-презентујуће и имуносупресивне ћелије у слезини и примарном тумору, 15 дана након апликације 4T1 туморских ћелија.

Процент CD11b⁻CD11c⁺ дендритских ћелија у слезини је био највиши код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији, иако разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 18).

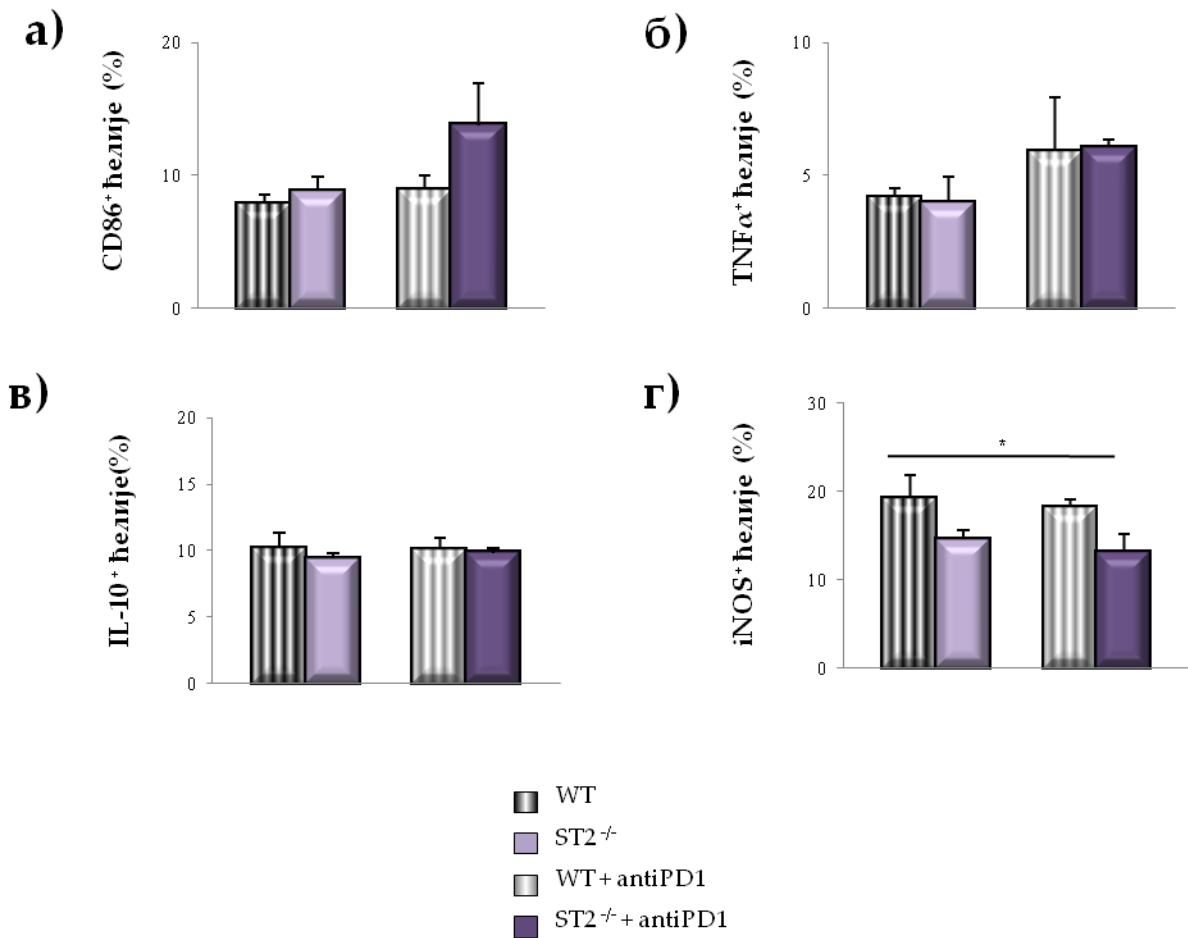
Није било значајне разлике у фенотипу CD11b⁻CD11c⁺ дендритских ћелија слезине, и то експресије CD86, TNF- α и IL-10 између експерименталних група (Фигура 19 а, б, в).

Једина значајна разлика је била у експресији iNOS молекула. У слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији регистрована је мања експресија iNOS у CD11b⁻CD11c⁺ дендритским ћелијама, у поређењу са BALB/c мишевима без терапије (p<0.05; Фигура 19г).



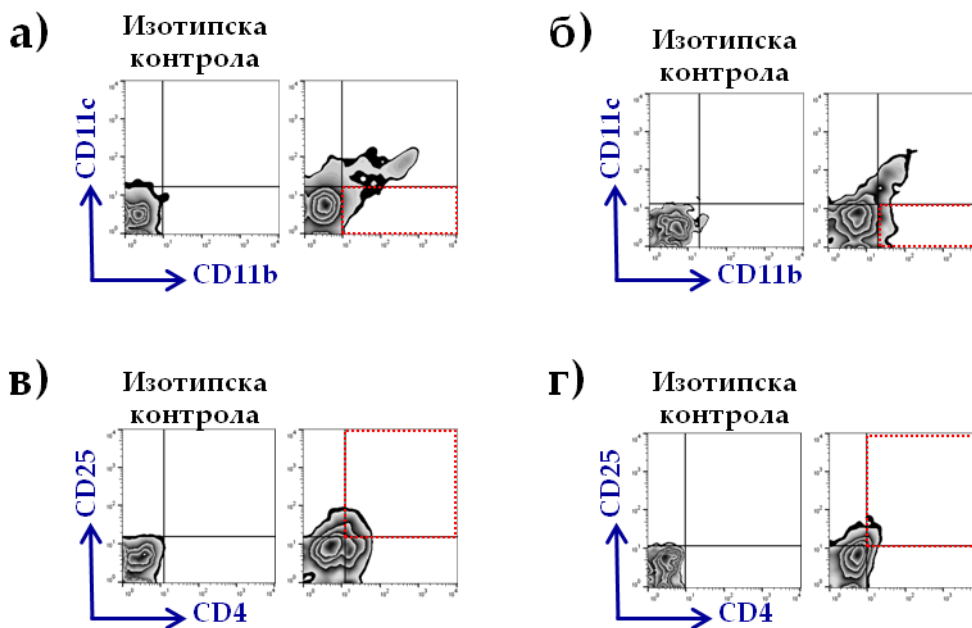
Фигура 18. Процент заступљености CD11b⁻CD11c⁺ ћелија у слезини. Процент CD11b⁻CD11c⁺ ћелија у слезини је био највећи код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији, али без статистичке значајности у односу на остале експерименталне групе. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

CD11b⁺ CD11c⁺ ћелије



Фигура 19. Фенотип CD11b⁺CD11c⁺дендритских ћелија у слезини. Није било значајне разлике у експресији CD86, TNF-α и IL-10 међу експерименталним групама. Постоји значајна разлика у експресији iNOS молекула, која је значајно нижа код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишева без терапије. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

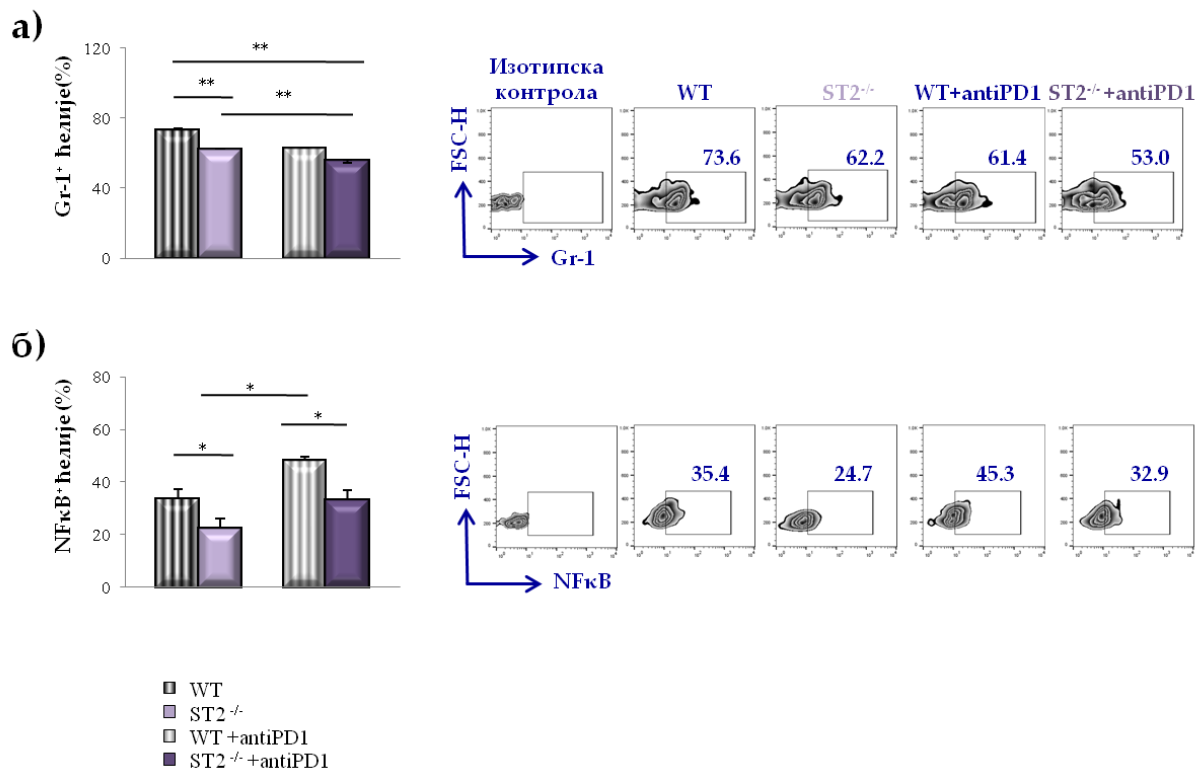
Затим смо анализирали имуносупресивне ћелије (мијелоидне супресорске ћелије и регулаторне Т лимфоците) у слезини и у туморској микросредини (Фигура 20).



Фигура 20. Gating стратегија за анализу мијелоидних супресорских ћелија и Т регулаторних лимфоцита слезине и примарног тумора. Gating стратегија за мијелоидне супресорске ћелије слезине (а) и примарног тумора (б), Т регулаторне лимфоците слезине (в) и примарног тумора (г).

Када је реч о мијелоидним супресорским ћелијама у слезини, проценат заступљености $CD11b^+CD11c^-Gr^+$ ћелија је значајно нижи код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 21а). Процент $CD11b^+CD11c^-Gr^+$ ћелија је такође мањи код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева који су добијали анти-PD1 терапију у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, али та разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 21а). Такође, постоји и значајна разлика код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева без терапије у односу на BALB/c мишеве без терапије (Фигура 21а). Процент $NF\kappa B^+ CD11b^+CD11c^-Gr^+$ мијелоидних супресорских ћелија слезине је био нижи код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти PD1 антителом у поређењу са BALB/c мишевима третираних анти-PD1 антителом ($p < 0.05$; Фигура 21б). Експресија $NF\kappa B$ је била значајно мања код $ST2^{-/-}$ нетретираних мишева у поређењу са BALB/c нетретираних мишева ($p < 0.05$; Фигура 21б). Процент $NF\kappa B^+ CD11b^+CD11c^-Gr^+$ ћелија је био већи код BALB/c нетретираних мишева у поређењу са BALB/c мишевима који су били на анти-PD1 терапији ($p < 0.05$; Фигура 21б).

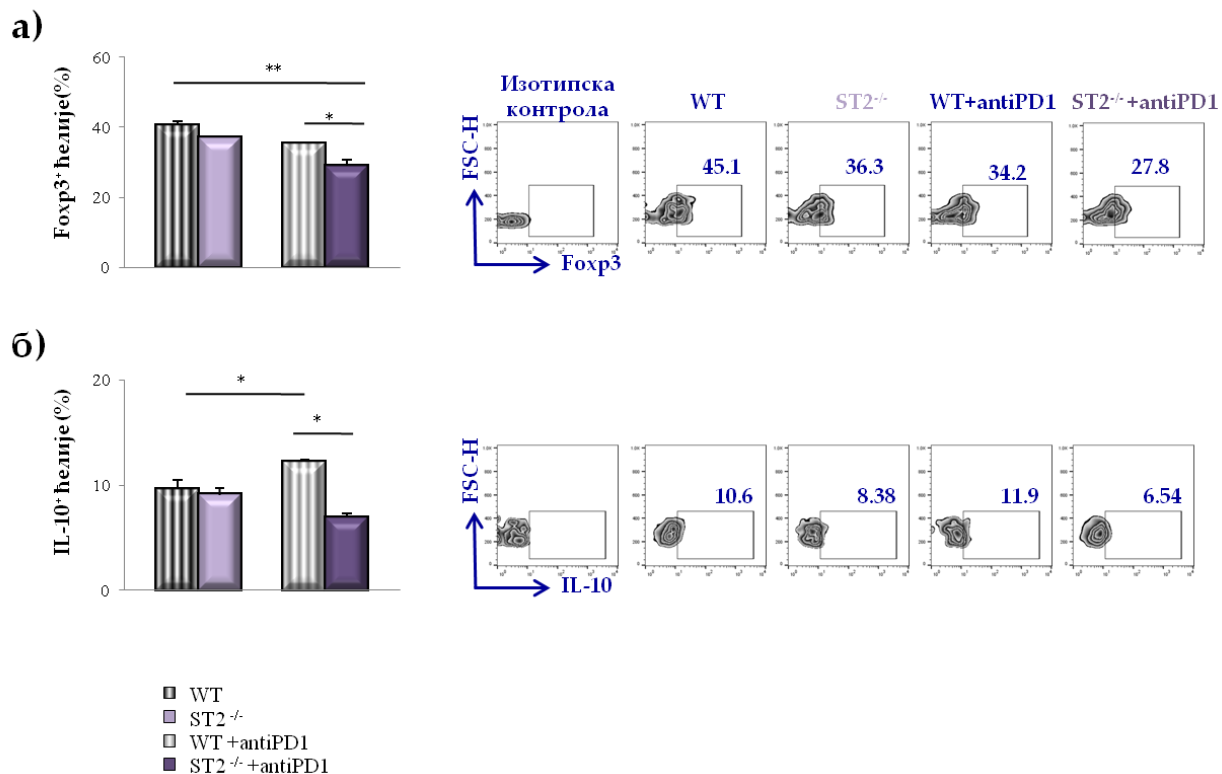
CD11c⁺CD11b⁺ ћелије



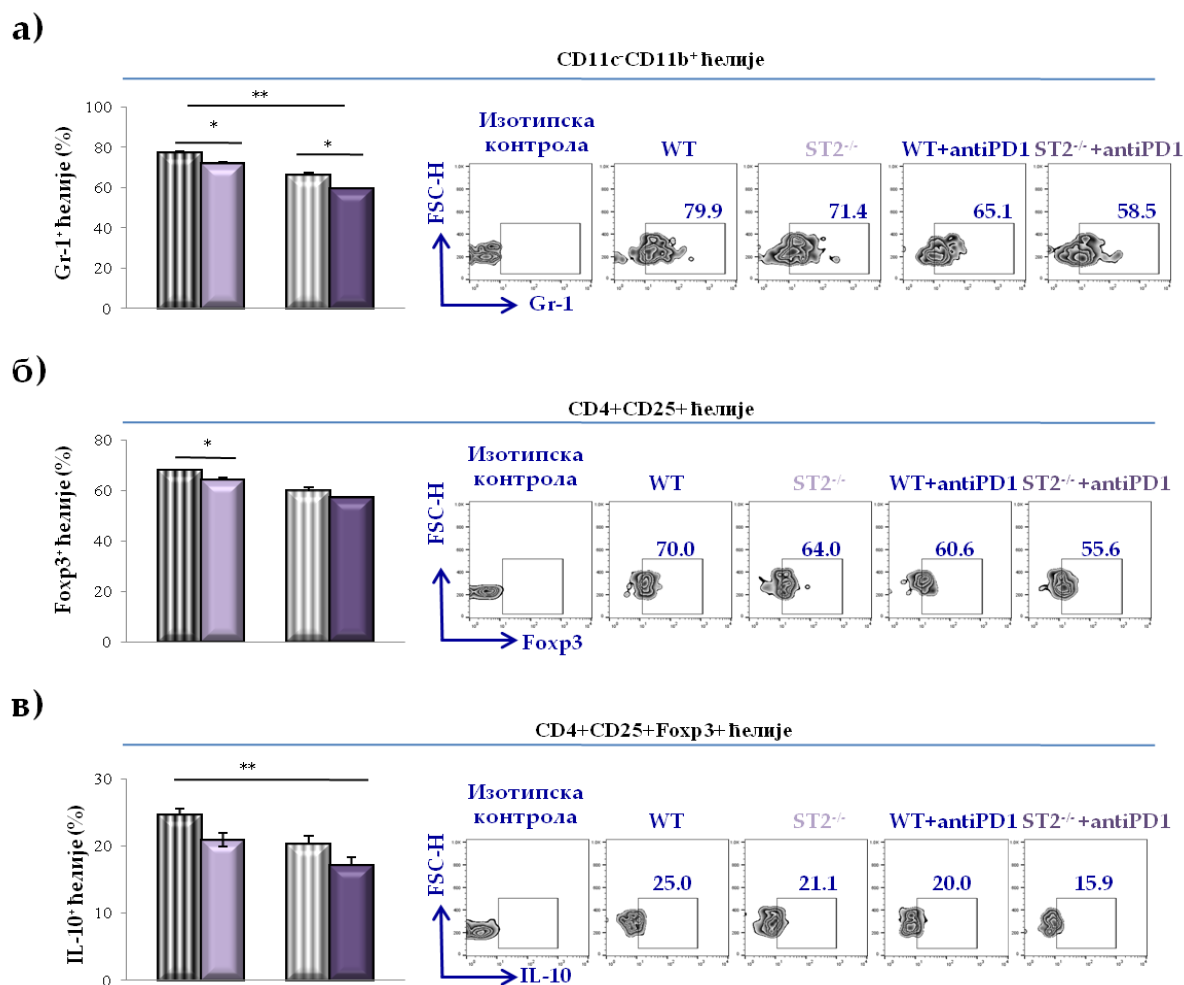
Фигура 21. Смањен проценат мијелоидних супресорских ћелија код ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији. Графикон а илуструје значајно смањену процентуалну заступљеност CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ мијелоидних супресорских ћелија слезине ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији. Значајно смањена експресија транскрипционог фактора NFκB у CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ мијелоидним супресорским ћелијама слезине ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији је илустрована на графикону б. Приказани су и репрезентативни FACS плотови NFκB⁺ и CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ мијелоидних супресорских ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Процентуална заступљеност $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т регулаторних лимфоцита слезине је била значајно мања у слезинама BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти PD-1 антителима у поређењу са BALB/c мишевима третираним анти PD-1 антителима и BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 22а). Процент заступљености $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија је био такође мањи код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c $ST2^{-/-}$ мишевима без терапије, али разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 22а). Процент $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија које продукују IL-10 је био значајно мањи у слезини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти PD-1 антителом у поређењу са BALB/c мишевима третираних анти PD-1 антителом ($p < 0.05$; Фигура 22б). Регистрована је и значајно већа процентуална заступљеност IL-10⁺ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ код BALB/c мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c нетретираним мишевима ($p < 0.05$; Фигура 22б).

Процент $CD11b^+CD11c^-Gr^+$ мијелоидних супресорских ћелија је био значајно мањи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти PD1 антителима у поређењу са BALB/c мишевима третираних анти-PD1 антителима, као и у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 23а). Такође, проценат ових ћелија је био значајно мањи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева без терапије у односу на BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 23а). Процент $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија је био најнижи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти PD1 антителом, али без статистичке значајности. Постојала је статистичка значајност само између BALB/c нетретираних мишева и BALB/c $ST2^{-/-}$ нетретираних мишева, те узмешу група третираних анти-PD1 антителом ($p < 0.05$; Фигура 23б). Процент IL-10⁺ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија је био значајно мањи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти PD-1 терапији у поређењу са BALB/c нетретираним мишевима ($p < 0.01$; Фигура 23в). Није било статистичке значајности између осталих експерименталних група.



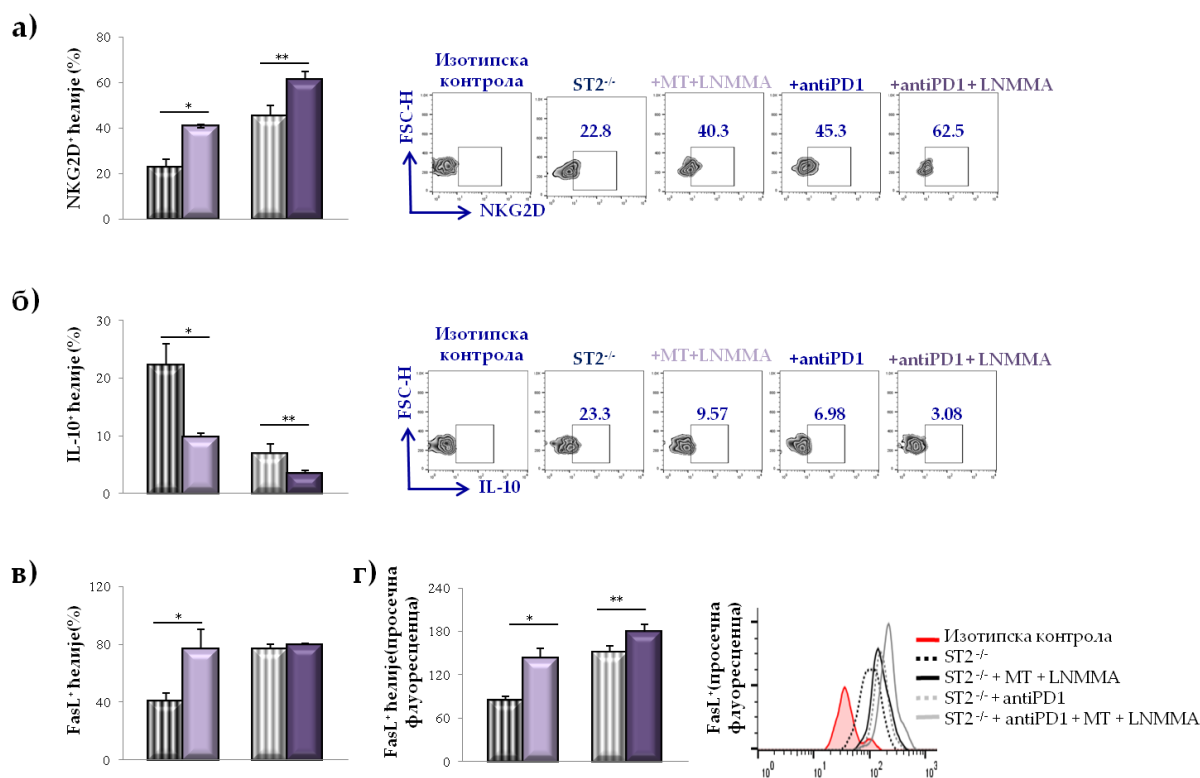
Фигура 22. Смањена процентуална заступљеност CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и IL-10⁺ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита у слезини ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији. Графикон а илуструје значајно мањи проценат CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита у слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева који су добијали анти-PD-1 антитела у односу на BALB/c мишеве на анти-PD-1 терапији, као и у односу на BALB/c мишеве без терапије. Графикон б илуструје значајно нижу процентуалну заступљеност IL-10⁺ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита у слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и IL-10⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.



Фигура 23. Смањена акумулација мијелоидних супресорских, регулаторних Т лимфоцита и IL-10⁺ регулаторних Т лимфоцита у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији. Анти PD-1 терапија је значајно смањила проценат CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ мијелоидних супресорских ћелија у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева(а). Процентуална заступљеност CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита је била најнижа у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} на анти-PD-1 терапији (б). Процент IL-10⁺ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита је био значајно нижи у туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева у односу на BALB/c мишеве без терапије (в). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и IL-10⁺ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.7. Већа експресија активационих маркера на НК ћелијама из слезине ST2^{-/-} мишева третираних анти-PD1 терапијом без обзира на *in vitro* блокаду IDO и iNOS молекула

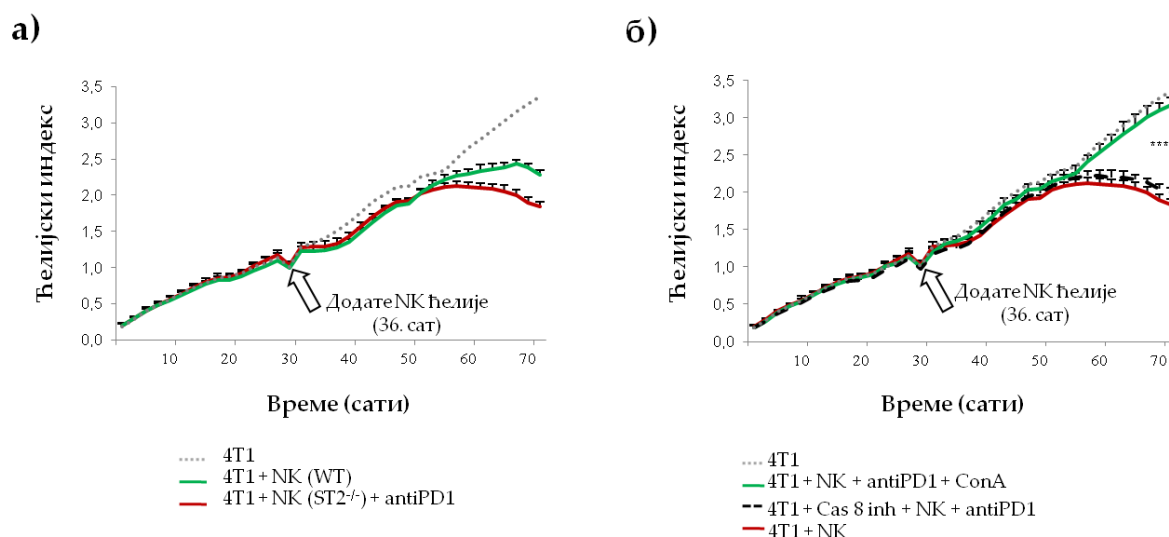
У даљим *in vitro* експериментима, изоловали смо спленоците из здравих BALB/c ST2^{-/-} мишева, а затим смо их инкубирали 24 сата у комплетном медијуму са или без додавања анти-PD1 антитела, са или без 1-MT, селективног блокатора идоламин диоксигеназе, и са или без LNNMA, селективног блокатора индуцибилне нитрит оксидазе у трајању од 24 часа. Потом смо анализирали CD3⁻CD49⁺ НК ћелије по групама. Симултано додавање 1-MT и LNNMA је повећало експресију NKG2D и FasL, а смањило експресију IL-10 ($p < 0.05$; Фигура 24 а,б,в). Исти феномен је забележен након додавања анти-PD1 антитела ($p < 0.05$; Фигура 24 а,б,в). Занимљиво је да истовремени третман анти-PD1 антителом, 1-MT-ом и LNNMA-ом додатно појачава експресију NKG2D и експресију FasL, а смањује проценат IL-10 продукујућих CD3⁻CD49⁺ НК ћелија у поређењу са једноструком блокадом ($p < 0.05$; Фигура 24 а,б,в).



Фигура 24. Већа експресија активационих маркера NKG2D и FasL и снижена експресија имunosупресивног IL-10 у NK ћелијама из слезине третиране анти- PD-1 антителом, приликом блокаде молекула IDO и iNOS *in vitro*. Графикон а илуструје значајно већу заступљеност NKG2D⁺NK ћелија из ST2^{-/-} мишева третираних анти-PD-1 антителом приликом блокаде IDO и iNOS *in vitro*. Графикон б илуструје значајно мању заступљеност IL-10⁺NK ћелија у слезини ST2^{-/-} мишева третираних анти-PD-1 антителом приликом блокаде IDO и iNOS *in vitro*. Графикон в илуструје просечну флуоресценцу за FasL молекул на NK ћелијама слезине ST2^{-/-} мишева третираних анти-PD-1 антителом приликом блокаде IDO и iNOS *in vitro*. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови NKG2D⁺ и IL-10⁺NK ћелија као и хистограми експресије FasL на NK ћелијама слезине ST2^{-/-} мишева. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.8. Одсуство IL-33/ST2 сигналног пута и PDL/PD1 осовине појачава NK ћелијску цитотоксичност преко унутрашњег пута апоптозе

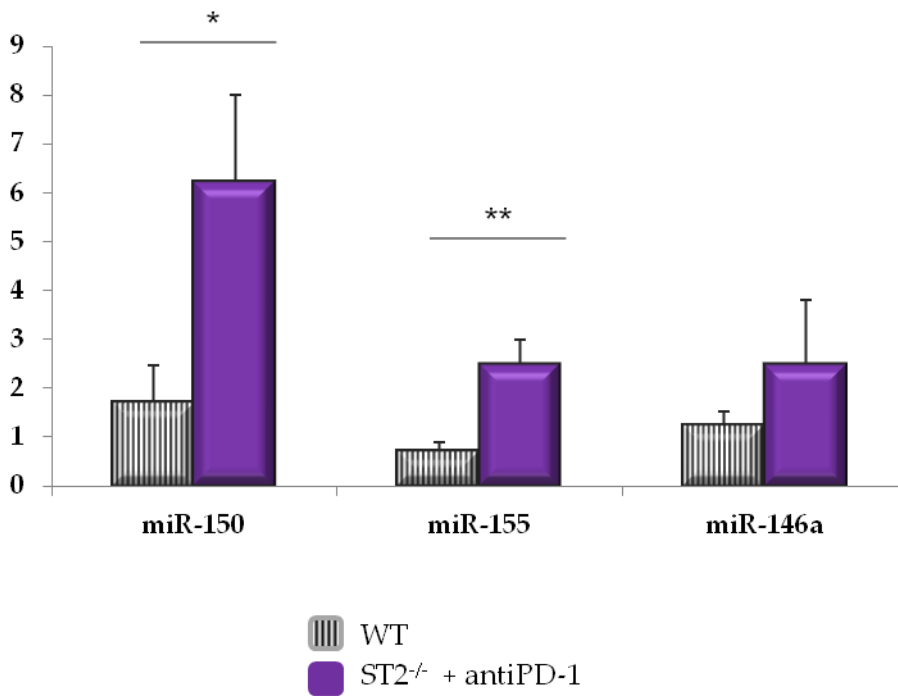
Тест цитотоксичности смо урадили са CD49b⁺ NK ћелијама свеже изолованим из слезина ST2^{-/-} и WT мишева, које су претретиране анти-PD антителом, а циљне ћелије су биле 4T1 ћелије. Додавање анти-PD1 антитела је значајно повећало цитотоксичност NK ћелија ST2^{-/-} мишева у односу на NK ћелије WT мишева (p<0.01; Фигура 25а). Да бисмо проценили који механизам цитотоксичности користе NK ћелије у условима симултане блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD1 осовина, најпре смо изоловали CD49b⁺ NK ћелије из слезине здравих ST2^{-/-} мишева. Инкубирали смо NK ћелије са анти-PD1 антителом, а потом са 4T1 таргет ћелијама које су пре-инкубирани са инхибитором каспазе 8. Тест цитотоксичности је показао да инкубирање циљаних 4T1 ћелија са инхибитором каспазе 8 у малој мери смањује цитотоксичност NK ћелија (Фигура 25б). Потом смо поновили тест цитотоксичности на CD49b⁺ ST2^{-/-} NK ћелијама које су претретиране са конканавалином А, како би се блокирао унутрашњи пут апоптозе. Блокирање унутрашњег пута апоптозе је значајно смањило цитотоксичност NK ћелија према циљаним 4T1 ћелијама (p<0.01; Фигура 25б).



Фигура 25. Појачана цитотоксичност НК ћелија изолованих из слезине $ST2^{-/-}$ мишева је резултат појачане активности унутрашњег пута апоптозе. Графикон а илуструје повећану цитотоксичку активност НК ћелија које су свеже изоловане из слезина BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева а потом инкубиране са анти-PD-1 антителом у односу на цитотоксичност НК ћелија које су свеже изоловане из слезина BALB/c мишева претретираних анти- PD-1 антителом. Графикон б приказује, праћењем ћелијског индекса, смањење степена апоптозе када је блокиран унутрашњи пут, а остаје неизмењен приликом блокаде спољашњег пута.

4.9. Промена експресије miRNA у НК ћелијама изолованих из слезине $ST2$ нокаут мишева након блокаде PDL/PD1

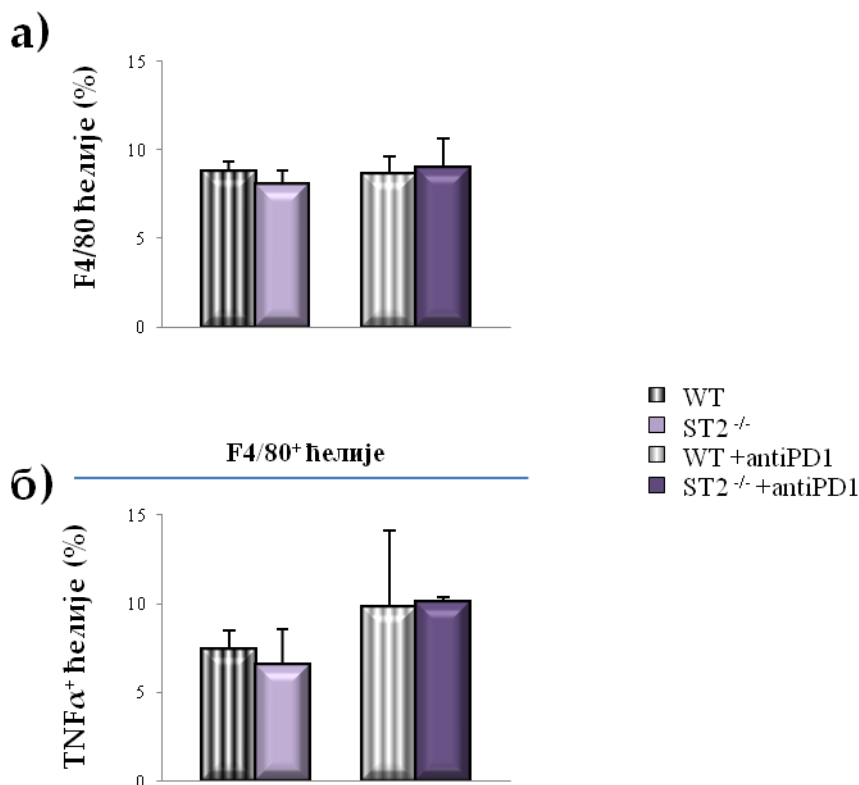
Мерили смо експресију miRNA-155, miRNA-150 и miRNA-146a у НК ћелијама изолованих из здравих WT мишева и $ST2^{-/-}$ мишева третираних анти-PD1 антителом. Наши резултати указују на значајно већу експресију miRNA-150 у НК ћелијама третираних анти-PD1 антителом ($p < 0.05$; Фигура 26). Експресија miRNA-155 гена је такође била значајно већа у НК ћелијама изолованих из $ST2^{-/-}$ мишева у поређењу са НК ћелијама изолованих из WT мишева ($p < 0.05$; Фигура 26). Није било значајне измене у експресији miRNA-146a између експерименталних група (Фигура 26).



Фигура 26. Повећана експресија miRNA-150 и miRNA-155 у НК ћелијама изолованих из слезина ST2^{-/-} мишева и третираних анти-PD-1 антителом. Користећи RT-PCR одређивана је експресија miRNA-150, miRNA-155 и miRNA-146a у НК ћелијама свеже изолованих из слезина. Графикон илуструје значајно повећану експресију miRNA-150 и miRNA-155 код НК ћелија BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти-PD-1 антителом у односу на BALB/c мишева третираних анти-PD-1 антителом. Нема значајне разлике у експресији miRNA-146a. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.10. Анти PD-1 терапија повећава акумулацију M1 макрофага у туморској микросредини ST2^{-/-} мишева

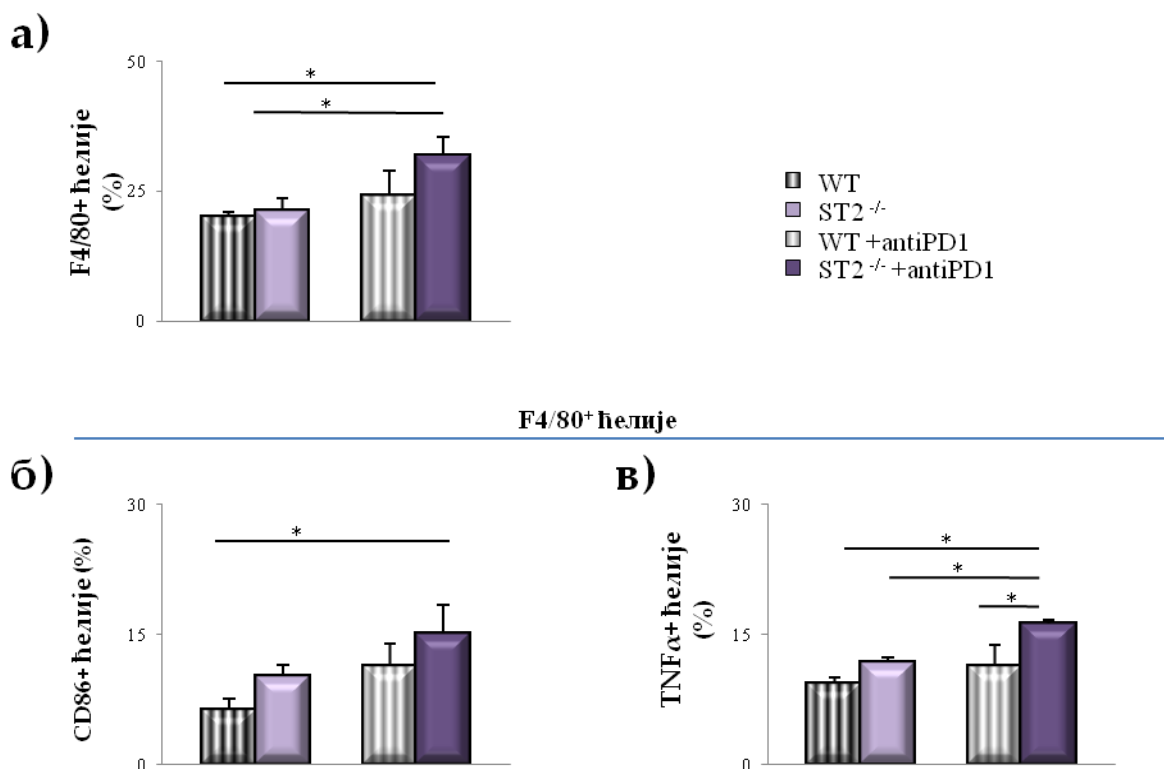
Примена анти-PD-1 терапије не утиче на повећање заступљености макрофага у слезини ST2^{-/-} мишева (Фигура 27а), као ни на експресију TNF α у макрофагима слезине (Фигура 27б).



Фигура 27. Истовремена блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 не утиче на процентуалну заступљеност F4/80⁺ и TNF α продукујућих макрофага слезине. Графикон а илустрјује непромењену процентуалну заступљеност макрофага између експерименталних група. Графикон б илустрјује непромењену процентуалну заступљеност TNF α ⁺F4/80⁺ макрофага слезине. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

У туморској микросредини BALB/c ST2^{-/-} мишева, анти- PD-1 терапија повећава заступљеност F4/80⁺ макрофага, са значајном разликом у поређењу са BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије. ($p < 0.05$; Фигура 28б). Није било значајне разлике између BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији и BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 28а). Анти-PD-1 терапија значајно повећава проценат CD86⁺ F4/80⁺ макрофага у примарном тумору BALB/c ST2^{-/-} мишева у односу на BALB/c мишеве без терапије. Није

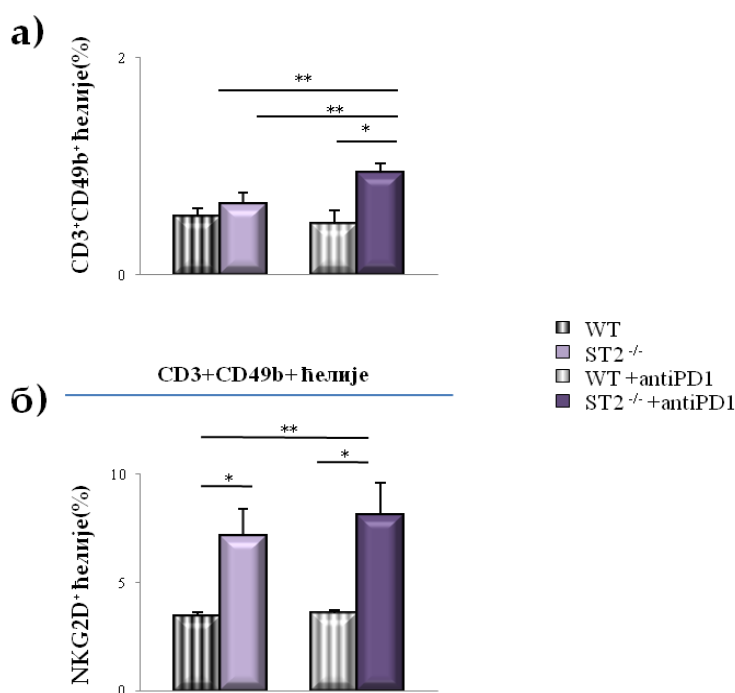
било значајних разлика између BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији и BALB/c ST2^{-/-} мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 28б). Такође, проценат експресије TNFα⁺ F4/80⁺ је био значајно већи код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти-PD-1 терапији, BALB/c ST2^{-/-} мишеве без терапије, као и BALB/c мишеве без терапије (Фигура 28в).



Фигура 28. Истовремена блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 повећава процентуалну заступљеност F4/80⁺, CD86⁺ и TNFα⁺ макрофага тумора. Графикон а илуструје значајно повећану процентуалну заступљеност F4/80⁺ макрофага тумора BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на обе нетретирание групе. Графикон б илуструје значајно повећану процентуалну заступљеност CD86⁺F4/80⁺ макрофага тумора BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c нетретирание мишеве. Графикон в илуструје значајно повећану процентуалну заступљеност TNFα⁺F4/80⁺ макрофага тумора BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на све остале групе. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.11. Примена анти- PD1 антитела повећава заступљеност NKT ћелија у слезини и мења њихов фенотип код ST2^{-/-} мишева

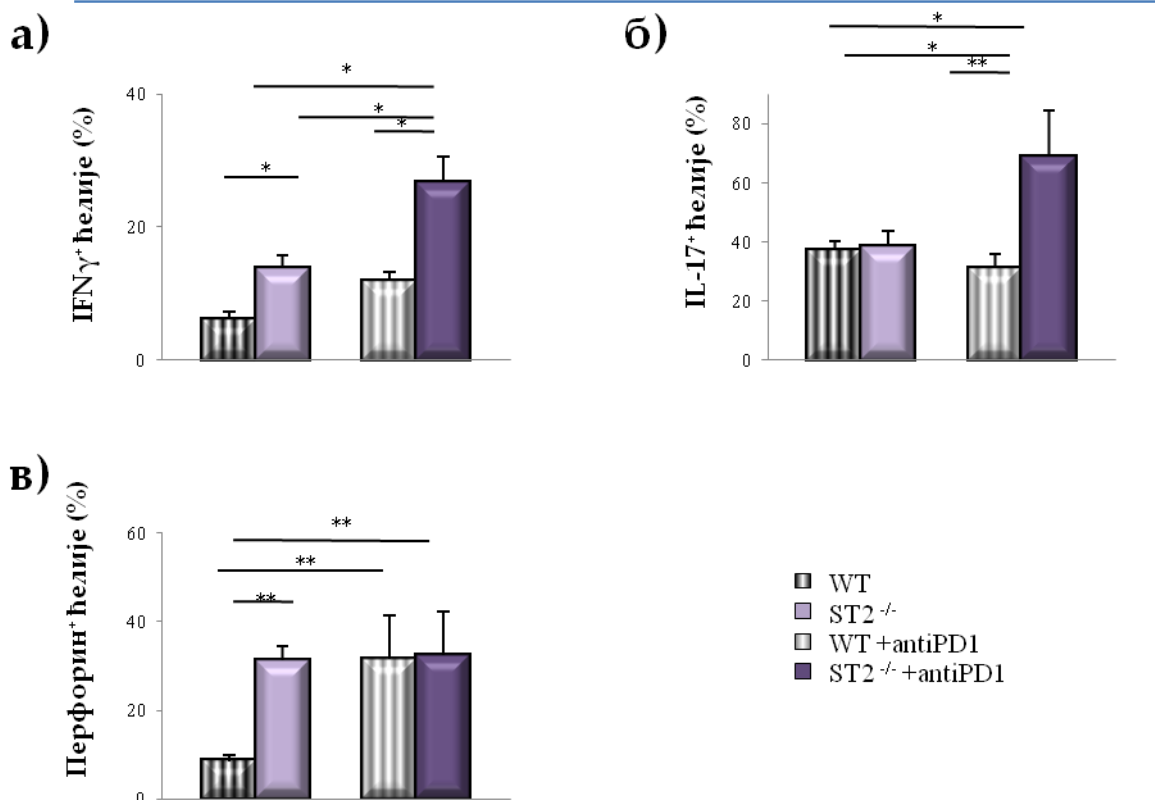
Анализирали смо и фенотип NKT ћелија у слезини. Наши резултати указују да у експерименталној групи са двоструком блокадом постоји значајно повећан проценат CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у односу на BALB/c мишеве третираних анти-PD1 антителом, BALB/c ST2^{-/-} мишеве без терапије и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 29а). Није било значајне разлике између BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији и BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 29а). Експресија NKG2D молекула је била већа на CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелијама из слезине BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији у поређењу са BALB/c експерименталном групом без терапије, као и у односу на BALB/c експерименталну групу која је била на анти-PD-1 терапији (p<0.05; Фигура 29б). Такође, регистрована је статистички значајни разлика и између BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c експерименталне групе без терапије (p<0.05; Фигура 29б).



Фигура 29. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност CD3⁺CD49b⁺ и NKG2D⁺CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у слезини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти - PD-1 антитела имају значајно већи проценат заступљености CD3⁺CD49b⁺ и NKG2D⁺NKT ћелија у односу на остале експерименталне групе (а, б). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

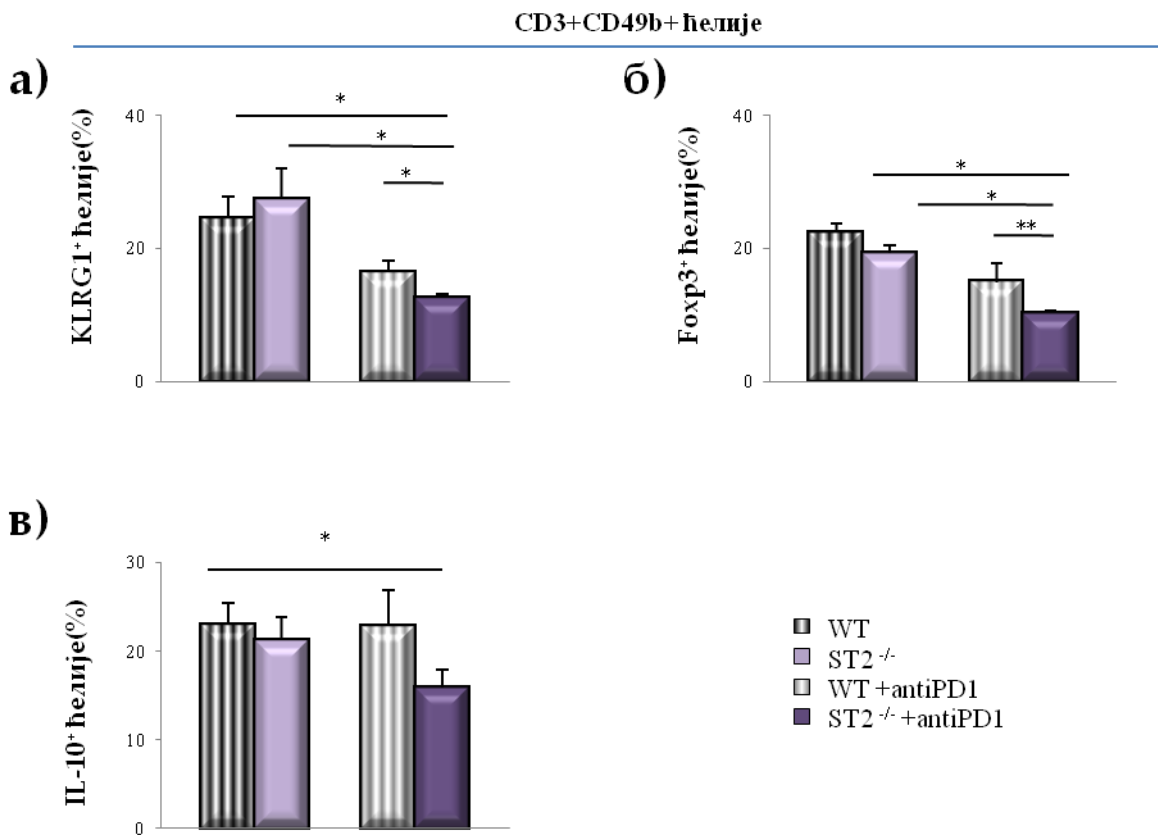
Експресија IFN- γ је била значајно повишена у CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелијама слезине BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве третиране анти-PD1 антителима, BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 30а). Такође, постојала је статистичка значајност и између ST2^{-/-} и BALB/c експерименталне групе без терапије (p<0.05; Фигура 30а).Процент IL-17⁺ CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија слезине је био значајно већи код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c анти-PD-1 третирану групу, BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c нетретирану групу (p<0.05; Фигура 30б). Процент CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија слезине које продукују перфорин је био значајно већи код BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 30в).

CD3+CD49b+ ћелије



Фигура 30. Анти/ PD-1 терапија повећава заступљеност IFN γ ⁺, IL-17⁺ и перфорин⁺ NKT ћелија у слезини ST2^{-/-} мишева. Процентуална заступљеност IFN γ ⁺ NKT ћелија је највећа код ST2^{-/-} мишева који су добијали анти- PD-1 антитела (а). BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већи проценат заступљености IL-17⁺ NKT ћелија у односу на све остале експерименталне групе (б). Перфорин⁺ NKT ћелије су значајно заступљеније у слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти - PD-1 терапији. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

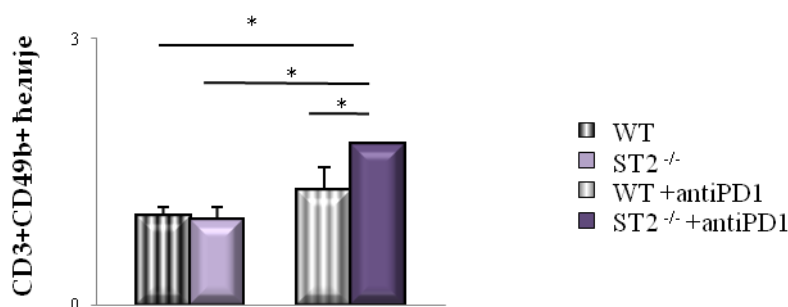
Процент $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија које експримирају имуносупресивне маркере KLRG-1 и FoxP3 је значајно нижи код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, $ST2^{-/-}$ и WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 31а, б). Експресија IL-10 у $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелијама слезине је била најнижа у слезини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији, са статистички значајном разликом у односу на WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 31в).



Фигура 31. Анти- PD-1 терапија смањује заступљеност KLRG1⁺, Foxp3⁺ и IL-10⁺NKT ћелија у слезини $ST2^{-/-}$ мишева. BALB/c $ST2^{-/-}$ мишеви који су добијали анти - PD-1 антитела имају значајно мањи проценат заступљености KLRG1⁺, Foxp3⁺ и IL-10⁺NKT ћелија у односу на остале експерименталне групе (а, б, в). Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента.. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

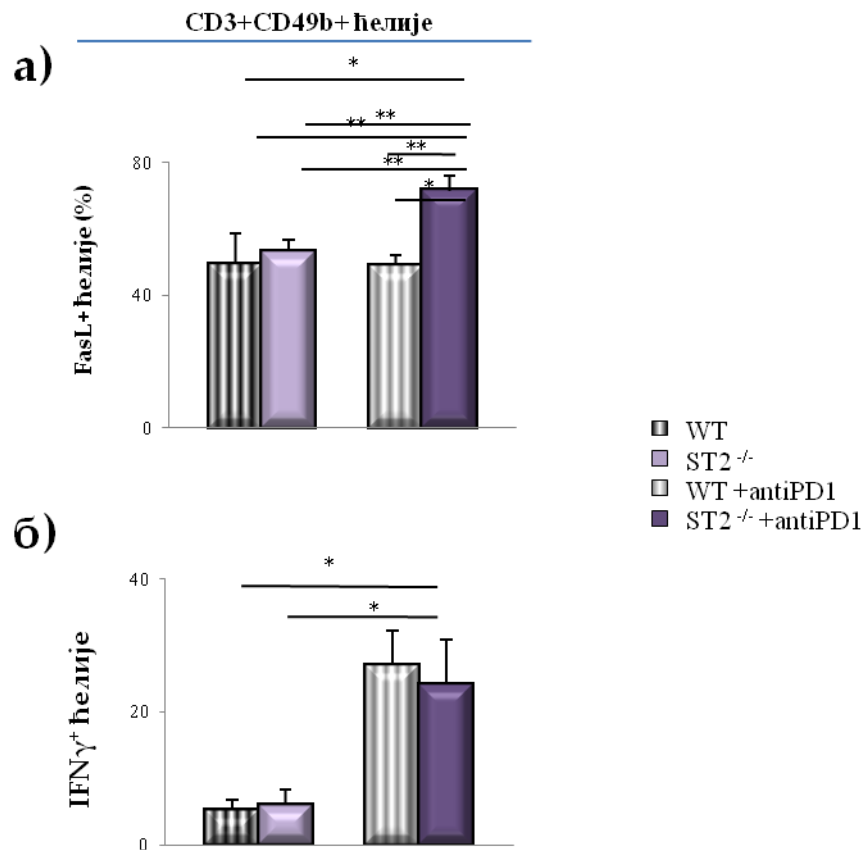
4.12. Повећана акумулација NKT ћелија у туморској микросредини код $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији је праћена повећаном експресијом активационих маркера

Процент $CD3^{+}CD49b^{+}$ NKT ћелија је био значајно већи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти-PD-1 терапији, као и у односу на $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 32а)



Фигура 32. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност $CD3^{+}CD49b^{+}$ NKT ћелија у туморској микросредини $ST2^{-/-}$ мишева. BALB/c $ST2^{-/-}$ мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већу заступљеност $CD3^{+}CD49b^{+}$ NKT ћелија у односу на све остале експерименталне групе. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Приказани су и репрезентативни FACS плотови $CD3^{+}CD49b^{+}$ NKT ћелија из свих експерименталних група. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

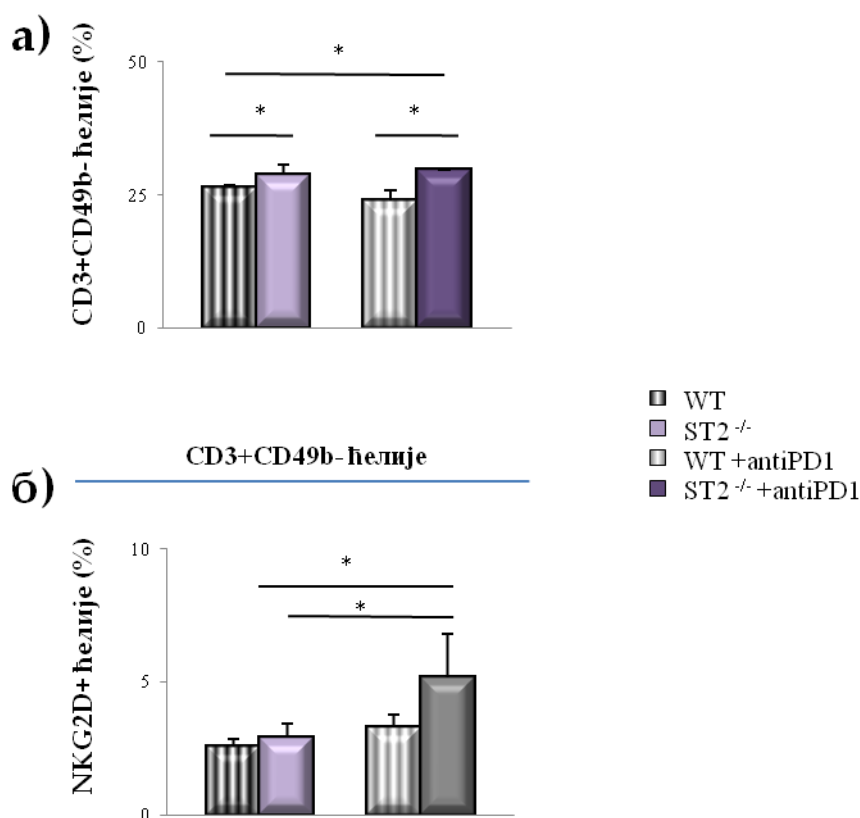
Процент $CD3^{+}CD49b^{+}$ NKT које експримирају FasL је био значајно већи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти-PD-1 терапији, $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 33а). Експресија IFN- γ је била значајно већа у $CD3^{+}CD49b^{+}$ NKT ћелијама тумора BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у односу на BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 33б).



Фигура 33. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност FasL⁺ и IFN γ ⁺ NKT ћелија у тумору ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већи проценат заступљености FasL⁺ и IFN γ ⁺CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у односу на остале експерименталне групе (а, б). Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

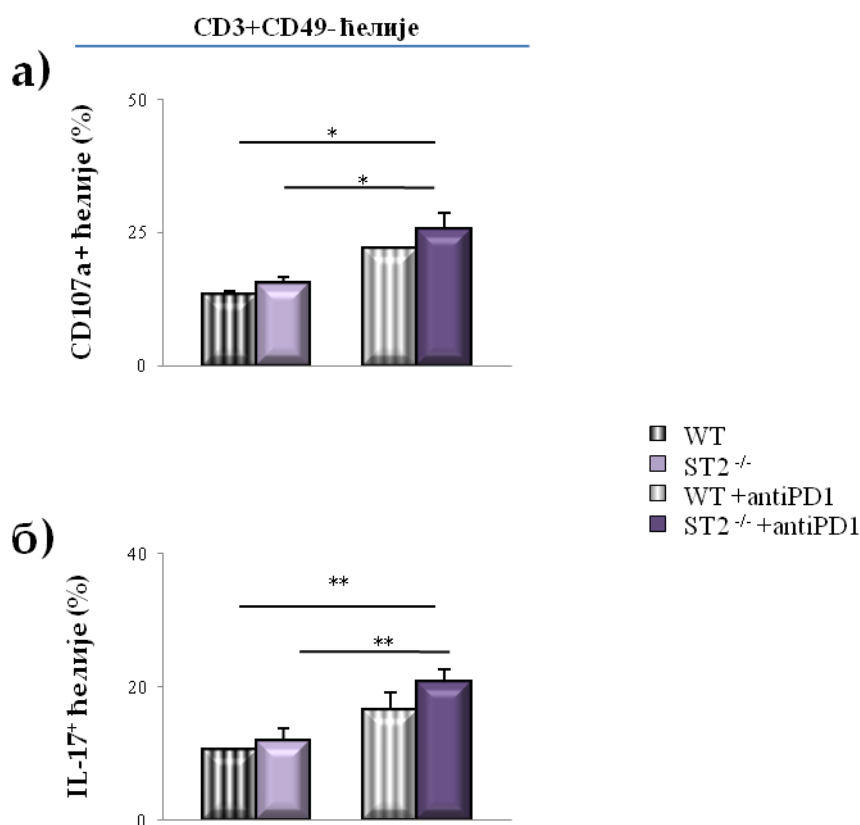
4.13. Анти PD-1 терапија повећава заступљеност Т лимфоцита уз повећање експресије активационих молекула, у слезини $ST2^{-/-}$ мишева

Процент $CD3^{+}CD49b^{-}$ Т лимфоцита је био значајно већи у слезини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са BALB/c мишевима на анти-PD-1 терапији, као и у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 34а). Заступљеност $CD3^{+}CD49b^{-}$ Т лимфоцита је такође била значајно већа код $ST2^{-/-}$ у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 34а). Експресија активационог молекула NKG2D на $CD3^{+}CD49b^{-}$ Т лимфоцитима је била значајно већа код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 34б). Није било значајне разлике између $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији и WT мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 34б).



Фигура 34. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност $CD3^{+}CD49^{-}$ и $CD3^{+}CD49^{-}$ NKG2D⁺ Т лимфоцита у слезини $ST2^{-/-}$ мишева. BALB/c $ST2^{-/-}$ мишеви који су добијали анти- PD-1 антитела имају значајно већи проценат $CD3^{+}CD49^{-}$ и $CD3^{+}CD49^{-}$ NKG2D⁺ Т лимфоцитау слезини у односу на остале експерименталне групе (а, б). Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

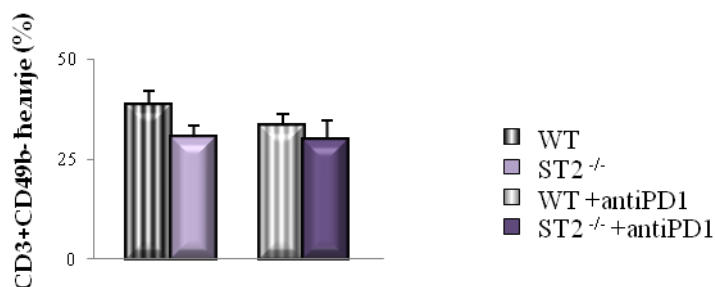
Експресија молекула CD107a у CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцитима је била значајно већа у слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са BALB/c ST2^{-/-} и BALB/c мишевима без терапије (p<0.05; Фигура 35a). Није било значајне разлике између BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији и BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 35a). Процент CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцита који продукују IL-17 је био значајно већи у слезини BALB/c ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са ST2^{-/-} и BALB/c мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 35б). Није било значајне разлике између ST2^{-/-} мишева на анти-PD-1 терапији и WT мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 35б).



Фигура 35. Анти- PD-1 терапија повећава заступљеност CD107b⁺ и IL-17⁺ Т лимфоцита у слезини ST2^{-/-} мишева. BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су добијали анти-PD-1 антитела имају значајно већи проценат CD107b⁺ и IL-17⁺ Т лимфоцита у слезини(а, б). Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T

4.14. Анти PD-1 терапија мења фенотип Т лимфоцита у туморској средини $ST2^{-/-}$ мишева

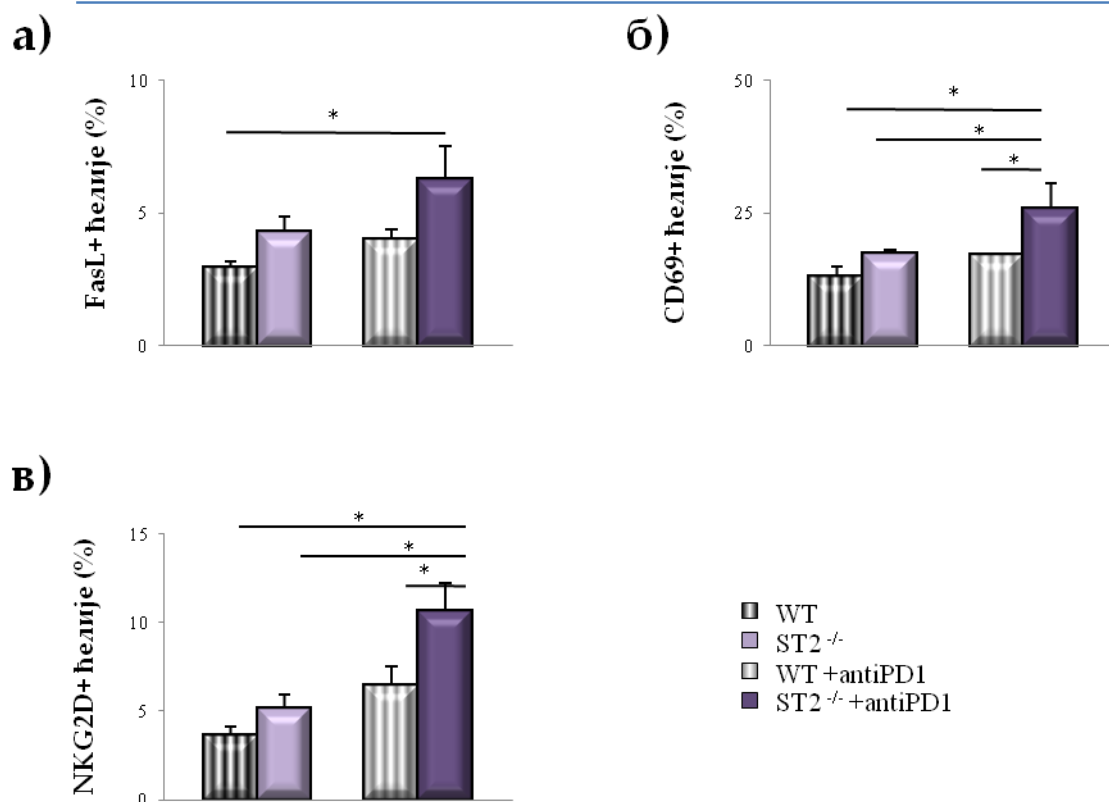
Анти PD-1 терапија није значајно утицала на процентуалну заступљеност $CD3^{+}CD49^{-}$ Т лимфоцита у туморској микросредини у експерименталним групама (Фигура 36)



Фигура 36. Анти- PD-1 терапија не утиче на акумулацију $CD3^{+}CD49b^{-}$ Т лимфоцита у примарном тумору $ST2^{-/-}$ мишева. Графикон илуструје проценталну заступљеност $CD3^{+}CD49b^{-}$ Т лимфоцита између свих експерименталних група. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

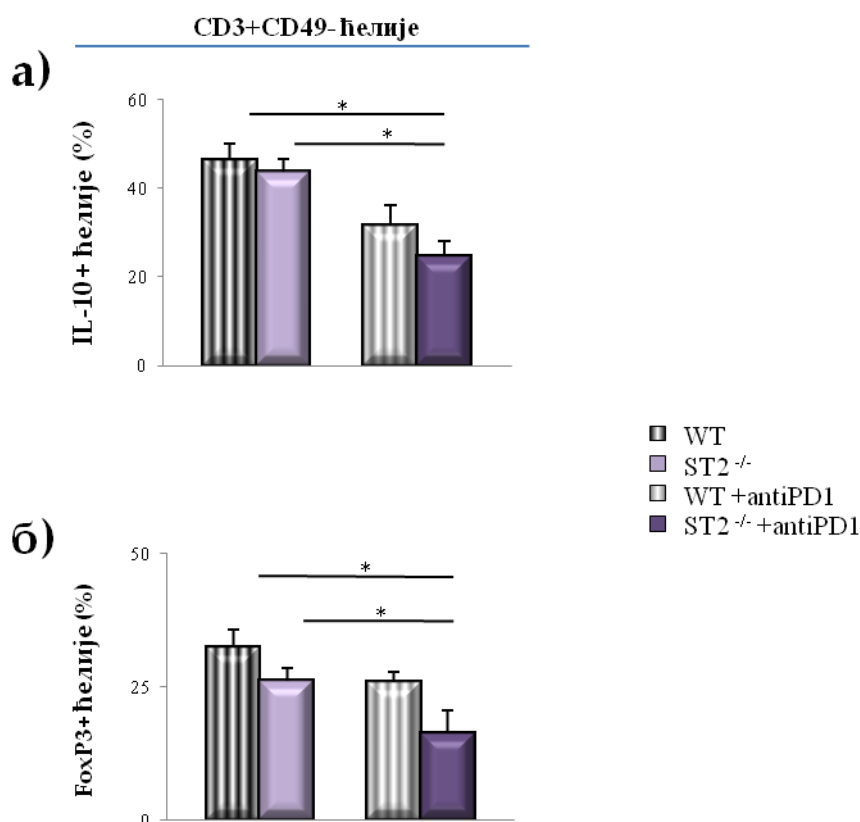
Процент $CD3^{+}CD49^{-}$ Т лимфоцита који експримирају FasL је био значајно већи у туморима BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 37а). Није било значајне разлике између BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији и BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 37а). Процент заступљености $CD3^{+}CD49b^{-}$ Т лимфоцита који експримирају CD69, односно NKG2D је био значајно већи у туморима BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве на анти- PD-1 терапији, BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 37 б и в).

CD3⁺CD49b⁻ ћелије



Фигура 37. Анти- PD-1 терапија стимулише активацију CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцита у примарном тумору ST2^{-/-} мишева. Графикона илуструје значајно повећану процентуалну заступљеност FasL⁺ Т лимфоцита у односу на BALB/c мишеве без терапије. Постоји значајно већа заступљеност CD69⁺ и NKG2D⁺Т лимфоцита у односу на све експерименталне групе (б, в) Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

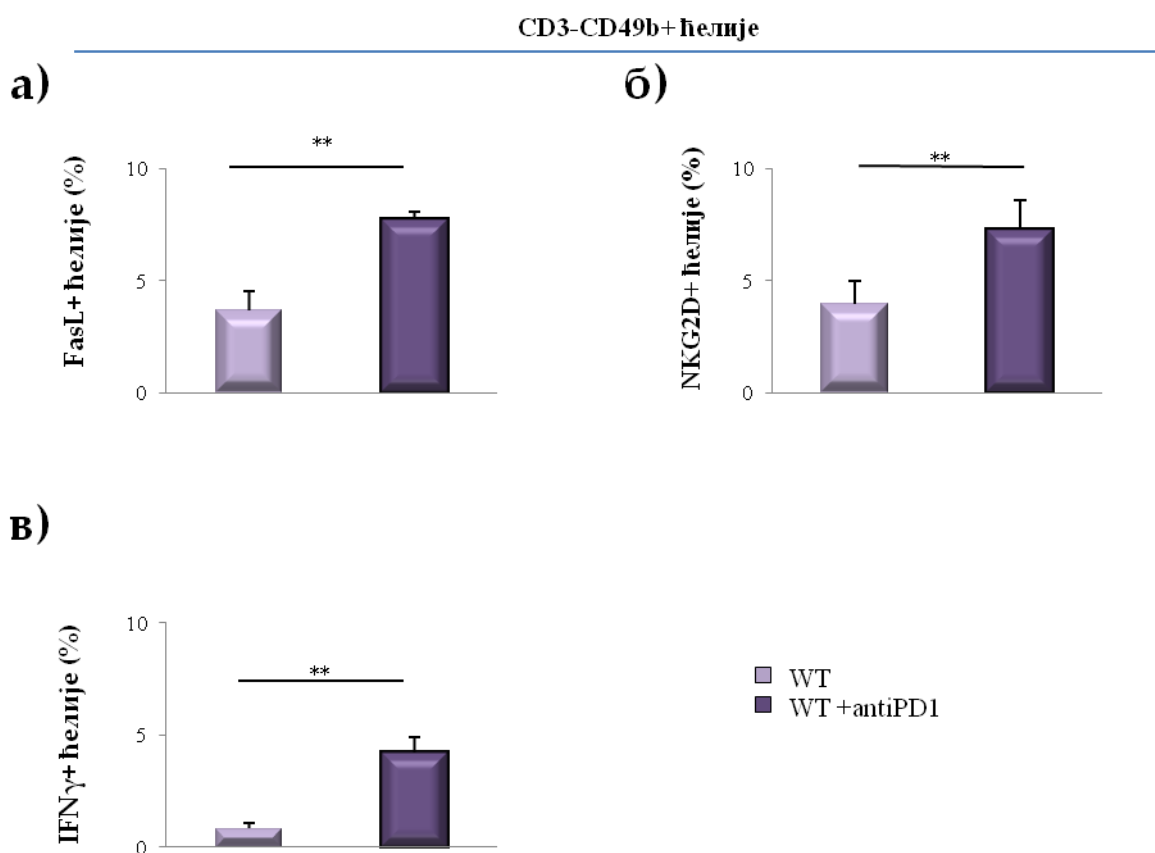
Процент $CD3^+CD49b^-$ Т лимфоцита који продукују IL-10 је био значајно већи у туморској микросредини BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са BALB/c $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 38а). Није било значајне разлике између $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији и WT мишева на анти-PD-1 терапији (Фигура 38а). Експресија FoxP3 у $CD3^+CD49b^-$ Т лимфоцитима је била значајно већа код BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу са $ST2^{-/-}$ и BALB/c мишевима без терапије ($p < 0.05$; Фигура 38б). Није било значајне разлике између BALB/c $ST2^{-/-}$ мишева на анти-PD-1 терапији и BALB/c мишева на анти-PD-1 терапији (38б).



Фигура 38. Анти- PD-1 терапија значајно смањује акумулацију IL-10⁺ и FoxP3⁺ CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцита у примарном тумору $ST2^{-/-}$ мишева. Графикона и билустрју значајно смањену заступљеност IL-10⁺ и FoxP3⁺ Т лимфоцита примарног тумора у односу на BALB/c мишове без терапије. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

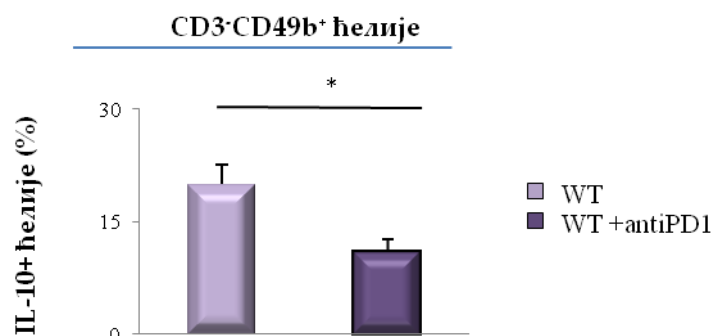
4.15. Ефекат блокаде PDL/PD-1 на НК ћелије

Процент $CD3^+CD49b^+$ НК ћелија које експримирају FasL је био значајно већи у слезинама BALB/c мишева на анти-PD1 терапији у односу на BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 39а). Процентуална заступљеност $CD3^+CD49b^+$ НК ћелија које експримирају NKG2D је била значајно већа у слезини BALB/c мишева на анти PD-1 терапији у односу на BALB/c мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 39б). Анти PD-1 терапија је значајно повећала експресију IFN- γ у $CD3^+CD49b^+$ НК ћелијама слезине BALB/c мишева у односу на WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 39в).



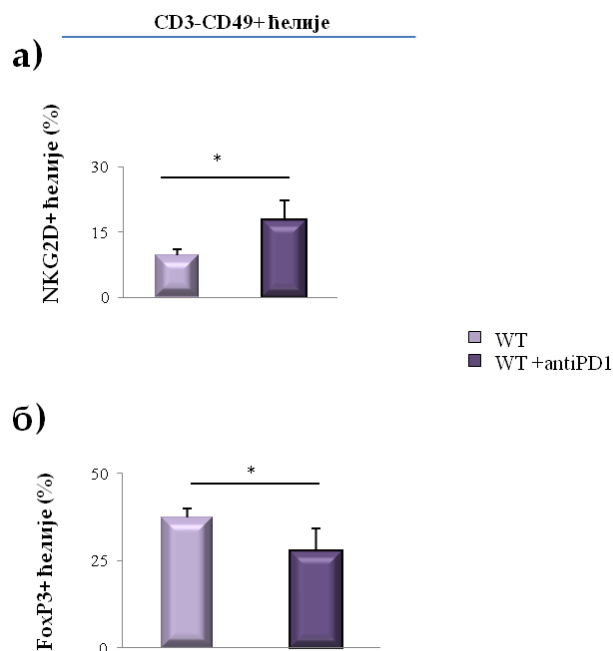
Фигура 39. Анти- PD-1 терапија значајно повећава експресију FasL, NKG2D IFN- γ код НК ћелија слезине. Значајно повећан проценат НК ћелија које експримирају FasL (а), NKG2D (б) и IFN- γ (в) у слезини мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Такође, проценат CD3⁻ CD49⁺ NK ћелија које продукују IL-10 је био значајно нижи код WT мишева на анти- PD-1 терапији у односу на WT мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 40).



Фигура 40. Анти- PD-1 терапија значајно смањује експресију IL-10 у NK ћелија слезине. Графикон илуструје значајно смањен проценат NK ћелија које експримирају IL-10 у слезини мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретираних BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

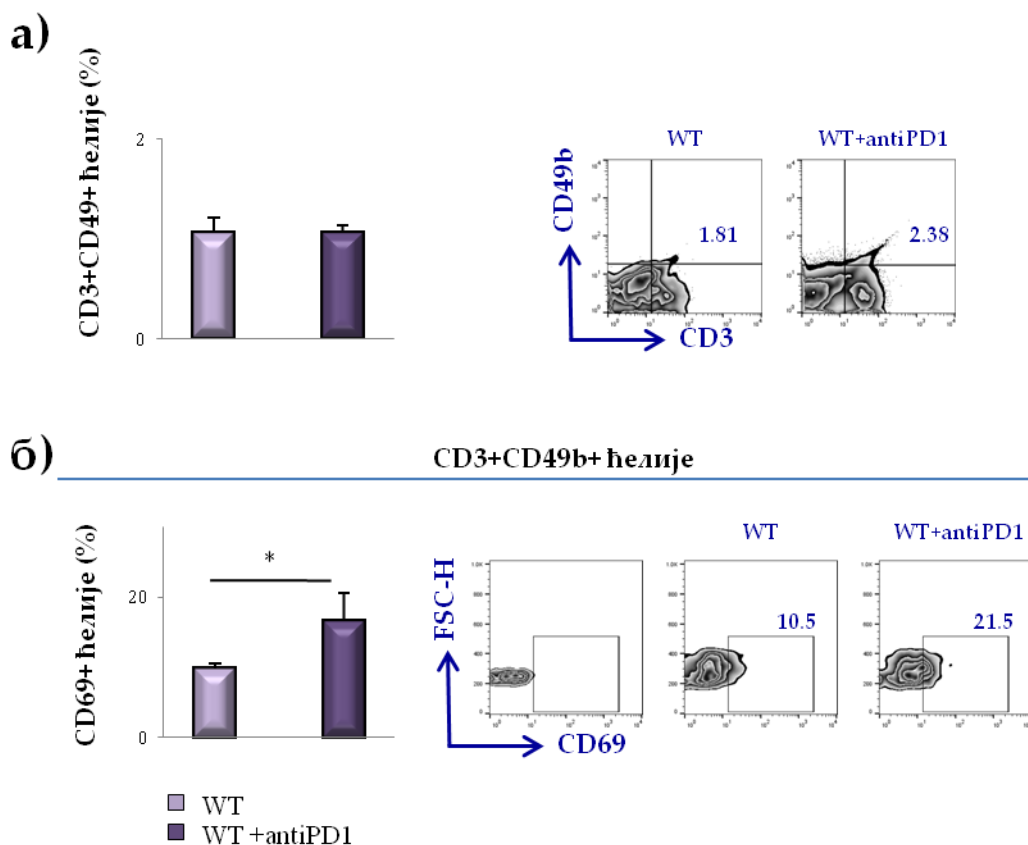
У туморској микросредини, анти PD-1 терапија је значајно повећала акумулацију CD3⁻ CD49⁺ NK ћелија које експримирају NKG2D у примарном тумору WT мишева у односу на WT мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 41a). Такође, проценат заступљености CD3⁻ CD49⁺ NK ћелија које експримирају FoxP3 је био значајно мањи у туморима WT мишева на анти -PD-1 терапији у односу на WT мишеве без терапије (p<0.05; Фигура 41b).



Фигура 41. Анти- PD-1 терапија значајно повећава експресију NKG2D и смањује експресију FoxP3 на NK ћелијама изолованих из примарног тумора. Повећан проценат NK ћелија које експримирају NKG2D (а), а смањен проценат NK ћелија које експримирају FoxP3 у примарном тумору BALB/с мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/с мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

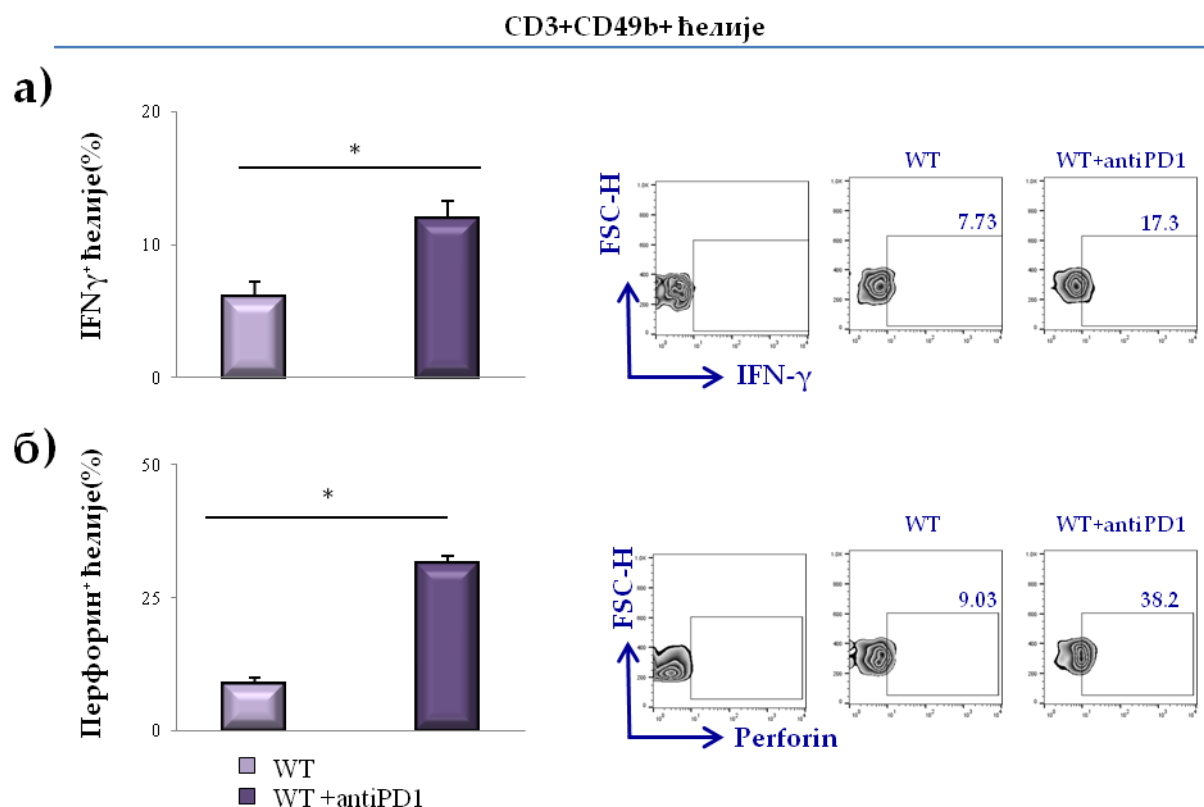
4.16. Ефекат блокаде PDL/PD-1 на NKT ћелије

Анти PD-1 терапија није значајно променила процентуалну заступљеност $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија у слезини WT мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу на WT мишеве без терапије (Фигура 42а). Са друге стране, анти PD-1 терапија је значајно повећала експресију CD69 молекула на $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелијама у слезини BALB/с мишева на анти-PD-1 терапији ($p < 0.05$; Фигура 42б).



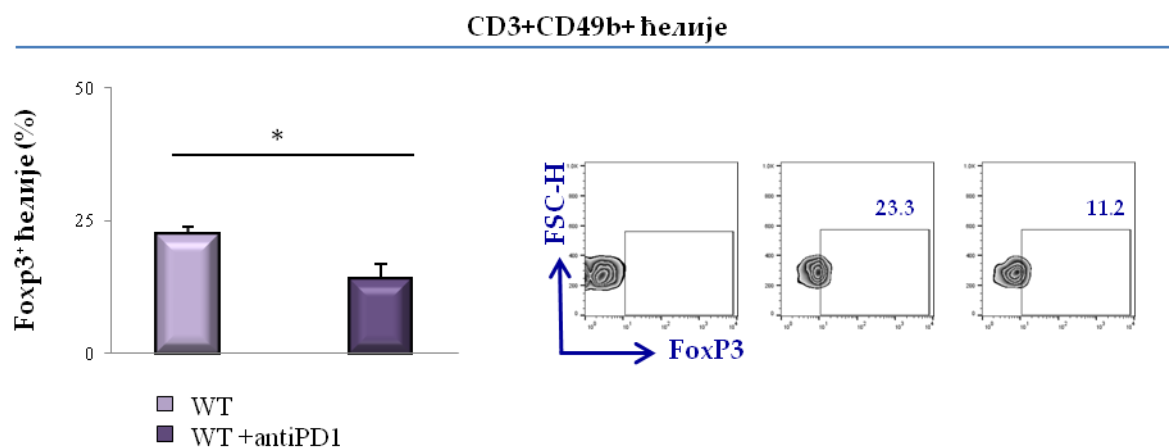
Фигура 42. Анти- PD-1 терапија значајно повећава заступљеност $CD69^+ CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија у слезини. Нема разлике у процентуалној заступљености $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија у слезини међу групама (а). Графикон б илуструје значајно већу процентуалну заступљеност $CD69^+$ NKT ћелија у слезини BALB/с мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/с мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

Такође, проценат $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија које продукују $IFN\gamma$ и perforin је био значајно већи у слезини WT мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу на WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 44а,б).



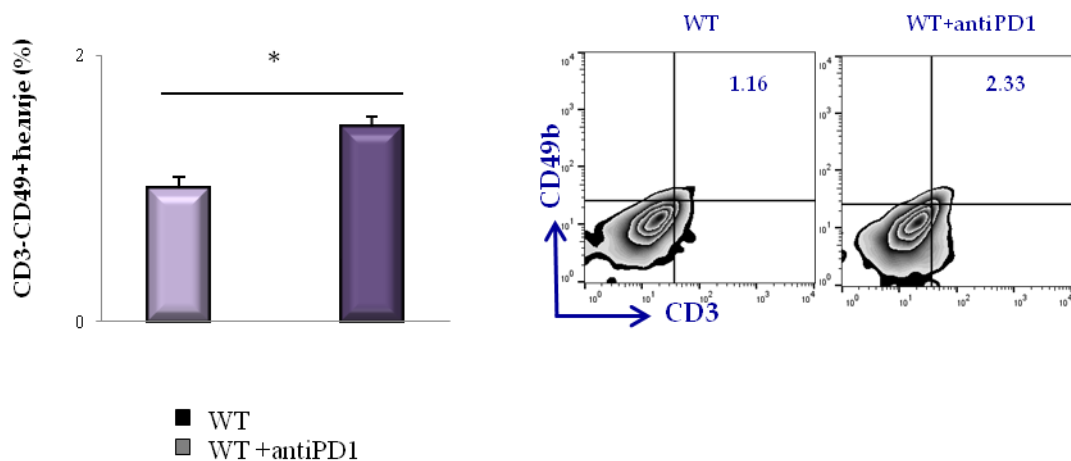
Фигура 43. Анти- PD-1 терапија значајно повећава заступљеност $IFN\gamma^+$ и перфорин⁺NK ћелијау слезини. Већа процентуална заступљеност NKT ћелијакоје експримирају $IFN\gamma$ (а) и перфорин (б) у слезини BALB/c мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

С друге стране, проценат заступљености $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија које експримирају транскрипциони фактор FoxP3 је био значајно мањи у слезини WT мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу на WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 45).



Фигура 44. Анти- PD-1 терапија значајно смањује експресију FoxP3⁺ NKT ћелија у слезини. Графикон илуструје значајно смањен проценат NKT ћелија које експримирају FoxP3молекулу у слезини BALB/c мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретираних BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

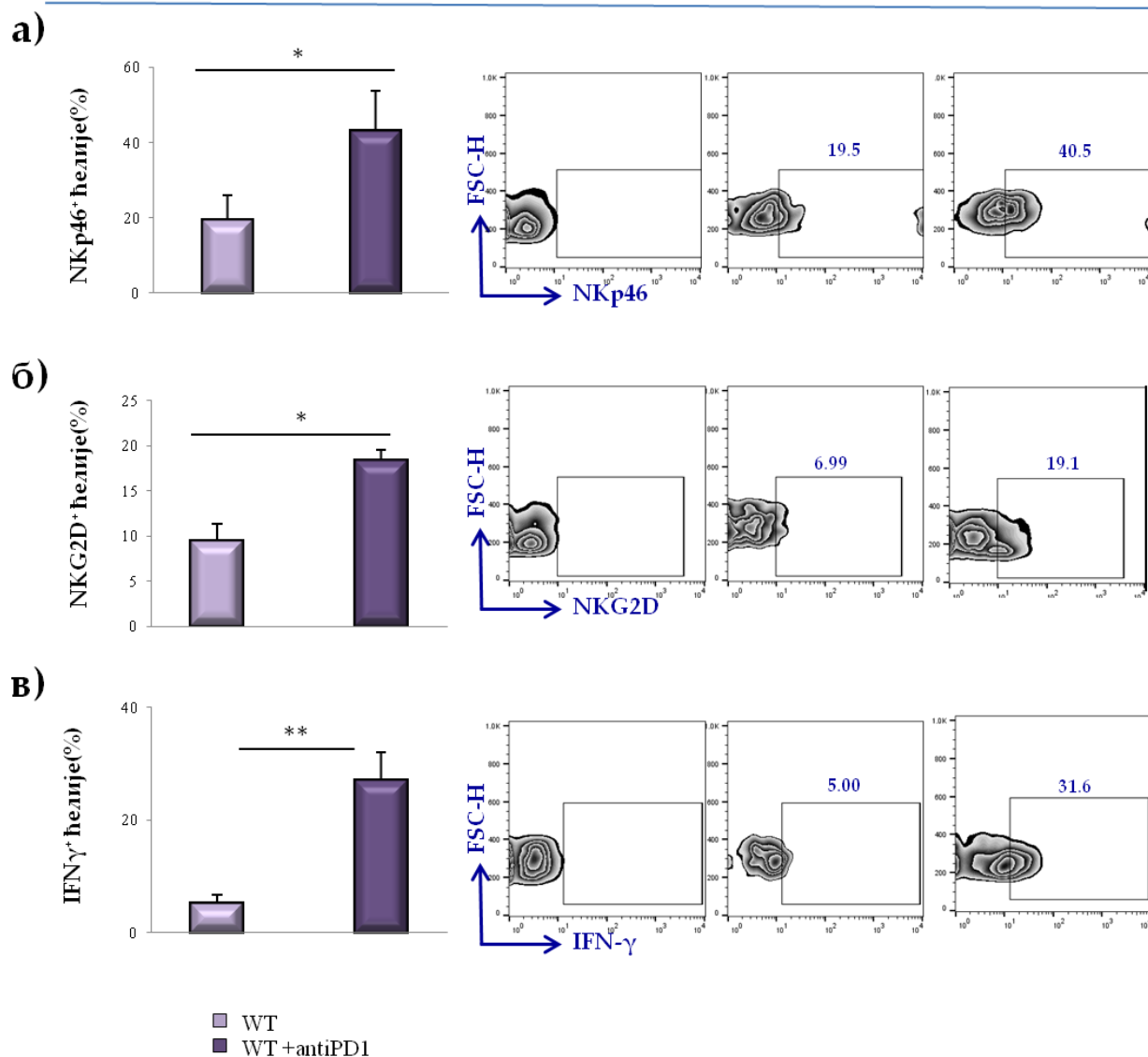
Анти-PD1 терапија је значајно повећала процентуалну заступљеност $CD3^+CD49b^+$ NKT ћелија у туморској микросредини, у односу на туморску микросредину WT мишева без терапије ($p < 0.05$; Фигура 45).



Фигура 45. Анти- PD-1 терапија значајно појачава акумулацију NKT ћелија у туморској микросредини. Графикон илуструје значајно повећање заступљености NKT ћелија у туморској микросредини BALB/c мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

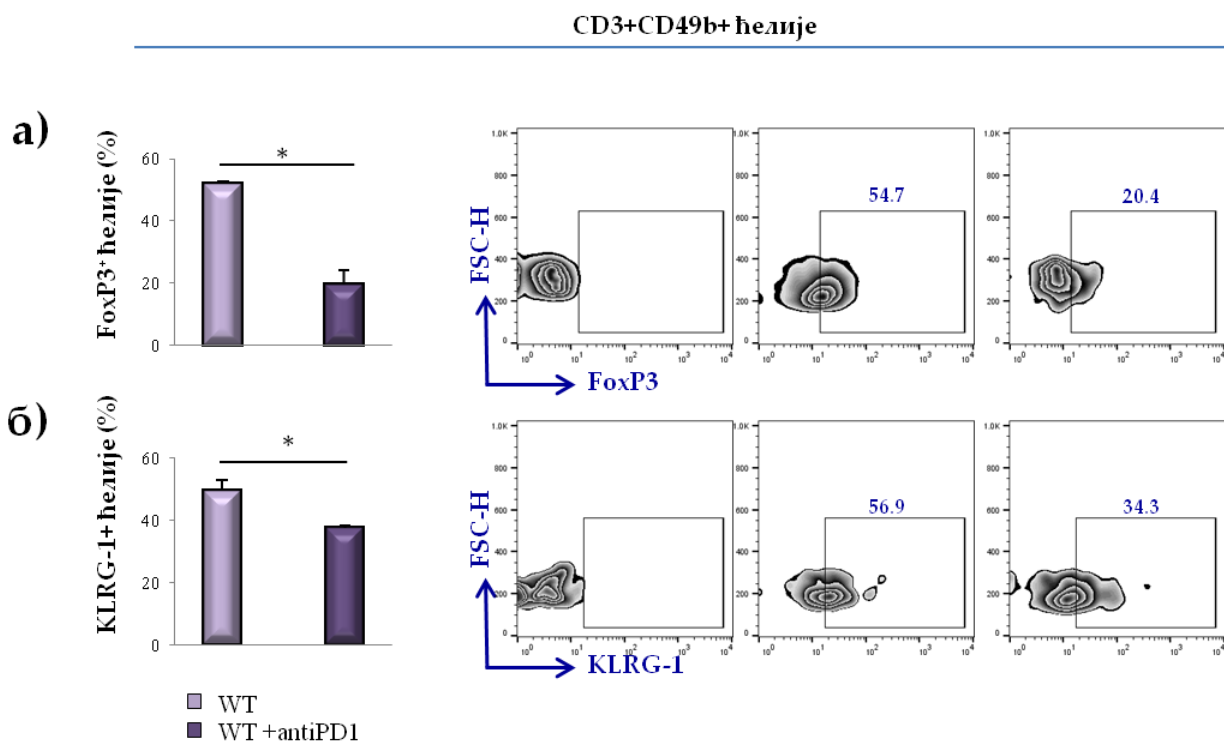
Процент NKp46⁺ и NKG2D⁺ CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у примарном тумору је био значајно већи код WT мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу на WT мишеве без терапије ($p < 0.05$; Фигура 46а,б). Експресија IFN γ ⁺ је била значајно већа у CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелијама у примарном тумору WT мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу на примарни тумор WT мишева без терапије ($p < 0.05$; Фигура 46в).

CD3+CD49b+ ћелије



Фигура 46. Анти- PD-1 терапија значајно повећава заступљеност NKp46⁺, NKG2D⁺ и IFN γ ⁺ NKT ћелија у туморској микросредини. Графикони а, б, в илуструју значајно повећање процента NKT ћелија које експримирају NKp46, NKG2D и IFN γ у туморској микросредини BALB/c мишева третираних анти-PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/c мишове. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

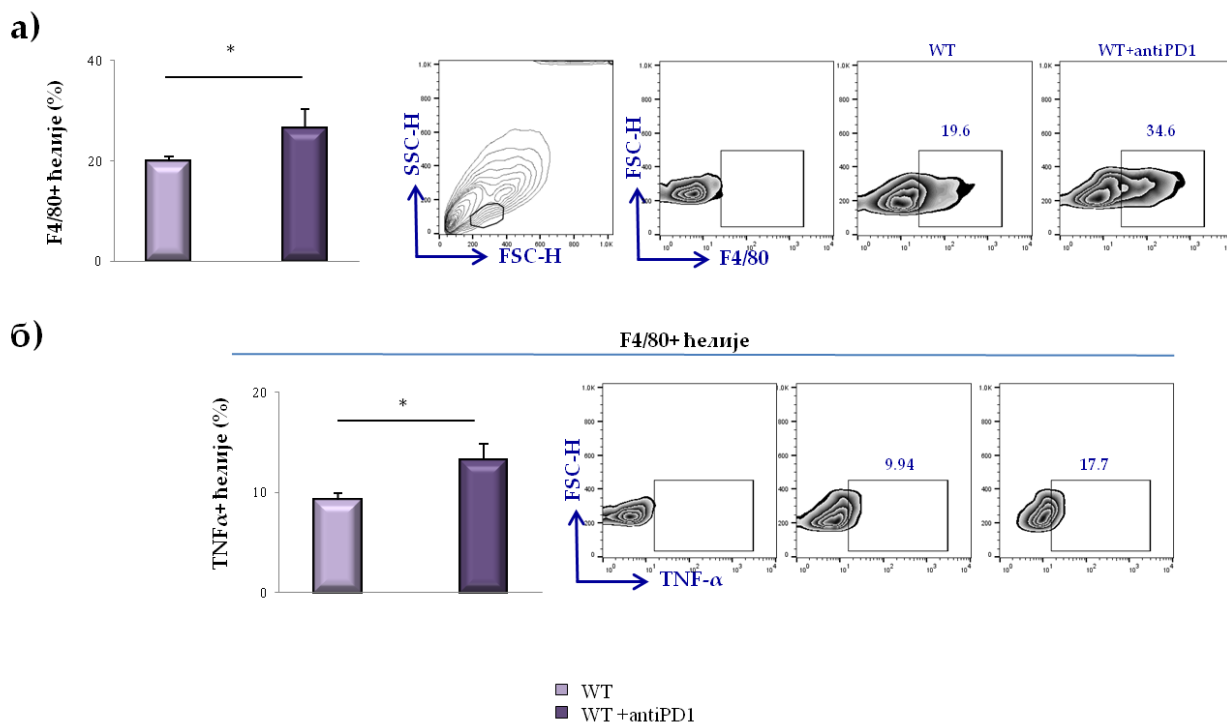
Такође, процентуална заступљеност KLRG1⁺ и FoxP3⁺ CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија је била значајно мања у примарном тумору WT мишева на анти-PD-1 терапији у поређењу на примарни тумор WT мишева без терапије (p<0.05; Фигура 47а,б).



Фигура 47. Анти- PD-1 терапија значајно смањује заступљеност FoxP3⁺ и KLRG1⁺ NKT ћелија у туморској микросредини. Графикони а и б илуструју значајно смањен проценат NKT ћелија које експримирају FoxP3 и KLRG1 у туморској микросредини BALB/c мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.17. Ефекат блокаде PD1/PD-1 на макрофаге

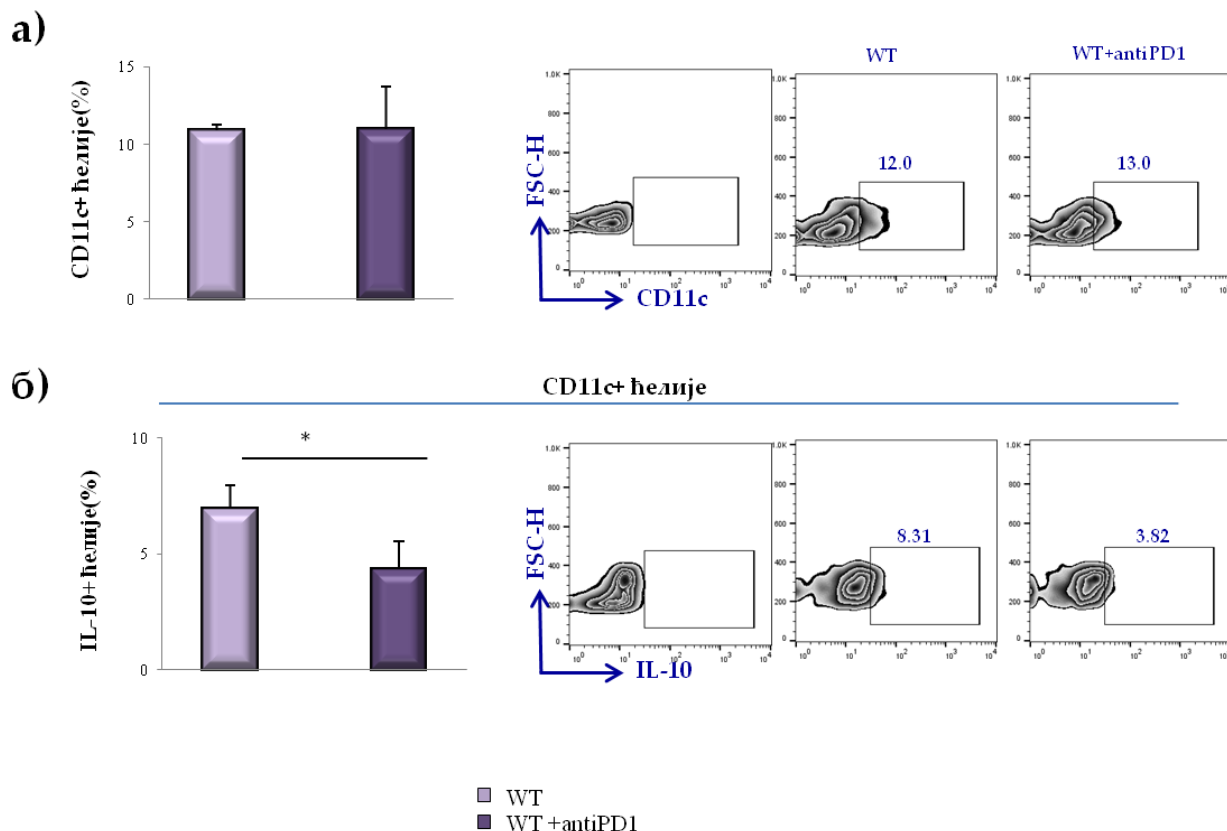
Анти- PD-1 терапија значајно појачава акумулацију F4/80⁺ макрофага у туморској микросредини BALB/с мишева у односу на BALB/с мишеве без терапије (p<0.05; Fig 48a). Такође, проценат TNF α ⁺ F4/80⁺ макрофага је био значајно већи у туморској микросредини BALB/с мишева на анти- PD-1 терапији у односу на BALB/с мишеве без терапије (p<0.05; Fig 48б)



Фигура 48. Анти-PD-1 терапија значајно повећава проценат F4/80⁺ макрофага и TNF α ⁺ F4/80⁺ макрофага у туморској микросредини. Графикона илустрјује значајно повећан проценат F4/80⁺ макрофага у туморској микросредини BALB/с мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на BALB/с мишеве без терапије. Графикон б илустрјује повећану процентуалну заступљеност F4/80⁺ макрофага који продукују TNF α у туморској микросредини BALB/с мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/с мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

4.18. Ефекат блокаде PDI/PD-1 на дендритске ћелије

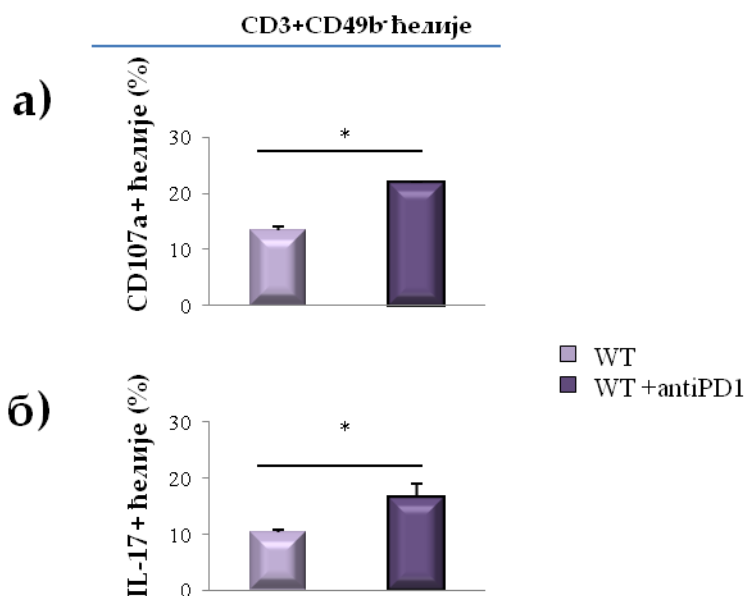
Анти- PD-1 терапија не утиче значајно на процентулану заступљеност дендритских ћелија у примарном тумору (Фигура 49а), али значајно смањује проценат IL-10⁺ дендритских ћелија (p<0.05; Fig 49б).



Фигура 49. Анти-PD-1 терапија мења фенотип дендритских ћелија у туморској микросредини. Графикона илуструје проценат CD11c⁺ дендритских ћелија у туморској микросредини, без значајне разлике међу групама. Графикон б илуструје значајно мањи проценат CD11c⁺ дендритских ћелија које продукују IL-10 у тумору BALB/c мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/c мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

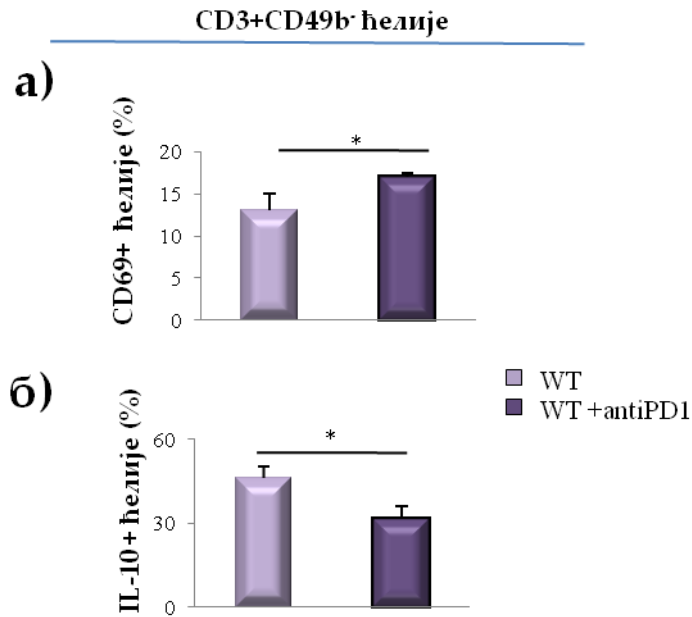
4.19. Ефекат блокаде PDI/PD-1 на Т лимфоците

Примена анти- PD-1 терапије је значајно повећала експресију CD107a молекула у CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцитима слезине (p<0.05; Fig 50a). Такође, анти-PD-1 терапија је значајно повећала и продукцију IL-17 у CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцитима слезине (p<0.05; Fig 50b).



Фигура 50. Анти-PD-1 терапија повећава проценат CD107a⁺ и IL-17⁺ Т лимфоцита слезине. Значајно повећан проценат CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцита који експримирају CD107a (а) и IL-17 (б) у слезини BALB/c мишева третираних анти- PD-1 антителима. Приказани резултати су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

У туморској микросредини, примена анти- PD-1 терапије је значајно повећала процентуалну заступљеност CD69⁺ CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцита (p<0.05; Fig 51a). Анти PD-1 терапија је значајно смањила процентуалну заступљеност IL-10⁺ CD3⁺CD49b⁻ Т лимфоцита у односу на експериментану групу без терапије (p<0.05; Fig 51b).



Фигура 51. Анти-PD-1 терапија повећава експресију CD69 и смањује експресију IL-10 молекула у Т лимфоцитима туморске микросредине. Значајно повећан проценат Т лимфоцитакоји експримирају CD69 (а), а смањен проценат Т лимфоцитакоји продукују IL-10 (б) у примарном тумору BALB/с мишева третираних анти- PD-1 антителима у односу на нетретиране BALB/с мишеве. Приказани резултати су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три засебна експеримента. Статистичка значајност је одређивана Student's T тестом.

5. ДИСКУСИЈА

У овој истраживачкој студији је испитиван утицај истовремене блокаде PDL/PD-1 и IL-33/ST2 осовина на раст и прогресију карцинома дојке и колоне и на антитуморски имунски одговор.

По први пут је показано да истовремена блокада PDL/PD-1 и IL-33/ST2 сигналних путева значајно одлаже појаву палпабилног карцинома дојке и колоректалног карцинома, у односу и на појединачну блокаду PDL/PD-1 или IL-33/ST2 сигналног пута. Поред „одложене“ појаве тумора, истовремена блокада PDL/PD-1 и IL-33/ST2 успорава раст примарног тумора. Средња вредност пречника и масе примарног тумора је била значајно мања у групи мишева са истовременом блокадом PDL/PD-1 и IL-33/ST2 сигналних путева.

У даљем истраживању су испитивани ефекти симултане блокаде PDL/PD-1 и IL-33/ST2 на анти-туморски имунски одговор.

Цитотоксичност NK ћелија према туморским ћелијама је знатно већа у условима дупле блокаде PDL/PD-1 и IL-33/ST2 осовина, *in vitro* и *in vivo*, и претежно се одвија преко унутрашњег пута апоптозе. Истовремена блокада PDL/PD-1 и IL-33/ST2 осовина значајно повећава експресију FasL, NKG2D, IFN- γ , IL-17, перфорино, а смањује експресију IL-10 и FoxP3 у NK ћелијама слезине. Двострука блокада значајно појачава акумулацију NK ћелија у примарни тумор, као и експресију NKp46, NKG2D, FasL, перфорино, а смањује експресију KLRG1 и FoxP3 молекула у NK ћелијама. Дупла блокада утиче на дуже преживљавање NK ћелија у примарном тумору, повећава експресију miRNA-155 и miRNA-150 и повећава транскрипциону активност NF κ B транскрипционог фактора у NK ћелијама.

Истовремена блокада PDL/PD-1 и IL-33/ST2 осовина смањује процентуалну заступљеност имуносупресивних популација: мијелоидних супресорских ћелија и Т регулаторних лимфоцита као и њихову активност (секрецију имуносупресивних цитокина) и у слезини и у примарном тумору.

Истовремена блокада PDL/PD-1 и IL-33/ST2 сигналних путева повећава процентуалну заступљеност NKT ћелија у слезини као и експресију NKG2D, IFN- γ , IL-17 и перфорино, а смањује експресију KLRG1, FoxP3 и IL-10 у NKT ћелијама. У примарном тумору, у условима дупле блокаде, забележена је повећана акумулација NKT ћелија које појачано експримирају FasL и IFN- γ .

Истовремена блокада PDL/PD-1 и IL-33/ST2 осовина повећава проценат Т лимфоцита у слезини, уз повећање експресије NKG2D, IL-17 и CD107a, док у примарном тумору, повећава експресију FasL, CD69 и NKG2D, а смањује експресију IL-10 и Foxp3.

Појединачна анти-PD1 терапија је значајно успорила раст тумора и повећала експресију активирајућих молекула CD69, NKp46, NKG2D у NKT ћелијама слезине и тумора и подстакла анти-туморске промене фенотипа дендритиских ћелија и макрофага у примарном тумору.

5.1. Истовремена блокада PDL/PD1 и IL33/ST2 осовина одлаже појаву и успорава раст примарног тумора

Блокада PDL/PD-1 осе појачава анти-туморску имуност. Од открића, анти PD-1 терапија је одобрена за лечење различитих врста тумора, као што су меланом, карцином бубрега, рак бешике и плућа (243). Међутим, не може се занемарити да се нежељени догађаји јављају код употребе већих доза или продужене терапије (244). Претходна истраживања су показала да блокирање IL-33/ST2 сигналног пута има сличне ефекте на раст тумора, као и анти-туморску имуност на мишићем моделу карцинома дојке, док повећани локални и серумски IL-33 корелирају са тежом и прогресивнијом болешћу код различитих типова тумора (116, 245, 246). Улога осовина IL-33/ST2 и PDL/PD-1 у биологији тумора је детаљно испитана, али подаци су врло скромни када је реч о интеракцији ових сигналних путева. У нама доступној литератури, до сада постоји само једна студија која показује да примена IL-33 у комбинацији са анти PD-1 терапијом доприноси дужем преживљавању мишева који имају акутну мијелоидну леукемију. Реч је о снажно имуногеном моделу тумора, у ком се анти-туморски имунски одговор углавном заснован на цитотоксичким Т лимфоцитима (247). Према нашем сазнању, ово истраживање је прво које показује да симултано блокирање IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина значајно одлаже појаву палпабилног тумора и успорава раст примарног тумора у експерименталним моделима карцинома дојке и колоректалног карцинома, у поређењу са појединачним блокадама IL-33/ST2 или PDL/PD-1 осовина (Фигура 1-3). Показана је већа ефикасност двоструке блокаде у одлагању појаве палпабилног тумора и успоравању његовог раста.

5.2. Истовремена блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина појачава цитотоксичност и мења фенотип NK ћелија слезине

Како оба горе поменути сигнална пута модулирају имунски одговор на тумор, у наставку истраживања испитивали смо ефекат истовремене блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина на антитуморску имуност. У истраживању смо користили експериментални модел карцинома дојке 4T1 и колоректалног карцинома CT26, код BALB/c мишева. Имајући у виду да су оба туморска модела слабо имуногена, фокусирали смо се на анализу урођеног анти-туморског имунског одговора. Прво смо анализирали цитотоксичност NK ћелија. Добијени резултати су показали да је цитотоксичност CD3⁺CD49⁺ NK ћелија појачана блокадом IL-33/ST2, а посебно блокадом PDL/PD-1 осовине. Ипак, двострука блокада ових осовина још више појачава цитотоксичност NK ћелија (Фигура 4). Да бисмо потврдили резултат који указује на појачану цитотоксичност NK анализирали смо функционални фенотип NK ћелија, у слезини и у примарном тумору. Већи проценат туморицидних FasL⁺, NKG2D⁺, перфорин⁺, IL-17⁺ и IFN- γ ⁺ NK ћелија праћен је смањеним присуством IL-10⁺ и FoxP3⁺ CD3⁺CD49⁺ NK ћелија у слезини мишева са двоструком блокадом (Фигура 6-9). Иако смо детектовали већи проценат NK ћелија које продукују IFN- γ у слезини, нисмо регистровали пораст концентрације IFN- γ у серуму BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти- PD-1 антителима (Фигура 17).

5.3. Блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина појачава акумулацију и значајно мења фенотип NK ћелија у туморској микросредини

FACS анализом тумор инфилтришућих леукоцита примарног тумора открили смо да истовремена блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина појачава акумулацију CD3⁺CD49⁺ NK ћелија, уз повећану експресију молекула NKp46, NKG2D, FasL и перфорина, а смањену експресију инхибиторног KLRG-1 и FoxP3 (Фигура 10-14). Приказани резултати заједно указују на појачану цитотоксичност и интензивнију акумулацију NK ћелија уз преминање туморицидних NK ћелија у слезини и примарном тумору мишева након блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 сигналних путева. Добијени резултати су у складу са претходно спроведеним студијама које показују пораст цитотоксичности NK ћелија и промену фенотипа у правцу туморицидних NK ћелија након блокаде PDL/PD-1 (248,249), односно IL-33/ST2 сигналног пута (250). Занимљиво је да се продукција IFN- γ и IL-10 у NK ћелијама углавном мења као резултат блокаде PDL/PD-1, док се експресија

NKp46 и перфорина мења углавном као последица блокаде IL-33/ST2 осовине (Фигура 6-9, 11-13).

5.4. Блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина интензивира пролиферацију, смањује ниво апоптозе и повећава транскрипциону активност NK ћелија у туморској средини

У наставку истраживања анализирали смо пролиферативни статус и преживљавање NK ћелија које инфилтрирају примарни тумор. Након симултане блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1, NK ћелије имају тенденцију да се више размножавају и мање су подложне апоптози, што је у складу са њиховом већом процентуалном заступљеношћу унутар примарног тумора (Фигура 15). Знатно већи проценат интратуморских NK ћелије BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти- PD-1 антителима, експримирао је транскрипционе факторе NFκB и STAT3 (Фигура 16). Транскрипциони фактор NFκB стимулише производњу и секрецију многих активирајућих цитокина у ефекторским ћелијама, између осталог и у NK ћелијама (251). Показано је да активација NFκB путем MAPK пута појачава секрецију IFN-γ и перфорина у NK ћелијама (252). Иако је експресија NFκB значајно већа у групи BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти- PD-1 антителима, наши резултати показују да је његова повећана експресија у NK ћелијама претежно последица блокаде PDL/PD-1 сигналног пута. У складу са добијеним резултатима, студија Zhou и сарадника показала је да блокада PDL/PD-1 повећава експресију NFκB у Т лимфоцитима (253). С друге стране, експресија STAT транскрипционох фактора у NK ћелијама, посебно STAT3, веома је важна за активацију NK ћелија, јер појачава експресију молекула који активирају NK ћелије као што су NKp46 и NKG2D (254). Ови налази могу објаснити промене функционалног фенотипа NK ћелија у правцу активнијег и туморициднијег услед коблокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1.

5.5. Значајно смањена локална и системска имуносупресија након блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина

Са обзиром да ко-блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 појачава акумулацију и цитотоксичку активност NK ћелија, у наставку студије испитивали смо да ли је промена функционалног фенотипа NK ћелија последица директног ефекта ко-блокаде на NK ћелије, последица интеракције са дендритским ћелијама или последица смањене супресије активности NK ћелија (255). Готово непромењени фенотип дендритских ћелија у условима ко-блокаде,

(Фигура 19), указује на незнатну улогу дендритских ћелија у подстицању NK ћелија. Затим смо тестирали потенцијалну улогу имуносупресивних ћелија у овом феномену. Добијени резултати показују значајно смањену системску концентрацију IL-10 код BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти- PD-1 антителима (Фигура 17), с једне стране, и значајно смањену процентулану заступљеност имуносупресивних ћелија као што су мијелоидне супресорске ћелије- MDSC и Т регулаторни лимфоцити (Фигура 21-23). Познато је да су главни извор IL-10 управо наведене имуносупресивне ћелије (256,257). Мијелоидне супресорске ћелије често инфилтрирају туморску микросредину, и обично су „праћене“ регулаторним Т лимфоцитима (258). Обе врсте ћелија играју важну улогу у супримирању ефекторских NK и CD8⁺ Т лимфоцита, директним контактом, имуносупресивним медијаторима или чак метаболичким оштећењем, што све заједно олакшава прогресију тумора (259,260).

Из наведених разлога анализирали смо процентуалну заступљеност и функционални фенотип мијелоидних супресорских ћелија и Т регулаторних лимфоцита у слезини и ткиву примарног тумора. Наши резултати су показали значајно мању акумулацију CD11b⁺CD11c⁻ Gr-1⁺ MDSC, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, као и Tregs које продукују IL-10 у слезини и туморској микросредини мишева са ко-блокадом IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина (Фигура 21-23). Иако је проценат Tregs које продукују IL-10 без сумње најмањи у групи BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти- PD-1 антителима, вредно је помена да је блокада IL-33/ST2 осовине у највећој мери одговорна за овај феномен (Фигура 22). Занимљиво је да ко-блокада оса IL-33/ST2 и PDL/PD-1 није утицала на експресију iNOS и IDO у мијелоидним супресорским ћелијама. Анализа експресије транскрипционог фактора NFκB у мијелоидним супресорским ћелијама показује супротне ефекте појединачне блокаде. Наиме, IL-33/ST2 блокада смањује, док PDL/PD-1 блокада повећава експресију NFκB у мијелоидним супресорским ћелијама (Фигура 21). Ови ефекти су неутрализовани код BALB/c ST2^{-/-} мишева третираних анти- PD-1 антителима где се уочава благо смањена експресија NFκB (Фигура 21). Литерални подаци указују на про-туморогену улогу NFκB у мијелоидним супресорским ћелијама (261). Имуносупресивне MDSC и Tregs које продукују IL-10, које се смањено акумулирају у слезини и тумору након двоструке блокаде, могу утицати на фенотип NK ћелија. Да бисмо испитали овај утицај, третирали смо свеже изоловане спленоците BALB/c ST2^{-/-} мишева са анти-PD-1 антителима, као и са инхибиторима IDO (1-MT) и iNOS (LNMMMA), два важна молекула ангажована на имуносупресивним ефектима MDSC и Tregs (262,263), а потом смо анализирали фенотип NK ћелија. Инхибиција IDO и iNOS појачава туморицидни фенотип

NK ћелија, у сличној мери као и блокирање само PDL/PD-1 осовине (Фигура 24). Истовремена инхибиција PDL/PD-1, IDO и iNOS још интензивније појачава туморицидни фенотип NK ћелија, што указује да блокада PDL/PD-1 осе делује независно од инхибиције IDO и iNOS (Фигура 24). Ово откриће указује да смањене имуносупресије не игра кључну улогу у промени функционалног фенотипа NK ћелија, у условима истовремене блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина.

5.6. Одсуство IL-33/ST2 сигналног пута и PDL/PD1 осовине појачава цитотоксичност NK ћелија преко перфорин/гранзим В пута апоптозе

Тест цитотоксичности са свеже изолованим NK ћелијама показује да истовремена блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина директно појачава ефекторске функције NK ћелија (Фигура 25). Добијени резултати указују да у основи повећане цитотоксичности NK ћелија јесте деловање симултане блокаде. Како NK ћелије користе најмање два различита пута за елиминацију туморских ћелија, урадили смо додатан *in vitro* експеримент да бисмо утврдили који је пут апоптозе претежно активиран NK ћелијама у условима двоструке блокаде. Појединачним блокирањем апоптотичних путева, као што је претходно описано (240), показали смо да је ћелијска смрт туморских ћелија доминантно индукована путем перфорин/гранзим В, док спољашњи пут апоптозе игра значајно мању улогу у цитотоксичности (Фигура 25).

5.7. Блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина мења експресију miRNA у NK ћелијама

Како су до сада приказани резултати указали на директан ефекат IL-33/ST2 и PDL/PD-1 ко-блокаде на цитотоксичност и измењен фенотип NK ћелија (Фигура 25), наш следећи циљ је био да утврдимо да ли двострука блокада изазива епигенетске промене у NK ћелијама које могу бити један од разлога за повећану активацију NK ћелија. Недавне студије сугеришу да неколико не-кодирајућих кратких сегмената RNA (енгл. *micro ribonucleic acid, miRNA*) могу директно и/или индиректно да контролишу експресију површинских молекула важних за активност NK ћелија (264). Између осталих, miRNA-150, miRNA-155 и miRNA-146 су међу најбоље окарактерисаним miRNA у NK ћелијама. Анализа експресије ових miRNA у NK ћелијама показује значајно повећану експресију miRNA-150 и miRNA-155 у NK ћелијама мишева са двоструком блокадом IL-33/ST2 и PDL/PD-1, док двострука блокада није значајно утицала на експресију miRNA-146а

(Фигура 26). Познато је да је miRNA-146a претежно негативни регулатор производње цитокина у NK ћелијама (232). miRNA-150 може деловати инхибиторно циљајући перфорин унутар NK ћелија и смањујући цитотоксичност NK ћелија (265), али такође може стимулирати развој и сазревање NK ћелија у лимфним чворовима и слезини, стимулирати покретање имунског одговора и производњу IFN- γ (216). Претходне студије су потврдиле да је miRNA-155 један од главних активатора производње IFN- γ и да прекомерна експресија miRNA-155 повећава цитотоксичност NK ћелија и појачава NF κ B сигнализацију у NK ћелијама (266, 267). Такође, показано је да miRNA-155 у експерименталном моделу карцинома дојке миша игра улогу у процесу инфилтрације NK ћелија у туморско ткиво (222). У складу са овим налазима и нашим претходним резултатима да двострука блокада појачава NF κ B сигнализацију (Фигура 16), производњу IFN- γ (Фигура 8) и акумулацију NK ћелија у ткиву тумора (Фигура 10), верујемо да IL-33/ST2 и PDL/PD-1 ко-блокада примарно индукује епигенетске промене кроз прекомерну експресију miRNA-150 и miRNA-155 у NK ћелијама, мења транскрипциону активност и појачава туморицидни фенотип NK ћелија.

5.8. Блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина повећава акумулацију M1 макрофага у туморској микросредини

Симултана блокада осовина IL-33/ST2 и PDL/PD-1 има повољне ефекте и на друге ћелијске популације, како у слезини, тако и у примарном тумору. Када су у питању макрофаги, наши резултати показују да двострука блокада не утиче значајно на повећање процентуалне заступљености макрофага и измену њиховог фенотипа у слезини (Фигура 27), али значајно појачава акумулацију F4/80⁺CD86⁺ макрофага, као и макрофага који продукују TNF- α (Фигура 28). Доступни подаци указују на то да приликом блокаде, обе осовине имају одређене ефекте на макрофаге туморске микросредине. Раније је показано да блокирање IL-33/ST2 осовине смањује заступљеност M2 макрофага у туморској средини (268), док друге студије указују на то да примена анти- PD1 антитела повећава заступљеност M1 макрофага у туморској средини (269). С друге стране, поједини аутори су показали да примена анти- PD1 антитела не мења значајно заступљеност ових ћелија у туморском ткиву, већ да много значајније утиче на њихов фенотип. Наиме, у току примене анти- PD1 антитела значајно се смањује експресија аргиназе (Arg1⁺), једне од одлика M2 фенотипа макрофага (270, 271).

5.9. Блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина повећава заступљеност NKT ћелија у слезини и примарном тумору и мења њихов фенотип

Блокада PDL1/PD1 и IL-33/ST2 сигналних путева повећава процентуалну заступљеност NKT ћелија у слезини, смањује експресију инхибиционог маркера KLRG1, транскрипционог фактора FoxP3 и продукцију IL-10, док повећава експресију активационих маркера на NK ћелијама FasL, NKG2D као и продукцију IL-17, IFN- γ и перфорина (Фигура 29-31). У тумору, блокада PDL1/PD1 и IL-33/ST2 сигналних путева повећава процентуалну заступљеност NKT ћелија, као и експресију активационог маркера FasL и повећава продукцију IFN- γ (Фигура 32-33). Када су у питању NKT ћелије, наши резултати указују да симултана блокада осовина IL-33/ST2 и PDL/PD-1 повећава њихову заступљеност и у слезини и у тумору смањује експресију имуносупресивних молекула, док повећава експресију активационих молекула. Раније је показано да PDL/PD-1 блокада спречава енергију NKT ћелија у моделу мишјег меланома, као и да спречава настанак метастаза (272,273,274). С друге стране, познато је да IL-33 стимулише развој NKT ћелија које су фенотипски сличне помагачким Т лимфоцитима другог типа, а које супримирају анти-туморски имунски одговор (275,276). Синергистички, блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина доприноси активнијем фенотипу који ефикасно учествује у анти-туморском имунском одговору.

5.10. Блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина повећава заступљеност Т лимфоцита уз повећање експресије активационих молекула

Ефекат двоструке блокаде PDL1/PD-1 и IL-33/ST2 сигналних путева повећава процентуалну заступљеност Т лимфоцита у слезини, повећава експресију активационог маркера NKG2D као и продукцију IL-17 и CD107a (Фигура 34-35). У туморској микросредини, истовремена блокада PDL1/PD1 и IL-33/ST2 сигналних путева не утиче на процентуалну заступљеност Т лимфоцита, али повећава експресију активационих маркера FasL, CD69, NKG2D, смањује експресију транскрипционог фактора Foxp3 и смањује продукцију IL-10 (Фигура 36-38). Доступна литература показује да IL-33 промовише развој тумора тако што стимулише експанзију Т регулаторних лимфоцита (277-280). Скорашњи подаци указују да анти- PD-1 терапија, осим продужавања полуживота ефektorских Т лимфоцита, може инхибирати поларизацију Т лимфоцита у правцу Т регулаторних лимфоцитима (281) и ефикасно смањити инфилтрацију Т регулаторних лимфоцита у туморски микросредину (282).

Приказани резултати указују да комбинација блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 сигналних путева успорава појаву и раст експерименталног карцинома дојке и колоректалног карцинома, више од појединачне блокаде. Ко-блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 повећава експресију miRNA-150 и miRNA-155, појачава цитотоксичност NK ћелија према 4T1 ћелијама, барем делимично кроз појачану активност NFκB и STAT3 транскрипционих фактора и следствену експресију FasL, NKG2D, NKp46, перфорина, IL-17 и IFN-γ и активацију перфорин/гранзим В апоптотског пута. Неке промене у функционалном фенотипу NK ћелија су претежно резултат појединачне блокаде, али већина њих је последица деловања ко-блокаде. Претпостављамо да ко-блокада примарно индукује епигенетске промене прекомерном експресијом miRNA-150 и miRNA-155 у NK ћелијама, мења транскрипциону активност и фаворизује туморицидни фенотип NK ћелија.

5.11. Ефекат блокаде PDL/PD-1 на NK ћелије

Показали смо и да појединачна блокада PDL/PD-1 има повољне ефекте на популацију NK ћелија у слезини и примарном тумору. Наиме, примена анти-PD-1 антитела повећава заступљеност NK ћелија уз повећану експресију FasL, NKG2D и IFN-γ, а смањену Foxp3, IL-10 у NK ћелијама (Фигура 39-41). Добијени резултати су у сагласности са студијама које су раније показале сличне фенотипске промене NK ћелија приликом примене анти- PD-1 терапије (283,284). Приликом симултане блокаде PDL1/PD-1 и IL-33/ST2, процентуална заступљеност и фенотип NK ћелија је значајније измењен у смеру туморицидног фенотипа, како у слезини, тако у туморској микросредини. Стога, симултана блокада PDL1/PD-1 и IL-33/ST2 осовина доприноси знатно ефикаснијем анти-туморском имунском одговору у поређењу са појединачном блокадом PDL1/PD-1.

5.12. Ефекат блокаде PDL/PD-1 на NKT ћелије

Потом смо анализирали ефекат појединачне блокаде PDL1/PD-1 на NKT ћелије. Као што је већ познато, NKT ћелије играју важну улогу у антитуморском имунском одговору. Како ове ћелије имају огроман капацитет за брзо продукују IFN-γ, IL-2, TNF-α и IL-4 након стимулације антигеном с једне стране, и могућност специфичног препознавања антигена с друге стране, NKT ћелије могу бити једна од првих ћелија које подстичу анти-туморски имунски одговор (285). Доступни подаци указују да присуство малигнух тумора може пореметити метаболизам масних киселина. NKT ћелије које углавном препознају липидне антигене донекле имају могућност да инхибирају прогресију тумора, са обзиром

да препознају измењене липидне антигене (286). Такође, интеракција NKT ћелија са другим ћелијама урођене имуности, као што су антиген-презентујуће ћелије може додатно стимулисати свеукупни анти-туморски имунски одговор (287,288,289). Иако проценат CD3⁺CD49⁺ NKT ћелија у слезини мишева третираних анти-PD-1 остаје непромењен (Фигура 42), фенотип CD3⁺CD49⁺ NKT ћелија се значајно мења. Наши резултати показују значајно већи проценат CD69⁺ CD3⁺ CD49⁺ ћелија код мишева третираних анти-PD-1, што имплицира да би анти-PD-1 терапија могла да подстакне активацију CD3⁺CD49⁺ NKT ћелија у слезини (Фигура 42).

У складу са добијеним резултатом, показано је да у туморима који су праћени великим степеном имуносупресије, као што су карциноми главе и врата, лиганди за PD-1 у ткиву тумора потенцијално инхибирају експресију CD69, и последично умањују активацију имунокомпетентних ћелија (290). Терапија анти-PD-1 такође је значајно повећала проценат IFN- γ ⁺ CD3⁺CD49⁺ NKT ћелија у слезини (Фигура 43). Доступни подаци сугеришу да анти-PD-1 терапија повећава експресију IFN- γ и инхибира напредовање агресивних тумора као што су NK/T лимфом (291). Такође, показано је да повећана продукција IFN- γ у NKT ћелијама стимулише анти-туморски имунски одговор посредован цитотоксичким Т лимфоцитима (CTL) у моделу високо имуногеног Т ћелијског лимфома (292). С друге стране, анти-PD-1 терапија је такође појачала продукцију перфорина у CD3⁺CD49⁺ NKT ћелијама, што сугерише да анти-PD-1 терапија може директно да повећа цитотоксички потенцијал NKT ћелија (Фигура 43). Поред тога, експресија имуносупресивног транскрипционог фактора Foxp3 била је значајно нижа код CD3⁺CD49⁺ NKT ћелија мишева третираних анти-PD-1 (Фигура 44). То показује да анти-PD-1 терапија, поред директног појачавања производње IFN- γ , истовремено слаби имуносупресивна својства NKT ћелија, што доприноси укупном повећању туморицидног фенотипа NKT ћелија.

Што се тиче туморске микросредине, проценат CD3⁺CD49⁺ NKT ћелија био је значајно већи код мишева третираних анти-PD-1 (Фигура 45), што имплицира интензивну акумулацију NKT ћелија у примарном туморском ткиву услед анти-PD-1 терапије. Као што је већ познато, присуство NKT ћелија у примарном туморском ткиву модификује микро средину тумора излучујући IFN- γ , који активира ефекторске ћелије, и потискује имуносупресивне популације, омогућавајући тако ефикаснији анти-туморски имунски одговор (293,294,295). Наши резултати указују да би анти-PD-1 терапија могла да стимулише ова корисна својства NKT ћелија. Такође, проценат NKp46⁺ и NKG2D⁺ NKT ћелија је значајно већи код мишева третираних анти-PD-1 (Фигура 46), што одражава

активнији фенотип NKT ћелија у примарном тумору. Слично као и у слезини, анти-PD-1 терапија је повећала процентуалну заступљеност CD3⁺ CD49⁺ NKT ћелија које производе IFN- γ у примарном туморском ткиву (Фигура 46). Даље, експресија маркера FoxP3 и KLRG-1 у CD3⁺ CD49⁺ NKT ћелијама је значајно смањена у примарном тумору (Фигура 47), што указује на фенотип NKT ћелија који је мање склон анергији (293).

5.13. Ефекат блокаде PDI/PD-1 на макрофаге и дендритске ћелије

Како је познато да NKT ћелије интерреагују са многим леукоцитима, као што су Т лимфоцити, дендритске ћелије и макрофаги (296,297), као и чињеница да карцином дојке 4T1 представља слабо имуногени тумор, даље смо анализирали дендритске ћелије и макрофаге унутар примарног тумора. Макрофаги повезани са тумором (енгл. *tumor-associated macrophages, TAMs*) су једна од најзаступљенијих ћелијских популација у ткиву примарног тумора (298). Макрофаги који се налазе у туморској микросредини углавном су имunosупресивног M2 фенотипа, што олакшава прогресију тумора (299). С обзиром на широк спектар имуномодулаторних својстава макрофага, стимулисање ових ћелија може бити од великог значаја када је у питању истраживање ефикаснијих терапијских стратегија код малигнитета. Као што је познато, макрофаги могу стимулисати имунски одговор против тумора, секрецијом TNF- α , а такође и инхибирати анти-туморски имунски одговор, секрецијом IL-10 који индукује имunosупресију (300,301). Наши резултати су показали да је анти-PD-1 терапија значајно повећала процентуалну заступљеност F4/80⁺ макрофага у примарном тумору (Фигура 48), и значајно појачава производњу TNF- α у F4/80⁺ макрофагима (Фигура 48), што је главно обележје M1 фенотипа (302).

Анти-PD-1 терапија није променила проценат CD11c⁺ дендритских ћелија у туморској микросредини (Фигура 49). Ипак, проценат CD11c⁺ дендритских ћелија које продукују IL-10 је значајно смањен у групи која је лечена анти-PD-1 терапијом (Фигура 49). Дендритске ћелије, као професионалне антиген-презентујуће ћелије непрестано циркулишу кроз микросредину тумора, где су континуирано изложене имunosупресивним молекулама које производе ћелије карцинома (303). У таквим околностима, дендритске ћелије могу постати толерогене и чак стимулисати даљу имunosупресију секрецијом цитокина као што је IL-10 (304). Према својој улози у имунском одговору, дендритске ћелије се традиционално деле у две групе: конвенционалне или класичне дендритске ћелије и плазмоцитоидне дендритске ћелије (51). Конвенционалне дендритске ћелије експримирају висок ниво MHC молекула обе

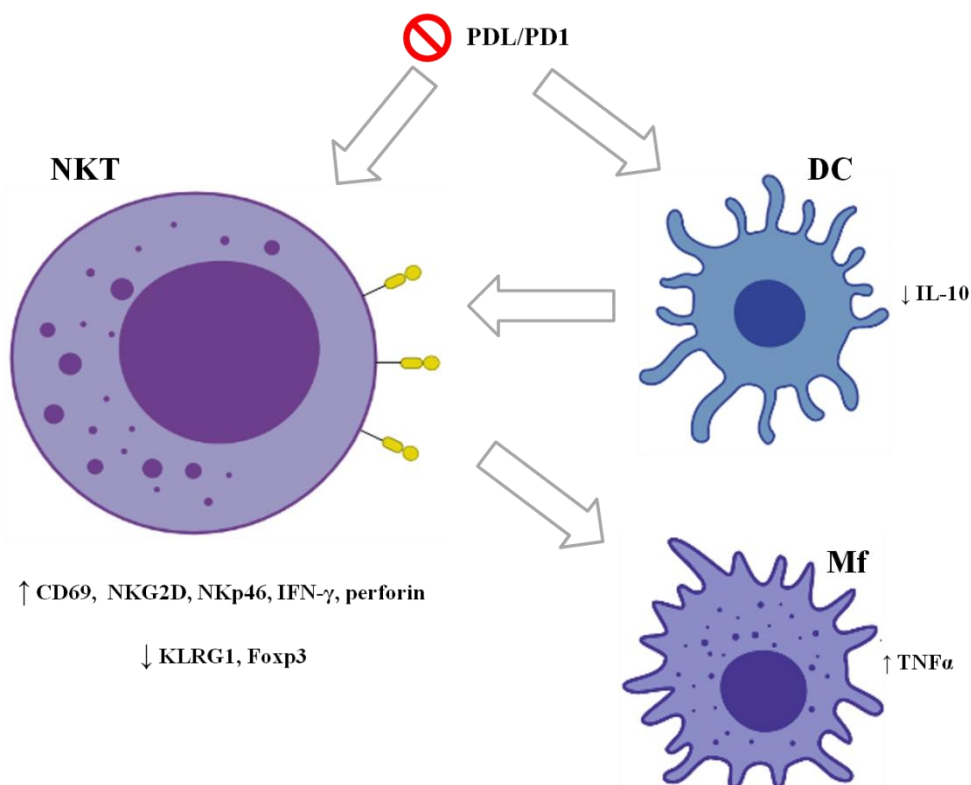
класе, стимулишући тако анти-туморски имунски одговор, док су плазмоцитоидне дендритске ћелије углавном укључене у секрецију интерферона типа I. У току анти-туморског имунског одговора, дендритске ћелије могу, сходно сигнаlima из околине, мењати свој фенотип између толерогеног и ефекторског фенотипа (305,306). Како су наши резултати показали изразито смањену експресију IL-10 у дендритским ћелијама, верујемо да би анти-PD-1 терапија бар делимично, могла смањити поларизацију дендритских ћелија према толерогеном фенотипу. Дендритске ћелије, као што је познато, ступају у интеракцију са NKT ћелијама, директним контактом или индиректно, преко експресије и секреције молекула, као што су CD40, интерферони типа I и II, IL-10, TNF- α (307). Дендритске ћелије мишева третираних са анти-PD-1 могу ефикасно активирати NKT ћелије, поред већ показане директне активације NKT ћелија услед анти-PD-1 терапије. Као што је претходно поменуто, NKT ћелије након активације брзо луче цитокине који активирају друге ћелије имунског система, попут макрофага. Како наши резултати показују појачану продукцију IFN- γ у NKT ћелијама након анти-PD-1 терапије, а IFN- γ снажно стимулише диференцијацију и активацију M1 макрофага (308), претпостављамо да NKT ћелије након анти-PD-1 терапије подстичу поларизацију макрофага ка анти-туморском M1 фенотипу.

5.14. Ефекат блокаде PD1/PD-1 на Т лимфоците

Анти PD-1 терапија повећава проценат CD107a⁺ и IL-17⁺ Т лимфоцита слезине (Фигура 50), што је већ раније показано (309,310). У туморској микросредини, након примене анти-PD-1 терапије, постоји повећан проценат CD69⁺ Т лимфоцита, а смањен ниво продукције имуносупресивног IL-10 (Фигура 51), што је већ раније показано (311,312). Наши резултати указују да, осим што симултана блокада још значајније повећава експресију горе поменутих активационих маркера на Т лимфоцитима и доприноси и већој процентулној заступљености Т лимфоцита у слезини. У туморској микросредини, додатно смањује експресију имуносупресивног IL-10, које је праћено и значајно сниженом експресијом имуносупресивног транскрипционог фактора Foxp3. Такође, значајније повећава заступљеност CD69⁺ Т лимфоцита, које је уз то праћено и значајно повећаном експресијом активационих маркера FasL и NKG2D.

Узимајући у обзир приказане резултате, верујемо да анти PD-1 терапија активира NKT ћелију директно, али и индиректно преко дендритских ћелија. Активиране NKT ћелије испољавају туморицидна својства директно, секрецијом перфорина и индиректно, поларизацијом макрофага према M1 фенотипу, као што је приказано на Фигури 52.

Потребне су даље студије како би се разјаснила међусобна интеракција између NKT ћелија и других ћелија имунског система у контексту анти-PD-1 терапије.



Фигура 52. Ефекат анти-PD1 терапије на NKT, дендритске ћелије и макрофаге.

Анти PD1 терапија делује директно на NKT ћелије фацилитирајући про-туморицидни фенотип, који даље поларизује макрофаге према M1 фенотипу преко повећане продукције IFN- γ . Анти-PD1 терапија смањује продукцију IL-10 у дендритским ћелијама, чинећи их мање толерогеним и ефикаснијим у активирању NKT ћелија.

6. ЗАКЉУЧЦИ

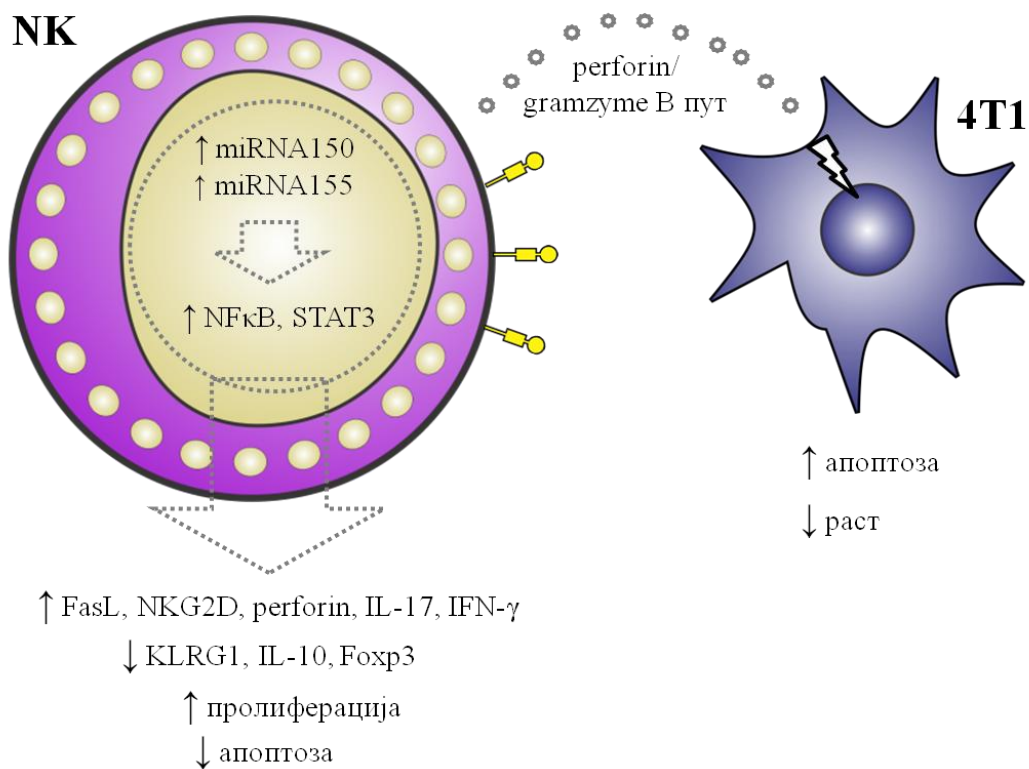
Резултати овог истраживања по први пут показују да истовремена блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 сигналног пута значајно успорава раст карцинома дојке и колона. Комбинована блокада индукује епигенетске промене и повећава транскрипциону активност у NK ћелијама, повећавајући цитотоксичност претежно преко унутрашњег пута апоптозе и промовишучи туморицидни фенотип, а уједно смањује заступљеност и дејство имуносупресивних ћелија (Фигура 53). Комбинована блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 успорава раст тумора чак и са мањим дозама анти- PD-1 терапије, што умањује могућност нежељених дејстава терапије посредованих имунским механизмима.

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

Симултана блокада IL-33/ST2 и PDL/PD-1 сигналних путева:

- 1) одлаже појаву палпабилног тумора у експерименталном моделу карцинома дојке и колона;
- 2) успорава раст примарног тумора дојке и колона;
- 3) појачава акумулацију NK ћелија у туморску микросредину;
- 4) интензивира пролиферацију а инхибира апоптозу NK ћелија у туморској микросредини;
- 5) повећава експресију miRNA-150 и miRNA-155 у NK ћелијама;
- 6) појачава транскрипциону активност NF κ B и STAT3 у NK ћелијама;
- 7) повећава експресију NKG2D, FasL, IL-17, IFN- γ , док смањује експресију KLRG-1 и Foxp3, у NK ћелијама слезине;
- 8) повећава експресију NKp46, NKG2D, FasL, перфорино, док смањује експресију KLRG-1 и Foxp3 у NK ћелијама туморске микросредине;
- 9) појачава цитотоксичност NK ћелија, преко перфорин/гранзим В пута апоптозе;
- 10) појачава акумулацију и активацију НКТ, дендритских ћелијама, макрофага и Т лимфоцита;
- 11) смањује заступљеност мијелоидних супресорских ћелија и Т регулаторних лимфоцита као и њихову активност, у слезини и у тумору;
- 12) активира NK ћелија независно од IDO и iNOS

 PDL/PD1 и IL-33/ST2



Фигура 53. Комбинована блокада PDL/PD1 и IL-33/ST2 сигналних путева индукује активацију NK ћелија кроз повећану експресију miRNA-150 и miRNA-155, активност транскрипционих фактора NFκB и STAT3 и следствену повећану експресију FasL, NKG2D, перфорино, IL-17, IFN- γ и смањену експресију KLRG1, IL-10 и Foxp3. Све наведено појачава цитотоксичност NK ћелија према 4T1 ћелијама преко перфорин/гранзим B пута апоптозе доприносећи успореном расту тумора.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

GC	енгл. Gastric cancer
GERD	енгл. Gastroesophageal reflux disease
GLOBOCAN	енгл. The Global Cancer Observatory
CDH1	енгл. cadherin 1 gene
CTNNA1	енгл. catenin alpha 1 gene
TP53	енгл. tumor protein p53
APC	енгл. Adenomatous polyposis coli, фамилијарна аденоматозна полипоза
STK11	енгл. serine/threonine kinase 11
CagA	енгл. cytotoxin-associated gene A
EPIC	енгл. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
MNNG	енгл. Methylnitrosoguanidine
NSAIL	Нестероидни антиинфламацијски лекови
WHO	енгл. World Health Organisation, Светска здравствена организација
SLE	енгл. siaryl Lewis X antigen
BCA-225	енгл. human breast carcinoma associated glycoprotein
hCG	енгл. Human chorion gonadotropine, humani horionski gonadotropin
IL-32	енгл. Interleukin – 32, интерлеукин - 32
NK	енгл. Natural Killer
PBMCs	енгл. Peripheral blood mononuclear cells
HUVEC	енгл. <i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
EC	енгл. Endothelial Cell
HIV	енгл. human immunodeficiency virus
TNFα	енгл. tumor necrosis factor alpha, фактор некрозе тумора алфа
Con A	енгл. <i>Concanavalin A</i>
LPS	енгл. Lipopolysaccharides
MAPK	енгл. mitogen-activated protein kinase
NF-κB	енгл. Nuclear Factor Kappa B
DAPK-1	енгл. Death-associated protein kinase 1
ERK1/2	енгл. extracellular signal-regulated kinases
PI3K/AKT	енгл. Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B
COPD	енгл. Chronic obstructive pulmonary disease
GM-CSF	гранулоцитно-моноцитни фактор стимулације раста

HBE	ЕНГЛ. Human bronchial epithelial cell
JNK	ЕНГЛ. c-Jun N-terminal kinase
cAMP	ЕНГЛ. Cyclic adenosine monophosphate
IFN-γ	ЕНГЛ. Interferon gamma
VEGF	ЕНГЛ. Vascular endothelial growth factor
HNSCC	ЕНГЛ. Head and neck squamous cell carcinoma
STAT3	ЕНГЛ. Signal transducer and activator of transcription 3
HIF-1α	ЕНГЛ. Hypoxia-inducible factor 1 α , фактор хипоксије 1 α
HCC	ЕНГЛ. Hepatocellular carcinoma
EMT	ЕНГЛ. epithelial–mesenchymal transition
CML	ЕНГЛ. chronic myeloid leukemia
ULBP2	ЕНГЛ. UL16 binding protein 2
CTL	ЕНГЛ. Cytotoxic T lymphocyte, цитотоксични Т лимфоцит
SNP	ЕНГЛ. Single nucleotide polymorphism
TAMc	ЕНГЛ. макрофаги повезани са тумором
MDSC	ЕНГЛ. мијелоидне супресорске ћелије
Treg	регулаторни Т лимфоцити
CCL	С-С мотивом лиганда хемокина
IL-1	ЕНГЛ. Interleukin – 1, интерлеукин - 1
IL-6	ЕНГЛ. Interleukin – 6, интерлеукин - 6
IL-8	ЕНГЛ. Interleukin – 8, интерлеукин - 8
CXCL1	ЕНГЛ. chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 1
MMP	ЕНГЛ. matrix metalloproteinase
IL-17	ЕНГЛ. Interleukin – 17, интерлеукин - 17
Th17	ЕНГЛ. T helper, помагачки Т лимфоцити 17
ILC3	ЕНГЛ. Type 3 innate lymphoid cells, урођене лимфоидне ћелије групе 3
DCs	ЕНГЛ. Dendritic cells, дендритичне ћелије
G-CSF	ЕНГЛ. Granulocyte colony-stimulating factor, фактора стимулације раста гранулоцита
CTLA4	ЕНГЛ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
HMVEC	ЕНГЛ. Human Microvascular Endothelial Cell
bFGF	ЕНГЛ. basic fibroblast growth factor, FGF- β
HGF	ЕНГЛ. Hepatocyte growth factor, фактор раста хепатоцита

CXCL8	енгл. C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
AP-1	енгл. Activator protein 1
CRC	енгл. Colorectal cancer
CAM	енгл. Chorioallantoic Membrane
mTOR	енгл. mammalian target of <u>rapamycin</u>
IGF-1	енгл. фактор раста сличан инсулину 1
PDGF	енгл. тромбоцитни фактор раста
EGF	енгл. епидермални фактор раста
EPC	енгл. ендотелне ћелије прогенитори
ECM	енгл. Extracellular Matrix
PD -ECGF	ендотелни фактор раста ендотелног порекла
MCP-1	моноцитни хемоатрактантни протеин-1
MIP-1α	запаљенски протеин макрофага-1 α
TAM	тумор-асоцирани макрофаги
MVD	енгл. Microvessel density, микроваскуларна густина
AJCC	енгл. American Joint Committee on Cancer
UICC	енгл. The Union for International Cancer Control
UK NEQAS	енгл. UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887–3895
2. Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z, Wang X. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Front Immunol*. 2019 Oct 4;10:2298.
3. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Aug;23:32-8.
4. Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol*. 2020 Mar 24;11:487.
5. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515–548
6. Shlapatska LM, Mikhalap SV, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, Nichols KE, Clark EA, Sidorenko SP. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5480-7.
7. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261-8.
8. Zhang X, Schwartz JC, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, Cammer M, Chen L, Zhang ZY, Edidin MA, Nathenson SG, Almo SC. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*. 2004 Mar;20(3):337-47.
9. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34.
10. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219–242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
11. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006;203(4):883–895. doi:10.1084/jem.20051776.

12. Mariotti FR, Petrini S, Ingegnere T, Tumino N, Besi F, Scordamaglia F, Munari E, Pesce S, Marcenaro E, Moretta A, Vacca P, Moretta L. PD-1 in human NK cells: evidence of cytoplasmic mRNA and protein expression. *Oncoimmunology*. 2018 Dec 25;8(3):1557030.
13. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: a phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):335–346e3.
14. Liu Y, Cheng Y, Xu Y, Wang Z, Du X, Li C, Peng J, Gao L, Liang X, Ma C. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. *Oncogene*. 2017;36(44):6143–6153.
15. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):12-26.
16. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64.
17. Curti BD, Kovacsovics-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res*. 2013;73(24):7189-7198. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4174
18. Xu F, Jin T, Zhu Y, Dai C. Immune checkpoint therapy in liver cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 May 29;37(1):110.
19. Zhang Y, Zheng J. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1248:201-226.
20. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106.
21. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, Bléry M, Bonnafous C, Gauthier L, Morel A, Rossi B, Remark R, Bresó V, Bonnet E, Habif G, Guia S, Lalanne AI, Hoffmann C, Lantz O, Fayette J, Boyer-Chammard A, Zerbib R, Dodion P, Ghadially H, Jure-Kunkel M, Morel Y, Herbst R, Narni-Mancinelli E, Cohen RB, Vivier E. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018 Dec 13;175(7):1731-1743.e13.
22. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2017 Mar;276(1):112-120.

23. Zhou XM, Li WQ, Wu YH, Han L, Cao XG, Yang XM, Wang HF, Zhao WS, Zhai WJ, Qi YM, Gao YF. Intrinsic Expression of Immune Checkpoint Molecule TIGIT Could Help Tumor Growth in vivo by Suppressing the Function of NK and CD8+ T Cells. *Front Immunol.* 2018 Nov 29;9:2821.
24. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood.* 2018 Jan 4;131(1):58-67.
25. Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, Javan MR, Rezaei N. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cell Immunol.* 2016 Dec;310:27-41.
26. Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2013 Sep;12(11):1091-100.
27. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;350:17-37.
28. Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol.* 2005;175(11):7372-7379. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7372
29. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 2016;7:550. Published 2016 Dec 12. doi:10.3389/fimmu.2016.00550
30. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5538-45.
31. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001 Apr 2;193(7):839-46.
32. Zhong X, Tumang JR, Gao W, Bai C, Rothstein TL. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol.* 2007 Sep;37(9):2405-10.
33. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;350:17-37
34. Dinesh RK, Hahn BH, Singh RP. PD-1, gender, and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2010 Jun;9(8):583-7.
35. Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol.* 2007 Oct 15;179(8):5064-70.

36. Schoenfeld AJ, Rizvi H, Bandlamudi C, Sauter JL, Travis WD, Rekhman N, Plodkowski AJ, Perez-Johnston R, Sawan P, Beras A, Egger JV, Ladanyi M, Arbour KC, Rudin CM, Riely GJ, Taylor BS, Donoghue MTA, Hellmann MD. Clinical and molecular correlates of PD-L1 expression in patients with lung adenocarcinomas. *Ann Oncol*. 2020 May;31(5):599-608.
37. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015 Jan;21(1):24-33.
38. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):955-72.
39. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, Sahebkar A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*. 2019 Aug;234(10):16824-16837.
40. Tang H, Liang Y, Anders RA, Taube JM, Qiu X, Mulgaonkar A, Liu X, Harrington SM, Guo J, Xin Y, Xiong Y, Nham K, Silvers W, Hao G, Sun X, Chen M, Hannan R, Qiao J, Dong H, Peng H, Fu YX. PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):580-588.
41. Lim SO, Li CW, Xia W, Cha JH, Chan LC, Wu Y, Chang SS, Lin WC, Hsu JM, Hsu YH, Kim T, Chang WC, Hsu JL, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yang Y, Chen CH, Sahin AA, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell*. 2016 Dec 12;30(6):925-939.
42. Chan LC, Li CW, Xia W, Hsu JM, Lee HH, Cha JH, Wang HL, Yang WH, Yen EY, Chang WC, Zha Z, Lim SO, Lai YJ, Liu C, Liu J, Dong Q, Yang Y, Sun L, Wei Y, Nie L, Hsu JL, Li H, Ye Q, Hassan MM, Amin HM, Kaseb AO, Lin X, Wang SC, Hung MC. IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. *J Clin Invest*. 2019 Jul 15;129(8):3324-3338.
43. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H, Connelly CF, Sun HH, Daadi SE, Freeman GJ, Armand P, Chapuy B, de Jong D, Hoppe RT, Neuberg DS, Rodig SJ, Shipp MA. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 10;34(23):2690-7.
44. Ikeda S, Okamoto T, Okano S, Umemoto Y, Tagawa T, Morodomi Y, Kohno M, Shimamatsu S, Kitahara H, Suzuki Y, Fujishita T, Maehara Y. PD-L1 Is Upregulated by Simultaneous Amplification of the PD-L1 and JAK2 Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016 Jan;11(1):62-71

45. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 2018 Jan 23;6(1):8.
46. Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell*. 2019 Nov 7;76(3):359-370.
47. Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2018;24(4):896-905.
48. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):382-386.
49. Okuma Y, Hosomi Y, Nakahara Y, Watanabe K, Sagawa Y, Homma S. High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer*. 2017 Feb;104:1-6.
50. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, Zhao F, Lee S, Liao X, Rodig S, Li J, Wu X, Butterfield LH, Piesche M, Manos MP, Eastman LM, Dranoff G, Freeman GJ, Hodi FS. Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res*. 2017 Jun;5(6):480-492.
51. A. Rotte, G. D'Orazi, M. Bhandaru, Nobel committee honors tumor immunologists, *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 37 (1) (2018) 262
52. Helmy KY, Patel SA, Nahas GR, Rameshwar P. Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv*. 2013 Oct;4(10):1307-20
53. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3335-3337. doi:10.1172/JCI83871
54. Wolchok JD, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369(2):122-133.
55. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3384-3391.
56. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106.

57. Solomon BL, Garrido-Laguna I. TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Nov;67(11):1659-1667.
58. Zhang Q, Zhong H, Fan Y, Liu Q, Song J, Yao S, Cao F. Immune and Clinical Features of CD96 Expression in Glioma by in silico Analysis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Jun 30;8:592.
59. van Hall T, André P, Horowitz A, Ruan DF, Borst L, Zerbib R, Narni-Mancinelli E, van der Burg SH, Vivier E. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer.* 2019 Oct 17;7(1):263.
60. Burugu S, Dancsok AR, Nielsen TO. Emerging targets in cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct;52(Pt 2):39-52.
61. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel).* 2020 Mar 20;12(3):738.
62. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, Plimack ER, Vaena D, Grimm MO, Bracarda S, Arranz JÁ, Pal S, Ohyama C, Saci A, Qu X, Lambert A, Krishnan S, Azrilevich A, Galsky MD. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Mar;18(3):312-322.
63. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattry D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):311-9.
64. Ferris R.L., Blumenschein G., Jr., Fayette J., Guigay J., Colevas A.D., Licitra L., Harrington K., Kasper S., Vokes E.E., Even C., et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* 2016;375:1856–1867
65. Overman M.J., Lonardi S., Wong K.Y.M., Lenz H.J., Gelsomino F., Aglietta M., Morse M.A., Van Cutsem E., McDermott R., Hill A., et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2018;36:773–779.
66. Ribas A., Puzanov I., Dummer R., Schadendorf D., Hamid O., Robert C., Hodi F.S., Schachter J., Pavlick A.C., Lewis K.D., et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): A randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16:908–918.

67. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD, Chung CH, Hernandez-Aya L, Lim AM, Chang ALS, Rabinowits G, Thai AA, Dunn LA, Hughes BGM, Khushalani NI, Modi B, Schadendorf D, Gao B, Seebach F, Li S, Li J, Mathias M, Booth J, Mohan K, Stankevich E, Babiker HM, Brana I, Gil-Martin M, Homsí J, Johnson ML, Moreno V, Niu J, Owonikoko TK, Papadopoulos KP, Yancopoulos GD, Lowy I, Fury MG. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Jul 26;379(4):341-351.
68. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 10;33(17):1974-82.
69. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, Tibaldi C, Minuti G, Salvini J, Coppi E, Chella A, Fontanini G, Filice ME, Tornillo L, Incensati RM, Sani S, Crinò L, Terracciano L, Cappuzzo F. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2015 Jan 6;112(1):95-102.
70. Wang D, Wang T, Liu J, Yu H, Jiao S, Feng B, Zhou F, Fu Y, Yin Q, Zhang P, Zhang Z, Zhou Z, Li Y. Acid-Activatable Versatile Micelleplexes for PD-L1 Blockade-Enhanced Cancer Photodynamic Immunotherapy. *Nano Lett*. 2016 Sep 14;16(9):5503-13.
71. Pasquali S, Chiarion-Sileni V, Rossi CR, Mocellin S. Immune checkpoint inhibitors and targeted therapies for metastatic melanoma: A network meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2017 Mar;54:34-42.
72. Widmann G, Nguyen VA, Plaickner J, Jaschke W. Imaging features of toxicities by immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Curr Radiol Rep*. 2016;5(11):59.
73. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2018;4(12):1721-8.
74. Collins LK, Chapman MS, Carter JB, Samie FH. Cutaneous adverse effects of the immune checkpoint inhibitors. *Curr Probl Cancer*. 2017;41(2):125-8
75. Spain L, Diem S, Larkin J. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2016;44:51-60
76. Belum VR, Benhuri B, Postow MA, Hellmann MD, Lesokhin AM, Segal NH, et al. Characterisation and management of dermatologic adverse events to agents targeting the PD-1 receptor. *Eur J Cancer*. 2016;60:12-25

77. Curry JL, Tetzlaff MT, Nagarajan P, Drucker C, Diab A, Hymes SR, et al. Diverse types of dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade therapy. *J Cutan Pathol.* 2017;44(2):158–76
78. Sibaud V, Meyer N, Lamant L, Vigarios E, Mazieres J, Delord JP. Dermatologic complications of anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Curr Opin Oncol.* 2016;28(4):254–63.
79. Som A, Mandaliya R, Alsaadi D, Farshidpour M, Charabaty A, Malhotra N, et al. Immune checkpoint inhibitor-induced colitis: a comprehensive review. *World J Clin Cases.* 2019;7(4):405–18.
80. Wang Y, Abu-Sbeih H, Mao E, Ali N, Qiao W, Trinh VA, et al. Endoscopic and histologic features of immune checkpoint inhibitor-related colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2018;24(8):1695–705
81. Chalan P, Di Dalmazi G, Pani F, De Remigis A, Corsello A, Caturegli P. Thyroid dysfunctions secondary to cancer immunotherapy. *J Endocrinol Investig.* 2018;41(6):625–38.
82. Faje AT, Lawrence D, Flaherty K, Freedman C, Fadden R, Rubin K, et al. High-dose glucocorticoids for the treatment of ipilimumab-induced hypophysitis is associated with reduced survival in patients with melanoma. *Cancer.* 2018;124(18):3706–14
83. Salem JE, Manouchehri A, Moey M, Lebrun-Vignes B, Bastarache L, Pariente A, et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: an observational, retrospective, pharmacovigilance study. *Lancet Oncol.* 2018;19(12):1579–89
84. Naidoo J, Wang X, Woo KM, Iyriboz T, Halpenny D, Cunningham J, et al. Pneumonitis in patients treated with anti-programmed death-1/programmed death ligand 1 therapy. *J Clin Oncol.* 2017;35(7):709–17.
85. Frelaut M, du Rusquec P, de Moura A, Le Tourneau C, Borcoman E. Pseudoprogression and Hyperprogression as New Forms of Response to Immunotherapy. *BioDrugs.* 2020 Aug;34(4):463-476.
86. V.L. Chiou, M. Burotto, Pseudoprogression and immune-related response in solid tumors, *J. Clin. Oncol.* 33 (31) (2015) 3541–3543.
87. A. Ribas, J.D. Wolchok, C. Robert, R. Kefford, O. Hamid, A. Daud, et al., P0116 updated clinical efficacy of the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in 411 patients with melanoma, *Eur. J. Cancer* 51 (2015) e24.

88. S. Chubachi, H. Yasuda, H. Irie, K. Fukunaga, K. Naoki, K. Soejima, et al., A case of non-small cell lung cancer with possible “Disease Flare” on nivolumab treatment, *Case Rep. Oncol. Med.* 2016 (2016) 1075641
89. E. Saada-Bouزيد, C. Defaucheux, A. Karabajakian, V.P. Coloma, V. Servois, X. Paoletti, et al., Tumor's Flare-up and Patterns of Recurrence in Patients (Pts) with Recurrent and/or Metastatic (R/M) Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Treated with Anti-PD1/PD-L1 Inhibitors, (2016).
90. S. Kato, A. Goodman, V. Walavalkar, D.A. Barkauskas, A. Sharabi, R. Kurzrock, Hyperprogressors after immunotherapy: analysis of genomic alterations associated with accelerated growth rate, *Clin. Cancer Res.* 23 (15) (2017) 4242–4250
91. S. Champiat, L. Dercle, S. Ammari, C. Massard, A. Hollebecque, S. Postel-Vinay, et al., Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated by anti-PD-1/PD-L1, *Clin. Cancer Res.* 23 (8) (2017) 1920–1928
92. S. Demaria, E.B. Golden, S.C. Formenti, Role of local radiation therapy in cancer immunotherapy, *JAMA Oncol.* 1 (9) (2015) 1325–1332.
93. E. Sharon, Can an immune checkpoint inhibitor (sometimes) make things worse? *Clin. Cancer Res.* 23 (8) (2017) 1879–1881.
94. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin – 1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003-1018.
95. Günther S et al. IL-1 Family Cytokines Use Distinct Molecular Mechanisms to Signal through Their Shared Co-receptor. *Immunity.* 2017 19;47(3):510-523
96. Wasmer M-H, Krebs P. The Role of IL-33-Dependent Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology.* 2016;7:682.
97. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J Immunol.* 2011;15;187(4):1609-16.
98. Gadina M, Jefferies CA. IL-33: a sheep in wolf's clothing? *Sci STKE.* 2007 Jun 12;2007:390.
99. Gao X et al. Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):438-45
100. Chan BCL, Lam CWK, Tam LS, Wong CK. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol.* 2019 Mar 4;10:364.

101. Murdaca G, Greco M, Tonacci A, Negrini S, Borro M, Puppo F, Gangemi S. IL-33/IL-31 Axis in Immune-Mediated and Allergic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 22;20(23):5856.
102. Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, Castanheira FV, Gozzi A, Czaikoski PG, Niedbala W, Borges MC, Zamboni DS, Liew FY, Cunha FQ, Alves-Filho JC. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun.* 2017 Apr 4;8:14919.
103. Taniguchi S, Elhance A, Van Duzer A, Kumar S, Leitenberger JJ, Oshimori N. Tumor-initiating cells establish an IL-33-TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression. *Science.* 2020 Jul 17;369(6501):eaay1813.
104. Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J Mol Med;* 2016;94(5):535-43
105. ia Y, Ohno T, Nishii N, Bhingare A, Tachinami H, Kashima Y, Nagai S, Saito H, Nakae S, Azuma M. Endogenous IL-33 exerts CD8⁺ T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Oct 15;518(2):331-336.
106. Casciaro M, Cardia R, Di Salvo E, Tuccari G, Ieni A, Gangemi S. Interleukin-33 Involvement in Nonsmall Cell Lung Carcinomas: An Update. *Biomolecules.* 2019 May 25;9(5):203.
107. Dominguez D et al. Exogenous IL-33 Restores Dendritic Cell Activation and Maturation in Established Cancer. *Immunol.* 2017 1;198(3):1365-1375
108. Amôr NG et al. ST2/IL-33 signaling promotes malignant development of experimental squamous cell carcinoma by decreasing NK cells cytotoxicity and modulating the intratumoral cell infiltrate. *Oncotarget.* 2018 Jul 20;9(56):30894-30904.
109. Lin SH et al. Inflammation elevated IL-33 originating from the lung mediates inflammation in acute lung injury. *Clin Immunol;* 2016; 30535-6.
110. Chen J et al. Interleukin-33 Contributes to the Induction of Th9 Cells and Antitumor Efficacy by Dectin-1-Activated Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2018 31;9:1787.
111. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol.* 2011.41: 1902–1912.

112. Ishikawa K et al. Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Auris Nasus Larynx*. 2014 Dec;41(6):552-7.
113. Chen SF et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2013 Oct;231(2):180-9.
114. Li J et al. Biliary repair and carcinogenesis are mediated by IL-33-dependent cholangiocyte proliferation. *J Clin Invest*. 2014; 124(7):3241-51
115. Zhang JF et al. IL 33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 via the ST2-NF- κ B pathway. *Oncol Rep*. 2017 Oct;38(4):2033-2042.
116. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014;134(7):1669-82.
117. Shani O, Vorobyov T, Monteran L, Lavie D, Cohen N, Raz Y, Tsarfaty G, Avivi C, Barshack I, Erez N. Fibroblast-Derived IL33 Facilitates Breast Cancer Metastasis by Modifying the Immune Microenvironment and Driving Type 2 Immunity. *Cancer Res*. 2020 Dec 1;80(23):5317-5329
118. J. Liu, J.X. Shen, J.L. Hu, et al, Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers, *Front. Immunol*. 5 (2014) 141.
119. M.Z. Milosavljevic, I.P. Jovanovic, N.N. Pejnovic, et al, Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma, *Oncotarget*. 7 (2016) 18106-18115.
120. Hu H, Sun J, Wang C, Bu X, Liu X, Mao Y, Wang H. IL-33 facilitates endocrine resistance of breast cancer by inducing cancer stem cell properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Apr 8;485(3):643-650.
121. H. Liu, H.W. Zhang, X.F. Sun, et al, Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties, *Chin. Med. J. (Engl)*. 126 (2013) 3030-3034.
122. Kim JY, Lim SC, Kim G, Yun HJ, Ahn SG, Choi HS. Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene*. 2015 Sep 17;34(38):4928-38.

123. Xiao P, Wan X, Cui B, Liu Y, Qiu C, Rong J, Zheng M, Song Y, Chen L, He J, Tan Q, Wang X, Shao X, Liu Y, Cao X, Wang Q. Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2015 Jun 24;5(1):e1063772.
124. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(22):2108–21.
125. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):361-370.
126. Zhao J, Huang J. Breast cancer immunology and immunotherapy: targeting the programmed cell death protein-1/programmed cell death protein ligand-1. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(7):853-862.
127. Barroso-Sousa R, Jain E, Kim D, Partridge AH, Cohen O, Wagle N. Determinants of high tumor mutational burden (TMB) and mutational signatures in breast cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36:1010.
128. Vinayak S, Tolaney SM, Schwartzberg LS, Mita MM, McCann GAL, Tan AR. TOPACIO/Keynote-162: niraparib plus pembrolizumab in patients (pts) with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC), a phase 2 trial. *J Clin Oncol* 2018; 36:1011.
129. Tolaney SM, Kabos P, Dickler MN, Gianni L, Jansen V, Lu Y. Updated efficacy, safety, & PD-L1 status of patients with HR+, HER2-metastatic breast cancer administered abemaciclib plus pembrolizumab. *J Clin Oncol* 2018; 36:1059.
130. Xia Y, Ohno T, Nishii N, Bhingare A, Tachinami H, Kashima Y, Nagai S, Saito H, Nakae S, Azuma M. Endogenous IL-33 exerts CD8+ T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Oct 15;518(2):331-336.
131. Cui G, Yuan A, Li Z, Goll R, Florholmen J. ST2 and regulatory T cells in the colorectal adenoma/carcinoma microenvironment: implications for diseases progression and prognosis. *Sci Rep*. 2020 Apr 3;10(1):5892.
132. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, et al. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(19):E2487-E2496. doi:10.1073/pnas.1422445112
133. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, Lanza DG, Berger NA, Markowitz SD, Lenz HJ, Nadeau JH, Pizarro TT, Heaney JD.

- IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 12;112(19):E2487-96.
134. Fang M, Li Y, Huang K, Qi S, Zhang J, Zgodzinski W, Majewski M, Wallner G, Gozdz S, Macek P, Kowalik A, Pasiarski M, Grywalska E, Vatan L, Nagarsheth N, Li W, Zhao L, Kryczek I, Wang G, Wang Z, Zou W, Wang L. IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res*. 2017 May 15;77(10):2735-2745.
135. Yamada D, Rizvi S, Razumilava N, Bronk SF, Davila JI, Champion MD, et al. IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. *Hepatology*. 2015;61:1627-42
136. Shalpour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3347-55.
137. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, Fiocchi C, Vecchi M, Pizarro TT. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):8017-22.
138. Ameri AH, Moradi Tuchayi S, Zaalberg A, Park JH, Ngo KH, Li T, Lopez E, Colonna M, Lee RT, Mino-Kenudson M, Demehri S. IL-33/regulatory T cell axis triggers the development of a tumor-promoting immune environment in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Feb 12;116(7):2646-2651.
139. Bao X, Zhang H, Wu W, Cheng S, Dai X, Zhu X, Fu Q, Tong Z, Liu L, Zheng Y, Zhao P, Fang W, Liu F. Analysis of the molecular nature associated with microsatellite status in colon cancer identifies clinical implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020 Oct;8(2):e001437.
140. Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Alvarez M, Ochoa MC, Belsue V, de Andrea C, Rodriguez-Ruiz ME, Perez-Gracia JL, Marquez-Rodas I, Llacer C, Alvarez M, de Luque V, Molina C, Teijeira A, Berraondo P, Melero I. Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature*. 2019 May;569(7756):428-432.
141. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, Wang Z, Wu Q, Peng H, Wei H, Sun R, Tian Z. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol*. 2018 Jul;19(7):723-732.

142. Dunn J, Rao S. Epigenetics and immunotherapy: The current state of play. *Mol Immunol.* 2017 Jul;87:227-239.
143. Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 1;12(4):307-13.
144. Brightman SE, Naradikian MS, Miller AM, Schoenberger SP. Harnessing neoantigen specific CD4 T cells for cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2020 Apr;107(4):625-633
145. Fridman WH, et al. Prognostic and predictive impact of intraand peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 2011;71:5601–5605.
146. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018 Oct;18(10):635-647.
147. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol.* 2019 Jun;234(6):8509-8521.
148. Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol.* 2019 Apr;40(4):310-327
149. Kursunel MA, Esendagli G. The untold story of IFN- γ in cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Oct;31:73-81.
150. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016 Feb;39(1):98-106
151. Dong C. Helper T Cells and Cancer-Associated Inflammation: A New Direction for Immunotherapy? *J Interferon Cytokine Res.* 2017 Sep;37(9):383-385
152. Pitt JM, André F, Amigorena S, Soria JC, Eggermont A, Kroemer G, Zitvogel L. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1224-32.
153. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* 2016 Dec;37(12):855-865.
154. Lee YS, Radford KJ. The role of dendritic cells in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;348:123-178.
155. Saxena M, Bhardwaj N. Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment. *Trends Cancer.* 2018 Feb;4(2):119-137.
156. Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Dec;17(12):887-904.
157. Poh AR, Ernst M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol.* 2018 Mar 12;8:49.

158. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.* 2015 Apr;36(4):229-39.
159. Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs.* 2015;7(2):303-10.
160. Tcyganov E, Mastio J, Chen E, Gabrilovich DI. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2018 Apr;51:76-82.
161. Wang Y, Sun H, Zhu N, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Immune Microenvironment Promote Progression of Esophagogastric Junction Adenocarcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:640080. Published 2021 Mar 29. doi:10.3389/fonc.2021.640080
162. Travis MA, Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:51–82.10.1146/annurev-immunol-032713-120257
163. Bae EA, Seo H, Kim IK, Jeon I, Kang CY. Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Arch Pharm Res.* 2019 Jul;42(7):543-548.
164. Wolf BJ, Choi JE, Exley MA. Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018 Mar 2;9:384.
165. Kriegsmann K, Kriegsmann M, von Bergwelt-Baildon M, Cremer M, Witzens-Harig M. NKT cells - New players in CAR cell immunotherapy? *Eur J Haematol.* 2018 Dec;101(6):750-757.
166. Mandal, R. et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 1, e89829 (2016).
167. Putz, E. M. et al. NK cell heparanase controls tumor invasion and immune surveillance. *J. Clin. Invest.* 127, 2777–2788 (2017)
168. Davis, Z. B., Vallera, D. A., Miller, J. S. & Felices, M. Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin. Immunol.* 31, 64–75 (2017)
169. Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J. & Caligiuri, M. A. The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunity* 47, 820–833 (2017).
170. Di Vito C, Mikulak J, Zaghi E, Pesce S, Marcenaro E, Mavilio D. NK cells to cure cancer. *Semin Immunol.* 2019 Feb;41:101272
171. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62.
172. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 13;17(10):1712.

173. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform.* 2019 Sep 27;20(5):1836–1852
174. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Nov;1803(11):1231–43.
175. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97
176. Krol J, Loedige I, Filipowicz W.. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11(9):597–610.
177. Krol J, Loedige I, Filipowicz W.. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11(9):597–610.
178. Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S., Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics.* 2003;82(3):323–330.
179. Ye Z., Jin H., Qian Q. Argonaute 2: A Novel Rising Star in Cancer Research. *J Cancer.* 2015;6(9):877–882
180. Wang M., Zhang L., Liu Z., Zhou J., Pan Q., Fan J. AGO1 may influence the prognosis of hepatocellular carcinoma through TGF-beta pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):324.
181. Kwak P.B., Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(2):145–151
182. Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004;305(5689):1437–1441
183. Fabian M.R., Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19:586–593.
184. Höck J., Weinmann L., Ender C., Rüdell S., Kremmer E., Raabe M., Urlaub H., Meister G. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* 2007;8:1052–1060.
185. Kalantari R., Hicks J.A., Li L., Gagnon K.T., Sridhara V., Lemoff A., Mirzaei H., Corey D.R. Stable association of RNAi machinery is conserved between the cytoplasm and nucleus of human cells. *RNA.* 2016;22:1085–1098. doi: 10.1261/rna.056499.116.

186. Bai B., Liu H., Laiho M. Small RNA expression and deep sequencing analyses of the nucleolus reveal the presence of nucleolus-associated microRNAs. *FEBS Open Bio.* 2014;4:441–449.
187. Matsui M., Chu Y., Zhang H., Gagnon K.T., Shaikh S., Kuchimanchi S., Manoharan M., Corey D.R., Janowski B.A. Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:10086–10109.
188. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 11;20(24):6249.
189. Backes C, Meese E, Keller A. Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther.* 2016 Dec;20(6):509-518
190. Chakraborty C, Das S. Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumour Biol.* 2016 May;37(5):5705-14.
191. Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Feb;98:12-23.
192. Ebert, M. S. & Sharp, P. A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. 2012 *Cell* 149, 515–524
193. Novershtern, N. et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. 2011. *Cell* 144, 296–309.
194. Cabezas-Wallscheid, N. et al. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA Methylome analysis. *Cell Stem Cell* 15,2014. 507–522
195. Bissels, U. et al. Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. 2011. *Stem Cells* 29, 847–857
196. . O’Connell, R. M. et al. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate longterm hematopoietic output. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 14235–14240 (2010).
197. Ooi, A. G. et al. MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 21505–21510 (2010)
198. So, A. Y. et al. Dual mechanisms by which miR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B-cell leukemias. *Blood* 124, 1502–1512 (2014)

199. Turner, M. L., Schnorfeil, F. M. & Brocker, T. MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J. Immunol.* 187, 3911–3917 (2011).
200. McCoy, C. E. et al. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 285, 20492–20498 (2010).
201. Vian, L. et al. Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors. *Cell Death Differ.* 21, 290–301 (2014).
202. Velu, C. S., Baktula, A. M. & Grimes, H. L. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood* 113, 4720–4728 (2009)
203. Xu, X. et al. Systematic analysis of microRNA fingerprints in thrombocytic platelets using integrated platforms. *Blood* 120, 3575–3585 (2012).
204. Lu, J. et al. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev. Cell* 14, 843–853 (2008)
205. Lu, T. X. et al. MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation. *J. Immunol.* 190, 1576–1582 (2013).
206. Pobeziński, L. A. et al. Let-7 microRNAs target the lineage-specific transcription factor PLZF to regulate terminal NKT cell differentiation and effector function. *Blood* 16, 517–524 (2015).
207. Cichocki, F. et al. Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. *J. Immunol.* 187, 6171–6175 (2011).
208. Mallampati, S. et al. Integrated genetic approaches identify the molecular mechanisms of Sox4 in early B-cell development: intricate roles for RAG1/2 and CK1ε. *Blood* 123, 4064–4076 (2014)
209. de Yebenes, V. G. et al. miR-217 is an oncogene that enhances the germinal center reaction. *Blood* 124, 229–239 (2014)
210. Yui, M. A. & Rothenberg, E. V. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 529–545 (2014).
211. Marsh R, Ph D, Stefan M, et al. MicroRNA-15/16 antagonizes Myb to control natural killer cell maturation. *J Immunol.* 2016;77: 616–623.
212. Cichocki F, Felices M, McCullar V, Presnell SR, Al-Attar A, Lutz CT, Miller JS. Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. *J Immunol.* 2011 Dec 15;187(12):6171-5.
213. Yang C, Shen C, Feng T, Li H. Noncoding RNA in NK cells. *J Leukoc Biol.* 2019 Jan;105(1):63-71.

214. Pesce S, Greppi M, Ferretti E, Obino V, Carlomagno S, Rutigliani M, Thoren FB, Sivori S, Castagnola P, Candiani S, Marcenaro E. miRNAs in NK Cell-Based Immune Responses and Cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Feb 25;8:119.
215. Fehniger T.A., Wylie T., Germino E., Leong J.W., Magrini V.J., Koul S., Keppel C.R., Schneider S.E., Koboldt D.C., Sullivan R.P., et al. 2010. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res.* 20:1590–1604 10.1101/gr.107995.110
216. **Bezman** NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med.* 2011 Dec 19;208(13):2717-31.
217. Ying W, Tseng A, Chang RC, Wang H, Lin YL, Kanameni S, Brehm T, Morin A, Jones B, Splawn T, Criscitiello M, Golding MC, Bazer FW, Safe S, Zhou B. miR-150 regulates obesity-associated insulin resistance by controlling B cell functions. *Sci Rep.* 2016 Feb 1;6:20176.
218. Trifari S, Pipkin ME, Bandukwala HS, Äijö T, Bassein J, Chen R, Martinez GJ, Rao A. MicroRNA-directed program of cytotoxic CD8⁺ T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 12;110(46):18608-13.
219. Kim N, Kim M, Yun S, et al. MicroRNA-150 regulates the cytotoxicity of natural killers by targeting perforin-1. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(1):195-203. doi:10.1016/j.jaci.2014.02.018
220. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia.* 2011 Aug;25(8):1324-34.
221. Cheng YQ, Ren JP, Zhao J, Wang JM, Zhou Y, Li GY, Moorman JP, Yao ZQ. MicroRNA-155 regulates interferon- γ production in natural killer cells via Tim-3 signalling in chronic hepatitis C virus infection. *Immunology.* 2015 Aug;145(4):485-97.
222. Kandell WM, Donatelli SS, Trinh TL, Calescibetta AR, So T, Tu N, Gilvary DL, Chen X, Cheng P, Adams WA, Chen YK, Liu J, Djeu JY, Wei S, Eksioglu EA. MicroRNA-155 governs SHIP-1 expression and localization in NK cells and regulates subsequent infiltration into murine AT3 mammary carcinoma. *PLoS One.* 2020 Feb 10;15(2):e0225820.
223. Trotta R, Chen L, Costinean S, Josyula S, Mundy-Bosse BL, Ciarlariello D, Mao C, Briercheck EL, McConnell KK, Mishra A, Yu L, Croce CM, Caligiuri MA.

- Overexpression of miR-155 causes expansion, arrest in terminal differentiation and functional activation of mouse natural killer cells. *Blood*. 2013 Apr 18;121(16):3126-34.
224. Ge J, Huang Z, Liu H, Chen J, Xie Z, Chen Z, Peng J, Sun J, Hou J, Zhang X. Lower Expression of MicroRNA-155 Contributes to Dysfunction of Natural Killer Cells in Patients with Chronic Hepatitis B. *Front Immunol*. 2017 Sep 22;8:1173
225. Geraldo M.V., Yamashita A.S., Kimura E.T. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene*. 2012;31:1910–1922.
226. Chou CK, Liu RT, Kang HY. MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 15;18(3):636.
227. Ding JN, Zang YF, Ding YL. MiRNA-146b-5p inhibits the malignant progression of gastric cancer by targeting TRAF6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Sep;24(17):8837-8844.
228. Saleh LM, Wang W, Herman SE, Saba NS, Anastas V, Barber E, Corrigan-Cummins M, Farooqui M, Sun C, Sarasua SM, Zhao Z, Abousamra NK, Elbaz O, Abdelghaffar HA, Wiestner A, Calvo KR. Ibrutinib downregulates a subset of miRNA leading to upregulation of tumor suppressors and inhibition of cell proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Feb;31(2):340-349
229. Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol*. 2014 Nov 21;5:578.
230. Wang H, Zhang Y, Wu X, Wang Y, Cui H, Li X, Zhang J, Tun N, Peng Y, Yu J. Regulation of Human Natural Killer Cell IFN- γ Production by MicroRNA-146a via Targeting the NF- κ B Signaling Pathway. *Front Immunol*. 2018 Mar 9;9:293.
231. Shi JH, Sun SC. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Front Immunol*. 2018 Aug 9;9:1849.
232. Xu D, Han Q, Hou Z, Zhang C, Zhang J. miR-146a negatively regulates NK cell functions via STAT1 signaling. *Cell Mol Immunol*. 2017 Aug;14(8):712-720.
233. Rady M, Watzl C, Claus M, Khorshid O, Mahran L, Abou-Aisha K. Altered expression of miR-181a and miR-146a does not change the expression of surface NCRs in human NK cells. *Sci Rep*. 2017 Feb 1;7:41381.

234. Bhatt K, Lanting LL, Jia Y, Yadav S, Reddy MA, Magilnick N, Boldin M, Natarajan R. Anti-Inflammatory Role of MicroRNA-146a in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Aug;27(8):2277-88.
235. Jurisevic M, Jagic N, Gajovic N, Arsenijevic A, Jovanovic M, Milovanovic M, Pantic J, Jovanovic I, Sabo T, Radosavljevic G, Arsenijevic N. O,O'-diethyl- (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride enhances influx of effective NK and NKT cells in murine breast cancer. *Vojnosanit Pregl*. 2018; doi: 10.2298/VSP180723149J.
236. Yang X, Belosay A, Du M, et al. Estradiol increases ER-negative breast cancer metastasis in an experimental model. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(6):711-721. doi:10.1007/s10585-012-9559-0)
237. Gajovic N, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocr Relat Cancer* 2018; 25(4):493-507.
238. Liu X, Li M, Wu Y, Zhou Y, Zeng L, Huang T. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Aug 14;386(1):181-5.
239. Stojanovic B, Jovanovic I, Stojanovic BS, Stojanovic MD, Gajovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. *Eur J Immunol*. 2019;49(6):940-946.
240. Makowska, A., Braunschweig, T., Denecke, B., Shen, L., Baloche, V., Busson, P. et al. Interferon β and Anti-PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade Cooperate in NK Cell-Mediated Killing of Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Transl Oncol*. 2019;12(9):1237-1256. doi:10.1016/j.tranon.2019.04.017
241. Jovicic N, Jeftic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. *PLoS One* 2015;10(7):e0134089
242. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001;29(9):e45
243. Costa R, Carneiro BA, Agulnik M, Rademaker AW, Pai SG, Villafior VM, Cristofanilli M, Sosman JA, Giles FJ. Toxicity profile of approved anti-PD-1 monoclonal antibodies in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):8910-8920

244. Chang CY, Park H, Malone DC, Wang CY, Wilson DL, Yeh YM, Van Boemmel-Wegmann S, Lo-Ciganic WH. Immune Checkpoint Inhibitors and Immune-Related Adverse Events in Patients With Advanced Melanoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2020 Mar 2;3(3):e201611
245. Kim JY, Lim SC, Kim G, Yun HJ, Ahn SG, Choi HS. Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene*. 2015;34(38):4928-4938.
246. Cui G, Yuan A, Pang Z, Zheng W, Li Z, Goll R. Contribution of IL-33 to the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2018;8:561. Published 2018 Nov 28.
247. Qin L, Dominguez D, Chen S, Fan J, Long A, Zhang M, Fang D, Zhang Y, Kuzel TM, Zhang B. Exogenous IL-33 overcomes T cell tolerance in murine acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61069-61080.
248. Guo Y, Feng X, Jiang Y, Shi X, Xing X, Liu X, Li N, Fadeel B, Zheng C. PD1 blockade enhances cytotoxicity of in vitro expanded natural killer cells towards myeloma cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):48360-48374.
249. Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault MC, Trevino TN, Azimi CS, Scheer AK, Randolph HE, Thompson TW, Zhang L, Iannello A, Mathur N, Jardine KE, Kirn GA, Bell JC, McBurney MW, Raulet DH, Ardolino M. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J Clin Invest*. 2018 Oct 1;128(10):4654-4668.
250. Wang K, Shan S, Yang Z, Gu X, Wang Y, Wang C, Ren T. IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. *Oncotarget*. 2017 Aug 2;8(40):68571-68582
251. Whitman E, Barber A. NKG2D receptor activation of NF- κ B enhances inflammatory cytokine production in murine effector CD8(+) T cells. *Mol Immunol*. 2015;63(2):268-278. doi:10.1016/j.molimm.2014.07.015
252. Tabarsa M, Dabaghian EH, You S, Yelithao K, Cao R, Rezaei M, Alboofetileh M, Bitá S. The activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways of RAW264.7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddinina zanardinii*. *Int J Biol Macromol*. 2020 Apr 1;148:56-67.
253. Zhou K, Guo S, Tong S, Sun Q, Li F, Zhang X, Qiao Y, Liang G. Immunosuppression of Human Adipose-Derived Stem Cells on T Cell Subsets via the Reduction of NF-kappaB Activation Mediated by PD-L1/PD-1 and Gal-9/TIM-3 Pathways. *Stem Cells Dev*. 2018 Sep 1;27(17):1191-1202

254. Park A, Yang Y, Lee Y, Kim MS, Park YJ, Jung H, Kim TD, Lee HG, Choi I, Yoon SR. Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Thyroid Cancer Cells Suppresses Natural Killer Cell Function by Inhibiting NKG2D and NKp46 Expression via STAT Signaling Pathways. *J Clin Med*. 2019 Jun 12;8(6):842.
255. Waniczek D, Lorenc Z, Śnietura M, Wesecki M, Kopec A, Muc-Wierzgoń M. Tumor-Associated Macrophages and Regulatory T Cells Infiltration and the Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(5):445-454.
256. Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blanche G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol*. 2012 Jul 17;3:208.
257. Whiteside TL. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(4):353-363
258. Y, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, Divino CM, Chen SH. 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 Jan 1;70(1):99-108
259. Taki M, Abiko K, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Murakami R, Yamanoi K, Horikawa N, Hosoe Y, Nakamura E, Sugiyama A, Mandai M, Konishi I, Matsumura N. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun*. 2018 Apr 27;9(1):1685.
260. Komrokji RS, Wei S, Mailloux AW, Zhang L, Padron E, Sallman D, Lancet JE, Tinsley S, Nardelli LA, Pinilla-Ibarz J, Epling-Burnette PK, List AF. A Phase II Study to Determine the Safety and Efficacy of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Enzyme INCB024360 in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019 Mar;19(3):157-161.
261. Yu J, Wang Y, Yan F, Zhang P, Li H, Zhao H, Yan C, Yan F, Ren X. Noncanonical NF- κ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *J Immunol*. 2014 Sep 1;193(5):2574-86.
262. Yentz S, Smith D. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibition as a Strategy to Augment Cancer Immunotherapy. *BioDrugs*. 2018;32(4):311-317.
263. Honkanen TJ, Tikkanen A, Karihtala P, Mäkinen M, Väyrynen JP, Koivunen JP. Prognostic and predictive role of tumour-associated macrophages in HER2 positive breast cancer. *Sci Rep*. 2019 Jul 29;9(1):10961.

264. Xu SJ, Hu HT, Li HL, Chang S. The Role of miRNAs in Immune Cell Development, Immune Cell Activation, and Tumor Immunity: With a Focus on Macrophages and Natural Killer Cells. *Cells*. 2019 Sep 24;8(10):1140.
265. Kim N, Kim M, Yun S, Doh J, Greenberg PD, Kim TD, Choi I. MicroRNA-150 regulates the cytotoxicity of natural killers by targeting perforin-1. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jul;134(1):195-203
266. Trotta R, Chen L, Ciarlariello D, Josyula S, Mao C, Costinean S, Yu L, Butchar JP, Tridandapani S, Croce CM, Caligiuri MA. miR-155 regulates IFN- γ production in natural killer cells. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3478-85.
267. Sullivan RP, Fogel LA, Leong JW, Schneider SE, Wong R, Romee R, Thai TH, Sexl V, Matkovich SJ, Dorn GW 2nd, French AR, Fehniger TA. MicroRNA-155 tunes both the threshold and extent of NK cell activation via targeting of multiple signaling pathways. *J Immunol*. 2013 Dec 15;191(12):5904-13.
268. Wang K, Shan S, Yang Z, Gu X, Wang Y, Wang C, Ren T. IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. *Oncotarget*. 2017 Aug 2;8(40):68571-68582.
269. Dhupkar P, Gordon N, Stewart J, Kleinerman ES. Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases. *Cancer Med*. 2018 Jun;7(6):2654-2664.
270. Arlauckas SP, Garren SB, Garris CS, Kohler RH, Oh J, Pittet MJ, Weissleder R. Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages. *Theranostics*. 2018 Nov 12;8(21):5842-5854
271. Fouda AY, Xu Z, Shosha E, et al. Arginase 1 promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses. *Cell Death Dis*. 2018;9(10):1001. Published 2018 Sep 25.
272. Parekh VV, Lalani S, Kim S, Halder R, Azuma M, Yagita H, et al. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol* (2009) 182(5):2816–26. 10.4049/jimmunol.0803648
273. Chang WS, Kim JY, Kim YJ, Kim YS, Lee JM, Azuma M, et al. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol* (2008) 181(10):6707–10. 10.4049/jimmunol.181.10.6707

274. Durgan K, Ali M, Warner P, Latchman YE. Targeting NKT cells and PD-L1 pathway results in augmented anti-tumor responses in a melanoma model. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60(4):547–58. doi: 10.1007/s00262-010-0963-5
275. Kim HY, Chang YJ, Subramanian S, Lee HH, Albacker LA, Matangkasombut P, Savage PB, McKenzie AN, Smith DE, Rottman JB, DeKruyff RH, Umetsu DT. Innate lymphoid cells responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jan;129(1):216-27.e1-6.
276. Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J Leukoc Biol*. 2019 Feb;105(2):243-255. doi: 10.1002/JLB.MR0318-097R. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30387907.
277. Hatziannou A, Banos A, Sakelaropoulos T, Fedonidis C, Vidali MS, Köhne M, Händler K, Boon L, Henriques A, Koliaraki V, Georgiadis P, Zoidakis J, Termentzi A, Beyer M, Chavakis T, Boumpas D, Tsirigos A, Verginis P. An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion. *Nat Immunol*. 2020 Jan;21(1):75-85. doi: 10.1038/s41590-019-0555-2. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31844326; PMCID: PMC7030950.
278. Li A, Herbst RH, Canner D, Schenkel JM, Smith OC, Kim JY, Hillman M, Bhutkar A, Cuoco MS, Rappazzo CG, Rogers P, Dang C, Jerby-Aron L, Rozenblatt-Rosen O, Cong L, Birnbaum M, Regev A, Jacks T. IL-33 Signaling Alters Regulatory T Cell Diversity in Support of Tumor Development. *Cell Rep*. 2019 Dec 3;29(10):2998-3008.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.120. PMID: 31801068; PMCID: PMC6990979.
279. Pastille E, Wasmer MH, Adamczyk A, Vu VP, Mager LF, Phuong NNT, Palmieri V, Simillion C, Hansen W, Kasper S, Schuler M, Muggli B, McCoy KD, Buer J, Zlobec I, Westendorf AM, Krebs P. The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote intestinal cancer. *Mucosal Immunol*. 2019 Jul;12(4):990-1003. doi: 10.1038/s41385-019-0176-y. Epub 2019 Jun 5. PMID: 31165767; PMCID: PMC7746527.
280. Faustino LD, Griffith JW, Rahimi RA, Nepal K, Hamilos DL, Cho JL, Medoff BD, Moon JJ, Vignali DAA, Luster AD. Interleukin-33 activates regulatory T cells to suppress innate $\gamma\delta$ T cell responses in the lung. *Nat Immunol*. 2020 Nov;21(11):1371-1383. doi: 10.1038/s41590-020-0785-3. Epub 2020 Sep 28. PMID: 32989331; PMCID: PMC7578082.
281. Asano Takeru, Meguri Yusuke, Yoshioka Takanori, Kishi Yuriko, Iwamoto Miki, Nakamura Makoto, Sando Yasuhisa, Yagita Hideo, Koreth John, Kim Haesook T.,

- Alyea Edwin P., Armand Philippe, Cutler Corey S., Ho Vincent T., Antin Joseph H., Soiffer Robert J., Maeda Yoshinobu, Tanimoto Mitsune, Ritz Jerome, Matsuoka Ken-ichi. PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy. *Blood*. 2017;129(15):2186–2197. doi: 10.1182/blood-2016-09-741629
282. Yoshida K, Okamoto M, Sasaki J, Kuroda C, Ishida H, Ueda K, Ideta H, Kamanaka T, Sobajima A, Takizawa T, Tanaka M, Aoki K, Uemura T, Kato H, Haniu H, Saito N. Anti-PD-1 antibody decreases tumour-infiltrating regulatory T cells. *BMC Cancer*. 2020 Jan 8;20(1):25. doi: 10.1186/s12885-019-6499-y. PMID: 31914969; PMCID: PMC6950856.
283. Dong W, Wu X, Ma S, Wang Y, Nalin AP, Zhu Z, Zhang J, Benson DM, He K, Caligiuri MA, Yu J. The Mechanism of Anti-PD-L1 Antibody Efficacy against PD-L1-Negative Tumors Identifies NK Cells Expressing PD-L1 as a Cytolytic Effector. *Cancer Discov*. 2019 Oct;9(10):1422-1437. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1259. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31340937; PMCID: PMC7253691.
284. Alvarez M, Simonetta F, Baker J, Morrison AR, Wenokur AS, Pierini A, Berraondo P, Negrin RS. Indirect Impact of PD-1/PD-L1 Blockade on a Murine Model of NK Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2020 Feb 11;11:7. doi: 10.3389/fimmu.2020.00007. PMID: 32117218; PMCID: PMC7026672.
285. Teyton L. New Directions for Natural Killer T Cells in the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2017 Nov 8;8:1480.
286. 32. Sivori S, Pende D, Quatrini L, Pietra G, Della Chiesa M, Vacca P, Tumino N, Moretta F, Mingari MC, Locatelli F, Moretta L. NK cells and ILCs in tumor immunotherapy. *Mol Aspects Med*. 2020 Aug 13:100870.
287. Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2018 Feb 15;24(4):896-905.
288. Xue W, Li W, Zhang T, Li Z, Wang Y, Qiu Y et al. Anti-PD1 up-regulates PD-L1 expression and inhibits T-cell lymphoma progression: possible involvement of an IFN- γ -associated JAK-STAT pathway. *Onco Targets Ther*. 2019 Mar 19;12:2079-2088.
289. Qin Y, Oh S, Lim S, Shin JH, Yoon MS, Park SH. Invariant NKT cells facilitate cytotoxic T-cell activation via direct recognition of CD1d on T cells. *Exp Mol Med*. 2019 Oct 25;51(10):1-9.
290. Krijgsman D., Hokland M., Kuppen P.J.K. The role of natural killer T cells in cancer-A phenotypical and functional approach. *Front. Immunol*. 2018;9:367.

291. Bedard M., Salio M., Cerundolo V. Harnessing the power of invariant natural killer T cells in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 2017;8:1829
292. Díaz-Basabe A, Strati F, Facciotti F. License to Kill: When iNKT Cells Are Granted the Use of Lethal Cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2020 May 30;21(11):3909.
293. Fallarini S, Paoletti T, Orsi Battaglini N, Lombardi G. Invariant NKT cells increase drug-induced osteosarcoma cell death. *Br J Pharmacol* (2012) 167(7):1533–49.
294. Hix LM, Shi YH, Brutkiewicz RR, Stein PL, Wang CR, Zhang M. CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. *PLoS One* (2011) 6(6):e20702.
295. Tan B, Shi X, Zhang J, et al. Inhibition of Rspo-Lgr4 facilitates checkpoint blockade therapy by switching macrophage polarization. [published online ahead of print July 2, 2018]. *CancerRes.*
296. Xiang W, Shi R, Kang X, et al. Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression. *Nat Commun.* 2018;9:2574
297. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem.* 2019 Mar;120(3):2756-2765.
298. Li T-F, Li K, Wang C, et al. Harnessing the cross-talk between tumor cells and tumor-associated macrophages with a nano-drug for modulation of glioblastoma immune microenvironment. *J Control Release.* 2017;268:128-146
299. Donzelli S, Milano E, Pruszko M, et al. Expression of ID4 protein in breast cancer cells induces reprogramming of tumour-associated macrophages. *Breast Cancer Res.* 2018;20:59.
300. Sumpter TL, et al., Hepatic stellate cells undermine the allostimulatory function of liver myeloid dendritic cells via STAT3-dependent induction of IDO. *J Immunol,* 2012. 189(8): p. 3848–58.
301. Motta JM and Rumjanek VM, Sensitivity of Dendritic Cells to Microenvironment Signals. *J Immunol Res,* 2016. 2016: p. 4753607.
302. Fujii SI, Shimizu K. Exploiting Antitumor Immunotherapeutic Novel Strategies by Deciphering the Cross Talk between Invariant NKT Cells and Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2017 Jul 31;8:886

303. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018 Sep;233(9):6425-6440.
304. Llopiz D, Ruiz M, Silva L, Sarobe P. Enhancement of Antitumor Vaccination by Targeting Dendritic Cell-Related IL-10. *Front Immunol.* 2018;9:1923. Published 2018 Sep 3. doi:10.3389/fimmu.2018.01923
305. Cancel JC, Crozat K, Dalod M, Mattiuz R. Are Conventional Type 1 Dendritic Cells Critical for Protective Antitumor Immunity and How? *Front Immunol.* 2019 Feb 12;10:9.
306. Scarlett UK, Rutkowski MR, Rauwerdink AM, Fields J, Escovar-Fadul X, Baird J, Cubillos-Ruiz JR, Jacobs AC, Gonzalez JL, Weaver J, Fiering S, Conejo-Garcia JR. Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J Exp Med.* 2012 Mar 12;209(3):495-506.
307. van der Vliet HJ, Wang R, Yue SC, Koon HB, Balk SP, Exley MA. Circulating myeloid dendritic cells of advanced cancer patients result in reduced activation and a biased cytokine profile in invariant NKT cells. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7287-93.
308. Paul S, Chhatar S, Mishra A, Lal G. Natural killer T cell activation increases iNOS+CD206- M1 macrophage and controls the growth of solid tumor. *J Immunother Cancer.* 2019 Aug 6;7(1):208.
309. Zhang H, Li Y, Liu X, Liang Z, Yan M, Liu Q, Chen A, Bao Y, Zhou C, Li S, Yee C, Li Y. ImmTAC/Anti-PD-1 antibody combination to enhance killing of cancer cells by reversing regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Immunology.* 2018 Oct;155(2):238-250. doi: 10.1111/imm.12954. Epub 2018 Jun 14. PMID: 29791021; PMCID: PMC6142295.
310. Wu D, Liu Y, Pang N, Sun M, Wang X, Haridia Y, Zhao F, Qin Y, Fan W, Guo X, Ding J. PD-1/PD-L1 pathway activation restores the imbalance of Th1/Th2 and treg/Th17 cells subtypes in immune thrombocytopenic purpura patients. *Medicine (Baltimore).* 2019 Oct;98(43):e17608. doi: 10.1097/MD.00000000000017608. PMID: 31651870; PMCID: PMC6824755.
311. Wang Z, Tan F. The blockade of PD-1/PD-L1 pathway promotes the apoptosis of CD19+ CD25+ Bregs and suppresses the secretion of IL-10 in patients with allergic rhinitis. *Scand J Immunol.* 2020 Feb;91(2):e12836. doi: 10.1111/sji.12836. Epub 2019 Nov 3. PMID: 31598989.

312. Prasad S, Hu S, Sheng WS, Chauhan P, Lokensgard JR. Reactive glia promote development of CD103+ CD69+ CD8+ T-cells through programmed cell death-ligand 1 (PD-L1). *Immun Inflamm Dis*. 2018 Jun;6(2):332-344. doi: 10.1002/iid3.221. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29602245; PMCID: PMC5946148

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Марина Јовановић је рођена 21.11.1991. у Ћуприји. Основну школу ОШ "Бранко Крсмановић", истурено одељење Плана, је завршила као носилац дипломе „Вук Караџић“. Средњу школу (Гимназија Параћин) је завршила са одличним успехом. Факултет медицинских наука у Крагујевцу је завршила са просечном оценом 9.20 (девет и 20/100). По завршеним основним студијама након уписала је Докторске академске студије, смер Имунологија, инфекција, инфламација. Усмени докторски испит из области Имунологија, инфекција, инфламација је положила 25.08.2018. са оценом 10 (десет). Од децембра 2018. до маја 2020. је била ангажована на пројекту Министарства 175069 Молекуларне детерминанте урођене имуности у аутоимунским болестима и канцерогенези као истраживач приправник. Руководилац је јуниор пројекта: „Синергистички ефекат блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD1 осовина у мишјем карциному дојке“ (ЈП 11-18). Од маја 2020. године је запошљена на Клиници за Оториноларингологију. Специјализацију из ОРЛ је започела децембра 2020. Члан је Лекарске коморе Србије и ОРЛ секције Српског лекарског друштва. Активно чита, пише и говори енглески и руски језик.

1. **Jovanovic M**, Gajovic N, Lukic M, Popovic A, Jovanovic IP. Synergism of PDL/PD1 and IL33/ST2 axis in tumor immunology. Ser J Exp Clin Res. DOI: 2478/sjecr-2018-0033
2. Bošković M, Franich A. A., Rajković S., Jovanović M., Jurisević M., Gajović N., **Jovanović M.**, Arsenijević N., Jovanović I., Živković M. D., Potential Antitumor Effect of Newly Synthesized Dinuclear 1,5-Naphthyridine-Bridging Palladium(II) Complexes ChemistrySelect 2020, 5, 10549
3. **Jovanović M.**, Gajović N., Jurišević M., Sekulić S., Arsenijević N., Jocić M., Jovanović M., Lukić R., Jovanović I., Radovanović D., Anti PD1 therapy activates tumoricidal properties of NKT cells and contributes to overall deceleration of tumor progression in a model of murine mammary carcinoma. Vojnosanitetski pregled 2021 OnLine-First Issue 00, Pages: 39-39. <https://doi.org/10.2298/VSP210126039J>

ИЗЈАВА АУТОРА ООРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марина Јовановић, изјављујем да
докторска дисертација поднасловом:

Синергистички ефекат блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина на прогресију мишјег
карцинома 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 19.04, 2021 године,



Потпис аутора

Образац2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марина Јовановић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синергистички ефекат блокаде IL-33/ST2 и PDL/PD-1 осовина на прогресију мишјег карцинома 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 дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једномод *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-делитиподистимусловима
- 3) Ауторство-безпрерада
- 4) Ауторство-некомерцијално
- 5) Ауторство-некомерцијално-делитиподистимусловима
- 6) Ауторство-некомерцијално -безпрерада²

У _____ Крагујевцу, 2021. године,



потписаутора

² 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/>

