

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Katarina M. Mirjačić Martinović

**Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih
receptora na urođenoubilačkim ćelijama na
funkciju ovih ćelija u bolesnika sa
metastatskim melanomom**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Katarina M. Mirjačić Martinović

**The influence of NK cell activating and
inhibitory receptor expression on the function
of these cells in metastatic melanoma patients**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Podaci o mentorima i članovima komisije

Mentor:

Prof. dr Radan Džodić
redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Prof dr Gordana Konjević
vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Članovi komisije:

Prof. dr Dušan Popadić
vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Vera Pravica
vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Kristina Gopčević
vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Vladimir Jurišić
redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

Dr sc. med. Snežana Bjelogrić
naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

Ovaj doktorski rad je urađen u Laboratoriji za imunologiju na Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, pod neposrednim rukovodstvom prof dr Gordane Konjević. Ovaj rad je realizovan u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja broj 145056 „Izučavanje regulatornih mehanizama vezanih za imunomodulaciju u malignim bolestima“ kojim je rukovodila prof. dr Gordana Konjević i broj 41031 „Identifikacija molekulskih markera za predikciju, progresiju tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ kojim rukovodi n. sav. dr Nikola Tanić.

Želim da se zahvalim

Prof. dr Gordani Konjević, svom mentoru, na ogromnoj pomoći, podršci i strpljenju tokom izrade ove doktorske disertacije kao i svemu što me je naučila tokom ovih godina rada u Laboratoriji za imunologiju.

Prof. dr Radanu Džodiću, mentoru ove doktorske teze na sugestijama tokom pisanja ovog rada i velikoj podršci.

Članovima Komisije: prof. dr Dušanu Popadiću, prof. dr Veri Pravici, prof. dr Kristini Gopčević, prof. dr Vladimiru Jurišiću i naučnom saradniku dr sc. med. Snežani Bjelogrić na veoma korisnim savetima i ispravkama teksta ove doktorske teze. Prof. dr Dušanu Popadiću se zahvaljujem i na pomoći tokom eksperimentalnog rada.

Kolegama dr sc. Ani Vuletić, dr sc. Tatjani Srdić-Rajić, dr sc. Emini Mališić, dr sc. Tatjani Stanojković, dr sc. Milanu Markićeviću, dr sc. Željku Žižku na pomoći, podršci i strpljenju.

Jasni Popovoć-Basić, laboratorijskom tehničaru na besprekornom laboratorijskom radu i ogromnoj pomoći i podršci.

I posebno hvala Draganu, Veljku, mojim roditeljima, sestrama i svekru na neizmernoj pomoći, razumevanju i strpljenju.

Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora na urođenoubilačkim ćelijama na funkciju ovih ćelija u bolesnika sa metastatskim melanomom

Katarina M. Mirjačić Martinović

Rezime

Uvod: Melanom, maligni tumor melanocita, iako ima brojna imunogenična svojstva, predstavlja tumor kože sa najvišom incidencom smrtnosti. Za antitumorsku imunost u melanomu posebno su značajne urođenoubilačke (*engl.* natural killer, NK) ćelije, komponenta sistema urođene imunosti koje mogu neposredno da prepoznaju maligno transformisane ćelije i da ih liziraju citolitičkim enzimima (perforin, granzimi), kao i da produkcijom citokina, pre svega IFN- γ , i hemokina regulišu funkcije ostalih ćelija imunskog odgovora u borbi protiv tumora. NK ćelije se definišu kao CD3⁻CD56⁺ i obuhvataju dve funkcionalno i fenotipski različite subpopulacije, zrelu, citotoksičnu CD3⁻CD56^{potmulo+} i manje zrelu, imunoregulatornu CD3⁻CD56^{sjajno+}. Funkcija NK ćelija je regulisana balansom signala koji potiču od njihovih aktivacionih i inhibitornih receptora. Aktivacioni receptori, među kojima lektinu sličan receptor NKG2D (*engl.* natural killer group 2, member D) ima veoma značajnu ulogu, prepoznaju stresom indukovane ligande na ćelijama tumora, dok inhibitorni imunoglobulinima slični ubilački receptori (*engl.* immunoglobulin-like killer receptors, KIR) vezivanjem za MHC molekule I klase inhibiraju funkciju NK ćelija i obezbeđuju njihovu toleranciju na sopstvene ćelije. Citokini urođene imunosti, IL-12 i IL-18, koje proizvode, pre svega, dendritične ćelije i makrofagi, kao i IL-2 kao glavni citokin Th1 imunskog odgovora različitim mehanizmima dovode do povećanja proliferacije i aktivacije NK ćelija u borbi protiv tumora.

Ciljevi rada: S obzirom da NK ćelije periferne krvi imaju značajnu ulogu u borbi protiv melanoma, a usled imunosupresije u odmaklom stadijumu tumora njihova aktivnost je u velikoj meri izmenjena, od velikog značaja bilo je istraživanje funkcionalnih i

imunofenotipskih karakteristika NK ćelija periferne krvi i njihovih subpopulacija u bolesnika obolelih od metastatskog melanoma (MM) u odnosu na zdrave kontrolne (ZK) osobe. Takođe, kako je melanom imunogeničan tumor koji je slabo osetljiv na zračnu i hemioterapiju, a brojni citokini ostvaruju stimulatorno dejstvo na NK ćelije i samim tim su ili odobrena terapija u lečenju bolesnika sa metastatskim melanomom, kao što je IL-2, ili se, kao IL-12 i IL-18, ispituju kroz brojne pretkliničke ili kliničke studije, bilo je od interesa da se ispituju efekti ovih citokina na funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija periferne krvi i njihovih subpopulacija u MM bolesnika i ZK osoba u cilju proučavanja mehanizama dejstva ovih citokina na različite karakteristike NK ćelija u cilju pospešivanja anti-tumorskog imunskog odgovora posredovanog ovim ćelijama.

Materijal i metode: U ovom istraživanju analizirani su uzorci periferne venske krvi 40 MM bolesnika u IV kliničkom stadijumu bolesti prema klasifikaciji američkog udruženja za kancer (*engl.* american joint committee on cancer, AJCC) i 30 ZK osoba. Krv je bolesnicima uzimana neposredno posle postavljanja dijagnoze, a pre primene hemio ili bilo koje druge post-operativne terapije. Iz uzetih uzoraka izolovane su mononukleane ćelije periferne krvi (MNČPK). Citotoksična aktivnost NK ćelija određivana je u odnosu na K562 tumorsku ćelijsku liniju osetljivu na NK ćelije radioaktivnim ^{51}Cr testom iz MNČPK sveže izolovanih, kao i 18h *in vitro* tretiranih medijumom za ćelijsku kulturu, IL-2 (200 IU/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml) i kombinacijom IL-12 i IL-18. Metodom protočne citometrije određivani su: ekspresija CD107a degranulacionog markera, produkcija IFN- γ , ekspresija STAT-1 i perforina u CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelijama i njihovim CD3 $^{-}$ CD56 $^{\text{potmulo}^{+}}$ i CD3 $^{-}$ CD56 $^{\text{sjajno}^{+}}$ subpopulacijama, procenat NK ćelija i njihovih subpopulacija, kao i ekspresija aktivacionog NKG2D, inhibitornih KIR (CD158a, CD158b) receptora i molekula vezanih za funkcije NK ćelija (CD56, IL-12R β 1 i IL-12R β 2) na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama iz netretiranih i svim ispitivanim citokinima 18h tretiranih MNČPK MM bolesnika i ZK osoba. Produkcija IFN- γ iz supernatanata MNČPK 48h tretiranih kombinacijom IL-12 i IL-18 u MM bolesnika i ZK određivana je ELISA metodom. RT-PCR metodom iz netretiranih kao i iz 18h *in vitro* tretiranih MNČPK svim ispitivanim citokinima praćena je transkripcija gena za DAP10 i SHP-1, kao i transkripcija gena za IRF-1 nakon 4h tretmana MNČPK kombinacijom IL-12 i IL-18 u ZK i MM

bolesnika. Western blot metodom analizirana je ekspresija pSTAT-4 proteina iz MNČPK tretiranih kombinacijom IL-12 i IL-18 u ZK i MM bolesnika. Za poređenje ispitivanih parametra NK ćelija MM bolesnika u odnosu na ZK osobe korišćen je statistički Mann Whitney test, a značajnost promena nakon tretmana citokinima u odnosu na medijum utvrđivana je Wilcoxon testom sume rangova. U statističkoj analizi korelacione povezanosti korišćen je Spearman test.

Rezultati: MM bolesnici u odnosu na ZK imaju statistički značajno nižu NK ćelijsku citotoksičnost, ekspresiju CD107a degranulacionog markera na ukupnim CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama kao i na citotoksičnoj CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji kao i sniženu produkciju IFN- γ u svim populacijama NK ćelija, što je praćeno sniženom ekspresijom molekula koji regulišu efektorske funkcije NK ćelija, perforina, IL-12R β 1 i IL-12R β 2 i CD56 receptora u svim populacijama NK ćelija. Analiza receptora NK ćelija i njihovih signalnih molekula ukazuje na to da su aktivacioni NKG2D receptor kao i njegov DAP10 signalni molekul značajno sniženi u MM bolesnika u odnosu na ZK za razliku od ekspresije inhibitornih KIR-ova, CD158a i CD158b i njihovog SHP-1 signalnog molekula koja je slična u MM bolesnika i ZK. Snižena ekspresija NKG2D receptora na NK ćelijama pozitivno koreliše sa sniženom citotoksičnošću i degranulacionim kapacitetom NK ćelija MM bolesnika. Ovo sniženje NKG2D receptora naročito se uočava u MM bolesnika sa najlošijom kliničkom prognozom koji pripadaju M1c kategoriji prema AJCC klasifikaciji.

Nakon 18h *in vitro* tretmana citokinima, pokazano je da IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 dovode do statistički značajnog povećanja citotoksičnosti NK ćelija, što je praćeno povećanom ekspresijom CD107a molekula i perforina u NK ćelijama i citotoksičnoj CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji u MM bolesnika i u ZK osoba. Najveće povećanje citotoksičnosti indukovane IL-2 i kombinacijom IL-12 i IL-18 uočeno je u bolesnika sa najmanje nepovoljnim lokalizacijama metastaza (M1a i M1b kategorija). Takođe, u MM bolesnika kombinacija IL-12 i IL-18 statistički značajno povećava, ali na mnogo nižem nivou nego kod ZK, intraćelijski IFN- γ jedino u imunoregulatornoj CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji, dok se u ZK osoba povećanje uočava u svim NK ćelijskim populacijama. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa dobijenim sniženjem *in vitro* produkcije IFN- γ , kao i manjim povećanjem nivoa pSTAT-4 proteina u MM bolesnika u odnosu na ZK posle

tretmana MNČPK kombinacijom IL-12 i IL-18. IL-2 u MM bolesnika, za razliku od ZK osoba, ne povećava ekspresiju NKG2D receptora ni u jednoj populaciji NK ćelija, dok se ekspresija CD158a i CD158b KIR receptora značajno povećava na svim populacijama NK ćelija u bolesnika i u ZK osoba. U MM bolesnika kombinacija IL-12 i IL-18 dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije NKG2D receptora na svim populacijama NK ćelija i DAP10 signalnog molekula u njihovim MNČPK, dok je u ZK ovo smanjenje prisutno, ali nije statistički značajno. Takođe je pokazano da IL-12 i IL-18 u kombinaciji u MM bolesnika i u ZK osoba dovode do smanjenja ekspresije CD158b receptora na NK ćelijama i CD3⁺CD56^{potmulo+} citotoksičnoj subpopulaciji. Za razliku od MM bolesnika kod kojih povećanje citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom IL-2, IL-12 i kombinacije IL-12 i IL-18 ne zavisi od ekspresije NKG2D, CD158a i CD158b receptora na NK ćelijama, u ZK je nađena statistički značajna korelacija između povećane ekspresije NKG2D receptora i povećane citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom IL-2.

Zaključak: U ovom radu opisane su imunofenotipske i funkcionalne karakteristike NK ćelija periferne krvi i njihovih subpopulacija u MM bolesnika i ZK osoba. Dobijeni rezultati ukazuju na to da metastatska bolest dovodi do poremećaja efektorskih funkcija NK ćelija i njihovih subpopulacija, kao i do smanjenja ekspresije aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovoj citotoksičnoj subpopulaciji posebno u bolesnika sa najnepovoljnijom kliničkom prognozom, pretpostavlja se usled dejstva brojnih faktora *in vivo* koje produkuju ćelije melanoma i imunosupresivne ćelije njihovog okruženja. *In vitro* tretmanima IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 postignuto je statistički visoko značajno povećanje citotoksičnosti i degranulacije NK ćelija u MM bolesnika koje može da ukaže na to da u bolesnika sa metastatskim melanomom ovim citokinima prethodno stimulisane NK ćelije mogu imati veliki značaj u novim terapijskim pristupima kao što je adoptivni transfer NK ćelija.

Ključne reči: NK ćelije, melanom, citotoksičnost, IFN- γ , NKG2D, KIR, IL-2, IL-12, IL-18

The influence of NK cell activating and inhibitory receptor expression on the function of these cells in metastatic melanoma patients

Katarina M. Mirjacic Martinovic

Summary

Introduction: Melanoma, malignant neoplasm of melanocytes, despite of its immunogenicity is the skin cancer with the highest mortality rate. In antitumor immunity in melanoma, natural killer (NK) cells as the component of the innate immune system have the ability to directly recognize malignantly transformed cells, lyse them by cytotoxic enzymes (perforin and granzymes) and by production of cytokines, such as IFN- γ and chemokines regulate the function of the other components of anti-tumor immune response. NK cells are defined as CD3⁻CD56⁺ and they are divided in two functionally and phenotypically different subsets, mature, cytotoxic, CD3⁻CD56^{dim+} and less mature, immunoregulatory, CD3⁻CD56^{bright+}. NK cell function is regulated by the balance of signals mediated by their activating and inhibitory receptors. Activating receptors, such as lectin-like receptor, natural killer group 2, member D (NKG2D) recognize stress induced ligands on tumor cells, while the inhibitory immunoglobulin-like killer receptors (KIR) by binding to MHC class I molecules inhibit NK cell function and enable self tolerance of NK cells. IL-12 and IL-18, the innate immunity cytokines produced primarily by dendritic cells and macrophages and IL-2, as the main cytokine of Th1 immune response have the ability to induce NK cell proliferation and activation against melanoma.

Objectives: Although the peripheral blood NK cells have an important antimelanoma effect considering the immunosuppression in advanced melanoma the effector functions of NK cells are impaired. According to this it was of great importance to analyze the functional and immunophenotypical characteristics of peripheral blood CD3⁻CD56⁺ NK cells and their subsets in metastatic melanoma (MM) patients compared to healthy controls (HC). Since melanoma is an immunogenic tumor insensitive to irradiation and

chemotherapy and numerous cytokines have stimulatory effect on NK cells, such as IL-2 that was approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of metastatic melanoma patients and IL-12 and IL-18 that are intensively investigated in numerous preclinical and clinical studies, the aim of this study was to investigate the effects of these cytokines on various functional and phenotypical characteristics of peripheral blood NK cells in MM patients and HC with intention to analyze the mechanisms of activity of these cytokines and their ability to induce anti-tumor NK cell immune response.

Material and methods: Peripheral venous blood was obtained from 40 MM patients in clinical stages IV according to American Joint Committee of Cancer (AJCC) and 30 HC. Blood was drawn at the time of diagnosis prior to chemotherapy or the other post surgical therapy. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from obtained peripheral venous blood samples. NK cell cytotoxic activity was evaluated against K562, NK-cell sensitive tumor cell line, using radioactive ^{51}Cr assay of freshly isolated PBMC, as well as after 18h *in vitro* treatments of PBMC in cell culture medium alone, IL-2 (200 IU/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml) and IL-12 and IL-18 in combination. Flow cytometry method was used for evaluation of the expression of CD107a degranulation marker, IFN- γ production, the expression of STAT-1 and perforin in CD3 $^+$ CD56 $^+$ NK cells and their CD3 $^+$ CD56 $^{\text{dim}+}$ and CD3 $^+$ CD56 $^{\text{bright}+}$ subsets, the percentage of NK cells and their subsets, as well as the expression of activating NKG2D, inhibitory KIR (CD158a, CD158b) receptors and molecules that regulate NK cell effector functions (CD56, IL-12R β 1, IL-12R β 2) on NK cells and their two subsets. IFN- γ production from supernatants of PBMC 48h *in vitro* treated with IL-12 and IL-18 in combination was estimated by ELISA. The transcription level of DAP10 and SHP-1 signaling molecules from native and 18h *in vitro* treated PBMC with all investigated cytokines and the transcription level of IRF-1 from 4h *in vitro* treated PBMC with IL-12 and IL-18 in combination were estimated by RT-PCR. pSTAT-4 protein expression was analyzed by Western blot from PBMC 4h *in vitro* treated with combined IL-12 and IL-18 treatment. The investigated parameters between MM patients and HC were compared by statistical Mann Whitney test, while the significance of differences after cytokine *in vitro* treatments was evaluated by Wilcoxon rank sum test. For correlation analysis Spearman's correlation was evaluated.

Results: MM patients compared to HC had impaired NK cell cytotoxicity, decreased expression of CD107a degranulation marker on CD3⁺CD56⁺ NK cells and their CD3⁺CD56^{dim+} subset, lower IFN- γ production in entire NK cell population that was in association with decreased expression of various molecules that regulate NK cell effector functions, perforin, IL-12R β 1, IL-12R β 2 CD56 on NK cells and both their subsets. Analysing the expression of NK cell receptors and their signaling molecules we show that the expression of NKG2D activating NK cell receptor and its DAP10 signaling molecule were decreased in MM patients compared to HC contrary to the expression of inhibitory KIR receptors, CD158a and CD158b, and its SHP-1 signaling molecule that were similar in MM and HC. In MM patients only, there was positive correlation between decreased NKG2D expression and impaired cytotoxicity, as well as lower degranulation capacity of NK cells. The lowest expression of NKG2D receptor was obtained in MM patients with unfavorable clinical prognosis that belong to M1c subclass.

After cytokine *in vitro* treatments it was shown that IL-2, IL-2 and combined IL-12 and IL-18 treatment increased NK cell cytotoxicity that is in association with the increased expression of CD107a degranulation marker and perforin in NK cells and their cytotoxic subset. The highest increase in NK cell cytotoxicity was observed after IL-2 and combined IL-12 and IL-18 *in vitro* treatment in MM subclasses with better clinical prognosis (M1a and M1b). Furthermore, in HC, the combination of IL-12 and IL-18 significantly increased IFN- γ production in NK cells and both their subsets and only in CD3⁺CD56^{bright+} subset in MM patients, but in the lower level than in HC. These results are in association with significantly lower IFN- γ production and lower increase in pSTAT-4 protein level in PBMC *in vitro* treated with IL-12 and IL-18 in combination of MM patients compared to HC. Contrary to HC, in MM patients IL-2 did not have any significant effect on NKG2D receptor expression in the entire NK cell population, while this cytokine significantly increased CD158a and CD158b KIR receptor expression on NK cells and their subsets in MM patients, as well as in HC. In MM patients *in vitro* combined treatment with IL-12 and IL-18 significantly decreased NKG2D receptor expression on entire NK cell population, while in HC this decrease was not significant. Furthermore, the same combination of cytokines significantly decreased inhibitory KIR CD158b receptor expression on NK cells

and their cytotoxic subset in both HC and MM patients. In MM patients there was no correlation between the expression of NKG2D, CD158a and CD158b receptors and NK cell cytotoxicity after 18h *in vitro* treatments of PBMC with IL-2, IL-12 and IL-12 and IL-18 in combination, while in HC NKG2D receptor positively correlated with NK cell activity after 18h *in vitro* treatment with IL-2.

Conclusion: In this study the functional and immunophenotypical characteristics of peripheral blood NK cells and their subsets were analyzed in MM patients compared to HC. The obtained results indicate that metastatic spread of melanoma impairs the effector functions of NK cells and their subsets and induces decreased expression of activating NKG2D receptor on NK cells and their cytotoxic subset especially in MM patients with the worst prognosis. It is supposed that numerous factors produced by melanoma cells and their microenvironment *in vivo* suppress NK cell functions. *In vitro* treatments with IL-2, IL-12 and IL-12 and IL-18 in combination strongly induce the increase in NK cell cytotoxic activity and degranulation which may indicate the potential of NK cell population preactivated with these cytokines in novel therapeutic approaches such as adoptive NK cell transfer in metastatic melanoma patients.

Key words: NK cells, melanoma, cytotoxicity, IFN- γ , NKG2D, KIR, IL-2, IL-12, IL-18

Spisak skraćenica

ADCC- ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela

DC- dendritske ćelije

FITC- fluorescein izotiocijanat

GM-CSF- granulocitno monocitni faktor rasta

ICAM-1- međućelijski adhezivni molekul-1

IDO- indolaminska 2, 3-dioksidogenaza

IFN- interferon

IL- interleukin

ITAM- imunoreceptorski tirozinski aktivacioni motivi

ITIM- imunoreceptorski tirozinski inhibitorni motivi

JAK- Janus tirozin kinaza

KIR- ubilački receptori slični imunoglobulinima

LAK- limfokinima aktivirane ćelije ubice

LAMP-1- protein membrane lizozoma 1

MAPK- mitogenom aktivirana protein kinaza

MDSC- mijeloidne supresivne ćelije

MMP- matriks metaloproteinaza

MNČPK- mononuklearne ćelije periferne krvi

NCAM- adhezivni molekul nervnih ćelija

NCR- prirodni citotoksični receptori

NK ćelije- urođenoubilačke ćelije

NKG2D- NK receptor grupe 2, član D

NKG2DL- ligand NKG2D receptora

PCR- reakcija lančanog umnožavanja

PE- fikoeritrin

PerCP- peridinin hlorofil protein

PGE2- prostaglandin E2

PI3K- fosfatidil inozitol 3 kinaza

PMA- forbol-12-miristat-13-acetat
RNK- ribonukleinska kiselina
ROS- reaktivne kiseonične vrste
RT-PCR- reakcija reverzne transkripcije
STAT- prenosnici signala i aktivatori transkripcije
TAM- makrofagi pridruženi tumoru
TAN- neutrofilni pridruženi tumoru
TCR- T ćelijski receptor
TGF- β - transformišući faktor rasta- β
TIL- tumor infiltrišući limfociti
TNF- faktor nekroze tumora
Treg- regulatorne T ćelije
VCAM- adhezivni molekul vaskularnih ćelija
VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opšte karakteristike urođenoubilačkih ćelija.....	1
1.2. Razvoj NK ćelija.....	3
1.3. Edukacija i tolerancija NK ćelija.....	5
1.3.1. Senzibilizacija ili „prajmovanje“ NK ćelija.....	7
1.4. Receptori NK ćelija.....	8
1.4.1. Aktivacioni receptori.....	8
1.4.1.1. NKG2D.....	8
1.4.1.2. Prirodni citotoksični receptori (NCR).....	12
1.4.1.3. DNAM-1.....	13
1.4.1.4. CD16.....	14
1.4.2. Inhibitorni receptori.....	15
1.4.2.1. KIR receptori.....	15
1.4.2.2. Lektinu slični receptori koji zavise od kalcijuma.....	19
1.4.2.3. Leukocitni imunoglobulinima slični receptori.....	19
1.4.2.4. Ubilački lektinu sličan receptor G1.....	20
1.5. Mehanizmi efektivne funkcije NK ćelija.....	20
1.5.1. Citotoksičnost NK ćelija.....	20
1.5.1.1. Direktna citotoksičnost.....	20
1.5.2. Imunoregulatorna uloga NK ćelija.....	23
1.5.2.1. Interferon-gama (IFN- γ).....	23
1.6. Funkcionalne karakteristike subpopulacija NK ćelija.....	25
1.6.1. Memorijske NK ćelije.....	26
1.6.2. NK ćelije materice.....	27
1.6.3. NK-22 subpopulacija NK ćelija.....	28
1.7. Uloga NK ćelija u odbrani od tumora.....	28
1.8. Imunosupresivno dejstvo ćelija tumora i tumorske mikrosredine na NK ćelije.....	30
1.9. Citokini-modulatori aktivnosti NK ćelija.....	35
1.9.1. Interleukin-2 (IL-2).....	35
1.9.2. Interleukin-12 (IL-12).....	37

1.9.3. Interleukin-18 (IL-18).....	39
1.10. Melanom.....	41
1.10.1. Melanom-opšte karakteristike tumora.....	41
1.10.2. Dijagnostifikovanje i prognoza bolesnika sa melanomom.....	43
1.10.3. Imunska reaktivnost vezana za melanom.....	45
1.10.3.1. Uloga NK ćelija u odbrani od melanoma.....	47
1.10.4. Terapija melanoma.....	48
1.10.4.1. Adjuvantna terapija melanoma.....	49
1.10.4.1.1. Uloga citokina u terapiji melanoma.....	51
2. CILJEVI RADA.....	55
3. ISPITANICI I METODE.....	56
3.1. Bolesnici i zdrave kontrolne osobe.....	56
3.2. Laboratorijske metode.....	57
3.2.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	57
3.2.2. In vitro tretmani mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	58
3.2.3. Određivanje citoksične aktivnosti NK ćelija.....	58
3.2.4. Protočna citometrija.....	59
3.2.4.1. Određivanje ekspresije CD107a molekula na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama.....	60
3.2.4.2. Analiza ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama posle kontakta sa tumorskim ćelijskim linijama.....	61
3.2.4.3. Određivanje intraćelijskog perforina, STAT-1 i IFN- γ u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama.....	61
3.2.5. Određivanje produkcije IFN- γ ELISA metodom.....	62
3.2.6. Reverzna transkripcija (RT-PCR).....	63
3.2.6.1. Izolacija RNK.....	63
3.2.6.2. Prevođenje RNK u komplementarnu DNK.....	64
3.2.6.3. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR).....	65
3.2.7. Western blot	66
3.2.7.1. Izolacija proteina.....	66
3.2.7.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju.....	67
3.2.7.3. Elektroforeza proteina.....	67
3.2.7.4. Elektrotransfer proteina na membranu.....	68

3.2.7.5. Imunodetekcija proteina.....	68
3.3. Statističke analize.....	69
4. REZULTATI.....	70
4.1. Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija u bolesnika obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe.....	70
4.1.1. Funkcionalne karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija.....	70
4.1.1.1. Citotoksična aktivnost i produkcija IFN- γ	70
4.1.1.2. Ekspresija molekula vezanih za regulaciju funkcionalnih aktivnosti NK ćelija.....	72
4.1.2. Zastupljenost CD3 ⁻ CD56 ⁺ NK ćelija i njihovih CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+} i CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+} subpopulacija u perifernoj krvi obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe.....	74
4.1.3. Imunofenotipske karakteristike CD3 ⁻ CD56 ⁺ NK ćelija i njihovih CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+} i CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+} subpopulacija u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	75
4.1.3.1. Ekspresija aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe.....	75
4.1.3.2. Ekspresija aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma posle kontakta limfocita periferne krvi sa tumorskim ćelijskim linijama.....	76
4.1.3.3. Ekspresija inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b, na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe.....	78
4.1.4. Nivo transkripcije signalnih molekula, DAP10 i SHP-1, u netretiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe.....	79
4.1.5. Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike ovih ćelija u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	80
4.1.6. Ekspresija različitih parametara NK ćelija u obolelih od metastatskog melanoma sa različitim lokalizacijama udaljenih metastaza.....	82

4.2. <i>In vitro</i> efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	83
4.2.1. <i>In vitro</i> efekat ispitivanih citokina na funkcionalne karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija.....	83
4.2.1.1. <i>In vitro</i> efekat ispitivanih citokina na citotoksičnu funkciju NK ćelija i njihovih subpopulacija.....	83
4.2.1.2. <i>In vitro</i> efekat kombinacije IL-12 i IL-18 na produkciju IFN- γ i nivo STAT-4 i IRF-1 signalnih molekula.....	89
4.2.2. <i>In vitro</i> efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na zastupljenost NK ćelija i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	91
4.2.3. <i>In vitro</i> efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na ekspresiju aktivacionih i inhibitornih receptora CD3 ⁻ CD56 ⁺ NK ćelija i njihovih CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+} i CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+} subpopulacija u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	92
4.2.3.1. <i>In vitro</i> efekat svih ispitivanih citokina na ekspresiju NKG2D aktivacionog receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	92
4.2.3.2. <i>In vitro</i> efekat svih ispitivanih citokina na ekspresiju KIR inhibitornih receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	95
4.2.4. <i>In vitro</i> efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na nivo transkripcije DAP10 i SHP-1 signalnih molekula u mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma.....	101
4.2.5. Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike <i>in vitro</i> tretiranih NK ćelija zdravih kontrolnih osoba.....	103
4.2.6. Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike <i>in vitro</i> tretiranih NK ćelija bolesnika obolelih od metastatskog melanoma.....	104
5. DISKUSIJA.....	105
6. ZAKLJUČCI.....	133
7. LITERATURA.....	135

1. UVOD

1.1. Opšte karakteristike urođenoubilačkih ćelija

Urođenoubilačke (*engl.* natural killer, NK) ćelije, predstavljaju ćelije urođene imunosti čija je prvenstvena uloga da eliminišu maligno transformisane i virusima inficirane ćelije, ali i širok dijapazon ostalih „izmenjenih“ ćelija kao što su ćelije obložene antitelima, alogene ćelije ili ćelije izložene nekoj vrsti fizičkog ili hemijskog stresa, a da pri tome ne oštete sopstvene, zdrave ćelije (Caligiuri, 2008). Prema najnovijim podacima NK ćelije pripadaju posebnoj grupi limfocita koji se nazivaju limfoidne ćelije urođene imunosti (*engl.* innate lymphoid cells, ILC) i koje se dele u 3 subpopulacije (ILC1, ILC2, ILC3) prema različitoj ekspresiji ključnih transkripcionih faktora i različitim funkcionalnim karakteristikama (Spits i sar., 2013). NK ćelije pripadaju ILC1 grupi i imaju osobinu da citotoksičnošću i produkcijom brojnih citokina i hemokina spontano eliminišu ciljane ćelije zahvaljujući velikom broju receptora na svojoj površini, bez prepoznavanja specifičnih antigena na površini ciljnih ćelija.

Prvi podaci o NK ćelijama datiraju iz 1975. godine, kada je Rolf Kiessling paralelno sa Ronaldom Herbermanom u miševa opisao i izolovao velike, granulirane limfocite, koji nemaju osobine ni T ni B limfocita, a imaju urođenu sposobnost da neposredno liziraju ćelije tumora, pa ih je iz tog razloga nazvao urođenoubilačkim ćelijama (Kiessling i sar., 1975; Herberman i sar., 1975). Korišćenjem monoklonskih antitela i različitih molekularno-bioloških tehnika, osamdesetih godina prošlog veka u čoveka su otkrivene NK ćelije, kao posebna, treća klasa limfocita (Lanier i sar., 1986). Kasnije je takođe otkriveno da NK ćelije nisu samo ćelije kičmenjaka, nego i mnogih beskičmenjaka.

U perifernoj krvi čoveka NK ćelije su uglavnom kratkog životnog veka i čine 5-20% limfocita. Međutim, poznato je da se NK ćelije pored periferne krvi nalaze i u mnogim drugim organima i tkivima. Tako da posle potpunog ili delimičnog sazrevanja u kostnoj srži one odlaze u sekundarne limfne, ali i mnoge druge nelimfoidne organe (koža, mukoza gastrointestinalnog trakta (GIT), jetra, pluća, materica) (Carrega i Ferlazzo, 2012).

Morfološki, većina NK ćelija su velike granulirane ćelije, veće od nestimuliranih limfocita. Imaju bubrežasto jedro i obilnu citoplazmu, u kojoj se nalaze gusto raspoređene, velike azurofilne granule (Campbell i Hasegawa, 2013).

Fenotipski, NK ćelije ispoljavaju veliki broj markera na svojoj površini, ali je njihovo najznačajnije obeležje prisustvo CD56, a odsustvo CD3 receptora. CD56 receptor koji po svojoj strukturi pripada familiji imunoglobulina je izoforma adhezivnog molekula nervnih ćelija (*engl.* neural cell adhesion molecule, NCAM) i primarno je odgovoran za uspostavljanje kontakta između nervnih i mišićnih ćelija (Caligiuri, 2008). Međutim, uloga CD56 receptora u funkciji humanih NK ćelija nije poznata. Iako se pretpostavlja da ovaj receptor nije direktno uključen u mehanizam citotoksičnosti NK ćelija, mogao bi da bude bitan u tom procesu jer se smatra da ima značajnu ulogu u vezivanju NK ćelija za ciljne ćelije (Nitta i sar., 1989).

Marker NK ćelija je i CD16 receptor, iako se on nalazi i na površini velikog broja drugih ćelija (neutrofili, aktivirani monociti, tkivni makrofagi, T limfociti). Ovaj molekul je receptor niskog afiniteta za Fc fragment imunoglobulina IgG1 i IgG3 i odgovoran je za ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela (*engl.* antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (Warren i Kinnear, 1999).

Nekada se smatralo da su NK ćelije homogene i da ih čini samo jedna populacija. Međutim, prve podatke o različitim subpopulacijama NK ćelija dali su Nagler i njegove kolege 1989. godine (Nagler i sar., 1989). Danas se zna da se NK ćelije na osnovu ekspresije CD56 i CD16 receptora dele u dve osnovne, funkcionalno i fenotipski različite subpopulacije $CD3^+CD56^{potmulo+}$ i $CD3^+CD56^{sjajno+}$ (Cooper i sar., 2001a; Montaldo i sar., 2013).

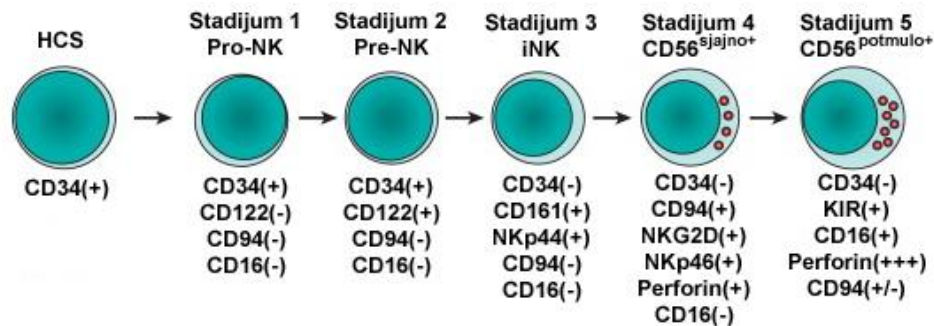
S obzirom na svoju bitnu ulogu u odbrani od tumora, NK ćelije sve više nalaze mesto u onkološkoj terapiji (Ames i Murphy, 2014). Takođe, poznata je i uloga ovih ćelija u borbi protiv različitih infekcija, transplantaciji, fiziologiji ali i patologiji trudnoće, razvoju autoimunosti (Vivier i sar., 2008). Pored toga, u literaturi je sve veći broj podataka o novim karakteristikama NK ćelija koje ih približavaju ćelijama adaptivne imunosti kao što su sticanje tolerancija na sopstveno (Höglund i Brodin, 2010), senzibilizacija ili „prajmovanje“ (Lucas i sar., 2007), klonska ekspanzija, memorija (Sun i sar., 2009).

1.2. Razvoj NK ćelija

Iako se razvoj NK ćelija već dugo proučava još uvek je ovaj proces nedovoljno ispitan, posebno u humanoj populaciji. Poznato je da NK ćelije potiču od CD34+ hematopoeznog prekursora i da u ovom procesu interleukin (IL)-15 ima bitnu ulogu. Za razliku od miševa gde se razvoj NK ćelija prvenstveno odvija u kostnoj srži, kod čoveka su prekursori NK ćelija nađeni i u timusu, perifernoj krvi, sekundarnom limfnom tkivu, fetalnoj i jetri odraslih, krvi pupčanika i decidui (Montaldo i sar., 2013). Pokazano je da NK ćelije koje potiču iz timusa ispoljavaju α lanac IL-7 odnosno CD127, pa njihov razvoj zavisi prvenstveno od IL-7, ali i IL-2, IL-15, IL-21 i GATA3 transkripcionog faktora. Zanimljivo je da ove ćelije čine 15-30% NK ćelija limfnog čvora i funkcionalno su slične CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama (Klein i sar., 2010).

Razvoj humanih NK ćelija odvija se u 5 faza (Slika 1). Najraniji prekursori NK ćelija (I stadijum razvoja) se nazivaju pro-NK ćelije i one nisu osetljive na IL-15, ali tokom svog daljeg razvoja stižu CD117 (c-Kit), receptor za faktor rasta matičnih ćelija (*engl.* stem cell factor, SCF) i prelaze u pre-NK ćelije (II stadijum). Pre-NK ćelije ispoljavaju β subjedinicu receptora interleukina-2 i IL-15 (IL-2/15R β), pa su samim tim podložne uticaju ovih citokina u daljem toku svog razvoja. Pod dejstvom ovih citokina pre-NK ćelije u III stadijumu svog razvoja prelaze u nezrele (*engl.* immature, i) NK ćelije. Ove prekursorske ćelije usmerene su isključivo ka razvoju populacije NK ćelija odnosno one ispoljavaju samo receptore ovih ćelija kao što su CD2, CD7, CD56, CD161, 2B4, NKp44. Međutim, iako ispoljavaju nekoliko aktivacionih receptora i koreceptora NK ćelija, one još uvek nisu funkcionalno zrele (Montaldo i sar., 2013; Yu i sar., 2013). Funkcionalno sazrevanje NK ćelija počinje u IV fazi njihovog razvoja. NK ćelije na svojoj površini tada ispoljavaju CD94-NKG2A, NKG2D, NKp46 receptore, a u nekima od njih počinje sinteza interferona (IFN)- γ . Ove ćelije predstavljaju CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciju NK ćelija, koja čini osnovu (95%) NK ćelija sekundarnih limfnih organa tako da limfni čvorovi predstavljaju veliki rezervoar ovih ćelija u telu čoveka, za razliku od periferne krvi u kojoj se nalazi 10% ovih ćelija (Cooper i sar., 2001b; Poli i sar., 2009). Međutim ni sve CD3⁻CD56^{sjajno+} ćelije, pre svega u sekundarnim limfnim organima, nisu dostigle potpunu funkcionalnu zrelost. U

V i poslednjoj fazi razvoja NK ćelija nastaju $CD3^-CD56^{potmulo+}$ ćelije koje čine preko 90% NK ćelija periferne krvi i one su potpuno efektorski zrele ćelije koje su se najverovatnije razvile iz $CD3^-CD56^{sjajno+}$ NK ćelija što potvrđuje i podatak da $CD3^-CD56^{sjajno+}$ NK ćelije u odnosu na $CD3^-CD56^{potmulo+}$ imaju duže telomere, bolje proliferišu, pa samim tim predstavljaju funkcionalno nezreliju formu (Romagnani i sar., 2007). Najvažnije promene u poslednjem stadijumu razvoja NK ćelija koje doprinose njihovoj funkcionalnoj zrelosti su pojava CD16 aktivacionog receptora i inhibitornih ubilačkih receptora sličnih imunoglobulinima (*engl.* immunoglobulin-like killer receptors, KIR) na površini $CD56^{potmulo+}$ ćelija kao i povećanje broja citotoksičnih granula sa medijatorima perforinom i granzimima u citoplazmi ovih ćelija. U humanizovanom mišjem modelu je pokazano da $CD3^-CD56^{sjajno+}CD16^-KIR^-$ ćelije preko $CD3^-CD56^{potmulo+}CD16^-KIR^-$ prekursorskih ćelija prelaze završno u $CD3^-CD56^{potmulo+}CD16^+KIR^+$ funkcionalno zrele NK ćelije (Huntington i Di Santo, 2008). Takođe, na osnovu prisustva CD62L, adhezionog molekula koji omogućava ekstravazaciju $CD3^-CD56^{sjajno+}$ ćelija u tkiva i organe za razliku od $CD3^-CD56^{potmulo+}$ ćelija koje ne ispoljavaju ovaj molekul i dominantne su u perifernoj krvi, identifikovana je $CD3^-CD56^{potmulo+}CD62L^+$ subpopulacija NK ćelija koja može da sintetiše citokine i citotoksična je, pa iz tih razloga kao i zbog dužine telomera predstavlja intermedijarni stadijum između manje zrele $CD3^-CD56^{sjajno+}$ i zrele $CD3^-CD56^{potmulo+}$ subpopulacije (Juelke i sar., 2010). Međutim postoje i autori koji smatraju da su $CD3^-CD56^{potmulo+}$ i $CD3^-CD56^{sjajno+}$ NK ćelije 2 potpuno efektorski zrele subpopulacije NK ćelija sa različitim funkcijama i da se njihov razvoj odvija nezavisno (Montaldo i sar., 2013).



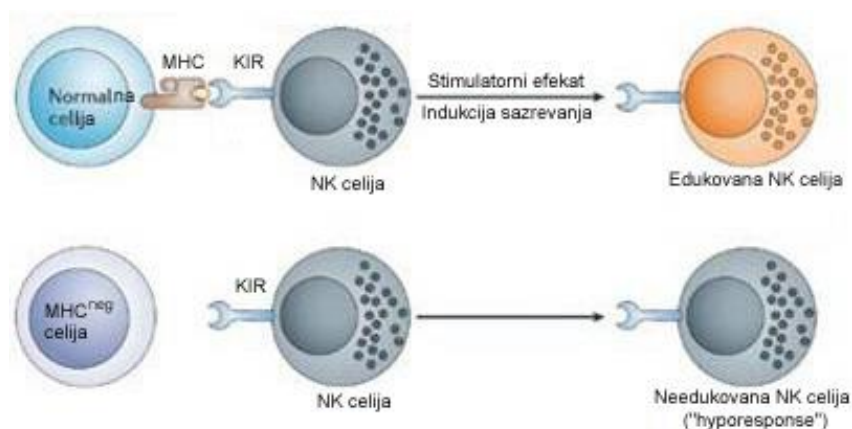
Slika 1. U toku svog razvoja od hematopoeznog stem ćelijskog prekursora (HCS) humane NK ćelije prolaze kroz 5 faza. Tokom ovog složenog procesa ove ćelije ispoljavaju ili gube veliki broj različitih markera (Yu i sar., 2013).

1.3. Edukacija i tolerancija NK ćelija

NK ćelije kao posebna klasa limfocita, za razliku od T i B ćelija, nemaju receptore koji nastaju somatskim rearanžiranjem gena za tačno određene determinantne antigena. Umesto toga, funkcija NK ćelija je kontrolisana mnogobrojnim receptorima, kodiranim funkcionalnim genima nasleđene DNK, čiji su ligandi kako klasični tako i neklasični molekuli I klase glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC). Iako NK ćelije na svojoj površini ispoljavaju brojne aktivacione i koaktivacione receptore, još uvek nije poznato da mogu samostalno i direktno da učestvuju u patogenezi autoimunosti (Orr i Lanier, 2010). Tako da zahvaljujući inhibitorynim receptorima kojima prepoznaju sopstvene MHC molekule I klase, NK ćelije ne liziraju autologe ćelije. Ova interakcija između inhibitorynih receptora NK ćelija i MHC molekula na sopstvenim ćelijama je veoma bitan proces koji se najverovatnije odvija u poslednjim fazama razvoja NK ćelija u kostnoj srži ili u različitim perifernim organima i naziva se edukacija odnosno licenciranje NK ćelija. Tako NK ćelije nauče da ne prepoznaju sopstvene, zdrave ćelije, a posle toga postaju osposobljene da obavljaju svoje efektorske funkcije (Höglund i Brodin, 2010) (Slika 2).

Do skoro se smatralo da sve NK ćelije moraju da imaju najmanje jedan inhibitoryni receptor kojim prepoznaju sopstveni MHC molekul I klase da bi bile tolerantne. Međutim, poznato je da je lokus KIR gena veoma varijabilan kako u broju prisutnih gena tako i u sekvenci svakog svog alela. Takođe, kako su geni za KIR i MHC molekule locirani na različitim hromozomima i ne postoji mogućnost zajedničkog nasleđivanja, oko 60% zdravih osoba, bez simptoma i znakova autoimunskih bolesti, ne ispoljava KIR receptore na sopstvenim NK ćelijama (Parham, 2005). Takođe je pokazano u mišjim modelima, a i u pacijenata koji usled mutacije nemaju određene alele MHC molekula da ne dolazi do razvoja autoimunosti (Liao i sar., 1991). U svim ovim slučajevima NK ćelije nisu autoagresivne jer nisu prošle proces edukacije odnosno nelicencirane su i u fiziološkim uslovima su slabo funkcionalne (*engl.* hyporesponsive) (Orr i Lanier, 2010) (Slika 2). Iako je molekularni mehanizam nelicenciranosti NK ćelija nedovoljno ispitan danas se pretpostavlja da je ograničenje funkcije aktivacionih receptora u ćelijskoj membrani

nelicenciranih NK ćelija osnovna razlika između edukovanih i needukovanih NK ćelija. Tako su u edukovanim NK ćelijama aktivacioni receptori grupisani u takozvane nanodomene koji su smeštinu u izvanćelijskom sloju membrane i predstavljaju njene regione koji su pogodni za prijem i prenos signala, za razliku od needukovanih NK ćelija u kojima ovi receptori ostaju vezani za aktinsku mrežu u ćeliji (Guia i sar., 2011). Ipak, danas se zna da je ovaj proces reverzibilan tako da primarno nelicencirana NK ćelija može postati licencirana u novoj sredini gde se susreće sa ćelijom koja ispoljava odgovarajući MHC molekul I klase ili suprotno NK ćelija koja je u toku svog razvoja prošla edukaciju može je izgubiti u interakciji sa sopstvenom ćelijom na periferiji koja ne ispoljava MHC molekul. Ova pojava se naziva reedukacija (Sun, 2010).



Slika 2. NK ćelije koje ispoljavaju inhibicioni KIR receptor u kontaktu sa sopstvenim MHC molekulom I klase postaju edukovane i funkcionalno zrele, za razliku od NK ćelija čiji KIR receptori ne prepoznaju sopstvene MHC molekule i one ne prolaze kroz proces edukacije (needukovane ili „hyporesponz“ NK ćelije) (Raulet i Vance, 2006)

Međutim, za razliku od T i B limfocita, nelicencirane NK ćelije ne podležu procesu apoptoze. Prema novim saznanjima, ove ćelije imaju dominantnu ulogu u borbi protiv virusnih infekcija, pre svega humanog citomegalovirusa (HCMV) i smatra se da pojava infekcije prekida proces tolerancije na sopstveno (Sun i Lanier, 2008; Orr i sar., 2010). Postavlja se pitanje kako nelicencirane NK ćelije ipak ne oštete sopstveno tkivo tokom ovog procesa. Smatra se da dolazi do određene selekcije onih nelicenciranih NK ćelija usmerenih prvenstveno na eliminaciju inficiranih ćelija, a koje zaobilaze sopstveno tkivo (Sun, 2010; Thielens i sar., 2012). Takođe, najnovija saznanja vezana za tumore govore o tome da needukovane NK ćelije efikasnije eliminišu maligno transformisane ćelije u

poređenju sa edukovanim. Pokazano je da needukovane NK ćelije ubijaju ćelije neuroblastoma ADCC mehanizmom i produkcijom IFN- γ kada se kao terapija koristi 3F8 monoklonsko antitelo usmereno na disialogangliozid 2 (GD2) na površini ćelija neuroblastoma (Tarek i sar., 2012). Tako da i u odbrani od tumora kao i virusnih infekcija, needukovane NK ćelije neispoljavanjem inhibitorynog KIR receptora nisu inhibirane da eliminišu ciljne ćelije za razliku od edukovanih NK ćelija koje svojim KIR-ovima prepoznaju odgovarajući MHC molekul na ćeliji meti i bivaju inhibirane. Tako da bi terapijska primena inhibitorynih anti-KIR antitela mogla da ima značajnu ulogu u aktivaciji NK ćelija i eliminaciji tumora.

1.3.1. Senzibilizacija ili „prajmovanje“ NK ćelija

Poznato je da zrele dendritske ćelije (DĆ) produkcijom citokina, pre svega IL-15, omogućavaju potpuno funkcionalno sazrevanje NK ćelija u procesu senzibilizacija ili „prajmovanja“ ovih ćelija. IL-15, vezan za α subjedinicu IL-15 receptora (IL-15R α) na DĆ vezuje se za komplementarnu $\beta\gamma$ subjedinicu IL-15 receptora (IL-15R $\beta\gamma$) na NK ćeliji i ovaj proces, takozvana *trans* prezentacija IL-15, omogućava preživljavanje i proliferaciju NK ćelija, kao i diferencijaciju nezrelih CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁻ u potpuno zrele CD3⁻CD56^{potmulo+}CD16⁺ ćelije (Lucas i sar., 2007). Ovaj proces koji se odvija u prvoj minuti interakcije NK ćelija i DĆ u posebnom aktivacionom domenu odvojenom od inhibitorynog MHC I/KIR domena, u centru imunološke sinapse, omogućava brzu aktivaciju NK ćelija, ali i zaštitu zrelih DĆ od liziranja NK ćelijama (Brilot i sar., 2007).

Pored DĆ značajnu ulogu u prajmovanju NK ćelija imaju i makrofagi, neutrofil, CD4⁺ T limfociti kao i brojni citokini kao što su IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 koje ove ćelije proizvode. Postoje podaci da IL-18 proizveden iz makrofaga i neutrofila aktivacijom proteina mijeloidne diferencijacije 88 (*engl.* myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) u NK ćelijama reguliše njihovo potpuno funkcionalno sazrevanje (Jaeger i sar., 2012).

1.4. Receptori NK ćelija

Efektorske funkcije NK ćelija su regulisane složenim balansom aktivacionih i inhibitornih signala koje ove ćelije primaju preko svojih mnogobrojnih receptora (Caligiuri, 2008). Receptori NK ćelija se prema svojoj funkciji dele u aktivacione i inhibitorne receptore, a prema strukturi u grupu imunoglobulinima sličnih i grupu od kalcijuma zavisnih lektinu sličnih receptora (Montaldo i sar., 2013).

Većina ovih receptora se ispoljava stohastički tako da svaka NK ćelija unutar jedne individue ne ispoljava ceo set gena za aktivacione i inhibitorne receptore NK ćelija te individue već samo deo gena koji su slučajno odabrani. Na taj način se NK ćelije odlikuju velikom heterogenošću i u svom imunofenotipu ali i funkcionalnim svojstvima što je bitno u procesu eliminacije virusa ili tumora (Rajalingam, 2011).

1.4.1. Aktivacioni receptori

NK ćelije na svojoj površini ispoljavaju brojne aktivacione receptore, koji su dobrim delom strukturno i funkcionalno identifikovani. Najznačajni aktivacioni receptori NK ćelija su NKG2D, predstavnik lektinima sličnih receptora 2 (*engl.* natural killer cell lectin-like receptor 2, NKG2), CD16 receptor, prirodni citotoksični receptori (*engl.* natural cytotoxicity receptors, NCR), aktivacioni KIR receptori i DNAM-1. Takođe, NK ćelije ispoljavaju i brojne koreceptore kao što su 2B4, CD48 i NKp80 (Montaldo i sar, 2013).

1.4.1.1. NKG2D

Opšte karakteristike

NKG2D je najbolje opisan aktivacioni receptor NK ćelija. Humani NKG2D je konstitutivno ispoljen na površini praktično svih NK ćelija, većini NKT i $\gamma\delta$ T limfocita, a među ćelijama adaptivne imunosti ovaj receptor ispoljava najveći broj $CD8^+ \alpha\beta$ T limfocita kao i mala populacija $CD4^+ \alpha\beta$ T limfocita koja može imati imunoregulatornu ulogu, ali se primarno vezuje za različita patološka stanja npr. reumatoidni artritis. U $CD8^+$ limfocitima

NKG2D ima ulogu koreceptora (Zafirova i sar., 2011). Takođe je dokazano prisustvo NKG2D molekula na površini ćelija miševa, svinja, rezus majmuna i šimpanzi. Međutim, miševi ispoljavaju ovaj receptor jedino na aktiviranim i memorijskim CD8⁺ αβ T ćelijama (Raulet, 2003; Zafirova i sar., 2011).

Pouzdanost se zna da je NKG2D receptor primarno odgovoran za inicijaciju citotoksičnosti NK ćelija u borbi protiv tumora i virusa (Hayakawa, 2012; Ullrich i sar., 2013). Takođe, kako se NKG2D receptor nalazi na površini NK ćelija još od prvih faza njihovog razvoja, a sazrevanjem NK ćelija ekspresija ovog receptora je sve veća, pretpostavlja se da NKG2D ima značajnu ulogu i u regulaciji procesa razvoja NK ćelija. Tako da je u prvim fazama razvoja NK ćelija NKG2D receptor neophodan za diferencijaciju, dok u poslednjim fazama ovaj receptor ima ulogu u pospešivanju efektorskih funkcija NK ćelija (Zafirova i sar., 2011; Ullrich i sar., 2013). S druge strane, NKG2D receptor ima ulogu u patogenezi mnogih autoimunskih bolesti i to pre svega reumatoidnog artritisa, Kronove bolesti, Wegenerove granulomatoze (Van Belle i von Herrath, 2009). Takođe, ovaj receptor ima ulogu i u patologiji trudnoće i odbacivanju transplantata (Zhang i sar., 2008a; Suárez-Alvarez i sar., 2009).

Iako po svojoj strukturi NKG2D pripada porodici lektinskih receptora zavisnih od kalcijuma i to NK grupi 2, član D, od ostalih članova ove porodice se dosta razlikuje. NKG2D je homodimer, za razliku od ostalih receptora NKG2 grupe koji prave heterodimere sa CD94 molekulom, ima samo 20% sličnosti u sastavu aminokiselina sa receptorima ove grupe, ne vezuje klasične MHC molekule I klase kao svoje ligande, ne postoji inhibitorni parnjak ovog receptora i prenos aktivacionih signala je vezan za DAP10 adaptorski protein, koji ne sadrži imunoreceptorski tirozinski aktivacioni motiv (*engl.* immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs, ITAM) u svom unutarćelijskom delu (Zafirova i sar., 2011) (Slika 3).

Ligandi NKG2D receptora i njihova regulacija

Ligande NKG2D receptora u humanoju populaciji čine 2 porodice molekula. Prvi otkriveni ligandi su proteini povezani sa MHC molekulom I klase (*engl.* MHC-class-I-

polypeptide-related sequence, MIC) A i B. Poznati su kao stresom indukovani neklasični MHC molekuli I klase koji u svojoj strukturi imaju $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ domen, ali ne i $\beta 2$ mikroglobulin (Fernández-Messina i sar., 2012). Geni za MICA i MICB ulaze u sastav gena za MHC u većini sisara i odlikuju se velikim polimorfizmom (do sada je opisano preko 80 MICA i 30 MICB alela). Poznato je da su pojedini MIC alotipovi povezani sa povećanom sklonošću za razvoj određenih karcinoma ili autoimunosti (Choy i Phipps, 2010). Drugu grupu liganada NKG2D receptora čini porodica UL16 vezujućeg proteina (*engl.* UL16 binding protein, UL16BP) koju čini 6 članova i koja je dobila ime po svojoj osobini da veže UL16, protein HCMV. Ovi molekuli su kodirani izvan genskog kompleksa MHC molekula, a strukturno ih takođe čine neklasični MHC molekuli I klase u čiji sastav ulaze samo $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domeni (Fernández-Messina i sar., 2012).

Ligandi NKG2D receptora uglavnom se ne eksprimiraju na ćelijama zdravih, neizmenjenih tkiva. Ipak u humanoj populaciji, nizak nivo MICA i ULBP proteina ispoljen je na epitelnim ćelijama sluznice bronha i GIT-a pretpostavlja se pod dejstvom odgovarajuće mikroflore (Raulet i sar., 2013). Takođe je značajno prisustvo liganada NKG2D receptora na nezrelim DC i aktiviranim T limfocitima, koje NK ćelije mogu da liziraju i na taj način omogućavaju efikasnu funkciju T limfocita odnosno pravovremeno prekidanje imunskog odgovora posredovano ovim ćelijama (Eagle i sar., 2009).

Ispoljavanje liganada NKG2D receptora na različitim inficiranim ili maligno transformisanim ćelijama ima značajnu ulogu u odbrani od virusa i tumora. Tako su ligandi NKG2D receptora ispoljeni na ćelijama inficiranim HCMV-om, virusom humane imunodeficijencije (*engl.* human immunodeficiency virus, HIV), virusom influenze i omogućavaju kontrolu virusne infekcije pomoću NK ćelija i CD8⁺ citotoksičnih T limfocita (CTL) (Colonna i sar., 2011). Takođe je dobro poznato da su ligandi NKG2D receptora, a najviše MICA molekul, konstitutivno ispoljeni na površini mnogih tumorskih ćelija i ćelija tumorskih linija i čoveka i miša. Tako su u humanoj populaciji ovi ligandi veoma zastupljeni kako na ćelijama mnogih hematoloških maligniteta, tako i na ćelijama solidnih tumora kao što su melanom, hepatocelularni karcinom, kolorektalni karcinom, neuroblastom, karcinom dojke, pluća. Na taj način NKG2D/NKG2D ligand sistem ima značajnu ulogu u regulaciji funkcije NK ćelija i T limfocita u borbi protiv tumora

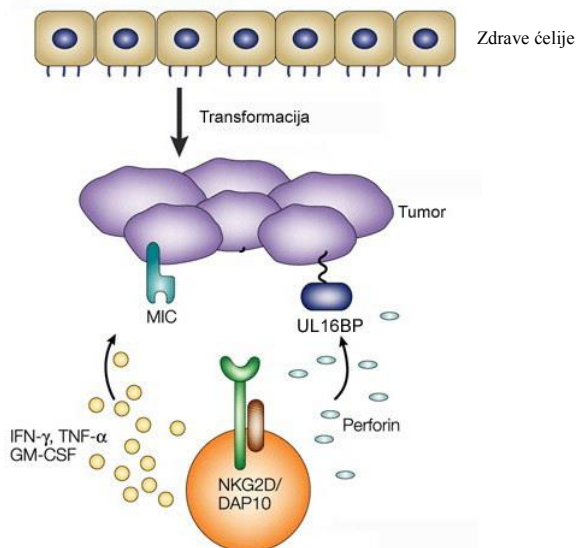
(Hayakawa, 2012; Ullrich i sar., 2013). Međutim, prema skorašnjim podacima, i same tumorske ćelije mogu ispoljiti NKG2D receptor koji vezujući se za svoje ligande na ovim ćelijama preko mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) može stimulisati njihovu proliferaciju (Benitez i sar., 2011).

Signalne putanje NKG2D receptora

NKG2D receptor je homodimer koji se sastoji od 2 transmembranska proteina povezana disulfidnim vezama i ima kratak unutarćelijski region koji nema mogućnost da prenosi signale. Iz tog razloga se prenos signala odvija pomoću adapterskih proteina, DAP10 i DAP12, koji se vežu kao homodimeri za svaki lanac receptora, pa su na taj način NKG2D-DAP10 odnosno NKG2D-DAP12 signalni kompleksi heksameri. U miševa postoje 2 izoforme NKG2D receptora koje se razlikuju po dužini svog unutarćelijskog dela u 13 aminokiselina, a poznato je da vežu i različite adapterske proteine. Tako da kraća (*engl. small, S*) izoforma (NKG2D-S) veže oba adapterska proteina, dok duža (*engl. long, L*), NKG2D-L, veže samo DAP10 adapter. U humanoju populaciji NKG2D receptor postoji samo u NKG2D-L formi, pa veže samo DAP10 adapterski protein (Zafirova i sar., 2011).

Kada se NK ćelije aktiviraju preko NKG2D receptora, prenos aktivacionog signala se u humanoju populaciji, za razliku od miševa, ne odvija preko ITAM-a. Poznato je da je DAP10 transmembranski signalni polipeptid koji umesto ITAM-a sadrži YxxM motiv u svom kratkom unutarćelijskom delu. Kada se NKG2D-DAP10 receptorski kompleks aktivira odnosno YxxM intracitoplazmatski motiv fosforiliše Src kinazom može da veže mnoge adapterske proteine od kojih značajno mesto zauzima p85 α regulatorna subjedinica fosfatidilinozitol 3 kinaze (PI3K). Dalje ova subjedinica najverovatnije aktivira Vav1 i Rac signalne molekule koji onda aktiviraju MAPK i ekstracelularnim signalom regulisanu kinazu (ERK). Smatra se da je ova signalna putanja ključna u regulaciji citotoksičnosti NK ćelija (López-Larrea i sar., 2008; Zafirova i sar., 2011; Ullrich i sar., 2013). Prema nekim autorima, komponente ostalih aktivacionih putanja NKG2D receptora su Vav1 i Grb2 koje se vežu direktno za DAP10 (López-Larrea i sar., 2008), kao i Jun amino(N)-terminalna kinaza (JNK) (Meresse i sar., 2004) i one ne zavise od PI3K. Takođe je poznato da IL-15

indukujući NKG2D-DAP10 kompleks učestvuje u regulaciji razvoja NK ćelija preko Janus kinaza (JAK) i transkripcionih faktora koji se nazivaju prenosnici signala i aktivatori transkripcije (*engl.* signal transducers and activators of transcription, STAT) i to JAK3/STAT5 signalne putanje (Zafirova i sar., 2011).



Slika 3. Kada zdrave ćelije podlegnu procesu maligne transformacije na svojoj površini ispoljavaju ligande NKG2D receptora (MICA, UL16BP) za koje se NK ćelije vezuju i aktiviraju oslobađajući perforin i IFN- γ (Cerwenka et Lanier, 2001)

1.4.1.2. Prirodni citotoksični receptori (NCR)

U prirodne citotoksične receptore (NCR), koji u svojoj strukturi imaju domene imunoglobulina, ubrajaju se NKp46, NKp44 i NKp30 od kojih su NKp30 i NKp44 isključivo prisutni na humanim, dok se NKp46 nalazi i na mišjim NK ćelijama. Poznato je da je NKp46 marker identifikacije humanih i mišjih NK ćelija. NKp46 i NKp30 su prisutni i na neaktiviranim i aktiviranim NK ćelijama, za razliku od NKp44 koji se nalazi samo na NK ćelijama koje su stimulisane citokinima (Montaldo i sar., 2013). NKp46 receptor je uglavnom ispoljen na CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama, dok su ostali NCR receptori ispoljeni na CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji ovih ćelija. Pored NK ćelija, NCR receptori se nalaze i na drugim ćelijama imuniteta kao što su plazmocitne DĆ, $\gamma\delta$ T i NKT limfociti, pa se

pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u uspostavljanju veze između ćelija adaptivne i urođene imunosti (Hudspeth i sar., 2013).

NCR receptori uglavnom imaju aktivaciona svojstva i bitni su za podsticanje kako citotoksičnosti tako i produkcije citokina iz NK ćelija u borbi protiv virusa i tumora. Takođe ovi receptori ispoljeni na NK ćelijama imaju značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora. Tako je NKp30 bitan za eliminaciju nezrelih DC i regulaciju adaptivne imunosti, dok preko NKp46 NK ćelije liziraju polimorfonuklearne ćelije i tako na vreme prekidaju imunski odgovor. Nasuprot tome, NCR receptori imaju ulogu i u patogenezi autoimunosti npr. autoimunskog dijabetesa (Glasner i sar., 2012; Hudspeth i sar., 2013).

Ligandi NCR receptora tek su počeli da se identifikuju poslednjih deset godina. Tako je otkriveno da je hemaglutinin virusa influence ligand za NKp46, a pp65, komponenta HCMV, ligand za NKp30 (Hudspeth i sar., 2013). Takođe je otkriveno nekoliko liganada na tumorskim ćelijama kao što su heparan sulfat za NKp30 i NKp46, BAT3 (*engl.* the nuclear factor HLA-B-associated transcript 3) i B7-H6, član B7 porodice imunoreceptora, kao ligandi za NKp30 i oni su uglavnom odgovorni za aktivaciju NK ćelija i eliminaciju tumora preko ITAM-a koji ulaze u sastavu ζ lanca CD3 molekula, FcR γ I lanca ili DAP12 adapterskog molekula (Hudspeth i sar., 2013). Međutim, poznato je da NKp30 receptor ima svoje 3 izoforme označene kao a, b i c od kojih je c izoforma kada se veže za B7-H6 odgovorna za prenos inhibitornih signala (Delahaye i sar., 2011). Takođe je poznato da NKp44 kada se veže za nuklearni antigen proliferišućih ćelija (*engl.* proliferating cell nuclear antigen, PCNA) dovodi do inhibicije NK ćelija (Rosental i sar., 2012).

1.4.1.3. DNAM-1

DNAM-1 (CD226) po svojoj strukturi takođe pripada porodici imunoglobulina. U humanoj populaciji se nalazi na površini NK ćelija, CD8⁺ i CD4⁺ T limfocita kao i na B limfocitima, monocitima i trombocitima. Ligandi DNAM-1 receptora su iz porodice nektina, CD155 (Nectin-5) i CD112 (Nectin-2), koji su povećano ispoljeni na ćelijama mnogih tumora kao što su melanom, karcinom jajnika i leukemija (de Andrade i sar., 2014). Posle kontakta sa svojim ligandima DNAM-1 dovodi do aktivacije NK ćelija i lize ćelija

tumora najverovatnije preko PI3K i Rac/MAPK. Takođe je pokazano da je njegova uloga bitna i u kontroli metastaza tumora npr. melanoma i to pre svega u kombinaciji sa NCR i NKG2D receptorima (Morgado i sar., 2011). Takođe je poznato da je DNAM-1 uključen i u patogenezu mnogih autoimunskih bolesti poput autoimuskog dijabetesa, tiroiditisa, multiple skleroze (Elishmereni i sar., 2008).

1.4.1.4. CD16

CD16 (FcγRIIIA), receptor iz porodice imunoglobulina, čini α lanac kojim se ovaj receptor veže za domen Fc fragmenta imunoglobulina tako da NK ćelije ostvaruju ADCC tako što se preko ovog receptora vežu za površinu ciljne ćelije obložene antitelom. Ovako aktivirane NK ćelije sekretuju citokine ili oslobađaju perforin i granzime iz svojih granula i liziraju ćelije mete. CD16 receptor je dominantno ispoljen na citotoksičnoj CD3⁻CD56^{potmulo+}CD16⁺ subpopulaciji NK ćelija (Seidel i sar., 2013).

CD16 je nekovalentno vezan za homodimer koga čine FcRγ ili TCRζ lanci ili heterodimer FcRγ i TCRζ lanaca. Kada CD16 molekul veže svoj ligand, dolazi do aktivacije NK ćelija preko Src-tirozin kinaze, koja fosforiliše rezidue tirozina ITAM-a u citoplazmatskom delu FcRγ i TCRζ lanaca koji dalje aktiviraju zeta-asocirani protein od 70kDa (ZAP-70) i Syk kinazu koje onda stimulišu enzim fosfolipazu C (*engl.* phospholipase C, PLC) i aktiviraju PI3K i MAPK koje pospešuju translokaciju nuklearnog faktora aktiviranih T ćelija (NFAT) (Lanier i sar., 1988).

Pokazano je, pre svega u mišjim modelima *in vivo*, da monoklonska antitela davana kao terapija ostvaruju svoj antitumorski efekat pokretanjem ADCC mehanizma NK ćelija. Međutim u humanoj populaciji u uslovima *in vivo* još uvek nije dokazan značaj ADCC mehanizma samostalno u borbi protiv tumora, pa samim tim ni efikasnost monoterapije monoklonskim antitelima u onkologiji (Seidel i sar., 2013). Ipak, pored toga što učestvuje u ADCC, pokazano je da NK ćelije preko CD16 receptora na svojoj površini mogu da se direktno vežu za ćelije tumora pri čemu dolazi do povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija (Mandelboim i sar., 1999; Grier i sar., 2012).

1.4.2. Inhibitorni receptori

Najznačajni inhibitorni receptori NK ćelija su KIR receptori dugog unutarćelijskog regiona, lektinu sličan receptor CD94/NKG2A, leukocitni imunoglobulinima slični receptori (*engl.* leukocyte immunoglobulin-like receptors, LIR) kao i nekoliko receptora koji ne vežu MHC molekule kao svoje ligande kao što su ubilački lektinu sličan receptor G1 (*engl.* killer cell lectin-like receptor G1, KLRG1), Siglec7, Irp60, NKRp1 (CD161).

1.4.2.1. KIR receptori

Opšte karakteristike KIR receptora

KIR receptori su velika porodica izrazito polimorfnih transmembranskih glikoproteina, zastupljenih na površini NK ćelija i nekih subpopulacija T limfocita kao što su NKT ćelije i $\gamma\delta$ T limfociti (Thielens i sar., 2012).

Složeni genski kompleks KIR receptora nalazi se na 19. hromozomu i čini ga 14 gena. Poznato je da KIR receptori pripadaju porodici imunoglobulina tako da se njihova nomenklatura bazira na broju domena imunoglobulina u izvanćelijskom delu (2D za 2 domena i 3D za 3 domena), ali i na dužini unutarćelijskog dela (L (*engl.* long) za dugi, a S (*engl.* short) za kratak unutarćelijski rep) na osnovu kojeg se KIR receptori dele u 2 velike grupe, različite po svojoj funkciji. Poznato je da KIR receptori dugačkog intracitoplazmatskog repa imaju inhibitorna svojstva (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2 i KIR3DL3), za razliku od KIR receptora koji imaju kratak intracitoplazmatski region (KIR2DS1, KIR2DS2/S3, KIR2DS4, KIR2DS5 i KIR3DS1) i imaju aktivaciona svojstva. Jedini izuzetak je KIR2DL4 receptor koji pored inhibitornih ima i aktivacione osobine, pa tako inhibira citotoksičnost NK ćelija, a snažno stimuliše produkciju citokina (Purdy i Campbell, 2009; Rajalingam, 2011).

Na osnovu sadržaja gena definisana su 2 KIR haplotipa, A i B. Za razliku od haplotipa B koji je veoma promenljivog genskog sastava, haplotip A je uniforman i čine ga geni za inhibitorne receptore KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR3DL1, KIR3DL2 i KIR3DL3

kao i dva gena za aktivacione KIR-ove, KIR2DS4 i KIR2DL4, koji se odlikuju veoma malom ekspresijom na površini NK ćelija tako da, praktično, haplotip A čine inhibitorni KIR-ovi. Distribucija A i B haplotipova varira među različitim etničkim grupama tako da one potencijalno mogu da ispolje veliki broj različitih kombinacija KIR-ova i njihovih liganada–MHC/HLA (humani leukocitni antigen) molekula I klase (Rajalingam, 2011).

Poznato je da inhibitorni KIR receptori imaju presudnu ulogu u sazrevanju i procesu edukacije NK ćelija iako se pretpostavlja da u tim procesima značajno mesto zauzimaju i drugi inhibitorni receptori NK ćelija (Orr i Lanier, 2010; Björkström i sar., 2010).

Takođe je dobro poznato da je odgovarajuća KIR-HLA kombinacija gena povezana sa sklonošću ili otpornošću prema mnogim patološkim stanjima kao što su virusne infekcije (hepatitis C, HIV), autoimunske ili hronične inflamatorne bolesti (vaskulitis, psorijaza, dijabetes, idiopatska bronhiektazija), patološka stanja tokom trudnoće (spontani pobačaj, preeklampsija), maligni tumori (melanom, limfomi, leukemije). Tako da je jača inhibitorna KIR-HLA veza koja dovodi do veće inhibicije NK ćelija nepovoljna u borbi protiv infekcija i kancera, dok pokazuje povoljnost u autoimunosti i trudnoći (Kuśnierczyk, 2013).

Inhibicija KIR receptora specifičnih za odgovarajući MHC molekul I klase anti-KIR antitelom mogla bi da predstavlja značajan terapijski princip u povećanju efikasnosti NK ćelija u borbi protiv tumora. U *in vitro* uslovima u miša je ispitano humanizovano blokirajuće antitelo koje vezuje KIR2DL1, 2 i 3 i KIR2DS1 i 2 receptore i pokazano je da višenedeljna primena ovog antitela nije uticala na procese edukacije i funkcionalnog sazrevanja NK ćelija (Thielens i sar., 2012; Jaeger i Vivier, 2012). Danas se IPH-2101 IgG4 anti-KIR antitelo ispituje u I fazi kliničkih studija u terapiji bolesnika sa akutnom mijeloblastnom leukemijom (AML) i multiplim mijelomom (Alici, 2010).

Funkcija aktivacionih KIR receptora je u velikoj meri još uvek neispitana, ali se zna da imaju ulogu u povećanju anti-virusnog efekta NK ćelija, ali je njihova uloga bitna i u patogenezi mnogih autoimunskih bolesti kao što je psorijaza (Rajalingam, 2011).

Ligandi KIR receptora

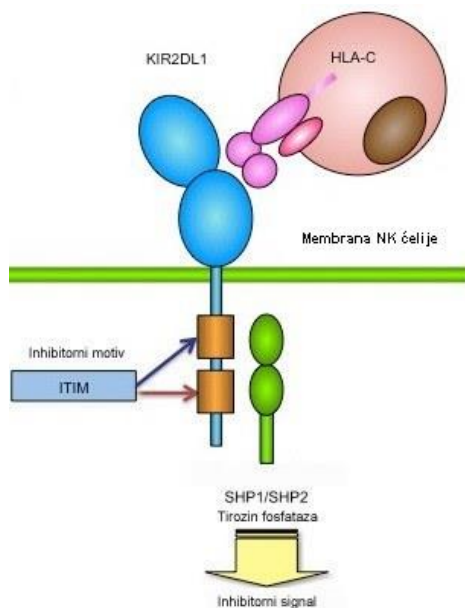
Ligandi KIR receptora su MHC molekuli I klase, od kojih je HLA-C najvažniji. Razlikuju se 2 grupe alela ovog molekula na osnovu aminokiseline na poziciji 80 u njegovom $\alpha 1$ heliksu. Skoro polovinu HLA-C alotipova čine alotipovi označeni kao HLA-C2 (HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6 i -Cw15) i oni imaju lizin na poziciji 80 $\alpha 1$ heliksa HLA-C molekula, a ligandi su za inhibitorni KIR2DL1 i aktivacioni KIR2DS1. Ostatak HLA-C alotipova označenih kao HLA-C1 čine aleli koji imaju asparagin na poziciji 80 i čine ih HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7 i -Cw8. Njih prepoznaju inhibitorni KIR2DL2 i KIR2DL3 receptori (Purdy i Campbell, 2009). Tako da NK ćelije mogu da ispoljavaju i aktivacione i inhibitorne KIR-ove na svojoj površini, koji prenose različite signale vezujući se za iste alele MHC molekula. Ipak, inhibitorni KIR-ovi imaju mnogo veći aviditet za HLA-C molekule od aktivacionih tako da NK ćelije sa aktivacionim i inhibitornim KIR-ovima koji vežu isti ligand, uglavnom ostaju inhibirane (Rajalingam, 2011; Moesta i Parham, 2012).

Za razliku od prethodno opisanih liganada, ostali aktivacioni i inhibitorni KIR-ovi vežu određene alele HLA-A i HLA-B molekula, HLA-G, nekласični MHC molekul I klase ili njihovi ligandi još uvek nisu definisani (Purdy i Campbell, 2009; Rajalingam, 2011).

Signalne putanje KIR receptora

Inhibitorni KIR-ovi sadrže tirozinske inhibitorne motive imunoreceptora (*engl.* immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIM) u svom unutarćelijskom delu. Kada vežu MHC molekul, dolazi do fosforilacije tirozina u ITIM-u pomoću aktivirane Lck familije tirozin kinaza, a fosforilisani tirozin postaje meta aktiviranih Src tirozin fosfataza (*engl.* src homology 2 domain-containing phosphatase, SHP)-1 i -2 kao i inozitol tirozin fosfataze (*engl.* the sh2 domain-containing inositol 5'-phosphatase, SHIP) koje dalje defosforilacijom mnogih fosforilisanih signalnih molekula u aktivacionim putanjama NK ćelija dovode do supresije aktivacije i inhibicije NK ćelijske aktivnosti (Slika 4). Tako je poznato da je Vav1 u signalnoj putanji NKG2D receptora, direktni supstrat SHP-1 u NK ćelijama (Long, 2008).

U inhibitornoj putanji NK ćelija, SHP-1 fosfataza koja sadrži dva Src domena (*engl. src homology 2, SH2*), katalitički domen i C-terminalni rep, je citoplazmatski protein od 68 kDa. Poznato je da postoje 2 transkripta SHP-1 gena čiju sintezu regulišu 2 različita promotora. Ova dva transkripta su različito ispoljena u humanom tkivu tako da je transkript koga reguliše promotor I uglavnom ispoljen u epitelnim ćelijama, dok je transkript koga reguliše promotor II zastupljen u ćelijama hematopoeze. Različita regulacija transkripata SHP-1 molekula povezana je i sa različitim patologijama, pa je poznato da je transkript koga reguliše promotor II smanjeno ispoljen u mononuklearnim ćelijama bolesnika obolelih od multiple skleroze u odnosu na zdrave kontrole (Christophi i sar., 2008; Christophi i sar., 2009). S druge strane, SHP-1 je i tumor supresorski gen u ćelijama limfoma i leukemija i on inhibira onkogeni potencijal tirozin kinaza (Tsui i sar., 2006).



Slika 4. Kada KIR receptor veže svoj ligand, HLA-C molekul, dolazi do fosforilacije tirozina u ITIM-u, a fosforilisani tirozin postaje meta aktiviranih tirozin fosfataza, SHP-1, SHP-2, koje defosforilacijom mnogih fosforilisanih signalnih molekula u aktivacionim putanjama NK ćelija inhibiraju funkciju ovih ćelija (Maeda i sar., 2012)

Kada se aktivacioni KIR-ovi vežu za svoje ligande prenos aktivacionih signala se vrši preko DAP-12 koji sadrže ITAM u svom citoplazmatskom delu. Src kinaze fosforilišu ITAM, pa se dalji prenos aktivacionih signala u NK ćelijama vrši preko ZAP-70 i Syk kinaze (Purdy i Campbell, 2009). Međutim, signalne putanje aktivacionih KIR receptora su u velikoj meri još uvek neispitane.

1.4.2.2. Lektinu slični receptori koji zavise od kalcijuma

Ovu grupu receptora čine heterodimeri sastavljeni od CD94 molekula, koji je nepolimorfan i koji ne poseduje unutarćelijski domen za prenos signala i proteina NKG2 familije zavisne od kalcijuma, čiji su izvanćelijski i unutarćelijski domeni raznoliki kako strukturno, tako i po ligandima koje vežu, kao i signalnim putanjama koje pokreću.

CD94-NKG2A je inhibitorni lektinski receptor koji veže HLA-E i prenos inhibitornih signala u NK ćelije se vrši preko 2 ITIM motiva u unutarćelijskom delu NKG2A molekula (Iwaszko i Bogunia-Kubik, 2011). Ovaj receptor je prisutan, pre svega, na CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama i u stalnom kontaktu sa svojim ligandom sprečava nepoželjnu aktivaciju NK ćelija (Borrego i sar., 2005). Takođe se smatra da CD94-NKG2A, koji se inače u razvoju NK ćelija pojavljuje pre KIR-ova ima značajnu ulogu u sazrevanju i edukaciji ovih ćelija (Höglund i Brodin, 2010; Björkström i sar., 2010).

Aktivacioni CD94/NKG2C receptor ima kratak unutarćelijski domen i kada veže svoj ligand HLA-E, prenos aktivacionog signala se vrši preko DAP12 proteina koji sadrži ITAM. Poznat je značaj ovog receptora u aktivaciji NK ćelija u borbi protiv HCMV infekcije (Muntasell i sar., 2013).

1.4.2.3. Leukocitni imunoglobulinima slični receptori

Leukocitni imunoglobulinima slični receptori (LIR) ili imunoglobulinima sličan transkript 2 (*engl.* immunoglobulin-like transcript 2, ILT-2) ili CD85 su inhibitorni receptori familije imunoglobulina prisutni na NK ćelijama, koji uglavnom vezuju MHC molekule I klase odnosno njihov $\alpha 3$ domen i $\beta 2$ mikroglobulin. Puno je nepoznanica vezano za ove receptore tako da na primer nije poznata priroda interakcije ovih receptora i MHC molekula. Takođe moguće su različite strukturne izoforme LIR receptora. Ovi receptori inhibiraju funkciju NK ćelija, ali se zna da su inhibitorna svojstva KIR i CD94-NKG2A receptora mnogo jača. Takođe, LIR-1 veže visokim afinitetom UL18, protein CMV, ali je uloga ove interakcije takođe nepoznata s obzirom da UL18, generalno, vezujući se za NK ćelije dovodi do njihove aktivacije (Pegram i sar., 2011).

1.4.2.4. Ubilački lektinu sličan receptor G1

Ubilački lektinu sličan receptor G1 (KLRG1) je inhibitorni receptor koji vezujući se za svoje ligande, klasične kadherine (E, N i R kadherini) preko ITIM-a prenosi inhibitorne signale NK ćelijama. Kako su kadherini prisutni na ćelijama zdravih tkiva, tako ovaj receptor štiti zdrave ćelije od napada NK ćelija i razvoja autoagresivnosti. S druge strane, pokazano je da epitelne ćelije mnogih tumora imaju smanjenu ekspresiju E-kadherina i pokazuju veću sklonost ka metastaziranju (Pegram i sar., 2011).

Tako da osim inhibitornih receptora koji prepoznaju MHC molekule I klase postoje i inhibitorni receptori koji prepoznaju druge ligande i dodatno omogućavaju da NK ćelije budu tolerantne na sopstvene ćelije koje ne ispoljavaju MHC molekule I klase.

1.5. Mehanizmi efektorske funkcije NK ćelija

Efektorske funkcije aktiviranih NK ćelija ostvaruje na dva osnovna načina: citotoksičnošću i produkcijom citokina i hemokina.

1.5.1. Citotoksičnost NK ćelija

Citotoksičnost NK ćelija može biti direktna ili citotoksičnost koja zavisi od antitela (ADCC).

1.5.1.1. Direktna citotoksičnost

Kada NK ćelije dođu u kontakt sa ciljnim ćelijama dolazi do stvaranja konjugata između njih i formiranja imunološke sinapse (Orange, 2008). Mnogobrojni adhezivni molekuli, a pre svega antigen 1 povezan sa funkcijom limfocita (*engl.* lymphocyte function-associated antigen, LFA-1) i makrofagni antigen 1 (Mac-1) čine periferni deo ove sinapse i odgovorni su za njeno učvršćivanje, ali i prenos prvih aktivacionih signala bitnih za polimerizaciju aktina i njegovo nakupljanje u ovom delu sinapse. S druge strane,

aktivacioni receptori NK ćelija su smešteni u centralnom delu sinapse i kada se oni vežu za svoje ligande uglavnom se aktiviraju dve signalne putanje, PI3K-ERK2 i PLC γ -JNK. Pod dejstvom udruženih aktivacionih signala, dolazi do još jače polimerizacije aktina na periferiji sinapse i pomeranja tzv. organizacionog centra mikrotubula (*engl.* the microtubule organizing centre, MTOC) sa pridruženim citotoksičnim granulama ka mestu kontakta NK ćelije i ćelije mete tako da granule oslobađaju svoj sadržaja procesom egzocitoze u prostor sinapse (Orange, 2008; Krzewski i Coligan, 2012).

Citotoksične granule NK ćelija opisuju se kao sekretorni lizozomi jer sadrže mnoštvo enzima karakterističnih za ove organele među kojima su najvažniji perforin, granzimi, ligandi familije faktora nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF), granulizin i mali antimikrobni peptidi (Krzewski i Coligan, 2012).

Citotoksičnost NK ćelija koja zavisi od perforina

Perforin je višejedinični protein koji je odgovoran za citotoksičnu aktivnost NK ćelija i CD8⁺ limfocita (Voskoboinik i sar., 2010; Krzewski i Coligan, 2012). Humani perforin se sintetiše u neaktivnoj formi u lumenu endoplazmatičnog retikuluma i kao glikoprotein molekulske mase 70 kDa prelazi u Goldžijev kompleks da bi se aktivirao u sekretornim granulama u kojima se skladišti proteolitičkim otkidanjem C-terminalne signalne sekvence dugačke 21 aminokiselinu pri čemu nastaje funkcionalno zrela, aktivna forma molekulske mase 60 kDa (Uellner i sar., 1997; Voskoboinik i sar., 2010).

U prostoru imunološke sinapse koja se odlikuje neutralnim pH i visokom koncentracijom jona Ca²⁺, oko 6500 puta većom nego u citosolu ćelije, dolazi do vezivanja Ca²⁺ i do promene konformacije perforina, njegove polimerizacije i aktivacije tako da molekuli perforina prave pore prečnika 16 nm na plazma membrani ciljne ćelije, što dovodi do njene osmotske lize. Na delovima membrane u kojima je ciljna ćelija oštećena dolazi do pinocitoze kojom granzimi i druge litičke komponente prisutne u imunološkoj sinapsi dospevaju u unutrašnjost ćelije (Arma i Podack, 2010; Voskoboinik i sar., 2010). Nepoželjnu proteolitičku aktivnost perforina u odnosu na NK ćeliju koja ga sintetiše sprečava katepsin B takođe skladišten u sekretornim granulama sa perforinom koji nakon

egzocitoze vrši proteolizu monomera perforina da bi sprečio njihovu spontanu difuziju u NK ćelije i destrukciju ovih ćelija (Balaji i sar., 2002; Krzewski i Coligan, 2012).

Perforin ima ulogu medijatora citotoksične aktivnosti NK ćelija u borbi protiv virusima inficiranih i maligno transformisanih ćelija (Orange, 2008). Poznato je da je čak i malo smanjenje sinteze perforina povezano sa značajnim slabljenjem citotoksičnosti NK ćelija i T limfocita (Voskoboinik i sar., 2010). Iz tog razloga mutacije u *PRF1*, genu za perforin, u humanoj populaciji dovode do oboljenja hemofagocitne limfocitocitoze koje je između ostalog praćeno učestalim virusnim infekcijama (Risma i sar., 2006). Takođe, smanjena sinteza ovog molekula povećava sklonost za razvoj melanoma i limfoma (Trapani i sar., 2013).

Poznato je da stimulacija NK ćelija različitim citokinima kao što su IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-21 ili IFN- β povećava sintezu perforina u ovim ćelijama (Pipkin i sar., 2010).

Granzimi su serin proteaze koje se u čoveka prepisuju sa 5 gena, A, B, H, K i M i konstitutivno su ispoljeni u NK ćelijama. Oni prolaze kroz pore koje pravi perforin i dovode do apoptoze ciljane ćelije aktivacijom ćelijskih kaspaza ili mehanizmima koji od njih ne zavise što u određenoj meri zavisi od tipa granzima (Hameed i sar., 1988; Susanto i sar., 2012). Granzim B je najbolje opisan enzim ove grupe koji pored toga što posredno izaziva apoptozu aktivacijom kaspaza može i da ošteti DNK molekul i time direktno dovede do apoptoze (Trapani i Suttom, 2003). Granzim A direktno deluje proapoptotski praveći jednolančane prekide u molekulu DNK (Russell i Ley, 2002), dok u mitohondrijama generiše reaktivne oblike kiseonika (*engl.* reactive oxygen species, ROS) i dovodi do smrti ciljane ćelije apoptozom koja ne zavisi od kaspaza (Martinval i sar., 2008).

Neperforinski mehanizam citotoksičnosti NK ćelija

Poznato je da se apoptoza ćelija meta može odvijati i mehanizmom koji ne zavisi od perforina uz pomoć liganada TNF familije koju čine Fas ligand (FasL), TNF ligand, ligand povezan sa TNF-om koji dovodi do apoptoze (*engl.* TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL). FasL i TRAIL vezujući se redom za Fas i TRAIL receptore na površini ciljnih ćelija dovode do apoptoze ovih ćelija kaspaza zavisnim, a TRAIL i kaspaza nezavisnim

odnosno mitohondrijalnim putem. Takođe je pokazano da nezrele NK ćelije imaju sposobnost da ubijaju ciljane ćelije isključivo koristeći TRAIL, dok zrele NK ćelije koriste i FasL i TRAIL. Ipak, zna se da je neperforinski mehanizam direktne citotoksičnosti NK ćelija mnogo sporiji i neefikasniji od mehanizma koji zavisi od perforina (Vušanović, 2011; Krzewski i Coligan, 2012). Postoje podaci da i neke ćelije tumora ispoljavajući FasL i TRAIL izazivaju apoptozu NK ćelija čime izbegavaju imunski odgovor (Saito i sar., 2013).

1.5.2. Imunoregulatorna uloga NK ćelija

NK ćelije proizvode brojne citokine (IFN- γ , TNF, IL-5 i IL-13, IL-10) i faktore rasta (granulocitno-makrofagni faktor rasta (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) i IL-3) kojima ove ćelije formiraju vezu između komponenti urođene i adaptivne imunosti. Takođe, NK ćelije sintetizuju i brojne β (CCL2, -3, -4, -5) i α (XCL1 (limfotraktin) i CXCL8 (IL-8)) hemokine kojima utiču na migraciju različitih ćelija imunskog sistema na mesto infekcije i tumora (Caligiuri, 2008). Osnovu imunoregulatorne uloge NK ćelija čini produkcija IFN- γ .

1.5.2.1. Interferon-gama (IFN- γ)

Interferoni su grupa plejotropnih citokina koji imaju značajnu ulogu u uspostavljanju veze između komponenti urođene i adaptivne imunosti, a sve u cilju borbe protiv infekcija izazvanih virusima i bakterijama kao i u zaštiti od tumora. U sisara su podeljeni u 2 osnovna tipa, I i II, koja se razlikuju po svojoj strukturi i funkciji. U tip I se ubrajaju IFN- α i IFN- β , dok IFN- γ pripada tipu II interferona (Pestka, 2007).

IFN- γ kada je otkriven šesdesetih godina prošlog veka nazvan je faktorom koji aktivira makrofage i smatralo se da ima samo antivirusnu aktivnost. Danas se zna da je IFN- γ ključan citokin kako urođene tako i Th1 posredovane adaptivne imunosti. Između IFN- γ i interferona I tipa, IFN- α/β , ne postoji strukturna homologija kao ni velika funkcionalna sličnost (Schroder i sar., 2004).

IFN- γ je homodimer koga sintetišu i produkuju, pre svega, CD4⁺, CD8⁺ limfociti i NK ćelije, ali i B limfociti, NKT ćelije i antigen prezentujuće ćelije (APĆ). Produkcija IFN- γ od strane NK ćelija i APĆ čini osnovu ranog imunskog odgovora, dok su aktivirani T limfociti glavni izvor IFN- γ u kasnijoj fazi imunskog odgovora što predstavlja osnovu adaptivne imunosti. Glavni stimulatori produkcije IFN- γ su IL-12 i IL-18 u kombinaciji, dok IL-4, IL-10 i transformišući faktor rasta (*engl.* transforming growth factor, TGF)- β negativno regulišu sintezu ovog citokina (Schroder i sar., 2004).

Receptor za IFN- γ koji pripada grupi II receptora citokina sastoji se iz dva lanca koji vezuju IFN- γ označenih kao IFNGR1 i dva lanca, IFNGR2, kojima se prenose signali preko JAK/STAT signalne putanje (Saha i sar., 2010). Vezivanjem IFN- γ za receptor dolazi do autofosforilacije i aktivacije JAK2 tirozin kinaze koja zatim fosforiliše i aktivira JAK1 tirozin kinazu, koja dovodi do aktivacije STAT-1 transkripcionog molekula. STAT-1 homodimer ulazi u jedro gde se veže za promotere mnogih gena kao što su geni za MHC molekule, B7 kostimulatore, enzime antimikrobnih supstanci u makrofagima, kao što je azot-oksidi (NO) sintetaza ili gene za komponente citokina kao što je na primer p40 lanac IL-12 (Saha i sar., 2010). Takođe, mnogi od ovih indukovanih gena su geni za transkripcione faktore kao što je regulatorni faktor interferona (*engl.* interferon regulatory factor, IRF)-1, koji regulacijom mnogih gena za citokine i to pre svega za tip I i II IFN, IL-15, IL-12, IL-18, reguliše razvoj i funkcije NK ćelija (Kröger i sar., 2002; Savitsky i sar., 2010).

Produkovani iz NK ćelija IFN- γ stimuliše anti-mikrobna svojstva makrofaga i neutrofila tako što podstiče transkripciju gena za nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) oksidazu, NO sintetazu, lizozomalne enzime. Takođe IFN- γ dovodi do diferencijacije naivnih CD4⁺ limfocita u Th1, a inhibicije Th2 subpopulacije ili direktno indukujući T limfocitni-bet (T-bet) transkripcioni faktor ili indirektno tako što aktivira makrofage, koji produkuju IL-12, glavni Th1 citokin. Pored toga, IFN- γ stimuliše oslobađanje IgG, a inhibira sintezu Ige imunoglobulina iz B limfocita, povećava ekspresiju MHC molekula I i II klase na APĆ tako da i na taj način pomaže u procesu prezentacije antigena i stimulaciji Th1 limfocita, indukuje produkciju hemokina koji zatim omogućavaju dolazak odgovarajućih ćelija na

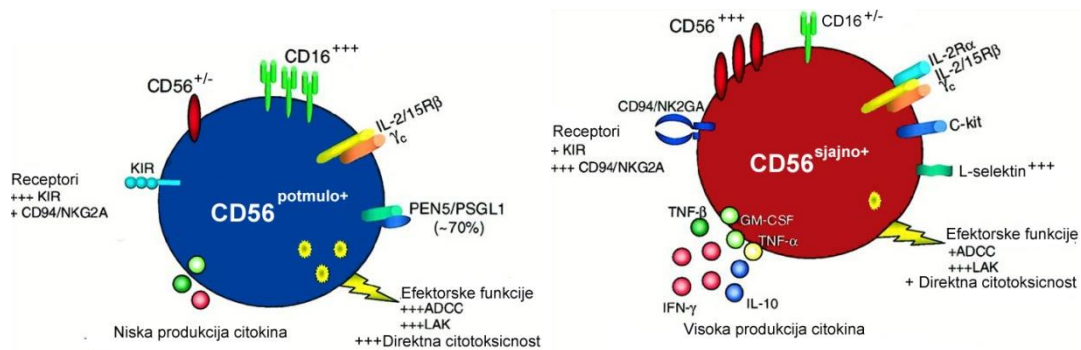
mesto infekcije i tumora (Schroder i sar., 2004). S druge strane, sve se više pominje uloga ovog citokina u patogenezi tumora i autoimunskih bolesti poput multiple skleroze, reumatoidnog artritisa i dijabetesa (Schroder i sar., 2004; Saha i sar., 2010).

1.6. Funkcionalne karakteristike subpopulacija NK ćelija

NK ćelije se dele na dve ne samo imunofenotipski već i funkcionalno različite subpopulacije, $CD3^+CD56^{potmulo+}$ i $CD3^+CD56^{sjajno+}$ (Slika 5). Prema klasičnom shvatanju, osnovna uloga $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulacije NK ćelija je direktna citotoksičnost zahvaljujući brojnim granulama ispunjenim perforinom i granzimima u citoplazmi, kao i ADCC zbog značajne ekspresije CD16 receptora (Cooper i sar., 2001a; Poli i sar., 2009; Montaldo i sar., 2013). Takođe, poznato je da ova subpopulacija NK ćelija ima mogućnost da formira brojne konjugate sa K562, ciljnom tumorskom ćelijskom linijom (Jacobs i sar., 2001). Za razliku od $CD3^+CD56^{potmulo+}$ ćelija, $CD3^+CD56^{sjajno+}$ NK ćelije u svojoj citoplazmi imaju mali broj citolitičkih granula tako da imaju slaba citotoksična svojstva, ali proizvode brojne citokine i hemokine i njihova osnovna uloga je da pomažu u regulaciji adaptivnog imunskog odgovora (Cooper i sar., 2001b; Caligiuri, 2008; Poli i sar., 2009; Montaldo i sar., 2013). Iz tog razloga je $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulacija locirana u parafolikularnom delu sekundarnog limfnog tkiva bogatog T limfocitima i APC (Caligiuri, 2008). U literaturi sve više podataka o mogućem mestu subpopulacija NK ćelija u adaptivnom transferu kao terapiji usmerenoj protiv hematoloških i solidnih tumora (De Maria i sar., 2011a).

Poslednjih godina se sve više govori o specifičnostima subpopulacija NK ćelija u infekciji i tumoru. Pokazano je da su NK ćelije koje infiltrišu tkivo tumora (*engl.* tumor-infiltrating NK cells, NK-TIL) fenotipski uglavnom $CD3^+CD56^{sjajno+}CD16^-$ i imaju oslabiljenije efektorske funkcije u odnosu na takođe funkcionalno oslabiljene NK ćelije u krvi bolesnika sa tumorom (Carrega i sar., 2008; McKay i sar., 2011). Nije poznato da li se to dešava kao posledica nemogućnosti dolaska zrelih, citotoksičnih $CD3^+CD56^{potmulo+}$ NK ćelija u tkivo tumora ili zbog povećanog preživljavanja i proliferacije $CD3^+CD56^{sjajno+}$ ćelija u tumorskoj sredini (Stojanovic i sar., 2013). Postoje podaci da uslovi oksidativnog

stresa prisutni u tumoru pogoduju povećanom preživljavanju $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulacije (Harlin i sar., 2007). Takođe ove NK ćelije ispoljavaju CXCR3 i CX3CR1 receptore hemokina koji su odgovorni za njihovu migraciju u tumorsko tkivo (Hayakawa i sar., 2006). S druge strane, različiti immunosupresivni faktori sredine tumora kao što je TGF- β sprečavaju diferencijaciju $CD3^+CD56^{sjajno+}$ u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ ćelije (Allan i sar., 2010).



Slika 5. Subpopulacije NK ćelija, $CD3^+CD56^{potmulo+}$ i $CD3^+CD56^{sjajno+}$, razlikuju se po svojim fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama (Cooper i sar., 2001a)

1.6.1. Memorijske NK ćelije

Iako NK ćelije predstavljaju komponente sistema urođene imunosti prema najnovijim podacima one mogu imati osobine memorijskih ćelija. Tako su u miševa opisane NK ćelije koje mogu preživeti i preko 6 meseci. Poznato je da postoje 3 različita tipa dugoživećih memorijskih NK ćelija (Sun i sar., 2009; Sun i sar., 2011). U miševa je prvi put otkrivena subpopulacija NK ćelija koja preko svog Ly49H lektinskog aktivacionog receptora specifično vezuje m157, protein mišjeg CMV i koja posle ponovnog susreta sa ovim virusom ubrzano proliferiše i ima mnogo veću citotoksičnost i sposobnost produkcije IFN- γ u odnosu na naivne NK ćelije (Sun i sar., 2011; Min-Oo i sar., 2013), što se smatra da je regulisano komponentama signalne putanje IL-12 odnosno STAT-4, ali ne i IFN- γ (Sun i sar., 2012). Kod ljudi koji su seropozitivni na CMV otkrivena je populacija potpuno zrelih, edukovanih $NKG2C^+CD57^+$ NK ćelija čiji se broj povećava posle reaktivacije CMV (Lopez-Verges i sar., 2011; Béziat i sar., 2013). Takođe, pokazano je postojanje posebne populacije NK ćelija koja može da preživi nekoliko nedelja u organizmu miševa, a koja je

prethodno *in vitro* stimulisana kombinacijom citokina, IL-12, IL-18 i IL-15. Ove NK ćelije pokazuju povećanu sposobnost produkcije IFN- γ i za razliku od prethodno opisanih memorijskih NK ćelija nisu antigen-specifične (Cooper i sar., 2009; Sun i sar., 2011; Min-Oo i sar., 2013). Prema najnovijim podacima moguće je da ove memorijske ćelije postoje i u humanoj populaciji i one stimulisane *in vitro* IL-12, IL-15 i IL-18 povećano proizvode IFN- γ posle ponovne stimulacije ovim citokinima (Ni i sar., 2012). Imunološka memorija je pokazana i kod NK ćelija u Rag2⁻ miševa u reakciji kontaktne preosetljivosti, pri čemu nakon ponovnog susreta sa haptenom 2,4-dinitro-1-fluorobenzenom (DNFB) koji je izazvao ovu reakciju, NK ćelije ispoljavaju pojačanu citotoksičnost (O'Leary i sar., 2006). Smatra se da ovo memorijsko svojstvo NK ćelija zavisi od ekspresije mišjeg inhibitorynog KIR receptora, Ly49C i edukacije NK ćelija koja zavisi od MHC molekula I klase, a pokazano je da ove memorijske NK ćelije ispoljavaju CXCR6 hemokinski receptor koji dovodi do njihovog nakupljanja u jetri (Jiang i sar., 2013). Međutim i dalje je malo podataka o nastanku i mehanizmima regulacije funkcija memorijskih NK ćelija pa samim tim i o njihovoj potencijalnoj terapijskoj upotrebi.

1.6.2. NK ćelije materice

Poznato je da se posebna subpopulacija NK ćelija fenotipski definisana kao CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁻ nalazi u gravidnom uterusu i ona u prvom tromesečju trudnoće čini oko 70% svih limfocita ovog tkiva. Iako ova subpopulacija na svojoj površini ispoljava nekoliko aktivacionih receptora klasičnih NK ćelija kao što su NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D i 2B4, kao i da u svojoj citoplazmi ima brojne citolitičke granule, ove ćelije nisu citotoksične prema ćelijama ekstravilusnog trofoblata (EVT) između ostalog i zbog toga što ispoljavaju mnogobrojne inhibitorne receptore kao što su LIR-1, KIR2DL4 i CD94/NKG2A koji vežu svoje ligande na ćelijama EVT. Tako da je stalna interakcija između ovih NK ćelija i ćelija trofoblata odgovorna za pravilno održavanje trudnoće (Kumpel i Manoussaka, 2012). S druge strane, NK ćelije materice proizvode brojne citokine i faktore rasta kao što su TNF, IL-10, GM-CSF, IL-1 β i u manjoj meri IFN- γ koji su neophodni u procesu građenja tkiva placente i remodelovanja kao i stvaranja njenih

novih krvnih sudova (Winger i Reed, 2013). Tako da materične NK ćelije obezbeđuju optimalnu sredinu za razvoj fetusa bez aktivacije ćelija imuniteta.

1.6.3. NK-22 subpopulacija NK ćelija

U limfnom tkivu pridruženom mukozi (*engl.* mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) u miša i čoveka pronađena je posebna subpopulacija NK ćelija označena kao NK-22. Ove ćelije proizvode IL-22 pod dejstvom IL-23 i pripadaju ILC3 grupi limfocita. U humanoj populaciji, NK-22 ćelije su NKp44+, nalaze se u mukozi tonzila i u Pejerovim pločama ileuma, nisu citotoksične i ne proizvode IFN- γ , već proizvode pored IL-22, IL-26 i leukemijski inhibicioni faktor (LIF). IL-23 proizveden iz APČ mukoze aktiviranih komensalnim ili patogenim bakterijama dovodi do diferencijacije NK-22 ćelija u kojima ROR γ transkripcioni faktor ima značajnu ulogu. IL-22 proizveden iz NK-22 ima različite uloge kako u održavanju homeostaze i zaštiti epitelnih ćelija mukoze pre svega GIT-a od mnogih infekcija (npr. *Citobacter rodentium*) i inflamatornih bolesti (hepatitis, inflamatorne bolesti creva), ali je pokazano i da ove ćelije učestvuju u patogenezi različitih bolesti (psorijaza, multipla skleroza) (Cherrier i sar., 2012).

1.7. Uloga NK ćelija u odbrani od tumora

Poznato je da NK ćelije imaju značajan citotoksični potencijal usmeren protiv ćelija hematoloških maligniteta, ali i ćelija mnogih solidnih tumora kao što su melanom, karcinom kolona, pluća, dojke sprečavajući njihov nastanak, rast i širenje (Stojanovic i sar., 2011). Brojne studije su pokazale da je niska citotoksičnost NK ćelija povezana sa lošom prognozom bolesnika sa karcinomom (Fregni i sar., 2012).

Poznato je da su zdrave ćelije zaštićene od napada NK ćelija jer uglavnom ispoljavaju MHC molekule I klase na svojoj površini, a praktično nemaju ligande za aktivacione receptore ovih ćelija. Tako da tokom maligne transformacije jak signal za aktivaciju NK ćelija predstavlja odsustvo ili nizak nivo MHC receptora I klase na površini ćelije tumora, a što su još 1990. godine Ljunggren i Karre opisali u svojoj tzv. „missing-

self“ hipotezi (Ljunggren i Kärre, 1990). Takođe ćelije tumora su meta NK ćelija jer ispoljavaju veliki broj različitih liganada za aktivacione receptore NK ćelija, pre svega, NKG2D, NCR i DNAM-1 (Stojanovic i sar., 2013).

NK ćelije ubijaju ćelije tumora ili direktnom citotoksičnošću ili ADCC mehanizmom (Langers i sar., 2012; Stojanovic i sar., 2013). Takođe, prema najnovijim podacima ove ćelije, kako native tako i aktivirane, imaju sposobnost da oslobađaju egzosome, vezikule veličine od 50-100 nm koje vode poreklo iz endozoma ne samo ćelija imuniteta i mezenhimalnih ćelija, već i iz ćelija tumora. Egzozomi NK ćelija na svojoj površini ispoljavaju CD56, NKG2D i u manjoj meri NCR, a u svojoj unutrašnjosti imaju i citotoksične proteine, perforin i FasL, tako da oslobođeni u kiseloj sredini tumorskog okruženja, koja inače pogoduje njihovoj produkciji, dovode do apoptoze ćelija tumora mehanizmima koje koriste same NK ćelije (Lugini i sar., 2012). Smatra se da bi egzozomi NK ćelija mogli da imaju dijagnostički značaj, ali i da budu meta za novu antitumorsku terapiju (Lugini i sar., 2012; Fais, 2013).

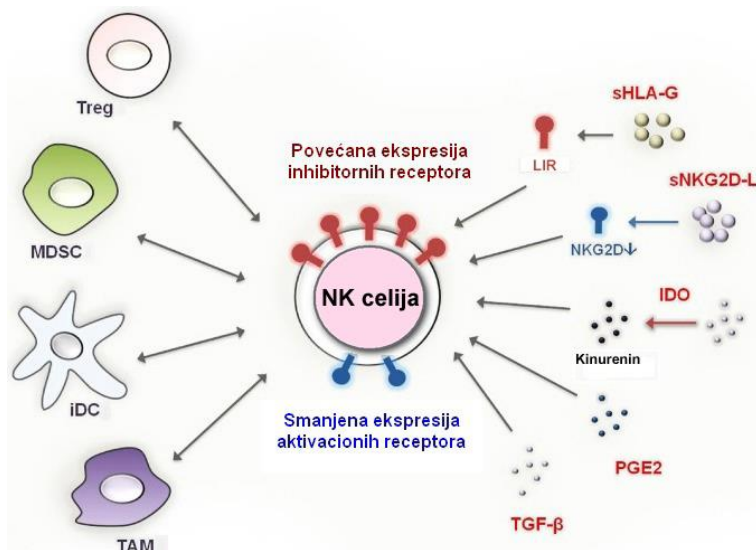
Takođe, NK ćelije i svojom imunoregulatornom ulogom odnosno produkcijom citokina, pre svega IFN- γ i TNF, kao i hemokina CCL3 i CCL4, ostvaruju značajnu antitumorsku ulogu. Antitumorsko dejstvo produkovanog IFN- γ ogleda se u aktivaciji APC koje povećanim ispoljavanjem MHC molekula efikasno prezentuju tumorske antigene CD4⁺ i CD8⁺ limfocitima i aktiviraju ih. Takođe, IFN- γ pospešuje diferencijaciju monocita u makrofage, koji proizvode brojne citokine i hemokine kao što su IL-12, IL-18, TNF, IFN tip I, CCR7 i CXCL10 aktiviraju NK ćelije. Poznato je da su IL-12 i IL-18 produkovani iz makrofaga neophodni za prajmovanje NK ćelija (O'Sullivan i sar., 2012). Takođe, IFN- γ aktivira i same NK ćelije ili direktno aktivacijom sinteze TRAIL molekula ili indirektno tako što aktivira makrofage i ostale APC koje produkcijom IL-12 povećavaju antitumorska svojstva NK ćelija (Langers i sar., 2012). Takođe, produkcijom citokina NK ćelije regulišu sintezu antitumorskih antitela (Stojanovic i sar., 2011; Langers i sar., 2012).

NK ćelije liziraju ćelije tumora i one postaju izvor antigena koje DC preuzimaju i aktiviraju T limfocite. Aktivirane DC i Th1 limfociti onda proizvode IL-2, IL-12, IL-18 koji opet aktiviraju NK ćelije (Nguyen-Pham i sar., 2012).

Pored ćelija tumora i imunosupresivne ćelije tumorskog okruženja kao što su mijeloidne supresorske ćelije (*engl.* myeloid-derived suppressor cells, MDSC), makrofagi pridruženi tumoru (*engl.* tumor-associated macrophages, TAM), nezrele (*engl.* immature, i) DC mogu biti meta NK ćelija jer ispoljavaju ligande za NKG2D i NCR receptore (Bellora i sar., 2010; Stojanovic i sar., 2013).

1.8. Imunosupresivno dejstvo ćelija tumora i tumorske mikrosredine na NK ćelije

Ćelije tumora koriste različite mehanizme kako bi inhibirale antitumorsko dejstvo NK ćelija i to direktnim kontaktom sa njima kao i dejstvom brojnih solubilnih faktora koje proizvode. Takođe, značajno imunosupresivno dejstvo na NK ćelije ostvaruju i mnoge ćelije i njihovi solubilni molekuli iz mikrosredine tumora (Slika 6).



Slika 6. Ćelije tumora i imunosupresivne ćelije njegove mikrosredine proizvode brojne solubilne faktore koji inhibiraju efektorske funkcije NK ćelija (Stojanovic i sar., 2013).

Direktan kontakt ćelija tumora i ćelija imuniteta

Zbog stalnog kontakta NKG2D receptora i njegovih liganada dolazi do smanjene ekspresije ovog receptora, pa samim tim i smanjene citotoksičnosti NK ćelija (Coudert i sar., 2008). Takođe, neklasični MHC molekul I klase, HLA-G, ispoljen na membrani ćelija

melanoma i karcinoma bubrega, inhibira NK ćelijsku aktivnost povećanjem ekspresije inhibitornog receptora, ILT-2, na NK ćelijama (LeMaout i sar., 2005). Egzozomi tumora, pretpostavlja se nastali dejstvom hipoksije u tumoru, imaju značajna imunosupresivna svojstva delujući na mnoge ćelije imuniteta, a pre svega na NK ćelije (Filipazzi 2012; Kahlert i Kalluri, 2013). Poznato je da i cirkulišuće ćelije tumora u direktnom kontaktu sa NK ćelijama inhibiraju njihove efektorske funkcije (Rao i sar., 2011).

Imunosupresivni citokini

Ćelije tumora kao i mnoge ćelije tumorske mikrosredine produkuju imunosupresivne citokine od kojih su najpoznatiji TGF- β i IL-10. Takođe, značajna karakteristika tkiva tumora, a što je bitan uzrok nastanka imunosupresije u njemu je i hronična inflamacija čiji su osnovni medijatori IL-6 i TNF (Balkwill i Mantovani, 2012).

TGF- β je citokin koji pripada TGF- β superfamiliji, a produkuju ga, pre svega, ćelije imuniteta (makrofagi, regulatorni T limfociti (Treg), MDSC), ali i trombociti kao i ćelije mnogih tumora u najmanje 3 izoforme, od kojih TGF- β 1 ima značajnu ulogu u stimulaciji rasta i širenja tumora (Yang i sar., 2010; Flavell i sar., 2010). TGF- β ostvaruje svoje protumorsko dejstvo delujući na mnoge ćelije imunskog odgovora. Ovaj citokin direktno inhibira funkciju NK ćelija i CD8⁺ CTL, inhibira proliferaciju i funkciju Th1 limfocita, a osnovni je citokin diferencijacije imunosupresivnih ćelija tumorske mikrosredine, Treg, TAM, MDSC, neutrofila pridruženih tumoru (*engl.* tumor-associated neutrophils, TAN) (Flavell i sar., 2010). S obzirom na svoj značajan imunosupresivni efekat na ćelije imuniteta u bolesnika sa karcinomom, TGF- β bi mogao da bude meta za potencijalnu terapiju (Flavell i sar., 2010).

IL-10 je citokin koga produkuju DC, makrofagi, Th2, Treg, Th17 limfociti i uglavnom ima imunosupresivno dejstvo. Takođe je pokazano da IL-10 produkuju ćelije melanoma, mijeloma, kolorektalnog karcinoma i povećana koncentracija ovog citokina u serumu bolesnika je povezana sa lošom prognozom i progresijom bolesti (Lippitz, 2013). Ima podataka da IL-10 ostvaruje indirektno imunosupresivno dejstvo na NK ćelije tako što inhibira produkciju IL-2, IL-15, IL-18 iz T limfocita i APC (Zwirner i Domaica, 2010).

IL-6, značajan proinflamatorni citokin, također može biti povećano izmeren u serumu bolesnika sa brojnim karcinomima (Lippitz, 2013). Pokazano je da ovaj citokin zajedno sa faktorima rasta, monocitnim faktorom rasta (*engl.* monocyte colony-stimulating factor, M-CSF) i GM-CSF-om, inhibirajući normalan proces mijelopojeze, dovodi do povećane zastupljenosti nezrelih mijeloidnih ćelija kao što su MDSC u krvi i tkivu tumora bolesnika obolelih od karcinoma (Sevko i Umansky, 2013).

TGF- β , IL-10 i IL-6 povećanjem ekspresije STAT-3 transkripcionog faktora u ćelijama tumora i imunosupresivnim ćelijama različitim mehanizmima dovode do inhibicije antitumorskog, a indukcije imunosupresivnog imunskog odgovora (Wu i sar., 2011).

TNF je citokin koji je dobio ime po sposobnosti da dovede do hemoragične nekroze ćelija sarkoma miša, a bez oštećenja okolnog zdravog tkiva. Iz tog razloga se veoma dugo samo i spominjao antitumorski efekat ovog citokina. Međutim, iako je ovaj citokin bitan za proliferaciju i funkciju NK ćelija, B i T limfocita, makrofaga i DC koje imaju antitumorsko dejstvo, sve je više podataka koji govore o tome da TNF ima učešće u svim fazama tumorogeneze kao i da je povećana sinteza ovog citokina i njegovih receptora kako na ćelijama tumora tako i na ćelijama mikrosredine tumora povezana sa lošom prognozom bolesti (Wu i Zhou, 2010). Poslednjih godina je sve više podataka da je TNF glavni medijator hronične inflamacije u tkivu tumora (Wu i Zhou, 2010; Waters i sar., 2013).

Imunosupresivni solubilni faktori ćelija tumora i njihovog okruženja

U serumu bolesnika sa karcinomom pokazano je postojanje solubilnih liganada aktivacionog NKG2D receptora koji se sa površine ćelija tumora oslobađaju dejstvom PLC, matriksnih metaloproteinaza (MMP) i to pre svega ADAM (*engl.* a disintegrin and metalloproteases) 7 i 10 ili ostaju na površini egzozomalnih mikrovezikula (Chitadze i sar., 2013). Ovi molekuli vezujući se za NKG2D receptor dovode do njegove endocitoze i degradacije, a samim tim i smanjene ekspresije na površini NK ćelija i inhibicije antitumorskih aktivnosti ovih ćelija (Groh i sar., 2002). Prisustvo ovih liganada u serumu također je povezano sa lošom prognozom i sklonošću ka metastaziranju u bolesnika sa melanomom (Paschen i sar., 2009).

Takođe u obolelih od karcinoma same ćelije tumora povećano proizvode enzim indolaminsku 2, 3-dioksigenazu-IDO koji razgrađuje triptofan do imunosupresivnih metabolita, L-kinurenina i kinurenične kiseline, kao i enzim ciklooksigenazu-2 (COX₂) koji je odgovoran za sintezu prostanglandina 2 (PGE₂). Svi ovi molekuli direktno inhibiraju proliferaciju NK ćelija i T limfocita, a s druge strane povećavaju diferencijaciju imunosupresivnih Treg ćelija (Stojanovic i sar., 2013). Takođe, L-kinurenin smanjuje ekspresiju NKp46 na humanim NK ćelijama i na taj način inhibira njihovu antitumorsku aktivnost (Della Chiesa i sar., 2006).

U serumu bolesnika sa karcinomom pokazano je postojanje solubilne forme HLA-G molekula koji vezujući se za KIR2DL4 receptor na NK ćelijama inhibira njihovu aktivnost (LeMaout i sar., 2005).

Imunosupresivne ćelije tumorske mikrosredine

Među imunosupresivnim ćelijama odgovornim za podsticanje rasta i širenja tumora najznačajnije mesto zauzimaju regulatorne DĆ (regDĆ), TAM, MDSC i Treg.

Sve je više novih podataka o imunosupresivnim svojstvima regDĆ u tumorima. Ove ćelije povećano proizvode IDO, arginazu-1 koja stvara L-arginin, inducibilnu NO sintetazu (iNOS) koja sintetiše NO, kao i citokine TGF-β i IL-10, a svi ovi molekuli direktno ili indirektno aktiviranjem drugih imunosupresivnih ćelija inhibiraju efektorske funkcije NK ćelija u borbi protiv tumora (Shurin i sar., 2013).

Suprotno klasično aktiviranim makrofagima (pro-inflamatorni M1), pod uticajem Th2 citokina (IL-4, IL-13) i TGF-β od monocita nastaju M2 makrofagi ili TAM (Schiavoni i sar., 2013). Ove ćelije proizvode TGF-beta, IL-10, IL-23, arginazu-1 inhibiraju NK ćelije i citotoksične T limfocite (Solinas i sar., 2009; Richards i sar., 2013), ispoljavanjem hemokina (CCL17, CCL22, CCL24) privlače Treg i Th2 limfocite u tumorsku sredinu, a produkcijom brojnih faktora rasta i MMP-2 i MMP-9 podstiču angiogenezu, rast i širenje tumora (Lakshmi Narendra i sar., 2013).

MDSC, funkcionalno i fenotipski heterogena populacija nezrelih mijeloidnih ćelija, nakuplja se u velikom broju u tkivu tumora i aktivacijom niza svojih enzima kao što su

iNOS, arginaza, NADPH oksidaza, COX-2 inhibira antitumorski odgovor NK ćelija, CD4⁺, CD8⁺ limfocita. Takođe, produkujući TGF-β i IL-10 MDSC podstiču diferencijaciju imunosupresivnih Treg, a smanjuju broj zrelih mijeloidnih DĆ na račun povećanog broja nezrelih, tolerogenih DĆ (Umansky i Sevko, 2012; Umansky i Sevko, 2013). Pokazano je da povećana ekspresija STAT-3 u MDSC predstavlja loš prognostički znak i govori u prilog metastatskog širenja melanoma (Deng i sar., 2012).

Analogno TAM makrofagima, u tumorima je pokazano postojanje TAN neutrofila odnosno neutrofila N2 fenotipa. Smatra se da je TGF-β iz tumora odgovoran za njihovu diferencijaciju u ovaj fenotip, a da TAN inhibiraju NK ćelije i CD8⁺ limfocite najverovatnije produkcijom arginaze-1 (Fridlender i Albelda, 2012).

Među T limfocitima najznačajnije mesto u imunosupresiji u tumoru imaju Th2 i regulatorni T limfociti (T reg).

Th2 limfociti produkujući IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 dovode do anergije NK ćelija i Th1 limfocita i inhibicije njihovih efektorskih funkcija i samim tim ostvaruju imunosupresivnu ulogu u obolelih od različitih tumora (Lakshmi Narendra i sar., 2013).

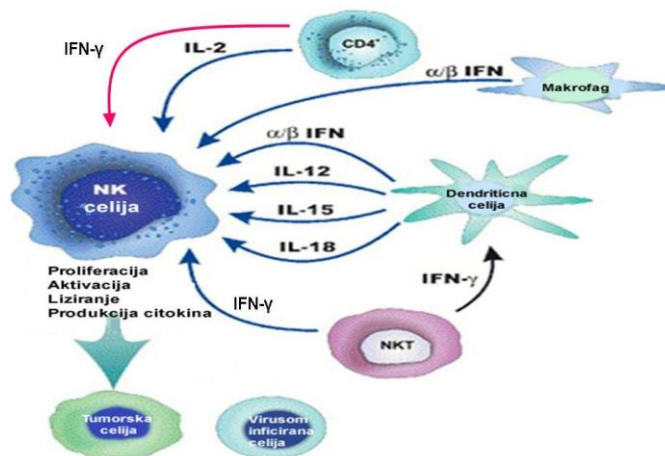
U tkivu tumora iDĆ, TAM i MDSC produkujući TGF-beta, IL-10, IL-6, vaskularni endotelni faktor rasta (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF), PGE2 stimulišu diferencijaciju Treg (Tanchot i sar., 2013; Schiavoni i sar., 2013). Ove ćelije produkcijom imunosupresivnih citokina, adenzina, cikličnog adenzin monofosfata (cAMP),IDO kao i ispoljavanjem brojnih inhibitornih receptora na svojoj površini, antigena 4 citotoksičnih T limfocitima (*engl.* cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CTLA-4), proteina programirane smrti 1 (*engl.* programmed death-1, PD-1), limfocitnog aktivacionog gena 3 (LAG-3), T ćelijskog imunoglobulinskog mucina 3 (Tim-3) (Schiavoni i sar., 2013) inhibiraju antitumorska svojstva NK ćelija, DĆ, M1 makrofaga, CD4⁺ i CD8⁺ limfocita. Tako da je povećan broj Treg ćelija u perifernoj krvi i tumorskom tkivu pacijenata obolelih od brojnih karcinoma povezan sa lošom prognozom i smanjenim preživljavanjem.

Uloga Th17 ćelija u nastanku i širenju tumora nije dovoljno poznata, ali postoje brojni podaci o povećanoj zastupljenosti ovih ćelija u krvi i tkivu tumora obolelih od karcinoma jetre, debelog creva i pankreasa. Međutim postoje i suprotni podaci koji govore o antitumorskim svojstvima ovih ćelija, smatra se zbog njihove velike plastičnosti. Tako

Th17 mogu ispoljiti T bet i diferentovati u antitumorske Th1 ćelije, dok prelaskom u Treg imaju snažna imunosupresivna svojstva (Ye i sar., 2013; Muranski i Restifo, 2013).

1.9. Citokini-modulatori aktivnosti NK ćelija

Citokini su proteini koje sekretuju ćelije kako nespecifične tako i specifične imunosti i imaju ulogu u uspostavljanju veze između ovih ćelija i regulisanju njihovih efektorskih funkcija. Dendritične ćelije i makrofagi pre svega proizvode IL-12 i IL-18, dok je IL-2 glavni citokin Th1 imunskog odgovora i svi oni različitim mehanizmima dovode do proliferacije i aktivacije NK ćelija u borbi protiv tumora (Lippitz, 2013) (Slika 7).



Slika 7. Citokini IFN- α/β , IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 imaju stimulatorno dejstvo na NK ćelije odnosno značajno pospešuju njihovu proliferaciju i efektorske funkcije, citotoksičnost i produkciju citokina (Hallet i Murphy, 2006)

1.9.1. Interleukin-2 (IL-2)

Humani IL-2 je mali (15,5 kDa), globularni protein koji se sastoji od 133 aminokiseline i po svojoj strukturi je tipičan citokin tzv. tipa I, koga čine 4 α heliksa. I pored toga što je IL-2 citokin T limfocita, ovaj citokin deluje i na mnoge druge ćelije urođene i adaptivne imunosti (Liao i sar., 2013). IL-2 pre svega proizvode aktivirani CD4⁺ T limfociti, a u manjoj meri i CD8⁺ limfociti, NK ćelije, NKT ćelije, aktivirane DĆ i mastociti (Boyman i Sprent, 2012).

Svoj efekat IL-2 ostvaruje preko složenih receptora koje čine različite kombinacije 3 subjedinice, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ (Boyman i Sprent, 2012; Liao i sar., 2013). IL-2R α (CD25) ima ulogu da vezuje IL-2, a nema mogućnost prenosa signala iako je neophodan za formiranje receptora IL-2 koji ima visok afinitet za vezivanje ovog citokina (Boyman i Sprent, 2012). U velikoj meri je konstitutivno ispoljen na Treg ćelijama (Malek i Castro, 2010), kao i na DC koje, prema novim podacima, vezuju IL-2 u *trans* položaju što je bitno za dodatnu aktivaciju CD4⁺ T limfocita (Wuest i sar., 2011). Međutim, uočena je povećana ekspresija ovog receptora kao i pojava njegove solubilne forme u serumu bolesnika obolelih od mnogih autoimunskih bolesti poput multiple skleroze, autoimunskog uveitisa kao i u toku procesa odbacivanja transplantata, ali i u malignitetima T i B limfocita, a što je u direktnoj vezi sa aktivnošću i prognozom bolesti (Rubin i Nelson, 1990). IL-2R β (CD122) ulazi i u sastav receptorskog kompleksa IL-15 i njegova ekspresija se povećava pod dejstvom IL-2 na T limfocitima, dok je IL-2R γ koji se još označava kao γ_c (*engl.* common cytokine receptor γ chain) deo receptorskog kompleksa mnogih citokina kao što su pored IL-2 i IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21 i zajedno sa IL-2R β ima ulogu u prenosu signala IL-2 (Boyman i Sprent, 2012; Liao i sar., 2013). Receptor visokog afiniteta za IL-2 se nalazi na površini aktiviranih CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita kao i na CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija i čine ga sve 3 subjedinice (α , β i γ). IL-2R koga čine β i γ_c ima srednji afinitet za vezivanje IL-2 i zastupljen je na površini NK ćelija, njihovoj CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji kao i na memorijskim CD8⁺ T limfocitima (Boyman i Sprent, 2012; Liao i sar., 2013). Poznato je da male doze IL-2 dovode do snažne proliferacije CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelija za razliku od visokih doza potrebnih za proliferaciju CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelija (Cooper i sar., 2001b).

IL-2 aktivira nekoliko signalnih putanja. Kada se ovaj citokin veže za IL-2R α , unutarćelijski domeni IL-2R $\beta\gamma_c$ aktiviraju JAK1 i JAK3 tirozin kinaze. Tri intracitoplazmatska signalna puta se dalje aktiviraju: JAK/STAT, Ras/Raf/MAPK i PI3K/Akt put. U JAK/STAT putanji najbitniju ulogu imaju STAT-5a i STAT-5b transkripcioni faktori koji kada se fosforilišu i dimerizuju odlaze u jedro ćelija gde se vezuju za gene bitne za razvoj, diferencijaciju i funkcije NK ćelija i T limfocita (Malek i Castro, 2010; Boyman i Sprent, 2012; Liao i sar., 2013). Danas je poznato da STAT-5

molekuli mogu formirati i tetramere koji su bitni za regulaciju ranog imunskog odgovora, kao i funkcije imunosupresivnih Treg ćelija (Lin i sar., 2012).

IL-2 ima veliki broj različitih bioloških dejstava. Ovaj citokin dovodi do značajne proliferacije CD4⁺ limfocita, pospešuje oslobađanje IFN- γ iz stimulisanih CD4⁺ limfocita i dovodi do njihove diferencijacije u Th1, Th2 i Treg limfocite. Uzimajući učešće u diferencijaciji i proliferaciji Treg limfocita ovaj citokin ima značajnu ulogu u inhibiciji imunskog odgovora, pre svega NK ćelija (Gasteiger i sar., 2013a; Gasteiger i sar., 2013b). Takođe, IL-2 prekida imunski odgovor CD4⁺ limfocita i održava homeostazu tako što povećava ekspresiju FasL i CTLA4 na površini ovih ćelija. IL-2 ima veoma složen efekat na Th17 limfocite tako što inhibira njihovu diferencijaciju, a povećava broj već diferenciovanih Th17 (Liao i sar., 2013). IL-2 je značajan aktivator NK ćelija i CD8⁺ limfocita. Dovodi do diferencijacije naivnih CD8⁺ limfocita u efektorske i memorijske ćelije i utiče na snažnu proliferaciju, povećanje citotoksičnosti i produkciju IFN- γ od strane NK ćelija i CD8⁺ limfocita (Zwirner i Domaica, 2010; Meazza i sar., 2011).

1.9.2. Interleukin-12 (IL-12)

Interleukin-12 je član IL-12 porodice heterodimeričnih citokina koju još čine IL-23, IL-27 i IL-35. Ovaj citokin ima centralnu ulogu u regulaciji Th1 imunskog odgovora, kao i u povećanju citotoksičnosti NK ćelija i na taj način on ostvaruje značajna antitumorska i antimikrobna svojstva (Trinchieri, 2003).

IL-12 strukturno čine 2 disulfidnim vezama povezana lanca, p35 (35 kDa) i p40 (40 kDa), koja grade heterodimer od 70kDa. Lanac p35 ima strukturne karakteristike citokina IL-6 superfamilije pa ima tipičnu strukturu citokina I tipa, dok p40 pripada hemopoetinskoj familiji receptora i sličan je IL-6R i receptoru za cilijarni neutrotrofični faktor (*engl.* cyliary neutrotrophic factor receptor, CNTFR). IL-12p40 lanac se sekretuje kao monomer ili homodimer u mnogo većoj količini u odnosu na IL-12p70 heterodimer. Za razliku od p40, p35 se ne sekretuje u monomerničnoj formi, već je isključivo vezan za p40 (Trinchieri, 2003; Watford i sar., 2003).

IL-12 receptor (IL-12R) čine 2 lanca, IL-12R β 1 i IL-12R β 2, koji strukturno pripadaju tipu I receptora citokina i slični su glikoproteinu 130 (gp130). IL-12p40 se veže za β 1 lanac, dok β 2 lanac prepoznaje heterodimer p70 ili p35 lanac. IL-12R β 1 lanac pored receptora za IL-12 ulazi u sastav receptora za IL-23 (Trinchieri, 2003; Watford i sar., 2003; Del Vecchio i sar., 2007). Malo je podataka o regulaciji ekspresije oba lanca IL-12R, ali je poznato da je IL-12R β 1 konstitutivno ispoljen na svim limfocitima i DĆ (Wu i sar., 1997).

Samo kada su prisutna oba lanca, IL-12 se visokim afinitetom veže za svoj receptor i dolazi do aktivacije signalnih molekula. Poznato je da je IL-12R β 1 povezan sa tirozin kinazom 2 (Tyk2), dok je IL-12R β 2 u asocijaciji sa JAK2 tirozin kinazom. Prenos signala se vrši preko β 2 lanca receptorskog kompleksa, dok IL-12R β 1 lanac ne poseduje tirozinsku grupu u svom unutarćelijskom delu i ima ulogu u vezivanju IL-12. β 2 lanac sadrži nekoliko rezidua tirozina u svom intracitoplazmatskom domenu, koje fosforilišu Tyk2 i JAK2 kinaze, da bi se dalje fosforilisalo i aktiviralo niz STAT transkripcionih faktora, STAT-3, STAT-4, STAT-5, među kojima je STAT-4 najznačajniji. STAT-4 homodimer ulazi u jedro ćelije i reguliše transkripciju niza gena vezanih za funkcionisanje pre svega Th1 limfocita i NK ćelija (Trinchieri, 2003; Watford i sar., 2003; Del Vecchio i sar., 2007).

Glavni izvor IL-12 su fagociti (monociti/makrofagi i neutrofilni) i DĆ aktivirane mikroorganizmima kao i različitim membranskim i solubilnim komponentama (Trinchieri, 2003; Watford i sar., 2003). IFN- γ povećava produkciju IL-12 tako što pojačava transkripciju gena za p35 i za p40. Takođe, interakcija CD40 liganda na aktiviranim T limfocitima sa CD40 molekulom makrofaga ili DĆ, dovodi do aktivacije ovih ćelija i produkcije IL-12. Najznačajniji negativni regulatori produkcije IL-12 su IL-10, TGF- β , ali i interferon tip I (Del Vecchio i sar., 2007).

Biološki efekti IL-12 su mnogobrojni. Ovaj citokin indukuje oslobađanje IFN- γ iz aktiviranih Th1 limfocita preko STAT-4 transkripcionog faktora. Takođe, IL-12 indukuje Th1, a inhibira Th2 imunski odgovor ili direktno ili indirektno preko oslobođenog IFN- γ . Zatim je pokazano da IL-12, nezavisno od IL-2, dovodi do proliferacije CD4⁺, CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR T limfocita, a takođe povećava citotoksičnost CD8⁺ limfocita. Takođe, IL-12 inhibira sintezu IgE od strane B limfocita prethodno stimulisanih IL-4 (Trinchieri, 2003; Watford i sar., 2003; Del Vecchio i sar., 2007).

IL-12 je originalno otkriven kao faktor koji povećava citotoksičnost NK ćelija. *In vitro* je pokazano da IL-12 povećava citotoksičnost NK ćelija za kratko vreme i to nezavisno od dejstva IL-2, IFN- α/β i IFN- γ . Ovaj svoj efekat IL-12 ostvaruje povećanjem ekspresije gena za perforin i TRAIL preko STAT-4 transkripcionog faktora koji se direktno veže za promotore ova 2 gena (Yamamoto i sar., 2002). Takođe, IL-12 sam, a pre svega u kombinaciji sa IL-18, povećava produkciju IFN- γ iz NK ćelija i proliferaciju ovih ćelija takođe posredstvom STAT-4 molekula. IL-12 povećava ekspresiju adhezivnih molekula na površini NK ćelija i tako olakšava vezivanje NK ćelija za ćelije tumora (Zwirner i Domaica, 2010). IL-12 putem NK ćelija inhibira angiogenezu u tumoru tako što povećava citotoksičnost ovih ćelija usmerenu protiv endotelnih ćelija krvnih sudova (Yao i sar., 1999).

1.9.3. Interleukin-18 (IL-18)

Interleukin-18 je otkriven 1989. godine kao faktor koji indukuje IFN- γ pa se smatralo da ovaj citokin ima presudnu ulogu u pokretanju Th1 imunskog odgovora. Danas se IL-18 svrstava u IL-1 porodicu citokina koju čini 11 članova pri čemu je IL-18 strukturno i biološki najbliži IL-1 β i IL-33 (Sedimbi i sar., 2013).

IL-18 produkuju kako ćelije imunskog sistema (monociti, aktivirani makrofagi i DC) tako i mnoge druge neimunske ćelije (keratinociti, intestinalne i respiratorne epitelne ćelije, hondrociti, sinovijalni fibroblasti i osteoblasti). IL-18 sekretuju i ćelije endokrinog i nervnog sistema tako da ovaj citokin uspostavlja kontakt između imunskog, nervnog i endokrinog sistema (Sedimbi i sar., 2013; Dinarello i sar., 2013). Takođe se danas zna da IL-18 produkuju i ćelije mnogih tumora (Kuppala i sar., 2012).

IL-18 se prvo sintetiše kao neaktivni protein od 24 kDa koji pod dejstvom kompleksa proteina u citoplazmi ćelije poznatih kao inflamazom i to pod dejstvom endoproteaze IL-1 β -konvertujućeg enzima (*engl.* IL-1 beta converting enzyme, ICE) ili kaspaze-1 postaje biološki aktivan molekul težine 18 kDa. Međutim, prema novijim podacima osim kaspaze-1 i veliki broj drugih enzima uključeno je u sintezu biološki aktivnog IL-18 (kaspaze 3 i 8, granzim B, proteinaza 3) (Sedimbi i sar., 2013).

Aktivnost IL-18 se ostvaruje preko heterodimeričkog receptora koga čine α i β lanac. IL-18R α vezuje IL-18 niskim afinitetom, dok IL-18R β ima ulogu u prenosu signala. IL-18 receptor se nalazi na površini makrofaga, neutrofila, NK ćelija, endotelnih i glatkomišićnih ćelija, a njegova ekspresija se na površini naivnih T, Th1 i B limfocita povećava pod dejstvom IL-12 (Sedimbi i sar., 2013; Dinarello i sar., 2013).

Vezivanjem IL-18 za receptor dolazi do aktivacije adapterskog proteina MyD88 koji dalje aktivira kinazu 4 povezanu sa receptorom IL-1 (*engl.* IL-1R-associated kinase-4, IRAK-4) koja se odvaja od receptorskog kompleksa IL-18 i stupa u kontakt sa faktorom 6 povezanim sa TNF receptorom (*engl.* TNFR-associated factor-6, TRAF-6) koji dalje aktivira nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) (Sedimbi i sar., 2013).

Protein koji vezuje IL-18 (*engl.* IL-18-binding protein, IL-18BP) je solubilni protein koji se visokim afinitetom vezuje za IL-18 i inhibira njegovo dejstvo. Na taj način IL-18BP inhibira funkciju Th1 limfocita i NK ćelija i to pre svega produkciju IFN- γ iz ovih ćelija. S druge strane, poznato je da sam IFN- γ povećava ekspresiju gena i sintezu ovog proteina tako da je osnovna uloga IL-18BP da reguliše funkciju IL-18 (Dinarello i sar., 2013).

IL-18 pokazuje veliki broj različitih bioloških svojstava. On je imunoregulatorni citokin koji ima ulogu da indukuje produkciju IFN- γ iz Th1 limfocita i NK ćelija i to pre svega u kombinaciji sa IL-12 (Sedimbi i sar., 2013; Dinarello i sar., 2013). Poznato je da IL-12 preko STAT-4 i aktivacionog proteina 1 (AP-1), a IL-18 preko NF- κ B i AP-1 aktiviraju IFN- γ promotor. Na taj način IL-12 i IL-18 različitim signalnim putevima dovode do značajne produkcije IFN- γ (Dinarello i sar., 2013). Zatim, pokazano je da IL-18 dovodi do Th1 diferencijacije samo u prisustvu IL-12, dok on sam indukuje Th2 imunski odgovor. Takođe, IL-18 povećava citotoksičnost CD8⁺ limfocita i NK ćelija (Zwirner i Domaica, 2010; Dinarello i sar., 2013). NK ćelije konstitutivno ispoljavaju receptor za IL-18 na svojoj površini i IL-18 povećava njihovu citotoksičnost nezavisno od IL-2, IL-12, IFN- γ mehanizmom koji zavisi od FasL (Smyth i sar., 2004). Takođe IL-18 u kombinaciji sa IL-2 povećavanjem ekspresije NKG2D receptora preko FasL i perforina povećava citotoksičnost NK ćelija (Smyth i sar., 2004).

Nekada se smatralo da IL-18 kao proinflamatorni citokin isključivo ima ulogu u odbrani organizma od infekcija i tumora. Međutim, prema novijim podacima pokazano je

da bi ovaj citokin mogao da ima bitno mesto i u patogenezi mnogih bolesti među kojima su autoimunske, metaboličke, bolesti srca, ali i maligne bolesti (Sedimbi i sar., 2013; Dinarello i sar., 2013).

1.10. Melanom

1.10.1. Melanom-opšte karakteristike tumora

Melanom je maligni tumor pigmentnih ćelija, melanocita koje vode poreklo od neuroektodermalnih ćelija neuralne kreste koje tokom embrionalnog razvoja migriraju u bazalni sloj epiderma. To je prvenstveno tumor kože, ali se može javiti i u uvealnom traktu i na konjunktivi oka, leptomeningeama, sluznici gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta. Iako melanom čini samo 4% svih karcinoma kože, on predstavlja najmaligniji tumor kože (Nikolaou i Stratigos, 2014).

Svake godine od melanoma u svetu oboli oko 200 000 ljudi, a oko 46 000 ljudi umre od ovog tumora. Incidencija melanoma je u stalnom porastu (3-7% godišnje), a najveća je u Australiji i Novom Zelandu. Procenjuje se da će do 2030. godine broj umrlih na godišnjem nivou dostići čak 80.000 (Nikolaou i Stratigos, 2014). U našoj zemlji svake godine od melanoma oboli oko 500 stanovnika i procena je da će se broj obolelih do 2030. godine uvećati za 80 odsto. Takođe, u Srbiji se broj umrlih od melanoma povećava iz godine u godinu, pa se od 1970. do 2000. godine smrtnost od melanoma kod muškaraca povećala tri puta, a kod žena dvostruko (Roš i sar., 2014).

Proces transformacije normalnih melanocita, melanomageneza, još uvek nije dovoljno ispitan. Smatra se da je to složen proces koji obuhvata promene u nizu gena melanocita, mutageni uticaj ultravioletnog zračenja kao i uticaj faktora sredine tumora (Bonaventure i sar., 2013). Na taj način je proces nastajanja melanoma multifaktorijalan, a faktori rizika su, pre svega, preterana izloženost sunčevim zracima naročito u mlađem životnom dobu, fenotipske karakteristike same osobe (osobe svetlije tena su pod znatno većim rizikom), pozitivna porodična anamneza za melanom, kao i druge karcinome kože, kao i postojanje tzv. prekursorskih pigmentnih lezija kod same osobe (Trotter i sar., 2013).

Smatra se da ultravioletno zračenje kao etiološki faktor nastanka melanoma oštećuje DNK ćelije ili direktnim dejstvom niza fotoprodukata ili indirektno povećavanjem sinteze ROS-a. Ovi molekuli dovode do promena u genima bitnim za procese proliferacije, diferencijacije ili smrti melanocita, (Tsao i sar., 2012).

BRAF protein je član porodice Raf kinaza koje su serin/treonin protein kinaze značajne u regulaciji MAPK/ERK signalnog puta i samim tim u regulaciji proliferacije ćelija. U oko 50-70% melanoma nađena je aktivirajuća mutacija B-Raf gena koja dovodi do povećane proliferacije melanocita i rasta tumora. Takođe je pokazano da ova mutacija stimuliše angiogenezu u tkivu melanoma. B-Raf mutacija je nađena u 59% lezija kože trupa i ekstremiteta koja je bila izložena dejstvu sunca. Tako su B-Raf inhibitori i to pre svega vemurafenib i dabrafenib našli značajno mesto u terapiji uznapredovalih melanoma, pa je krajem 2011. godine vemurafenib postao zvanična terapija u bolesnika sa neresektabilnim ili metastatskim melanomom koji imaju aktivirajuću mutaciju B-Raf gena. Međutim, zbog pojave rezistencije na B-Raf inhibitore kombinovanje ovih terapeutika sa inhibitorima nishodne kinaze, MEK kinaze, u MAPK/ERK signalnoj putanji pokazalo je dobre rezultate. Pored B-Raf-a u lezijama melanoma nađene su aktivirajuće mutacije gena za NRAS i PI3K kao i mutacije inhibitora 2A kinaze koja zavisi od ciklina (*engl.* cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A) i fosfataze i tenzin homologa (*engl.* phosphatase and tensin homolog, PTEN), značajnih tumor supresorskih gena, koje dovode do povećane proliferacije melanocita i rasta tumora (Kudchadkar i sar., 2013).

Melanom je veoma agresivan tumor i odlikuje se velikom invazivnošću. Poznato je da je početna faza širenja melanoma faza vertikalnog rasta u kojoj maligno transformisani melanociti prelaze iz epiderma kože u derm probijajući bazalnu membranu. Pretpostavlja se da su razlozi u pseudoepitelno-mezenhimskom poreklu melanocita koje ih čini veoma pokretljivim, gubitku adhezije među melanocitima, gubitku adhezije između melanocita i ćelija matriksa, razgradnji matriksa i migraciji maligno transformisanih melanocita u krvne sudove. Svi ovi procesi su regulisani brojnim signalnim molekulima poput MAPK, PI3K i Wtn/ β -katenina (Bonaventure i sar., 2013). Takođe, melanociti na svojoj površini ispoljavaju veliki broj adhezivnih molekula poput adhezivnog molekula ćelija melanoma (*engl.* melanoma cell adhesion molecule, MCAM), adhezivnog molekula vaskularnih ćelija

(*engl.* vascular cell adhesion molecule, VCAM), međućelijskog adhezivnog molekula (*engl.* intercellular adhesion molecule, ICAM), NCAM-a, N-kadherina, koji postoje i na endotelnim ćelijama krvnih sudova i koji im omogućavaju da kada uđu u krvni sud ostanu u njemu, vežu se za njegov zid i na kraju iz krvnog suda migriraju u parenhim određenog organa. Pokazano je da ćelije melanoma zahvaljujući specifičnosti svojih adhezivnih molekula metastaziraju u tačno određene organe. Takođe, sintetišući niz proteina poput IL-8, VEGF-A, VEGF-C i lipida kao što su faktor aktivacije trombocita (*engl.* platelet activating factor, PAF) i lizofosfatidna kiselina (*engl.* lysophosphatidic acid, LPA) ćelije melanoma podstiču stvaranje novih krvnih sudova i limfatika. Takođe, invazivnost melanoma povezana je i sa mutacijama B-Raf, NRAS, PTEN i CDKN2A gena u tkivu tumora (Braeuer i sar., 2014).

1.10.2. Dijagnostifikovanje i prognoza bolesnika sa melanomom

Prevenција i rana dijagnoza imaju najveći značaj u borbi protiv melanoma. Kako svaka promena već postojećeg urođenog mladeža ili pojava novog drugačijeg zahteva oprez, za pacijente i lekare značajan je tzv. ABCDEF kriterijum koji predstavlja asimetriju (*engl.* asymmetry, A), nepravilnost ivice (*engl.* border irregularity, B), promenu boje (*engl.* color, C), povećanje dimenzija (*engl.* diameter, D), uzdignutost (*engl.* elevation, E) promene i porodičnu anamnezu (*engl.* familiar, F). Tako da se dijagnoza melanoma zasniva na kliničkoj identifikaciji sa obaveznom histopatološkom potvrdom (Hauschild i sar., 1999). Histopatološka analiza pruža niz podataka koji osim u postavljanju dijagnoze mogu pomoći i u određivanju prognoze i terapije. Postoje 4 osnovna kliničkopatološka tipa melanoma: melanom koji se širi površinski, nodularni, lentigo maligni melanom i akralno lentiginozni od kojih su prvi i drugi tip najzastupljeniji. Površinsko šireći i lentigo melanom imaju bolju, dok nodularni melanom ima najlošiju prognozu. U retke varijante melanoma ubrajaju se amelanotični, dezmoplastični, melanom svetlih ćelija, mikroidni (Weedon, 2002).

Debljina tumora je najznačajniji prognostički faktor kod bolesnika sa primarnim melanomom kože. Tako se na osnovu histopatološke analize određuju klinično-prognostički parametri koji opisuju stepen invazivnosti melanoma i to su parametar prema

Klarku, koji opisuje nivo invazije tumora u različitim slojevima kože (Clark i sar., 1969) i Breslow klinički parametar koji opisuje debljinu tumora u milimetrima (Breslow, 1970).

Prva klasifikacija melanoma Američkog udruženja za kancer (*engl.* american joint committee on cancer, AJCC) datira iz 1978. godine i doživela je niz promena do poslednje, sedme klasifikacije iz 2009. godine (Balch i sar., 2009). Klasifikacija objavljena 2002. godine, zasniva se na patohistološkom nalazu i TNM klasifikaciji (tumor-T, limfni čvor-L i metastaze-M) (Balch i sar., 2001) i prema njoj bolesnici oboleli od melanoma svrstavaju se u 4 stadijuma.

Stadijumi I i II se odnose na lokalizovanu bolest, stadijum III na melanom sa zahvaćenim regionalnim limfnim čvorovima, a stadijum IV na bolest sa prisutnim udaljenim metastazama. U bolesnika sa lokalizovanim melanomom debljina tumora ima najveći prognostički značaj, pa se pacijenti sa debljinom tumora do 1mm svrstavaju u I, a preko toga u II klinički stadijum.

Bolesnici sa metastazama u udaljenim organima svrstavaju se u IV klinički stadijum. Pokazano je da bolesnici sa različitom lokalizacijom metastaza imaju različitu prognozu tako da bolesnici s metastazama u koži, potkožnom tkivu kao i udaljenim limfnim čvorovima (M1a kategorija) imaju značajno bolje preživljavanje od bolesnika s metastazama u plućima (M1b) ili metastazama u drugim udaljeni organima (M1c), koji imaju najlošije preživljavanje. Ono što je specifičnost AJCC klasifikacije je uvrščivanje vrednosti laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu u klasifikaciju melanoma što nije učinjeno ni kod jednog drugog tumora. Tako da vrednost LDH predstavlja nezavisan prognostički faktor i bolesnici sa povišenom vrednošću ovog enzima imaju takođe najlošije preživljavanje i svrstavaju se u M1c kategoriju bez obzira na lokalizaciju udaljenih metastaza (Balch i sar., 2001).

Poznato je da je u početnom stadijumu melanoma petogodišnje preživljavanje bolesnika 97%, a desetogodišnje 93%. Metastatska bolest odnosno IV stadijum se javlja u 10-15% pacijenata sa petogodišnjim preživljavanjem ispod 10% (Trotter i sar., 2013).

1.10.3. Imunska reaktivnost vezana za melanom

Poznato je da je melanom imunogeničan tumor što potvrđuju podaci o postojanju infiltrirajućih T limfocita i NK ćelija u humanom tkivu melanoma, a što predstavlja povoljan prognostički faktor (Cipponi i sar., 2011). U nekih pacijenata je čak pokazana spontana histološka regresija primarnog melanoma. Takođe, ćelije melanoma ispoljavaju veliki broj heterogenih antigena na svojoj površini kao što su Melan-A, gp100 ili kancer/testis antigen 1 koji pokreću imunski odgovor T i B limfocita (Parmiani i sar., 2007).

U početku razvoja melanoma komponente nespecifične i specifične imunosti funkcionišu udruženo kako bi detektovale tumor i eliminisale ga. Oštećene ćelije tumora ili ćelije tumorskog okruženja proizvode brojne faktore kao što su IFN- γ , IFN- α/β , molekule vezane za opasnost (*engl.* danger-associated molecular patterns, DAMP) koji aktiviraju NK, NKT, $\gamma\delta$ T ćelije, makrofage i DĆ kao komponente urođene kao i CD4⁺ i CD8⁺ T limfocite i B limfocite kao predstavnike stečene imunosti. NK ćelije i makrofagi u tkivu tumora aktiviraju jedni druge produkcijom IFN- γ i IL-12, a onda NK ćelije dejstvom perforina, granzima, TRAIL-a, a makrofagi produkcijom ROS-a i azotnih komponenti ubijaju ćelije tumora. Aktivirane DĆ prezentuju antigene tumora CD8⁺ CTL koji uz pomoć CD4⁺ ćelija postaju efektorske, a pre svega memorijske ćelije koje su ključne u eliminaciji ćelija melanoma. B limfociti produkcijom antitela eliminišu glikosfingolipidne antigene melanoma, gangliozide (Parmiani i sar., 2007; Aris i sar., 2012).

Međutim, ćelije melanoma imaju brojne imunosupresivne karakteristike kao što su odsustvo kostimulatornih molekula, smanjena ekspresija antigena tumora, liganda za aktivacione receptore NK ćelija kao i povećana produkcija niza imunosupresivnih molekula. S druge strane u mikrosredini melanoma povećano su prisutne imunosupresivne ćelije: MDSC, TAM, TAN, Treg, nezrele DĆ (Umansky i Sevko, 2012).

Solubilni medijatori hronične inflamacije koje proizvode ćelije melanoma i ćelije njihovog okruženja uključuju različite citokine (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF, TGF- β), hemokine (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL8) i faktore rasta (VEGF, GM-CSF), ROS, azotne čestice, prostanglandine, matriks metaloproteinaze i svi ovi molekuli podstiču rast i metastaziranje tumora stimulišući protumorske mutacije, a sprečavajući apoptozu ćelija

tumora, a takođe povećavaju i neovaskularizaciju. Takođe, ovi medijatori indukuju migraciju i aktivaciju svih prethodno pomenutih imunosupresivnih ćelija u tkivo melanoma (Umansky i Sevko, 2012).

Imunosupresivna funkcija ćelija melanoma kao i ćelija njihovog okruženja regulisana je aktivacijom niza transkripcionih faktora kao što su NF- κ B, AP-1, STAT-3 (Del Prete i sar., 2011). Takođe mnogobrojni onkogeni u ćelijama melanoma nemaju samo ulogu u indukciji nekontrolisane proliferacije ćelija, već i u regulaciji sinteze i produkcije imunosupresivnih citokina i hemokina. Tako se zna da komponente RAS-RAF signalnog puta aktiviraju NF- κ B i podstiču sintezu imunosupresivnih medijatora. Tako da je, prema najnovijim podacima, mutacija B-Raf gena povezana i sa imunosupresijom u melanomu. Pokazano je da upotreba B-Raf inhibitora kod pacijenata sa melanomom dovodi do povećane infiltracije CD4⁺ i CD8⁺ limfocita u tkivu tumora kao i do smanjene produkcije IL-6 i IL-10, citokina koji mogu da učestvuju u uspostavljanju imunosupresije u tumoru (Wilmott i sar., 2012; Frederick i sar., 2013).

Međutim, pokazano je da u tkivu melanoma NK i T ćelije pod dejstvom imunosupresivnih solubilnih faktora, a pre svega IL-10 i TGF- β na svojoj površini povećano ispoljavaju inhibitorni CTLA-4 molekul. Primenom monoklonskog antitela usmerenog protiv ovog molekula sprečava se veza CTLA-4 i B7 na APC, pa samim tim i prenos inhibitornih signala u T limfocite što dovodi do njihove aktivacije u borbi protiv melanoma. Prema najnovijim podacima CTLA-4 molekul se nalazi i na površini ćelija melanoma, tako da primenom anti-CTLA-4 antitela NK ćelije mogu da liziraju ćelije melanoma ADCC mehanizmom (Ott i sar., 2013). U prilog tome je 2011. godine humano monoklonsko anti-CTLA-4 antitelo, ipilimumab, u zvaničnoj primeni u bolesnika sa metastatskim melanomom. Veliki je broj studija u kojim se ispituje primena ovog antitela u kombinaciji sa IL-2, dakarbazinom ili vemurafenibom (Addeo i Rinaldi, 2013).

PD-1 je drugi koinhibitorni receptor T limfocita koji je strukturno sličan CTLA-4, ali se od njega razlikuje po svojim biološkim funkcijama i ligandima. Njegovi ligandi su PD-L1 i PD-L2 od kojih se PD-L1 nalazi na površini ćelija mnogih tumora kao i ćelija tumorskog okruženja kao što su MDSC na kojima se ispoljava pod dejstvom imunosupresivnih citokina. Poznato je da u uznapredovalom melanomu NK ćelije i T

limfociti bivaju inhibirani i zbog povećane ekspresije PD-1 molekula. Tako da se u brojnim kliničkim studijama ispituje anti-PD-L1 monoklonsko antitelo, nivolumab, koje blokira vezivanje PD-L1 za PD-1 i aktivira NK ćelije i T limfocite, a daje mnogo manje neželjenih efekata od ipilimumaba (Ott i sar., 2013; Merelli i sar., 2014).

1.10.3.1. Uloga NK ćelija u odbrani od melanoma

Interakcija između NK ćelija i ćelija melanoma intenzivno se izučava poslednjih desetak godina. Poznato je da NK ćelije svojim efektorskim funkcijama, citotoksičnošću i produkcijom citokina, mogu uspešno da eliminišu ćelije melanoma (Morgado i sar., 2011; Desbois i sar., 2012). Takođe se zna da NK ćelije u kontaktu sa DC^Ć podstiču njihovo sazrevanje i povećavaju njihov kapacitet za aktivaciju T limfocita koji proizvode citokine u borbi protiv melanoma (Desbois i sar., 2012). Takođe, ćelije melanoma na svojoj površini ispoljavaju veliki broj liganada za aktivacione receptore NK ćelija, a smanjeno ispoljavaju MHC molekule I klase. Na taj način su aktivacijom brojnih aktivacionih receptora pre svega NKG2D, NCR i DNAM-1, ali i inhibicijom dejstva inhibitornih receptora, pre svega KIR-ova, CD94-NKG2A, LIR-1 NK ćelije spremne da eliminišu ćelije melanoma (Casado i sar., 2009; Morgado i sar., 2011). NKG2D receptor vezujući se za ligande na ćelijama melanoma ima značajnu ulogu u njihovoj eliminaciji. Poznato je da postoji pozitivna korelacija između povećane ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama i povećane citotoksičnosti ovih ćelija u bolesnika sa metastatskim melanomom (Morgado i sar., 2011). Pokazano je da se MICA/B ligandi nalaze na 80% ćelija ćelijskih linija melanoma i da su nađeni na 77.5% ćelija primarnih tumora i 65% ćelija metastatskog melanoma (Vetter i sar., 2002). NCR receptori takođe imaju značajnu ulogu u eliminaciji ćelija melanoma. Pokazano je da NKp46 receptor ima najznačajniju ulogu u borbi protiv ovog tumora i da postoji pozitivna korelacija između ekspresije ovog receptora na NK ćelijama i njihove citotoksičnosti (Morgado i sar., 2011). Međutim, analizom ćelija metastatskog melanoma pokazano je da sve ćelije ispoljavaju ligande za NKp44, većina za NKp30, a da ne ispoljavaju ligande za NKp46 (Cagnano i sar., 2008). Ligandi DNAM-1, aktivacionog receptora NK ćelija, CD112, a pre svega CD155 su značajno zastupljeni na ćelijama melanoma i pokazano je da DNAM-1 ima značajnu ulogu u kontroli metastaziranja i to pre

svoga slabo imunogenih metastatskih melanoma koji ne ispoljavaju ligande za NKG2D receptor (Casado i sar., 2009; Lakshmikanth i sar., 2009). Takođe, na površini mnogih ćelija melanoma smanjena je ekspresija MHC molekula I klase što je okidač za aktivaciju NK ćelija (Degenhardt i sar., 2010).

Da bi NK ćelije ostvarile svoju citotoksičnost neophodna je adekvatna interakcija između njih i tumorskih ćelija koja se ostvaruje preko adhezionih molekula. Analiza ovih molekula na ćelijskim linijama melanoma pokazala je prisustvo CD54, CD58 kao i CD56 i CD57, dok su ligandi za kostimulatorne molekule CD80, CD86 ili CD48 bili odsutni (Casado i sar., 2009).

Međutim, danas se dobro zna da brojni faktori koje proizvode ćelije melanoma i ćelije njihovog okruženja imaju dominantan imunosupresivni efekat na NK ćelije. Tako je pokazano da TGF- β , PGE₂ iIDO smanjuju ekspresiju NKp30, NKp44 i NKG2D aktivacionih receptora na NK ćelijama pa samim tim i njihovu citotoksičnu aktivnost i produkciju citokina (Pietra i sar., 2012a; Pietra i sar., 2012b; Balsamo i sar., 2012). Smanjena ekspresija NKp30 na NK ćelijama u melanomu dovodi i do loše interakcije NK ćelija i DĆ tako da se smanjuje broj zrelih DĆ koje uspešno prezentuju antigene tumora (Pietra i sar., 2012b). Značajnu imunosupresivnu ulogu u melanomu imaju i fibroblasti koji čine komponente tumorskog okruženja. Pokazano je da oni imaju osobinu da inhibiraju imunostimulatorno dejstvo IL-2 na NK ćelije tako što inhibiraju povećanje ekspresije aktivacionih receptora, NKp44, NKp30 i DNAM-1, na NK ćelijama pod dejstvom ovog citokina. Pokazano je da se ekspresija DNAM-1 receptora na površini NK ćelija smanjuje u direktnom kontaktu fibroblasta i NK ćelija, a da je za smanjenje ekspresije NKp44 i NKp30 odgovoran PGE₂ produkovan iz fibroblasta (Balsamo i sar., 2009).

1.10.4. Terapija melanoma

Melanom je veoma agresivan maligni tumor koji je neosetljiv na zračnu terapiju, ali i slabo osetljiv na hemioterapiju usled niskog stepena spontane apoptoze, ali i apoptoze indukovane hemioterapeuticima. Iz tog razloga edukacija, prevencija i rana detekcija čine osnovu za smanjenje broja obolelih i umrlih od melanoma (Trotter i sar., 2013).

Hirurška terapija predstavlja osnovnu terapiju za lokalne, regionalne i izolovane metastatske melanome. Kada se melanom dijagnostikuje na vreme tada je veoma mala verovatnoća njegovog širenja pa se preko 90% melanoma može izlečiti na ovaj način (Dunki-Jacobs i sar., 2013).

Za melanome sa srednjim i visokim rizikom potrebna je i adjuvantna terapija posle hirurgije koja se primenjuje ili kao zvanično prihvaćena terapija ili kao deo mnogobrojnih istraživačkih protokola. Međutim, i pored na hiljade postojećih kliničkih studija efikasnost adjuvantne terapije je i dalje nezadovoljavajuća (Menzies i Long, 2013).

1.10.4.1. Adjuvantna terapija melanoma

Adjuvantna terapija u bolesnika sa melanomom još uvek je predmet detaljnih ispitivanja. Osnovu adjuvantne terapije čine hemioterapija, na različite molekule ciljana terapija i imunska terapija koja može biti specifična (vakcine i adoptivni transfer ćelija) i nespecifična (citokini) (Salama, 2013).

Sistemska hemioterapija i dalje čini osnovu lečenja bolesnika sa metastatskim melanomom iako je njena upotreba dala razočaravajuće rezultate. Dakarbazin (DTIC), alkilozirajući hemioterapeutik, je od sedamdesetih godina prošlog veka jedini hemioterapeutik koji je u zvaničnoj upotrebi u lečenju obolelih od metastatskog melanoma. Prema prvim procenama DTIC je davao klinički odgovor oko 25%, a danas se zna da je klinički odgovor na ovaj lek samo 5-12% (Gogas i sar., 2013). Međutim, prema najnovijim podacima DTIC u bolesnika sa metastatskim melanomom povećava ekspresiju liganada NKG2D receptora i tako povećava citotoksičnost NK ćelija u borbi protiv tumora (Hervieu i sar., 2013a; Hervieu i sar., 2013b). Od ostalih hemioterapeutika u lečenju melanoma koriste se temozolomid (efikasnost slična dakarbazinu, a ima manje neželjenih efekata), cisplatina, vinblastin, paklitaksel. Tako da se u raznim kliničkim studijama ispituje efekat dakarbazina u kombinaciji sa drugim hemioterapeuticima ili različitim oblicima biološke terapije (vakcine, citokini, ciljana terapija) (Gogas i sar., 2013).

Vakcine protiv melanoma čine aktivnu specifičnu imunsku terapiju koja ima za cilj da obezbedi dugotrajan imunski odgovor usmeren na različite antigene ćelija melanoma i

da kontroliše pojavu metastaza bez velikih neželjenih efekata. Osnovu vakcinacije čini ubacivanje antigena tumora u DC, koje onda migriraju u limfne čvorove i aktiviraju CD4⁺ i CD8⁺ T limfocite. Početkom ovog veka počela su intenzivna ispitivanja vakcina protiv melanoma. U početku su rezultati bili skromni jer su se slabo poznavali antigeni melanoma, dok danas postoji veliki broj multicentričnih studija u III fazi gde u odnosu na ciljani antigen i njegovu formu vakcine mogu biti bazirane na celoj ćeliji ili njenim lizatima, na definisanim antigenima koji mogu biti peptidi ili gangliozidi, mogu biti vakcine sa dendritskim ćelijama, plazmid DNK vakcine, rekombinantne vakcine sa virusnim vektorom (Blanchard i sar., 2013).

U adoptivnom transferu se autologe ili alogene NK ćelije *ex vivo* stimulišu različitim citokinima i prebacuju u organizam obolelog (Cheng i sar., 2013; Ames i Murphy, 2014). Adoptivni transfer alogenih NK ćelija *in vitro* stimuliranih IL-2 našao je značajno mesto u prekliničkim studijama u melanomu uz poštovanje „KIR-mismatched“ principa koji podrazumeva da NK ćelije davaoca moraju da ispolje KIR receptore koji nemaju odgovarajuće MHC molekule I klase na ćelijama tumora primaoca pri čemu dolazi do snažne “kalem protiv tumora” (*engl.*graft versus tumor, GVT) reakcije (Ruggeri i sar., 2008; Besser i sar., 2013). Takođe, alogene NK ćelije čiji aktivacioni receptori vezuju ligande na ćelijama tumora pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost protiv ćelija melanoma (Markel i sar., 2009). Međutim, primena autologih NK ćelija u terapiji melanoma nije dala značajne rezultate (Besser i sar., 2013). NK-92 ćelijska linija je dobijena od NK ćelija limfoma i njen fenotip je CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁻KIR⁻. Ona se odlikuje i citotoksičnošću i produkcijom citokina, ispoljava aktivacione receptore NK ćelija, a nema KIR-ove. Tako da je značajan broj studija koje ispituju ulogu NK-92 ćelijske linije u terapiji melanoma (Cheng i sar., 2012).

U terapiji melanoma značajnu ulogu imaju i monoklonska antitela koja se vezuju za antigene na ćelijama melanoma (npr. na GD3 antigen) (Forero i sar., 2006). Takođe, poslednjih godina veliki je značaj ciljane terapije u melanomu kako one koja nema direktno dejstvo na imunski odgovor (anti-B-Raf i anti-MEK antitela), tako i imunske ciljane terapije (anti-CTLA-4, -PD-1, -PD-L1 antitela), a ispituju se i blokirajuća antitela usmerena na TGF-β i njegove receptore (Busse i Keilholz, 2011; Ott i sar., 2013).

1.10.4.1.1. Uloga citokina u terapiji melanoma

Citokini zauzimaju značajno mesto u terapiji melanoma. IFN- α u visokim dozama je zvanična terapija u lečenju pacijenata sa visokim rizikom za pojavu metastaza (IIB, IIC i III stadijum), dok je IL-2 u visokim dozama prihvaćena terapija u lečenju obolelih od metastatskog melanoma. Međutim zbog neželjenih dejstava ovih citokina u mnogim pretkliničkim i kliničkim studijama ispituju se efekti citokina novije generacije (IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) pojedinačno ili u međusobnim kombinacijama ili u kombinaciji sa niskim dozama IFN- α i IL-2, vakcinama, monoklonskim antitelima (Nicholas i Lesinski, 2011).

IL-2 je prvi citokin koji je našao primenu u terapiji melanoma citokinima. Poznato je da svoje antitumorsko dejstvo ovaj citokin ostvaruje povećanjem proliferacije i citotoksičnosti NK ćelija i CD8⁺ citotoksičnih limfocita, stimulacijom stvaranja memorijskih CD8⁺ limfocita, povećanjem proliferacije i funkcija CD4⁺ pomoćničkih limfocita. Takođe, IL-2 dovodi do proliferacije CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije koja produkcijom citokina stimuliše T ćelijski antitumorski odgovor (Liao i sar., 2013). IL-2 je u zvaničnoj upotrebi u lečenju bolesnika obolelih od metastatskog melanoma od 1988. godine, a metastatskog karcinoma bubrega od 1992. godine (Liao i sar., 2013). Pokazano je da je njegov klinički odgovor u bolesnika sa metastatskim melanomom od 15% do 25%, a kod 6% bolesnika dovodi do kompletne ili dugotrajne remisije (Nicholas i Lesinski, 2011). Međutim, terapijska primena ex vivo IL-2 stimulisanih ćelija ubica (*engl.* lymphokine stimulated killer, LAK) i visokih doza IL-2 dala je razočaravajuće rezultate u bolesnika sa metastatskim melanomom i pored toga što IL-2 *in vitro* značajno povećava proliferaciju i citotoksičnosti NK ćelija i CD8⁺ limfocita. Terapijska uspešnost IL-2 pokazala se malom pre svega zbog brojnih neželjenih dejstava koje daje ovaj citokin (Nicholas i Lesinski, 2011; Ames i Murphy, 2014). Na prvom mestu je visok stepen sistemske toksičnosti IL-2 i njegov kratak poluživot. Toksičnost IL-2 najviše se ispoljava kada se ovaj citokin daje učestalo u visokim dozama i to na prvom mestu kao vaskularni sindrom koga čine povećana propustljivost krvnih sudova, hipotenzija, edem pluća, oštećenje jetre i bubrega. Prema najnovijim podacima ovaj sindrom nastaje zbog vezivanja IL-2 za CD25 na endotelnim ćelijama krvnih sudova (Boyman i Sprent, 2012; Liao i sar., 2013). Takođe, IL-

2 dovodi do snažne proliferacije i aktivacije Treg ćelija koje produkcijom TGF- β i IL-10 inhibiraju NK ćelije. Tako da bi bila poželjna inhibicija Treg ćelija pre primene IL-2 (Gasteiger i sar., 2013a, Gasteiger i sar., 2013b).

Takođe se kroz mnoge studije ispituju efekti srednjih ili niskih doza IL-2 u kombinaciji sa drugim citokinima (IFN- α , IL-12, IL-18), vakcinama (npr. gp100), hemioterapeuticima (DTIC, ciklofosamid), ciljanom terapijom (ipilimumab) pri čemu su neželjeni efekti IL-2 mnogo manji (Nicholas i Lesinski, 2011). Prema novijim podacima, visok nivo VEGF-a i fibronektina u cirkulaciji pacijenata sa melanomom govori u prilog lošeg odgovora na terapiju IL-2 i lošeg preživljavanja (Sabatino i sar., 2009).

IL-12 ima snažna anti-tumorska svojstva. Ovaj citokin dovodi do Th1 diferencijacije i produkcije IFN- γ iz ovih ćelija, a IFN- γ sa svoje strane snažno indukuje produkciju IL-12 iz fagocita i dendritičnih ćelija, a inhibira pro-tumorski Th2 imunski odgovora. Zatim, IL-12 dovodi do proliferacije CD4⁺, CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR T limfocita i NK ćelija, a takođe povećava citotoksičnost NK ćelija i CD8⁺ limfocita (Zwirner i Domaica, 2010). Prema novijim podacima pokazano je da IL-12 inhibira proliferaciju Treg u tumorskom tkivu (Cao i sar., 2009). Takođe, u *in vitro* uslovima IL-12 indukuje ispoljavanje IL-12R β 2 na površini makrofaga, DC i MDSC koje onda postaju efikasne APC koje prezentujući antigene tumora aktiviraju CD8⁺ limfocite u borbi protiv B16 melanoma (Kerker i sar., 2011). Takođe je pokazano da IL-12 podstiču stvaranje NKp46⁺LTi ćelija koje takođe inhibiraju rast B16 tumora nezavisno od NK ćelija i T limfocita (Eisenring i sar., 2010). Pokazano je da miševi sa mutiranim IL-12 imaju povećanu sklonost za razvoj spontanih tumora ili tumora izazvanih hemijskim karcinogenima (Ngiow i sar., 2013). IL-12 ima snažna antiangiogenetska svojstva koja se pre svega ogledaju u njegovoj moći da povećava produkciju IFN- γ , koji sa svoje strane povećava produkciju hemokina CXCL10 i CXCL9 koji inhibiraju sintezu MMP-9 i ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1, a takođe i zaustavljaju ćelijski ciklus endotelnih ćelija krvnih sudova u tumoru. S druge strane oba hemokina se vežu za CXCR3 receptor na aktiviranim NK ćelijama i T limfocitima (Voest i sar., 1995). Iz svega iznetog puno je razloga za ispitivanje mogućnosti uključivanja IL-12 u antitumorsku terapiju.

Antimelanomska dejstva IL-12 se intenzivno ispituje kroz brojne pretkliničke i kliničke studije. Prva klinička primena IL-12 bila je 1997. godine kada je humani rekombinantni (hr) IL-12 davan intravenski bolesnicima obolelim od karcinoma bubrega, kolona i melanoma. Tada je pokazan delimičan odgovor u pacijenta sa karcinomom bubrega i prolazan kompletan odgovor u bolesnika sa melanomom uz veliku sistemsku toksičnost pre svega zbog povećane produkcije IFN- γ (Atkins i sar., 1997). Takođe su usledili pokušaji subkutanog davanja IL-12. Iako je ovaj oblik terapije IL-12 bio manje toksična i doveo je do značajnog povećanja CTL u tkivu tumora, njegov klinički značaj je ostao mali (Bajetta i sar., 1998). Dalje je usledilo nekoliko kliničkih studija u kojima je davanje hrIL-12 pokazalo veći terapijski značaj u hematološkim malignitetima, u odnosu na melanom (Del Vecchio i sar., 2007). Poslednjih godina IL-12 zauzima značajno mesto kao adjuvans u vakcinama protiv melanoma gde se u mnogim pretkliničkim i kliničkim studijama subkutano davan kombinuje sa DĆ koje prezentuju brojne antigene melanoma kao što su gp100, tirozinaza i značajno povećavaju aktivaciju Th1 limfocita uz minimalnu toksičnost (Nagai i sar., 2010). Danas je sve više studija u kojima se ispituje genska terapija koja podrazumeva lokoregionalno davanje injekcije plazmida IL-12, kao i aplikacija IL-12 u formi imunocitokina (IL-12 spojen sa monoklonskim antitelom) (Daud i sar., 2008; Lasek i sar., 2014). Veliki značaj i dalje imaju studije u kojima se IL-12 u minimalnim dozama kombinuje sa brojnim drugim citokinima poput IL-2, -7, -15, -18, -21, -27, IFN- α , pri čemu IL-12 i IL-18 u kombinaciji pokazuju značajna antitumorska svojstva uz minimalnu toksičnost (Weiss i sar., 2007).

IL-18 ima i antikancerska i prokancerska svojstva. Antitumorska svojstva IL-18 ogledaju se pre svega u aktivaciji Th1 limfocita i NK ćelija (Park i sar., 2007; Zwirner i Domaica, 2010). Takođe, IL-18 inhibira proliferaciju i funkciju Treg limfocita jer one ispoljavaju IL-18R na svojoj površini (Sims i Smith, 2010). S druge strane, u novije vreme je puno podataka o protumorskim svojstvima ovog citokina. Povećana koncentracija IL-18 nađena je u serumu pacijenata obolelih od mnogih tumora i povezana je sa lošom prognozom bolesti i metastaziranjem (Park i sar., 2007; Kuppala i sar., 2012; Lippitz, 2013). Pokazano je da je IL-18 odgovoran za inhibiciju imunskog odgovora, podsticanje angiogeneze, rasta i metastaziranja tumora tako što u ćelijama karcinoma podstiče sintezu

VEGF, CXCL12, CCL2, MMP-2 i MMP-9. Takođe je pokazano da VEGF stimuliše sintezu IL-18 i na taj način postoji pozitivna povratna sprega između njega i IL-18 (Park i sar., 2007; Kuppala i sar., 2012). U mnogim tumorskim modelima prenos signala preko MyD88 je odgovoran za karcinogenezu (Salcedo i sar., 2010).

Ipak, ispitivanja IL-18 kao i IL-12 u antitumorskoj terapiji su sve intenzivnija kako u prekliničkim tako i u kliničkim studijama. U prvoj kliničkoj studiji koja je prošla I i II fazu, IL-18 je davan intravenski bolesnicima sa metastatskim melanomom. Ovaj citokin se pokazao dobro tolerantnim i kod 70% pacijenata bolest se stabilizovala posle 12 ciklusa terapije. IL-18 pokazuje manju toksičnost u odnosu na IL-12 što se može objasniti time da ovaj citokin svoje antitumorsko dejstvo ne ostvaruje samo oslobađanjem IFN- γ (Srivastava i sar., 2010; Nicholas i Lesinski, 2011). Takođe, postoje preporuke da se IL-18 ispituje u kombinaciji sa drugim citokinima (IL-2, IL-15, IL-15) (Du i sar., 2012; Ni i sar., 2013), Fc fragmentom IgG antitela (Srivastava i sar., 2013), hemioterapijom, kao adjuvans u vakcinama ili kao genska terapija i da bi na taj način mogao uspešnije da unapredi Th1 imunski odgovor i pojača citotoksičnost NK ćelija (Vacchelli i sar., 2012).

Primena citokina kao terapije u bolesnika sa melanomom jako je složena. Razlozi su mnogobrojni, a pre svega leže u sistemskoj toksičnosti citokina, ali i u nedovoljnom poznavanju ciljnih molekula koje citokini aktiviraju, imunosupresivnoj prirodi melanoma kao i genotipskim i fenotipskim karakteristikama pacijenta. Iz tih razloga je neophodno da bi se unapredio terapijski značaj citokina da se obrati više pažnje na izbor pacijenata, umanje imunosupresivne karakteristike ćelija melanoma i da se citokini što direktnije aplikuju na mesto tumora (Nicholas i Lesinski, 2011).

2. CILJEVI RADA

Iako NK ćelije periferne krvi imaju značajnu ulogu u borbi protiv melanoma, usled imunosupresije u odmaklom stadijumu tumora njihova aktivnost je u velikoj meri izmenjena. U skladu sa tim, bilo bi od velikog značaja da se ispituju funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija periferne krvi i njihovih subpopulacija u bolesnika obolelih od metastatskog melanoma (MM) u odnosu na zdrave kontrole (ZK).

Takođe, kako brojni citokini ostvaruju stimulatorno dejstvo na NK ćelije i samim tim su ili odobrena terapija u lečenju bolesnika sa melanomom ili se ispituju kroz mnoge pretkliničke ili kliničke studije bilo bi od interesa da se analiziraju efekti različitih citokina na funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija periferne krvi i njihovih subpopulacija u MM bolesnika i ZK osoba u cilju proučavanja mehanizama dejstva ovih citokina na različite karakteristike NK ćelija i eventualnog unapređenja anti-tumorskog imunskog odgovora posredovanog ovim ćelijama.

Ciljevi ovog istraživanja su da se u uslovima *in vitro* ispita:

1. Citotoksična funkcija NK ćelija pre i nakon tretmana mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNĆPK) MM bolesnika i ZK osoba IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacijom IL-12 i IL-18 putem određivanja ekspresije degranulacionog markera CD107a i citotoksičnosti prema eritroleukemijskoj K562 ćelijskoj liniji.
2. Uticaj stimulacije MNĆPK MM bolesnika i ZK osoba pomenutim citokinima ili forbolmiristat acetatom i jonomicinom na zastupljenost CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} NK ćelijske subpopulacije, membransku ekspresiju NKG2D, CD158a, CD158b receptora i sadržaj IFN- γ u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama.
3. Povezanost ekspresije NKG2D, CD158a, CD158b receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama sa citotoksičnom funkcijom netretiranih i pomenutim citokinima tretiranih NK ćelija MM bolesnika i ZK osoba.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Bolesnici i zdrave kontrolne osobe

U ovom istraživanju analizirani su uzorci periferne venske krvi 40 MM bolesnika (IV klinički stadijum prema 7. modifikovanom sistemu klasifikacije američkog udruženja za kancer (*engl.* american joint committee on cancer, AJCC)) (Balch i sar., 2009) i 30 ZK osoba bez prisustva infekcije ili bilo koje druge bolesti usaglašenih prema polu i godinama sa bolesnicima. Krv je bolesnicima uzimana neposredno posle postavljanja dijagnoze, a pre primene hemio ili bilo koje druge adjuvantne terapije. Svaki pacijent kao i svaka zdrava kontrolna osoba uključeni u istraživanje bili su obavešteni o njegovom toku i značaju putem detaljno napisanog Obaveštenja za ispitanike i dali su svoj pristanak da u njemu učestvuju u vidu potpisivanja Formulara za pristanak, tako da je ovo istraživanje odobreno od strane kako Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, tako i Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Opis ZK i kliničko-patološke karakteristike MM bolesnika dati su u tabeli 1. Performans status je određivan na osnovu ECOG skale sa nivoima od 0 do 4 gde 0 predstavlja potpuno aktivne bolesnike, 1 bolesnike sa ograničenim fizičkim aktivnostima, 2 bolesnike koji nisu sposobni da iznesu bilo koju fizičku aktivnost, nivo 3 su oni bolesnici koji su vezani za postelju preko 50% vremena provedenog u budnom stanju, dok nivo 4 čine potpuno nepokretni bolesnici (Khan i sar., 2012). U cilju analize ekspresije različitih parametara vezanih za efektorske funkcije NK ćelija, MM bolesnici su podeljeni u 2 grupe na osnovu lokalizacije udaljenih metastaza prema AJCC sistemu klasifikacije. Tako da su pacijenti sa metastazama u udaljenoj koži, potkožnom tkivu i udaljenim limfnim čvorovima, a sa normalnim vrednostima serumske laktat dehidrogenaze (LDH) koji pripadaju kategoriji M1a, i pacijenti sa metastazama u plućima (kategorija M1b) svrstani u grupu M1a+b, dok bolesnici koji imaju metastaze u ostalim vitalnim organima sa normalnim vrednostima serumskog LDH ili oni pacijenti sa udaljenim metastazama na bilo kojoj lokalizaciji, a sa povišenim vrednostima LDH čine M1c grupu.

Tabela 1. Opis zdravih kontrolnih (ZK) osoba i kliničko-patološke karakteristike bolesnika sa metastatskim melanomom (MM)

	ZK	MM
Godine		
Opseg	38-65	39-71
Medijana	52	56
Pol		
Muški	14	18
Ženski	16	22
Performans status:		
0		20
1		15
2		3
3		2
4		0
Primarna lokalizacija tumora		
Glava i vrat		8
Trup		8
Gornji ekstremiteti		10
Donji ekstremiteti		12
Nepoznata lokalizacija		2
Klasifikacija udaljenih metastaza		
M1a		16
M1b		5
M1c		19

3.2. Laboratorijske metode

3.2.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi (MNĆPK) ZK i MM bolesnika su izolovane iz heparinizovane pune krvi posle 40 min centrifugiranja na 527 x g u gustinskom gradijentu

Histopaque ili Lymphoprep (Nypacon, Norveška) i zatim su nakon tri ispiranja centrifugiranjem na 666 x g u trajanju od 10 min u medijumu za ćelijsku kulturu napravljenom od hranljive podloge RPMI 1640 (Gibco, Vel. Britanija) sa 10% fetalnim telećim serumom (Gibco) (Medijum), resuspendovane u tom medijumu i izbrojane. Ovako izolovane MNČPK su odmah korišćene za funkcionalne, imunofenotipske i molekularne analize.

3.2.2. *In vitro* tretmani mononuklearnih ćelija periferne krvi

5×10^6 /ml MNČPK su inkubirane 18h na 37°C u 2 ml medijuma u pločama sa 6 bunarčića sa sledećim citokinima: IL-2 (200 IU/ml) (Sigma, Nemačka), IL-12 (10 ng/ml) (Sigma), IL-18 (100ng/ml) (R & D, SAD) i kombinacijom IL-12 i IL-18. Kao kontrola uvek su se koristile mononuklearne ćelije inkubirane samo u medijumu.

3.2.3. Određivanje citoksične aktivnosti NK ćelija

Kod nativnih ili *in vitro* svim ispitivanim citokinima tretiranih MNČPK ZK i MM bolesnika određivana je citotoksična aktivnost NK ćelija standardnim ^{51}Cr testom (Brown i sar., 1985). Za potrebe ovog testa, K562 ćelije, ćelije eritromijeloidne leukemije koje su inače trajna ćelijska linija osetljiva na lizu NK ćelijama, su prethodno obeležene ^{51}Cr ($\text{Na}_2\text{Cr}_6\text{O}_4$, Amersham, Vel. Britanija) specifičnog aktiviteta $A_s=3.7$ MBq. Ovom metodom se na posredan način, merenjem oslobođenog γ zračenja nastalog otpuštanjem radioaktivnog ^{51}Cr u toku lize obleženih K562 ćelija od strane NK ćelija, određuje citotoksična aktivnost NK ćelija. Naime, ovim testom se određuje procenat lize K562 ćelija NK ćelijama u odnosu na količinu radioaktivnog ^{51}Cr koji se oslobađa tretiranjem K562 ćelija detredžentom (Triton X 100) koji razgrađuje njihovu ćelijsku membranu. U ovom testu K562 ćelije koncentracije 0.05×10^6 ćelija/ml medijuma su kultivisane sa ispitivanim MNČPK. Napravljeno je osnovno razblaženje MNČPK-efektorskih ćelija (E) koncentracije 4×10^6 ćelija/ml medijuma koje je dva puta sukcesivno razblaženo u odnosu 1:1 da bi se ostvarila tri odnosa efektorskih prema ciljnim K562 ćelijama (T) (E:T): 80:1, 40:1 i 20:1.

Naime, u mikropločama, po 100 μ l suspenzije MNČPK je pomešano sa po 100 μ l obeleženih K562 ćelija. Za svako razblaženje test je postavljen u triplikatu. Nakon 4h inkubacije na 37°C u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksidom, mikroploče su kratko centrifugirane. Nakon centrifugiranja 100 μ l supernatanta uzeto je iz svakog uzorka i aktivnost radioaktivnog ⁵¹Cr otpuštenog iz liziranih K562 tumorskih ćelija, merena je kao broj otkucaja u minuti (cpm) na γ -brojaču (Berthold, Nemačka). Procenat specifične citotoksične aktivnosti NK ćelija izračunat je prema formuli:

$$\frac{\text{cpm (eksperimentalno otpuštanje)} - \text{cpm (spontanootpuštanje)}}{\text{cpm (maksimalno otpuštanje)} - \text{cpm (spontanootpuštanje)}} \times 100$$

gde je spontano otpuštanje dobijeno inkubacijom ciljnih K562 tumorskih ćelija u medijumu, a maksimalno otpuštanje je dobijeno tretiranjem K562 ćelija 5% rastvorom Triton-a X 100.

3.2.4. Protočna citometrija

Zastupljenost CD3⁺CD56⁺ NK ćelija i njihovih subpopulacija, kao i ekspresija različitih receptora na njihovoj površini u populaciji limfocita periferne krvi (LPK) kako u sveže izolovanim, tako i u citokinima tretiranim MNČPK ZK i MM bolesnika određivana je metodom protočne citometrije korišćenjem monoklonskih antitela obeleženih fluorescentnim bojama. Uzorci za analizu su pripremani po metodi Jacson-a i saradnika (Jackson i Warner, 1986). Naime, 100 μ L suspenzije sveže izolovanih ili citokinima tretiranih MNČPK (koncentracija 5 x 10⁶ ćelija/ml) je inkubirano 30 minuta na 4°C sa 10 μ l odgovarajuće kombinacije monoklonskih antitela i nakon toga ćelije su ispirane dva puta centrifugiranjem na 527 x g u hladnom rastvoru fosfatnog pufera (CellWASH, Becton Dickinson, San Jose, SAD) i za analizu na protočnom citometru FACSCalibur (Becton Dickinson) resuspendovane u 1% paraformaldehidu (CellFIX, Becton Dickinson). Tako pripremljen uzorak analiziran je u CellQuest programu koji je 50 000 LPK u suspenziji mononuklearnih ćelija detektovao prema njihovoj veličini i granularnosti. Stepem nespecifične imunofluorescencije određivan je korišćenjem izotipski identičnih, irelevantnih, kontrolnih monoklonskih antitela, obeleženih fluorescein-izotiocijanatom (FITC), fikoeritrinom (PE) ili peridinin-hlorofil-protein kompleksom (PerCP) i oduziman je

od fluorescencije uzorka. Dalje je unutar populacije LPK definisana i analizirana populacija NK ćelija na osnovu CD3 i CD56 receptora kao CD3⁻CD56⁺ ćelije. Dve fenotipski i funkcionalno različite subpopulacije NK ćelija, CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+}, definisane su i analizirane na osnovu srednje gustine ekspresije (*engl.* mean fluorescence intensity, MFI) CD56 receptora. Tako se CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacija odlikuje nižom gustinom CD56 receptora u odnosu na CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciju. Ekspresija svih ispitivanih receptora (CD56, NKG2D aktivacionog receptora, CD158a i CD158b inhibitornih KIR receptora, IL-12Rβ1 i IL-12Rβ2) na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama takođe je izražena kao MFI ovih receptora. U radu su korišćene sledeće kombinacije monoklonskih antitela obeleženih fluorescentnim bojama:

- CD56PE/CD3PerCP,
- CD56FITC/CD158bPE/CD3PerC,
- CD56FITC/IL-12Rβ1PE/CD3PerCP,
- CD56FITC/IL-12R2βPE/CD3PerC,
- CD56PE/CD158aFITC/CD3PerCP,
- CD56FITC/NKG2DPE/CD3PerCP (Becton Dincinson i R&D za NKG2D antitelo).

Procenat CD3⁻CD56⁺ NK ćelija i njihovih CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija je određivan unutar LPK, dok su apsolutni brojevi NK ćelija i njihovih subpopulacija unutar LPK izračunati množenjem apsolutnog broja limfocita svake ispitivane osobe sa procentom analiziranih ćelija u LPK dobijenim prethodnom analizom na protočnom citometru. Apsolutni broj limfocita svake ZK i MM bolesnika određivan je u Laboratoriji za hematologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

3.2.4.1. Određivanje ekspresije CD107a molekula na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama

100 μl suspenzije sveže izolovanih, netretiranih ili medijumom, IL-2 (200 IU/ml), IL-12 (10 mg/ml), IL-18 (100 ng/ml) i kombinacijom IL-12 i IL-18 18h *in vitro* tretiranih MNĆPK (koncentracija 3x10⁶/ml) ZK i MM bolesnika inkubirano je 4h na 37°C sa 100 μl suspenzije K562 tumorskih ćelija (koncentracija 1x10⁶/ml). Monensin (Sigma) u

koncentraciji od 2 $\mu\text{l/ml}$ dodat je posle 1h inkubacije da bi se sprečio transport sintetisanih proteina iz ćelija u spoljašnju sredinu. Posle isteka četvorosatne inkubacije ćelije su jednom isprane u medijumu centrifugiranjem na 527 x g u trajanju od 5 min i posle toga bojene sa 10 μl monoklonskih antitela obeleženih fluorescentnim bojama i to CD56FITC, CD3PerCP i CD107aPE (Becton Dickinson). Posle toga ćelije su ispirane dva puta centrifugiranjem na 527 x g u hladnom rastvoru fosfatnog pufera (CellWASH) i za analizu na protočnom citometru FACSCalibur (Becton Dickinson) resuspendovane u 1% paraformaldehidu (CellFIX). U populaciji limfocita određivan je MFI CD107a molekula na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama i njihovim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama. Takođe u odsustvu K562 ćelija određivana je ekspresija CD107a molekula na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama.

3.2.4.2. Analiza ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama posle kontakta sa tumorskim ćelijskim linijama

100 μl suspenzije sveže izolovanih MNČPK (koncentracija $3 \times 10^6/\text{ml}$) ZK i MM bolesnika inkubirano je 4h na 37°C sa 100 μl suspenzije K562 tumorskih ćelija (koncentracija $2 \times 10^6/\text{ml}$) i 100 μl suspenzije FemX, tumorske ćelijske linije humanog melanoma (koncentracija $2 \times 10^6/\text{ml}$). Posle inkubacije ćelije su jednom isprane u medijumu centrifugiranjem na 527 x g u trajanju od 5 min, a zatim bojene sa 10 μl monoklonskih antitela obeleženih fluorescentnim bojama, CD3PerCP, CD56FITC i NKG2DPE. U populaciji limfocita određivan je MFI NKG2D receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama i njihovim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama.

3.2.4.3. Određivanje intraćelijskog perforina, STAT-1 i IFN- γ u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama

Za određivanje prisustva sintetisanog IFN- γ u CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama i njihovim subpopulacijama metodom protočne citometrije pripremljen je uzorak od $1 \times 10^6/\text{ml}$ MNČPK ZK i MM bolesnika, netretiranih ili 18h *in vitro* tretiranih medijumom i

kombinacijom IL-12 (10 ng/ml) i IL-18 (100 ng/ml). Intraćelijski perforin određivan je iz citokinima netretiranih i medijumom, IL-2 (200 IU/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml) i kombinacijom IL-12 i IL-18 18h tretiranih MNČPK (koncentracija 1×10^6 /ml), dok je intraćelijski STAT-1 određivan iz citokinima netretiranih MNČPK (koncentracija 1×10^6 /ml). Za analizu intraćelijskog IFN- γ i STAT-1 u citokinima netretiranim NK ćelijama, MNČPK su tretirane 4h na temperaturi od 37°C sa forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) (50 ng/ml) (Sigma) i jonomicinom (500 ng/ml) (Sigma) koji nespecifično stimulišu sintezu IFN- γ i STAT-1. Nakon 1h inkubacije sa PMA i jonomicinom dodato je 10 μ g/ml brefeldina A (Sigma) da bi se sprečio transport sintetisanih proteina iz ćelija u spoljašnju sredinu. Takođe, postupak je ponovljen sa MNČPK koje nisu stimulisane sa PMA i jonomicinom, a jedino su tretirane brefeldinom da bi se izmerio nivo rezidualne sinteze IFN- γ i STAT-1 iz citokinima *in vitro* netretiranih MNČPK koja potiče iz *in vivo* aktivacije. Za analizu IFN- γ iz citokinima tretiranih MNČPK korišćen je samo brefeldin bez nespecifične stimulacije, a za analizu unutarćelijskog perforina nije korišćena ni nespecifična stimulacija ni brefeldin. Spoljašnji antigeni koji određuju imunofenotip NK ćelija obeleženi su sa po 10 μ l monoklonskih antitela, CD56FITC (za analizu perforina i STAT-1), CD56PE (za analizu IFN- γ) i CD3PerCP (Becton Dickinson) i inkubirani 30 minuta na 4°C. Nakon toga uzorci su po dva puta ispirani centrifugiranjem na 527 x g u hladnom rastvoru fosfatnog pufera (CellWASH). Nakon bojenja spoljašnjih antigena, talog MNČPK je izlagan dejstvu komercijalnog BD FACS rastvora 2 za permeabilizaciju (Becton Dickinson) i nakon toga za obeležavanje unutarćelijskih molekula uzorcima je dodato po 10 μ l monoklonskih antitela, anti-IFN- γ FITC, anti-perforinPE, anti-STAT-1PE (Becton Dickinson). Nakon dva ispiranja u hladnom rastvoru fosfatnog pufera za analizu na protočnom citometru uzorci su rastvoreni u 1% paraformaldehidu (CellFIX). U populaciji limfocita određivana je ekspresija (MFI) IFN- γ , STAT-1 i perforina u CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama kao i njihovim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama.

3.2.5. Određivanje produkcije IFN- γ ELISA metodom

1×10^6 /ml MNČPK ZK i MM bolesnika tretirane su 48h medijumom i kombinacijom IL-12 (10 ng/ml) i IL-18 (100 ng/ml) za određivanje produkcije IFN- γ iz

supernatanta tretiranih MNČPK. Supernatanti su se sakupljali i čuvali na -70°C do analize ELISA metodom korišćenjem odgovarajućeg ELISA kita (eBioscience Inc., San Diego, SAD), prema uputstvu proizvođača. Ukratko, ploče sa 96 rupica bile su obložene sa 0.1 mL/rupici vezujućeg antitela i inkubirane preko noći na 4°C . Posle isteka inkubacije 0.2 mL/rupici rastvora za razblaživanje dodato je da blokira nespecifično vezivanje u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi. Posle toga, 0.1 mL uzorka i standarda su dodati u odgovarajuće rupice na ploči, a serija dvostrukih razblaženja standarda korišćena je za pravljenje standardne krive. Zatim su ploče prekrivene i inkubirane 2h na sobnoj temperaturi. Posle toga su ploče isprane i dodato je antitelo za detekciju u koncentraciji od 0.1 mL/rupici i ploče su ponovo ostavljene da se inkubiraju 1h na sobnoj temperaturi. Posle toga je u svaku rupicu dodata Avidin-peroksidaza u koncentraciji 0.1 mL/rupici i ploče su onda inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je u svaku rupicu dodat rastvor substrata, ploče su inkubirane 15 min i reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora za prekidanje reakcije. Na kraju, koncentracija IFN- γ je preračunata pomoću kolorimetrijskog optičkog dozimetra (model 2550EIA Reader (Bio-Rad, Richmond, SAD)), koji je očitavao apsorbancu na 450 nm. Osetljivost ovog eseja je 4 pg/mL, a opseg standardne krive je od 4 do 500 pg/mL. ELISA je urađena u duplikatu i vrednosti su izračunate kao srednja vrednost 2 vrednosti za svaki uzorak. Vrednost IFN- γ je izražena u pg/mL.

3.2.6. Reverzna transkripcija (RT-PCR)

3.2.6.1. Izolacija RNK

RNK je izolovana iz 5×10^6 MNČPK ZK i MM bolesnika nakon 4h (analiza nivoa gena za IRF-1) ili 18h (analiza nivoa gena za DAP10 i SHP-1) tretmana u 2 ml medijuma u pločama sa 6 bunarčića i to u samom medijumu, medijumu sa IL-2 (200 IU/ml), medijumu sa IL-12 (10 ng/ml), medijumu sa IL-18 (100ng/ml) i medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18, korišćenjem monofaznog rastvora fenola i guanidinizotiocijanata (Trizol) (Sigma, SAD). Nakon tretmana odgovarajućim citokinima, suspenzija MNČPK prebačena je u plastičnu Ependorf epruvetu, centrifugirana 10 min na $823 \times g$ i odliven je supernatant. Na

preostale MNC koje su se vezale za plastičnu podlogu bunarčića sipano je po 1ml Trizol-a i nakon 10 min na sobnoj temperaturi sadržaj je prebačen u plastičnu epruvetu u kojoj su već prethodno istaložene ćelije. Zatim je dodato po 200 µl hloroforma (odnos hloroform:trizol 1:5), dobro je promućkan sadržaj ependorf epruveta na vorteksu i posle 20 minuta inkubacije na 4°C sadržaj je centrifugiran 15 min na 15620 x g na temperaturi od 2 do 8°C. Izdvojena je gornja bezbojna faza RNK, dodata je ista zapremina izopropanola i sadržaj je blago promućkan i ostavljen 30 min na sobnoj temperaturi. Posle 15 min centrifugiranja na 15620 x g odliven je supernatant i dodan je 1ml 75% etanola i nakon toga je vršeno ponovo centrifugiranje 15 min na 15620 x g. Posle odlivanja supernatanta dodan je 1ml etanola i vršeno je centrifugiranje sadržaja 5 min na 15620 x g. Supernatant je ponovo odliven i dobijeni talog RNK čuvan je u zamrzivaču na -20°C do očitavanja koncentracije na spektrofotometru. Talog RNK je za merenje rastvaran u 20 µl demineralizovane vode, a koncentracija je očitavana na spektrofotometru (Eppendorf BioPhotometer) na 260/280nm.

3.2.6.2. Prevođenje RNK u komplementarnu DNK

Za prevođenje RNK u komplementarnu DNK dobijena RNK je izmerena i preračunata na koncentraciju od 1µg/1µl. Na odgovarajući broj µl koji sadrži 1 µg RNK po uzorku dodan je 1 µl random heksamera (Fermentas, Kanada) i dodata je voda do zapremine od 11 µl, pa je uzorak inkubiran u PCR aparatu 5 min na 70°C, a zatim ohlađen na ledu 5 min. Dalje je po uzorku dodato 4 µl 5 x pufera za MuLV reverznu transkriptazu (Fermentas) (krajnja koncentracija 1x), 2 µl 10mM dNTP smeše (Fermentas) (krajnja koncentracija 1mM), 1 µl inhibitora ribonukleaze (Fermentas) (20 IU) i dodata je voda do zapremine od 19 µl. Zatim su uzorci inkubirani 5 minuta na 25°C, da bi posle bio dodan 1µl MuLV (Fermentas) (1IU). Prevođenje RNK u cDNK vršeno je sukcesivno pod sledećim uslovima: 10 minuta na 25°C, 60 minuta na 42°C i 10 minuta na 70°C i uzorci su nakon toga ohlađeni na ledu.

3.2.6.3. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)

PCR reakcija se odvijala u 20 μ l ukupne reakcione zapremine. Za umnožavanje ciljne sekvence IRF-1 čija je dužina 414 bp korišćene su sledeće sekvence prajmera: uzvodna 5'-GAC CAG AGC AGG AAC AAG-3' i nizvodna 5'-TAA CTT CCC TTC CTC ATC C-3', ciljne sekvence prajmera za DAP10 (dužina 350 bp) su uzvodna 5'-CAG ACC CCA GTC CAC CAT G-3' i nizvodna 5'-GTG CCA CCA CAC ACC ATC-3' i ciljne sekvence prajmera za SHP-1 (dužina 440 bp) su uzvodna 5'-GTG ACC CAT ATT CGG ATC CAG-3' i nizvodna 5'-CTT GAA ATG CTC CAC CAG GTC-3'. Radi kvantifikacije nivoa transkripcije svih analiziranih gena umnožena je ciljna sekvenca β -aktina (dužina 685 bp) korišćenjem sledeće sekvence prajmera: 5'-TGG GTC AGA AGG ATT CCT AT-3' i 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT-3'.

Za analizu nivoa gena za IRF-1 na 1 μ l cDNA po uzorku dodato je 5.7 μ l vode, 2 μ l 5xPCR pufera (Fermentas), 1.2 μ l MgCl₂ (Fermentas), 2 μ l 2mM smese dNTP (Fermentas), 2 μ l 5' i 3' prajmera za β aktin (Applied Biosystems, SAD) (krajnja koncentracija 0.8 mM), 2 μ l 5' i 3' prajmera za IRF-1 (Applied Biosystems) (krajnja koncentracija 1.2 mM) i 0.1 μ l (2 IU) Taq polimeraze (Fermentas). cDNA je dalje umnožena pod sledećim uslovima: denaturacija 5 min na 95°C, hibridizacija prajmera sa matricom (*engl.* annealing) 30 s na 56°C, ekstenzija 45 s na 72°C i završna ekstenzija 7 min na 72°C. Za ekspresiju IRF-1 i β aktina nađen je optimalan broj od 25 ciklusa.

Za analizu nivoa gena za DAP10 i SHP-1 na 1 μ l cDNA po uzorku dodato je 1.7 μ l vode, 2 μ l 5xPCR pufera (Fermentas), 1.2 μ l MgCl₂ (Fermentas), 2 μ l 2mM smese dNTP (Fermentas), 2 μ l 5' i 3' prajmera za β aktin (Applied Biosystems) (krajnja koncentracija 0.8 mM), 2 μ l 5' i 3' prajmera za DAP10 (Invitrogen, SAD) (krajnja koncentracija 1.2 mM), 2 μ l 5' i 3' prajmera za SHP-1 (Invitrogen) (krajnja koncentracija 1.2 mM) i 0.1 μ l (2 IU) Taq polimeraze (Fermentas). cDNA je umnožena pod sledećim uslovima: denaturacija 5 min na 95°C, hibridizacija prajmera sa matricom 30 s na 55°C, ekstenzija 30 s na 72°C i završna ekstenzija 7 min na 72°C. Za ekspresiju DAP10 i SHP-1 optimalno je 40 ciklusa.

PCR produkti su provereni elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu. Intenzitet traka je izmeren denzitometrom i semi-kvantifikovan korišćenjem Scion Image programa.

Intenzitet traka dobijen umnožavanjem IRF-1, DAP10 i SHP-1 svakog uzorka izražen je u odnosu na intenzitet odgovarajuće trake dobijene umnožavanjem β aktina.

3.2.7. Western blot

3.2.7.1. Izolacija proteina

Proteini su izolovani iz 5×10^6 MNČPK ZK i MM bolesnika nakon 4h tretmana u 2 ml medijuma u pločama sa 6 bunarčića i to u samom medijumu i medijumu sa kombinacijom IL-12 (10 ng/ml) i IL-18 (100ng/ml) korišćenjem monofaznog rastvora fenola i guanidinizotiocianata (Trizol) (Sigma). Nakon tretmana odgovarajućim citokinima, suspenzija MNČPK prebačena je u plastičnu Ependorf epruvetu i centrifugirana 10 min na 823 x g i odliven je supernatant. Na preostale MNČ koje su se vezale za plastičnu podlogu posude za gajenje ćelija sipano je po 1ml Trizol-a i nakon 10 min na sobnoj temperaturi sadržaj je prebačen u plastičnu epruvetu u kojoj su već prethodno istaložene ćelije. Zatim je dodato po 200 μ l hloroforma (odnos hloroform:trizol 1:5), dobro je promućkan sadržaj ependorf epruveta na vorteksu i posle 20 minuta inkubacije na 4°C sadržaj je centrifugiran 15 min na 15620 x g na temperaturi od 2 do 8°C. Izdvojena je srednja bela faza sa proteinima i dodato je 1.5 ml izopropanola. Sadržaj je promućkan i ostavljen 10 min na sobnoj temperaturi. Posle 10 min centrifugiranja na 12000 x g supernatant je odliven, dodato je 2 ml 95% etanola i sadržaj je ostavljen da stoji 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je vršeno centrifugiranje 5 min na 7500 x g. Supernatant je odliven, ponovo je dodato 2 ml 95% etanola i sadržaj je ponovo ostavljen 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je ponovo vršeno centrifugiranje 5 min na 7500 x g. Ovaj poslednji korak je još jednom ponovljen. Posle odlivanja supernatanta na talog proteina je dodato 2 ml 100% etanola, sadržaj je promućkan i ostavljen da stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi. Posle toga je usledilo centrifugiranje 5 min na 7500 x g. Supernatant je odliven i tako dobijen talog proteina je osušen i rastvoren u 1% SDS-u (natrijum dodecil sulfat). Da bi se odstranili nerastvoreni ostaci sadržaj je centrifugiran 10 min na 10000 x g, a supernatant sa rastvorenim proteinima je prebačen u novu plastičnu epruvetu i čuvan na -20°C do merenja njegove koncentracije.

3.2.7.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju

Određivanje proteina Lowry metodom se zasniva na reaktivnosti Cu^{2+} jona sa peptidnim vezama u baznoj sredini i sledstvenom redukcijom folina. Ova reakcija se manifestuje pojavom plave boje usled oksidacije aromatičnih aminokiselinskih ostataka u proteinu u reakciji koju katalizuje Cu^{2+} .

U ovom radu proteini izolovani iz MNCPK ZK i MM bolesnika razblaženi su 10 puta u destilovanoj vodi. Reagensi za određivanje koncentracije proteina A (2% Na_2CO_3 , 0.02% NaK tartarat rastvoren u 0.1 N NaOH, 2 g Na_2CO_3 , 0,02685 NaK tartarat x $4\text{H}_2\text{O}$ rastvoren u 100 ml 0,1N NaOH) i B (0.5% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) sjedinjeni su u odnosu 50:1 (20 ml A : 0,4 ml B). 0.8 ml tako dobijenog rastvora AB je dodavano na 0.2 ml vodenog rastvora proteina i inkubirano na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon toga dodavano je 0.1 ml 1 N rastvora folana i inkubirano na sobnoj temperaturi sat vremena. Apsorbanca je merena na 660 nm talasne dužine, a koncentracije rastvorenih proteina su očitane sa standardne linearne prave. Korišćena standardna prava konstruisana je tako što su na apcisu nanošene poznate koncentracije proteina goveđeg serum albumina (BSA), a na ordinatu izmerene apsorbance. Prava je povučena kroz osam tačaka koje predstavljaju apsorbance rastvora BSA u rasponu koncentracija od 0.25×10^{-4} g/ml do 2.5×10^{-4} g/ml.

3.2.7.3. Elektroforeza proteina

Uzorci proteina su pomešani sa puferom za nanošenje uzorka (0.125 M Tris pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-merkaptoetanol, 0.005% brom fenol plavo) u zapreminskom odnosu uzorak : pufer 1:1 i nakon toga denaturisani kuvanjem 5 min na 100°C , a zatim ohlađeni na ledu. Proteini su razdvajani SDS denaturišućom elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu. Nakon polimerizacije 8% gela za razdvajanje (2.6 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 2.6 ml 30 % bis-akrilamid (30%/0.8%), 0.1 ml 10% SDS, 100 μl 10% amonijum persulfata (AP), 10 μl TEMED, 4.6 ml destilovane vode) naliven je 5% gel za koncentrisanje (1.25 ml 0.5 M Tris pH 6.8, 0.833 ml 30% bis-akrilamid (30%/0.8%), 50 μl 10% SDS, 50 μl 10% amonijum persulfata (AP), 5 μl TEMED, 787 μl destilovane vode) nakon čije polimerizacije je u bunarčice naneto po 25 μg proteina po uzorku. Elektroforeza

proteina je vršena na 100 V u puferu za elektroforezu pH 8.3 (Tris baza 25 mM, glicin 200 mM i 0.10% SDS) koji je razblažen 10 puta u destilovanoj vodi.

3.2.7.4. Elektrotransfer proteina na membranu

Nakon elektroforeze odsečen je gel za koncentrisanje, a gel sa razdvojenim proteinima i nitrocelulozna (NC) membrana čija površina odgovara dimenzijama gela su potopljani u pufer za transfer pH 8.3 (25 mM Tris baza, glicin 200 mM) sa 20% metanola koji je 10 puta razblažen u destilovanoj vodi. Da bi se obavio elektrotransfer proteina, NC membrana i gel su orijentisani tako da je gel smešten do negativne elektrode u sistemu za elektrotransfer, a NC membrana do pozitivne. Transfer je vršen 1h u ohlađenom puferu za transfer pri naponu od 100 V uz hlađenje. Da bi se proteini čvrsto vezali za NC membranu, membrana je uranjana u rastvor za fiksaciju koji sadrži 45% metanola i 7% glacijalne sirćetne kiseline i nakon 15 min inkubacije ispirana je destilovanom vodom. Da bi se proverila uspešnost transfera proteina sa poliakriamidnog gela na NC membranu, vršeno je reverzibilno bojenje 0.1% komercijalnom Ponceau S bojom (Sigma, Nemačka) sa 5% glacijalne sirćetne kiseline, 2 do 3 minuta na sobnoj temeperaturi na mešalici. Na taj način sve trake proteina su nespecifično obojene u crveno i nakon bojenja NC membrane su ispirane destilovanom vodom.

3.2.7.5. Imunodetekcija proteina

Da bi se sprečila pojava nespecifičnog vezivanja antitela za proteine, NC membrane su potopljene u rastvor 5% obranog mleka u prahu (Sigma) u TBS puferu (20 mM Tris, 150 mM NaCl) pH 7.6 razblaženom 10 puta u koji je dodat deterdžent Tween-20 u krajnjoj koncentraciji 0.1% (TBST) i inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi uz mešanje. Blokiranjem se postiže da protein kazein iz mleka sprečava nespecifično vezivanje antitela za protein.

Inkubacija NC membrane sa primarnim antitelom (mišje anti-STAT4 (Becton Dickinson) specifično za fosforilisanu formu STAT-4 molekula (PY694) razblaženo 1:1000) je vršena preko noći u hladnoj sobi na mešalici. Monoklonsko antitelo je rastvoreno u 1 x TBST-u u zapremini rastvarača od 150 μ l po cm^2 površine NC membrane.

Nakon toga membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u na sobnoj temperaturi, na mešalici.

Zatim je korišćeno anti-mišje IgG sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (Sigma) rastvoreno u TBST-u i razblaženo 1:5000.

Detekcija traka sa ispitivanim proteinima putem hemiluminiscencije zasniva se na emitovanju svetlosnog signala koji nastaje usled reakcije enzima peroksidaze vezane za sekundarno antitelo i supstrata (vodonik preksid i luminol). Ukratko, nakon ispiranja viška sekundarnog antitela TBST-om i odlivanja viška tečnosti, na NC membranu je nanošena tečnost za detekciju. Korišćen je reagens za hemiluminiscenciju SuperSignal West PICO (TMO Pierce Protein, SAD) koji sadrži supstrat za enzim peroksidazu i luminol. Nakon 60 s inkubacije u mraku, odliven je višak reagensa i NC membrana je uvijena u providnu celofansku foliju i nakon toga prekrivena rentgen filmom (Kodak X-Omat Blue). Nakon 1 do 5 min ekspozicije u mraku, film je uronjen u rastvor za razvijanje (razvijač) sve dok nisu uočene trake sa specifičnim proteinima, a nakon toga u rastvor za fiksaciju.

Filmovi koji su dobijeni na prethodno opisan način su skenirani i dobijeni dokument je preveden u tif format. Ova slika je zatim analizirana Image J programom gde je intenzitet-debljina trake obeležene pSTAT-4 antitelom posle tretmana IL-12 i IL-18 određivana u odnosu na debljinu trake u medijumu. Kao unutrašnja kontrola korišćen je β -aktin.

3.3. Statističke analize

Razlike u vrednostima ispitivanih parametara u MM bolesnika u odnosu na ZK ispitivane su Mann Whitney neparametrijskim statističkim testom. Za utvrđivanje značajnosti promena ispitivanih parametara u ZK i MM bolesnika posle 4h i 18h *in vitro* tretmana IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacijom IL-12 i IL-18 u odnosu na kontrolne tretmane u medijumu korišćen je Wilcoxon test sume rangova. Korelacije između podataka su vršene Spearman rangovnom korelacijom. Razlike između upoređivanih grupa su bile statistički značajne odnosno nađena je korelacija ukoliko je izračunata vrednost p bila manja ili jednaka 0,05.

4. REZULTATI

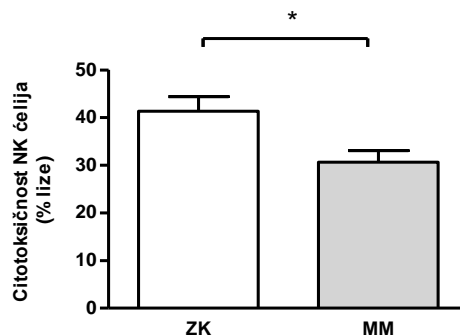
4.1. Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija u bolesnika obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe

U prvom delu ovog poglavlja analizirane su različite karakteristike netretiranih NK ćelija periferne krvi i njihovih subpopulacija MM bolesnika u odnosu na ZK osobe.

4.1.1. Funkcionalne karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija

4.1.1.1. Citotoksična aktivnost i produkcija IFN- γ

Citotoksična aktivnost NK ćelija periferne krvi MM bolesnika ($30.64 \pm 2.45\%$) određivana merenjem stepena liziranosti ciljne tumorske ćelijske linije, K562, standardnim radioaktivnim ^{51}Cr testom je statistički značajno niža ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na ZK ($41.35 \pm 3.08\%$) (Slika 8).

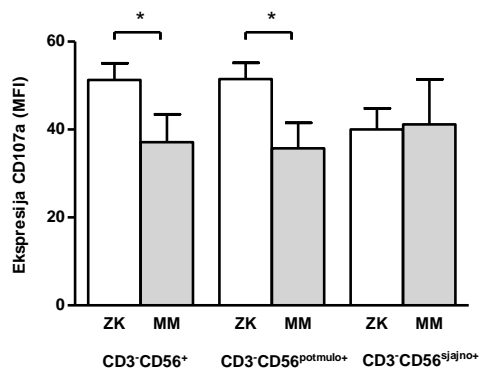


Slika 8. Citotoksična aktivnost NK ćelija periferne krvi MM bolesnika je statistički značajno niža (* $p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na citotoksičnu aktivnost NK ćelija ZK osoba. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 30 ZK i 40 MM bolesnika

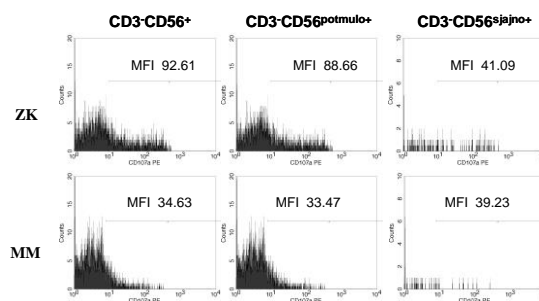
MM bolesnici imaju statistički značajno nižu ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) srednju gustinu ekspresije (MFI) CD107a degranulacionog markera kako na $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$ NK ćelijama (37.14 ± 6.36) tako i na citotoksičnoj $\text{CD3}^-\text{CD56}^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji (35.74 ± 5.77) u odnosu na ekspresiju ovog molekula na NK ćelijama (51.27 ± 3.78) i $\text{CD3}^-\text{CD56}^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji (51.47 ± 3.70) u ZK. Suprotno ovome, ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u ekspresiji CD107a molekula na

imunoregulatornoj $CD3^+CD56^{sajno+}$ subpopulaciji između ZK (40.05 ± 4.77) i MM bolesnika (41.18 ± 10.23) (Slika 9a, b).

a)



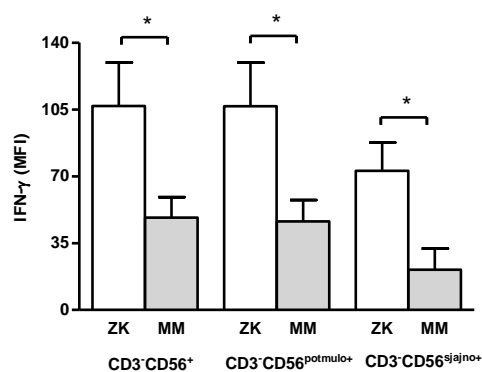
b)



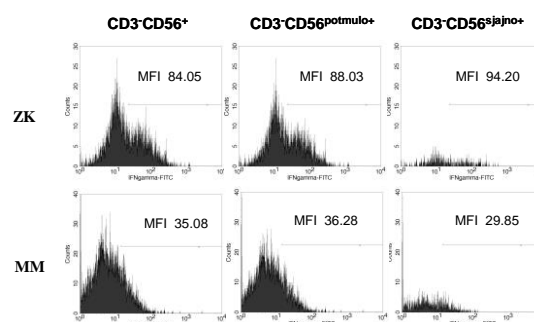
Slika 9. a) MFI CD107a degranulacionog markera na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama i njihovoj $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji u MM bolesnika je statistički značajno niži (* $p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na ZK; b) Reprerzentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška za 15 ZK i 15 MM bolesnika

MFI $IFN-\gamma$ u $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama (48.41 ± 10.64) kao i u obe njihove subpopulacije, $CD3^+CD56^{potmulo+}$ (46.38 ± 11.18) i $CD3^+CD56^{sajno+}$ (21.08 ± 11.10), je statistički značajno niži ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u MM bolesnika u odnosu na MFI $IFN-\gamma$ u $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama (106.80 ± 22.78), $CD3^+CD56^{potmulo+}$ (106.70 ± 22.89) i $CD3^+CD56^{sajno+}$ subpopulaciji (72.82 ± 14.84) u ZK (Slika 10a, b).

a)



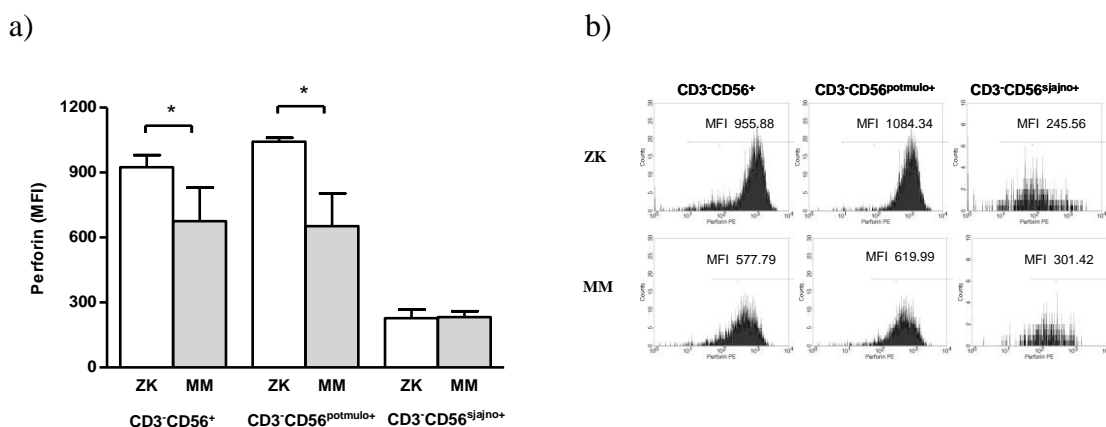
b)



Slika 10. a) MFI $IFN-\gamma$ u $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama i njihove obe subpopulacije u MM bolesnika je statistički značajno niži (* $p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na vrednosti u ZK; b) Reprerzentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška za 15 ZK i 15 MM bolesnika

4.1.1.2. Ekspresija molekula vezanih za regulaciju funkcionalnih aktivnosti NK ćelija

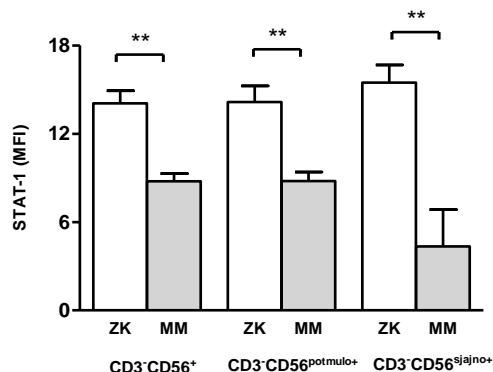
Metodom protočne citometrije analizirana je ekspresija unutarćelijskog perforina u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama i pokazano je da MM bolesnici imaju statistički značajno niži ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) MFI ovog citotoksičnog medijatora u odnosu na ZK kako u $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama (543.10 ± 93.81 vs. 924.80 ± 55.46 , redom) tako i u njihovoj $CD3^+CD56^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji (652.60 ± 151.40 vs. 1042.00 ± 18.49 , redom). Za razliku od ovih rezultata pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u ekspresiji ovog molekula u $CD3^+CD56^{\text{sjajno}+}$ subpopulaciji između ZK i MM bolesnika (227.70 ± 39.99 vs. 232.50 ± 26.61 , redom) (Slika 11a, b).



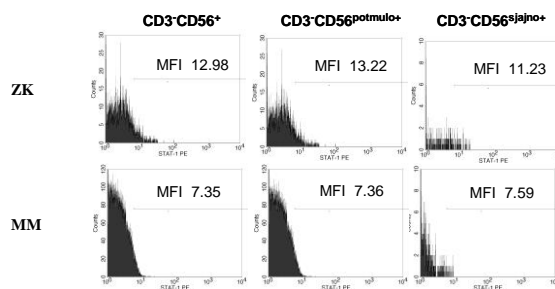
Slika 11. a) MFI perforina u $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama i njihovoj $CD3^+CD56^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji u MM bolesnika je statistički značajno niži (* $p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na vrednosti ovog molekula u ZK osoba; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 7 ZK i 7 MM bolesnika

Takođe, metodom protočne citometrije praćena je ekspresija STAT-1 transkripcionog faktora u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u ZK i MM bolesnika. Pokazano je da MM bolesnici imaju statistički značajno niži ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) MFI ovog molekula u odnosu na ZK kako u $CD3^+CD56^+$ ćelijama (8.76 ± 0.54 vs. 14.06 ± 1.49 , redom) tako i u njihovim subpopulacijama, $CD3^+CD56^{\text{potmulo}+}$ (8.78 ± 0.62 vs. 14.16 ± 1.89 , redom) i $CD3^+CD56^{\text{sjajno}+}$ (4.34 ± 2.51 vs. 15.48 ± 2.07 , redom) (Slika 12a, b).

a)



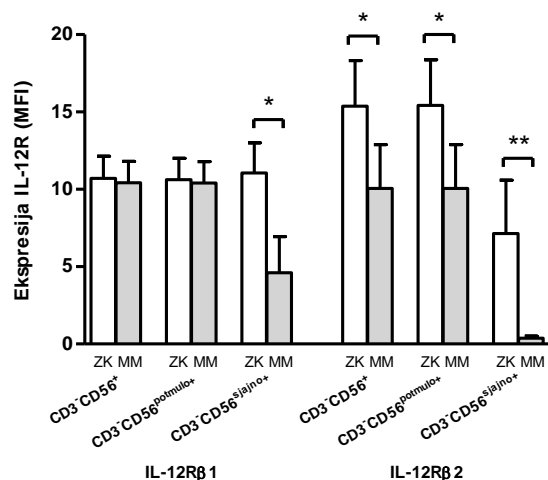
b)



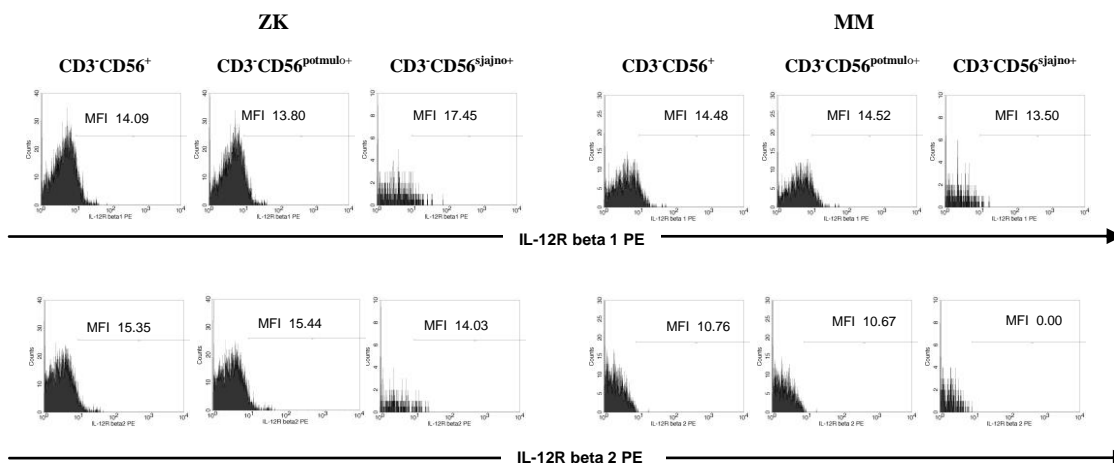
Slika 12. a) MFI STAT-1 transkripcionog faktora u CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama i obe njihove subpopulacije u MM bolesnika je visoko statistički značajno niži (* $p \leq 0.01$, Mann Whitney test) u odnosu na ZK; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna za greška za 7 ZK i 7 MM

Analizirajući ekspresiju obe subjedinice receptora IL-12 pokazano je da MM bolesnici imaju statistički značajno sniženu ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) ekspresiju IL-12R β 1 na CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija u odnosu na ZK (4.61 ± 2.34 vs. 11.06 ± 1.94 , redom). Za razliku od ovih rezultata, pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u ekspresiji ovog molekula između ZK i MM bolesnika kako na celokupnoj populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija (10.71 ± 1.43 vs. 10.43 ± 1.37 , redom) tako i na citotoksičnoj CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji (10.62 ± 1.38 vs. 10.41 ± 1.37 , redom). Takođe, MM bolesnici imaju statistički značajno sniženu ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) ekspresiju IL-12R β 2 na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama (10.06 ± 2.83) i CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji (10.06 ± 2.83) u odnosu na ekspresiju ove subjedinice IL-12R na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama (15.38 ± 2.93) i CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji (15.43 ± 2.95) ZK, dok je ekspresija IL-12R β 2 na CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji visoko statistički značajno snižena ($p \leq 0.01$, Mann Whitney test) u MM bolesnika u odnosu na ZK (0.37 ± 0.14 vs. 7.13 ± 3.46 , redom) (Slika 13a, b).

a)



b)



Slika 13. a) MFI IL-12Rβ1 na CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji kao i MFI IL-12Rβ2 na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama i CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji je statistički značajno niži (* p≤0.05, Mann Whitney test), dok je MFI IL-12Rβ2 na CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji visoko statistički značajno niži (* p≤0.01, Mann Whitney test) u MM bolesnika u odnosu na ZK; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 7 ZK i 7 MM

4.1.2. Zastupljenost CD3⁺CD56⁺ NK ćelija i njihovih CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacija u perifernoj krvi obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe

Uvidom u zastupljenost NK ćelija i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi nije nađena statistički značajna razlika (p>0.05, Mann-Whitney test) u procentu i apsolutnom broju ovih ćelija u MM bolesnika u odnosu na ZK. S druge strane, u MM bolesnika

ekspresija (MFI) CD56 receptora statistički je značajno niža ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) na NK ćelijama i obe njihove subpopulacije u odnosu na ZK. U Tabeli 2 su dati konkretni brojevi podaci za sve navedene ćelije za obe kategorije ispitanika.

Tabela 2. Zastupljenost NK ćelija i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi zdravih kontrolnih (ZK) osoba i obolelih od metastatskog melanoma (MM)

		ZK (n=30)	MM (n=40)
Procenat (%)	CD3 ⁻ CD56 ⁺	15.05 ± 1.63 [#]	16.38 ± 1.73
	CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	13.98 ± 1.59	15.55 ± 1.69
	CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	1.31 ± 0.19	0.88 ± 0.09
CD56 MFI	CD3 ⁻ CD56 ⁺	47.45 ± 8.68	21.14 ± 4.16*
	CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	38.00 ± 6.99	18.71 ± 4.24*
	CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	168.90 ± 35.65	65.82 ± 14.86*
Apsolutna vrednost (/μL)	CD3 ⁻ CD56 ⁺	240.70 ± 25.70	274.50 ± 30.27
	CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	223.40 ± 25.07	259.70 ± 28.96
	CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	21.63 ± 3.29	15.48 ± 2.26

Apsolutni brojevi su izračunati množenjem apsolutnog broja limfocita svake ispitivane osobe sa procentom analiziranih ćelija u LPK dobijenim prethodnom analizom na protočnom citometru.

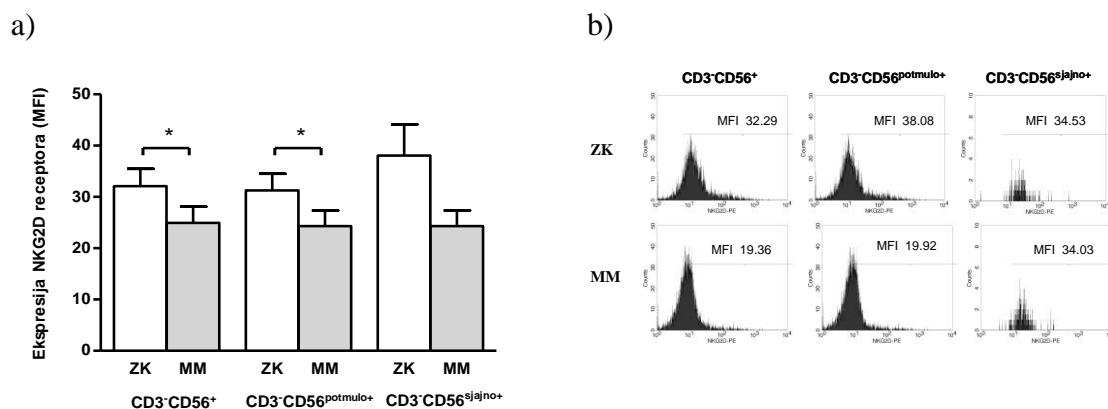
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SE; * $p \leq 0.05$, Mann Whitney test

4.1.3. Imunofenotipske karakteristike CD3⁻CD56⁺ NK ćelija i njihovih CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

4.1.3.1. Ekspresija aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe

Analizom NKG2D receptora, unutar celokupne populacije NK ćelija kao i njihovih subpopulacija pokazano je da MM bolesnici imaju statistički značajno sniženu ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) ekspresiju (MFI) ovog receptora kako na NK ćelijama (24.94 ± 3.16)

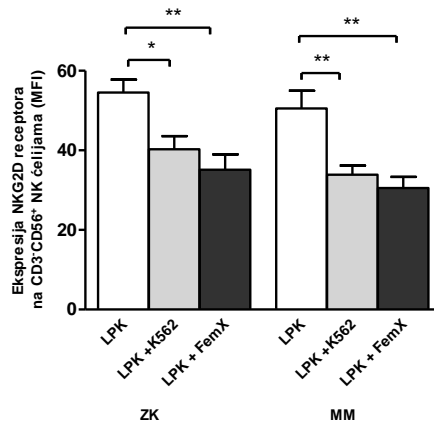
tako i na $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji (24.30 ± 3.05) u odnosu na ekspresiju ovog molekula na NK ćelijama (32.09 ± 3.37) i $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji (31.26 ± 3.25) u ZK. Za razliku od ovih rezultata, ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u ekspresiji ovog molekula na $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji između ZK (38.06 ± 6.06) i MM bolesnika (24.30 ± 3.05) (Slika 14a, b).



Slika 14. a) MFI NKG2D receptora na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama i njihovoj $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji u MM bolesnika je statistički značajno niži (* $p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na vrednosti ovog receptora u ZK osoba; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 22 ZK i 29 MM bolesnika

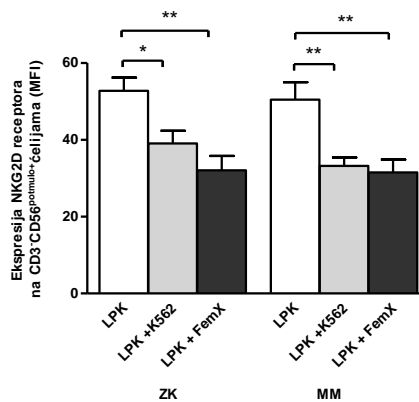
4.1.3.2. Ekspresija aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma posle kontakta limfocita periferne krvi sa tumorskim ćelijskim linijama

Analiza ekspresije aktivacionog NKG2D receptora u ZK posle kontakta LPK sa K562 tumorskom ćelijskom linijom pokazuje statistički značajno sniženje ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) MFI ovog receptora na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama sa 54.51 ± 3.26 na 40.29 ± 3.28 i visoko statistički značajno sniženje MFI ovog receptora ($p \leq 0.01$, Mann Whitney test) na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama posle kontakta LPK sa FemX ćelijskom linijom, sa 54.51 ± 1.62 na 35.12 ± 3.84 . U MM bolesnika je MFI NKG2D receptora na NK ćelijama visoko statistički značajno snižen ($p \leq 0.01$, Mann Whitney test) i posle kontakta LPK sa K562 i sa FemX-om (posle kontakta sa K562 sa 50.50 ± 4.47 na 33.87 ± 2.31 , a posle kontakta sa FemX-om sa 50.50 ± 4.47 na 30.53 ± 2.80) (Slika 15).



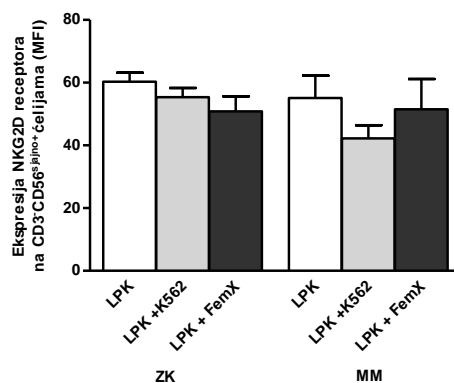
Slika 15. MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama je statistički značajno niži (* p≤0.05, Mann Whitney test) ili visoko statistički značajno niži (** p≤0.01, Mann Whitney test) posle kontakta LPK sa K562 i FemX tumorskim ćelijskim linijama u ZK i MM pacijenata. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 7 ZK i 9 MM

Takođe je u ZK uočeno statistički značajno sniženje (p≤0.05, Mann Whitney test) MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} ćelijama posle kontakta LPK sa K562 sa 52.77 ± 3.44 na 39.09 ± 3.26 i visoko statistički značajno sniženje MFI NKG2D receptora (p≤0.01, Mann Whitney test) posle kontakta LPK sa FemX-om sa 52.77 ± 3.44 na 32.06 ± 3.74, dok je ovo sniženje ekspresije NKG2D receptora posle kontakta LPK sa ciljnim tumorskim ćelijskim linijama u MM bolesnika visoko statistički značajno (p≤0.01, Mann Whitney test) i to posle kontakta LPK sa K562 sa 50.46 ± 4.57 na 33.21 ± 2.19, a posle kontakta sa FemX-om sa 50.46 ± 4.57 na 31.55 ± 3.33 (Slika 16).



Slika 16. MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} NK ćelijama je statistički značajno niži (* p≤0.05, Mann Whitney test) ili visoko statistički značajno niži (** p≤0.01, Mann Whitney test) posle kontakta LPK sa K562 i FemX tumorskim ćelijskim linijama u ZK i MM pacijenata. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 7 ZK i 9 MM

Za razliku od prethodnih rezultata, nisu uočene statistički značajne promene ($p > 0.05$, Mann Whitney test) u ekspresiji NKG2D receptora posle kontakta LPK sa K562 i FemX ćelijskim linijama na imunoregulatornoj $CD3^+CD56^{sajno+}$ subpopulaciji i u ZK i MM bolesnika. Tako je u ZK MFI NKG2D receptora na ovoj subpopulaciji 60.29 ± 2.90 , posle kontakta LPK sa K562 55.34 ± 2.93 i posle kontakta sa FemX-om 50.82 ± 4.81 . U MM bolesnika MFI NKG2D receptora na $CD3^+CD56^{sajno+}$ subpopulaciji je 55.08 ± 7.12 , 42.21 ± 4.22 posle kontakta LPK sa K562 i 51.49 ± 9.68 posle kontakta sa FemX-om (Slika 17).



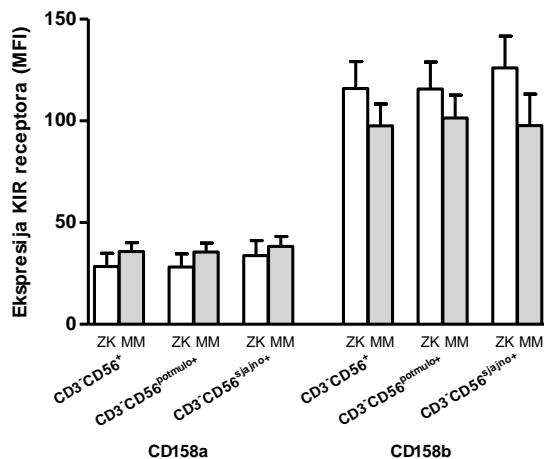
Slika 17. Nisu uočene statistički značajne promene ($p \geq 0.05$, Mann Whitney test) posle kontakta LPK sa K562 i FemX ćelijskim linijama u MFI NKG2D receptora na $CD3^+CD56^{sajno+}$ subpopulaciji i u ZK i MM bolesnika. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 7 ZK i 9 MM

4.1.3.3. Ekspresija inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b, na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe

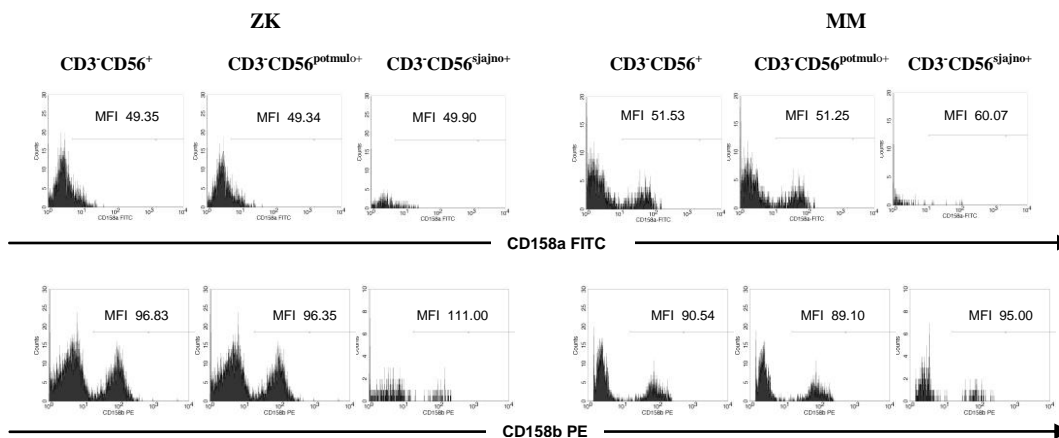
Analiza ekspresije inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b, pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u MFI ovih receptora na NK ćelijama kao i na njihovim subpopulacijama između ZK i MM bolesnika. Tako je MFI CD158a receptora na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama 28.40 ± 6.50 u ZK i 35.82 ± 4.39 u MM bolesnika, na $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji 28.19 ± 6.47 u ZK i 35.62 ± 4.37 u MM bolesnika i na $CD3^+CD56^{sajno+}$ subpopulaciji 33.82 ± 7.33 u ZK i 38.29 ± 4.86 u MM bolesnika. MFI CD158b receptora je na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama 116.00 ± 13.19 u ZK i 97.62 ± 10.65 u MM bolesnika, na $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji 115.70 ± 13.20 u ZK i

101.40 ± 11.21 u MM bolesnika i na CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji 126.00 ± 15.66 u ZK i 97.69 ± 15.52 u MM bolesnika (Slika 18a, b).

a)



b)

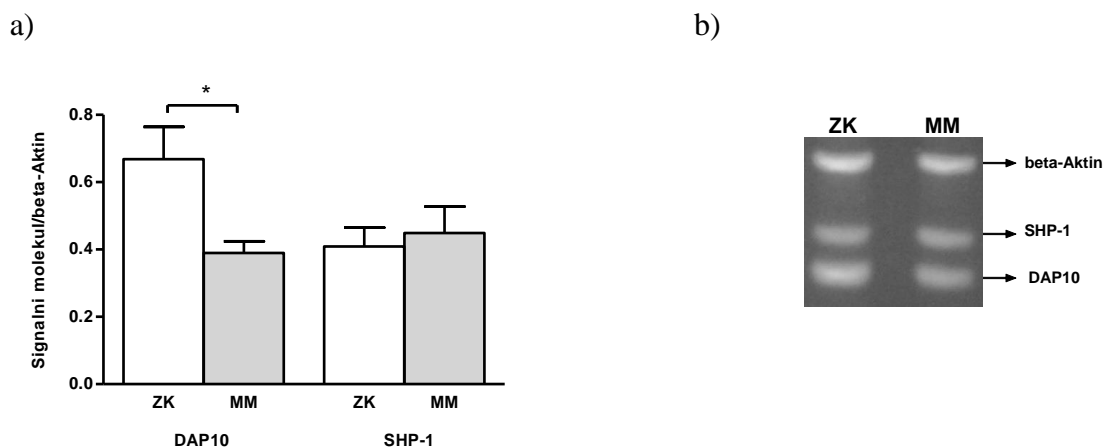


Slika 18. a) MFI CD158a i CD158b inhibitornih KIR receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama i njihovim CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama u MM bolesnika ne pokazuje statistički značajnu razliku ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u odnosu na ZK; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± standardna greška za 22 ZK i 30 MM bolesnika

4.1.4. Nivo transkripcije signalnih molekula, DAP10 i SHP-1, u netretiranim mononuklearnim ćelijama periferne krvi obolelih od metastatskog melanoma u odnosu na zdrave kontrolne osobe

Analiza nivoa transkripcije molekula vezanih za prenos signala receptora NK ćelija, DAP10 i SHP-1, u MNČPK ZK i MM bolesnika RT-PCR metodom pokazala je statistički

značajno sniženje ($p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) nivoa transkripcije DAP10 signalnog molekula u MNČPK MM bolesnika (0.39 ± 0.03) u poređenju sa nivoom transkripcije ovog molekula u ZK (0.67 ± 0.09). S druge strane, ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u nivou transkripcije SHP-1 signalnog molekula između ZK (0.41 ± 0.06) i MM bolesnika (0.45 ± 0.08) u njihovim MNČPK (Slika 19a, b).



Slika 19. a) Nivo transkripcije gena za DAP10 izražen prema nivou beta-Aktina u MNČPK MM bolesnika je statistički značajno niži (* $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) u odnosu na taj nivo u ZK osoba. Ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u nivou SHP-1 signalnog molekula izraženog prema nivou beta-Aktina u MNČPK MM bolesnika u odnosu na ZK; b) Reprezentativni RT-PCR rezultat. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška za 10 ZK i 10 MM

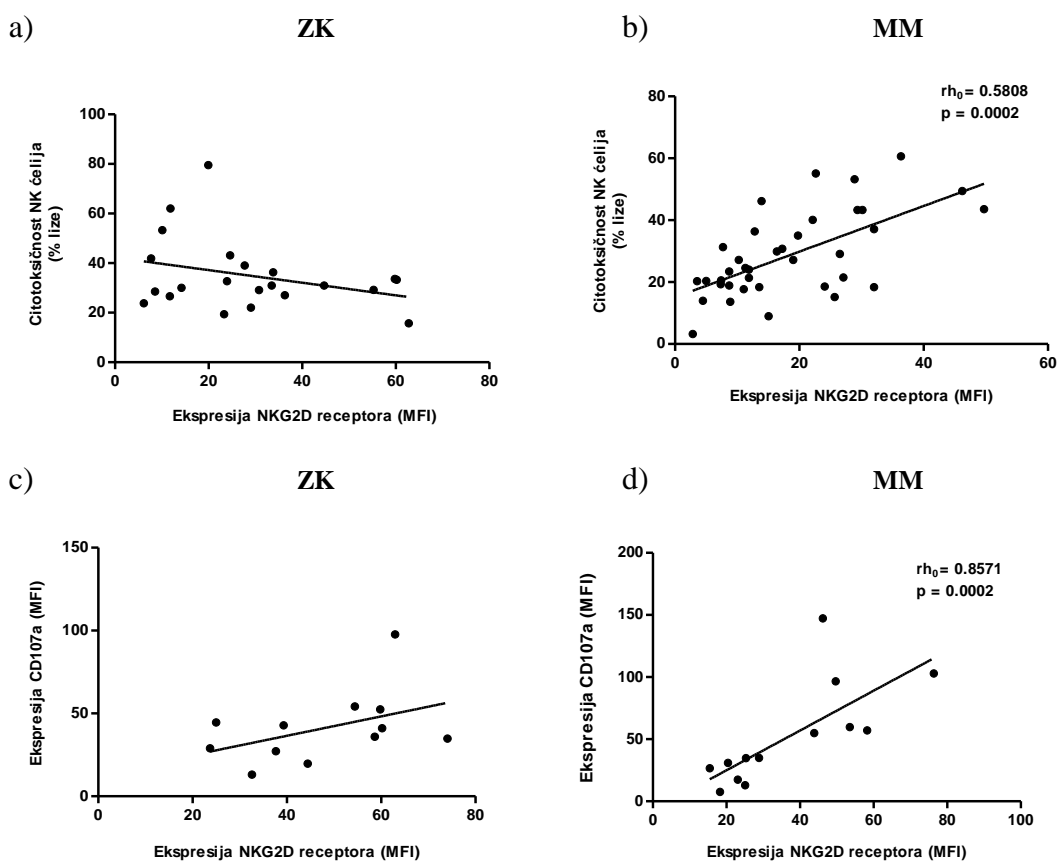
4.1.5. Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike ovih ćelija u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

U MM bolesnika MFI NKG2D aktivacionog receptora na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Spearman test) koreliše kako sa citotoksičnom aktivnošću NK ćelija tako i sa ekspresijom CD107a degranulacionog markera na ovim ćelijama (Tabela 3, Slika 20b, d). S druge strane, nije pokazan statistički značajan uticaj ($p > 0.05$, Spearman test) MFI NKG2D receptora na NK ćelijama na produkciju IFN- γ u ovim ćelijama. Takođe, u MM nije pokazan statistički značajan uticaj ($p > 0.05$, Spearman test) MFI inhibitornog CD158b receptora na NK ćelijama na funkcionalne karakteristike ovih ćelija (Tabela 3). U ZK nije nađena nijedna statistički značajna korelacija ($p > 0.05$, Spearman test) između svih ispitivanih parametara NK ćelija (Tabela 3, Slika 20a, c).

Tabela 3. Korelacija ekspresije receptora na NK ćelijama i citotoksične aktivnosti i produkcije IFN- γ ovih ćelija u zdravih kontrolnih (ZK) osoba i obolelih od metastatskog melanoma (MM)

Korelacija između		ZK (n=30)		MM (n=40)	
		rh ₀	p	rh ₀	p
NKG2D (MFI)	Citotoksičnost NK ćelija (% lize)	-0.1525	0.4981	0.5808	0.0002**
NKG2D (MFI)	CD107a (MFI)	0.4126	0.1826	0.8571	0.0002**
NKG2D (MFI)	IFN- γ (MFI)	0.5000	0.2667	0.3727	0.2589
CD158b (MFI)	Citotoksičnost NK ćelija (% lize)	0.0678	0.8101	0.3099	0.0956
CD158b (MFI)	CD107a (MFI)	-0.2619	0.5364	0.1000	0.9500
CD158b (MFI)	IFN- γ (MFI)	-0.8000	0.3333	-0.0833	0.8432

** p \leq 0.01, Spearman test



Slika 20. MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama u ZK ne pokazuje statistički značajnu korelaciju (p>0.05, Spearman test) sa citotoksičnošću (a) i MFI CD107a degranulacionog markera (c) NK ćelija, za razliku od visoko statistički značajne korelacije (** p \leq 0.01, Spearman test) između ovih parametara u MM bolesnika (b, d). Na svakoj slici su date konkretne vrednosti koeficijenta korelacije (rh₀) i statističke značajnosti (p) dobijene Spearman testom

4.1.6. Ekspresija različitih parametara NK ćelija u obolelih od metastatskog melanoma sa različitim lokalizacijama udaljenih metastaza

Analiza različitih parametara NK ćelija u obolelih od metastatskog melanoma sa različitim lokalizacijama udaljenih metastaza pokazala je da bolesnici koji su klasifikovani u M1c kategoriju imaju statistički značajno nižu ($p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) ekspresiju (MFI) NKG2D receptora u odnosu na bolesnike koji pripadaju M1a i M1b kategorijama i čine M1a+b grupu ispitanika. Nasuprot ovom nalazu, nije nađena statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u vrednostima svih ostalih ispitivanih NK ćelijskih parametara, NK ćelijskoj citotoksičnosti, ekspresiji CD107a, IFN- γ , perforina, STAT-1, CD158a i CD158b između M1a+b i M1c grupa pacijenata (Tabela 4).

Table 4. Ekspresija različitih parametara NK ćelija u obolelih od metastatskog melanoma sa različitim lokalizacijama udaljenih metastaza

Parametri NK ćelija	Kategorija udaljenih metastaza	
	M1a+b (n=21)	M1c (n=19)
Citotoksičnost (% lize)	31.70±3.98 [#]	30.18±3.09
CD107a (MFI)	39.58±7.26	33.43±7.49
IFN- γ (MFI)	58.60±10.34	50.80±11.41
Perforin (MFI)	709.10±100.03	669.70±139.00
STAT-1 (MFI)	8.22±0.43	9.26±0.35
NKG2D (MFI)	31.08±5.14	20.84±2.67*
CD158a (MFI)	43.19±8.46	34.28±5.25
CD158b (MFI)	118.20±24.62	108.92±11.93

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test

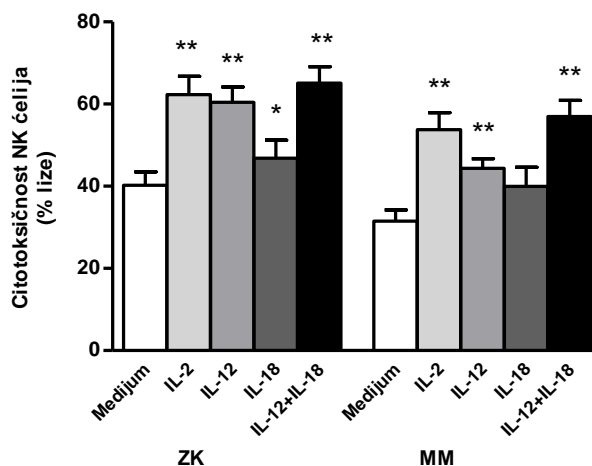
4.2. *In vitro* efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

U drugom delu ovog poglavlja analiziran je *in vitro* efekat svih ispitivanih citokina na različite karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija u ZK osoba i MM bolesnika.

4.2.1. *In vitro* efekat ispitivanih citokina na funkcionalne karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija

4.2.1.1. *In vitro* efekat ispitivanih citokina na citotoksičnu funkciju NK ćelija i njihovih subpopulacija

Nakon 18h tretmana MNČPK ZK medijumom sa 200 IU/ml IL-2, medijumom sa 10 ng/ml IL-12 i u medijumom sa 10 ng/ml IL-12 i 100 ng/ml IL-18 u kombinaciji došlo je do visoko statistički značajnog ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija u odnosu na citotoksičnost ovih ćelija u samom medijumu (vrednosti su 40.26 ± 3.22 u medijumu, 62.28 ± 4.47 u medijumu sa IL-2, 60.45 ± 3.74 u medijumu sa IL-12 i 65.10 ± 4.02 u medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18). U ZK sam IL-18 je doveo do statistički značajnog ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanja citotoksičnosti NK ćelija (sa 40.26 ± 3.22 u medijumu do 46.81 ± 4.46 u medijumu sa IL-18). Slični rezultati su dobijeni i u MM bolesnika kod kojih se citotoksična aktivnost NK ćelija visoko statistički značajno povećala ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) sa 31.47 ± 2.78 % u medijumu na 53.75 ± 4.15 % u prisustvu IL-2, na 44.37 ± 2.32 % u prisustvu IL-12 i na 56.99 ± 3.93 % u prisustvu kombinacije IL-12 i IL-18. U ovoj grupi ispitanika IL-18 nije imao statistički značajnog efekta ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na povećanje citotoksičnosti NK ćelija (vrednosti su 31.47 ± 2.78 % u medijumu i 39.95 ± 4.68 % posle tretmana IL-18) (Slika 21).

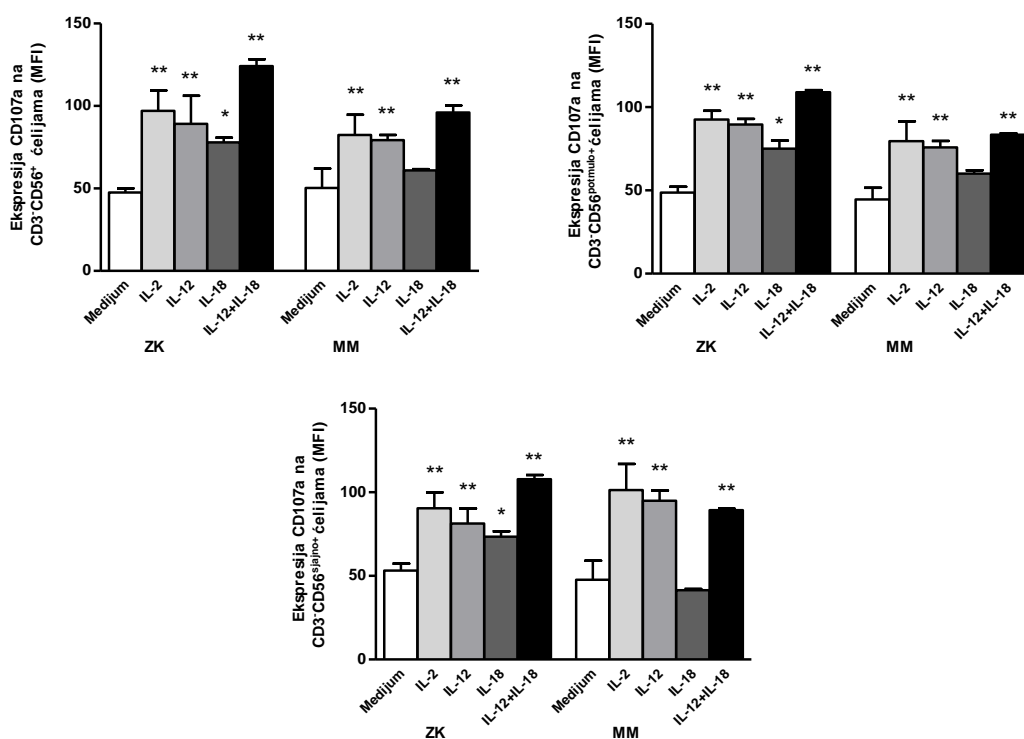


Slika 21. Citotoksična aktivnost NK ćelija ZK i MM bolesnika je visoko statistički značajno povećana (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test) nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 u odnosu na medijum. IL-18 je statistički značajno povećao (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) citotoksičnost NK ćelija jedino u ZK. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 20 ZK i 28 MM bolesnika

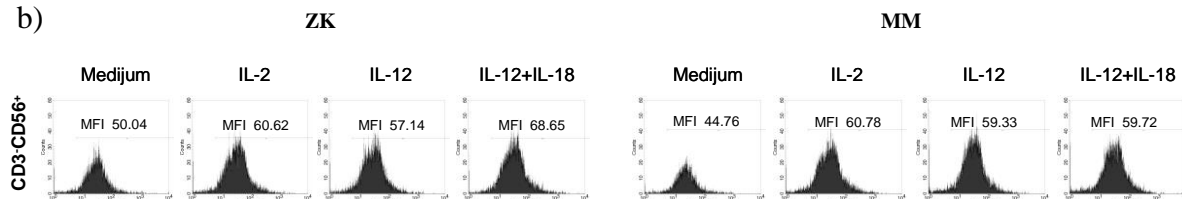
IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećavaju ekspresiju (MFI) CD107a molekula kako na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama tako i na njihovim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama u ZK i MM bolesnika. S druge strane, u ZK IL-18 statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećava ekspresiju CD107a molekula, dok u MM bolesnika ovaj citokin nije imao statistički značajnog uticaja na ekspresiju ovog degranulacionog markera ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na NK ćelijama i obe njihove subpopulacije. Tako je u ZK MFI CD107a receptora na NK ćelijama 47.54 ± 2.54 u medijumu, 97.04 ± 12.46 posle tretmana IL-2, 89.13 ± 17.03 posle tretmana IL-12, 77.97 ± 2.79 posle tretmana IL-18 i 124.20 ± 4.06 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18, na CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji ekspresija CD107a je 48.71 ± 3.43 u medijumu, 92.51 ± 5.34 posle tretmana IL-2, 89.53 ± 3.40 posle tretmana IL-12, 75.03 ± 4.91 posle tretmana IL-18 i 108.90 ± 1.29 posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji, a na CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji ekspresija CD107a je 53.25 ± 4.10 u medijumu, 90.40 ± 9.51 posle tretmana IL-2, 81.29 ± 9.04 posle tretmana IL-12, 73.38 ± 3.25 posle tretmana IL-18 i 107.80 ± 2.55 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18. U MM bolesnika MFI CD107a degranulacionog markera na NK ćelijama je 50.27 ± 11.74 u medijumu, 82.43 ± 12.28 posle tretmana IL-2, 79.34 ± 3.16 posle tretmana IL-12, $60.96 \pm$

0.75 posle tretmana IL-18 i 96.01 ± 4.32 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18, na $CD3^+CD56^{\text{potmulo}^+}$ subpopulaciji ekspresija CD107a je 44.61 ± 6.99 u medijumu, 79.56 ± 11.86 posle tretmana IL-2, 75.80 ± 3.85 posle tretmana IL-12, 60.06 ± 2.05 posle tretmana IL-18 i 83.47 ± 0.66 posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji, a na $CD3^+CD56^{\text{sjajno}^+}$ subpopulaciji ekspresija CD107a je 47.65 ± 11.44 u medijumu, 101.30 ± 15.60 posle tretmana IL-2, 94.91 ± 6.10 posle tretmana IL-12, 41.47 ± 0.68 posle tretmana IL-18 i 89.36 ± 0.82 posle tretmana IL-12 i IL-18 (Slika 22a, b).

a)



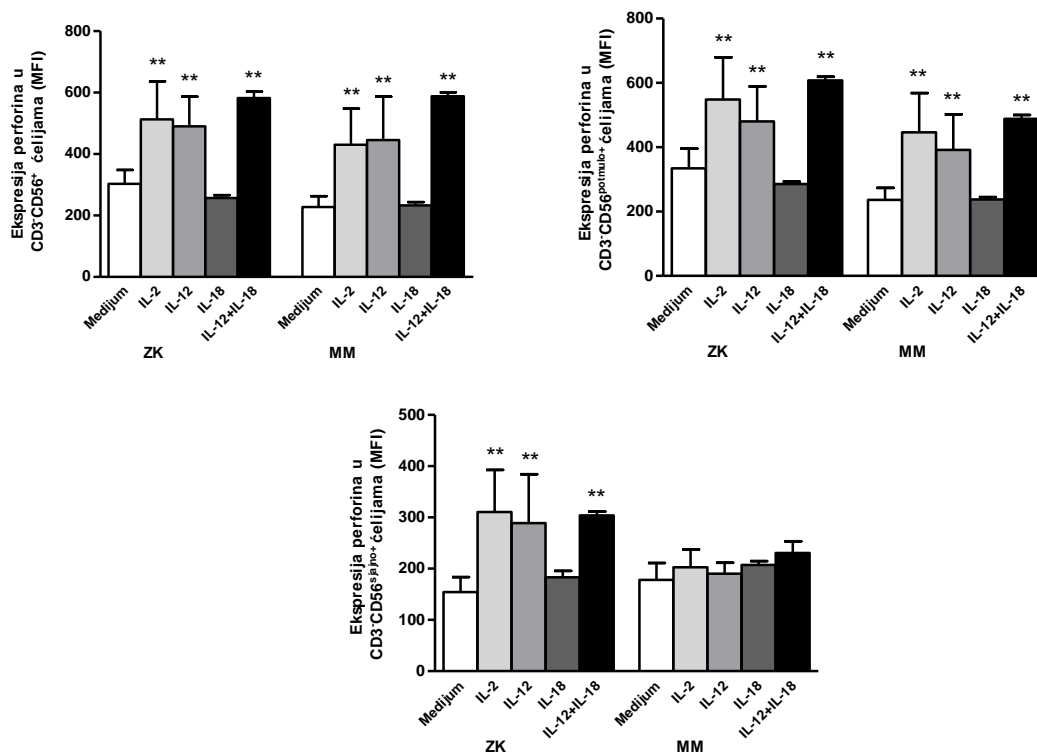
b)



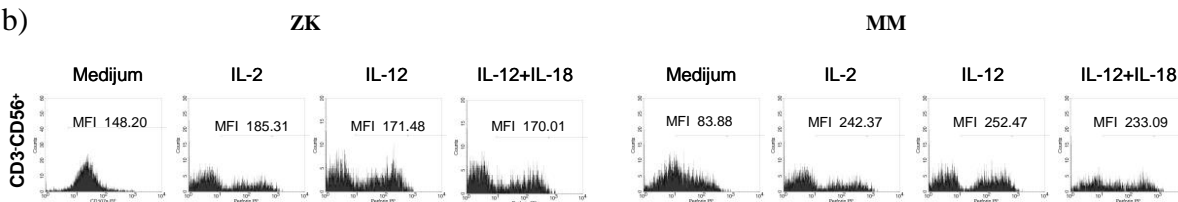
Slika 22. a) U ZK i MM bolesnika 18h *in vitro* tretmani IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 dovode do visoko statistički značajnog povećanja (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test), dok je u ZK IL-18 statistički značajno povećao (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) MFI CD107a degranulacionog markera kako na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama tako i na njihovim subpopulacijama u odnosu na medijum; b) Reprerentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 7 ZK i 7 MM bolesnika

Analiza ekspresije intraćelijskog perforina u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama pokazala je da u ZK i MM bolesnika IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 dovode do visoko statistički značajnog ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećanja, dok IL-18, sam, nema statistički značajnog uticaja ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na MFI ovog citotoksičnog medijatora kako u $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama tako i u njihovoj $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji. Tako je u ZK MFI perforina u NK ćelijama 303.00 ± 45.63 u medijumu, 513.00 ± 124.30 posle tretmana IL-2, 490.40 ± 96.40 posle tretmana IL-12, 256.90 ± 9.54 posle tretmana IL-18 i 582.20 ± 21.67 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18, dok je ekspresija ovog molekula u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji 334.20 ± 61.18 u medijumu, 548.60 ± 131.00 posle tretmana IL-2, 480.30 ± 108.50 posle tretmana IL-12, 237.60 ± 7.42 posle tretmana IL-18 i 488.50 ± 11.60 posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji. U MM bolesnika MFI perforina u NK ćelijama je 227.70 ± 35.17 u medijumu, 430.50 ± 117.00 posle tretmana IL-2, 445.90 ± 141.40 posle tretmana IL-12, 232.70 ± 11.22 posle tretmana IL-18 i 588.40 ± 12.80 posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji, dok je ekspresija ovog molekula u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji 236.00 ± 37.83 u medijumu, 446.10 ± 122.20 posle tretmana IL-2, 391.50 ± 110.90 posle tretmana IL-12, 285.50 ± 7.32 posle tretmana IL-18 i 607.40 ± 11.86 posle tretmana IL-12 i IL-18. U ZK u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji za razliku od ponovnog izostanka statistički značajnog dejstva ($p > 0.05$, Wilcoxon test) IL-18 (183.00 ± 12.61), dolazi do visoko statistički značajnog ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećanja MFI perforina posle *in vitro* stimulacije MNČPK IL-2 (310.60 ± 82.20), IL-12 (288.90 ± 95.38) i kombinacijom IL-12 i IL-18 (304.00 ± 7.59) u odnosu na ekspresiju ovog molekula u medijumu (154.30 ± 29.48). U MM bolesnika u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji ne dolazi do statistički značajnih promena ($p > 0.05$, Wilcoxon test) u ekspresiji ovog molekula posle tretmana svim ispitivanim citokinima u odnosu na medijum (ekspresija perforina je 178.30 ± 32.66 u medijumu, 202.70 ± 35.16 posle dejstva IL-2, 190.10 ± 21.26 posle dejstva IL-12, 207.40 ± 7.32 posle tretmana IL-18 i 230.60 ± 22.92 posle dejstva kombinacije IL-12 i IL-18) (Slika 23a, b).

a)



b)



Slika 23. a) 18h *in vitro* tretmani IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 dovode do visoko statistički značajnog (** p<0.01, Wilcoxon test) povećanja MFI perforina u CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama i obe njihove subpopulacije u ZK i u NK ćelijama i CD3⁺CD56^{poimulob+} subpopulaciji u MM bolesnika u odnosu na medijum; b) Reprerentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± standardna greška za 7 ZK i 7 MM bolesnika

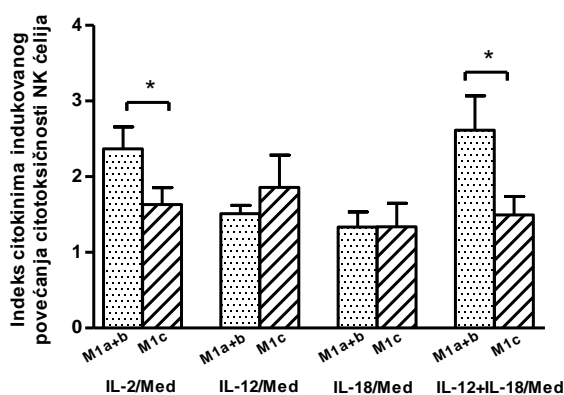
Analiza indeksa povećanja citotoksičnosti NK ćelija posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK ispitivanim citokinima pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika (p>0.05, Mann-Whitney test) između njihovih vrednosti u ZK i MM bolesnika (Tabela 5).

Tabela 5. Indeks povećanja citotoksičnosti NK ćelija zdravih kontrola (ZK) i obolelih od metastatskog melanoma (MM) posle 18h *in vitro* tretmana ispitivanim citokinima

Citokin/Medijum	ZK (n=20)	MM (n=28)
IL-2/Medijum	1.60 ± 0.11 [#]	1.97 ± 0.19
IL-12/Medijum	1.66 ± 0.16	1.66 ± 0.17
IL-18/Medijum	1.12 ± 0.09	1.29 ± 0.16
IL-12+IL-18/Medijum	1.78 ± 0.17	2.16 ± 0.30

Indeks povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija izračunava se kada se vrednost NK ćelijske aktivnosti svakog ispitanika posle 18h tretmana citokinom podeli sa vrednošću NK ćelijske aktivnosti dobijene posle tretmana u medijumu. Vrednosti indeksa su izražene kao srednja vrednost ± SE

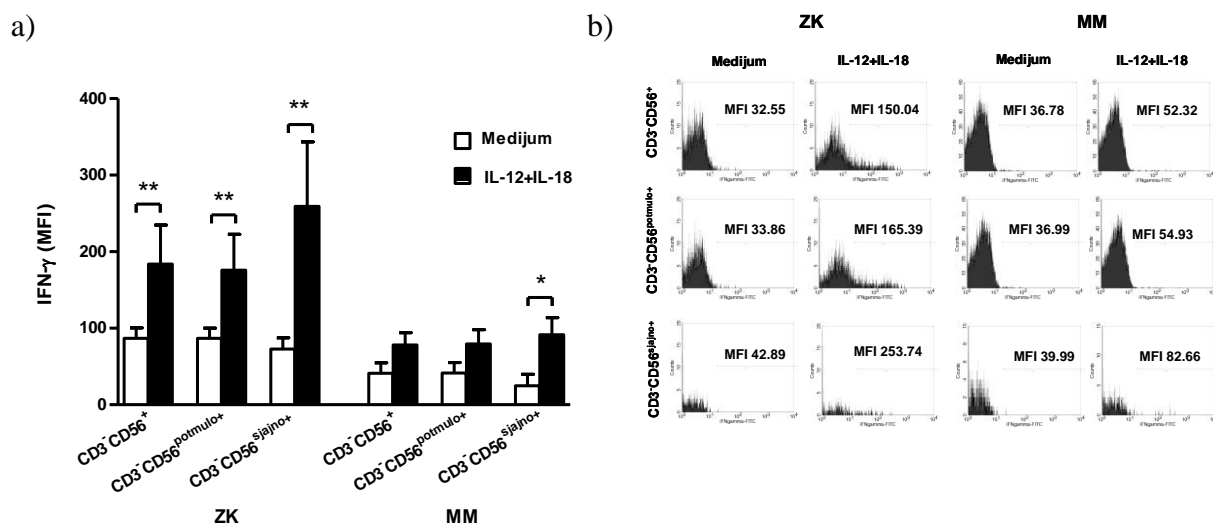
Bolesnici u M1a+b grupi imaju statistički značajno veće povećanje ($p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) citotoksičnosti NK ćelija u odnosu na povećanje u pacijenata u M1c grupi posle *in vitro* tretmana IL-2 (2.39 ± 0.29 vs. 1.63 ± 0.22 , redom), kao i kombinacijom IL-12 i IL-18 (2.69 ± 0.41 vs. 1.18 ± 0.12 , redom). IL-12 i IL-18, pojedinačno, imali su sličan efekat na povećanje citotoksičnosti NK ćelija u M1a+b i M1c grupi (povećanje pod dejstvom IL-12 je 1.51 ± 0.11 u M1a+b i 1.86 ± 0.43 u M1c grupi, a pod dejstvom IL-18 povećanje je 1.33 ± 0.20 u M1a+b i 1.33 ± 0.31 u M1c grupi) (Slika 24).



Slika 24. MM bolesnici u M1a+b grupi imaju statistički značajno veće ($* p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) povećanje citotoksičnosti NK ćelija posle 18h dejstva IL-2 kao i kombinacije IL-12 i IL-18 u poređenju sa povećanjem u M1c grupi pacijenata. Povećanje citotoksičnosti NK ćelija se izračunava kada se vrednost NK ćelijske aktivnosti za svakog pacijenta posle 18h tretmana određenim citokinom podeli sa vrednošću NK ćelijske aktivnosti dobijene posle tretmana medijumom. Vrednosti povećanja su izražene kao srednja vrednost ± SE za ukupno 28 MM bolesnika

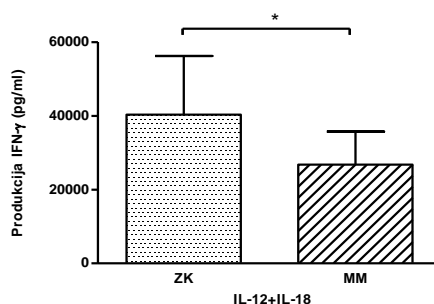
4.2.1.2. *In vitro* efekat kombinacije IL-12 i IL-18 na produkciju IFN- γ i nivo STAT-4 i IRF-1 signalnih molekula

U ZK je pokazano da kombinacija IL-12 i IL-18 visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećava MFI IFN- γ kako u NK ćelijama (od 86.76 ± 13.67 u medijumu na 184.00 ± 50.76 posle tretmana IL-12 i IL-18), tako i u njihovim subpopulacijama, $CD3^-CD56^{potmulo+}$ (od 86.69 ± 13.57 u medijumu na 175.70 ± 47.28 posle tretmana citokinima) i $CD3^-CD56^{sjajno+}$ (od 72.82 ± 14.84 u medijumu na 259.30 ± 84.25 posle tretmana citokinima). Za razliku od ZK, u MM bolesnika IL-12 i IL-18 u kombinaciji dovode do statistički značajnog ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanja MFI IFN- γ jedino u $CD3^-CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji (vrednosti su 24.95 ± 14.85 u medijumu i 91.37 ± 22.53 u medijumu sa IL-12 i IL-18), dok u NK ćelijama i u $CD3^-CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji ne dolazi do statistički značajnih promena ($p > 0.05$, Wilcoxon test) u MFI ovog citokina (vrednosti su 41.29 ± 13.43 u medijumu i 78.12 ± 15.97 posle tretmana citokinima u NK ćelijama i 41.57 ± 13.67 u medijumu i 79.42 ± 18.89 posle tretmana u $CD3^-CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji) (Slika 25a, b).



Slika 25. a) U ZK MFI IFN- γ se visoko statistički značajno povećava (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test) u $CD3^-CD56^+$ NK ćelijama i njihovim subpopulacijama, dok se u MM bolesnika MFI ovog citokina statistički značajno povećava (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) jedino u $CD3^-CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK kombinacijom IL-12 i IL-18 u odnosu na medijum; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 7 ZK i 7 MM

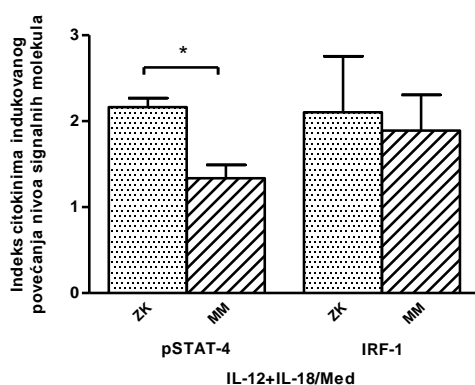
Analiza produkcije IFN- γ iz MNČPK 48h *in vitro* stimulisanih kombinacijom IL-12 i IL-18 u ZK i MM bolesnika pokazala je da mononuklearne ćelije obolelih od MM statistički značajno niže ($p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) proizvode IFN- γ posle tretmana citokinima u odnosu na ZK (26750.00 ± 8967.00 vs. 40320.00 ± 8967 , redom) (Slika 26).



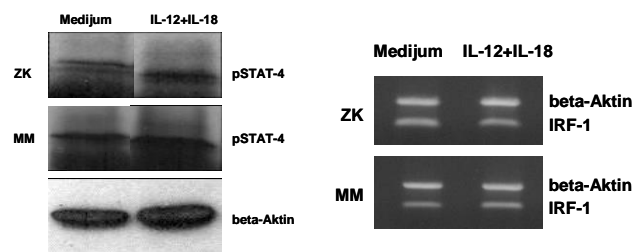
Slika 26. Produkcija IFN- γ iz MNČPK 48h *in vitro* tretiranih kombinacijom IL-12 i IL-18 merena ELISA metodom u MM bolesnika je statistički značajno niža (* $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) u odnosu na vrednosti u ZK. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 7 ZK i 7 MM

Analiza nivoa signalnih molekula u MNČPK 4h *in vitro* tretiranim kombinacijom IL-12 i IL-18 pokazala je statistički značajno manje ($p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) povećanje nivoa pSTAT-4 molekula u MM bolesnika (1.33 ± 0.15) u odnosu na povećanje ovog proteina u ZK (2.16 ± 0.10), dok analiza nivoa transkripcije IRF-1 molekula nije pokazala statistički značajnu razliku ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u povećanju nivoa iRNK ovog gena između ZK (2.10 ± 0.65) i MM bolesnika (1.89 ± 0.41) (Slika 27a, b).

a)



b)



Slika 27. a) 4h *in vitro* tretmani MNČPK kombinacijom IL-12 i IL-18 dovode do statistički značajno manjeg (* $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test) povećanja nivoa pSTAT-4 proteina u MM bolesnika u odnosu na ZK, dok nije pokazana statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) u nivou povećanja transkripcije IRF-1 između ZK i MM; b) Repräsentativna slika Western blota i RT-PCR-a, redom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 7 ZK i 9 MM

4.2.2. *In vitro* efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na zastupljenost NK ćelija i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

Nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK svim ispitivanim citokinima nije pokazana statistički značajna razlika ($p > 0.05$, Wilcoxon test) u odnosu na kontrolni medijum kako u procentu tako i u apsolutnom broju NK ćelija i njihovih subpopulacija u ZK i MM bolesnika. U ZK i MM bolesnika IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) ili visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećavaju gustinu ekspresije CD56 receptora u odnosu na njegove vrednosti u medijumu. IL-18 nije imao statistički značajnog efekta ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na ekspresiju ovog receptora na svim ispitivanim ćelijama u ZK i MM bolesnika (Tabela 6).

Tabela 6. Zastupljenost NK ćelija i njihovih subpopulacija u zdravih kontrola i obolelih od metastatskog melanoma posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK ispitivanim citokinima

		18h tretmani					
		Medijum	IL-2	IL-12	IL-18	IL-12+IL-18	
Kontrolne (n=20)	Procentat (%)	CD3 ⁻ CD56 ⁺	13.76 ± 1.75 [#]	13.52 ± 2.10	14.58 ± 2.67	13.92 ± 2.66	12.47 ± 2.14
		CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	12.72 ± 1.76	12.57 ± 2.08	13.39 ± 2.64	12.04 ± 2.26	11.53 ± 2.13
		CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	1.06 ± 0.11	0.97 ± 0.12	1.18 ± 0.15	1.07 ± 0.20	0.90 ± 0.12
	CD56 MFI	CD3 ⁻ CD56 ⁺	38.57 ± 7.92	47.55 ± 10.73**	52.74 ± 16.17*	38.68 ± 11.09	43.53 ± 13.22*
		CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	29.61 ± 5.17	36.01 ± 7.24**	38.78 ± 11.00*	29.18 ± 7.73	33.76 ± 9.72*
		CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	120.70 ± 24.08	152.80 ± 37.47*	154.10 ± 48.40*	124.50 ± 38.44	130.40 ± 41.07*
	Apsolutna vrednost (/ μ L)	CD3 ⁻ CD56 ⁺	261.53 ± 19.33	268.33 ± 32.33	280.53 ± 29.33	255.28 ± 21.38	275.14 ± 23.33
		CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	250.87 ± 30.54	242.17 ± 39.55	260.71 ± 32.55	249.39 ± 33.83	259.12 ± 35.22
		CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	19.63 ± 1.39	20.08 ± 0.07	21.13 ± 0.19	18.87 ± 0.09	20.18 ± 1.01
Melanom (n=40)	Procentat (%)	CD3 ⁻ CD56 ⁺	16.61 ± 1.99	16.57 ± 2.08	16.82 ± 2.11	17.70 ± 2.42	17.72 ± 2.31
		CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	15.56 ± 1.96	15.64 ± 2.05	15.82 ± 2.10	16.63 ± 2.40	16.66 ± 2.29
		CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	1.05 ± 0.09	0.95 ± 0.09	1.06 ± 0.08	1.07 ± 0.10	1.03 ± 0.12
	CD56 MFI	CD3 ⁻ CD56 ⁺	45.21 ± 4.94	54.17 ± 6.01**	52.35 ± 5.92**	46.17 ± 6.06	47.30 ± 6.50*
		CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	36.23 ± 4.08	45.52 ± 5.18**	41.72 ± 4.74**	37.34 ± 5.02	38.77 ± 5.41**
		CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	147.00 ± 16.36	167.30 ± 20.22*	165.30 ± 18.78**	145.70 ± 19.85	154.20 ± 22.02*
	Apsolutna vrednost (/ μ L)	CD3 ⁻ CD56 ⁺	328.32 ± 21.33	310.13 ± 28.33	319.83 ± 28.33	319.83 ± 25.13	338.51 ± 23.33
		CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+}	305.13 ± 20.96	300.97 ± 35.18	300.75 ± 39.73	321.27 ± 27.23	325.17 ± 27.71
		CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+}	22.87 ± 0.19	19.55 ± 0.27	25.34 ± 0.09	26.13 ± 0.33	20.01 ± 0.10

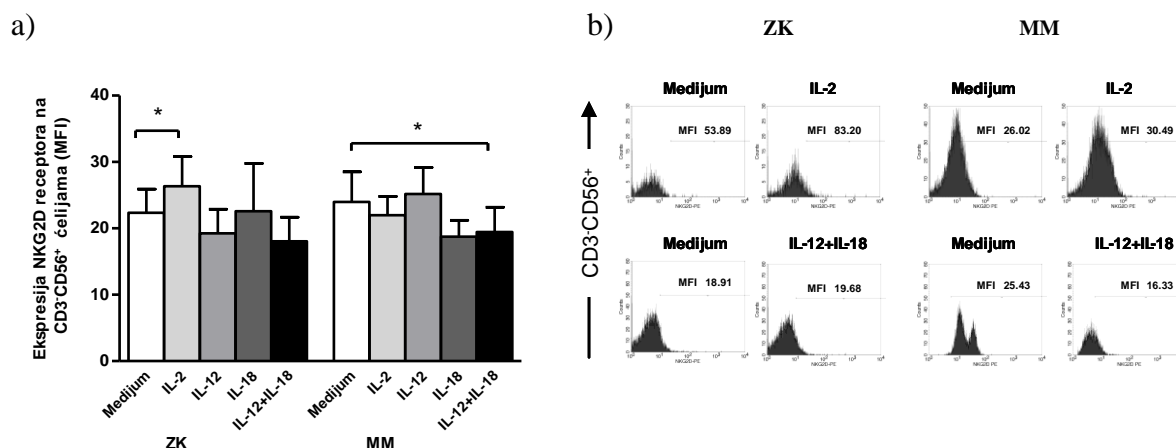
Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SE; * $p \leq 0.05$, Wilcoxon test, ** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test

4.2.3. *In vitro* efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na ekspresiju aktivacionih i inhibitornih receptora CD3⁻CD56⁺ NK ćelija i njihovih CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

U daljim ispitivanjima, na protočnom citometru analizirana je ekspresija aktivacionog NKG2D i inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b, na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama i njihovim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama poreklom iz periferne krvi ZK i MM bolesnika posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK citokinima IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacijom IL-12 i IL-18. Srednja gustina ekspresije (MFI) ispitivanih receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama nakon tretmana svim ispitivanim citokinima poredena je sa vrednostima dobijenim u medijumu.

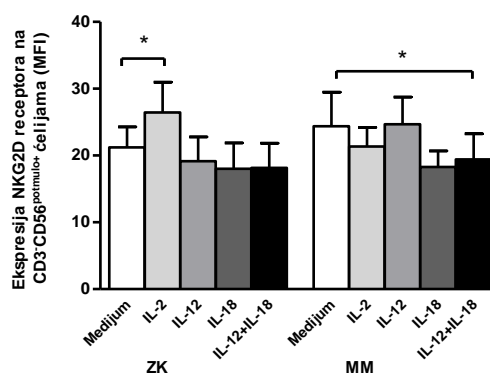
4.2.3.1. *In vitro* efekat svih ispitivanih citokina na ekspresiju NKG2D aktivacionog receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

Analiza ekspresije aktivacionog NKG2D receptora, pokazala je da 18h *in vitro* tretman IL-2 dovodi do statistički značajnog ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanja ekspresije ovog receptora u ZK, dok u MM bolesnika kombinacija IL-12 i IL-18 statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) smanjuje ekspresiju ovog receptora na NK ćelijama. U tom smislu, u ZK MFI ovog receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama je u medijumu 22.33 ± 3.59 , 26.36 ± 4.46 u medijumu sa IL-2, 19.26 ± 3.63 u medijumu sa IL-12, 22.57 ± 7.21 u medijumu sa IL-18 i 18.04 ± 3.64 u medijumu sa IL-12 i IL-18 u kombinaciji. U MM pacijenata MFI NKG2D receptora na NK ćelijama je 23.98 ± 4.53 posle tretmana medijumom, 21.99 ± 2.84 posle tretmana IL-2, 25.17 ± 4.01 posle tretmana IL-12, 18.75 ± 2.47 posle tretmana IL-18 i 19.45 ± 3.72 nakon tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18 (Slika 28a, b).



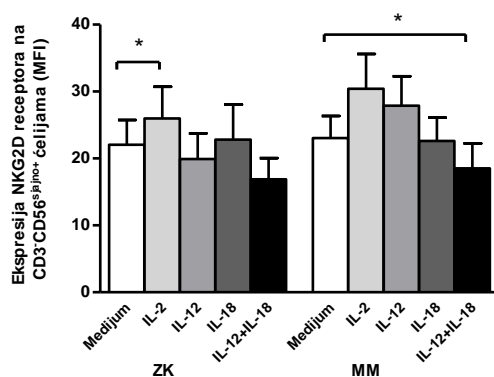
Slika 28. a) MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama u ZK osoba nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2 je statistički značajno veći (* p≤0.05, Wilcoxon test), dok je u MM bolesnika statistički značajno niži (* p≤0.05, Wilcoxon test) posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji u odnosu na ekspresiju ovog receptora u medijumu; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 19 ZK i 23 MM

Analiza ekspresije NKG2D receptora merena na CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija ponovo je pokazala da u ZK IL-2 dovodi do statistički značajnog (p≤0.05, Wilcoxon test) povećanja ekspresije NKG2D receptora sa 21.23 ± 3.06 u medijumu na 26.45 ± 4.53 posle tretmana sa IL-2. Za razliku od IL-2, svi ostali ispitivani citokini nisu imali statistički značajnog uticaja (p>0.05, Wilcoxon test) na ekspresiju ovog receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija (ekspresija ovog receptora je 19.16 ± 3.61 u medijumu sa IL-12, 18.01 ± 3.86 u medijumu sa IL-18 i 18.15 ± 3.69 u medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18). U ispitivanoj grupi pacijenata jedino su IL-12 i IL-18 u kombinaciji doveli do statistički značajnog (p≤0.05, Wilcoxon test) smanjenja ekspresije NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} NK ćelijama (gustina ekspresije NKG2D receptora na potmulo pozitivnim ćelijama je 24.38 ± 5.10 posle tretmana medijumom, 21.35 ± 2.86 posle tretmana IL-2, 24.69 ± 4.07 posle tretmana IL-12, 18.27 ± 2.41 posle tretmana IL-18 i 19.42 ± 3.82 nakon tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji) (Slika 29).



Slika 29. MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{potimulo+} subpopulaciji u ZK osoba nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2 je statistički značajno veći (* p≤0.05, Wilcoxon test), dok je u MM bolesnika statistički značajno niži (* p≤0.05, Wilcoxon test) posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji u odnosu na ekspresiju ovog receptora u medijumu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 19 ZK i 23 MM

Analiza ekspresije NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija pokazala je statistički značajno povećanje (p≤0.05, Wilcoxon test) MFI ovog receptora u ZK jedino posle 18h *in vitro* tretmana IL-2. U tom smislu, u ZK izmerena ekspresija ovog receptora na CD3⁺CD56^{sjajno+} NK ćelijama je u medijumu 22.07 ± 3.67, 25.99 ± 4.72 u medijumu sa IL-2, 19.92 ± 3.84 u medijumu sa IL-12, 22.81 ± 5.23 u medijumu sa IL-18 i 16.87 ± 3.18 u medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18. U MM pacijenata gustina ekspresije NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{sjajno+} NK ćelijama je statistički značajno smanjena (p≤0.05, Wilcoxon test) sa 23.05 ± 3.29 posle tretmana medijumom na 18.53 ± 3.71 nakon tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji. IL-2, IL-12 i IL-18 nisu imali statistički značajnog uticaja (p>0.05, Wilcoxon test) na ekspresiju ovog receptora (MFI NKG2D receptora je 30.41 ± 5.21 nakon tretmana IL-2, 27.87 ± 4.40 posle tretmana IL-12 i 22.62 ± 3.51 posle tretmana IL-18) (Slika 30).



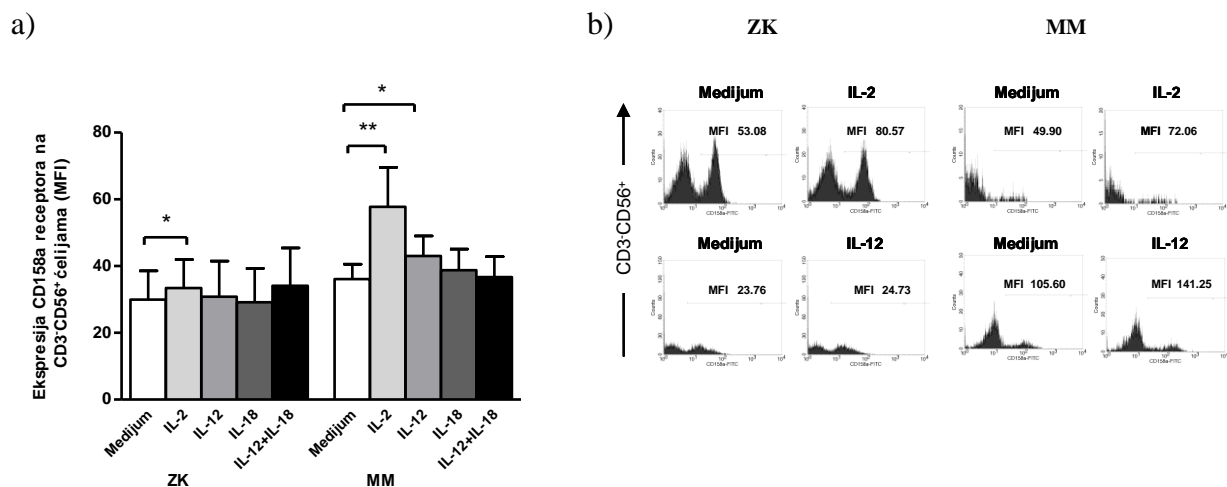
Slika 30. MFI NKG2D receptora na CD3⁺CD56^{high} subpopulaciji u ZK osoba nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2 je statistički značajno veći (* p≤0.05, Wilcoxon test), dok je u MM bolesnika statistički značajno niži (* p≤0.05, Wilcoxon test) posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji u odnosu na ekspresiju ovog receptora u medijumu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 19 ZK i 23 MM

4.2.3.2. *In vitro* efekat svih ispitivanih citokina na ekspresiju KIR inhibitornih receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

In vitro efekat ispitivanih citokina na ekspresiju CD158a receptora

Analiza ekspresije (MFI) CD158a inhibitornog receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama u ZK, pokazala je da jedino tretman IL-2 dovodi do statistički značajnog (p≤0.05, Wilcoxon test) povećanja ekspresije ovog receptora. U tom smislu, u ZK MFI ovog receptora na NK ćelijama je u medijumu 29.95 ± 8.62, 33.43 ± 8.52 u medijumu sa IL-2, 30.83 ± 10.67 u medijumu sa IL-12, 29.15 ± 10.18 u medijumu sa IL-18 i 34.11 ± 11.32 u medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18. S druge strane u MM pacijenata, pokazano je da IL-2 visoko statistički značajno (p≤0.01, Wilcoxon test) povećava MFI CD158a receptora na NK ćelijama (od 36.11 ± 4.48 posle tretmana medijumom na 57.74 ± 11.80 posle tretmana IL-2), dok IL-12 statistički značajno (p≤0.05, Wilcoxon test) povećava ekspresiju ovog inhibitornog receptora na ovim ćelijama (sa 36.11 ± 4.48 posle tretmana medijumom na 43.00 ± 6.04 nakon tretmana IL-12). Za razliku od IL-2 i IL-12, IL-18 sam ili u kombinaciji sa IL-12 nije doveo do statistički značajnih promena (p>0.05, Wilcoxon test) u ekspresiji CD158a receptora na NK ćelijama u MM bolesnika (gustina ekspresije CD158a

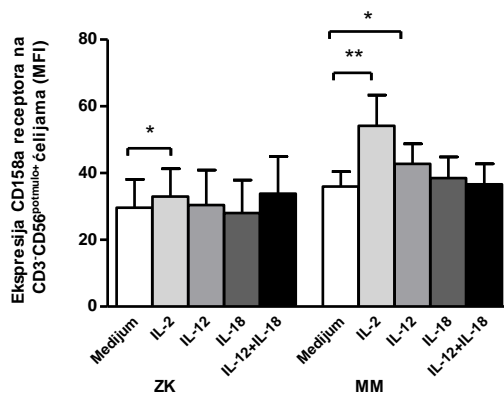
receptora na NK ćelijama je 38.74 ± 6.38 posle tretmana IL-18, 36.69 ± 6.12 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18) (Slika 31a, b).



Slika 31. a) MFI CD158a inhibitorynog KIR receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama ZK osoba se statistički značajno (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećava nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2, dok se u MM bolesnika ekspresija ovog molekula visoko statistički značajno (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećava nakon tretmana MNČPK IL-2 i statistički značajno (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) nakon tretmana IL-12 u odnosu na medijum; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 17 ZK i 27 MM bolesnika

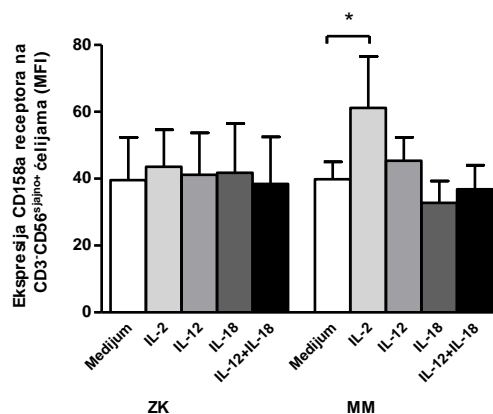
Identične promene dobijene su analizom ekspresije CD158a receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija. Tako je u ZK jedino IL-2 doveo do statistički značajnog ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanja MFI CD158a receptora na ovim ćelijama sa 29.64 ± 8.48 u medijumu na 32.98 ± 8.33 posle tretmana medijumom sa IL-2. Svi ostali ispitivani citokini nisu imali statistički značajnog uticaja ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na ekspresiju ovog receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji (ekspresija ovog receptora je 30.41 ± 10.46 u medijumu sa IL-12, 28.06 ± 9.84 u medijumu sa IL-18 i 33.82 ± 11.17 u medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18). U grupi MM pacijenata, IL-2, ponovo, visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećava MFI CD158a receptora na CD3⁺CD56^{potmulo+} NK ćelijama (od 35.97 ± 4.47 posle tretmana medijumom na 54.14 ± 9.20 posle tretmana IL-2), dok IL-12 statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećava ekspresiju ovog inhibitorynog receptora na ovim ćelijama (sa 35.97 ± 4.47 posle tretmana medijumom na 42.76 ± 6.02 nakon tretmana IL-12). IL-18 sam ili u kombinaciji sa IL-12 nije doveo do statistički značajnog povećanja ($p > 0.05$, Wilcoxon test) ekspresije CD158a

receptora (gustina ekspresije CD158a receptora na CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelijama je 38.50 ± 6.32 posle tretmana IL-18 i 36.65 ± 6.11 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18) (Slika 32).



Slika 32. MFI CD158a inhibitornog KIR receptora na CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji ZK osoba se statistički značajno (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećava nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2, dok se u MM bolesnika ekspresija ovog molekula visoko statistički značajno (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećava nakon tretmana MNČPK IL-2 i statistički značajno (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) nakon tretmana IL-12 u odnosu na medijum. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za 17 ZK i 27 MM bolesnika

S druge strane, analiza ekspresije CD158a inhibitornog receptora na CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijskoj subpopulaciji u ZK pokazala je da nijedan ispitivani citokin ne dovodi do statistički značajnih promena ($p > 0.05$, Wilcoxon test) u ekspresiji ovog receptora. Tako je gustina ekspresije CD158a receptora na ovim ćelijama 39.54 ± 12.82 posle tretmana medijumom, 43.57 ± 11.06 posle tretmana IL-2, 41.17 ± 12.52 posle tretmana IL-12, 41.76 ± 14.76 posle tretmana IL-18 i 38.43 ± 14.10 nakon tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18. Za razliku od ZK, u MM bolesnika jedino IL-2 dovodi do statistički značajnog povećanja ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) ekspresije CD158a receptora na CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama sa 39.84 ± 5.18 u medijumu na 61.17 ± 15.41 posle tretmana IL-2. Svi ostali ispitivani citokini nisu imali statistički značajnog uticaja ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na ekspresiju ovog receptora na ovoj subpopulaciji NK ćelija (ekspresija CD158a receptora je 45.38 ± 6.95 u medijumu sa IL-12, 32.74 ± 6.57 u medijumu sa IL-18 i 36.81 ± 7.21 u medijumu sa kombinacijom IL-12 i IL-18) (Slika 33).

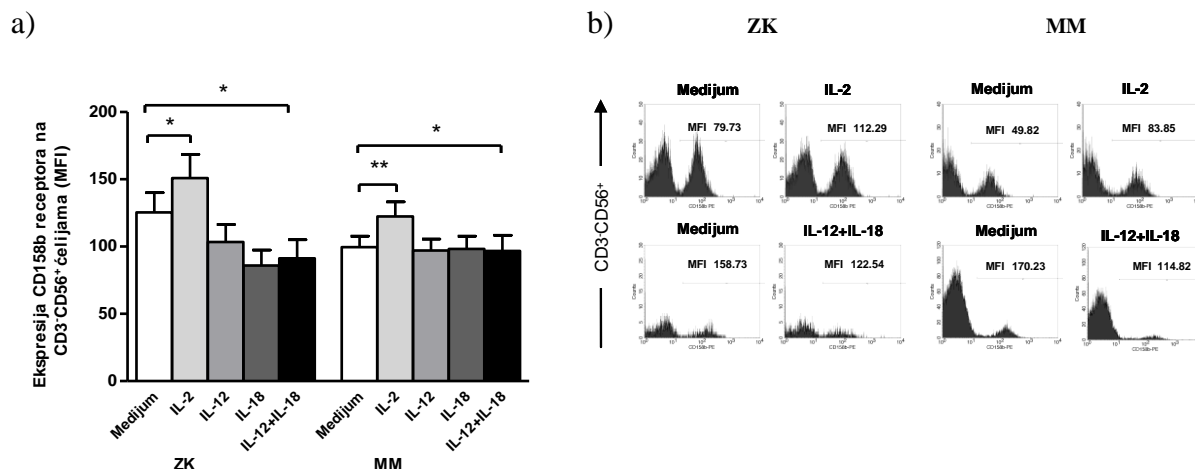


Slika 33. MFI CD158a inhibitornog KIR receptora na CD3⁺CD56⁺sjajno⁺ subpopulaciji NK ćelija jedino se u MM bolesnika statistički značajno (* p≤0.05, Wilcoxon test) povećava nakon tretmana MNČPK IL-2 u poređenju sa njegovom ekspresijom u medijumu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 17 ZK i 27 MM bolesnika

***In vitro* efekat ispitivanih citokina na ekspresiju CD158b receptora**

Analizom ekspresije drugog inhibitornog KIR receptora, CD158b na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK svim ispitivanim citokinima pokazano je da IL-2 i IL-12 i IL-18 u kombinaciji imaju sličan efekat na ekspresiju ovog receptora i u ZK i MM bolesnika. Tako u ZK IL-2 dovodi do statistički značajnog (p≤0.05, Wilcoxon test) povećanja ekspresije (MFI) CD158b receptora na NK ćelijama sa 125.50 ± 14.56 u medijumu na 150.90 ± 17.76 u medijumu sa IL-2, dok je kombinacija IL-12 i IL-18 dovela do statistički značajnog (p≤0.05, Wilcoxon test) sniženja ekspresije ovog receptora sa 125.50 ± 14.56 u medijumu na 91.18 ± 13.83 u medijumu sa IL-12 i IL-18 u kombinaciji. Ostali ispitivani citokini nisu imali statistički značajnog efekta (p>0.05, Wilcoxon test) na ekspresiju CD158b receptora na NK ćelijama (MFI CD158b receptora je 103.40 ± 13.13 u medijumu sa IL-12 i 85.95 ± 11.54 u medijumu sa IL-18). U MM pacijenata takođe je pokazano da IL-2 visoko statistički značajno (p≤0.01, Wilcoxon test) povećava MFI CD158b receptora na NK ćelijama (sa 99.59 ± 8.12 posle tretmana medijumom na 122.50 ± 10.82 posle tretmana IL-2), dok kombinacija IL-12 i IL-18 statistički značajno (p≤0.05, Wilcoxon test) smanjuje ekspresiju ovog inhibitornog receptora na NK ćelijama (sa 99.59 ± 8.12 posle tretmana medijumom na 96.79 ± 11.61 nakon tretmana IL-12 i IL-18). Za razliku od IL-2 i kombinacije IL-12 i IL-18, ni u ovoj grupi ispitanika IL-12 i IL-18, samostalno,

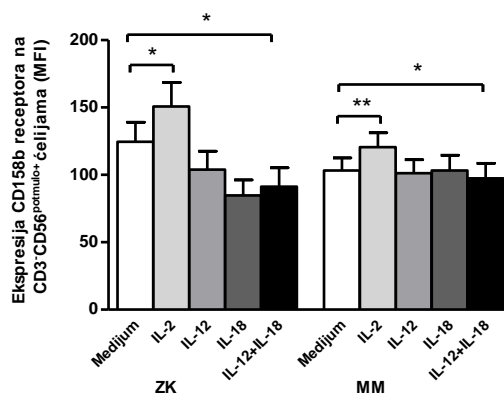
nisu doveli do statistički značajnih promena ($p > 0.05$, Wilcoxon test) u ekspresiji CD158b receptora na NK ćelijama (gustina ekspresije CD158b receptora na NK ćelijama je 97.11 ± 8.53 posle tretmana IL-12 i 98.27 ± 9.56 posle tretmana IL-18) (Slika 34a, b).



Slika 34. a) MFI CD158b inhibitory KIR receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama u ZK osoba se statistički značajno ($* p \leq 0.05$, Wilcoxon test), dok se u MM bolesnika visoko statistički značajno ($** p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećava posle tretmana MNČPK IL-2. IL-12 i IL-18 u kombinaciji statistički značajno ($* p \leq 0.05$, Wilcoxon test) smanjuju ekspresiju ovog receptora u ZK i u MM bolesnika u odnosu na medijum; b) Reprezentativni histogrami dobijeni metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 18 ZK i 27 MM bolesnika

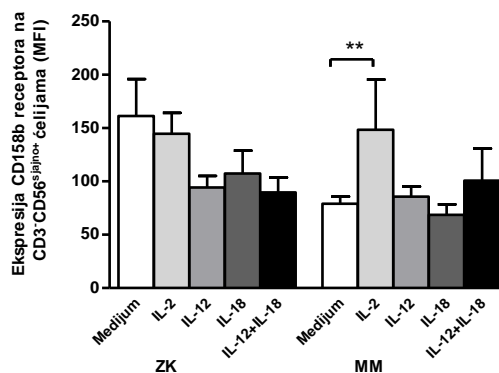
Slični rezultati dobijeni su analizom ekspresije CD158b receptora na CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija. Tako je u ZK IL-2, ponovo, doveo do statistički značajnog ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanja ekspresije CD158b receptora na ovim ćelijama sa 124.60 ± 14.56 u medijumu na 150.70 ± 17.84 posle tretmana IL-2, dok su IL-12 i IL-18 u kombinaciji statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) smanjili ekspresiju ovog inhibitory receptora sa 124.60 ± 14.56 na 91.33 ± 13.97 . Svi ostali ispitivani citokini nisu imali statistički značajnog uticaja ($p > 0.05$, Wilcoxon test) na ekspresiju ovog receptora na CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija (ekspresija ovog receptora je 103.90 ± 13.77 u medijumu sa IL-12 i 84.77 ± 11.52 u medijumu sa IL-18). U grupi MM pacijenata, IL-2 visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećava ekspresiju CD158b receptora na ovim NK ćelijama (od 103.30 ± 9.22 posle tretmana medijumom na 120.60 ± 10.69 posle tretmana IL-2), dok kombinacija IL-12 i IL-18 i u ovoj grupi ispitanika statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) smanjuje ekspresiju ovog inhibitory receptora na CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelijama (sa 103.30 ± 9.22 posle tretmana

kontrolnim medijumom na 97.44 ± 11.17 nakon tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji). IL-12 i IL-18, pojedinačno, nisu imali statistički značajan ($p > 0.05$, Wilcoxon test) uticaj na ekspresiju CD158b receptora na $CD3^+CD56^{\text{potmulo}^+}$ ćelijama u MM bolesnika (gustina ekspresije CD158b receptora je 101.20 ± 10.09 posle tretmana IL-12 i 103.20 ± 11.28 posle tretmana IL-18) (Slika 35).



Slika 35. MFI CD158b inhibitory KIR receptor on $CD3^+CD56^{\text{potmulo}^+}$ NK cells in ZK individuals is statistically significant (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test), while in MM patients it is highly statistically significant (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test) after MNCPK IL-2. IL-12 and IL-18 in combination statistically significantly (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) reduce the expression of this receptor in ZK and MM patients. Results are presented as mean value \pm standard deviation for 18 ZK and 27 MM patients

On the other hand, analysis of CD158b inhibitory receptor expression on $CD3^+CD56^{\text{sjajno}^+}$ subpopulation in ZK showed that no tested cytokine leads to statistically significant changes ($p > 0.05$, Wilcoxon test) in the expression of this receptor. Thus, the density of CD158b receptor expression on these cells is 161.40 ± 34.56 after control medium, 144.60 ± 19.61 after IL-2 treatment, 94.37 ± 10.82 after IL-12, 107.50 ± 21.34 after IL-18 and 89.74 ± 13.86 after combination of IL-12 and IL-18. In contrast to ZK, in MM patients only IL-2 leads to a highly statistically significant ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) increase in CD158b receptor expression on $CD3^+CD56^{\text{sjajno}^+}$ NK cells, from 79.04 ± 6.72 in control medium to 148.50 ± 47.07 after IL-2 treatment. All other tested cytokines had no statistically significant effect ($p > 0.05$, Wilcoxon test) on the expression of this receptor in this NK cell subpopulation (expression of this receptor is 85.75 ± 9.37 in medium with IL-12, 68.72 ± 9.74 in medium with IL-18 and 100.80 ± 29.99 in medium with combination of IL-12 and IL-18) (Slika 36).



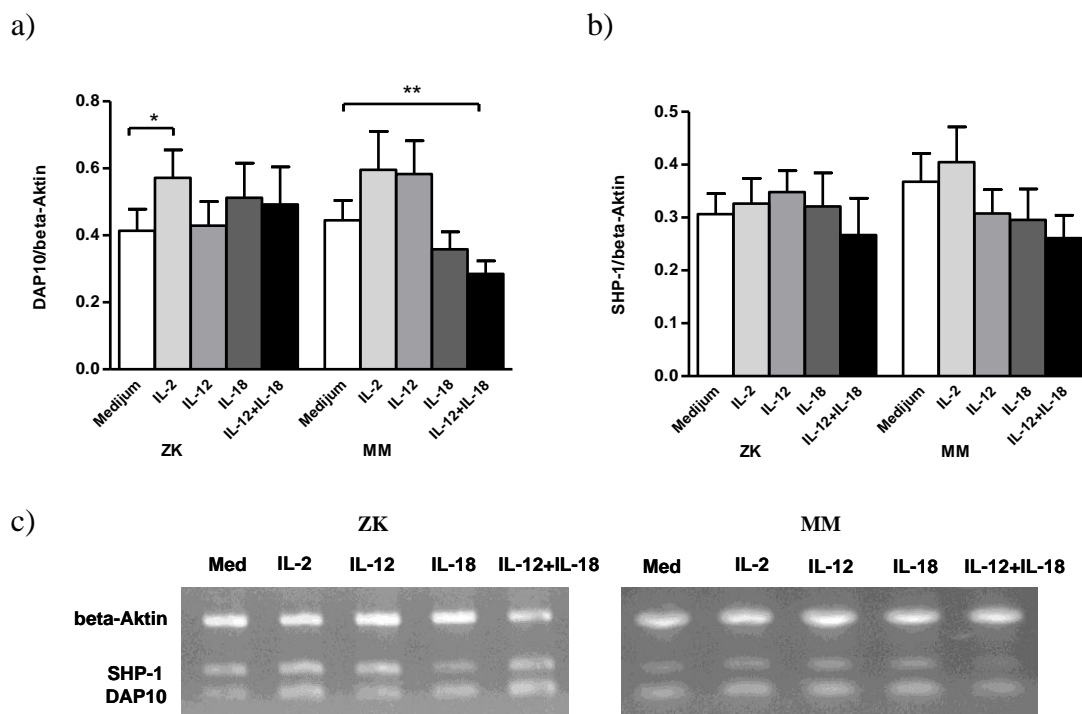
Slika 36. U MM bolesnika MFI CD158b inhibičnog KIR receptora na CD3⁺CD56⁺ subpopulaciji NK ćelija jedino se nakon 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2 visoko statistički značajno (** p≤0.01, Wilcoxon test) povećava u odnosu na ekspresiju ovog receptora u medijumu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za 18 ZK i 27 MM bolesnika

4.2.4. *In vitro* efekat IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na nivo transkripcije DAP10 i SHP-1 signalnih molekula u mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrolnih osoba i obolelih od metastatskog melanoma

RT-PCR metodom praćen je nivo transkripcije DAP10 i SHP-1 signalnih molekula, izračunatih u odnosu na nivo gena za ubikvitarni protein beta-Aktin, u MNČPK 18h *in vitro* tretiranim IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacijom IL-12 i IL-18 u ZK i MM bolesnika.

Dobijeni rezultati su pokazali da se u grupi ZK nivo iRNK za DAP10 gen statistički značajno povećava (p≤0.05, Wilcoxon test) jedino nakon tretmana MNČPK IL-2 sa 0.41 ± 0.06 na 0.57 ± 0.08. Ostali ispitivani citokini nisu doveli do statistički značajnih promena (p>0.05, Wilcoxon test) u nivou transkripcije ovog gena (0.41 ± 0.06 u medijumu, 0.43 ± 0.07 posle tretmana IL-12, 0.51 ± 0.10 posle tretmana IL-18 i 0.49 ± 0.11 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18). U grupi MM pacijenata kombinacija citokina IL-12 i IL-18 dovela je do visoko statistički značajnog (p≤0.01, Wilcoxon test) smanjenja nivoa transkripcije gena za DAP10 (sa 0.44 ± 0.05 u medijumu na 0.28 ± 0.03 posle 18h *in vitro* tretmana IL-12 i IL-18). U grupi pacijenata ostali ispitivani citokini, IL-2, IL-12 i IL-18, pojedinačno, nisu imali statistički značajan efekat (p>0.05, Wilcoxon test) na nivo transkripcije ovog gena (0.59 ± 0.11 posle tretmana IL-2, 0.58 ± 0.09 posle tretmana IL-12 i 0.35 ± 0.05 posle tretmana IL-18) (Slika 37a, c).

Analiza transkripcije gena za SHP-1 signalni molekul je pokazala da nijedan od ispitivanih citokina nije doveo do statistički značajne promene ($p > 0.05$, Wilcoxon test) u nivou transkripcije ovog gena u MNČPK kako u ZK tako i u MM bolesnika. Tako je u ZK nivo gena za SHP-1 0.31 ± 0.15 u medijumu, 0.33 ± 0.04 posle tretmana IL-2, 0.35 ± 0.04 posle tretmana IL-12, 0.32 ± 0.06 posle tretmana IL-18 i 0.27 ± 0.07 posle tretmana IL-12 i IL-18 u kombinaciji, dok je u MM bolesnika taj nivo 0.37 ± 0.05 u medijumu, 0.40 ± 0.06 posle tretmana IL-2, 0.31 ± 0.04 posle tretmana IL-12, 0.29 ± 0.05 posle tretmana IL-18 i 0.26 ± 0.04 posle tretmana kombinacijom IL-12 i IL-18 (Slika 37b, c).



Slika 37. a) Nivo transkripcije gena za DAP10 izračunat u odnosu na nivo beta-Aktina u ZK osoba se statistički značajno povećava ($* p \leq 0.05$, Wilcoxon test) nakon tretmana MNČPK IL-2, a u MM bolesnika se visoko statistički značajno smanjuje ($* p \leq 0.01$, Wilcoxon test) posle tretmana ovih ćelija kombinacijom IL-12 i IL-18 u odnosu na vrednosti u medijumu; b) Nivo transkripcije gena za SHP-1 izračunat u odnosu na nivo beta-Aktina se nije statistički značajno menjao ($p > 0.05$, Wilcoxon test) nakon tretmana MNČPK svim ispitivanim citokinima u odnosu na medijum i u ZK i MM pacijenata; c) Odabrani RT-PCR rezultati. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška za 17 ZK i 14 MM

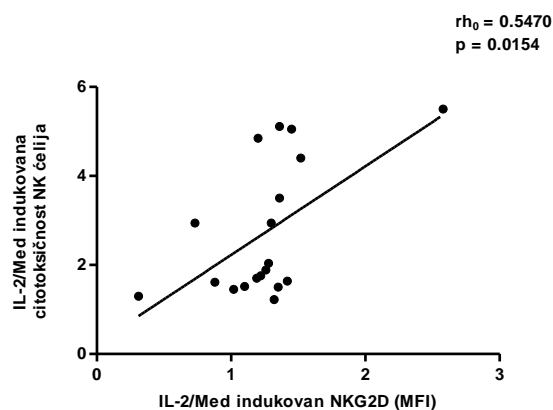
4.2.5. Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike *in vitro* tretiranih NK ćelija zdravih kontrolnih osoba

Analiza uticaja ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike (citotoksična aktivnost i produkcija IFN- γ) ovih ćelija posle *in vitro* tretmana MNČPK različitim citokinima u ZK pokazala je da jedino srednja gustina ekspresije (MFI) NKG2D aktivacionog receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama posle 18h *in vitro* tretmana IL-2 statistički značajno ($p < 0.05$, Spearman test) koreliše sa citotoksičnom aktivnošću NK ćelija posle tretmana ovim citokinom (Tabela 7, Slika 38). Ekspresija inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b, na NK ćelijama nije imala statistički značajnog uticaja ($p > 0.05$, Spearman test) kako na citotoksičnost NK ćelija posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2 ili kombinacijom IL-12 i IL-18 tako ni na produkciju IFN- γ u NK ćelijama posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK kombinacijom IL-12 i IL-18 (Tabela 7).

Tabela 7. Korelacija ekspresije različitih receptora NK ćelija, njihove citotoksične aktivnosti i produkcije IFN- γ nakon *in vitro* tretmana različitim citokinima u zdravih kontrolnih osoba

Korelacija između		r_{ho}	p
IL-2/Med indukovan NKG2D (MFI)	IL-2/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	0.5470	0.0154*
IL-2/Med indukovan CD158a (MFI)	IL-2/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	-0.1789	0.5779
IL-2/Med indukovan CD158b (MFI)	IL-2/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	0.1870	0.5220
IL-12+IL-18/Med smanjen CD158b (MFI)	IL-12+IL-18/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	0.1119	0.7292
IL-12+IL-18/Med smanjen CD158b (MFI)	IL-12+IL-18/Med indukovana produkcija IFN-gama	-0.5000	1.0000

* $p < 0.05$, Spearman test



Slika 38. Ekspresija NKG2D receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama pozitivno koreliše (* $p \leq 0.05$, Spearman test) sa citotoksičnom aktivnošću NK ćelija dobijenom posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK IL-2 u zdravih kontrolnih osoba. Na slikama su date konkretne vrednosti statističke značajnosti (p) i koeficijenta korelacije (ρ_s) dobijene testom Spermanove korelacije

4.2.6. Uticaj ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike *in vitro* tretiranih NK ćelija obolelih od metastatskog melanoma

Analiza uticaja ekspresije aktivacionih i inhibitornih receptora NK ćelija na funkcionalne karakteristike ovih ćelija posle 18h *in vitro* tretmana MNČPK različitim citokinima u MM bolesnika pokazala je da nijedan od ispitivanih receptora nije imao statistički značajnog uticaja ($p > 0.05$, Spearman test) kako na citotoksičnost NK ćelija tako ni na produkciju IFN- γ u ovim ćelijama (Tabela 8).

Tabela 8. Korelacija ekspresije različitih receptora NK ćelijama, njihove citotoksične aktivnosti i produkcije IFN- γ nakon *in vitro* tretmana različitim citokinima u obolelih od metastatskog melanoma

Korelacija između		ρ_s	p
IL-2/Med indukovana CD158a (MFI)	IL-2/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	-0.0067	0.9745
IL-12/Med indukovana CD158a (MFI)	IL-12/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	0.1417	0.5088
IL-2/Med indukovana CD158b (MFI)	IL-2/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	0.2056	0.3241
IL-12+IL-18/Med smanjen CD158b (MFI)	IL-12+IL-18/Med indukovana citotoksičnost NK ćelija	0.1536	0.5179
IL-12+IL-18/Med smanjen CD158b (MFI)	IL-12+IL-18/Med indukovana produkcija IFN-gama	0.1925	0.6134

5. DISKUSIJA

Značaj NK ćelija u odbrani od melanoma pokazan je prvi put osamdesetih godina prošlog veka (Trinchieri i Perussia, 1984). Takođe su tih godina Kornstein i saradnici opisali ulogu NK ćelija u sprečavanju rasta i širenja ovog tumora (Kornstein i sar., 1987). Od tada pa do danas u mnogim, kako mišjim, tako i humanim modelima pokazano je da NK ćelije mehanizmom citotoksičnosti i produkcijom IFN- γ ostvaruju snažan anti-melanomski efekat (Morgado i sar., 2011; Desbois i sar., 2012). Takođe, danas je mnogo podataka koji govore o važnoj antitumorskoj ulozi NK ćelija periferne krvi bolesnika obolelih od melanoma (Konjevic i sar., 2012a), kao i o prognostičkom značaju NK ćelija koje infiltrišu tkivo melanoma (Ladányi, 2013), tako da bi sve terapijske strategije kojima bi se povećala efikasnost ovih ćelija bile od velikog kliničkog značaja (Ames i Murphy, 2014).

Međutim i pored značajnih antimelanomskih svojstava NK ćelija, u ovom radu je pokazano da u odnosu na ZK, MM bolesnici imaju značajno oslabljene efektorske funkcije NK ćelija u perifernoj krvi. Postavlja se pitanje na koji način ove ćelije u perifernoj cirkulaciji dolaze u kontakt sa ćelijama tumora. U melanomu je pokazano postojanje cirkulišućih ćelija ovog tumora koje direktno u perifernoj cirkulaciji inhibiraju efektorske funkcije NK ćelija (Rao i sar., 2011). Takođe, iako je malo podataka o recirkulaciji NK ćelija smatra se da se zahvaljujući brojnim hemokinima i selektinima određeni broj funkcionalno i fenotipski oslabljenih NK ćelija tkiva tumora ne zadržava u ovom tkivu, već odlazi u perifernu krv (Fregni i sar., 2012).

Tako je u ovom radu pokazano da u odnosu na ZK, MM bolesnici imaju statistički značajno niže vrednosti NK ćelijske citotoksične aktivnosti koja se ostvaruje posredstvom citotoksičnih medijatora perforina i granzima (Voskoboinik i sar., 2010), a određuje se standardnim hromskim radioaktivnim testom pomoću K562 ciljne tumorske ćelijske linije (Brown i sar., 1985). Ovaj rezultat je u skladu sa brojnim podacima u literaturi (Seidel i sar., 1998; Konjević i sar., 2009; Balsamo i sar., 2009; Mirjačić Martinović i sar., 2011; Pietra i sar., 2012a). Takođe, u ovom radu je pokazano da uporedo sa sniženom citotoksičnošću, MM bolesnici u odnosu na ZK imaju statistički značajno nižu ekspresiju

CD107a degranulacionog markera ne samo na površini NK ćelija, već i na njihovoj citotoksičnoj, CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji posle četvoročasovnog kontakta MNČPK i K562, ciljane ćelijske tumorske linije. CD107a ili protein membrane lizozoma 1 (*engl.* lysosomal-associated membrane protein, LAMP-1) je najzastupljeniji protein membrane citotoksičnih granula NK ćelija koji je glikoziliran tako da stvara šećerni omotač ili glikokaliks sa unutrašnje strane ove membrane štiteći je na taj način od dejstva hidrolitičkih enzima u samim granulama (Krzewski i Coligan, 2012). Pokazano je da se CD107a može smatrati markerom degranulacije NK ćelija, a samim tim i citotoksičnosti ovih ćelija i povećano je ispoljen na membrani NK ćelija posle njihovog kontakta sa ćelijama tumora što je praćeno izlaskom perforina iz citotoksičnih granula NK ćelija. Na taj način je ekspresija CD107a molekula u direktnoj povezanosti sa citotoksičnom aktivnošću NK ćelija usmerenoj protiv ćelija tumora (Alter i sar., 2004; Atkas i sar., 2009). Iz tog razloga rezultati dobijeni u ovom radu koji govore o smanjenoj ekspresiji ovog molekula na NK ćelijama i njihovoj citotoksičnoj subpopulaciji dodatno govore u prilog smanjene citotoksične funkcije NK ćelija u obolelih od metastatskog melanoma. Takođe, prema najnovijim podacima površinski CD107a u procesu degranulacije NK ćelija štiti ove ćelije od autoagresivnosti (Cohnen i sar., 2013), pa je tako smanjena ekspresija ovog molekula na NK ćelijama i na CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji u MM bolesnika, pokazana u ovom radu, povezana i sa potencijalno povećanom autocitotoksičnošću ovih ćelija u bolesnika.

Razlozi za poremećaj citotoksične aktivnosti NK ćelija, a naročito u odmaklim stadijumima maligniteta su različiti i mnogobrojni, ali još uvek nedovoljno ispitani. Ono što je poznato je da ćelije tumora koriste različite mehanizme kako bi inhibirale antitumorsko dejstvo NK ćelija i to direktnim kontaktom sa njima kao i dejstvom solubilnih faktora kao što su citokini (TGF- β , IL-10, IL-6), hemokini (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1), faktori rasta (GM-CSF) i enzimi (IDO), koje proizvode same ćelije tumora kao i mnogobrojne imunosupresivne ćelije (regDĆ, TAM, TAN, MDSC, Treg) tumorske mikrosredine (Pietra i sar., 2012b; Balsamo i sar., 2012). Takođe je pokazano da egzozomi ćelija tumora direktno inhibiraju citotoksičnost NK ćelija inhibirajući oslobađanje perforina i granzima iz njihovih granula, što je pokazano na humanim ćelijskim linijama melanoma i akutne mijeloblastne leukemije (Clayton, 2012).

Ovi faktori mogu dovesti do poremećaja citotoksične funkcije NK ćelija smanjenjem ekspresije i funkcije brojnih molekula koji regulišu citotoksičnost NK ćelija, smanjenjem ekspresije aktivacionih, a povećanjem ekspresije inhibitornih receptora NK ćelija kao i smanjenjem procenta i broja NK ćelija i njihovih subpopulacija (Pietra i sar., 2012a; Stojanovic i sar., 2013).

Takođe u ovom radu pokazana je smanjena produkcija IFN- γ u sveže izolovanim NK ćelijama i u njihove obe subpopulacije, CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} u MM bolesnika u odnosu na ZK. Produkcija IFN- γ je druga, bitna funkcionalna karakteristika NK ćelija kojom ove ćelije ostvaruju antitumorski efekat ili direktno ili indirektno aktivacijom velikog broja drugih ćelija imunskog sistema kao što su makrofagi, dendritične ćelije ili T limfociti (O'Sullivan i sar., 2012). Tako da rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da je pored citotoksične i imunoregulatorna funkcija NK ćelija inhibirana u bolesnika sa metastatskim melanomom, a što je u skladu sa podacima u literaturi (Konjević i sar., 2009; Mirjačić Martinović i sar., 2011). Smatra se da imunosupresivni citokini kao što su TGF- β 1 i IL-10 produkovani iz ćelija tumora, kao i iz Treg, MDSC i NKT limfocita imaju osnovnu ulogu da smanjuju produkciju IFN- γ iz NK ćelija tako što smanjuju ekspresiju ζ lanca na ovim ćelijama koji ima bitnu ulogu u prenosu signala vezanih za regulaciju efektorskih funkcija NK ćelija, pa samim tim i produkciju IFN- γ . Takođe, TGF- β 1 smanjuje produkciju IFN- γ iz NK ćelija tako što SMAD3 (*engl.* mothers against decapentaplegic homolog 3) transkripcioni faktor signalne putanje TGF- β 1 negativno reguliše sintezu brojnih signalnih molekula neophodnih za produkciju IFN- γ (Zwirner i Domaica, 2010; Lippitz, 2013). Takođe je poznato da Treg prvenstveno preko membranske forme TGF- β na svojoj površini smanjuju produkciju IFN- γ u NK ćelijama i favorizuju širenje tumora (Ghiringhelli i sar., 2005).

Takođe je u ovom radu pokazano da ne samo ukupne NK ćelije i njihova imunoregulatorna, CD3⁻CD56^{sjajno+} već i citotoksična CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacija produkuju IFN- γ i u ZK i MM bolesnika što je u potpunosti u skladu sa najnovijim saznanjima za ZK po kojima su CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije prvih nekoliko sati (2-4h) posle stimulacije odgovorne ne samo za citotoksičnost već i za produkciju citokina i hemokina što potvrđuje i postojanje konstitutivne iRNK za IFN- γ u ovoj subpopulaciji NK

ćelija (Fauriat i sar., 2010; De Maria i sar., 2011a; De Maria i Moretta, 2011b). Tako CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacija NK ćelija pored citolize ciljnih ćelija može istovremeno brzo da aktivira i druge ćelije urođene i adaptivne imunosti kako bi svi zajedno efikasnije eliminisali ćelije tumora. Ipak svojstvo CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelija da proizvode citokine je prolazno i završava se najviše 24h posle stimulacije NK ćelija. Tada ulogu preuzimaju CD56^{sjajno+} ćelije i poznato je da ova subpopulacija proizvodi IFN- γ konstantno u kasnijim fazama posle stimulacije NK ćelija (De Maria i sar., 2011a; De Maria i Moretta, 2011b). Međutim, još uvek nije poznato kako se lokus gena za IFN- γ različito reguliše u CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija.

Podaci o produkciji IFN- γ iz CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelija u ovom radu su po prvi put pokazani i u MM bolesnika. Međutim, u ovih bolesnika produkcija IFN- γ kako iz ukupnih NK ćelija tako i iz obe njihove subpopulacije je snižena u odnosu na ZK.

S druge strane, uporedo sa poznatim antitumorskim svojstvima IFN- γ , u novije vreme je sve više podataka i o protumorskim osobinama ovog citokina po kojima IFN- γ može da inhibira citotoksična svojstva NK ćelija i citotoksičnih CD8⁺ limfocita, a pospešuje razvoj Treg ćelija, MDSC i TAM-ova. Pokazano je da IFN- γ koga proizvode NK ćelije u odmakloj fazi razvoja tumora, povećava na površini ćelija melanoma ekspresiju neklasičnih MHC molekula I klase, HLA-G i HLA-E, koji inhibiraju funkciju NK ćelija i CD8⁺ limfocita vezujući se za njihov inhibicioni receptor, LIR-1 (ILT-2) (Balsamo i sar., 2012). Takođe, velike količine IFN- γ inhibiraju citotoksičnu funkciju NK ćelija tako što pospešuju sintezu imunosupresivnih faktora,IDO, L-kinurenina, kinurenične kiseline, COX-2, prostaglandina E₂ u ćelijama melanoma, a smanjuju ekspresiju i prezentaciju antigena ovog tumora, *Melan-A* i gp100 (Zaidi i Merlino, 2011).

Pretpostavlja se da uloga IFN- γ koja će u tumoru prevladati zavisi od prirode tumora, njegovog okruženja kao i komponenti signalnih putanja koje ovaj citokin pokrene. Potrebno je da se detaljnije ispituju molekularni mehanizmi dejstva ovog citokina i njihovi mehanizmi regulacije u antitumorskom imunskom odgovoru kako bi se unapredilo eventualno antitumorsko terapijsko dejstvo ovog citokina.

Citotoksični protein perforin ima značajnu ulogu u eliminaciji ćelija melanoma posredstvom NK ćelija, pre svega zato što, za razliku od CD8⁺ citotoksičnih limfocita,

praktično sve native, nestimulisane NK ćelije konstitutivno ispoljavaju iRNK i protein za perforin (Konjevic i sar., 1995). Tako je pokazano da osobe sa mutacijom gena za perforin imaju veću sklonost za razvoj melanoma (Trapani i sar., 2013). U ovom radu je pokazana smanjena ekspresija perforina kako u NK ćelijama tako i u njihovoj CD3⁻CD56^{potmulo+}, citotoksičnoj subpopulaciji što može biti povezano sa smanjenom citotoksičnošću i degranulacionim svojstvima ovih ćelija u bolesnika sa MM.

Još uvek je malo podataka o regulaciji sinteze perforina u NK ćelijama u fiziološkim uslovima, a posebno u tumoru. Pretpostavlja se da u uslovima hipoksije ćelije tumora povećano sintetišu i oslobađaju laktate, adenzin kao i egzosome koji direktno još uvek nepoznatim mehanizmima inhibiraju sintezu perforina u NK ćelijama, pa samim tim i njihovu citotoksičnost (Sarkar i sar., 2013; Baginska i sar., 2013).

Takođe je pokazano da je smanjeno ispoljavanje CD107a degranulacionog markera odgovorno i za poremećaj kretanja citotoksičnih granula kao i smanjen transport perforina u granule, a samim tim i nivo perforina, ali ne i granzima B, u samim granulama NK ćelija. U ćelijama koje nemaju CD107a, perforin ostaje van citotoksičnih granula, u transportnim vezikulama Goldžijevog aparata. Tako da usled smanjenja ekspresije CD107a molekula na NK ćelijama i citotoksičnoj CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji, što je u MM bolesnika pokazano u ovom radu, dolazi do smanjenja nivoa perforina u citotoksičnim granulama kao i poremećaja kretanja samih granula ka mestu sinapse NK i ciljne ćelije što dovodi do slabljenja citotoksičnosti NK ćelija i nemogućnosti lize ćelija melanoma (Krzewski i sar., 2013).

Takođe, u ovom radu je pokazana smanjena ekspresija STAT-1 transkripcionog faktora u NK ćelijama i obe njihove subpopulacije u MM bolesnika u odnosu na ZK osobe. Poznato je da su mnogi STAT signalni molekuli značajni regulatori transkripcije gena za perforin i IFN- γ u NK ćelijama (O'Shea i Plenge, 2012). Prema novijim podacima u ovim ćelijama geni za perforin i IRF-1 imaju mesto za vezivanje STAT-1 koji onda reguliše njihovu transkripciju, a samim tim i citotoksičnost i sintezu IFN- γ u NK ćelijama (Pipkin i sar., 2010; Vairo i sar., 2011; Cichocki i sar., 2013). Tako da poremećaj nivoa ovog signalnog molekula u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama može biti povezan sa oslabljenom citotoksičnom i imunoregulatornom funkcijom NK ćelija i njihovih

subpopulacija u bolesnika sa MM, što je u ovom radu pokazano. Na taj način, STAT-1 regulišući ekspresiju perforina i IFN- γ u NK ćelijama reguliše sposobnost NK ćelija da liziraju ćelije melanoma.

U ovom radu je po prvi put analizirana ekspresija obe subjedinice IL-12R, IL-12R β 1 i IL-12R β 2 na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u ZK i MM bolesnika. Pokazano je da MM bolesnici imaju sniženu ekspresiju IL-12R β 1 na CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji, a IL-12R β 2 na NK ćelijama i na obe ispitivane subpopulacije. IL-12 je citokin koga primarno proizvode APC i koji ima značajnu ulogu u uspostavljanju odnosa između ćelija urođene i adaptivne imunosti. IL-12 se veže za IL-12R β 1 i preko IL-12R β 2 subjedinice aktivira komponente JAK/STAT signalne putanje, i to pre svega STAT-4 koji reguliše transkripciju gena za perforin i IFN- γ (Yamamoto i sar., 2002). U osoba sa mutacijama gena za IL-12R β 1 i IL-12R β 2 opisana je pojava teških infekcija izazvanih, inače kod zdravih osoba, nepatogenim mikobakterijama i salmonelom. Na taj način je još jednom pokazano da obe subjedinice IL-12 receptora imaju veoma važnu ulogu u regulaciji efektorskih funkcija Th1 limfocita i NK ćelija, a posebno produkcije IFN- γ (Wu i sar., 2000; Ramirez-Alejo i sar., 2013). Tako da u MM bolesnika smanjena ekspresija IL-12R β 1 i IL-12R β 1 može da ima za posledicu smanjenu sposobnost vezivanja u *in vivo* uslovima IL-12 produkovanog iz APC aktiviranih tumorom za površinu NK ćelija, pa samim tim i smanjenu ekspresiju perforina, poremećenu citotoksičnost, a naročito smanjenu produkciju IFN- γ u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama, što je u ovom radu i pokazano, a što je u skladu sa novim podacima po kojima mutacije gena za obe subjedinice receptora za IL-12 mogu predisponirati razvoj brojnih tumora (Airoldi i sar., 2005; Cárdenes i sar., 2010).

U ovom radu je pokazano da procenat i apsolutni broj NK ćelija i njihovih subpopulacija nije statistički značajno različit u ZK i MM bolesnika. Ovaj nalaz pokazuje da poremećaj efektorskih funkcija NK ćelija, citotoksičnosti i produkcije IFN- γ , u MM bolesnika nije posledica promena u procentu i broju ovih ćelija i njihovih subpopulacija.

CD56 receptor, osnovni marker NK ćelija, je adhezivni molekul bitan u uspostavljanju veze između NK i ciljnih ćelija i dominantno je ispoljen na imunoregulatornoj CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji ovih ćelija. U ovom radu je pokazano da MM bolesnici u odnosu na ZK imaju smanjenu gustinu ekspresije CD56 receptora na NK

ćelijama i obe njihove subpopulacije. Smanjena ekspresija CD56 receptora mogla bi da bude znak procesa sazrevanja NK ćelija koje gubitkom ovog receptora iz nezrelih CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelija prelaze u potpuno funkcionalno zrele citotoksične CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije (Montaldo i sar., 2013). Međutim, kako u ovom radu nije nađena statistički značajna razlika u procentu i apsolutnom broju NK ćelija i njihovih subpopulacija između MM bolesnika i ZK, smanjenje ekspresije CD56 receptora se nije odrazilo na promene u distribuciji subpopulacija NK ćelija. S druge strane u literaturi nema podataka o funkcionalnim karakteristikama NK ćelija sa smanjeno ispoljenim CD56 receptorom. U jednom radu u HIV+ pacijenata pokazan je povećan broj CD56⁻ NK ćelija koje se odlikuju smanjenom citotoksičnošću i produkcijom citokina, kao i smanjenom ekspresijom aktivacionih NCR receptora, a povećanom ekspresijom inhibitornih KIR-ova (Mavilio i sar., 2005). Moguće objašnjene je da u ovoj virusnoj infekciji, a potencijalno i u tumoru hronično dejstvo antigena virusa ili tumora može dovesti do smanjene ekspresije CD56 i ostalih aktivacionih receptora NK ćelija što je dalje povezano sa poremećajem efektorskih funkcija ovih NK ćelija. S druge strane, prema najnovijim podacima pored NK ćelija i neke plazmocitne i mijeloidne DĆ ispoljavaju CD56 receptor na svojoj površini i imaju citotoksična svojstva (Roothans i sar., 2013). Takođe je poznato da je CD56 receptor ligand za receptor 1 faktora rasta fibroblasta (*engl.* fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) koji je konstitutivno ispoljen na perifernim fibroblastima i pretpostavlja se da je interakcija između ovog receptora na nezrelim CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama i FGFR1 na fibroblastima bitna u završnoj fazi sazrevanja NK ćelija koje funkcionalno i fenotipski diferenciraju u CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelije (Chan i sar., 2007). Na taj način bi promene u ekspresiji CD56 receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama mogle još uvek nepoznatim mehanizmima da utiču na regulaciju procesa sazrevanja ovih ćelija, kao i na regulaciju citotoksične aktivnosti funkcionalno zrelih NK ćelija.

NK ćelije ispoljavaju veliki broj aktivacionih i inhibitornih receptora na svojoj površini koji regulišu njihovu aktivnost. Iako su ovi receptori u velikoj meri dobro ispitani analiza njihove ekspresije na CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija u ZK, a posebno u bolesnika sa malignitetima praktično nije ispitana.

NKG2D je značajan receptor NK ćelija koji ima bitnu ulogu u aktivaciji ovih ćelija u borbi protiv tumora (Hayakawa, 2012). Antitumorska uloga NKG2D receptora uglavnom se zasniva na indukciji citotoksičnosti NK ćelija koja zavisi od perforina (Smyth i sar., 2004). U ovom radu je pokazano da MM bolesnici imaju statistički značajno sniženu ekspresiju NKG2D receptora na ukupnim NK ćelijama kao i na citotoksičnoj CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji što je u skladu sa brojnim novijim podacima u literaturi (Konjević i sar., 2009; Balsamo i sar., 2009; Mirjagic Martinovic i sar., 2011; Pietra i sar., 2012a; Mirjagic Martinovic i sar., 2014).

Razlozi za smanjenu ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama su mnogobrojni. Pokazano je da u hroničnom kontaktu između NKG2D receptora na NK ćelijama i njegovih liganada na ćelijama tumora dolazi do smanjenja ekspresije ovih liganada i sledstvenog smanjenja ekspresije NKG2D receptora, što je pre svega pokazano na ćelijama metastatskog melanoma (Paschen i sar., 2014). Takođe je pokazano da ovo smanjenje povlači sa sobom i slabljenje funkcije ostalih aktivacionih receptora NK ćelija, NKp46 i CD16 (Coudert i sar., 2008). Takođe se zna da preterana stimulacija NKG2D receptora ligandima na tumorskim ćelijama može dovesti i do apoptoze NK ćelija Fas/FasL zavisnim putem (Hanaoka i sar., 2010), a moguće je i intraćelijsko uvlačenje i razgradnja MIC liganada zbog njihovog učestalog vezivanja za NKG2D receptor, pa samim tim i smanjenja ekspresije ovog receptora na površini NK ćelija (Chen i sar., 2011). Pokazano je takođe da preterana aktivacija NKG2D receptora dovodi do povećanja proliferacije regulatornih NKG2D⁺CD4⁺ T ćelija koje proizvode IL-10 i TGF- β inhibiraju funkciju NK ćelija i T limfocita, a ispoljavanjem FasL dovode do apoptoze ovih ćelija (Groh i sar., 2006). Prema najnovijim podacima NK ćelije imaju sposobnost da od ćelija tumora preuzimaju ligande NKG2D receptora i samim tim postaju meta susednih NK ćelija (bratoubistvo NK ćelija) (Nakamuar i sar., 2013).

U ovom radu je takođe pokazano da u kontaktu sa ćelijskim tumorskim linijama K562, a posebno FemX-om, u ZK i naročito u MM bolesnika dolazi do smanjenja ekspresije NKG2D receptora kako na NK ćelijama tako i na citotoksičnoj, CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji. Uzrok za ovo smanjenje je ili direktan kontakt između NK i ćelija tumorskih linija, ili dejstvo egzozoma, koje proizvode ćelije mnogih tumora i

tumorskih linija. Egzozomi inhibiraju ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama ili takođe u direktnom kontaktu sa njima jer ispoljavaju ligande za NKG2D receptor na svojoj površini ili indirektno produkujom TGF- β (Clayton i sar., 2008; Filipazzi i sar., 2012). Zbog svog značaja u imunologiji tumora, a i jednostavne izolacije iz telesnih tečnosti, egzozomi bi mogli da imaju dijagnostički, ali i terapijski značaj (Filipazzi i sar., 2012; Clayton, 2012).

Pored produkcije iz egzozoma, TGF- β produkovan iz ćelija tumora kao i iz Treg, TAM, MDSC, NKT limfocita, kao i IL-4 produkovan iz Th2 limfocita snažno inhibiraju ekspresiju NKG2D receptora. Najsnažnije imunosupresivno dejstvo na NK ćelije ostvaruje membranski TGF- β na površini MDSC i Treg (Flavell i sar., 2010; Zwirner i Domaica, 2010). U tom smislu je u pacijenata sa karcinomom pluća i debelog creva pokazana smanjena ekspresija NKG2D receptora koja je bila u direktnoj korelaciji sa povećanom koncentracijom TGF- β u serumu ovih pacijenata. Takođe je pokazano da neutralizacija ovog citokina ne samo da dovodi do povećanja ekspresije NKG2D na NK ćelijama nego i do povećanja antitumorskog efekta ovih ćelija (Zwirner i Domaica, 2010; Lippitz, 2013). Prema novijim podacima TGF- β svoj supresivni efekat na ekspresiju NKG2D receptora u velikoj meri ostvaruje posredstvom mikroRNK-1245 (Espinoza i sar., 2012).

Takođe u procesu smanjenja ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama značajnu ulogu imaju i solubilni faktori i to solubilni ligandi NKG2D receptora koje povećano produkuju ćelije melanoma u uslovima hipoksije, kao i mnogobrojni metaboliti kao što su produktiIDO enzima, L-kinurenin i kinurenična kiselina ili proizvod COX-2 enzima, PGE₂ koje pored ćelija melanoma u velikoj meri produkuju i MDSC i Treg (Pietra i sar., 2012a; Balsamo i sar., 2012). Kako je IDO veoma bitan u mehanizmu imunosupresije izazvane tumorima, poslednjih godina se intenzivno ispituju IDO inhibitori koji bi u znatnoj meri povećali efikasnost antitumorske terapije (Sabado i Bhardwaj, 2013).

U ovom radu je takođe po prvi put pokazano da smanjenje ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama prati i smanjen nivo njegovog DAP10 adapterskog molekula u MNČPK MM bolesnika. Taj rezultat je u skladu sa najnovijim podacima po kojima je DAP10 molekul neophodan za ispoljavanje NKG2D receptora na površini NK ćelija, pa u slučaju da se DAP10 ne veže za svoj NKG2D, receptor će endocitozom biti uvučen u

citoplazmu ćelije i razgrađen (Park i sar., 2011). Razlozi za smanjenje nivoa DAP10 signalnog molekula u MM bolesnika su brojni. Poznato je da u uslovima stalnog kontakta sa ćelijama tumora dolazi do smanjenja sinteze ali i anergije DAP10 signalnog molekula što takođe sa sobom povlači smanjenu ekspresiju NKG2D receptora (Coudert i sar., 2008), a takođe se zna da TGF- β produkovan od strane ćelija tumora i imunosupresivnih ćelija preko svojih SMAD signalnih molekula smanjuje sintezu ovog signalnog molekula i na transkripcionom i na translacionom nivou (Lee, 2011).

Takođe je u ovom radu pokazano da u MM bolesnika, za razliku od ZK, ekspresija NKG2D receptora pozitivno koreliše sa citotoksičnom aktivnošću kao i sa ekspresijom CD107a degranulacionog markera na NK ćelijama. Ovim rezultatom se potvrđuje da smanjena ekspresija NKG2D receptora na NK ćelijama i citotoksičnoj CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji može da ima za posledicu smanjenu citotoksičnost i degranulacionu sposobnost NK ćelija u MM bolesnika. Na taj način je u ovom radu pokazano da aktivacioni NKG2D receptor ima veoma značajnu ulogu u regulaciji citotoksičnih svojstava NK ćelija u MM bolesnika.

Međutim u ovom radu nije pokazana statistički značajna povezanost između ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama i produkcije IFN- γ od strane ovih ćelija ni u ZK ni u MM bolesnika. Podaci o uticaju ovog receptora na drugu imunoregulatornu funkciju NK ćelija u humanoju populaciji, a pre svega u bolesnika sa tumorima, za razliku od rezultata dobijenih na ćelijskim linijama i u eksperimentalnim životinjama (Zafirova i sar., 2011), su malobrojni i još uvek u velikoj meri oprečni. Pokazano je da u miševa kod kojih je zbog mutacije DAP12 molekula aktivan samo DAP10 adapter, NKG2D receptorski kompleks aktivira samo citotoksičnost NK ćelija bez uticaja na produkciju citokina. U humanoju populaciji je takođe pokazano da NKG2D-DAP10 kompleks ima ulogu samo u povećanju citotoksičnosti NK ćelija bez uticaja na produkciju citokina. Međutim, pokazano je da kada NKG2D veže svoje solubilne ligande MICA, ULBP-1 ili ULBP-2, NK ćelije sekretuju brojne citokine i faktore rasta uključujući IFN- γ i GM-CSF. Takođe prema podacima Lanier i saradnika NKG2D-DAP10 receptorski kompleks može indukovati i produkciju citokina samo ako NKG2D receptor veže u velikoj koncentraciji svoje ligande visokim afinitetom (Lanier, 2008). Tako da najviše podataka ukazuje na to da simultani

prenos aktivacionih signala preko više udruženih aktivacionih receptora NK ćelija ima najveći značaj u potpunoj aktivaciji NK ćelija (Cichocki i sar., 2014). Smatra se da je NKG2D u kombinaciji sa NKp46 i DNAM-1 najznačajniji stimulator produkcije IFN- γ iz ovih ćelija (Morgado i sar., 2011).

Inhibitorni KIR receptori NK ćelija, CD158a i CD158b vezujući se za svoje ligande, MHC molekule I klase, imaju značajnu ulogu u inhibiciji citotoksične funkcije NK ćelija, ali, prema novim podacima, ovi receptori imaju ključnu ulogu i u regulaciji procesa razvoja i edukacije ovih ćelija (Rajalingam, 2011).

U ovom radu analizirana je ekspresija inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b, na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u njihovoj ekspresiji na ispitivanim ćelijama između ZK i MM bolesnika. Takođe je u ovom radu po prvi put pokazano da je i nivo transkripcije SHP-1, signalnog molekula inhibitornih KIR-ova, sličan u MNČPK ZK i MM bolesnika. Iz ovih rezultata bi se moglo zaključiti da su aktivacioni receptori NK ćelija i njihovi signalni molekuli mnogo osetljiviji i da predstavljaju potencijalnu metu za dejstvo imunosupresivnih faktora tumora i tumorske mikrosredine (Stojanovic i sar., 2013).

Suprotno rezultatima dobijenim u ovom radu, u literaturi ima podataka o povećanoj ekspresiji KIR receptora na NK ćelijama u bolesnika sa tumorima koja je odgovorna za inhibiciju citotoksične funkcije NK ćelija u ovih bolesnika (Naumova i sar., 2007; Konjevic i sar., 2009; Al Omar i sar., 2011). Tako da se može zaključiti da je regulacija ekspresije KIR receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u bolesnika sa tumorom vrlo složena i odvija se na više različitih nivoa.

U ovom radu je uočeno (rezultati nisu prikazani) povećanje procenta CD3⁻CD56^{sjajno+}CD158b⁺ ćelija u MM bolesnika u odnosu na ZK. Poznato je da ne samo u sekundarnom limfnom tkivu, već i u perifernoj krvi postoji mali procenat (<10%) CD3⁻CD56^{sjajno+}CD158b⁺ ćelija za koje se smatra da imaju mogućnost za dalju diferencijaciju ka potpuno zreloj CD3⁻CD56^{potmulo+}CD158⁺ subpopulaciji NK ćelija u petoj, završnoj fazi razvoja ovih ćelija (Montaldo i sar., 2013). Međutim u ovom radu nije nađena razlika u procentu ovih zrelih CD3⁻CD56^{potmulo+}CD158b⁺ ćelija između ZK i MM bolesnika. Poznato je da metastatske ćelije tumora vršeći invaziju na različite lokalizacije među kojima su i one

u kojima se odvijaju procesi razvoja i sazrevanja NK ćelija (na primer limfni čvorovi) inhibiraju ove procese i ne dozvoljavaju potpuno funkcionalno sazrevanje NK ćelija (Fregni i sar., 2012). Prema najnovijim podacima pretpostavlja se da u *in vivo* uslovima TGF- β , produkovan iz ćelija melanoma, inhibira diferencijaciju CD3⁻CD56^{sjajno+} u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciju NK ćelija. Normalan razvoj NK ćelija iz CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁻ subpopulacije do zrele, krajnje diferentovane CD3⁻CD56^{potmulo+}CD16⁺ subpopulacije odvija se preko male CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁺ subpopulacije. Pokazano je da TGF- β onemogućava ovaj proces tako što zrelije CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁺ ćelije vraća u početne, potpuno nezrele CD3⁻CD56^{sjajno+}CD16⁻ ćelije (Allan i sar., 2010). Takođe je poznato da tokom diferencijacije NK ćelija nezrele CD3⁻CD56^{sjajno+} ćelije gube CD62L adhezivni molekul, a na svojoj površini povećano ispoljavaju CD16 i CD158 receptore i marker potpune diferencijacije, CD57 i prelaze u zrele CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelije (Juelke i sar., 2010). Prema najnovijim podacima poremećaj ovog procesa uočen je kod deteta obolelog od melanoma sa teškom gljivičnom infekcijom pluća za koju se pretpostavlja da je nastala usled neadekvatnog sazrevanja NK ćelija i smanjenog broja zrele, CD3⁻CD56^{potmulo+}, citotoksične subpopulacije (Domaica i sar., 2012).

Dobro je poznato da su CD158a i CD158b značajni inhibicioni receptori NK ćelija koji vezujući se za svoje ligande MHC molekule I klase inhibiraju citotoksičnu funkciju ovih ćelija. Takođe se zna da ovi receptori preko svog signalnog molekula, SHP-1, odnosno njegovog transkripta koga reguliše promotor II koji inhibira transkripciju STAT-1 i IRF-1 gena, inhibiraju produkciju IFN- γ iz NK ćelija (Tsui i sar., 2006; Christophi i sar., 2008; Christophi i sar., 2009). Međutim, u ovom radu nije pokazana statistički značajna korelacija između ekspresije CD158b receptora, najzastupljenijeg KIR receptora NK ćelija i citotoksičnosti, degranulacionog kapaciteta kao ni produkcije IFN- γ iz NK ćelija. Ovaj rezultat se može objasniti time da pored uloge u inhibiciji efektorskih funkcija NK ćelija, KIR receptori imaju značajnu ulogu i u regulaciji složenih procesa razvoja, edukacije i tolerancije NK ćelija.

U ovom radu je prvi put predstavljena analiza ekspresije različitih receptora i molekula koji regulišu citotoksičnu i imunoregulatornu funkciju NK ćelija u bolesnika sa različitim lokalizacijama udaljenih metastaza u melanomu. Ova analiza je pokazala da

bolesnici koji pripadaju M1c grupi sa najlošijom prognozom prema AJCC sistemu klasifikacije imaju značajno nižu ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama u odnosu na bolesnike koji su uvršćeni u M1a+1b grupu sa boljom prognozom. Ovaj rezultat još jednom potvrđuju značaj NKG2D receptora koji bi mogao da predstavlja kako biomarker koji ukazuje na progresiju tumora tako i indikator prognoze u bolesnika sa metastatskim melanomom.

U ovom radu je pokazano da NK ćelije periferne krvi bolesnika sa metastatskim melanomom imaju smanjenu citotoksičnu aktivnost prema senzitivnoj K562 tumorskoj ćelijskoj liniji, smanjenu sposobnost degranulacije merenu ekspresijom CD107a degranulacionog markera, a takođe i poremećenu imunoregulatornu funkciju koja se ogleda smanjenom produkcijom IFN- γ iz NK ćelija i obe njihove subpopulacije. Takođe, analiza molekula vezanih za efektorske funkcije NK ćelija kao što su perforin, STAT-1, IL-12R β 1, IL-12R β 2, CD56 pokazala je njihovu sniženu ekspresiju kako na NK ćelijama tako i na njihovim subpopulacijama u MM bolesnika u odnosu na ZK. Analiza receptora NK ćelija i njihovih signalnih molekula ukazuje na to da su aktivacioni NKG2D receptor kao i njegov DAP10 signalni molekul značajno sniženi u MM bolesnika u odnosu na ZK za razliku od ekspresije inhibitornih KIR-ova, CD158a i CD158b i njihovog SHP-1 signalnog molekula čija je ekspresija slična u ZK i MM bolesnika. Pokazano je takođe da snižena ekspresija NKG2D receptora na NK ćelijama pozitivno koreliše sa takođe sniženom citotoksičnošću i degranulacionim kapacitetom NK ćelija u MM bolesnika što potvrđuje veliki značaj NKG2D receptora u regulaciji citotoksičnosti NK ćelija. Ovi rezultati ukazuju na to da imunosupresivni faktori poreklom iz ćelija tumora i njihovog okruženja inhibiraju efektorske funkcije NK ćelija, citotoksičnost i produkciju IFN- γ , smanjujući ekspresiju značajnih efektorskih molekula koji regulišu te funkcije kao i ekspresiju aktivacionog NKG2D receptora i njegovog DAP10 signalnog molekula.

Poznato je da se T limfociti u perifernoj krvi, a pre svega u tkivu tumora, zbog svoje oslabljene funkcionalne aktivnosti i izmenjenog fenotipa u odnosu na T limfocite zdravih osoba označavaju kao funkcionalno i fenotipski iscrpljeni („exhausted“ T limfociti) (Stojanovic i sar., 2013). Prema najnovijim podacima ovaj pojam bi se mogao primeniti i na NK ćelije (Stojanovic i sar., 2013), što je u ovom radu i pokazano s obzirom na

oslabljene funkcionalne karakteristike NK ćelija i njihovih subpopulacija u MM bolesnika i smanjenu ekspresiju NKG2D, ključnog aktivacionog receptora NK ćelija. Takođe, pored T limfocita, pokazano je da funkcionalno iscrpljene NK ćelije, pre svega u tkivu tumora, na svojoj površini povećano ispoljavaju veliki broj inhibitornih receptora poput PD-1, CTLA-4, a u manjoj meri LAG-3, CD160 koji dodatno inhibiraju funkciju NK ćelija (Stojanovic i sar., 2013). U tom smislu bi terapijska aktivacija stimulatornih receptora uz blokiranje inhibitornih receptora NK ćelija mogla da ima veliki značaj u povećanju antitumorskih svojstava NK ćelija. Tako se kroz kliničke studije I faze ispituje efekat anti-KIR antitela, a od 2013. godine evropska agencija za lekove (EMA) odobrila je anti-CTLA-4 antitelo (ipilimumab) kao prvu liniju terapije za bolesnike sa uznapredovalim melanomom, dok se terapija anti-PD-1 antitelom intenzivno ispituje (Cheng i sar., 2013). Takođe u mnogim istraživanjima ispituju se efekti različitih agenasa koji ili povećavanjem ekspresije liganada NKG2D receptora na ćelijama tumora (inhibitori histon deacetilaze, demetilirajući agensi) ili inhibicijom oslobađanja solubilnih liganada ovog receptora (sorafenib) povećavaju citotoksičnost NK ćelija (Chretien i sar., 2014).

U ovom radu analiziran je 18h *in vitro* efekat citokina IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na citotoksičnu aktivnost NK ćelija u ZK i MM bolesnika. Pokazano je da u ZK svi ispitivani citokini statistički značajno povećavaju citotoksičnost NK ćelija, kao i kod MM bolesnika, kod kojih jedino IL-18 nije imao statistički značajnog uticaja na citotoksičnost. Rezultati koji se odnose na dejstvo, pre svega, IL-2, IL-12 i kombinacije IL-12 i IL-18 na citotoksičnost NK ćelija u ZK su očekivani i u skladu su sa podacima u literaturi (Lauwerys i sar., 1999; Wang i sar., 2000; Fehniger i sar., 2000; Singh i sar., 2000; Konjevic i sar., 2010a). Poznato je da NK ćelije na svojoj površini ispoljavaju receptore visokog afiniteta za ove citokine tako da oni povećavaju citotoksičnost NK ćelija povećavanjem transkripcije i translacije gena za perforin, granzime, FasL, TRAIL ili direktno ili indirektno preko STAT transkripcionih faktora (Smyth i sar., 2004; Zwirner i Domaica, 2010). Mnogo je manje podataka u literaturi o dejstvu svih ovih ispitivanih citokina na NK ćelijsku aktivnost u bolesnika sa tumorom (Lotzova i sar., 1987; Epling-Burnette i sar., 2007; Konjevic i sar., 2010b). Tako da pored radova koji opisuju efekat IL-2 (Konjevic i sar., 2007, Konjevic i sar., 2010b) u literaturi nema podataka o uticaju IL-12,

IL-18 i njihove kombinacije, na citotoksičnost NK ćelija u bolesnika sa metastatskim melanomom.

U ovom radu je pokazano da u zdravih osoba IL-18 statistički značajno povećava citotoksičnu aktivnost NK ćelija, ali je njegov efekat u odnosu na ostale ispitivane citokine najmanji. Podaci o uticaju IL-18 na citotoksičnost NK ćelija u ZK su još uvek neusaglašeni, ali postoje podaci koji ukazuju na to da native NK ćelije ispoljavaju nizak, ali još uvek merljiv nivo IL-1Rrp, značajne komponente IL-18R, čija se ekspresija na površini NK ćelija povećava pod dejstvom IL-12 ili IL-15 (Fehniger i sar., 1999). Rezultati dobijeni u ovom radu u skladu su sa ovim podacima. Takođe, pored direktnog dejstva na citotoksičnost NK ćelija, IL-18 ima mnogo veći značaj u procesu „prajmovanja“ NK ćelija (Jaeger i sar., 2012), „komunikaciji“ između NK ćelija i DC (Chijioko i Münz, 2013), kao i zaštiti NK ćelija od samo-destrukcije jer dovodi do inhibicije kaspaze-3 i povećanja ekspresije brojnih anti-apoptopskih molekula (Hodge i sar., 2006).

Uloga IL-18 u regulaciji anti-tumorske aktivnosti NK ćelija još uvek je nejasna i smatra se da u velikoj meri zavisi od odnosa različitih signala koje NK ćelije primaju pod dejstvom ovog citokina kao i faktora mikrosredine tumora. Prema najnovijim podacima, IL-18 indukuje stvaranje takozvanih „pomoćničkih NK ćelija“ koje proizvode hemokine CCL3 i CCL4 pod dejstvom ćelija tumora ili proinflamatornih citokina aktiviraju nezrele DC, koje takođe proizvode brojne hemokine, CXCL9, CXCL10, CCL5, čija je uloga da privuku efektorske CD8⁺ limfocite u tumorsko okruženje (Wong i sar., 2013). Takođe, prema najnovijim podacima, CD14⁺ monociti tretirani IL-18 razvijaju se u CD3⁻ CD56^{sjajno+} CD11c⁺ imunoregulatorne ćelije koje imaju ulogu da aktiviraju $\gamma\delta$ T limfocite u borbi protiv tumora (Li i sar., 2013).

Poznato je da IL-18 u melanomu pokazuje imunosupresivna svojstva tako što povećava ekspresiju Fas liganda na površini ćelija tumora koje onda vezujući se za Fas na ćelijama imuniteta dovode do njihove apoptoze (Cho i sar., 2000). Takođe, postoje podaci da je u serumu bolesnika sa melanomom izmerena visoka koncentracija IL-18 koja može da uzrokuje defekte u efektorskim funkcijama NK ćelija i da dovede do metastatskog širenja bolesti (Dinarello i sar., 2013). Takođe je u mišjem modelu pokazano da je IL-18 koga proizvode ćelije tumora odgovoran za širenje B16F10, ćelijske linije melanoma miša,

mehanizmom koji je zavisan od PD-1. Ovim putem IL-18 dovodi do diferencijacije konvencijalnih Kit⁻CD11b⁻ NK ćelija u Kit⁺ NK ćelije koje imaju imunosupresivne karakteristike jer značajno ispoljavaju PD-1 ligand na svojoj površini. Vezujući se za PD-1 na DC, ove Kit⁺ NK ćelije eliminišu DC iz sekundarnih limfnih organa i na taj način sprečavaju značajan uticaj DC na potpuno funkcionalno sazrevanje NK ćelija u borbi protiv tumora (Terme i sar., 2011; Terme i sar., 2012).

U skladu sa rezultatima koji se odnose na *in vitro* efekat ispitivanih citokina na citotoksičnost NK ćelija su i u ovom radu po prvi put prikazani rezultati koji opisuju uticaj ispitivanih citokina na ekspresiju CD107a degranulacionog markera na NK ćelijama i njihovim populacijama. Tako da je u ovom radu pokazano da u ZK svi ispitivani citokini statistički značajno povećavaju ekspresiju ovog molekula na NK ćelijama i njihove obe subpopulacije što je u skladu sa podacima u literaturi (Tomescu i sar., 2009; Heidemann i sar., 2010), dok u MM bolesnika, jedino IL-18 nije imao statistički značajnog uticaja na ekspresiju ovog molekula, inače markera citotoksičnosti NK ćelija. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 predstavljaju najznačajnije stimulatore citotoksičnosti i degranulacije NK ćelija i u ZK i MM bolesnika.

Poznato je da IL-2 i IL-12 povećavaju citotoksičnost NK ćelija prvenstveno povećavanjem sinteze efektorskog molekula perforina, dok IL-18 svoj efekat ostvaruje posredstvom FasL i TRAIL-a (Smyth i sar., 2004). U skladu sa tim rezultatima u ovom radu je pokazano da IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 visoko statistički značajno povećavaju ekspresiju perforina u ukupnim NK ćelijama i obe njihove subpopulacije u ZK, dok je u MM bolesnika jedino izostao efekat ovih citokina na povećanje ekspresije perforina u imunoregulatornoj, CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji. Očekivano, IL-18 nije imao statistički značajnog uticaja na ekspresiju perforina u NK ćelijama i njihovim subpopulacijama i u ZK i MM bolesnika. Pored pozitivnog dejstva u *in vitro* uslovima i *in vivo*, IL-2, IL-12 i IL-18, produkovani iz različitih ćelija imuniteta pod dejstvom tumora ili čak iz samih ćelija tumora mogu ostvariti stimulatorni efekat na citotoksičnost NK ćelija.

U ovom radu je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika u nivou povećanja citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom svih ispitivanih citokina između ZK i MM bolesnika. Ipak, uočeno je da najbolji efekat u grupi MM bolesnika ostvaruju IL-2 i

kombinacija IL-12 i IL-18. U ovom radu je potvrđeno da je IL-2 moćan *in vitro* stimulator citotoksičnosti NK ćelija u MM bolesnika što je u skladu sa njegovom zvaničnom upotrebom u terapiji bolesnika sa metastatskim melanomom i pored brojnih neželjenih efekata koje ispoljava (Liao i sar., 2013). Takođe, novi rezultati dobijeni u miševa u *in vivo* uslovima i u humanoj populaciji *in vitro* pokazuju da NK ćelije prethodno aktivirane IL-12 i IL-15 i IL-18 u kombinaciji, posle dejstva IL-2 iz Th1 limfocita *in vivo* ili egzogenog IL-2, *in vitro*, ubrzano proliferišu i imaju pojačane efektorske funkcije što se ogleda u povećanoj sintezi perforina i granzima i pre svega značajnoj produkciji IFN- γ (Ni i sar., 2012). Prema najnovijim podacima ovim citokinima kao, i IL-12 i IL-18, u kombinaciji, prethodno stimulisane NK ćelije povećano ispoljavaju CD25 receptor na svojoj površini i to je razlog njihove ubrzane proliferacije i aktivacije pod dejstvom IL-2 (Ni i sar., 2012; Leong i sar., 2014). Takođe, prema najnovijim podacima ove ćelije su i dugoživeće i imaju osobine memorijskih NK ćelija (Romee i sar., 2012; Leong i sar., 2014). Tako da prethodno izneti podaci, kao i podaci dobijeni u ovom radu o efikasnosti kombinacije IL-12 i IL-18 u povećanju citotoksičnosti NK ćelija, daju mogućnost da se razmatra upotreba citokinima, IL-12 i IL-18, prethodno stimulisanih NK ćelija za adoptivni transfer u imunoterapiji NK ćelijama u melanomu. S druge strane, u literaturi su rezultati o upotrebi IL-2 u ovoj terapiji oprečni, pa su tako Parkhurst i saradnici pokazali neefikasnost adoptivnog transfera autologih NK ćelija stimulisanih IL-2 u bolesnika sa solidnim tumorima (Parkhurst i sar., 2011), za razliku od pozitivnih rezultata drugih autora (Pegram i sar., 2010). Pretpostavlja se da su razlike u efikasnosti IL-2 nastale zbog različitih eksperimentalnih protokola.

U ovom radu je po prvi put pokazano da MM pacijenti svrstani po lokalizaciji udaljenih metastaza u M1a+b grupu sa boljom prognozom prema AJCC sistemu klasifikacije (Balch i sar., 2009) imaju statistički značajno veće povećanje citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom IL-2 i kombinacije IL-12 i IL-18 u odnosu na bolesnike sa lošijom prognozom u M1c grupi. Tako da bi bolesnici sa boljom prognozom mogli da predstavljaju ciljnu grupu za adoptivnu imunoterapiju NK ćelijama prethodno stimulisanim IL-2 i kombinacijom IL-12 i IL-18.

Poznato je da su IL-12 i IL-18 u kombinaciji najznačajniji stimulatori produkcije IFN- γ iz NK ćelija i Th1 limfocita. Pored poznatih podataka o ulozi ovih citokina u

indukciji memorijskih NK ćelija (Ni i sar., 2012; Romee i sar., 2012), *in vitro* eksperimenti su takođe pokazali da i needucovane, anergične NK ćelije pod dejstvom IL-12 i IL-18 proizvode znatne količine IFN- γ i dobijaju osobine funkcionalnih NK ćelija (Yokoyama and Kim, 2006).

Za razliku od ZK kod kojih IL-12 i IL-18 u kombinaciji povećavaju produkciju IFN- γ ne samo u NK ćelijama već i u obe njihove subpopulacije, u MM bolesnika ovi citokini jedino su doveli do statistički značajnog povećanja produkcije ovog citokina u imunoregulatornoj, CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji, ali na znatno nižem nivou. Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da i posle 18h *in vitro* stimulacije MNČPK citokinima IL-12 i IL-18 u kombinaciji, citotoksične, CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelije proizvode određenu količinu IFN- γ i u ZK i MM bolesnika, ali je ta produkcija, očekivano, veća u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji. Tako da posle duže *in vitro* stimulacije ovim citokinima imunoregulatorna funkcija citotoksične populacije slabi i njenu ulogu očekivano preuzimaju CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelije. Ovi rezultati su u skladu sa podacima po kojima kada se NK ćelije stimulišu, pre svega citokinima IL-12 i IL-18, CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelije rano počinju da proizvode IFN- γ i da se ta njihova uloga održava, odnosno perzistira i do 24h (Fauriat i sar., 2010). Takođe, u literaturi je pokazano da u ZK osoba pored CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije koja dominantno proizvode IFN- γ posle tretmana NK ćelija kombinacijom IL-12 i IL-18, postoji određeni, manji procenat CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelija koje ispoljavaju inhibitorski NKG2A receptor i takođe proizvode IFN- γ . Poznato je da su ove ćelije još uvek nezrele i da predstavljaju prelaznu subpopulaciju između više nezrelih CD3⁻CD56^{sjajno+} KIR⁻NKG2A⁺ i potpuno zrelih CD3⁻CD56^{potmulo+} KIR⁺NKG2A⁻ ćelija (Béziat i sar., 2010).

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na to da je osim u imunoregulatornoj CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji produkcija citokina u ukupnim NK ćelijama i CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji poremećena u MM bolesnika. Takođe ove rezultate potvrđuje i nalaz statistički značajno smanjene produkcije IFN- γ iz MNČPK prethodno stimuliranih 48 h kombinacijom IL-12 i IL-18 u MM bolesnika u odnosu na zdrave kontrole.

Regulacija sinteze i produkcije IFN- γ u NK ćelijama i Th1 limfocitima je složena i uključuje integraciju različitih signalnih puteva kao i različite nivoe regulacije unutar

jednog signalnog puta (Cichocki i sar., 2013). Prema najnovijim podacima mikroRNK imaju značajnu ulogu u regulaciji produkcije IFN- γ bilo direktno, bilo indirektno regulišući STAT-4 transkripcioni molekul. Pretpostavlja se da su najznačajnije 3 porodice mikroRNK i to: miR-155, miR-29 i miR-15/16 od kojih miR-155 ima najveći značaj (Trotta i sar., 2012; Sullivan i sar., 2013). miR-155 je slabo ispoljena u neaktiviranim perifernim mišjim i humanim NK ćelijama dok se njena ekspresija značajno povećava posle stimulacije ovih ćelija kombinacijom IL-12 i IL-18. Pokazano je da miR-155 direktno ili preko povećano ispoljenog STAT-4 transkripcionog faktora inhibira SHIP-1 fosfatazu (Sullivan i sar., 2013), a takođe povećava ekspresiju STAT-1 molekula koji preko IRF-1 transkripcionog faktora indukuje produkciju IFN- γ u NK ćelijama (Trotta i sar., 2012; Sullivan i sar., 2013). Međutim, još uvek je puno nepoznanica o ulozi miR-155 molekula u regulaciji funkcija NK ćelija pre svega u borbi protiv infekcije i tumora. Takođe se postavlja pitanje da li je SHIP-1 jedina meta miRNK.

Kako je STAT-4 bitan regulator produkcije IFN- γ iz Th1 limfocita i NK ćelija stimuliranih kombinacijom IL-12 i IL-18 (Thierfelder i sar., 1996), u ovom radu je po prvi put pokazano da MM bolesnici u odnosu na ZK imaju statistički značajno niže povećanje sinteze ovog proteina u svojim MNČPK pod dejstvom ovih citokina što ima direktan uticaj na smanjenje produkcije IFN- γ iz ovih ćelija pod dejstvom kombinacije IL-12 i IL-18. S druge strane pored određenog broja podataka o ekspresiji STAT-4 proteina u ćelijama miševa (Kaplan i sar., 1996), ćelijskim linijama (Strengell i sar., 2003; Lupov i sar., 2006; Zhang i sar., 2008b) ili humanim NK ćelijama zdravih kontrolnih osoba (Strengell i sar., 2003; Lupov i sar., 2006; Zhang i sar., 2008b), veoma je malo podataka o ekspresiji STAT-4 proteina u limfocitima bolesnika obolelih od tumora (Lupov i sar., 2006).

I pored značajne uloge u regulaciji produkcije IFN- γ , u ovom radu je pokazano da nema značajne razlike u nivou transkripcije IRF-1 signalnog molekula u MNČPK stimuliranih kombinacijom IL-12 i IL-18 između MM bolesnika i ZK. U literaturi je mnogo manje podataka o ekspresiji i ulozi ovog signalnog molekula u limfocitima obolelih od tumora (Konjevic i sar., 2007; Konjevic i sar., 2010b; Konjevic i sar., 2012b), za razliku od podataka koji su za IRF-1 dobijeni u tkivu tumora. Prema najnovijim podacima IRF-1 molekul povećano ispoljen u tkivu tumora je značajan stimulator

nakupljanja NK ćelija u tom tkivu. Pokazano je da ćelije tumora pod dejstvom IRF-1 povećano ispoljavaju CXCL11 hemokin na svojoj površini koji dovodi do povećanog nakupljanja NK ćelija u ovom tkivu jer one ispoljavaju CXCR3 receptor. Takođe je pokazano da je indukovani IRF-1 u ćelijama tumora pluća miša odgovoran za povećano ispoljavanje liganada DNAM-1 aktivacionog koreceptora NK ćelija, kao i TRAIL-a i sledstveno aktiviranje NK ćelija. Tako da i minimalno povećanje ekspresije IRF-1 u ćelijama tumora dovodi do inhibicije razvoja metastaza i povećanog preživljavanja, a za mnoge citokine je pokazano da povećavaju transkripciju IRF-1 (Ksienzyk i sar., 2012). Takođe prema nekim autorima postoje najmanje 2 imunofenotipa melanoma: jedan tzv. Th17 fenotip povezan sa povećanom sintezom STAT-3 i TGF- β u tkivu melanoma, koji se odlikuje slabijom diferencijacijom i lošom prognozom i Th1 fenotip koga karakteriše povećana ekspresija komponenti IFN- γ signalne putanje, odnosno STAT-1/IRF-1 transkripcionih faktora, koji je bolje diferentovan i odlikuje se boljom prognozom (Spivey i sar., 2012). Iz svih navedenih razloga analiza transkripcije IRF-1 u tkivu tumora, ali i u MNČPK bolesnika obolelih od melanoma mogla bi da ima veliki značaj jer bi IRF-1 mogao da posane novi ciljni molekul u terapiji tumora.

U ovom radu je pokazano da nijedan od ispitivanih citokina nije imao uticaj na procenat i apsolutni broj NK ćelija i njihovih subpopulacija u ZK i MM bolesnika. Mali je broj podataka u literaturi o distribuciji receptora za citokine na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama. Poznato je da CD3⁻CD56^{sjaj^{no+}} NK ćelije imaju veću ekspresiju receptora za brojne citokine kao što su IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, tako da ove ćelije imaju veliku sposobnost proliferacije pod dejstvom ovih citokina (Cooper i sar., 2001a). Izostanak ovog efekta u ovom radu se može objasniti time da je potrebna duža inkubacija MNČPK ispitivanim citokinima od primenjene (18h) da bi oni doveli do proliferacije NK ćelija (Cooper i sar., 2001a).

Za razliku od ovih rezultata, u ovom radu je pokazano da IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 povećavaju ekspresiju CD56 receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u ZK i u MM bolesnika. Ovi rezultati mogli bi da predstavljaju novi mehanizam kojim ovi citokini, povećavanjem ekspresije CD56 receptora, povećavaju aktivnost NK ćelija u borbi protiv melanoma. Tako da IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-

18 povećavajući ekspresiju CD56 receptora, povećavaju kapacitet NK ćelija u vezivanju za ćelije melanoma i tako indirektno povećavaju njihovu citotoksičnost.

U ovom radu su dati sasvim novi rezultati o 18h *in vitro* efektu svih ispitivanih citokina na ekspresiju aktivacionog NKG2D i inhibitornih KIR receptora na površini NK ćelija i njihovih CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija u ZK i MM bolesnika.

Analizirajući ekspresiju aktivacionog NKG2D receptora u ovom radu je pokazano da IL-2 povećava ekspresiju ovog receptora na NK ćelijama i obe njegove subpopulacije samo u ZK što je u skladu sa rezultatima u literaturi (Zhang i sar., 2005a; Baeriswyl i sar., 2006; Zwirner i Domaica, 2010), dok IL-12 i IL-18 pojedinačno nemaju uticaja na ekspresiju NKG2D receptora ni u ZK ni u MM bolesnika. Podaci o uticaju IL-12 na ekspresiju ovog receptora na NK ćelijama su još uvek oprečni tako da postoje studije (Smyth i sar., 2004; Zhang i sar., 2008b) u kojima je nađeno da ovaj citokin povećava ekspresiju NKG2D receptora, dok nekoliko radova pokazuje izostanak tog efekta (Marcenaro i sar., 2005; Girart i sar., 2007). Smatra se da efekat IL-12 na ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama u velikoj meri zavisi od eksperimentalnih uslova, koncentracije ovog citokina i vremena inkubacije. Prema Smyth-u i njegovim saradnicima IL-2, IL-12 samostalno ili u kombinaciji sa IL-18, za razliku od samog IL-18, povećavajući ekspresiju NKG2D receptora, povećavaju sintezu perforina i citotoksičnu aktivnost NK ćelija (Smyth i sar., 2004), što je u ovom radu pokazano kao efekat IL-2 u ZK. Takođe prema Smyth-u, IL-18 ne pokazuje efekat na ekspresiju NKG2D receptora i povećanje citotoksičnosti NK ćelija ostvaruje Fas-FasL zavisnim putem. Tako da bi se očekivalo u bolesnika sa tumorom da pre svega IL-2 i IL-12 koji povećavaju citotoksičnost NK ćelija stimulacijom sinteze perforina pokazuju bolji efekat u tumorima koji ispoljavaju ligande za NKG2D receptor. Međutim u ovom radu je pokazano da u MM bolesnika i pored povećanja ekspresije perforina i citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom IL-2 i IL-12 ovi citokini nemaju statistički značajnog uticaja na ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama. Poznato je da niz imunosupresivnih faktora u tumoru poput dejstva fibroblasta, membranskog TGF-β,IDO metabolita i PGE₂ značajno smanjuju ekspresiju NKG2D receptora, što je u ovom radu i pokazano na sveže izolovanim NK ćelijama u MM bolesnika, i tim putem onemogućavaju ispoljavanje stimulatornog efekta

IL-2 na ekspresiju ovog receptora (Flavell i sar., 2010; Zwirner i Domaica, 2010; Pietra i sar., 2012a). Tako da bi neutralizacija svih pomenutih imunosupresivnih faktora bila od značaja u pospešivanju efekta IL-2 u terapiji metastatskog melanoma (Zwirner i Domaica, 2010; Lippitz, 2013).

U ovom radu je pokazan najkompleksniji *in vitro* uticaj kombinacije IL-12 i IL-18 na ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama. Ovi citokini su u MM bolesnika doveli do statistički značajnog smanjenja ekspresije NKG2D receptora kako na NK ćelijama, tako i na obe njihove subpopulacije, dok je u ZK to smanjenje evidentno, ali još uvek nije statistički značajno. Kako su IL-12 i IL-18 u kombinaciji različitim mehanizmima najsnažniji stimulatori produkcije IFN- γ , pretpostavlja se da bi ovaj citokin mogao da ima ulogu u smanjenju ekspresije NKG2D receptora. Prema rezultatima u literaturi u NK ćelijama zdravih kontrola i humanim NK ćelijskim linijama pokazano je da IFN- γ dovodi do statistički značajnog sniženja ekspresije NKG2D, a povećanja ekspresije inhibitornih NKG2A/B i KIR2DL1 receptora (Zhang i sar., 2005b). Takođe je na modelu humanih ćelijskih linija melanoma pokazano da IFN- γ preko STAT1 signalne putanje smanjujući ekspresiju MICA liganada smanjuje ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama (Schwinn i sar., 2009). Zatim, prema najnovijim rezultatima solubilni MICA ligandi, inače povećano prisutni u serumu bolesnika sa metastatskim melanomom, zajedno sa povećanom produkcijom IFN- γ iz NK ćelija koje su *in vitro* stimulisane IL-12 i IL-18 smanjuju ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama (Boukouaci i sar., 2013). Tako da povećana produkcija IFN- γ iz NK ćelija i njihovih subpopulacija stimulisanih kombinacijom IL-12 i IL-18 u ZK i iz imunoregulatorne CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije u MM bolesnika, što je u ovom radu pokazano u *in vitro* uslovima, uz moguće povećan nivo solubulnih MICA liganada i TGF- β *in vivo* u bolesnika sa MM mogu biti odgovorni za statistički značajno nižu ekspresiju NKG2D receptora u MM bolesnika i statistički još uvek neznačajno, ali primetno sniženje ovog receptora u ZK. U MM bolesnika ovaj rezultat bi mogao da predstavlja novi mehanizam izbegavanja imunskog odgovora u tumoru po kome zbog smanjene ekspresije NKG2D receptora NK ćelije slabije liziraju ćelije melanoma koje ispoljavaju ligande za ovaj receptor.

Prema rezultatima dobijenim u ovom radu povećanje citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom IL-12 i kombinacije IL-12 i IL-18 u ZK i MM bolesnika ne postiže se preko NKG2D receptora. Pored NKG2D, dobro je poznata uloga drugih aktivacionih receptora kao što su NCR i DNAM-1 u aktivaciji NK ćelija protiv melanoma (Morgado i sar., 2011), tako da se danas zna da je potrebna kombinacija aktivacionih signala iz više stimulatornih receptora NK ćelija da bi one bile potpuno funkcionalno aktivne u tumoru (Cichocki i sar., 2014). Za razliku od MM bolesnika u ovom radu je pokazano da u ZK povećano ispoljen NKG2D receptor na NK ćelijama pod dejstvom IL-2 pozitivno koreliše sa indukovanom citotoksičnošću ovih ćelija pod dejstvom ovog citokina, što potvrđuje da u ZK IL-2 preko NKG2D receptora povećava sintezu perforina kao i citotoksičnost NK ćelija.

S obzirom na mali broj podataka u literaturi o uticaju ispitivanih citokina na ekspresiju KIR receptora na NK ćelijama u zdravih osoba (Shin i sar., 2004; Chrul i sar., 2005), a posebno u bolesnika sa malignitetima (Konjevic i sar., 2010b, Konjevic i sar., 2012b), u ovom radu je analizirana ekspresija CD158a i CD158b receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama u ZK i MM bolesnika. Pokazana je povećana ekspresija oba KIR receptora na NK ćelijama i CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji u ZK, kao i povećana ekspresija ispitivanih KIR receptora na NK ćelijama i obe njihove subpopulacije u MM bolesnika posle *in vitro* dejstva IL-2. U MM bolesnika takođe je nađena povećana ekspresija CD158a receptora na NK ćelijama i CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji posle dejstva IL-12. Povećanje ekspresije inhibitornih CD158a i CD158b KIR receptora koje je dobijeno u ovom radu u ZK i MM bolesnika, može da se objasni u svetlu regulacije *KIR* gena. Pokazana je pozitivna regulacija *KIR* gena c-Myc transkripcionim faktorom, kao i da IL-2 i IL-15 povećavaju transkripciju gena za c-Myc, a time i ekspresiju KIR receptora. Takođe je indukcija ekspresije *KIR* gena citokinima IL-2 i IL-15 pokazana i na NK ćelijama iz pupčane vrpce (Satwani i sar. 2011), a za gen inhibitornog KIR receptora *KIR3DL1* je pokazano da ovi citokini direktno stimulišu njegovu transkripciju posredstvom STAT-5 signalnog molekula (Presnell i sar., 2013). S druge strane dobro je poznato da je citokinima IL-2 i IL-15 povećana ekspresija KIR receptora na NK ćelijama ključni događaj u završnoj fazi razvoja NK ćelija i njihovoj edukaciji. Pokazano je da se ovaj proces dešava kada NK ćelije uđu u IV, pretposlednju fazu svog razvoja, odnosno kada CD3⁻CD56^{sjajno+}

subpopulacija NK ćelija pod dejstvom IL-2 i IL-15 počinje da ispoljava KIR receptore i prelazi u poslednjoj V fazi razvoja u potpuno zrele CD3⁻CD56^{potmulo+}KIR⁺ NK ćelije (Cichocki i sar., 2009). Svi ovi opisani događaji kao i rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na to da je ekspresija KIR receptora osetljiva na dejstvo IL-2 i IL-15 što je bitan podatak za proučavanje mehanizama regulacije procesa razvoja, edukacije i funkcionalnog sazrevanja NK ćelija u kojima KIR receptori i ovi citokini imaju značajnu ulogu.

Za razliku od ZK, u ovom radu je u MM bolesnika pokazana povećana ekspresija oba KIR receptora na CD3⁻CD56^{sjajno+}, imunoregulatornoj subpopulaciji posle dejstva IL-2. Poznato je da ova subpopulacija NK ćelija ispoljava receptore za IL-2, IL-12 i IL-18 na svojoj površini i posle *in vitro* stimulacije ovim citokinima fenotipski i funkcionalno dobija karakteristike CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije (Ferlazzo i sar., 2004). Pretpostavlja se da u limfnim čvorovima organizma pod dejstvom IL-2 iz Th1 limfocita i IL-12 iz aktiviranih APĆ dolazi do sazrevanja nezrele CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije koja na svojoj površini počinje da *de novo* sintetiše ne samo KIR receptore već i CD16, NKp46, NKp30 receptore, perforin i Tim-3, najnoviji marker zrelosti NK ćelija, i prelazi u potpuno efektorski zrele CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciju NK ćelija (Ferlazzo i sar., 2004; Ndhlovu i sar., 2012). Prema rezultatima dobijenim u ovom radu moglo bi se pretpostaviti da IL-2 povećavajući ekspresiju KIR receptora na nezrelim CD3⁻CD56^{sjajno+} ćelijama usmerava ove ćelije ka potpunom sazrevanju. Međutim, u ovom radu nije pokazana povećana ekspresija perforina u ovim ćelijama posle dejstva IL-2 što bi bio očekivan nalaz u procesu sazrevanja NK ćelija. Nemogućnost povećanja ekspresije perforina u CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama, pa samim tim i ubrzanog sazrevanja NK ćelija u MM bolesnika pod dejstvom citokina, može da ukaže na prethodni *in vivo* prekid u sazrevanju ovih ćelija nastao kao posledica dejstva imunosupresivnih faktora koje proizvode ćelije tumora i ćelije njihove mikrosredine, kao što je citokin TGF-β, koji sprečavaju očekivano stimulatorno dejstvo IL-2, IL-12 i kombinacije IL-12 i IL-18 na sazrevanje NK ćelija (Allan i sar., 2010; Xu i sar., 2010).

Takođe, u ovom radu nisu pokazane statistički značajne korelacije u ZK i MM bolesnika između indukovane ekspresije CD158a i CD158b receptora na NK ćelijama pod dejstvom IL-2 i IL-12 i povećanja citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom ovih citokina. Ovi rezultati još jednom potvrđuju značaj indukovanih KIR receptora u regulaciji razvoja,

edukacije i sprečavanju autoagresivnosti NK ćelija, a ne samo u inhibiciji njihovih efektorskih funkcija.

Naši novi podaci ukazuju na to da kombinacija IL-12 i IL-18 smanjuje ekspresiju CD158b receptora na NK ćelijama i njihovoj CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji u ZK i MM bolesnika. Očekivalo bi se da kako je CD158b veoma zastupljen inhibitorni receptor NK ćelija ovo njegovo smanjenje inverzno koreliše sa povećanom citotoksičnošću i produkcijom IFN- γ iz NK ćelija pod dejstvom ovih citokina u ZK i MM bolesnika, što u ovom radu nije pokazano. Poznato je da smanjena ekspresija KIR receptora na NK ćelijama uvodi ove ćelija u stanje smanjene reaktivnosti ("hyporesponsiveness") (Orr i Lanier, 2010), što podržavaju podaci iz literature da smanjena ekspresija KIR receptora dovodi do smanjenja ekspresije aktivacionih receptora ovih ćelija (Huard i sar., 2001). Tako je u ovom radu pokazano da IL-12 i IL-18 u kombinaciji pored smanjenja ekspresije CD158b receptora na NK ćelijama dovode do statistički značajnog smanjenja ekspresije aktivacionog NKG2D receptora na istim ovim ćelijama u MM bolesnika i nestatistički značajnog u ZK. Ovo citokinima izazvano smanjenje inhibitornog i aktivacionog receptora NK ćelija moglo bi se smatrati novim mehanizmom koji sprečava preteranu aktivnost NK ćelija usmerenu na zdrave ćelije koje ispoljavaju ligande NKG2D receptora. Takođe, iako nije dovoljno proučena uloga NKG2D receptora u edukaciji NK ćelija moguće je da bi citokinima promenjena ekspresija ovog receptora mogla da ima uticaj na promene u dinamici distribucije inhibitornih receptora NK ćelija i na taj način na proces edukacije (Sheppard i sar., 2013). Međutim, u ovom radu je pokazano da su IL-12 i IL-18 značajni stimulatori efektorskih funkcija NK ćelija. Prema najnovijim podacima NK ćelije mogu da imaju karakteristike memorijskih ćelija (Sun i sar. 2009; Sun i sar., 2011). Jedan od značajnih mehanizama nastanka memorijskih NK ćelija je taj da kada se prethodno citokinima IL-12 i IL-18 u kombinaciji aktivirane NK ćelije ponovo stimulišu ovim citokinima one dobijaju karakteristike dugoživećih, memorijskih NK ćelija koje se odlikuju značajnom citotoksičnošću, a pre svega velikom produkcijom IFN- γ . Takođe je pokazano u *in vitro* modelu da humane memorijske NK ćelije, i to citotoksične, CD3⁺CD56^{potmulo+} fenotipa na svojoj površini povećano ispoljavaju CD94, NKG2A, NKG2C i CD69, a smanjeno KIR i CD57 receptore. Prema tome, ove memorijske ćelije su manje zrele CD3⁺

CD56^{potmulo+} ćelije (Romee i sar., 2012). Međutim, u literaturi ne postoje precizni podaci o imunofenotipskim i funkcionalnim karakteristikama memorijskih NK ćelija u ZK, a posebno ne u bolesnika sa tumorima. Iz prethodno iznetih rezultata može se zaključiti da IL-12 i IL-18 delujući na NK ćelije kako *in vitro* tako i kao osnovni proinflamatorni citokini *in vivo* mogu da utiču na plastičnost i regulaciju efektorskih funkcija ovih ćelija.

U ovom radu po prvi put su predstavljeni rezultati koji se odnose na uticaj svih ispitivanih citokina na nivo transkripcije signalnih molekula vezanih za receptore NK ćelija, DAP10 i SHP-1, u MNČPK ZK i MM bolesnika. Pokazano je da IL-2 povećava nivo transkripcije DAP10 signalnog molekula samo u ZK, dok u MM bolesnika IL-12 i IL-18 u kombinaciji smanjuju nivo iRNK ovog signalnog molekula. Kako je poznato da je DAP10 signalni molekul neophodan za ispoljavanje NKG2D receptora na površini NK ćelija (Park i sar., 2011), pokazane promene u nivou ovog molekula mogu biti povezane sa promenama u ekspresiji NKG2D receptora na NK ćelijama, dobijenim u ovom radu. U ZK je tako pokazano da IL-2 povećava ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama i CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji što je praćeno povećanim nivoom transkripcije DAP10 signalnog molekula u ZK. Takođe u MM bolesnika IL-2 nije uticao ni na povećanje ekspresije NKG2D receptora, ni na povećanje nivoa njegovog signalnog molekula, pa se može pretpostaviti da su svi prethodno pomenuti imunosupresivni faktori u melanomu koji deluju *in vivo* mogli uticali i na smanjenje transkripcije DAP10 signalnog molekula, što je u ovom radu pokazano na netretiranim MNČPK. Na taj način je dejstvo ovih negativnih faktora dominantnije od stimulativnog dejstva IL-2 (Park i sar., 2011; Lee i sar., 2011). Takođe je u ovom radu pokazano da IL-12 i IL-18 u kombinaciji smanjuju ekspresiju NKG2D receptora i DAP10 signalnog molekula u MM bolesnika. Ovi rezultati pokazuju da ne samo aktivacioni NKG2D receptor, već i njegov DAP10 signalni molekul, mogu biti inhibirani pokazanom povećanom produkcijom IFN- γ iz NK ćelija *in vitro* tretiranih kombinacijom IL-12 i IL-18 kao i dejstvom mogućeg povećanog nivoa solubilnih MICA liganada i TGF- β *in vivo* u MM bolesnika. Tako da bi se smanjena ekspresija NKG2D receptora na NK ćelijama i njegovog DAP10 signalnog molekula pod dejstvom IL-12 i IL-18 u kombinaciji u MM bolesnika mogla objasniti uticajem simultanog dejstva velikog broja različitih imunosupresivnih faktora.

Analizirajući efekat svih ispitivanih citokina na ekspresiju SHP-1 signalnog molekula bitnog za prenos inhibitornih signala KIR receptora, u ovom radu je pokazano da nijedan od ispitivanih citokina nije pokazao statistički značajan uticaj na nivo transkripcije ovog molekula u MNČPK, kako ZK tako i MM bolesnika. U ovom radu su, s druge strane, pokazane brojne promene u ekspresiji oba KIR receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama što bi moglo da ima uticaj na procese edukacije i funkcionalnog sazrevanja NK ćelija. Međutim ove promene nisu praćene promenama u nivou SHP-1 signalnog molekula. Smatra se da u procesu inhibicije NK ćelija najznačajnije mesto zauzima SHP-1 fosfataza što potvrđuje i činjenica da u slučaju inaktivacije katalitičkog domena SHP-1 nema inhibicije NK ćelija (Lanier i sar., 2008). Međutim, ostaje još uvek otvoreno pitanje koja je uloga SHP-1 signalnog molekula u procesima razvoja, edukacije i regulacije funkcije zrelih NK ćelija. Tako da prema podacima nekoliko autora (Kim i sar., 2005; Orr i sar., 2010) SHP-1 molekul odnosno prenos inhibitornih signala koji se odvija preko njega nije potreban u procesu edukacije NK ćelija. Pretpostavlja se da bi i drugi signalni molekuli inhibitornih putanja KIR receptora, SHP-2 i SHIP mogli biti značajni u ovom procesu (Huse i sar., 2013). Međutim, Lowing-Kropf i autori su pokazali da SHP-1 molekul ima značajnu ulogu u ovom procesu na modelu transgenih miševa sa dominantnom negativnom mutacijom SHP-1 (Lowing-Kropf i sar., 2000). Takođe, prema najnovijim podacima SHP-1 signalni molekul ima značajnu ulogu u regulaciji efektorskih funkcija zrelih, funkcionalnih NK ćelija (Mahmood i sar., 2012). Tako da ostaje potpuna nepoznanica kakva je uloga SHP-1 molekula u regulaciji razvoja i funkcije NK ćelija u zdravih osoba, a posebno u bolesnika sa karcinomom.

Podaci dobijeni u ovom radu nakon *in vitro* tretmana NK ćelija IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacijom IL-12 i IL-18 ukazuju na to da svi ispitivani citokini, osim IL-18 povećavaju inače sniženu citotoksičnu aktivnost NK ćelija u MM bolesnika. Identičan efekat na povećanje citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom ispitivanih citokina postignut je i u zdravih kontrolnih osoba, osim što je u ovoj grupi ispitanika IL-18 manje, ali još uvek statistički značajno, povećao citotoksična svojstva NK ćelija. Pored toga, u ovom radu je pokazano da IL-2 i kombinacija IL-12 i IL-18 najveći efekat na citotoksičnost NK ćelija ostvaruju u M1a+b grupi bolesnika sa boljom kliničkom prognozom. Pored citotoksičnosti,

IL-2, IL-12 i kombinacija IL-12 i IL-18 statistički značajno povećavaju i degranulacionu sposobnost NK ćelija i njihove obe subpopulacije i u ZK i u MM bolesnika. Pokazano je da ovakav efekat ovi citokina ostvaruju povećanjem ekspresije perforina. Takođe, IL-12 i IL-18 u kombinaciji kao najznačajni stimulatori produkcije IFN- γ iz NK ćelija povećavaju inače značajno sniženu produkciju ovog citokina jedino u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija u MM bolesnika, za razliku od povećanja produkcije IFN- γ u ZK i u ukupnim NK ćelijama i u obe subpopulacije ovih ćelija. IL-2 povećava ekspresiju NKG2D receptora i njegovog DAP10 signalnog molekula u ZK, dok je taj efekat izostao u MM bolesnika kod kojih IL-12 i IL-18 u kombinaciji smanjuju ekspresiju NKG2D receptora i DAP10. U ZK jedino je nađena statistički značajna korelacija između povećanja ekspresije NKG2D receptora i povećane citotoksičnosti NK ćelija pod dejstvom IL-2. Takođe, IL-2 povećava ekspresiju CD158a i CD158b receptora u ZK, a posebno u MM bolesnika što se pretpostavlja da doprinosi regulaciji složenih procesa razvoja, edukacije, funkcionalnog sazrevanja i sprečavanja autoagresivnosti NK ćelija.

In vitro tretmani IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 najveći efekat su postigli na povećanje citotoksičnosti i degranulacije NK ćelija i njihovih CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija u perifernoj krvi bolesnika obolelih od metastatskog melanoma, dok je njihov efekat na povećanje ekspresije aktivacionog NKG2D receptora izostao pretpostavlja se zbog prethodnog dominantnog *in vivo* dejstva velikog broja imunosupresivnih faktora koje produkuju kako ćelije tumora tako i ćelije njihove mikrosredine koji imaju sposobnost da inhibiraju stimulatívno dejstvo IL-2 *in vitro*. Tako da rezultati dobijeni u ovom radu mogu da ukažu na to da bi kombinovanje malih doza u terapiji prihvaćenih citokina, kao što je IL-2 i novih citokina koji se intenzívno ispituju kroz brojne pretkliničke i kliničke studije, kao što su IL-12 i IL-18 bilo značajno koristiti u stimulaciji NK ćelija, a tako stimulisane ćelije bilo bi moguće davati u terapiji bolesnika obolelih od metastatskog melanoma u vidu adoptivnog transfera, uz moguću primenu drugih oblika imunostimulatorne terapije koja bi, na primer, inhibirala dejstvo brojnih imunosupresivnih faktora, kao što su TGF- β , IL-10 iliIDO metaboliti.

6. ZAKLJUČCI

I Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija bolesnika sa metastatskim melanomom

NK ćelije periferne krvi bolesnika sa metastatskim melanomom u odnosu na zdrave kontrolne osobe ispoljavaju sniženu

- citotoksičnu aktivnost
- degranulaciju (merenu ekspresijom CD107a molekula) i ekspresiju perforina
- produkciju IFN- γ

Uočeni poremećaji u funkciji NK ćelija praćeni su sniženom NK ćelijskom ekspresijom STAT-1, IL-12R β 1 i IL-12R β 2

Poremećaj u citotoksičnoj funkciji NK ćelija

- povezan je sa sniženom ekspresijom aktivacionog NKG2D receptora kao i njegovog signalnog molekula, DAP10
- nije povezan sa ekspresijom inhibitornih KIR receptora, CD158a i CD158b

II Efekti *in vitro* tretmana IL-2, IL-12, IL-18 i kombinacije IL-12 i IL-18 na funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija periferne krvi bolesnika sa metastatskim melanomom i zdravih kontrolnih osoba

In vitro tretmani IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 dovode do statistički značajnog povećanja citotoksičnosti NK ćelija, što je podržano povećanom degranulacijom (merenom ekspresijom CD107a molekula) i ekspresijom perforina u NK ćelijama bolesnika sa metastatskim melanomom i u zdravih kontrolnih osoba.

U bolesnika sa metastatskim melanomom kombinacija IL-12 i IL-18 statistički značajno povećava, ali na mnogo nižem nivou nego kod zdravih kontrolnih osoba, intraćelijski IFN- γ jedino u imunoregulatornoj CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji, dok se kod zdravih kontrolnih

osoba ovo povećanje uočava u svim populacijama NK ćelija. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa dobijenim sniženjem *in vitro* produkcije IFN- γ nakon stimulacije 48h mononuklearnih ćelija periferne krvi istom kombinacijom citokina u bolesnika sa metastatskim melanomom.

In vitro tretman IL-2 i pored statistički značajnog povećanja citotoksičnosti NK ćelija ne dovodi do statistički značajnog povećanja ekspresije NKG2D receptora na NK ćelijama u bolesnika sa metastatskim melanomom, za razliku od postignutog povećanja citotoksičnosti NK ćelija i ekspresije aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama u zdravih kontrolnih osoba.

In vitro tretman IL-2 statistički značajno povećava ekspresiju inhibitornih CD158a i CD158b KIR receptora na NK ćelijama u bolesnika sa metastatskim melanomom i u zdravih kontrolnih osoba.

In vitro tretman kombinacijom IL-12 i IL-18 dovodi do neočekivanog smanjenja ekspresije aktivacionog NKG2D, ali i inhibitornog CD158b receptora na NK ćelijama u bolesnika sa metastatskim melanomom i u zdravih kontrolnih osoba.

Za razliku od MM bolesnika kod kojih povećanje citotoksičnosti NK ćelija posle *in vitro* tretmana IL-2, IL-12 i kombinacijom IL-12 i IL-18 ne zavisi od ekspresije NKG2D, CD158a i CD158b receptora na NK ćelijama, u ZK je nađena statistički značajna korelacija između povećane ekspresije NKG2D receptora i povećane citotoksičnosti NK ćelija posle *in vitro* tretmana IL-2.

U bolesnika sa najnepovoljnijom lokalizacijom metastaza (M1c kategorija), uočava se najizraženije sniženje ekspresije NKG2D receptora, kao i najmanje povećanje citotoksičnosti NK ćelija indukovane IL-2 i kombinacijom IL-12 i IL-18.

7. LITERATURA

- Addeo A, Rinaldi CR. Treatment with ipilimumab: a case report of complete response in a metastatic malignant melanoma patient. *Case Rep Oncol* 2013; 6: 285-288.
- Airoidi I, Di Carlo E, Cocco C, Sorrentino C, Fais F, Cilli M, et al. Lack of Il12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy. *Blood* 2005; 106: 3846-3853.
- Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 2009; 254: 149-154.
- Al Omar SY, Marshall E, Middleton D, Christmas SE. Increased killer immunoglobulin-like receptor expression and functional defects in natural killer cells in lung cancer. *Immunology* 2011; 133: 94-104.
- Alici E IPH-2101, a fully human anti-NK-cell inhibitory receptor mAb for the potential treatment of hematological cancers. *Curr Opin Mol Ther* 2010; 12: 724-733.
- Allan DS, Rybalov B, Awong G, Zúñiga-Pflücker JC, Kopcow HD, Carlyle JR, et al. TGF- β affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2289-2295.
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004; 294: 15-22.
- Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63: 21-28.
- Aris M, Barrio MM, Mordoh J. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 192719.
- Arma LR, Podack ER. Natural Killer cytolytic activity. In: Lotze MT, Thomson AW, editors. *Natural Killer Cells-Basic Science and Clinical Application*. Elsevier, 2010; p. 215-227.

- Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, DuBois JS, et al. Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 409-417.
- Baeriswyl V, Wodnar-Filipowicz A, Kalberer CP. The effect of silencing NKG2D through RNA interference on receptor functions in interleukin-2-activated human natural killer cells. *Haematologica* 2006; 91: 1538-1541.
- Baginska J, Viry E, Paggetti J, Medves S, Berchem G, Moussay E, et al. The Critical Role of the Tumor Microenvironment in Shaping Natural Killer Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol* 2013; 4: 490.
- Bajetta E, Del Vecchio M, Mortarini R, Nadeau R, Rakhit A, Rimassa L, et al. Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 75-85.
- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002; 196: 493-503.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-3648.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206.
- Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol* 2012; 22: 33-40.
- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20847-20852.
- Balsamo M, Pietra G, Vermi W, Moretta L, Mingari MC, Vitale M. Melanoma immunoediting by NK cells. *Oncoimmunology* 2012; 1: 1607-1609.

- Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Reggiardo G, Moretta L, Mantovani A, et al. The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 21659-21664.
- Benitez AC, Dai Z, Mann HH, Reeves RS, Margineantu DH, Gooley TA, et al. Expression, signaling proficiency, and stimulatory function of the NKG2D lymphocyte receptor in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4081-4086.
- Besser MJ, Shoham T, Harari-Steinberg O, Zabari N, Ortenberg R, Yakirevitch A, et al. Development of allogeneic NK cell adoptive transfer therapy in metastatic melanoma patients: in vitro preclinical optimization studies. *PLoS One* 2013; 8: e57922.
- Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 2010; 5: e11966.
- Béziat V, Liu LL, Malmberg JA, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 2013; 121: 2678-2688.
- Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010; 116: 3853-3864.
- Blanchard T, Srivastava PK, Duan F. Vaccines against advanced melanoma. *Clin Dermatol* 2013; 31: 179-190.
- Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; 26: 316-325.
- Borrego F, Masilamani M, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol* 2005; 42: 485-488.

- Boukouaci W, Al-Daccak R, Dulphy N, Lauden L, Amokrane K, Fortier C, et al. Soluble MICA-NKG2D interaction upregulates IFN- γ production by activated CD3-CD56+ NK cells: potential impact on chronic graft versus host disease. *Hum Immunol* 2013; 74: 1536-1541.
- Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 180-190.
- Braeuer RR, Watson IR, Wu CJ, Mobley AK, Kamiya T, Shoshan E, et al. Why Is Melanoma So Metastatic? *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27: 19-36.
- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-908.
- Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Münz C. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15 α . *J Clin Invest* 2007; 117: 3316-3329.
- Brown RL, Ortaldo JR, Griffith RL, Blanca I, Rabin H. The proliferation and function of human mononuclear leukocytes and natural killer cells in serum-free medium. *J Immunol Methods* 1985; 81: 207-214.
- Busse A, Keilholz U. Role of TGF- β in melanoma. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12: 2165-2175.
- Cagnano E, Hershkovitz O, Zilka A, Bar-Ilan A, Golder A, Sion-Vardy N, et al. Expression of ligands to NKp46 in benign and malignant melanocytes. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 972-979.
- Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112: 461-469.
- Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 536-544.
- Cao X, Leonard K, Collins LI, Cai SF, Mayer JC, Payton JE, et al. Interleukin 12 stimulates IFN- γ -mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance. *Cancer Res* 2009; 69: 8700-8709.

- Cárdenes M, Angel-Moreno A, Fieschi C, Sologuren I, Colino E, Molinés A, et al. Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency. *J Med Genet* 2010; 47: 635-637.
- Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 2008; 112: 863-875.
- Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol* 2012; 3: 347.
- Casado JG, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, et al. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1517-1526.
- Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 41-49.
- Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 2007; 179: 89-94.
- Chen Z, Chen L, Baker K, Olszak T, Zeissig S, Huang YH, et al. CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *J Exp Med* 2011; 208: 2633-2640.
- Cheng M, Zhang J, Jiang W, Chen Y, Tian Z. Natural killer cell lines in tumor immunotherapy. *Front Med* 2012; 6: 56-66.
- Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 230-252.
- Cherrier M, Ohnmacht C, Cording S, Eberl G. Development and function of intestinal innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 277-283.
- Chijioke O, Münz C. Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation. *Front Immunol* 2013; 4: 365.

- Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol* 2013; 78: 120-129.
- Cho D, Song H, Kim YM, Houh D, Hur DY, Park H, et al. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 2000; 60: 2703-2709.
- Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* 2010; 16: 97-106.
- Chretien AS, Le Roy A, Vey N, Prebet T, Blaise D, Fauriat C, et al. Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. *Front Immunol* 2014; 5: 122.
- Christophi GP, Hudson CA, Gruber RC, Christophi CP, Mihai C, Mejico LJ, et al. SHP-1 deficiency and increased inflammatory gene expression in PBMCs of multiple sclerosis patients. *Lab Invest* 2008; 88: 243-255.
- Christophi GP, Panos M, Hudson CA, Tsikkou C, Mihai C, Mejico LJ, et al. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis attenuates inflammatory gene expression through inducible activity of the phosphatase SHP-1. *Clin Immunol* 2009; 133: 27-44.
- Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, Bodalski J. Influence of interleukin IL-2 and IL-12 + IL-18 on surface expression of immunoglobulin-like receptors KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR3DL2 in natural killer cells. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 46957.
- Cichocki F, Hanson RJ, Lenvik T, Pitt M, McCullar V, Li H, et al. The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element. *Blood* 2009; 113: 3245-3253.
- Cichocki F, Miller JS, Anderson SK, Bryceson YT. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front Immunol* 2013; 4: 55.

- Cichocki F, Sitnicka E, Bryceson YT. NK cell development and function - Plasticity and redundancy unleashed. *Semin Immunol* 2014; 26: 114-126.
- Cipponi A, Wieers G, van Baren N, Coulie PG. Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 1153-1160.
- Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-727.
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; 180: 7249-7258.
- Clayton A. Cancer cells use exosomes as tools to manipulate immunity and the microenvironment. *Oncoimmunology* 2012; 1: 78-80.
- Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, et al. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 2013; 122: 1411-1418.
- Colonna M, Jonjic S, Watzl C. Natural killer cells: fighting viruses and much more. *Nat Immunol* 2011; 12: 107-110
- a Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640.
- b Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151.
- Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1915-1919.
- Coudert JD, Scarpellino L, Gros F, Vivier E, Held W. Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways. *Blood* 2008; 111: 3571-3578.

- Daud AI, De Conti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5896-5903.
- de Andrade LF, Smyth MJ, Martinet L. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. *Immunol Cell Biol* 2014; 92: 237-244.
- a De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 728-732.
- b De Maria A, Moretta L. Revisited function of human NK cell subsets. *Cell Cycle* 2011; 10: 1178-1179.
- Degenhardt Y, Huang J, Greshock J, Horiates G, Nathanson K, Yang X, et al. Distinct MHC gene expression patterns during progression of melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 144-154.
- Del Prete A, Allavena P, Santoro G, Fumarulo R, Corsi MM, Mantovani A. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21: 264-275.
- Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13(16): 4677-4685.
- Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011; 17: 700-707.
- Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, et al. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 2006; 108: 4118-4125.

- Deng J, Liu Y, Lee H, Herrmann A, Zhang W, Zhang C, et al. S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell* 2012; 21: 642-654.
- Desbois M, Rusakiewicz S, Locher C, Zitvogel L, Chaput N. Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. *Front Immunol* 2012; 3: 395.
- Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol* 2013; 4: 289.
- Domaica CI, Fuertes MB, Uriarte I, Girart MV, Sardaños J, Comas DI, et al. Human natural killer cell maturation defect supports in vivo CD56(bright) to CD56(dim) lineage development. *PLoS One* 2012; 7: e51677.
- Du G, Ye L, Zhang G, Dong Q, Liu K, Tian J. Human IL18-IL2 fusion protein as a potential antitumor reagent by enhancing NK cell cytotoxicity and IFN- γ production. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 1727-1736.
- Dunki-Jacobs EM, Callender GG, McMasters KM. Current management of melanoma. *Curr Probl Surg* 2013; 50: 351-382.
- Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev* 2009; 5: 22-34.
- Eisenring M, vom Berg J, Kristiansen G, Saller E, Becher B. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nat Immunol* 2010; 11: 1030-1038.
- Elishmereni M, Bachelet I, Levi-Schaffer F. DNAM-1: an amplifier of immune responses as a therapeutic target in various disorders. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 491-496.
- Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood* 2007; 109: 4816-4824.

- Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, Nakata K, Sato T, Kasahara Y, et al. Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. *Haematologica* 2012; 97: 1295-1303.
- Fais S. NK cell-released exosomes: Natural nanobullets against tumors. *Oncoimmunology* 2013; 2: e22337.
- Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010; 115: 2167-2176.
- Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; 162: 4511-4520.
- Fehniger TA, Bluman EM, Porter MM, Mrózek E, Cooper MA, VanDeusen JB, et al. Potential mechanisms of human natural killer cell expansion in vivo during low-dose IL-2 therapy. *J Clin Invest* 2000; 106: 117-124.
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004; 172: 1455-1462.
- Fernández-Messina L, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol* 2012; 3: 299.
- Filipazzi P, Bürdek M, Villa A, Rivoltini L, Huber V. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol* 2012; 22: 342-349.
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 554-567.

- Forero A, Shah J, Carlisle R, Triozzi PL, LoBuglio AF, Wang WQ, et al. A phase I study of an anti-GD3 monoclonal antibody, KW-2871, in patients with metastatic melanoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2006; 21: 561-568.
- Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 1225-1231.
- Fregni G, Perier A, Avril MF, Caignard A. NK cells sense tumors, course of disease and treatments: Consequences for NK-based therapies. *Oncoimmunology* 2012; 1: 38-47.
- Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012; 33: 949-955.
- a Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Le Floc'h A, Huse M, Sun JC, et al. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med* 2013; 210: 1167-1178.
- b Gasteiger G, Hemmers S, Bos PD, Sun JC, Rudensky AY. IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. *J Exp Med* 2013; 210: 1179-1187.
- Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075-1085.
- Girart MV, Fuertes MB, Domaica CI, Rossi LE, Zwirner NW. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J Immunol* 2007; 179: 3472-3479.
- Glasner A, Ghadially H, Gur C, Stanietzky N, Tsukerman P, Enk J, et al. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 2012; 188: 2509-2515.
- Gogas H, Polyzos A, Kirkwood J. Immunotherapy for advanced melanoma: fulfilling the promise. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 879-885.

- Grier JT, Forbes LR, Monaco-Shawver L, Oshinsky J, Atkinson TP, Moody C, et al. Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest* 2012; 122: 3769-3780.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419: 734-738.
- Groh V, Smythe K, Dai Z, Spies T. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol* 2006; 7: 755-762.
- Guia S, Jaeger BN, Piatek S, Mailfert S, Trombik T, Fenis A, et al. Confinement of activating receptors at the plasma membrane controls natural killer cell tolerance. *Sci Signal* 2011; 4: ra21.
- Hallett WH, Murphy WJ. Positive and negative regulation of Natural Killer cells: therapeutic implications. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 367-382.
- Hameed A, Lowrey DM, Lichtenheld M, Podack ER. Characterization of three serine esterases isolated from human IL-2 activated killer cells. *J Immunol* 1988; 141: 3142-3147.
- Hanaoka N, Jabri B, Dai Z, Ciszewski C, Stevens AM, Yee C, et al. NKG2D initiates caspase-mediated CD3zeta degradation and lymphocyte receptor impairments associated with human cancer and autoimmune disease. *J Immunol* 2010; 185: 5732-5742.
- Harlin H, Hanson M, Johansson CC, Sakurai D, Poschke I, Norell H, et al. The CD16- CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16+ CD56(dim) subset. *J Immunol* 2007; 179: 4513-4519.
- Hauschild A, Kiene P, Christophers E. Melanoma – clinical. In: Chu AC, Edelson RL, editors. *Malignant tumors of the skin*. London: Arnold, 1999; p. 66-77.
- Hayakawa Y, Huntington ND, Nutt SL, Smyth MJ. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* 2006; 214: 47-55.
- Hayakawa Y. Targeting NKG2D in tumor surveillance. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 587-599.

- Heidemann SC, Chavez V, Landers CJ, Kucharzik T, Prehn JL, Targan SR. TL1A selectively enhances IL-12/IL-18-induced NK cell cytotoxicity against NK-resistant tumor targets. *J Clin Immunol* 2010; 30: 531-538.
- Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; 16: 230-239.
- a Hervieu A, Rébé C, Végran F, Chalmin F, Bruchard M, Vabres P, et al. Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 499-508.
- b Hervieu A, Mignot G, Ghiringhelli F. Dacarbazine mediate antimelanoma effects via NK cells. *Oncoimmunology* 2013; 2: e23714.
- Hodge DL, Subleski JJ, Reynolds DA, Buschman MD, Schill WB, Burkett MW, et al. The proinflammatory cytokine interleukin-18 alters multiple signaling pathways to inhibit natural killer cell death. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26: 706-718.
- Höglund P, Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 724-734.
- Huard B, Karlsson L, Triebel F. KIR down-regulation on NK cells is associated with down-regulation of activating receptors and NK cell inactivation. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1728-1735.
- Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol* 2013; 4: 69.
- Huntington ND, Di Santo JP. Humanized immune system (HIS) mice as a tool to study human NK cell development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324: 109-124.
- Huse M, Catherine Milanoski S, Abeyweera TP. Building tolerance by dismantling synapses: inhibitory receptor signaling in natural killer cells. *Immunol Rev* 2013; 251: 143-153.

- Iwaszko M, Bogunia-Kubik K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 353-367.
- Jackson A, Warner N. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose N, Friedmah H, Fahey J, editors. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1986; p. 226-235.
- Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3121-3127.
- Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordoñez-Rueda D, Barlogis V, et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* 2012; 209: 565-580.
- Jaeger BN, Vivier E. When NK cells overcome their lack of education. *J Clin Invest* 2012; 122: 3053-3056.
- Jiang X, Chen Y, Peng H, Tian Z. Memory NK cells: why do they reside in the liver? *Cell Mol Immunol* 2013; 10(3): 196-201.
- Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood* 2010; 116: 1299-1307
- Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91: 431-437.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 174-177.
- Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J Clin Invest* 2011; 121: 4746-4757.
- Khan KH, Goody RB, Hameed H, Jalil A, Coyle VM, McAleer JJ. Metastatic melanoma: a regional review and future directions. *Tumori* 2012; 98: 575-580.

- Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5: 112-117.
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005; 436: 709-713.
- Klein Wolterink RG, García-Ojeda ME, Vosshenrich CA, Hendriks RW, Di Santo JP. The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation. *Immunol Rev* 2010; 238: 126-137.
- Konjevic G, Schlesinger B, Cheng L, Olsen KJ, Podack ER, Spuzic I. Analysis of perforin expression in human peripheral blood lymphocytes, CD56+ natural killer cell subsets and its induction by interleukin-2. *Immunol Invest* 1995; 24: 499-507.
- Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurisić V, Babović N, et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 1-11.
- Konjević G, Mirjacić Martinović K, Jurisić V, Babović N, Spuzić I. Biomarkers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells. *Biomarkers* 2009; 14: 258-270.
- a Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Radenković S. Novel aspects of in vitro IL-2 or IFN- α enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 663-671.
- b Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Babović N. In-vitro IL-2 or IFN- α -induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res* 2010; 20: 459-467.

- a Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, Vuletic A, Mirjagic Martinovic K, Radenkovic S, et al. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunol Res* 2012; 52: 139-156.
- b Konjevic G, Mirjagic-Martinovic K, Vuletic A, Babovic N. In vitro increased natural killer cell activity of metastatic melanoma patients with interferon- α alone as opposed to its combination with 13-cis retinoic acid is associated with modulation of NKG2D and CD161 activating receptor expression. *J BUON* 2012; 17: 761-769.
- Kornstein MJ, Stewart R, Elder DE. Natural killer cells in the host response to melanoma. *Cancer Res* 1987; 47: 1411-1412
- Kröger A, Köster M, Schroeder K, Hauser H, Mueller PP. Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 5-14.
- Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 2012; 3: 335.
- Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V, Peruzzi G, Coligan JE. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood* 2013; 121: 4672-4683.
- Ksienzyk A, Neumann B, Kröger A. IRF-1 is critical for IFN γ mediated immune surveillance. *Oncoimmunology* 2012; 1: 533-534.
- Kudchadkar RR, Gonzalez R, Lewis K. New targeted therapies in melanoma. *Cancer Control* 2013; 20: 282-288.
- Kumpel BM, Manoussaka MS. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang* 2012; 102: 2-12.
- Kuppala MB, Syed SB, Bandaru S, Varre S, Akka J, Mundulru HP. Immunotherapeutic approach for better management of cancer--role of IL-18. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 5353-5361.
- Kuśnierczyk P. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene associations with autoimmune and allergic diseases, recurrent spontaneous abortion, and neoplasms. *Front Immunol* 2013; 4: 8.

- Ladányi A. [Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in melanoma]. *Magy Onkol* 2013; 57: 85-95.
- Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res* 2013; 62: 823-834.
- Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2009; 119: 1251-1263.
- Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics* 2012; 6: 73-82.
- Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986; 137: 2735-2739.
- Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* 1988; 141: 3478-3485.
- Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9: 495-502.
- Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63: 419-435.
- Lauwerys BR, Renauld JC, Houssiau FA. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* 1999; 11: 822-830.
- Lee JC, Lee KM, Ahn YO, Suh B, Heo DS. A possible mechanism of impaired NK cytotoxicity in cancer patients: down-regulation of DAP10 by TGF-beta1. *Tumori* 2011; 97: 350-357.
- LeMaoult J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J* 2005; 19: 662-664.
- Leong JW, Chase JM, Romee R, Schneider SE, Sullivan RP, Cooper MA, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 Induces CD25 and a Functional High-

Affinity IL-2 Receptor on Human Cytokine-Induced Memory-like Natural Killer Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20: 463-473.

- Li W, Okuda A, Yamamoto H, Yamanishi K, Terada N, Yamanishi H, et al. Regulation of Development of CD56(bright)CD11c(+) NK-like Cells with Helper Function by IL-18. *PLoS One* 2013; 8: e82586.
- Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 1991; 253: 199-202.
- Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013; 38: 13-25.
- Lin JX, Li P, Liu D, Jin HT, He J, Ata Ur Rasheed M, et al. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity* 2012; 36: 586-599.
- Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2013; 14: e218-228.
- Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244.
- Long EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* 2008; 224: 70-84.
- López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; 14: 179-189.
- Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57⁺NKG2C^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 14725-14732.
- Lotzová E, Savary CA, Herberman RB. Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *J Immunol* 1987; 138: 2718-2727.

- Lowin-Kropf B, Kunz B, Beermann F, Held W. Impaired natural killing of MHC class I-deficient targets by NK cells expressing a catalytically inactive form of SHP-1. *J Immunol* 2000; 165: 1314-1321.
- Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007; 26: 503-517.
- Lugini L, Cecchetti S, Huber V, Luciani F, Macchia G, Spadaro F, et al. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol* 2012; 189: 2833-2842.
- Lupov IP, Voiles L, Han L, Schwartz A, De La Rosa M, Oza K, et al. Acquired STAT4 deficiency as a consequence of cancer chemotherapy. *Blood* 2011; 118: 6097-6106.
- Maeda N, Izumiya C, Taniguchi K, Matsushima S, Fukaya T. Role of NK cells and HLA-G in endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 1568-1581.
- Mahmood S, Kanwar N, Tran J, Zhang ML, Kung SK. SHP-1 phosphatase is a critical regulator in preventing natural killer cell self-killing. *PLoS One* 2012; 7: e44244.
- Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010; 33: 153-165.
- Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5640-5644.
- Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 2005; 174: 3992-3998.
- Markel G, Seidman R, Besser MJ, Zabari N, Ortenberg R, Shapira R, et al. Natural killer lysis receptor (NKLR)/NKLR-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells. *PLoS One* 2009; 4: e5597.

- Martinval D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* 2008; 133: 681-692.
- Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2886-2891.
- McKay K, Moore PC, Smoller BR, Hiatt KM. Association between natural killer cells and regression in melanocytic lesions. *Hum Pathol* 2011; 42: 1960-1964.
- Meazza R, Azzarone B, Orengo AM, Ferrini S. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 861920.
- Menzies AM, Long GV. New combinations and immunotherapies for melanoma: latest evidence and clinical utility. *Ther Adv Med Oncol* 2013; 5: 278-285.
- Merelli B, Massi D, Cattaneo L, Mandalà M. Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89: 140-165.
- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004; 21: 357-366.
- Min-Oo G, Kamimura Y, Hendricks DW, Nabekura T, Lanier LL. Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol* 2013; 34: 251-258.
- Mirjačić Martinović K, Konjević G, Babović N, Inić M. The stage dependent changes in NK cell activity and the expression of activating and inhibitory NK cell receptors in melanoma patients. *J Surg Res* 2011; 171: 637-649.
- Mirjačić Martinović KM, Babović NL, Džodić RR, Jurišić VB, Tanić NT, Konjević GM. Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and

intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res* 2014 Apr 24.

- Moesta AK, Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front Immunol* 2012; 3: 336.
- Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A* 2013; 83: 702-713.
- Morgado S, Sanchez-Correa B, Casado JG, Duran E, Gayoso I, Labella F, et al. NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions. *J Innate Immun* 2011; 3: 365-373.
- Muntasell A, Vilches C, Angulo A, López-Botet M. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur J Immunol* 2013; 43: 1133-1141.
- Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 2013; 121: 2402-2414.
- Nagai H, Oniki S, Fujiwara S, Yoshimoto T, Nishigori C. Antimelanoma immunotherapy: clinical and preclinical applications of IL-12 family members. *Immunotherapy* 2010; 2: 697-709.
- Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcR3 positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-3191.
- Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Amagai R, Ishii T, Harigae H, et al. Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 9421-9426.
- Naumova E, Mihaylova A, Ivanova M, Mihailova S. Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 95-100.

- Ndhlovu LC, Lopez-Vergès S, Barbour JD, Jones RB, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 2012; 119: 3734-3743.
- Ngiow SF, Teng MW, Smyth MJ. A balance of interleukin-12 and -23 in cancer. *Trends Immunol* 2013; 34: 548-555.
- Nguyen-Pham TN, Yang DH, Nguyen TA, Lim MS, Hong CY, Kim MH, et al. Optimal culture conditions for the generation of natural killer cell-induced dendritic cells for cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2012; 9: 45-53.
- Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 2012; 209: 2351-2365.
- Ni J, Miller M, Stojanovic A, Cerwenka A. Toward the next generation of NK cell-based adoptive cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2013; 2: e23811.
- Nicholas C, Lesinski GB. Immunomodulatory cytokines as therapeutic agents for melanoma. *Immunotherapy* 2011; 3: 673-690.
- Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol* 2014; 170: 11-19.
- Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989; 170: 1757-1761.
- O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 7: 507-516.
- Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 713-725.
- Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 2010; 142: 847-856.
- Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol* 2010; 11: 321-327.

- O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 2012; 36: 542-550.
- O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, Koebel CM, Arthur C, White JM, et al. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J Exp Med* 2012; 209: 1869-1882.
- Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5300-5309.
- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 201-214.
- Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 329-335.
- Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, et al. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the γ c cytokines and TGF- β 1. *Blood* 2011; 118: 3019-3027.
- Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6287-6297.
- Parmiani G, Castelli C, Santinami M, Rivoltini L. Melanoma immunology: past, present and future. *Curr Opin Oncol* 2007; 19: 121-127.
- Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Nguyen XD, et al. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5208-5215.
- Paschen A, Baingo J, Schadendorf D. Expression of stress ligands of the immunoreceptor NKG2D in melanoma: Regulation and clinical significance. *Eur J Cell Biol* 2014; 93: 49-54.

- Pegram HJ, Haynes NM, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK. Characterizing the anti-tumor function of adoptively transferred NK cells in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 1235-1246.
- Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 2011; 89: 216-224.
- Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 2007; 282: 20047-20051.
- a Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, et al. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res* 2012; 72: 1407-1415.
- b Pietra G, Vitale M, Moretta L, Mingari MC. How melanoma cells inactivate NK cells. *Oncoimmunology* 2012; 1: 974-975.
- Pipkin ME, Rao A, Lichtenheld MG. The transcriptional control of the perforin locus. *Immunol Rev* 2010; 235: 55-72.
- Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465
- Presnell SR, Chan HW, Zhang L, Lutz CT. IL-2/IL-15 activate the human clonally restricted KIR3DL1 reverse promoter. *Genes Immun* 2013; 14: 107-114.
- Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 2211-2220.
- Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* 2011; 46: 216-228.
- Ramirez-Alejo N, Blancas-Galicia L, Yamazaki-Nakashimada M, García-Rodríguez SE, Rivas-Larrauri F, Paolo-Cienfuegos DP, et al. Molecular analysis for patients with IL-12 receptor β 1 deficiency. *Clin Genet* 2013 Aug 16.
- Rao C, Bui T, Connelly M, Doyle G, Karydis I, Middleton MR, et al. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. *Int J Oncol* 2011; 38: 755-760.

- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 781-790.
- Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 520-531.
- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 413-441.
- Richards DM, Hettinger J, Feuerer M. Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron* 2013; 6: 179-191.
- Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest* 2006; 116: 182-192.
- Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 2007; 178: 4947-4955.
- Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 2012; 120: 4751-4760.
- Roothans D, Smits E, Lion E, Tel J, Anguille S. CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncoimmunology* 2013; 2: e23037.
- Rosental B, Hadad U, Brusilovsky M, Campbell KS, Porgador A. A novel mechanism for cancer cells to evade immune attack by NK cells: The interaction between NKp44 and proliferating cell nuclear antigen. *Oncoimmunology* 2012; 1: 572-574.
- Roš T, Gajić B, Todorović-Živković D, Kandolf-Sekulović L. Epidemiologija i prevencija melanoma. U: Novakovic M i Babović N, editori. *Melanom kože: prevencija, dijagnostika i lečenje*. Beograd: Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva, 2014; p. 5-11.

- Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med* 1990; 113: 619-627.
- Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, et al. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 84-90.
- Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 323-370.
- Sabado RL, Bhardwaj N. Dendritic cell immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1284: 31-45.
- Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC, Stroncek D, Wang E, Taback B, et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2645-2652.
- Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* 2010; 50: 1-14.
- Saito H, Takaya S, Osaki T, Ikeguchi M. Increased apoptosis and elevated Fas expression in circulating natural killer cells in gastric cancer patients. *Gastric Cancer* 2013; 16: 473-479.
- Salama AK. Evolving pharmacotherapies for the treatment of metastatic melanoma. *Clin Med Insights Oncol* 2013; 7: 137-149.
- Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* 2010; 207: 1625-1636.
- Sarkar S, Germeraad WT, Rouschop KM, Steeghs EM, van Gelder M, Bos GM, et al. Hypoxia induced impairment of NK cell cytotoxicity against multiple myeloma can be overcome by IL-2 activation of the NK cells. *PLoS One* 2013; 8: e64835.
- Satwani P, van de Ven C, Ayello J, Cairo D, Simpson LL, Baxi L, et al. Interleukin (IL)-15 in combination with IL-2, fms-like tyrosine kinase-3 ligand and anti-CD3 significantly enhances umbilical cord blood natural killer (NK) cell and NK-cell subset expansion and NK function. *Cytotherapy* 2011; 13: 730-738.

- Savitsky D, Tamura T, Yanai H, Taniguchi T. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 489-510.
- Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. *Front Oncol* 2013; 3: 90.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163-189.
- Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, et al. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 1594-1604.
- Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MC. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 4795-4808.
- Seidel MG, Freissmuth M, Pehamberger H, Micksche M. Stimulation of natural killer activity in peripheral blood lymphocytes of healthy donors and melanoma patients in vitro: synergism between interleukin (IL)-12 and IL-15 or IL-12 and IL-2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358: 382-389
- Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 2013; 4: 76.
- Sevko A, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. *J Cancer* 2013; 4: 3-11.
- Sheppard S, Triulzi C, Ardolino M, Serna D, Zhang L, Raulet DH, et al. Characterization of a novel NKG2D and NKp46 double-mutant mouse reveals subtle variations in the NK cell repertoire. *Blood* 2013; 121: 5025-5033.
- Shin EC, Choi KS, Kim SJ, Shin JS. Modulation of the surface expression of CD158 killer cell Ig-like receptor by interleukin-2 and transforming growth factor-beta. *Yonsei Med J* 2004; 45: 510-514.

- Shurin GV, Ma Y, Shurin MR. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer Microenviron* 2013; 6: 159-167.
- Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 89-102.
- Singh SM, Yanagawa H, Hanibuchi M, Miki T, Okamura H, Sone S. Augmentation by interleukin-18 of MHC-nonrestricted killer activity of human peripheral blood mononuclear cells in response to interleukin-12. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 35-43.
- Smyth MJ, Swann J, Kelly JM, Cretney E, Yokoyama WM, Diefenbach A, et al. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 2004; 200: 1325-1335.
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 1065-1073.
- Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 145-149.
- Spivey TL, De Giorgi V, Zhao Y, Bedognetti D, Pos Z, Liu Q, et al. The stable traits of melanoma genetics: an alternate approach to target discovery. *BMC Genomics* 2012; 13: 156.
- Srivastava S, Salim N, Robertson MJ. Interleukin-18: biology and role in the immunotherapy of cancer. *Curr Med Chem* 2010; 17: 3353-3357.
- Srivastava S, Pelloso D, Feng H, Voiles L, Lewis D, Haskova Z, et al. Effects of interleukin-18 on natural killer cells: costimulation of activation through Fc receptors for immunoglobulin. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62: 1073-82.
- Stojanovic A, Cerwenka A. Natural killer cells and solid tumors. *J Innate Immun* 2011; 3: 355-364.
- Stojanovic A, Correia MP, Cerwenka A. Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2013; 6: 135-146.

- Strengell M, Matikainen S, Sirén J, Lehtonen A, Foster D, Julkunen I, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 2003; 170: 5464-5469.
- Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Baltar JM, Ortega F, López-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant* 2009; 9: 251-257.
- Sullivan RP, Leong JW, Fehniger TA. MicroRNA regulation of natural killer cells. *Front Immunol* 2013; 4: 44.
- Sun JC, Lanier LL. Cutting edge: viral infection breaks NK cell tolerance to "missing self". *J Immunol*. 2008; 181: 7453-7457.
- Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009; 457: 557-561.
- Sun JC. Re-educating natural killer cells. *J Exp Med* 2010; 207: 2049-2052.
- Sun JC, Lopez-Verges S, Kim CC, DeRisi JL, Lanier LL. NK cells and immune "memory". *J Immunol* 2011; 186: 1891-1897.
- Sun JC, Madera S, Bezman NA, Beilke JN, Kaplan MH, Lanier LL. Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *J Exp Med* 2012; 209: 947-954.
- Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens* 2012; 80: 477-487.
- Tanchot C, Terme M, Pere H, Tran T, Benhamouda N, Strioga M, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron* 2013; 6: 147-157.
- Tarek N, Le Luduec JB, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, et al. Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest* 2012; 122: 3260-3270.
- Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 5393-5399.

- Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Coudert JD, Desbois M, et al. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res* 2012; 72: 2757-2767.
- Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 239-245.
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; 382: 171-174.
- Tomescu C, Chehimi J, Maino VC, Montaner LJ. Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN-alpha by human NK cells after CD107a degranulation. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 871-876.
- Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 533-543.
- Trapani JA, Thia KY, Andrews M, Davis ID, Gedye C, Parente P, et al. Human perforin mutations and susceptibility to multiple primary cancers. *Oncoimmunology* 2013; 2: e24185.
- Trinchieri G, Perussia B. Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab Invest* 1984; 50: 489-513.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-146.
- Trotta R, Chen L, Ciarlariello D, Josyula S, Mao C, Costinean S, et al. miR-155 regulates IFN- γ production in natural killer cells. *Blood* 2012; 119: 3478-3485.
- Trotter SC, Sroa N, Winkelmann RR, Olencki T, Bechtel M. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013; 6: 18-26.
- Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012; 26: 1131-1155.
- Tsui FW, Martin A, Wang J, Tsui HW. Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunol Res* 2006; 35: 127-136.

- Uellner R, Zvelebil MJ, Hopkins J, Jones J, MacDougall LK, Morgan BP, et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBOJ* 1997; 16: 7287-7296
- Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, Steinle A. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncoimmunology* 2013; 2: e26097.
- Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol* 2012; 22: 319-326.
- Umansky V, Sevko A. Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenviron* 2013; 6: 169-177.
- Vacchelli E, Galluzzi L, Eggermont A, Galon J, Tartour E, Zitvogel L, et al. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology* 2012; 1: 493-506.
- Vairo D, Tassone L, Tabellini G, Tamassia N, Gasperini S, Bazzoni F, et al. Severe impairment of IFN- γ and IFN- α responses in cells of a patient with a novel STAT1 splicing mutation. *Blood* 2011; 118: 1806-1817.
- Van Belle TL, von Herrath MG. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol Immunol* 2009; 47: 8-11.
- Vetter CS, Groh V, Thor Straten P, Spies T, Bröcker EB, Becker JC. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 600-605.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 503-510.
- Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 581-586.
- Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev* 2010; 235: 35-54.
- Vujanovic NL. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res* 2011; 50: 159-174.

- Wang KS, Frank DA, Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* 2000; 95: 3183-3190.
- Warren HS, Kinnear BF. Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J Immunol* 1999; 162: 735-742.
- Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor and cancer. *J Pathol* 2013; 230: 241-248.
- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 361-368.
- Weedon D. *Skin pathology* (2nd edition). London: Churchill Livingstone; 2002; p. 821-858.
- Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltout RH. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1705-1721.
- Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1386-1394.
- Winger EE, Reed JL. The multiple faces of the decidual natural killer cell. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70: 1-9.
- Wong JL, Berk E, Edwards RP, Kalinski P. IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8⁺ T cells to the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2013; 73: 4653-4662.
- Wu C, Warriar RR, Wang X, Presky DH, Gately MK. Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 147-154.
- Wu C, Wang X, Gadina M, O'Shea JJ, Presky DH, Magram J. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J Immunol* 2000; 165: 6221-6228.

- Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2010; 102: 639-644.
- Wu L, Du H, Li Y, Qu P, Yan C. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3C) promotes myeloid-derived suppressor cell expansion and immune suppression during lung tumorigenesis. *Am J Pathol* 2011; 179: 2131-2141.
- Wuest SC, Edwan JH, Martin JF, Han S, Perry JS, Cartagena CM, et al. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med* 2011; 17: 604-609.
- Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010.
- Yamamoto K, Shibata F, Miyasaka N, Miura O. The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 1245-1252.
- Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; 31: 220-227.
- Yao L, Sgadari C, Furuke K, Bloom ET, Teruya-Feldstein J, Tosato G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood* 1999; 93: 1612-1621.
- Ye J, Livergood RS, Peng G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol* 2013; 182: 10-20.
- Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 2006; 214: 143-154.
- Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol* 2013; 34: 573-582.
- Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, Polić B. Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 3519-3529.

- Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- γ in cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6118-6124.
- a Zhang C, Zhang J, Wei H, Tian Z. Imbalance of NKG2D and its inhibitory counterparts: how does tumor escape from innate immunity? *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1099-1111.
- b Zhang C, Zhang J, Sun R, Feng J, Wei H, Tian Z. Opposing effect of IFN γ and IFN α on expression of NKG2 receptors: negative regulation of IFN γ on NK cells. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1057-1067.
- a Zhang Y, Zhao A, Wang X, Shi G, Jin H, Lin Q. Expressions of natural cytotoxicity receptors and NKG2D on decidual natural killer cells in patients having spontaneous abortions. *Fertil Steril* 2008; 90: 1931-1937.
- b Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Zhang J, Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol* 2008; 69: 490-500.
- Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 2010; 36: 274-288.

BIOGRAFIJA

Mirjačić Martinović dr Katarina rođena je 12.aprila.1975. godine u Valjevu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je 1994. godine, a diplomirala 2001. godine sa srednjom ocenom 9,23. Poslediplomske studije iz imunologije upisala je u oktobru 2001. godine. Po završetku opšteg lekarskog staža u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, izradu magistarske teze započela je tokom 2002. godine u Laboratoriji za virusologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Od septembra 2003. godine zaposlena je na neodređeno vreme kao istraživač-pripravnik u Laboratoriji za imunologiju Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. U aprilu 2006. godine započela je specijalizaciju iz imunologije. Magistarsku tezu pod nazivom “Modulacija aktivnosti i ekspresije receptora NK ćelija različitim citokinima kod bolesnika sa melanomom” odbranila je u maju 2008. godine, a specijalistički ispit je položila u oktobru 2009. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2003. do danas učestvovala je u radu 4 projekta koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Član je Lekarske komore Srbije, Srpskog lekarskog društva, Društva imunologa Srbije, Srpskog društva istraživača raka, Evropskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR). Autor je 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 6 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i 1 rada u međunarodnom časopisu (M23) i 19 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M24).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Катарина Мирјачић Мартиновић
број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај експресије активационих и инхибиторних рецептора на урођеноубилачким
ћелијама на функцију ових ћелија у болесника са метастатским меланомом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 9. јун 2014. године

К. Мирјачић Мартиновић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина Мирјачић Мартиновић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Утицај експресије активационих и инхибиторних рецептора на урођеноубилачким ћелијама на функцију ових ћелија у болесника са метастатским меланомом

Ментор Проф. др Радан Џодић

Потписана Катарина Мирјачић Мартиновић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 9. јун 2014. године

К. Мирјачић Мартиновић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај експресије активационих и инхибиторних рецептора на урођеноубилачким ћелијама на функцију ових ћелија у болесника са метастатским меланомом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 9. јун 2014. године

