



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Невена Гајовић

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

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

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

КРАГУЈЕВАЦ, 2018. године

Сажетак:

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

Abstract:

AB

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

САДРЖАЈ

1. УВОД	9
1.1. ТУМОР ДОЈКЕ	9
1.2. ДИЈАБЕТЕС И ТУМОР ДОЈКЕ	9
1.3. УТИЦАЈ ДИЈАБЕТЕСА НА ИМУНСКИ СИСТЕМ	9
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	11
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	12
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	12
3.2. ИНДУКЦИЈА DIABETES MELLITUS-A	12
3.3. ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА МИШЈЕГ ТУМОРА ДОЈКЕ (4T1)	12
3.4. ВЕРИФИКАЦИЈА ПРИМАРНОГ ТУМОРА	14
3.5. АНАЛИЗА МЕТАСТАТСКИХ КОЛОНИЈА	14
3.6. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ	15
3.7. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНИХ ЕНЗИМА	15
3.8. ИЗОЛАЦИЈА ЛЕУКОЦИТА ИЗ СЛЕЗИНЕ	16
3.9. ИЗОЛАЦИЈА ЋЕЛИЈА ИЗ ПРИМАРНОГ ТУМОРА	16
3.10. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА СЛЕЗИНЕ И ПРИМАРНОГ ТУМОРА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ	17
3.10.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера	18
3.10.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина	21
3.11. ИЗДВАЈАЊЕ CD8⁺ Т ЛИМФОЦИТА НЕГАТИВНОМ СЕЛЕКЦИЈОМ ПОМОЋУ МАГНЕТНИХ КУГЛИЦА	22
3.12. ИЗДВАЈАЊЕ НК ЋЕЛИЈА НЕГАТИВНОМ СЕЛЕКЦИЈОМ ПОМОЋУ МАГНЕТНИХ КУГЛИЦА	23
3.13. ТЕСТ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ	24

3.14. ДЕПЛЕЦИЈА НК ЋЕЛИЈА	25
3.15. МЕРЕЊЕ СЕРУМСКЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ IL-10, IFN-Г, IL-1, IL-12, IL-17, TNF-А И IL-13.....	25
3.16. КУЛТИВАЦИЈА СПЛЕНОЦИТА У ДИЈАБЕТИЧНОМ И ХИПЕРГЛИКЕМИЧНОМ СЕРУМУ	26
3.17. ИНХИБИЦИЈА ВОДНИК ПЕРОКСИДА.....	27
3.18. ИНХИБИЦИЈА ИНДОЛАМИН-2, 3 ДИОКСИГЕНАЗЕ	27
3.19. ИНХИБИЦИЈА ИНДУЦИБИЛНЕ АЗОТ МОНОКСИД СИНТАЗЕ.....	28
3.20. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА (PCR).....	28
3.20.1. Изолација RNA из ткива слезине миша	28
3.20.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA	29
3.20.3. Квантификација експресије гена	30
3.21. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА	31
3.22. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	31
4. РЕЗУЛТАТИ	32
4.1. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС УБРЗАВА ПОЈАВУ И РАСТ ПРИМАРНОГ ТУМОРА ДОЈКЕ	32
4.2. СМАЊЕНА ЦИТОТОКСИЧНОСТ НК ЋЕЛИЈА ДОПРИНОСИ УБРЗАНОЈ ПОЈАВИ И РАСТУ ТУМОРА ДОЈКЕ КОД МИШЕВА ТРЕТИРАНИХ STZ-ОМ.....	35
4.3. ДЕПЛЕЦИЈА НК ЋЕЛИЈА УБРЗАВА ПОЈАВУ И РАСТ ПРИМАРНОГ ТУМОРА.....	38
4.4. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС ЗНАЧАЈНО СМАЊУЈЕ ЕКСПРЕСИЈУ NKG2D, ПЕРФОРИНА, IFN-Г, IL-17, А ПОВЕЋАВА ЕКСПРЕСИЈУ PD-1 МОЛЕКУЛА И IL-10 НА СПЛЕНИЧНИМ НК ЋЕЛИЈАМА	40
4.5. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС НЕ УТИЧЕ ЗНАЧАЈНО НА ФЕНОТИП CD8⁺ Т ЛИМФОЦИТА У МОДЕЛУ 4Т1 ТУМОРА ДОЈКЕ	44

4.6. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС ПОВЕЋАВА ПРОЦЕНТУАЛНУ ЗАСТУПЉЕНОСТ TGF- β -ПРОДУКУЈУЋИХ НКТ ЋЕЛИЈА.....	47
4.7. ПОВЕЋАНА КОНЦЕНТРАЦИЈА IL-10 У СЕРУМУ МИШЕВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ	48
4.8. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС ПОЈАЧАВА АКУМУЛАЦИЈУ ИМУНОСУПРЕСИВНИХ ЋЕЛИЈА У СЛЕЗИНУ МИШЕВА СА ТУМОРОМ ДОЈКЕ	50
4.9. СМАЊЕНА АКУМУЛАЦИЈА NKG2D ⁺ НК ЋЕЛИЈА А ПОВЕЋАНА PD- 1 ⁺ НК ЋЕЛИЈА У ПРИМАРНОМ ТУМОРУ МИШЕВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ	54
4.10. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС ФАВОРИЗУЈЕ АКУМУЛАЦИЈУ МИЈЕЛОИДНИХ СУПРЕСИВНИХ ЋЕЛИЈА У ТУМОРСКОЈ МИКРОСРЕДИНИ	56
4.11. ДИЈАБЕТИЧНИ СЕРУМ МЕЊА ФЕНОТИП НК ЋЕЛИЈА, <i>IN VITRO</i> ...	59
4.12. ДИЈАБЕТЕС СТИМУЛИШЕ АПОПТОЗУ СПЛЕНОЦИТА, <i>IN VITRO</i> ..	64
4.13. MDSCS И DCS СУПРИМИРАЈУ НК ЋЕЛИЈЕ АКТИВНОШЋУ ЕНЗИМА IDO	69
5. ДИСКУСИЈА	74
5.1. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС УБРЗАВА ПОЈАВУ И РАСТ ПРИМАРНОГ ТУМОРА ДОЈКЕ	76
5.2. ДИЈАБЕТЕС СМАЊУЈЕ АНТИТУМОРСКУ ЦИТОТОКСИЧНОСТ НК ЋЕЛИЈА.....	76
5.3. ДИЈАБЕТЕС МОДУЛИРА ФУНКЦИОНАЛНИ ФЕНОТИП НК ЋЕЛИЈА	77
5.4. КУЛТИВАЦИЈА У СЕРУМУ МИШЕВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ СУПРИМИРА АКТИВАЦИОНИ ФЕНОТИП НК ЋЕЛИЈА, <i>IN VITRO</i> ...	77
5.5. ПЕГ-КАТАЛАЗА НЕ МЕЊА ЗНАЧАЈНО ФУНКЦИОНАЛНИ ФЕНОТИП НК ЋЕЛИЈА, <i>IN VITRO</i>	78

5.6. ДИЈАБЕТЕС ФАВОРИЗУЈЕ АКУМУЛАЦИЈУ ИМУНОСУПРЕСИВНИХ ЋЕЛИЈА У СЛЕЗИНИ И ПРИМАРНОМ ТУМОРУ	78
5.7. ИМУНОСУПРЕСИВНЕ ЋЕЛИЈЕ У БИОЛОГИЈИ ТУМОРА ДОЈКЕ У ДИЈАБЕТИЧНИМ УСЛОВИМА	79
5.8. УТИЦАЈ БЛОКАДЕ IDO-А И INOS-А НА ФУНКЦИОНАЛНИ ФЕНОТИП НК ЋЕЛИЈА, У ДИЈАБЕТИЧНИМ УСЛОВИМА, <i>IN VITRO</i>	80
6. ЗАКЉУЧЦИ	81
7. СКРАЋЕНИЦЕ	83
8. РЕФЕРЕНЦЕ	85

1. УВОД

1.1. Тумор дојке

Тумор дојке је најчешће дијагностификован рак код жена и један од водећих узрока смрти (1,2). Дијабетес мелитус је метаболичка болест, која се углавном карактерише хипергликемијом, и настаје услед недостатка секреције или деловања инсулина (3). Поред веома важне улоге хипергликемије, други фактори као што су оксидативни стрес и хиперлипидемија су такође важни у настанку компликација у дијабетесу (4).

1.2. Дијабетес и тумор дојке

Клиничке студије показују да је дијабетес удружен са повећаним ризиком од развоја карцинома дојке због многих истих фактора ризика (5, 6, 7, 8). Дијабетес утиче на настанак и прогресију тумора на неколико начина (8). Према Варбурговој хипотези, туморске ћелије користе далеко више глукозе за енергију и преживљавање него регуларне ћелије, што указује да хипергликемија може олакшати раст тумора (9). Кисеонични слободни радикали, који се продукују у дијабетес мелитусу, важни су су за настанак и прогресију карцинома (10). Недавна студија показала је да појачан оксидативни стрес, настао услед хипергликемије, повећава експресију адхезивних молекула на ендотелним ћелијама, чиме се убрзава метастазирање меланома и да неутралисање оксидативног стреса смањује прогресију туморских метастаза у дијабетичним условима (11). Ови механизми објашњавају могућу везу између дијабетеса и убрзаног настанка и прогресије тумора. Међутим, улога дијабетеса у примарном расту тумора и имунски одговор на тумор још увек није довољно рајашњен.

1.3. Утицај дијабетеса на имунски систем

Рањије студије су показале да дијабетес ремети одбрану од инфекција и имунски одговор, укључујући НК ћелије. Пацијенти са дијабетесом тип 1 имају смањену експресију и аберантну сигнализацију преко NKG2D рецептора, као и значајну нижу експресију

молекула p30/p46 на NK ћелијама (12, 13). Чен и сарадници су показали да цитотоксички Т лимфоцити изоловани из миша третираног стрептозотоцином производе мање перфорина и TNF- α , те стога немају способности да елиминишу ћелије меланома (14). Друге студије су показале да дијабетес смањује укупан проценат и такође нарушава експресију хемокинских рецептора и костимулаторних молекула и смањује производњу проинфламацијских цитокина у професионалним антиген презентујућим ћелијама (15,16). За сада нема података о имуносупресивним ћелијама, важном фактору у биологији тумора, у дијабетес мелитусу. Како је карцином дојке један од најчешћих тумора у популацији, циљ наше студије био је да се испита ефекат дијабетес мелитуса на раст карцинома дојке 4Т1 раста дојке и на антитуморски имунски одговор.

Најважнији закључак ове дисертације је да дијабетес мелитус убрзава раст карцинома дојке, подстиче супресивну активност мијелоидних супресорских ћелија (енгл. *Myeloid Derived Suppressor Cells*, MDSC) и регулаторних Т лимфоцита (енгл. *Regulatory T cells*, Treg) и каталитичком активношћу ензима индоламин 2, 3 диоксигеназа (енгл. *Indolamine 2,3-dioxygenase*, IDO) супримира NK ћелије.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

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

ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Експериментални модел дијабетес мелитуса убрзава раст и метастазирање тумора дојке.
 2. Хипергликемија смањује инфилтрацију туморицидних NK ћелија и CD8⁺ T лимфоцита у примарни тумор.
 3. Хипергликемија смањује цитотоксички капацитет NK ћелија и CD8⁺ T лимфоцита.
-

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Студија је спроведена у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у периоду од септембра 2014. године до децембра 2017. године.

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

3.1. Експерименталне животиње

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

3.2. Индукција diabetes mellitus-a

У индукцији дијабетес мелитуса коришћен је Стрептозотоцин (STZ, *Sigma Chemical St. Louis, MO, USA*) који је токсичан за инсулин продукујуће β ћелије панкреаса. Налик глукози, користи GLUT2 транспортере за улазак у ћелију изазивајући оштећење DNA који потом узрокује ADP-рибозилацију, процес важан у развоју дијабетеса (46). У свим експериментима мишевима је након четворочасовног гладовања интраперитонеално апликована једна сублетална доза STZ у дози 170mg/kg раствореног у 100 μ l цитратног пуфера (енгл. *Citrate buffer*, CB) pH вредности 4.5.

3.3. Ћелијска линија мишјег тумора дојке (4T1)

У експериментима је коришћена 4T1, ћелијска линија мишјег тумора дојке (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; CRL-2539*).

Ова линија је добијена из спонтано насталог тумора дојке у BALB/C мишу (47). Представља анимални модел за испитивање IV стадијума хуманог карцинома дојке. Ћелије се могу инокулисати директно у масно јастуче млечне жлезде (инјекцијом), интравенски у латералну репну вену, артеријски хируршком катетеризацијом десне каротидне артерије или инјекцијом у леву преткомору срца. Након апликације у млечну жлезду BALB/C мишева, 4T1 ћелије формирају примарни тумор и метастазирају у плућа, јетру, лимфне чворове и мозак, налик хуманом карциному дојке (48).

Туморске ћелије 4T1 су узгајане у DMEM медијуму (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са додатком 10% феталног телећег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 2 mmol/l L-глутамин, 1 mmol/l пеницилин/стрептомицин, 1 mmol/l не-есенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*).

Ћелије извађене из контејнера са течним азотом су се одмрзавале 1 до 2 минута у воденом купатилу на температури од 37°C. Додавањем 9 ml комплетног медијума и центрифугирањем на 350G 10 минута, уклоњен је крио-протективни медијум. Крио-протективни медијум јесте комплетан медијум за раст ћелија са додатком 5% DMSO. Након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума, пребачене у флак и култивисане у асептичним условима у инкубатору на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂. Просечно време дуплирања броја ћелија износи од 24 до 48^h.

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

У експериментима, бројни истраживачи су користили различит број туморских ћелија 4T1 за индукцију болести, који се кретао од 1×10^3 до 1×10^6 (49,50). У свим *in vivo*

експериментима овог истраживања коришћено је 5×10^4 туморских ћелија за индукцију тумора (20,21).

Малигне ћелије 4Т1 (5×10^4) су ресуспендоване у 50 μ l PBS-а и убризгаване су инсулинским системом (шприц и игла 21G) директно у масно јастуче млечне жлезде број 4.

3.4. Верификација примарног тумора

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

3.5. Анализа метастатских колонија

Мишеви који су примили STZ односно СВ су жртвовани 28. дана након апликације 4Т1 туморских ћелија, након чега су им плућа и јетре изоловане за патохистолошку анализу.

Фиксација и дехидратација: Непосредно након изолације, ткиво плућа и јетре је фиксирано у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени резови дебљине 5 μ m. Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

Бојење хематоксилином и еозином (H&E): Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56°C у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени Mayer-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута а потом су испрани дестилованом, а онда и текућом водом 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након

бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem*, Србија) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*).

3.6. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: хипергликемија, параметри оксидативног стреса

Зависне варијабле: величина примарног тумора, маса примарног тумора, број и величина метастатских колона, параметри оксидативног стреса и стреса ендоплазматског ретикулума, ћелијски састав слезине и субпопулације тумор-инфилтришућих леукоцита, фенотипске и функционалне карактеристике и цитотоксички капацитет НК ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита

Збуњујуће варијабле: не постоје

3.7. Одређивање антиоксидативних ензима

Еритроцити изловани из крви мишева који су примили STZ односно СВ су коришћени за мерење каталазе (енгл. *Catalase, CAT*), супероксид дисмутазе (енгл. *Superoxid dismutase, SOD*) и глутатиона (енгл. *Glutathione, GLU*) спектрофотометријом. Изоловани еритроцити су испрани три пута са 0.9 mmol/l NaCl и хемолизатом који садржи приближно 50 g of Hb/l, за које су. За одређивање активности CAT, лизати су разблажени дестилованом водом (1:7 v/v) и третирани са хлороформ-етанолом (0,6:1 v/v) како би се уклонио хемоглобин. Затим је 100 µl узорка и 1ml 10 mM H₂O₂ је додато у 50µl каталазног пуфера. Каталаза је детектована спектрофотометријски на 360 nm. Активност супероксид дизмутазе је одређена коришћењем епинефрина. Измешано је 100µl лизата и 1 ml карбонантног пуфера, а након тога је додато 100 µl епинефрина. SOD је детектован спектрофотометријски на 470nm. Активност CAT и SOD у еритроцитима је приказана је приказана у јединицама по

граму хемоглобина $\times 10^3$ (U/g Hb $\times 10^3$).

3.8. Изолација леукоцита из слезине

Мишеви који су развили дијабетес су жртвовани цервикалном дислокацијом 28. дана након апликације STZ или 15. дана после апликације 5×10^4 4T1 туморских ћелија у млечну жлезду. 15. дана после апликације 5×10^4 4T1 туморских ћелија су жртвовани и мишеви који су третирани само туморским ћелијама. Свим мишевима су изоловане слезине, након чега је поступак изолације спленоцита, односно лимфоцита спроведен на $+4^\circ\text{C}$. Најпре је клипом шприца протиснута слезина кроз ћелијско сито (енгл. *Cell strainer*, BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50ml уз додавање 5ml медијума (RPMI-1640; PAA Laboratories GmbH са додатком 10% FBS-a). Ћелије су центрифугиране 5 минута на 350G. Супернатант је одливен, а на ћелијски талог је додато 5ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Er Lysing buffer*) (4mg EDTA, 100mg NaHCO_3 , 826mg NH_4Cl , растворено у 100ml ddH₂O), и инкубирано 5 минута на леду. Након истека инкубације, додато је 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом чиме је заустављено даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране, супернатант је одливен а талог ресуспендован у 8ml RPMI-1640 (10% FBS). Ћелије су пропуштене кроз ћелијско сито, како би се избегла потенцијална контаминација хистиоцитима слезине. Након изолације, приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Овако добијена суспензија појединачних спленоцита коришћена је у експериментима (за проточну цитометрију и тест цитотоксичности).

3.9. Изолација ћелија из примарног тумора

Мишеви који су развили дијабетес су жртвовани цервикалном дислокацијом 15. дана након апликације 5×10^4 4T1 туморских ћелија у млечну жлезду. 15. дана после апликације 5×10^4 4T1 туморских ћелија су жртвовани и мишеви који су третирани само туморским ћелијама. Свим мишевима су изоловане примарни тумори, након чега је измерена њихова маса. Маказама су тумори уситњени а нако тога опрани 2-3 пута у петри шољи коришћењем PBS. Иситњени тумори су потом ресуспендовани у 5ml медијума за дигестију. Медијум за

дигестију туморског ткива садржи 1mg/ml колагеназе тип I, 1mM EDTA у 10 ml RPMI коме је додато 2% FBS. Дигестија тумора се одвија у трајању од два сата на 37°C уз мешање на шејкеру. Након дигестије, ћелије су центрифугиране 5минута на 1500 rpm, а потом је супернатант одливен пипетом. На талог је додато 10 ml претходно загрејаног трипсина, након чега је уследила инкубација у трајању од 3 минута на 37°C. Потом су садржаји у епруветама центрифугирани 10 минута на 1500 rpm, након чега је супернатант одливен пипетом. На талог је додато 2.5 ml претходно припремљене и загрејане DNA-зе (10µg/ml) након чега је уследила инкубација у трајању од 1 минута на 37°C. Након инкубације, у епрувете је додато 7 ml комплетног медијума и садржај је центрифугиран 10 min на 1500 rpm. Из епрувета је супернатант одливен пипетом, а потом је додато 5 ml комплетног медијума. Садржај је пропуштен кроз ћелијско сито, а потом и центрифугиран 10 min на 1500 rpm. Ћелије су ресуспендоване у 0,5 ml комплетног медијума. Приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Овако добијена суспензија појединачних тумор инфилтришућих леукоцита коришћена је у експериментима (за проточну цитометрију и тест цитотоксичности).

3.10. Анализа популација мононуклеарних ћелија слезине и примарног тумора проточном цитометријом

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

3.10.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера

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

Табела 1. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији

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

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

Табела 2. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћених у проточној цитометрији

назив	клон	изотип	произвођач
Alexa Fluor® 488 Hamster Isotype Control	A19-3	IgG1 κ	BD Pharmingen
PE Hamster Isotype Control	B81-3	IgG2a κ	BD Pharmingen
Alexa Fluor® 488 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
Alexa Fluor® 647 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
FITC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
APC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
PerCP-Cy™5.5 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
FITC Rat Isotype Control	B39-4	IgG1 λ	BD Pharmingen

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

3.10.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина

Бојење интрацелуларних молекула и цитокина изведено је по *BD Cytofix/Cytoperm™* методи. У овом истраживању ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, РМА; *Sigma Aldrich*) и јономицином (енгл. *Ionomycin*; *Sigma Aldrich*), који активирају протеин киназе С (енгл. *Protein kinase C*, РКС) и покрећу инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује експресију цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима. Инкубација у трајању од 4 до 6 часова је адекватна за продукцију већине цитокина. Дужа инкубација је удружена са цитотоксичким дејством поменутих активатора. Током *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgiStop™* (садржи моненсин) и *BD GolgiPlug™* (садржи брефелдин А). Блокирање интрацелуларног транспорта поменутих инхибиторима омогућава акумулацију већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, чиме се повећава могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Како моненсин и брефелдин А имају дозно и временски зависан цитотоксички ефекат, излагање ћелија овим агенсима мора бити ограничено, не дуже од 12 часова. Након истека времена предвиђеног за активацију, ћелије су центрифугиране 5 минута на 1400 rpm и ресуспендоване у пуферу за бојење (енгл. *Staining Buffer*, *BD Biosciences*). Најпре је урађено бојење мембранских маркера према унапред описаној процедури. После истека инкубације ћелије су опране у 2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 250g. Ћелије су затим фиксиране и пермеабелизоване коришћењем 250 μ l раствора за фиксацију и пермеабелизацију (*Fixation/Permeabilisation solution*, *BD Biosciences*) у трајању од 20 минута на +4°C. Пре и после додавања раствора за фиксацију и пермеабелизацију, сви узорци су добро вортексовани. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (*Perm/Wash™*, *BD Biosciences*) 5 минута на 250g. После одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана 30 минута на +4°C. Примарно коњугована анти-мишја антитела примењена су у финалном разблажењу 1:100. Примарна анти-зечја антитела за NLRP3, IL-1 β и NF- κ B и анти-козје *Cryopyrin* антитело примењена су у финалној концентрацији 1 μ g/ml. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (*Perm/Wash™*, *BD Biosciences*) 5 минута на 250g. Узорци у којима су примењена необележена примарна

антитела су додатно инкубирани са PE-Cy5.5 коњугованим козјим анти-зечјим IgG антителом или PE коњугованим анти-козјим IgG антителом, у финалном разблажењу 1:400, 30 минута на +4°C. Након испирања у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабилizацију (*Perm/Wash™, BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm, ћелије су ресуспендоване у 350 µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*). Непосредно након процедуре бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur (BD Biosciences)*.

3.11. Издвајање CD8⁺ Т лимфоцита негативном селекцијом помоћу магнетних куглица

За издвајање CD8⁺ Т лимфоцита из слезине је коришћен *CD8a⁺ T Cell Isolation Kit mouse*, према утврђеном протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*). Први корак у сепарацији CD8⁺ Т лимфоцита је изолација спленоцита који су најпре избројани а онда је узето 10⁷ ћелија. Ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а потом је одливен супернатант и талог ћелија ресуспендован у 40 µl пуфера (PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). У ћелијску суспензију је додато 10µl *CD8a⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse* који садржи различита антитела (анти-CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, MHC Class II, Ter-119 и TCRγ/δ. антитело) којима се уклањају одређене популације ћелија. Талог ћелија је добро промешан и инкубиран 5 минута на температури од 2-8°C. Затим је у талог додато 30 µL пуфера, 20 µL *Anti-Biotin MicroBeads*. Талог је добро промешан и инкубиран 10 мин у фрижидеру 2-8° C. Након инкубације талог је ресуспендован у 500 µl пуфера. LS колона, постављена у магнетно поље MidiMACS сепаратора (*Miltenyi Biotec*) је припремљена испирањем са 3 ml пуфера. Након инкубације од 15 минута на температури од 2-8°C, ћелијска суспензија је пропуштена кроз LS колону у магнетном пољу и на тај начин су прикупљени необележени CD8⁺ Т лимфоцити. Колона је потом испрана коришћењем 3 ml пуфера и прикупљени необележени CD8⁺ Т лимфоцити. По завршеном прикупљању негативно селекованих CD8⁺ Т лимфоцита додато је још 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом а затим су ћелије центрифугиране 10 минута на 300 G. Затим је одливен супернатант, талог ћелија је ресуспендован у 500µl RPMI-1640 са 10% FBS-ом и процењена је њихова вијабилност. Свеже изоловани CD8⁺ Т лимфоцити чији је принос износио између 90% и 95% су коришћене као ефекторске ћелије у тесту

цитотоксичности.

3.12. Издвајање NK ћелија негативном селекцијом помоћу магнетних куглица

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

3.13. Тест цитотоксичности

За одређивање цитотоксичке активности спленоцита, NK ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита изолованих из слезине експерименталних животиња коришћена је DP верзија *xCELLigence* система, која садржи 3 микротитар плоче са по 16 бунарчића (E16) са златним дном. 100 µl комплетног медијума је сипано у сваки бунарчић, након чега је извршена калибрација постављањем *xCELLigence* система у инкубатор на 37° у присуству 5% CO₂. Као циљне ћелије коришћене су ћелије туморске линије 4T1 (1x10⁴/по бунарчићу). Суспензија таргет ћелија (4T1) је припремљена на следећи начин: туморске ћелије су одвајане са дна флашка краткотрајним деловањем трипсином [0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA раствореног у PBS-у. Ћелије су затим ресуспендоване у у 6 ml DMEM-а са додатком 10% FBS-а, како би се неутралисао трипсин и спречило оштећење ћелија, а потом су центрифугиране 300 g 10 минута. Ћелије су додатно пране у PBS-у, без FBS-а. Вијабилност ћелија је одређена помоћу *trypan-blue*-а и коришћене су само ћелијске суспензије са вијабилношћу већом од 95%.

Потом је припремљена суспензија ћелија (1x10⁴ ћелија/ml комплетног медијума) тако да је у свако бунарче E16 плоче сипано по 100µl медијума у коме се налазило 1x10⁴ туморских ћелија. E16 плоче су постављене у *xCELLigence* систем, након чега су таргет ћелије 4T1 инкубиране на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂ у трајању 36h.

Ефекторске ћелије које су изоловане на претходно описан начин (спленоцити, NK ћелије, CD8⁺ Т лимфоцити) су кокултивисане са таргет ћелијама и то у односу спленоцити:4T1=20:1, NK ћелије:4T1=5:1, CD8⁺ Т лимфоцити:4T1=5:1. Ефекторске ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму (4x10⁶ ћелија/ml комплетног медијума), а затим су у одговарајуће бунарчиће сипане у волумену од 100µl по истеку 36-часовне инкубације таргет ћелија. E16 плоче су постављене у *xCELLigence* систем којим је мерен ћелијски индекс на 15 минута током 24 сата (37°C; 5% CO₂). Подаци су анализирани коришћењем програма *RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences)*.

3.14. Деплеција НК ћелија

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

3.15. Мерење серумске концентрације IL-10, IFN- γ , IL-1, IL-12, IL-17, TNF- α и IL-13

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

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

Према упутству произвођача, стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 2000pg/ml за TNF- α , IFN- γ и IL-10, IL-12, IL-13, и 1000pg/ml за IL-17, IL-1 β . У циљу добијања стандардне криве и одређивања једначине праве према којој ће бити прерачунате концентрације мерених цитокина, од припремљених штокова стандарда су направљена серијска двоструко растућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *Reagent Diluent* (PBS са 1%-тним BSA)).

100 μ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. *Microtiter Plate- MTP*) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене преко ноћи на собној температури. Ујутру су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*) у аутоматској машини за испирање МТП-а. Затим

је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μ l и МТР су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у МТР, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања МТР, у све бунарчиће је додато 100 μ l радне концентрације детекционог антитела (енгл. *Detection Antibody*), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране, а у бунарчиће сипано 100 μ l радне концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем МТР-а. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора субстрата (енгл. *Substrate Solution: Color reagent A + Color reagent B*, 1:1). Плоче су остављене двадесет минута касније, заклоњене од дневне светлости. Након тога додато је 50 μ l стоп раствора (енгл. *Stop Solution: 2N H₂SO₄*) и апсорбанца је мерена одмах у сваком бунарчету коришћењем *Microplate reader*-а (*Zenyth, Anthos, UK*) на таласној дужини 450nm.

Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

3.16. Култивација спленочита у дијабетичном и хипергликемичном серуму

Спленочити су изоловани из слезине здравог миша на претходно описан начин. Након изолације, приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Из дијабетичних и здравих мишева је сакупљена крв пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm). Измерена је концентрација глукозе у серуму изолованом из дијабетичних и здравих мишева. Потом је у сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено 2 милиона спленочита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*). Након тога је у бунаре додато

100 μ l серума и то тако што је у првих седам бунара додат серум изолован из дијабетичних мишева, у наредних седам бунара је додат серум изолован из здравог миша коме је додата глукоза (тако да је концентрација глукозе у дијабетичном серуму и серуму здравог миша коме је додата глукоза изједначена), док је трећој групи додат само серум изолован из здравих мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5% CO₂, ћелије су центрифугиране, потом су обојене и анализирани проточном цитометријом.

3.17. Инхибиција водоник пероксида

У циљу испитивања утицаја појачаног оксидативног стреса, који доминира у дијабетес мелитусу, на функционални фенотип NK ћелије, коришћен је инхибитор водоник-пероксида, пег-каталаза (*Sigma- Aldrich*). У сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено 2 милиона спленочита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*). Петнаест минута пре додатка серума дијабетичног миша, спленочити су инкубирани са 2000 U/ml пег-каталазе који конвертује H₂O₂ у H₂O и O₂. Након тога је у бунаре додато 100 μ l серума изолованог из дијабетичних мишева. Контролну групу су сачињавали спленочити инкубирани само у серуму дијабетичних мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5% CO₂, ћелије су центрифугиране, потом су обојене и анализирани проточном цитометријом.

3.18. Инхибиција индоламин-2, 3 диоксигеназе

У експериментима у којима је испитивано да ли је IDO један од медијатора којим MDSCs супримирају NK ћелије, коришћен је фармаколошки инхибитор IDO-а, 1-метил DL триптофан (1-MT, 860646, *Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*). 1-MT је смеша два стереоизомера, *levo*-1-метил триптофана, који компетитивно инхибира IDO 1 и *dextro*-1-метил триптофана који компетитивно инхибира IDO2. 1-MT је најпре растворен у 0.1 N NaOH чиме је направљен 1 mM шток. pH је коригована применом хлороводоничне киселине до 7.5.

У сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено 2 милиона спленочита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*).

Након тога је у бунаре додато 100 μ l серума и то тако што је у првих седам бунара додат серум изолован из дијабетичних мишева коме је додат 1 mM 1-MT, другој групи додат је само серум изолован из дијабетичних мишева, док је трећој групи додат серум изолован из контролних здравих мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5% CO₂, ћелије су центрифугиране, потом су обојене и анализирани проточном цитометријом.

3.19. Инхибиција индуцибилне азот моноксид синтазе

У експериментима у којима је испитивано да ли је iNOS један од медијатора којим MDSCs супримирају NK ћелије, коришћен је фармаколошки инхибитор L-N^G-монометил аргинин цитрат (енгл. *L-N^G-monomethyl Arginine citrate*, L-NMMA). L-NMMA је неселективни инхибитор ензима iNOS. L-NMMA (*Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*) је растворен у 1ml дестиловане воде до финалне концентрације 5mg/ml. У сваки бунар микротитар плоче са 24 бунара плоче стављено 2 милиона спленоцита изолованих из здравог миша, а затим је у бунаре додат RPMI 1640 медијум (*Sigma- Aldrich*). Након тога је у бунаре додато 100 μ l серума и то тако што је у првих седам бунара додат серум изолован из дијабетичних мишева коме је додат 1 mM L-NMMA, другој групи додат је серум изолован из дијабетичних мишева коме је додат 1 mM IDO, трећој групи додат само серум изолован из изолован из дијабетичних мишева, док је четвртој групи додат серум изолован из здравих мишева. Укупан волумен у бунарима је био 1ml. Након 24 h инкубације на 37°C у атмосфери са 5% CO₂, ћелије су центрифугиране, потом су обојене и анализирани проточном цитометријом.

3.20. Полимеризована ланчана реакција (PCR)

3.20.1. Изолација RNA из ткива слезине миша

За изолацију укупне рибонуклеопротеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid*,) из ткива јетре коришћен је тризол реагенс, који садржи раствор фенола и гуанидин изотиоцианата. Након изолације, део ткива слезине миша тежине приближно 100 mg је механички хомогенизован у 1 ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA*) коришћењем ручног хомогенизатора. Хомогенат је пребачен у епрувете величине 1,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубиран 5 минута на собној

температури, а онда центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. На супернатант је додато 100 µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane*, ВСР, *Sigma Aldrich*), узорци су промешани, инкубирани 15 минута на собној температури, а затим центрифугирани 20 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања уочавају се раздвојена три слоја, а RNA је изолована из горњег провидног слоја. RNA је пребачена у нове епрувете у које је додато 500 µl расхлађеног изопропил алкохола да би се извршила преципитација RNA. Након што су промешани, узорци су инкубирани 15 минута на собној температури, а затим центрифугирани 8 минута на 12000 rpm на +4°C. Талог из епрувета је опран два пута са по 1 ml расхлађеног 70% етил алкохола и потом сушен 2 до 5 минута на собној температури. Осушени талог је разблажен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water*, *Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност РНК одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280 nm коришћењем апарата *Eppendorf® Biophotometer* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*).

3.20.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA

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

3.20.3. Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) мерена је експресија жељених гена. Реакција qRT-PCR је изведена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) коришћењем микротитар плоча са 96 места (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Реакциона смеша је имала волумен од 20 µl по комори, а садржала је: 2 µl узорка комеплементарне DNA, 10 µl *Master mix (Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems)*, 2 µl смеше парова прајмера за жељени ген („*forward*“ и „*reverse*“) као и 6 µl воде која не садржи нуклеазе. Затим су плоче прелепљене оптичком адхезивном фолијом (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), центрифугиране 1 минут на 3000 rpm и смештене у qRT-PCR апарат (*Mastercycler® ep realplex*). Реакције qRT-PCR је изведена на основу температурне шеме: 4 минута на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Да би се одредила специфичност PCR продукта подешени су услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. Прајмери који су коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у табели (Табела 3).

Табела 3: Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу

	Forward	Reverse
NKG2D	ACG TTT CAG CCA GTA TTG TGC	GGA AGC TTG GCT CTG GTT C
DAP10	CCC AGG CTA CCT CCT GTT C	CTA CAA TTA GGA GTG ACA TGA CCG
NKG2D ORF	GAA GGC TTT TAT CCA CAA	CCC CAG CCC ATC CAC TCT
ATF4	GGGTTCTGTCTTCCACTCCA	AAGCAGCAGAGTCAGGCTTTC
CHOP	CCACCACACCTGAAAGCAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
BiP	TTCAGCCAATTATCAGCAAАCTCT	TTTTCTGATGTATCCTCTTCACCAGT
GRP94	AAGAATGAAGGAAAAACAGGACAAAA	CAAATGGAGAAGATTCCGCC

3.21. Снага студије и величина узорка

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

3.22. Статистичка обрада података

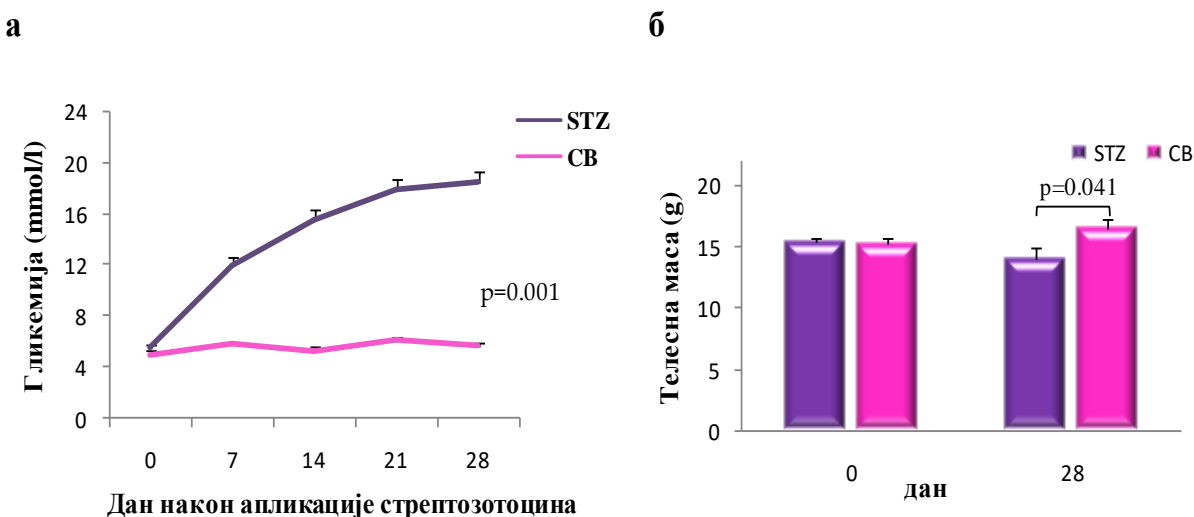
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма IBM SPSS Statistics 20. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*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

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Дијабетес мелитус убрзава појаву и раст примарног тумора дојке

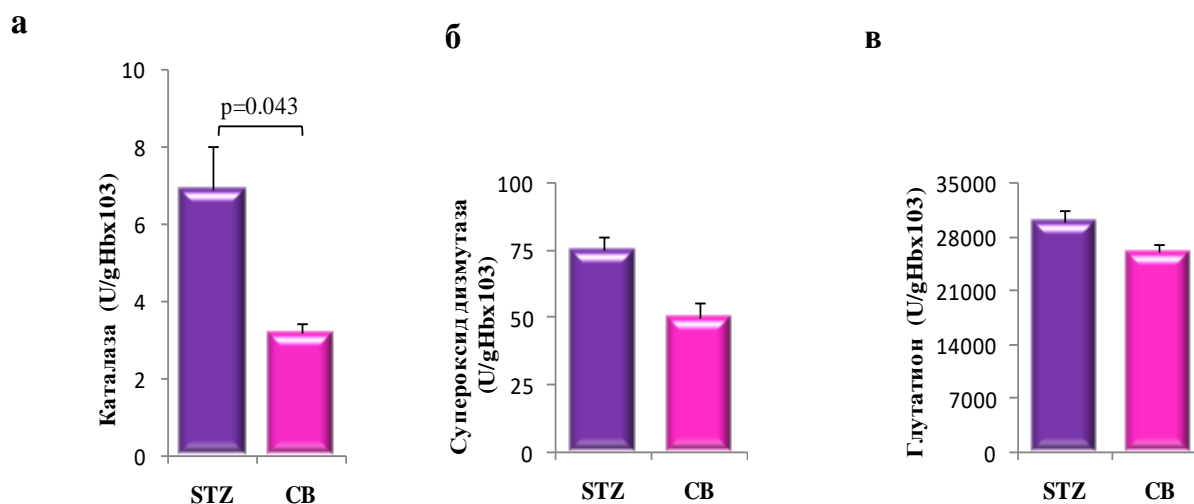
Једна сублетална доза стрептозотоцина (170mg/kg растворено у 100 μ l цитратног пуфера) је апликована интраперитонеално експерименталној групи BALB/c мишевима, док је контролној групи BALB/c мишева апликован цитратни пуфер (100 μ l). Током трајања експеримента, мерена је концентрација глукозе у крви наше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

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



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

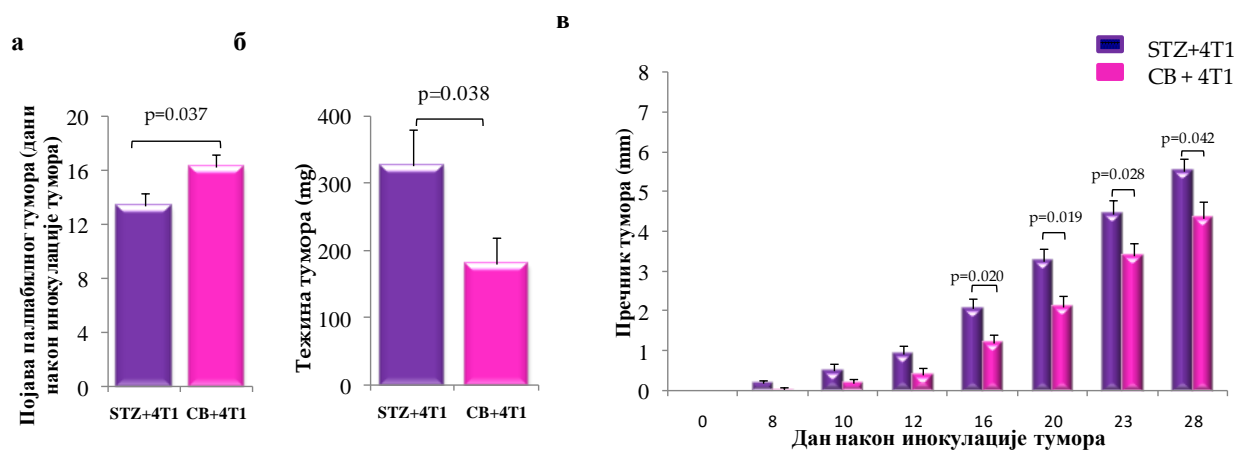
Мишеви третирани стрептозотоцином имали су значајно више вредности антиоксиданса каталазе у еритроцитима у поређењу са контролним мишевима ($p=0.043$; Графикон 2а). Такође, концентрације антиоксиданаса супероксид дизмутазе и глутатиона су биле повишене код мишева којима је апликован стрептозотин у односу на мишеве третиране цитраним пуфером, али ове разлике нису досегле статистичку значајност ($p>0.05$; Графикони 2б, 2ц).



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

Ћелије из културе 4T1 тумора (5×10^4) су убризгане у четврту млечну жлезду BALB/c мишева 28. дана након апликације стрептозотоцина односно цитратног пуфера. Појава тумора је свакодневно праћена палпацијом. Након појаве палпабилног тумора мерен је његов пречник док је тежина примарног тумора измерена 36-ог дана експеримента, односно након жртвовања животиња.

Мишеви третирани стрептозотоцином су раније развили примарни тумор у поређењу са контролном групом мишева третираном цитратним пуфером ($p=0.037$; Графикон 3а). Средња вредност пречника примарног тумора је била значајно већа код мишева који су примили стрептозотоцин у односу на контролну групу мишева ($p=0.020$; Графикон 3в). Такође, средња вредност масе примарног тумора је била значајно већа у групи мишева третираних стрептозотоцином у поређењу са групом мишева третираних цитратним пуфером ($p=0.038$; Графикон 3б).

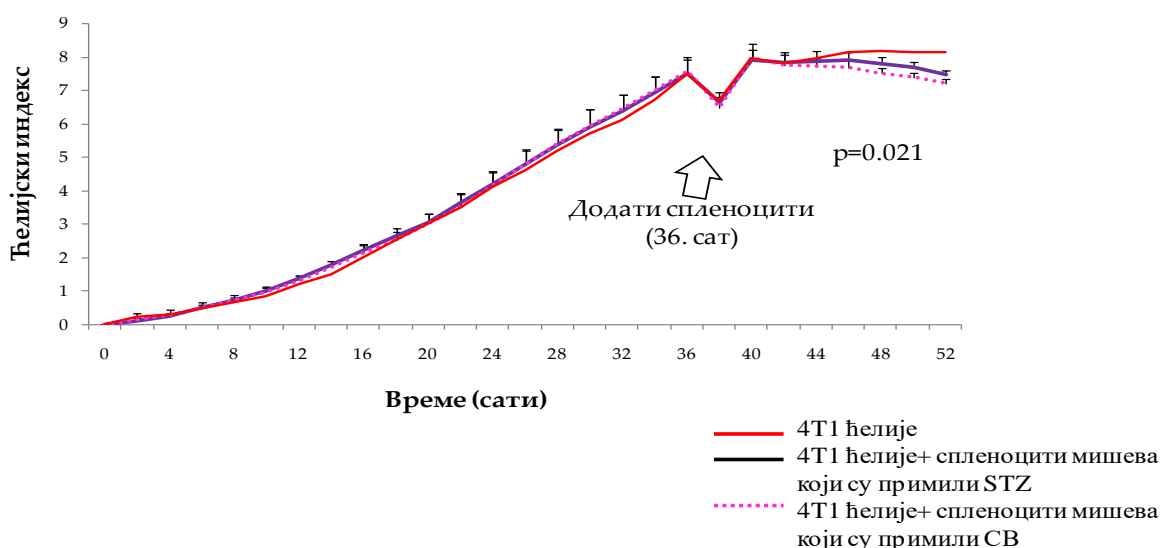


Графикон 3. Убрзан раст 4T1 тумора дојке код мишева третираних стрептозотоцином. BALB/c мишевима убризгано је 5×10^4 4T1 туморских ћелија. Појава палпабилног тумора значајно је убрзана код мишева који су третирани ST (а). Волумени примарних тумора знатно су већи код мишева који су примили STZ (б). 20. дана од инокулације тумора средња вредност пречника примарног тумора код мишева који су примили STZ је статистички значајно већа него код мишева који су третирани CB (в). Резултати су приказани као аритметичке средине \pm SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student's T* тестом.

4.2. Смањена цитотоксичност NK ћелија доприноси убрзаној појави и расту тумора дојке код мишева третираних STZ-ом

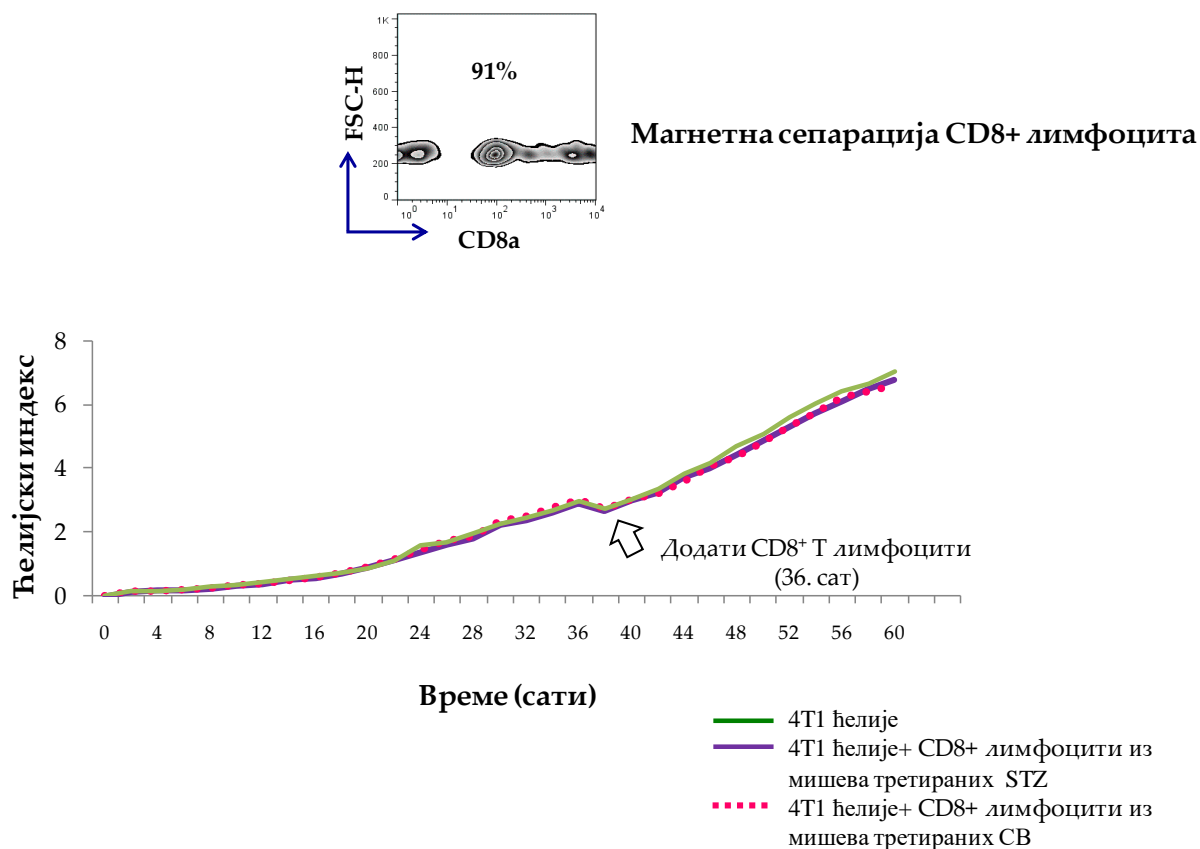
Налаз убрзане појаве и раста примарног тумора код мишева који су примили STZ, у даљем току истраживања испитан је цитотоксички ефекат спленоцита, CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија мишева који су примили STZ односно СВ према 4Т1 туморској линији.

Двадесетосмог дана након апликације STZ односно СВ, мишеви су жртвовани и изоловане су слезине у циљу анализе цитотоксичности спленоцита према 4Т1 туморској линији. На графикону 4 се види да су спленоцити изоловани из мишева који су примили STZ показали значајно мању цитотоксичност према 4Т1 ћелијској линији у поређењу са спленоцитима мишева који су примили само СВ ($p=0.021$; Графикон 4).



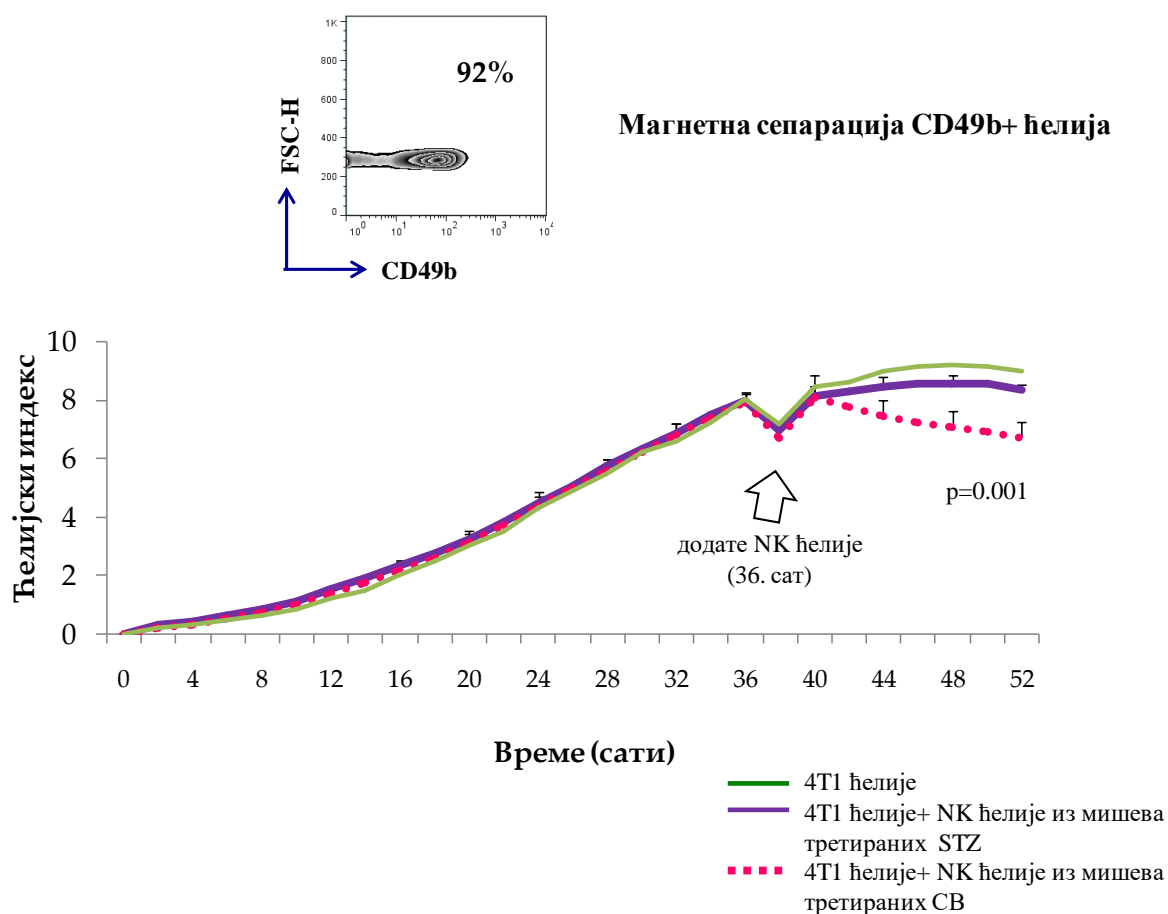
Графикон 4. Интраперитонална апликација STZ смањује цитотоксичност спленоцита према 4Т1 туморским ћелијама. Цитотоксичка активност спленоцита према 4Т1 таргет ћелијама испитивана је *xCELLigence* системом у трајању од 52 сати, однос таргет:ефектор = 1:20. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс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

У циљу прецизније потврде које су то ћелије одговорне за смањену цитотоксичност према 4Т1 туморској линији, $CD8^+$ Т лимфоцити и NK ћелије су изоловани магнетном сепарацијом из слезина мишева третираних STZ и односно СВ. Утврђено је да се цитотоксичност $CD8^+$ Т лимфоцита не разликује у групи мишева који су третирани STZ 4Т1 туморским ћелијама у односу на мишеве који су примили СВ и туморске 4Т1 ћелије ($p>0.05$; Графикон 5).



Графикон 5. Интраперитонална апликација STZ не утиче на цитотоксичност $CD8^+$ Т лимфоцита према 4Т1 туморским ћелијама. Цитотоксичка активност спленоцита према 4Т1 таргет ћелијама испитивана је *xCELLigence* системом у трајању од 60 сати, однос таргет:ефектор = 1:5. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Цитотоксичност $CD8^+$ Т лимфоцита изолованих из мишева који су примили STZ+4Т1 се не разликује у односу на $CD8^+$ Т лимфоците изоловане из мишева који су примили СВ+4Т1. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређена је *Student's T* тестом.

Након овог резултат смо изоловали CD49b⁺ NK ћелије позитивном селекцијом на магнетним колонама и потом из мишева третираних STZ односно СВ и испитали њихову цитотоксичност према 4Т1 ћелијској линији. NK ћелије изловане из слезине мишева третираних STZ су показале значајно мању цитотоксичност према 4Т1 ћелијама у односу на NK ћелије изловане из слезине мишева третираних СВ (p=0.001; Графикон 6).

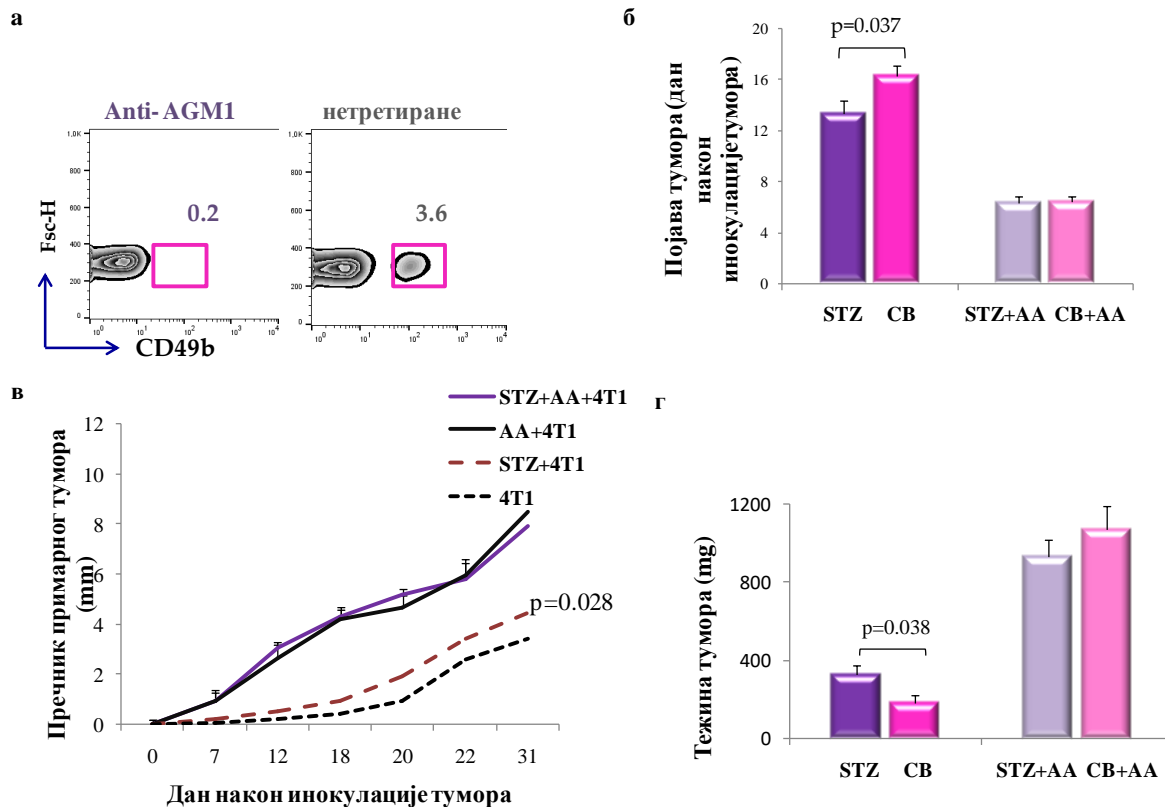


Графикон 6. Интраперитонална апликација STZ смањује цитотоксичност NK ћелија према 4Т1 туморским ћелијама. Цитотоксичка активност NK ћелија према 4Т1 таргет ћелијама испитивана је *xCELLigence* системом у трајању од 52 сата, однос таргет:ефектор = 1:5. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Цитотоксичност NK ћелија изолованих из мишева који су примили STZ је значајно мања у односу на NK ћелија изоловане из мишева који су примили СВ. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SEM из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређена је *Student's T* тестом.

4.3. Деплеција НК ћелија убрзава појаву и раст примарног тумора

Да би се испитао утицај НК ћелија у антитуморском имунском одговору на појаву и раст 4Т1 карцинома дојке, мишевима је пре индукције болести, уклонили смо популацију НК ћелија из мишева уз даљу индукцију дијабетес мелитуса и инокулацију тумора дојке. Мишеви су нултог дана експеримента примили STZ односно СВ. НК ћелије су деплетирани *in vivo* интраперитонеалном апликацијом анти-*asialo* GM1 антитела дан пре и 5 дана након апликације туморских 4Т1 ћелија. Мишевима је 28. дана експеримента убризгано 5×10^4 4Т1 туморских ћелија и праћена је појава као и раст примарног тумора. Апликација анти-*asialo* GM1 антитела резултовала је значајном редукцијом НК ћелија у слезини, што је приказано на графикону 7а. Након уклањања НК ћелија *in vivo*, појава тумора је убрзана у обе експерименталне групе, а разлика у дијаметру и маси примарних тумора између STZ односно СВ третираних мишева је нестала (Графикон 7б, 7в, 7г). Добијени резултати указују на кључну улогу НК ћелија у анти-туморском имунском одговору на 4Т1 карцином дојке.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишијег тумора дојке

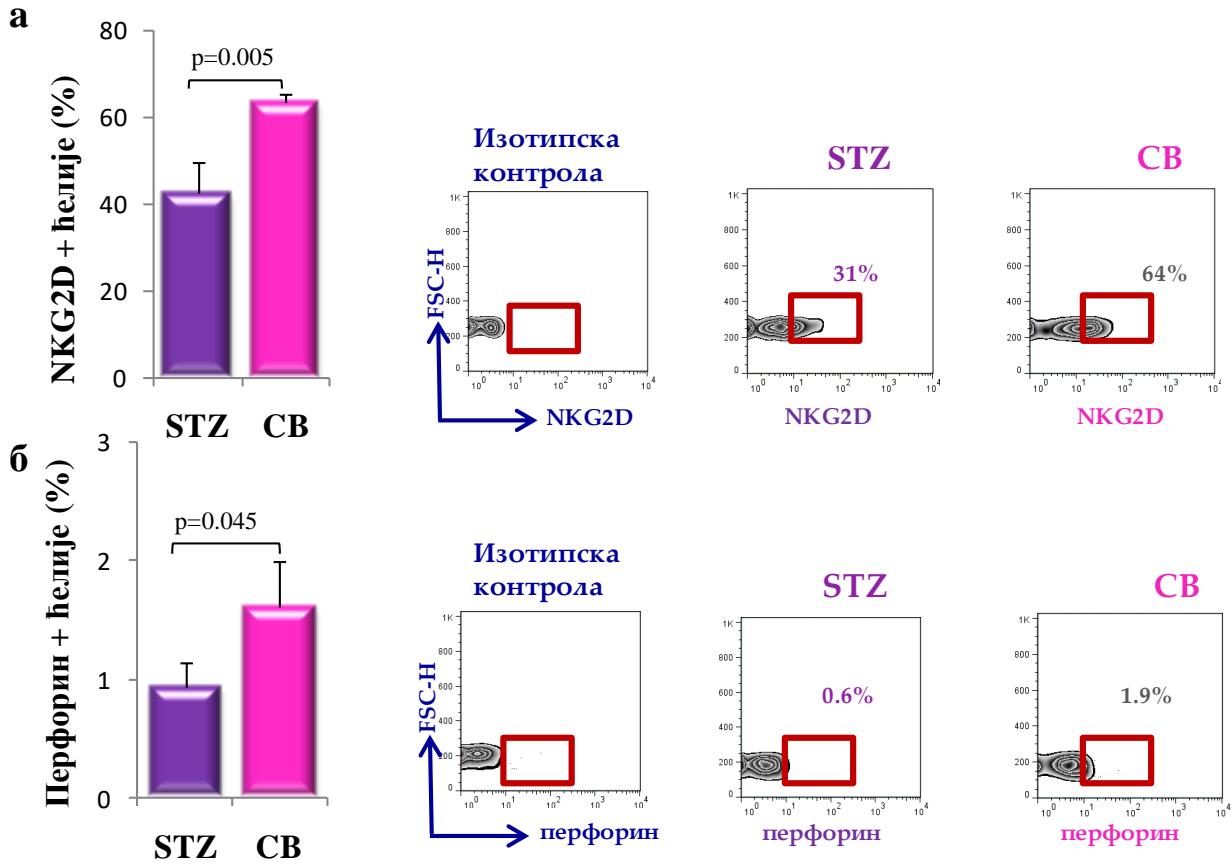


Графикон 7. Мишевима је индукован дијабетес а потом су инокулисани са 5×10^4 4T1 туморских ћелија и праћена је појава и раст примарног тумора у мишевима са уклоњеним NK ћелијама. Репрезентативни цитометријски плотови показују проценат NK ћелија након *in vivo* давања анти-asialo GM1 mAb. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student's T* тестом.

4.4. Дијабетес мелитус значајно смањује експресију NKG2D, перфоринона, IFN- γ , IL-17, а повећава експресију PD-1 молекула и IL-10 на спленичним NK ћелијама

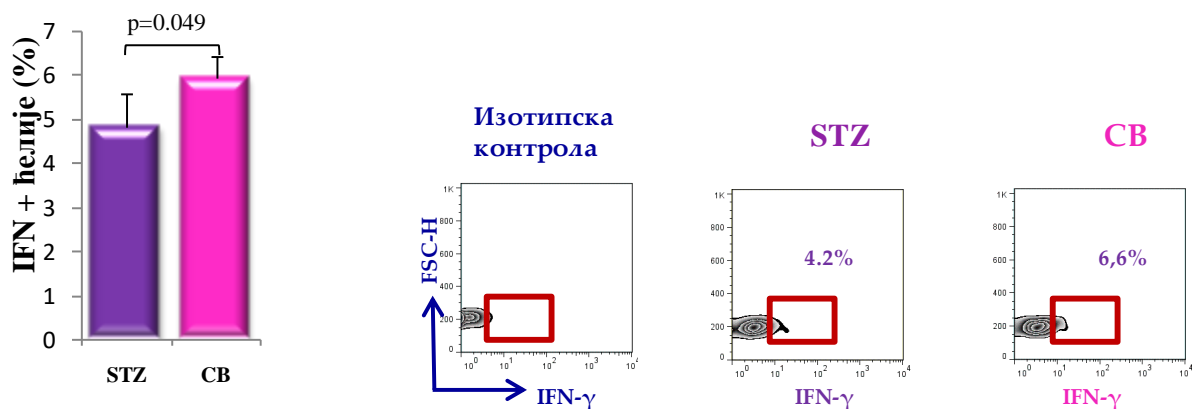
У циљу дефинисања могућих разлога смањене цитотоксичке активности NK ћелија, следећи корак у истраживању био је да се испита функционални фенотип NK ћелија у слезини мишева 28. дана након апликације STZ. У оквиру изоловане популације NK ћелија слезине, анализирана је експресија NKG2D, PD-1 (енгл. *Programmed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

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишјег тумора дојке

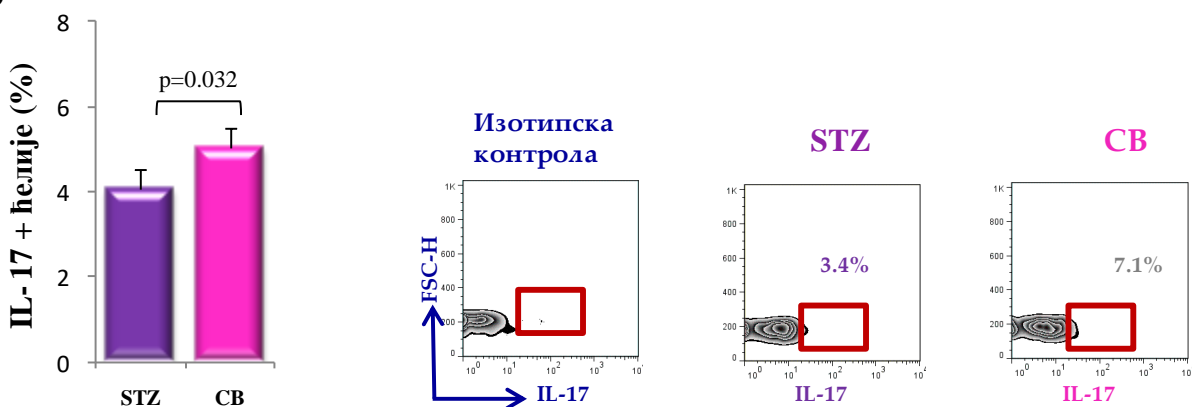


Графикон 8. Дијабетес мелитус смањује процентуалну заступљеност NKG2D⁺ и перфторин⁺ NK ћелија у слезини мишева. Мишеви који су примили једну дозу STZ, имају смањен проценат NKG2D⁺ (а) и перфторин⁺ (б) NK ћелија у поређењу са мишевима који су примили само CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student's T* тестом.

а



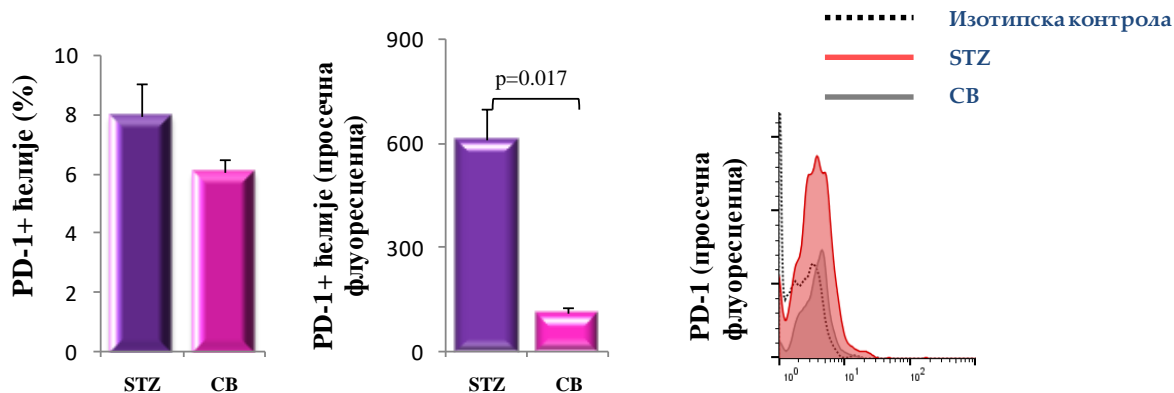
б



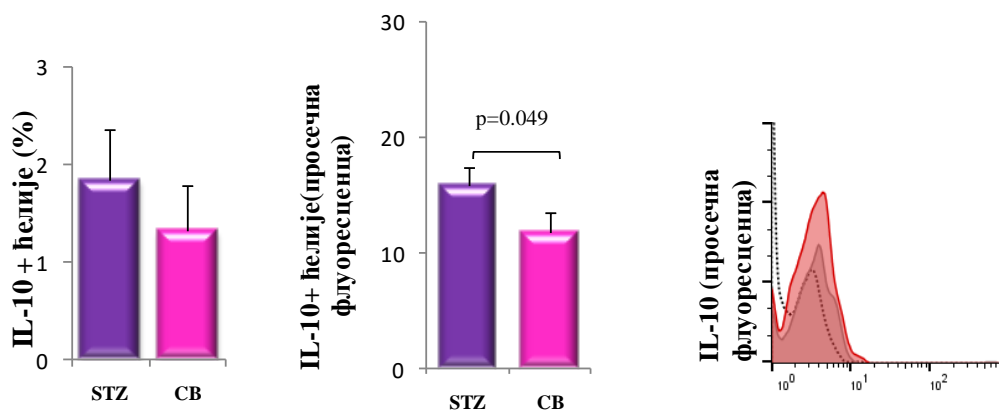
Графикон 9. Дијабетес мелитус смањује процентуалну заступљеност IFN- γ ⁺ и IL-17⁺NK ћелија у слезини мишева. Мишеви који су примили једну дозу STZ, имају смањен проценат IFN- γ ⁺ NK ћелија (а) и IL-17⁺ NK ћелија (б) у поређењу са мишевима који су примили само CB. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке

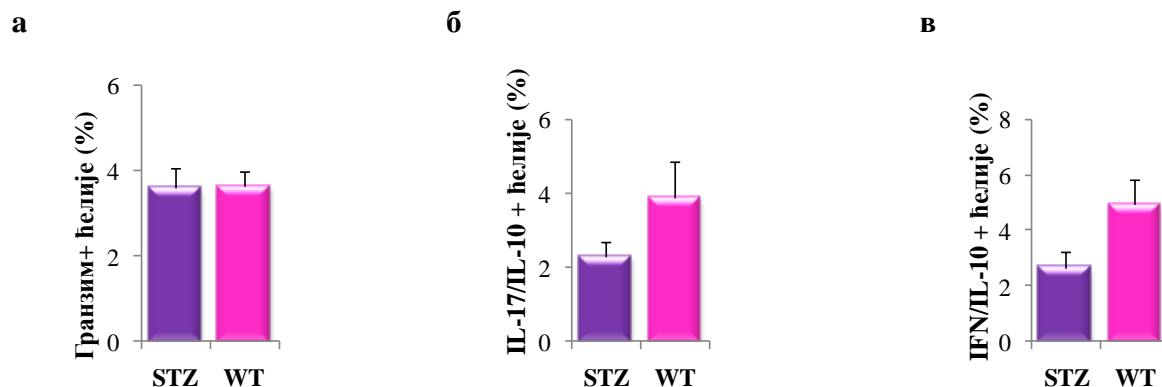
а



б



Графикон 10. Дијабетес мелитус повећава експресију PD-1 молекула и IL-10 на NK ћелијама у слезини мишева. NK ћелије мишева са дијабетесом експримирају значајно више PD-1 молекула (а) и IL-10 (б) у поређењу са NK ћелијама изолованих из слезина мишева који су само примили СВ. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.



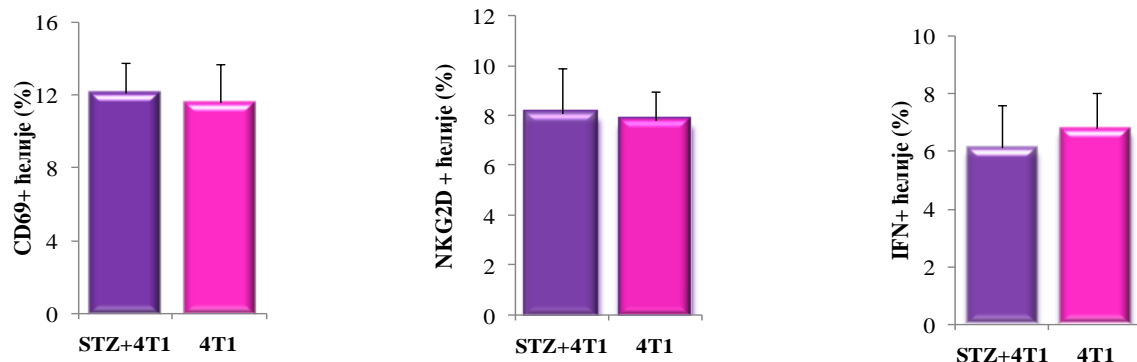
Графикон 11. Дијабетес мелитус не утиче на проценат гранзим⁺NK ћелија, IL-17/IL-10⁺ NK ћелија ни IFN- γ /IL-10⁺ NK ћелија у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености гранзим⁺NK ћелија (а), IL-17/IL-10⁺ NK ћелија (б) ни IFN- γ /IL-10⁺ NK ћелија (в) у слезинама мишева који су третирани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

4.5. Дијабетес мелитус не утиче значајно на фенотип CD8⁺ Т лимфоцита у моделу 4Т1 тумора дојке

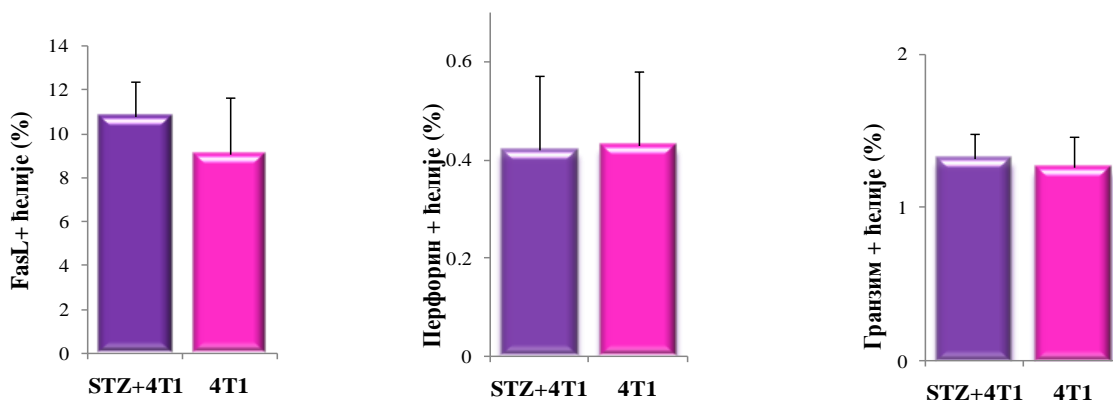
У циљу даљег испитивања утицаја дијабетес мелитуса на компоненте антитуморског имунског одговора, методом проточне цитометрије у слезини је анализиран фенотип CD8⁺ Т лимфоцита.

Интраперитонеална примена STZ није утицала на процентуалну заступљеност CD69⁺ ($p > 0.05$; Графикон 12а), NKG2D⁺ ($p > 0.05$; Графикон 12б) IFN- γ ⁺ ($p > 0.05$; Графикон 12в), FasL⁺ ($p > 0.05$; Графикон 13а), перфорин⁺ ($p > 0.05$; Графикон 13б), гранзим⁺ ($p > 0.05$; Графикон 13в) CD3⁺CD8⁺ Т лимфоцита у слезини мишева. Такође, није уочена разлика у проценту CD3⁺CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају молекулу CD107а ($p > 0.05$; Графикон 14а) и PD-1 ($p > 0.05$; Графикон 14б). Резултати приказани на графикону 14в показују да дијабетично стање значајно повећава експресију KLRG-1 на спленичним CD3⁺CD8⁺ Т лимфоцитима у поређењу са CD3⁺CD8⁺ Т лимфоцитима изолованим из слезина мишева третираних само СВ ($p = 0.05$; Графикон 14в).

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишијег тумора дојке

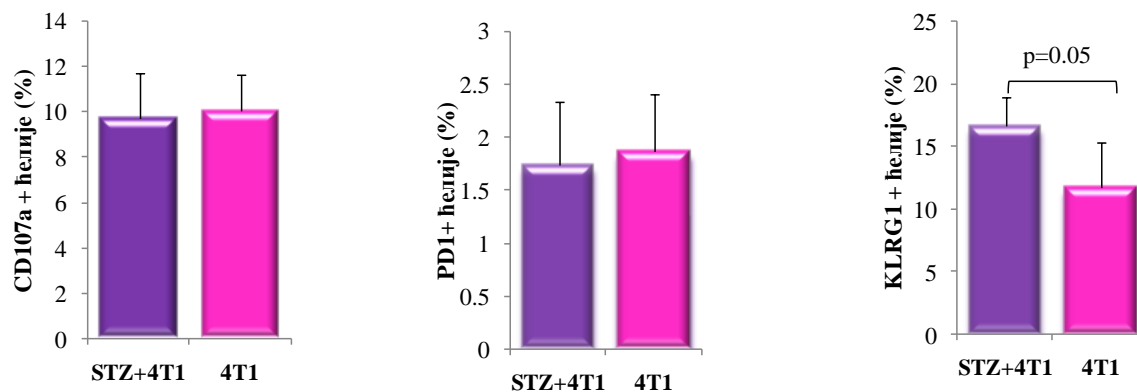


Графикон 12. Дијабетес мелитус не утиче на проценат CD69⁺, NKG2D⁺ IFN- γ ⁺ CD3⁺CD8⁺ T лимфоцита услезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености CD69⁺ (а), NKG2D⁺ (б), IFN- γ ⁺ (в) CD3⁺CD8⁺ T лимфоцита у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са CD3⁺CD8⁺ T лимфоцита изолованих из слезина мишева који су само примили СВ. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.



Графикон 13. Дијабетес мелитус не утиче на проценат FasL⁺, перфорин⁺ гранзим⁺ CD3⁺CD8⁺ T лимфоцита у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености FasL⁺ (а), перфорин⁺ (б), гранзим⁺ (в) CD3⁺CD8⁺ T лимфоцита у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са CD3⁺CD8⁺ T лимфоцита изолованих из слезина мишева који су само примили СВ. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

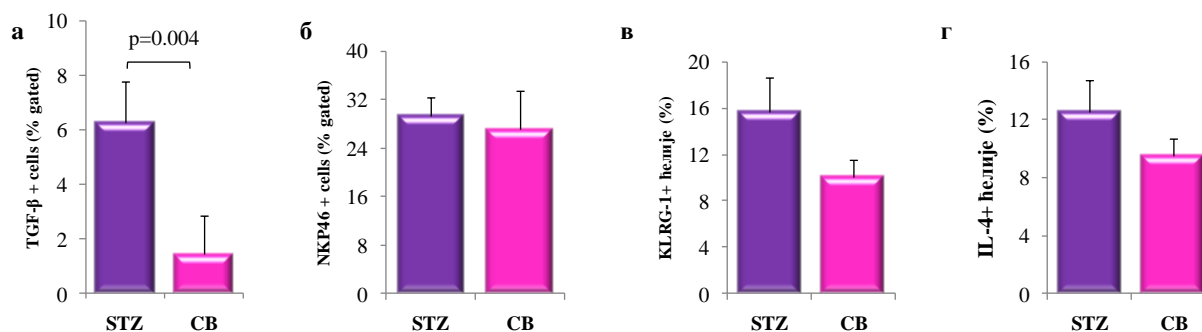
Утицај дијабетес мелитус на раст и прогрессију мишјег тумора дојке



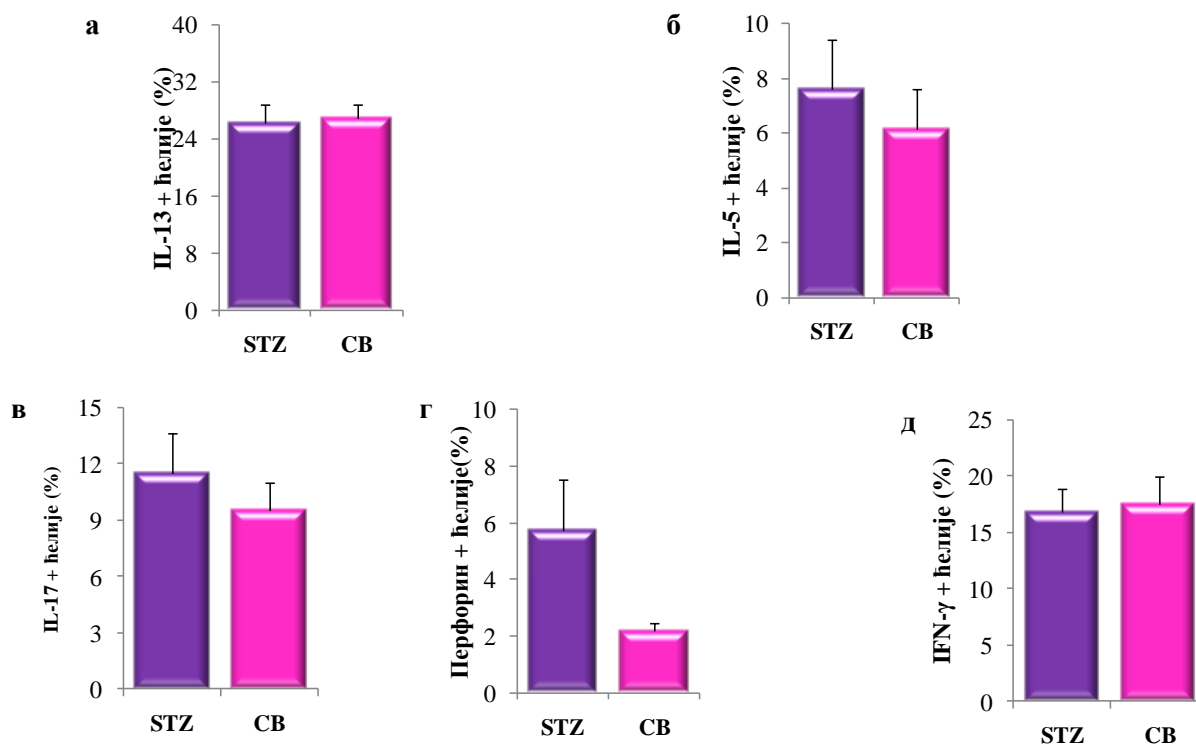
Графикон 14. Дијабетес мелитус повећава процентуалну заступљеност KLRG-1⁺CD3⁺CD8⁺ Т лимфоцита, а не утиче на проценат CD107a⁺ и PD-1⁺ CD3⁺CD8⁺ Т лимфоцита у слезини мишева. Нема разлике у процентуалној заступљености CD107a⁺ (а), PD-1⁺ (б) CD3⁺CD8⁺Т лимфоцита у слезинама мишева који су третирани STZ у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

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

Обзиром да је познато да и NKT ћелије могу да доприноси анти-туморском имунском одговору, испитивали смо функционални фенотип NKT ћелија. Резултати приказани на графикану 15а указују да дијабетично стање значајно повећава процентуалну заступљеност TGF- β -продукујућих CD3⁺CD49b⁺NKT ћелија ($p=0.004$; Графикон 15а) у поређењу са NKT ћелијама изолованим из слезина мишева третираних само СВ. Дијабетес мелитус није утицао на процентуалну заступљеност NKp46⁺ ($p>0.05$; Графикон 15б), KLRG-1⁺ ($p>0.05$; Графикон 15в) IL-4-продукујућих ($p>0.05$; Графикон 15г) CD3⁺CD49b⁺NKT ћелија. Између експерименталних група није било значајне разлике ($p>0.05$) у проценту NKT ћелија које продукују IL-13, IL-5, IL-17, перфорин, IFN- γ (Графикон 16а, 16б, 16в, 16г, 16д).



Графикон 15. Дијабетес мелитус повећава процентуалну заступљеност TGF- β ⁺CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија, а не утиче на проценат NKp46⁺, KLRG-1⁺ и IL-4⁺ CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у слезини мишева. Мишеви који су примили STZ имају значајно већи проценат KLRG-1⁺CD3⁺CD49b⁺ Т лимфоцита (а) у слезини у односу на мишеве који су примили само СВ. Нема разлике у процентуалној заступљености NKp46⁺ (б), KLRG-1⁺ (в) и IL-4⁺ (г) CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у слезинама мишева који су третирани STZ у поређењу са CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелијама изолованим из слезина мишева који су само примили СВ. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.



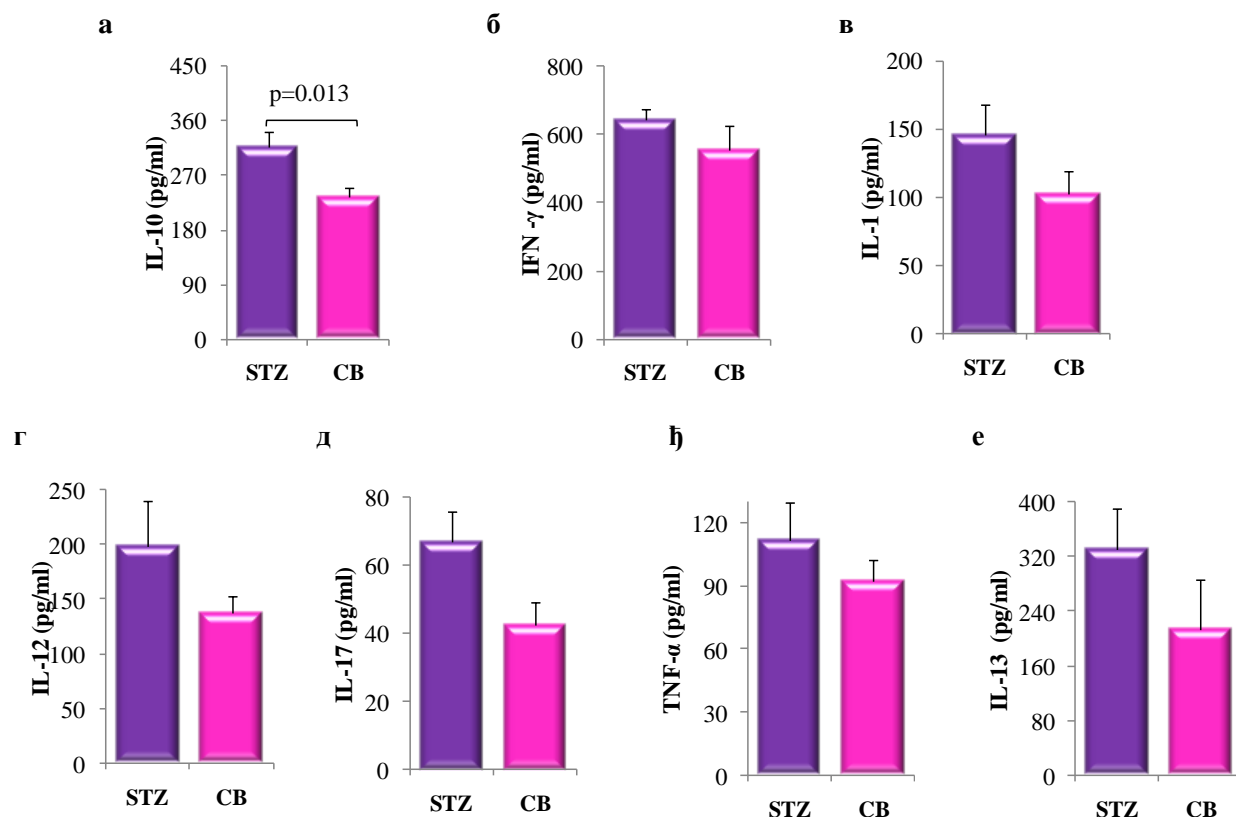
Графикон 16. Дијабетес мелитус не утиче процентуалну заступљеност IL-13⁺, IL-5⁺, IL-17⁺, перфорин⁺, IFN- γ ⁺ CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија. Апликација STZ није утицала на проценат IL-13⁺ (а), IL-5⁺ (б), IL-17⁺ (в), перфорин⁺ (г), IFN- γ ⁺ (д) CD3⁺CD49b⁺ NKT ћелија у слезинама мишева. Приказане вредности су аритметичке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

4.7. Повећана концентрација IL-10 у серуму мишева са дијабетесом

Обзиром да су резултати показали да дијабетично стање супримира цитотоксичку функцију NK ћелија, испитано је да ли примена STZ утиче на продукцију цитокина.

Мерењем цитокина у серуму 28 дана након интраперитонеалне примене STZ утврђено је статистички значајно повећање концентрације IL-10 ($p=0.013$; Графикон 17а) у серуму мишева који су примили STZ у поређењу са мишевима којима је дат само CB. Као што се може видети на графикону 17, није било статистичке разлике ($p>0.05$) у концентрацији

IFN- γ ($p>0.05$; Графикон 17б), IL-1 ($p>0.05$; Графикон 17в), IL-12 ($p>0.05$; Графикон 17г), IL-17 ($p>0.05$; Графикон 17д), TNF- α ($p>0.05$; Графикон 17ђ), IL-13 ($p>0.05$; Графикон 17е) између испитиваних група.



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

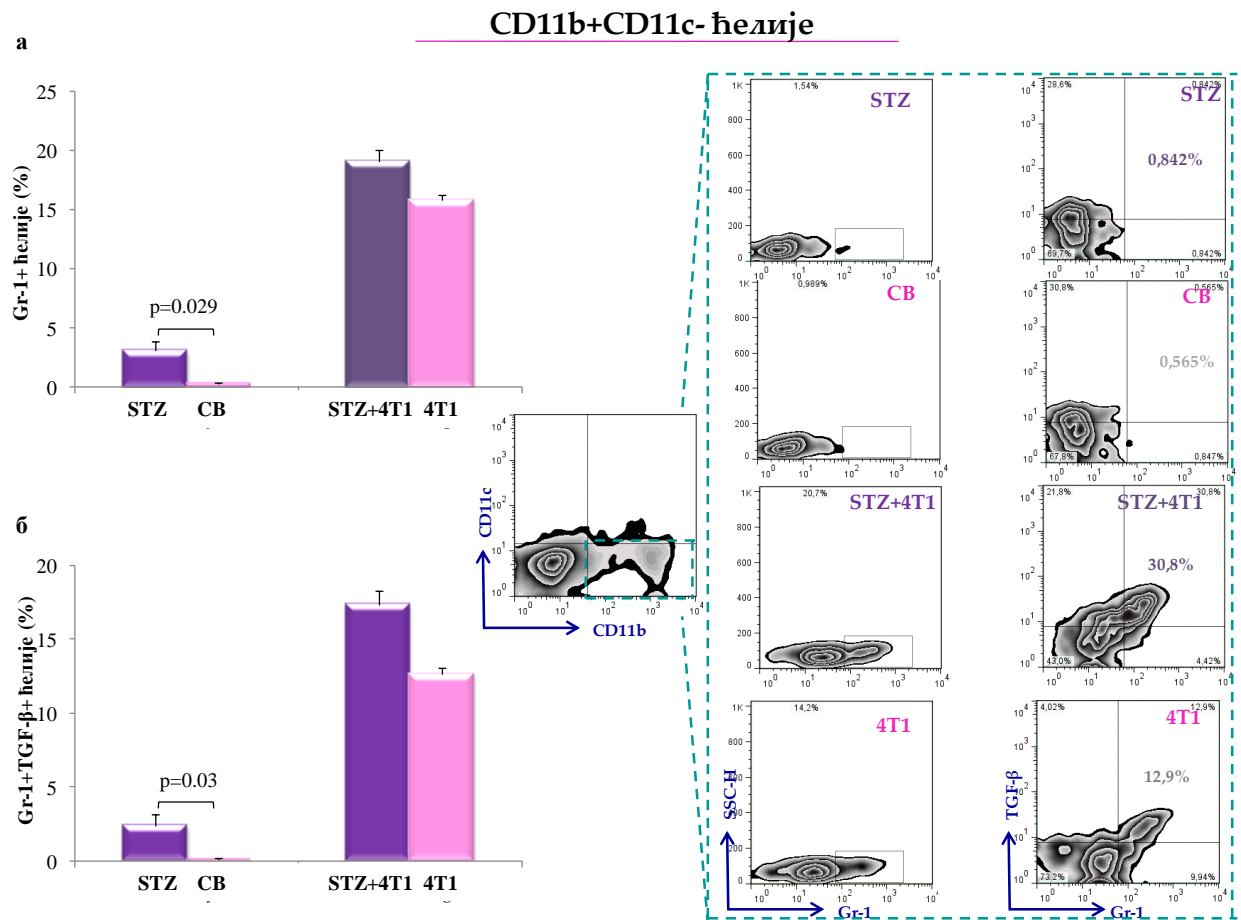
4.8. Дијабетес мелитус појачава акумулацију имunosупресивних ћелија у слезину мишева са тумором дојке

Анализе серумских цитокина су показале да у серуму мишева који су примили STZ постоји значајна разлика у концентрацији IL-10 у односу на мишеве којима је дат само СВ, док није било разлике у концентрацијама TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-12, IL-17 између поменутих група (Графикон 17). У складу са овим резултатом проточном цитометријом су анализирани фенотипске и функционалне карактеристике имunosупресивних ћелија имунског система у слезини мишева који су примили STZ односно СВ, пре и 15 дана након апликације 4Т1 туморских ћелија.

Прво смо анализирали функционални фенотип мијелоидних супресорских ћелија (енгл. *Myeloid-derived suppressor cell*, MDSC). На графикону 18а се јасно уочава статистички значајно већи проценат CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs у слезини мишева који су примили STZ у односу на контролну групу мишева (p=0.029; Графикон 18а). Ова разлика у процентуалној заступљности CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺MDSCs у слезини се губи након апликације туморских 4Т1 ћелија (p>0.05; Графикон 18а). Мишеви третирани STZ су имали значајно већи проценат TGF- β -продукујућих CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs (p=0.03; Fig. 18б) у поређењу са контролном групом.

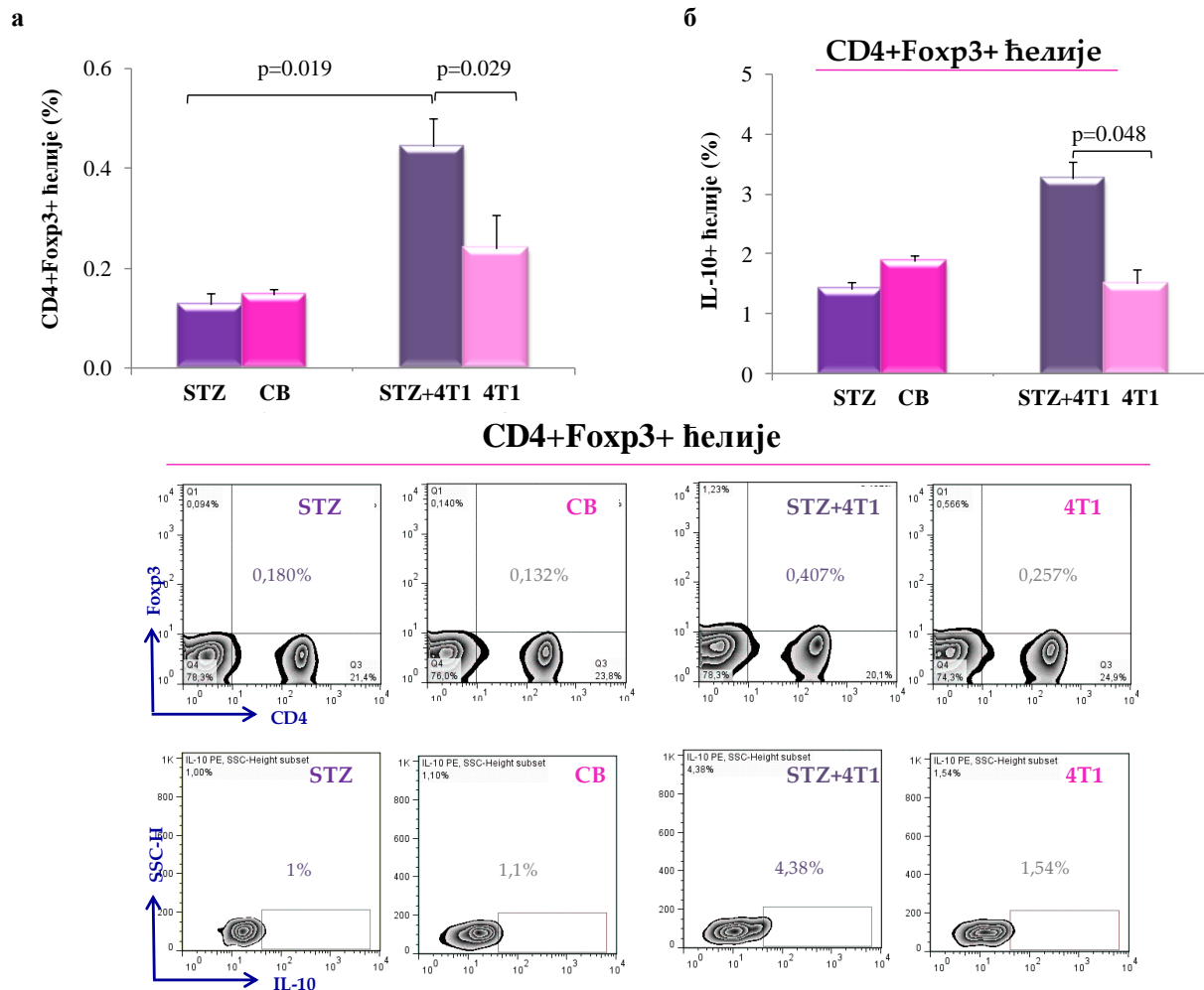
Анализа функционалног фенотипа регулаторних Т лимфоцита је показала да примена STZ значајно повећава проценат CD4⁺Foxp3⁺ регулаторних Т лимфоцита (p=0.029; Графикон 19а) као и проценат CD4⁺Foxp3⁺ регулаторних Т лимфоцита које продукују IL-10 (p=0.048; Графикон 19б) у слезини мишева након индукције тумора.

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

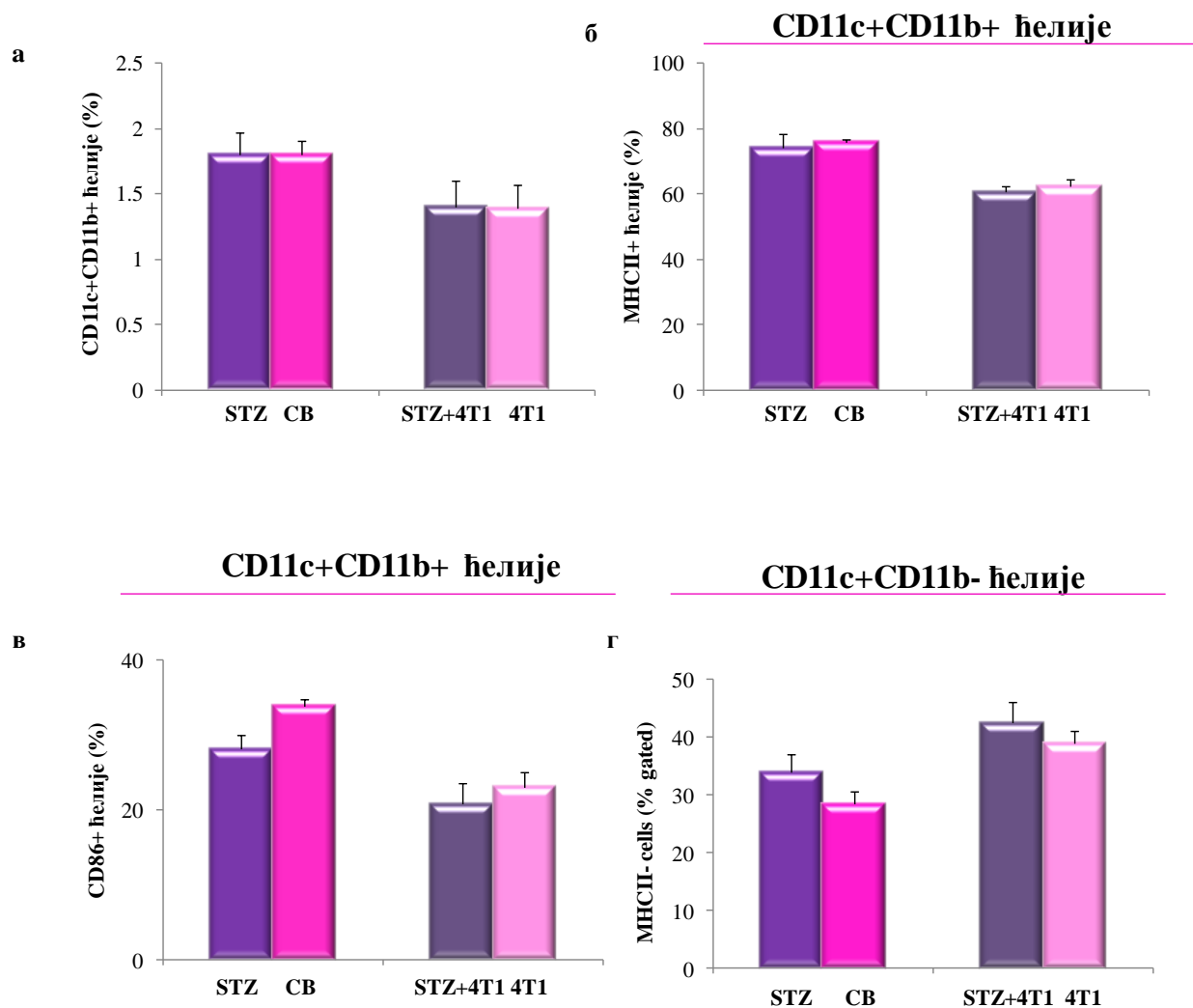


Графикон 18. Дијабетес мелитус повећава акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у слезина мишева пре индукције тумора. Процент CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs (a) and TGF-β⁺CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs (б) је значајно већи у слезинама мишева који су примили STZ у поређењу са контролном групом мишева која је примила CB, пре индукције тумора. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогрессију мишијег тумора дојке



Графикон 19. Дијабетес мелитус повећава акумулацију регулаторних Т лимфоцита у слезини мишева након индукције тумора. Апликација стрептозотоцина је значајно повећала процентуалну заступљеност $CD4^+Foxp3^+$ регулаторних Т лимфоцита (а) и $IL-10^+CD4^+Foxp3^+$ регулаторних Т лимфоцита у слезини мишева након индукције тумора. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

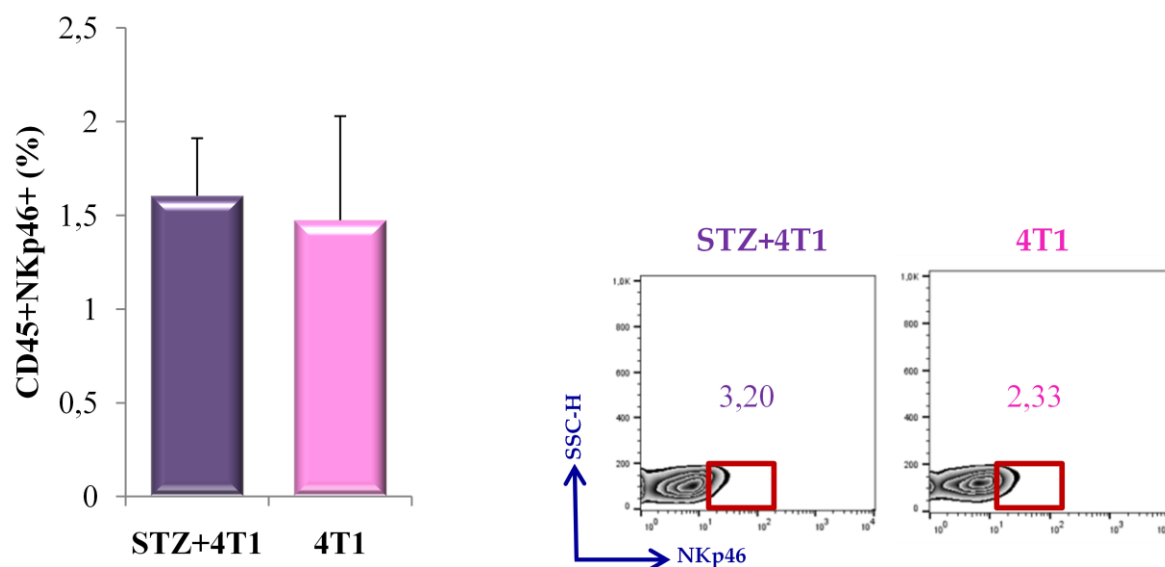


Графикон 20. Дијабетес мелитус не утиче на проценат дендритских ћелија у слезини мишева пре ни након индукције тумора. Апликација стрептозотоцина није утицала на процентуалну заступљеност CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија (а), MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија (б), CD69⁺CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија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

4.9. Смањена акумулација NKG2D⁺ NK ћелија а повећана PD-1⁺NK ћелија у примарном тумору мишева са дијабетесом

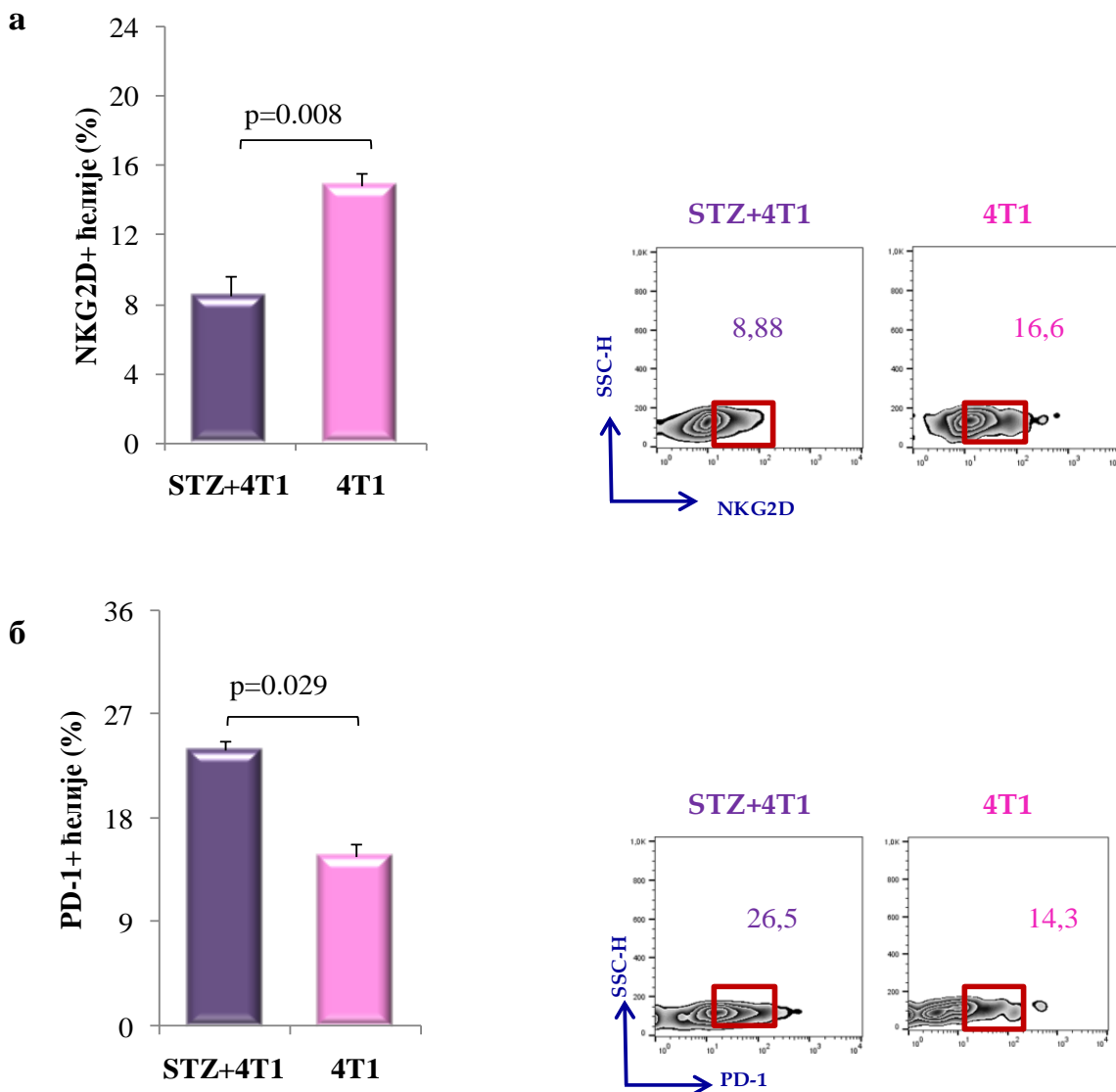
Након што је анализом функционалног фенотипа показано да примена STZ супримира проинфламацијски и антитуморски фенотип NK ћелија, следећи корак је била анализа фенотипа NK ћелија изолованих из примарног тумора мишева третираних STZ.

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



Графикон 21. Дијабетес мелитус не утиче на проценат NK у туморској микросредини. Примена стрептозотоцина није утицала на процентуалну заступљеност CD45⁺NKp46⁺ NK ћелија у туморској микросредини мишева. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

CD45+NKp46+ ћелије



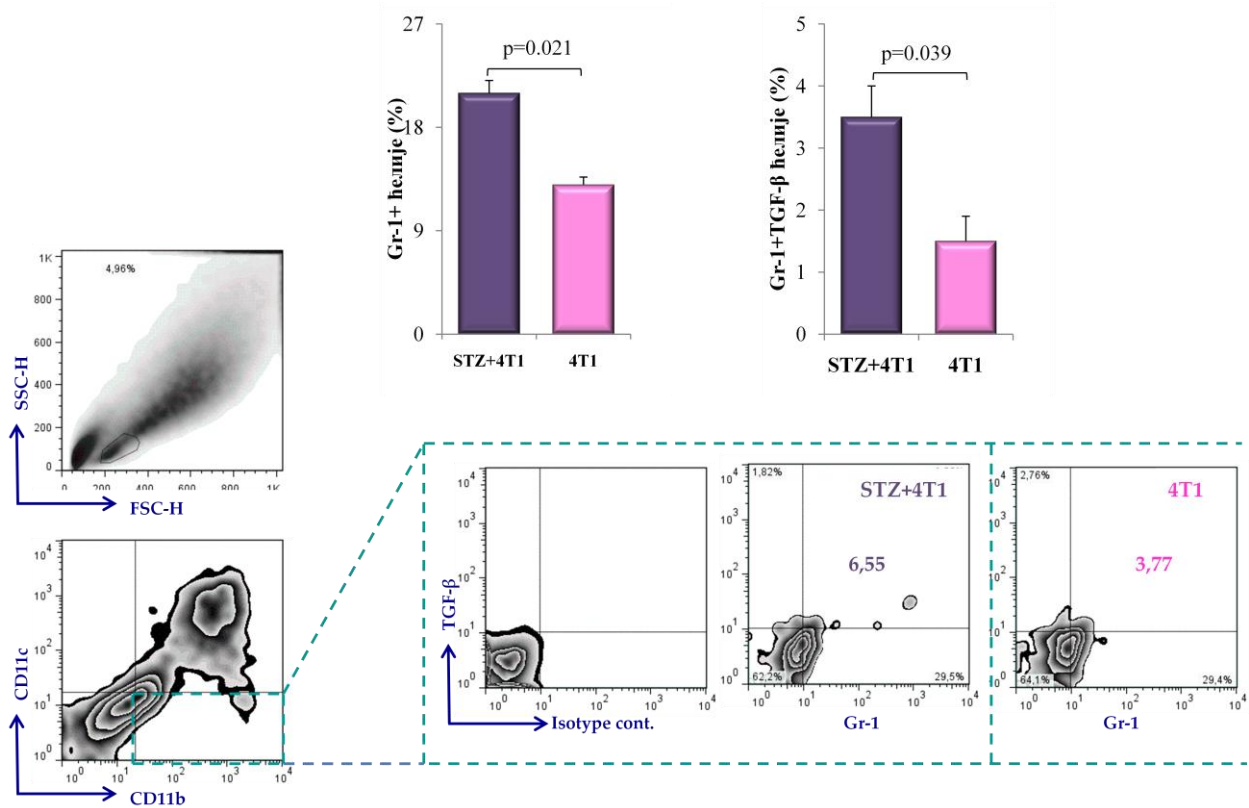
Графикон 22. Дијабетес мелитус смањује акумулацију NKG2D⁺ NK ћелија а повећава проценат PD-1⁺NK ћелија у примарном тумору. Апликација стрептозотоцина је значајно смањила проценат NKG2D⁺CD45⁺NKp46⁺NK ћелија (а) а повећала проценат CD45⁺NKp46⁺PD-1⁺NK ћелија у примарном тумору мишева. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

4.10. Дијабетес мелитус фаворизује акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у туморској микросредини

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

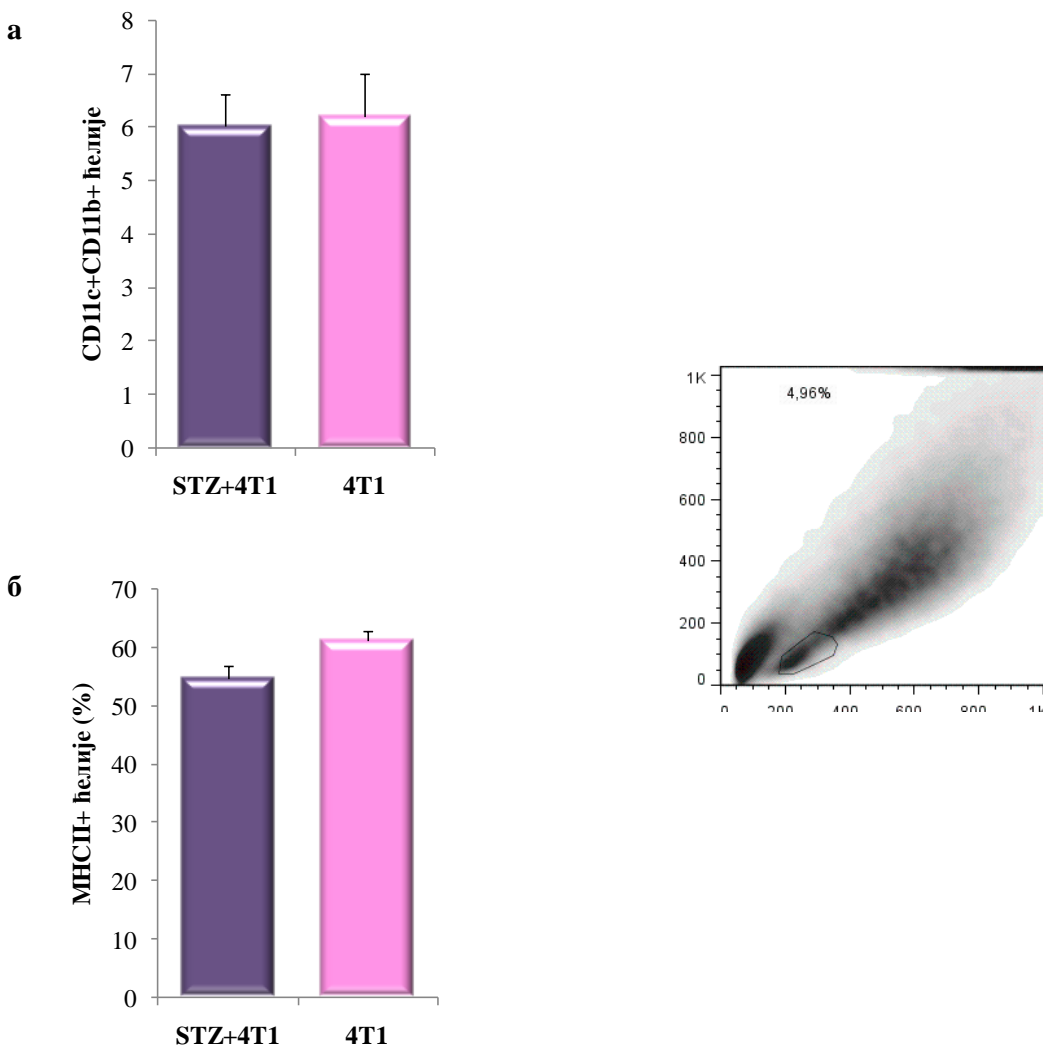
Апликација STZ није утицала на акумулацију CD11c⁺CD11b⁺ дендритских ћелија (p>0.05; Графикон 24а) као ни на експресију МНС молекула II класе на популацији CD11c⁺CD11b⁺ дендритских ћелија (p>0.05; Графикон 24б) у примарном тумору мишева.

CD11b+CD11c- ћелије



Графикон 23. Дијабетес мелитус повећава акумулацију мијелоидних супресивних ћелија у примарном тумору мишева. Процент CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs (a) and TGF-β продукујућих CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs (б) је значајно већи у примарним туморима мишева који су примили STZ у поређењу са контролном групом мишева која је примила СВ. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

CD11c+CD11b+ ћелије

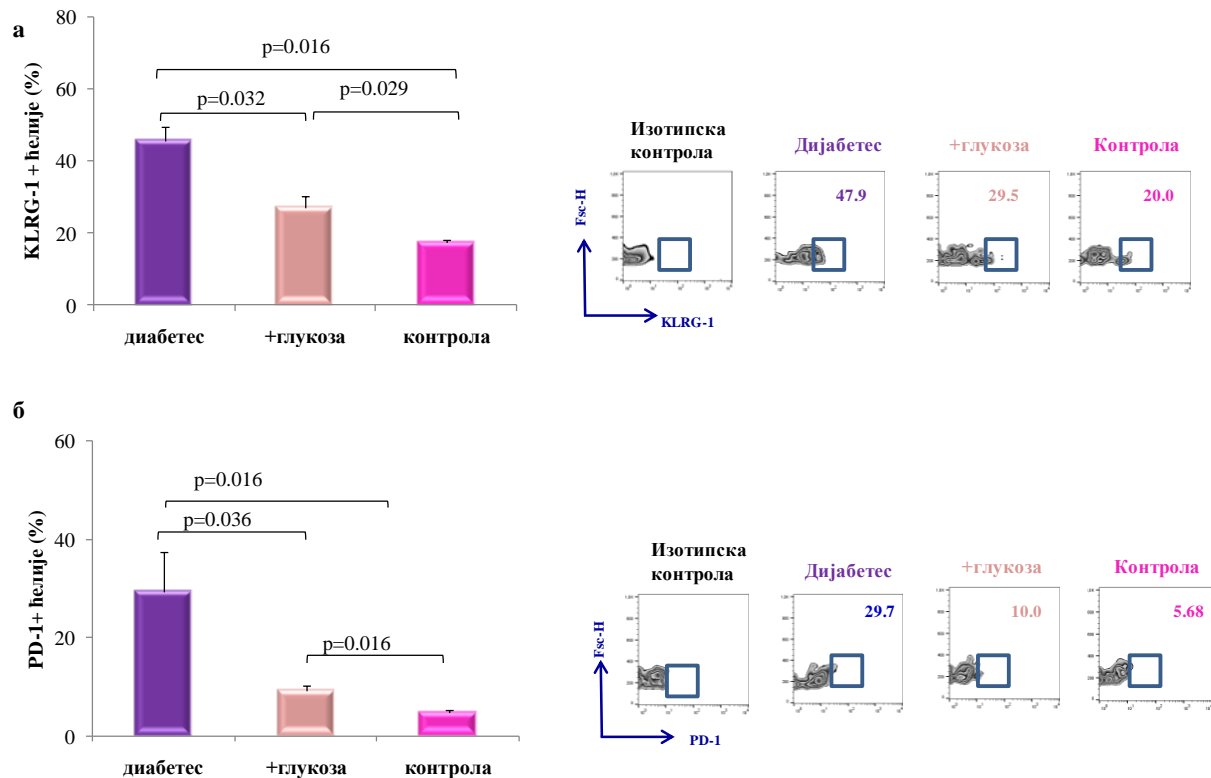


Графикон 24. Дијабетес мелитус не утиче на проценат дендритских ћелија у примарном тумору мишева. Апликација стрептозотоцина није утицала на процентуалну заступљеност CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија (а), МНСИИ⁺CD11b⁺CD11c⁺ дендритских ћелија (б) у туморској микросредини. Приказане вредности су аритметичке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

4.11. Дијабетични серум мења фенотип НК ћелија, *in vitro*

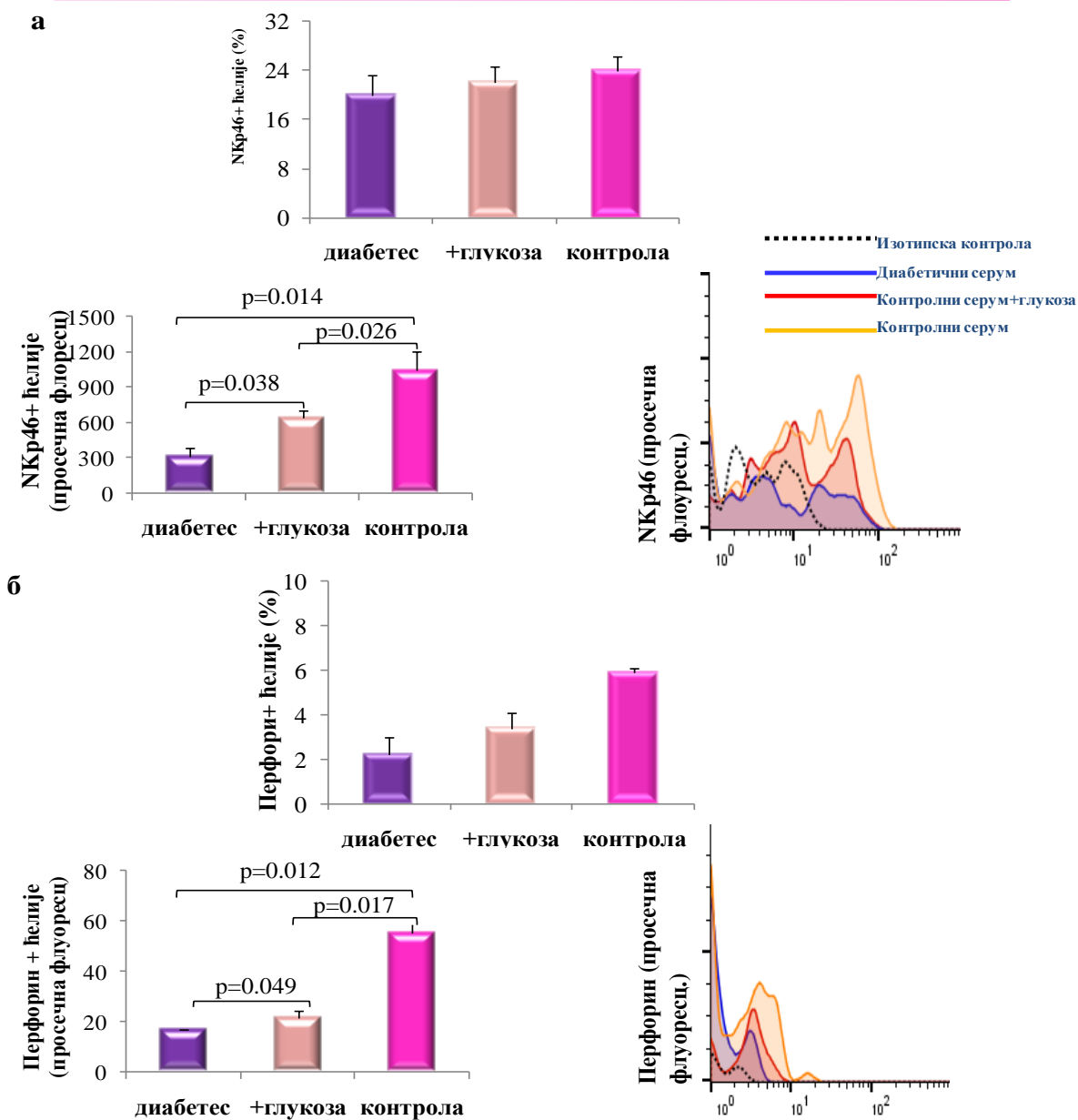
Обзиром да је показан измењен фенотип имуносупресивних ћелија и слезини и примарном тумору мишева са дијабетесом, у следећем кораку је испитан ефекат солубилних фактора који настају током прогресије дијабетес мелитуса као и ефекат глукозе на функционални фенотип НК ћелија. Спленоцити изоловани из здравог миша су култивисани 24 часа у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, серум коме је додата глукоза или серум изолован из контролног миша. Унутар култивисане популације спленоцита, проточном цитометријом су анализирани $CD3^+CD49^+$ НК ћелије. Додатак глукозе повећао је проценат $KLRG-1^+$ ($p=0.029$, Графикон 25а) and $PD-1^+$ ($p=0.016$; Графикон 25б) $CD3^+CD49^+$ НК ћелије. Иако није било разлике у процентуалној заступљености $NKp46^+$ и перфорин⁺ $CD3^+CD49^+$ НК ћелија, уочено је значајно нижа експресија ових молекула на НК ћелијама третираним глукозом ($p=0.026$; $p=0.017$; Графикони 26а, 26б). Култивација у дијабетичном серуму додатно је повећала процентуални удео $KLRG-1^+$ ($p=0.032$; $p=0.016$, Графикон 25а) и $PD-1^+$ ($p=0.036$; $p=0.016$; Графикон 25б) $CD3^+CD49^+$ НК ћелија, а смањило је експресију $NKp46$ ($p=0.038$; $p=0.014$, Графикон 25а) и продукцију перфорина ($p=0.049$; $p=0.012$; Графикон 25б) по $CD3^+CD49^+$ НК ћелији у односу на ћелије култивисане у гликемичном серуму односно у контролном серуму. Дијабетични серум је такође значајно смањило проценат $IFN-\gamma$ продукујућих $CD3^+CD49^+$ НК ћелија ($p=0.029$; $p=0.029$; Графикон 27а), смањило је продукцију $IL-17$ ($p=0.048$; $p=0.032$; Графикон 27б) као и гранзима ($p=0.004$; $p=0.003$; Графикон 28а) и експресију $CD107a$ ($p=0.016$; $p=0.014$; Графикон 28б) у $CD3^+CD49^+$ НК ћелијама у поређењу са НК ћелијама третираним серумом са додатком глукозе односно контролним серумом.

CD3-CD49b+ ћелије



Графикон 25. Дијабетес мелитус мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Спленоцити изоловани из здравог миша култивани су у медијуму који садржи дијабетични серум, серум коме је додата глукоза и контролни серум. Дијабетични серум је значајно повећао процентуалну заступљеност KLRG-1⁺ (а) and PD-1⁺ (б) CD3⁺CD49b⁺NK ћелија у односу на серум коме је додата глукоза и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

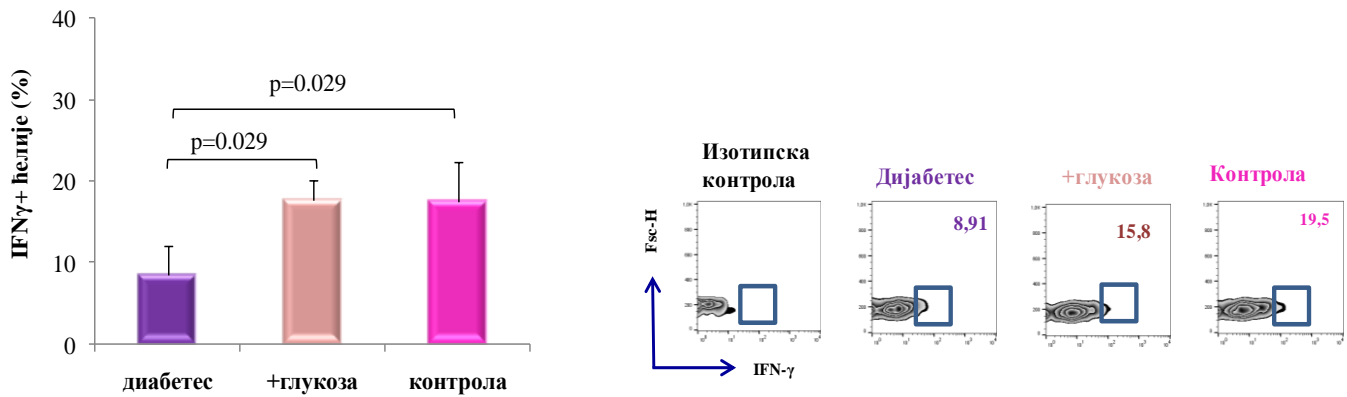
CD3-CD49b+ ћелије



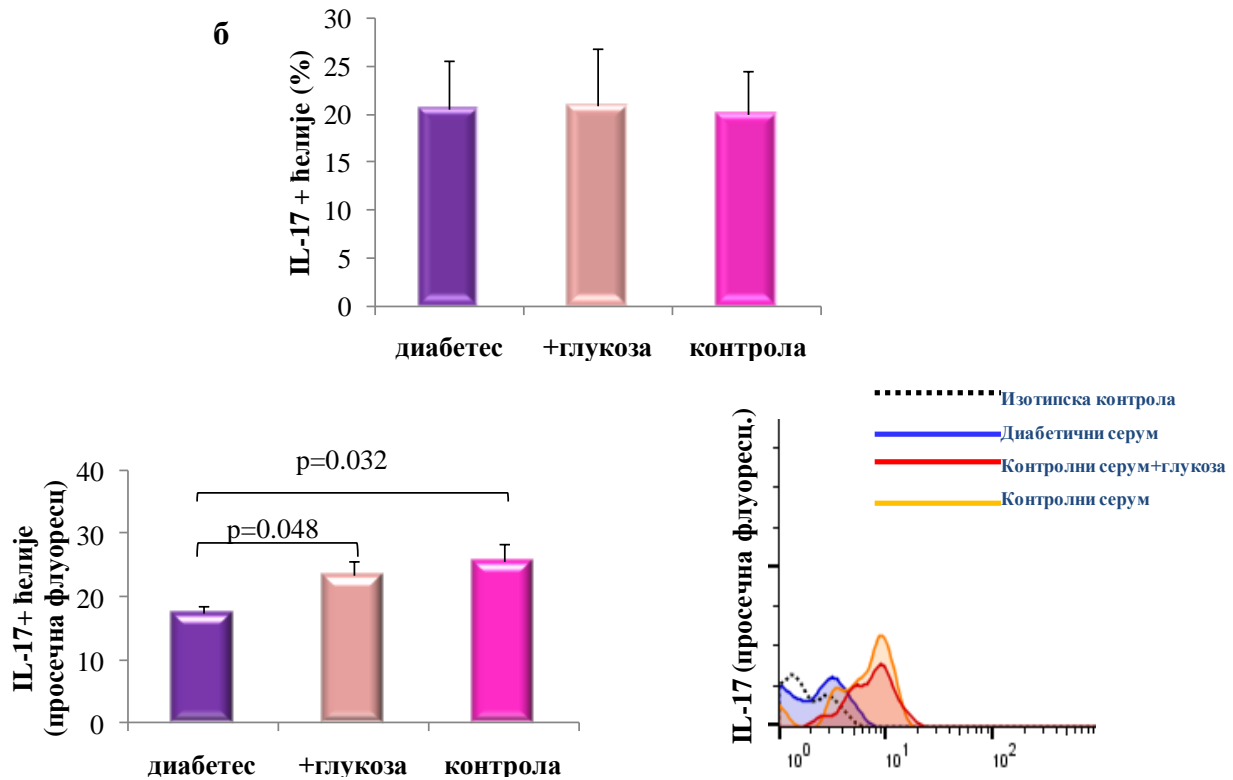
Графикон 26. Дијабетес мелитус мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Дијабетични серум је у *in vitro* условима значајно смањио експресију рецептора NKp46 (а) и продукцију перфориноа (б) у CD3⁺CD49b⁺NK ћелијама у односу на серум коме је додата глюкоза и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је Student T тестом.

CD3⁻CD49b⁺ ћелије

а

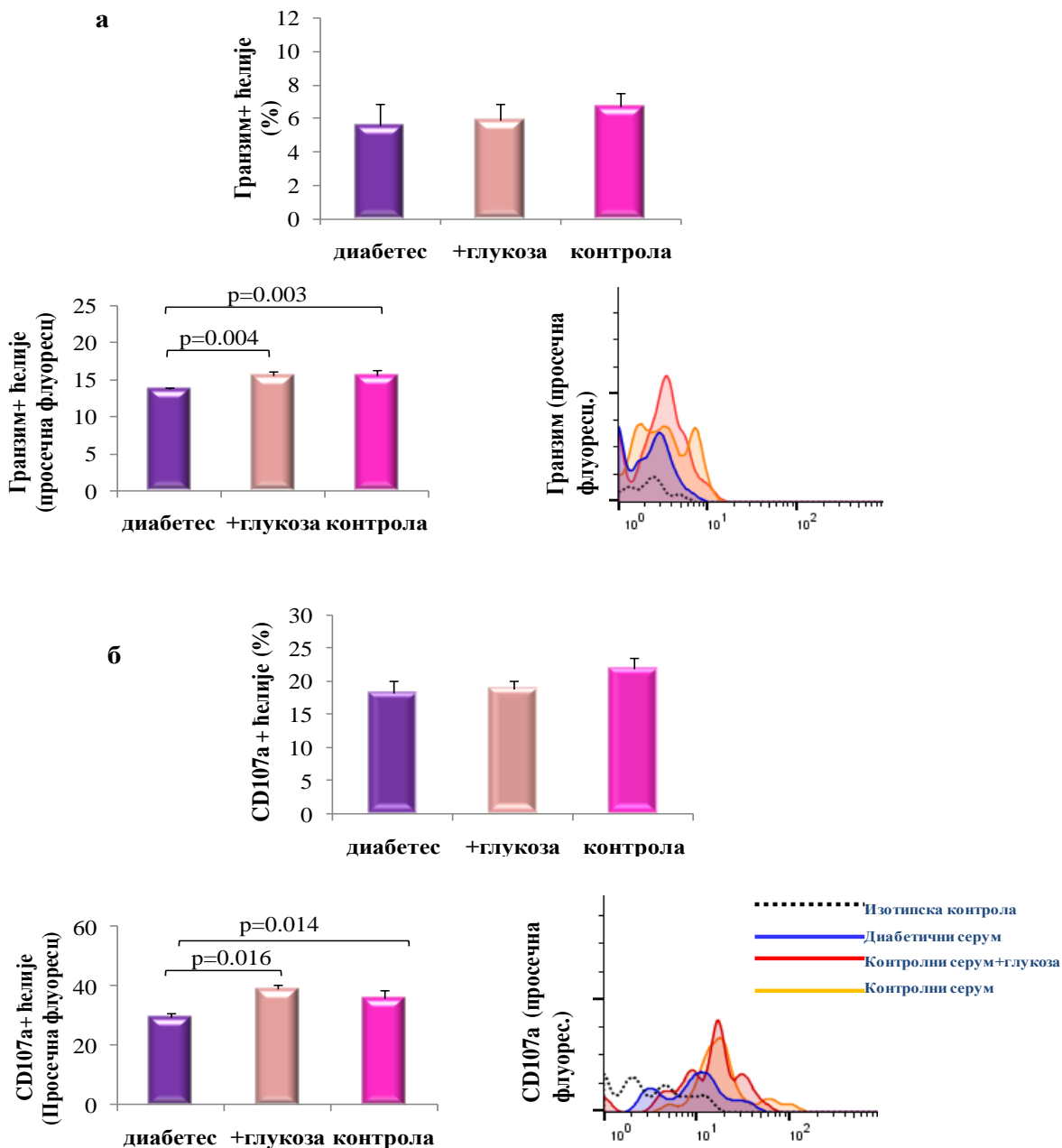


б



Графикон 27. Дијабетес мелитус мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Дијабетични серум је значајно смањило проценат IFN- γ ⁺CD3⁻CD49b⁺NK ћелија (а) и продукцију IL-17 (б) у CD3⁻CD49b⁺NK ћелијама у односу на серум са глюкозом и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине \pm SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

CD3-CD49b+ ћелије

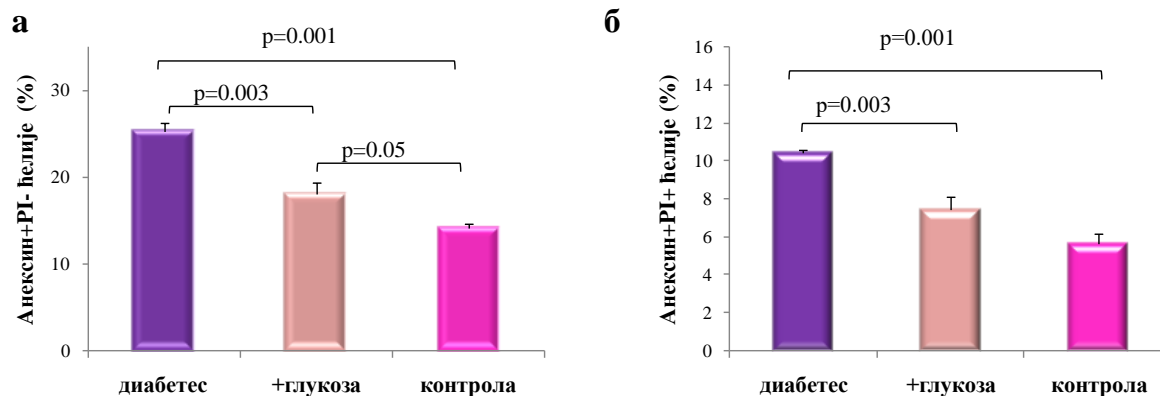


Графикон 28. Дијабетес мелитус мења фенотип NK ћелија у *in vitro* условима. Дијабетични серум је значајно смањило продукцију гранзима (а) и CD107а (б) у CD3⁺CD49b⁺NK ћелијама у односу на серум са глукозом и контролни серум. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

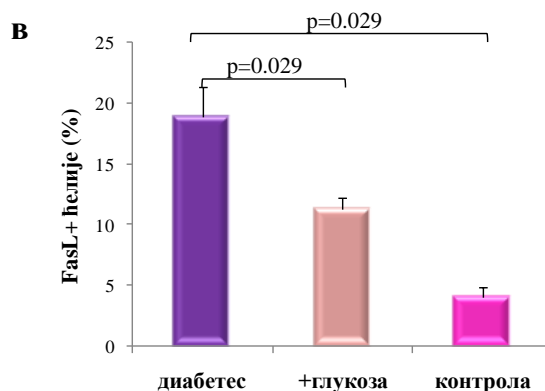
4.12. Дијабетес стимулише апоптозу спленоцита, *in vitro*

У наредном кораку желели смо да испитамо да ли дијабетични серум утиче на апоптозу спленоцита. Након двадесетчетворочасовне култивације спленоцита изолованих из здравог миша у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, серум коме је додата глукоза или серум изолован из контролног миша, спленоците смо подигли и анализирали експресију маркера апоптотоских ћелија, анексин и пропидијум јодид. На графику 29а и 29б се јасно уочава да је дијабетични серум је у *in vitro* условима значајно повећао процентуалну заступљеност анексин⁺пропидијум јодид⁻ спленоцита (p=0.003; p=0.001; Графикон 29а) као и анексин⁺пропидијум јодид⁺ спленоцита (p=0.003; p=0.001; Графикон 29б) у односу на спленоците култиване у серуму коме је додата глукоза односно у серуму изолованом из здравог миша. Додатно, анализа експресије FasL у популацији CD3⁻CD49b⁺NK ћелија је показала да дијабетични серум значајно повећава проценат FasL⁺CD3⁻CD49b⁺NK ћелија (p=0.029; p=0.029; Графикон 29в) у *in vitro* условима у односу на остале две експерименталне групе.

Спленоцити



CD3-CD49⁺ ћелије

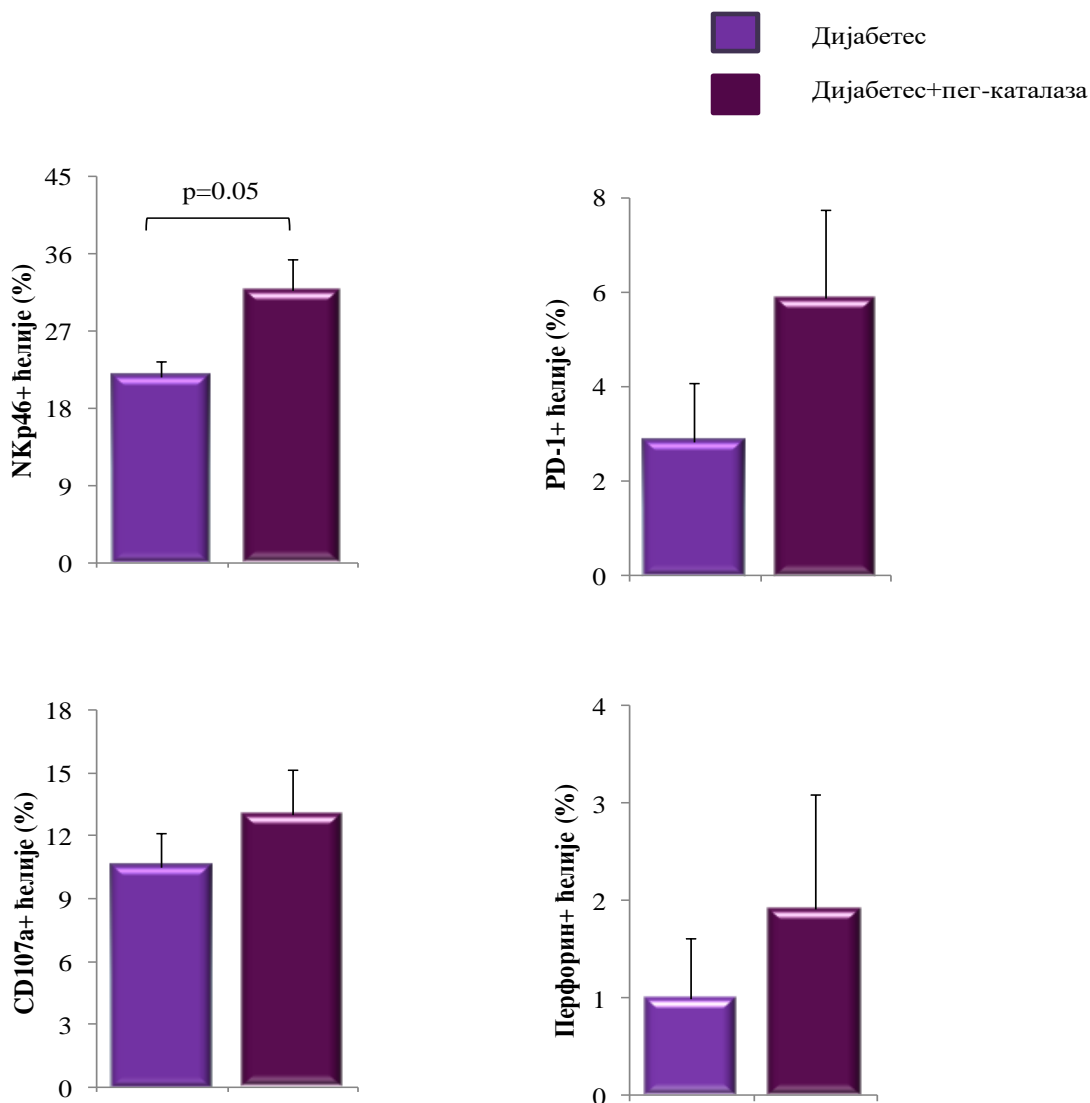


Графикон 29. Дијабетични серум повећава експресију маркера апоптозе *in vitro* условима. Дијабетични серум је значајно повећао процентуалну заступљеност анексин⁺пропидијум јодид⁻ спленоцита (а) и анексин⁺пропидијум јодид⁺ спленоцита (б) у односу на спленоците култиване у серуму коме је додата глюкоза односно у серуму изолованом из здравог миша. Дијабетични серум је значајно повећао проценат FasL⁺CD3⁻CD49b⁺NK ћелија (в) у односу на остале две експерименталне групе. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

У циљу неутралисања ефекта појачаног оксидативног стреса, изведени су додатни *in vitro* експерименти. Спленоцити изоловани из здравог миша култивисани су у медијуму који садржи серум дијабетичног миша односно у медијуму који поред серума дијабетичног миша садржи и додату пег-каталазу. Додатак пег-каталазе је значајно повећао процентуални удео $\text{NKp46}^+\text{CD3}^-\text{CD49b}^+\text{NK}$ ћелија ($p=0.05$; Графикон 30а) у поређењу са NK ћелијама култивисаним у дијабетичном серуму. Међутим, није уочена разлика у експресији PD-1 ($p>0.05$; Графикон 30б), CD107а ($p>0.05$; Графикон 30в) и продукцији перфорина ($p>0.05$; Графикон 30г) на NK ћелијама између поменутих група.

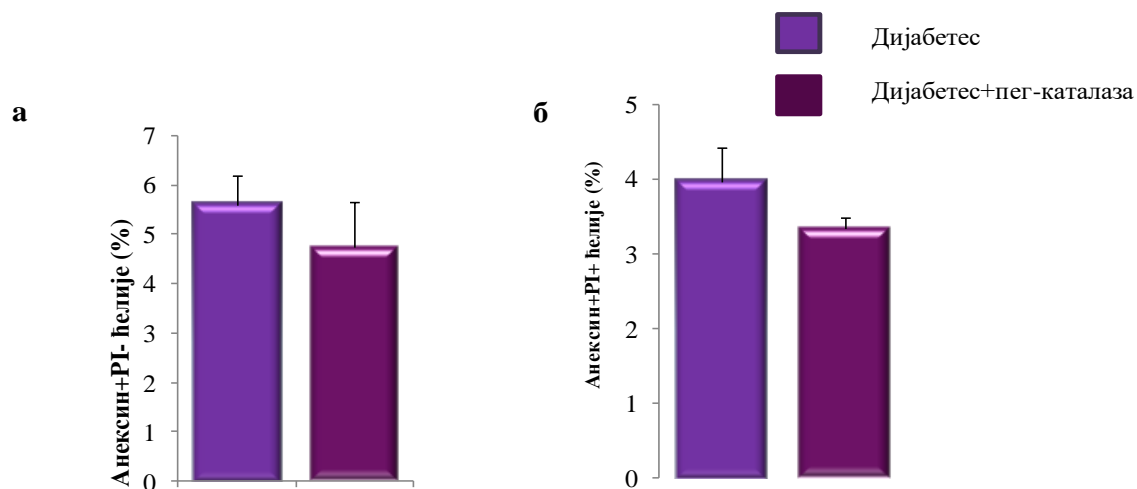
Анализа експресије молекула који детерминишу ћелију у апоптози је показала да додатак пег-каталазе не утиче на процентуалну заступљеност $\text{анексин}^+\text{пропидијум јодид}^-$ спленоцита ($p>0.05$; Графикон 31а) као и $\text{анексин}^+\text{пропидијум јодид}^+$ спленоцита ($p>0.05$; Графикон 31б) у односу на спленоците култиване у серуму изолованом из дијабетичног миша. Такође, додатак пег-каталазе није утицао на проценат $\text{FasL}^+\text{CD3}^-\text{CD49b}^+\text{NK}$ ћелија ($p>0.05$; Графикон 31в).

CD3-CD49+ ћелије

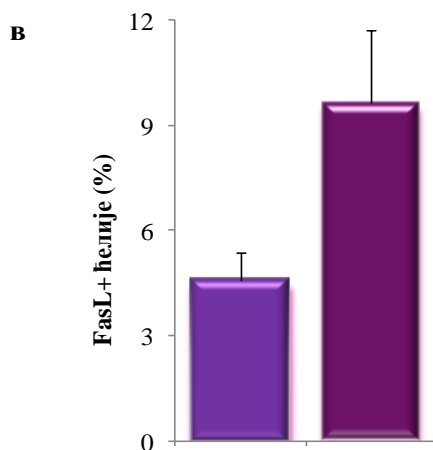


Графикон 30. Пег-каталаза повећава проценат NKp46⁺CD3⁺CD49b⁺NK ћелија. Додатак пег-каталазе је значајно повећао проценат NKp46⁺CD3⁺CD49b⁺NK ћелија (а) у односу на NK ћелије третиране дијабетичним серумом, док није утицао на проценат, PD-1⁺ (б), CD107a⁺ (в) и перфорин⁺CD3⁺CD49b⁺NK ћелија. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 7 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

Спленоцити



CD3-CD49+ ћелије



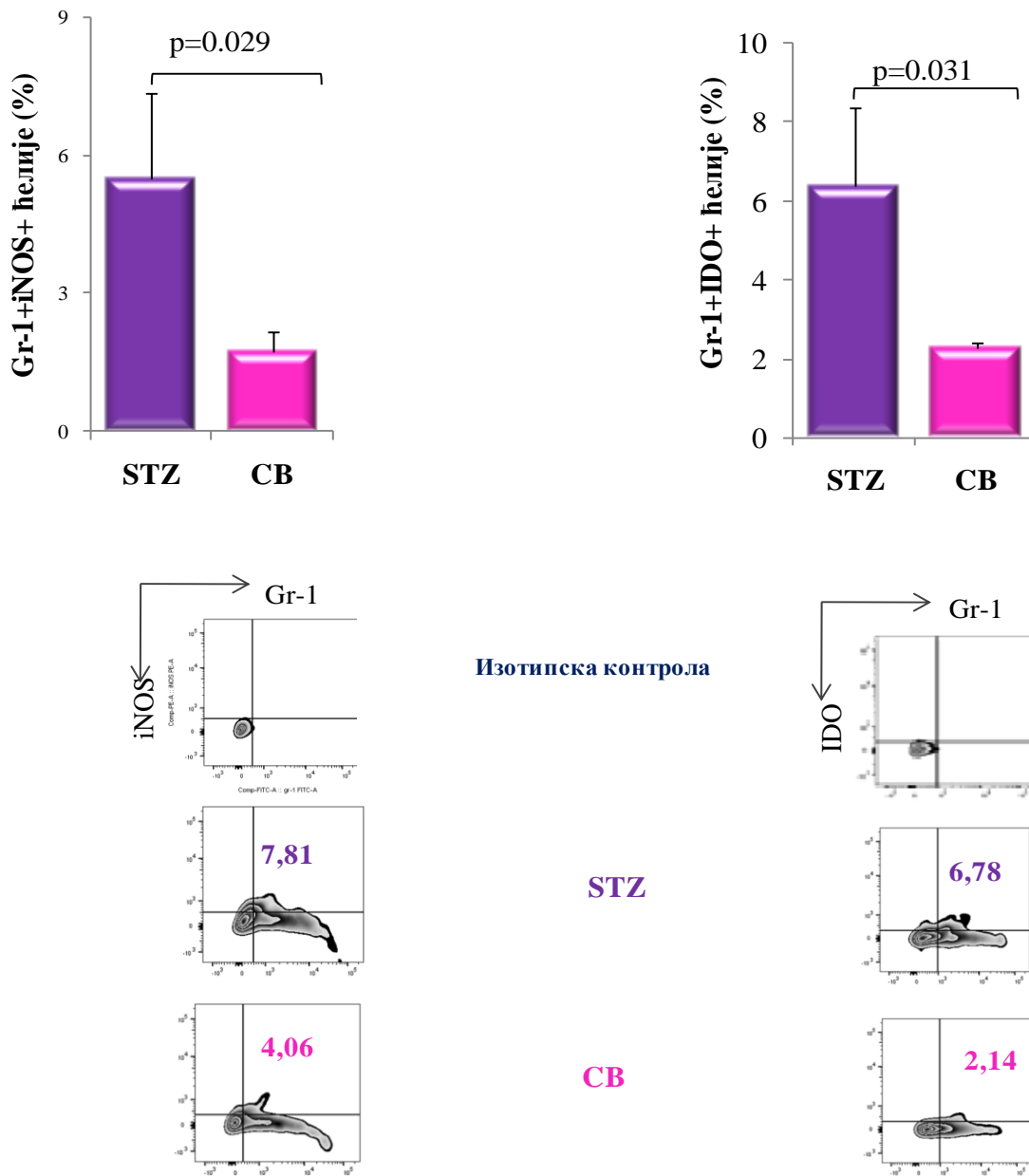
Графикон 31. Пег-каталаза не утиче на експресију апоптотских молекула. Додатак пег-каталазе дијабетичном серуму није изменио процентуалну заступљеност анексин⁺пропидијум јодид⁻ спленоцита (а) и анексин⁺пропидијум јодид⁺ спленоцита (б) у односу на спленоците култиване у дијабетичном серуму. Пег-каталаза није утицала на проценат FasL⁺CD3⁻CD49b⁺NK ћелија (в) у односу на контролну групу. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из три посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney Rank Sum* тестом.

4.13. MDSCs и DCs супримирају НК ћелије активношћу ензима IDO

У циљу анализе који је то солубилни фактор заслужан за измену фенотипа НК ћелија, у даљем току истраживања смо анализирали продукцију индуцибилне азот моноксид синатазе (енгл. *Inducible nitric oxide synthase*, iNOS) и индоламин 2,3 диоксигеназе (енгл. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) различитих популација ћелија изолованих из слезина мишева који су третирани STZ односно СВ. Интраћелијско бојење мијелоидних супресорских ћелија MDSCs је показало значајно виши проценат iNOS⁺ (p=0.029; Графикон 32а) и IDO⁺ (p=0.031; Графикон 32б) CD11b⁺CD11c⁻Gr⁺MDSCs у слезинама мишева који су третирани STZ у односнu на мишeве која је примила само СВ. Примена STZ је такође значајно повећала процентуалну заступљеност iNOS⁺ (p=0.005; Графикон 33а) и IDO⁺ (p=0.026; Графикон 33б) CD11b⁺CD11c⁺ DCs у односнu на контролну групу.

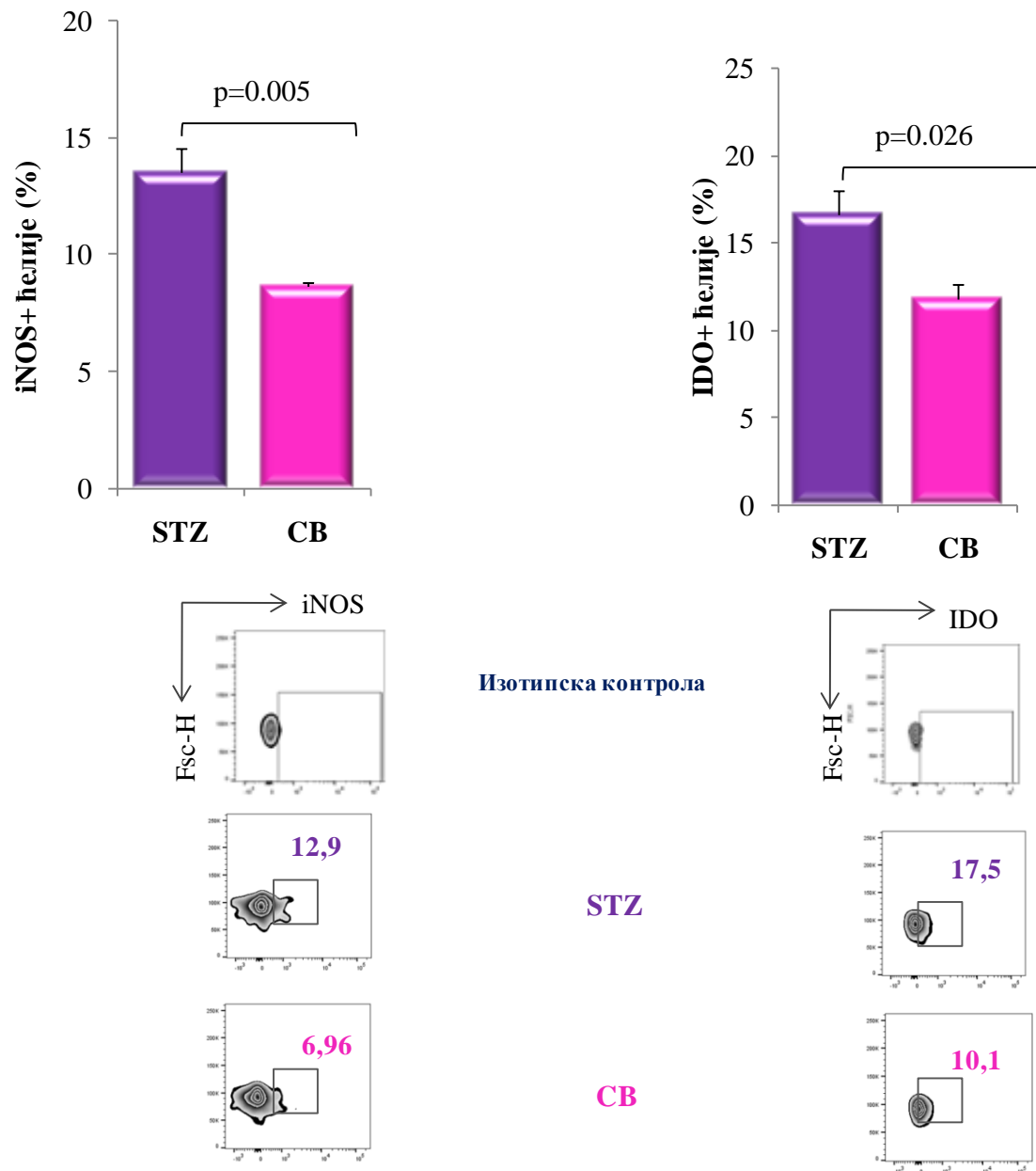
У наредним *in vitro* експериментима, спленоцити изоловани из здравог миша су култивисани у медијуму који садржи серум изолован из дијабетичног миша, уз присуство или одсуство 1-метил триптофана (1-МТ), селективног блокатора IDO, и у серуму изолованом из здравих мишева. Додатак 1-МТ је значајно елиминисао супресивни ефекат дијабетичног серума на проценат NKG2D⁺ (p=0.016; Графикон 34а), NKp46⁺ (p=0.038; Графикон 34б) и CD69⁺ (p=0.004; Графикон 34в) као и на проценат перфорин продукујућих (p=0.008; Графикон 34г) и гранзим продукујућих CD3⁻CD49b⁺ (p=0.032; Графикон 35а) НК ћелија у поређењу са популацијом ћелија култивисаном у дијабетичном серуму без додатка 1-МТ. Додатак 1-МТ је значајно смањио процентуални удео IL-10 продукујућих CD3⁻CD49b⁺НК ћелија (p=0.041; Графикон 35б) као и експресију PD-1 молекула по CD3⁻CD49b⁺НК ћелији (p=0.015; Графикон 35в) у поређењу са НК ћелијама које су култивисане само у дијабетичном серуму.

CD11b+CD11c- ћелије



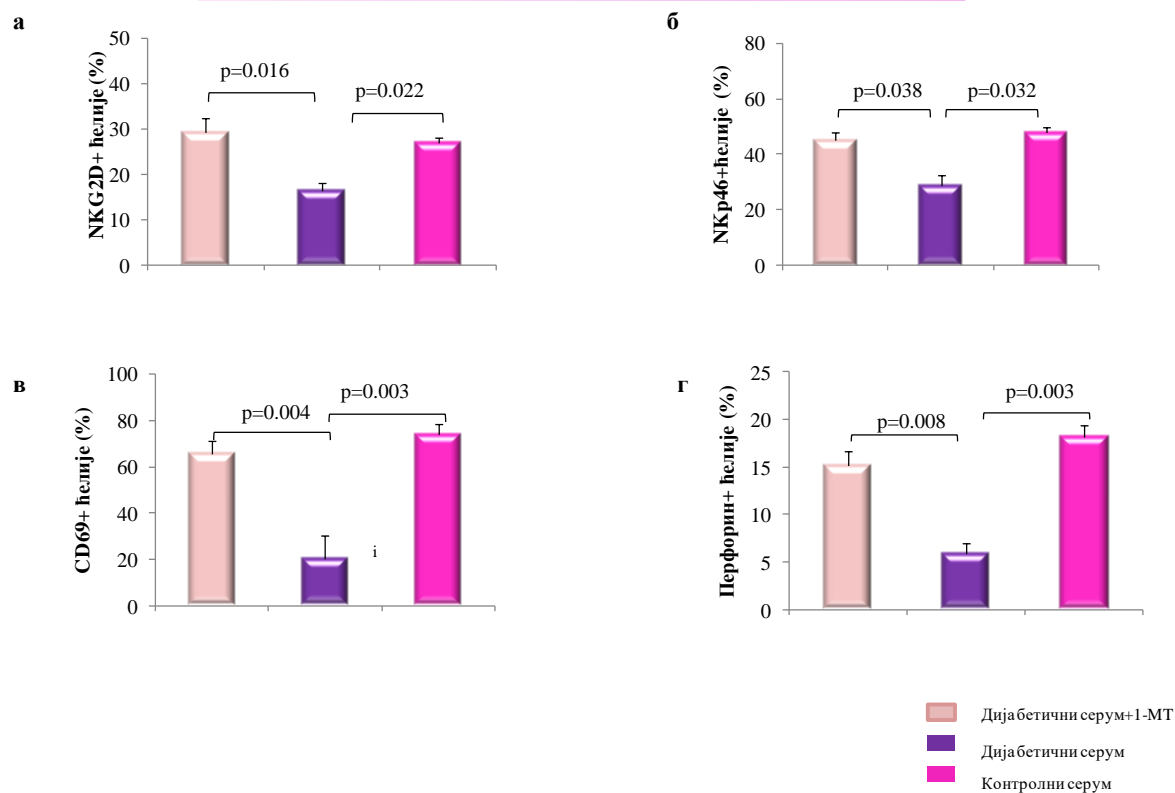
Графикон 32. Дијабетес мелитус повећава продукцију iNOS и IDO у MDSCs. Мишеви који су примили STZ имсју у слезини значајно већи проценат iNOS⁺ (a) и IDO⁺ (b) CD11b⁺CD11c⁻Gr⁺MDSCs у односу на мишеве третиране CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

CD11b+CD11c+ ћелије



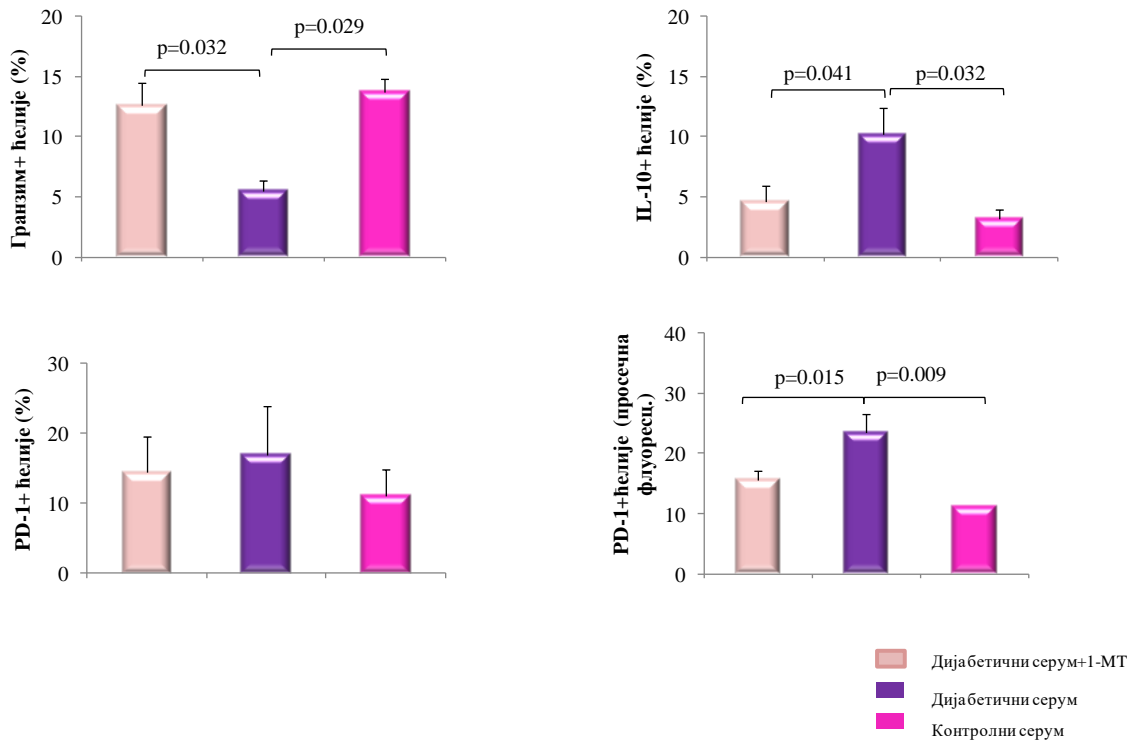
Графикон 33. Дијабетес мелитус повећава продукцију iNOS и IDO у дендритским ћелијама. Мишеви који су примили STZ имсју у слезини значајно већи проценат iNOS⁺ (а) и IDO⁺ (б) CD11b⁺CD11c⁺ DCs у односу на мишеве третиране CB. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

CD3-CD49b+ ћелије



Графикон 34: 1-МТ неутралише супресивни ефекат дијабетичног серума. Додатак 1-МТ је значајно повећао проценат NKG2D⁺ а), NKp46⁺ (б) и CD69⁺ (в) и перфорин продукујућих (г) CD3⁻CD49b⁺ NK ћелија у поређењу са популацијом ћелија култивисаних у дијабетичном серуму без додатка 1-МТ. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Student T* тестом.

CD3⁻CD49b⁺ ћелије



Графикон 35: 1-МТ неутралише супресивни ефекат дијабетичног серума. Додатак 1-МТ је значајно повећао проценат гранзим продукујућих CD3⁻CD49b⁺ (а) NK ћелија у поређењу са ћелија култивисаним у дијабетичном серуму без додатка 1-МТ. Додатак 1-МТ је значајно смањило проценат IL-10 продукујућих CD3⁻CD49b⁺NK ћелија (б) као и експресију PD-1 молекула по CD3⁻CD49b⁺NK ћелији (в) у поређењу са NK ћелијама које су култивисане само у дијабетичном серуму. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 6 мишева по групи из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann–Whitney Rank Sum* тестом.

5. ДИСКУСИЈА

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

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

У мишева третираних стрептозотоцином, детектована је значајно мања цитотоксичност спленоцита и НК ћелија према туморским ћелијама. Након уклањања НК ћелија *in vivo*, нестала је разлика у дијаметру и маси примарних тумора између STZ, односно СВ третираних мишева, што указује на кључну улогу НК ћелија у анти-туморском имунском одговору на 4T1 карцином дојке.

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

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

Како је детектована већа експресија индуцибилне азот моноксид синтазе (iNOS) и индоламин 2,3 диоксигеназе (IDO) у слезинским MDSCs и DCs, у наредним *in vitro* експериментима, спленоцити су култивисани у присуству 1-метил триптофана (1-MT), селективног блокатора IDO, односно селективног блокатора iNOS. Блокада iNOS-а мења фенотип НК ћелија: повећава експресију активационих и туморицидних а смањује

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишјег тумора дојке

експресију инхибиционих и имуносупресивних молекула. 1-МТ, блокадом IDO, у потпуности неутралише супресивни ефекат дијабетичног серума и враћа фенотип NK ћелија на ниво здравог миша.



5.1. Дијабетес мелитус убрзава појаву и раст примарног тумора дојке

Претходне клиничке и анималне студије су јасно указале на повезаност дијабетес мелитуса тип 1 и тип 2 и малигнитета, док су се друге студије бавиле испитивањем механизма укључених у ове процесе (Икемура и сар., 2013, Цхен ет ал., 2014). Такође, зна се да хипергликемија, гојазност, резистенција на инсулин и инфламација могу на различите начине утицати ефекторске ћелије укључене у антитуморску имуност (Селл ет ал., 2012, Вранн ет ал., 2012, Берроу ет ал., 2013). Овим истраживањем смо показали да дијабетес мелитус изазван једном сублеталном дозом стрептозотоцина убрзава раст карцинома дојке код мишева.

5.2. Дијабетес смањује антитуморску цитотоксичност НК ћелија

Показали смо да су спленоцити изоловани из дијабетичних мишева који су развили тумор имали значајно нижу цитотоксичку активност у поређењу са онима изолованим из контролних мишева са развијеним тумором (слика 2а). Такође, тестирали смо цитотоксичност изолованих CD8⁺ Т лимфоцита и НК ћелија. Недавно, Чен и сарадници су показали да је цитотоксички капацитет CD8⁺ цитотоксичких Т лимфоцита смањен код мишева третираних STZ који су развили меланом (Chen и сарадници., 2014). Међутим, у нашем истраживању није уочена значајна разлика у цитотоксичкој активности CD8⁺ Т лимфоцита према 4T1 туморским ћелијама у *in vitro* условима (слика 2б). Док су у овом животињском моделу показали да CD8⁺ Т лимфоцити играју важну антитуморску улогу, у нашим ранијим студијама активирани CD8⁺ Т лимфоцити нису играли запажену улогу (Jovanović i sar., 2011, Jovanović i drugi). У складу са нашим резултатима су и чињеница да је 4T1 слаба имуногена мишја ћелијска линија тумора дојке као и претходни налази који указују да је урођени имунски одговор важан у антитуморском одговору у овом туморском моделу (Jovanović i sar., 2011, Jovanović i drugi). Показано је да је цитотоксичност НК ћелија важна у имунском надзору и имунском одговору на тумор, а такође смо потврдили измењен цитотоксички капацитет и фенотип НК ћелија код дијабетичних мишева пре индукције тумора (Smith et al. 2005, Jovanović i sar., 2011, Marcus i sar. 2014;). Ови налази су показали мању цитотоксичност НК ћелија мишева третираних STZ (слика 2ц).

Деплеција NK ћелија *in vivo* је анулирала разлику у појави и расту тумора што је у складу са експериментом у *in vitro* условима (слика 2д-ф). Ови налази указују на кључну улогу супримиране активности NK ћелија у убрзаној појави и расту туморског код дијабетичних мишева.

5.3. Дијабетес модулира функционални фенотип NK ћелија

Родацки и сар. известили су да NK ћелије код пацијената са дуготрајним дијабетесом типа 1 имају знатно нижу експресију p30/p46 NK рецептора у поређењу са онима код контролисаних субјеката (Родацки ет ал., 2007). Интересантно је да и NOD мишеви и пацијенти са дијабетесом такође имају благо смањење експресије NKG2D (Огасавара и сар., 2003, Кин ет ал., 2011). Сходно томе, наши налази показују да дијабетес смањује експресију активирајућег рецептора као што је NKG2D, производњу цитолитичких молекула као што је перфорин и проинфламаторних цитокина IFN- γ и IL-17, док се фаворизује експресија молекула PD-1 и производња IL-10 у NK ћелијама слезине (слика 3). Наши резултати су у складу са претходно поменути студијама које показују да се код људи с дијабетесом мења фенотип NK-ћелија (Родацки и сар., 2007, Берроу и сар., 2013). Сличан феномен је добијен у туморској микросредини. Иако нисмо пронашли разлику у проценту тумор инфилтришућих NK ћелија, значајно мања процентуална заступљеност NKG2D⁺ NK ћелија и већи проценат PD-1⁺ NK ћелија указују на то да дијабетес фаворизује акумулацију слабо функционалних NK ћелија у примарном тумору (Слика 5а- д).

5.4. Култивација у серуму мишева са дијабетесом супримира активациони фенотип NK ћелија, *in vitro*

Како се предлажу различити механизми који су одговорни за имуносупресивне ефекте дијабетеса, тестирали смо неколико хипотеза да идентификујемо медијаторе одговорне за измењен функционални фенотип NK ћелија. Прво, испитали смо могућност да је забележен феномен последица хипергликемије, за коју је познато да директно интерферира са функцијом ендоплазматичног ретикулума (ER), фаворизује акумулацију

неисправних протеина у лумену, чиме се промовише стрес ЕР, који заузврат смањује експресију активационих рецептора на НК ћелијама (Берроу и сар. 2013). Дијабетични серум повећава проценат KLRG-1⁺ и PD-1⁺ НК ћелија, смањује експресију NKp46, CD107a и производњу перфоруина, гранзима, IFN- γ и IL-17 по НК ћелији у поређењу са серумом са додатом глукозом и контролним серумима (Слика ба-х). Ови резултати показују да сама хипергликемија није пресудна за промену фенотипа НК ћелија код дијабетеса што оставља најмање две могућности које не искључују једна другу: дејство појачаног оксидативног стреса и дејство имуносупресивних ћелија.

5.5. Пег-каталаза не мења значајно функционални фенотип НК ћелија, *in vitro*

Прво, реактивни кисеонични радикали, којима је богат серум дијабетичких мишева, могу супримирати активност НК ћелија кроз смањење експресије активирајућих рецептора као што је NKG2D, као што је претходно описано (Цхои ет ал., 2008, Пералди и сар., 2009). У нашој студији, повећање концентрације каталазе указује на веће системске вредности H₂O₂, једног од главних ROS-ова, у дијабетичких мишева (слика 1ц). Међутим, додавање пег-каталазе и следствено блокирање појачаног оксидативног стреса прати повећање експресије само NKp46, док није утицало на експресију или производњу других маркера НК ћелијске активности као што су NKG2D, KLRG-1 и PD-1 (табела 1). Недавна студија је показала да је *in vivo* третман са пег-каталазом значајно смањио број туморских ћелија у плућима и јетри у контролним и мишевима третираним STZ-ом. Наши резултати указују на неке друге медијаторе који супримирају туморицидни фенотип НК ћелија (Икемура и сар. 2013).

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

Ниво IL-10 је значајно повећан у серуму дијабетичких мишева (слика 4А). Познато је да су имуносупресивне ћелије као што су MDSCs, Tregs и незреле DCs важни регулатори урођених и адаптивних имунских процеса и све могу произвести IL-10 (Дилек и сар., 2012, Јан 2013). Изгледа да дијабетични услови олакшавају акумулацију супресивних CD11b⁺CD11c⁻Gr-1⁺ MDSCs у слезину, пре инокулације тумора (слика 4Б и Ц). Током

раста тумора регрутоване MDSCs омогућавају настанак, поларизацију, активацију и миграцију Tregs (Хуанг ет ал., 2006, Хоецхст ет ал. 2009, Витале ет ал. 2014). Заиста, дијабетично стање значајно повећава акумулацију TGF- β продукујућих MDSCs како у слезиној тако и у примарном тумору дојке (Слике 4Ц и 5Е). Штавише, детектована је повећана акумулација IL-10 продукујућих CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs у слезини дијабетичних мишева са тумором (слика 4Е). Ситрин и колеге тврде да Tregs контролишу функцију NK ћелија контролом биорасположивости ограничене количине IL-2, у острвцима панкреаса, насталог претежно у CD4⁺ Т лимфоцитима који инфилтрирају острвца у BDC2.5/NOD мишевима (Ситрин и сар. 2013). Међутим, у нашем моделу, ово би требало да има врло ограничен ефекат јер је једна висока доза STZ токсична за β ћелије панкреаса, и не изазива значајну инфилтрацију острваца.

5.7. Имуносупресивне ћелије у биологији тумора дојке у дијабетичним условима

Данас је познато неколико механизма којим MDSCs супримирају NK ћелије. Оне инхибирају NK ћелије директним ћелијским контактом, преко мембрански везаног TGF- β или препознавањем активационих рецептора на NK ћелијама (Остранд-Росенберг и сар. 2012). Такође је познато да MDSCs, да би генерисале имуносупресивну туморску микросредину, производе аргиназу 1, индуцибилну азот-моноксид синтазу (iNOS), индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO), NADPH оксидазу и имуносупресивне цитокине (Весоловски ет ал. 2013). iNOS је један од производа имуносупресивних ћелија важан за синтезу NO који на даље директно супримира пролиферацију лимфоцита (Габриловић & Нагарај 2009, Богдан 2011). Недавна студија открива већу активност iNOS-а код дијабетичара (Адела ет ал. 2015). Наши резултати показују да дијабетес значајно повећава процентуалну заспуљеност iNOS⁺ MDSCs као и iNOS⁺ DCs (Слика 7А и Ц). Запаљење ниског интензитета, једна од карактеристика дијабетес мелитуса, индукује активацију iNOS и следствену производњу NO која на даље повећава активност IDO-а (Бисвас 2016, Газдиц и сар. 2017). IDO, ензим који производе многе ћелије имунског система и строме, има снажне имуномодулаторне ефекте (Иу ет ал. 2013). IDO је укључен у катаболизам есенцијалне аминокиселине L-триптофана до L-кинуренина, а следствени метаболити L-L-кинуренина длују имуносупресивно (Lee ет ал., 2002, Суцхер и сар. 2010, Харден &

Егилмез 2012). IDO инхибира пролиферацију и фацитира апоптозу Т лимфоцита, смањује експресију активационих рецептора на НК ћелијама изазвану IL-2, инхибира продукцију IFN- γ и фаворизује апоптозу НК ћелија (Делла Цхиеса и сар., 2006, Ли ет ал. 2009, Цацалано 2016). У складу са тим, у овој студији показали смо значајно повећање процента MDSCs и DCs које производе IDO у мишевима са дијабетесом (слика 7Б и Д).

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

Да би потврдили могући имуносупресивни ефекат MDSCs и DCs преко IDO-а, блокирали смо ефекат IDO-а користећи фармаколошки инхибитор 1-МТ, *in vitro*. Додавање 1-МТ у дијабетични серум повећало је проценат NKG2D⁺, NKp46⁺, CD69⁺, перфорин и гранзим продукујућих НК ћелија (Слика 7Е, Ф, Г, Х и И). Поред тога, инхибиција IDO-а у дијабетичним условима значајно смањује проценат IL-10 продукујућих CD3⁻CD49⁺ НК ћелија као и експресију PD-1 молекула на ћелијама CD3⁻CD49⁺ НК ћелијама (слика 7Ј и К). У поређењу са контролним серумом, додавање 1-МТ у серум дијабетичних мишева скоро у потпуности обнавља функционални фенотип НК ћелија, указујући на важну улогу IDO сигналне каскаде у супресији НК ћелија у дијабетичком стању. Блокада iNOS-а, *in vitro*, мења фенотип НК ћелија: повећава експресију активационих и туморицидних а смањује експресију инхибиционих и имуносупресивних молекула, али овај ефекат није значајан као блокада IDO-а.

6. ЗАКЉУЧЦИ

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

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

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

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

7. СКРАЋЕНИЦЕ

ADCC	цитотоксичност зависна од антитела
CTL	Цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T Lymphocytes)
DCs	Дендритске ћелије
DMSO	(енгл. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	(енгл. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	(енгл. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	(енгл. <i>EnzymeLinkedImmunosorbentAssay</i>)
FBS	(енгл. <i>Fetal bovine serum</i>)
FADD	(енгл. Fas- Associated- Death- Domain- Protein)
H&E	хематоксилин и еозин (енгл. Hematoxylin & Eosin)
IL	Интерлеукин (енгл. <i>Interleukin</i>)
IFN-γ	Интерферон гама (енгл. <i>Interferon-gama</i>)
iNKT	инваријантне NKT ћелије
IRAK1	(енгл. IL-1R-associated kinase 1)
JNK1	JUN N-терминална киназа-1
KLRG1	инхибиторни рецептор (енгл. Killer Cell Lectin-Like Receptor G1)
Lamp	мембрански гликопротеин удружен са лизозомима (енгл. Lysosomal associated membrane glycoproteins)
LPS	липополисахарид
MAPK	протеин киназа активирана митогеном (енгл. Mitogen Activated Protein Kinase)
MCs	мастоцити (енгл. Mast cells)
M1	класично активирани макрофаги
M2	алтернативно активирани макрофаги
MLD-STZ	вишеструке мале дозе стрептозоточина (енгл. multiple low dose)
MMP	металопротеиназе матрикса (енгл. Matrix Metalloproteinase)
mRNA	информациона рибонуклеинска киселина
MTP	микротитар плоча (енгл. MicroTiter Plate)
MHC	главни комплекс гена ткивне подударности (енгл. Major Histocompatibility Complex)
MYD88	(енгл. Myeloid differentiation primary-response protein 88)
NK ћелије	урођене убилачке ћелије (енгл. Natural Killer Cells)
NKG2D	активациони рецептор (енгл. Natural Killer Group 2, Member D)
NOS2	азот моноксид синтетаза 2 (енгл. Nitric Oxide Synthase 2)
NKT	(енгл. <i>Natural killer T cell</i>)
NLR	<i>NOD-like</i> рецептори
PAMPs	(енгл. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PCR	реакција ланчаног умножавања (енгл. Polymerase Chain Reaction)
PBS	(енгл. Phosphate Buffered Salline)

Утицај дијабетес мелитуса на раст и прогресију мишићег тумора дојке

RNK	Рибонуклеинска киселина
ROS	(енгл. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
Th ћелије	Помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper cells</i>)
TLR	(енгл. <i>Toll like receptor</i>)
Treg	Регулаторни Т лимфоцити
TNF	Фактор некрозе тумора (енгл. <i>Tumor necrosis factor</i>)
TGF-β	Трансформишући фактор раста бета (енгл. <i>Transforming growth factor β</i>)
TRAIL	(енгл. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TAM	тумор асоцирани макрофаги (енгл. Tumor Associated Macrophages)
TIL	тумор-инфилтришући лимфоцити (енгл. Tumour Infiltrating Lymphocytes)
TRAF6	(енгл. TNFR- associated factor 6)
VEGF	(енгл. vascular endothelial growth factor)



8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics 2013. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 52-62.
 2. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys* 2015; 72: 333-8.
 3. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37: S81-S90.
 4. Kangralkar V.A., Patil S.D., Bandivadekar R.M. Oxidative stress and diabetes: a review. *Int. J. Pharm. Appl* 2010; 1: 38-45.
 5. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 1103-23.
 6. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergental RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care* 2010; 33: 1674-1685.
 7. Cohen DH, LeRoith D. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: F27-45.
 8. Shi Y, Hu FB. The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* 2014; 383: 1947-8.
 9. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-33.
 10. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* 2006; 5: 14.
 11. Ikemura M, Nishikawa M, Kusamori K, Fukuoka M, Yamashita F, Hashida M. Pivotal role of oxidative stress in tumor metastasis under diabetic conditions in mice. *J Control Release* 2013; 170: 191-7.
 12. Rodacki M, Svoren B, Butty V, Besse W, Laffel L, Benoist C, Mathis D. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2007; 56: 177-85.
 13. Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, Priatel JJ, Tan R. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes* 2011; 60: 857-66.
-

14. Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN, Lai YP. Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8⁺ cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One* 2014; 9: e109961. doi: 10.1371/journal.pone.0109961.
 15. Nieminen JK, Vakkila J, Salo HM, Ekström N, Härkönen T, Ilonen J, Knip M, Vaarala O. Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35: 2303-10.
 16. Sun C, Sun L, Ma H, Peng J, Zhen Y, Duan K, Liu G, Ding W, Zhao Y. The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1670-9.
 17. Sell H, Habich C, Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 709-16.
 18. Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, Nave H. Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E108-16.
 19. Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A, Peraldi MN. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS One* 2013; 8: e62418.
 20. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S. and Lukic ML. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur J Immunol* 2011; 41: 1902-1912.
 21. Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. *Int J Cancer* 2014; 134: 1669-16682.
 22. Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 2005; 202: 583-8.
 23. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N, Raulet DH. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol* 2014; 122: 91-128.
-

24. Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, Pertel T, Carnaud C, Bluestone JA, Lanier LL. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 2003; 18: 41-51.
 25. Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1217-31.
 26. Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, et al. Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J Immunol* 2009; 182: 1696-705.
 27. Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol* 2012; 3: 208.
 28. Yang WC. Myeloid-derived Suppressor Cells in Autoimmune Diabetes: Their Anti-diabetic Potential and Mechanism. *J Diabetes Metab* 2013; S12:004. doi:10.4172/2155-6156.S12-004
 29. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. Gr-11CD1151 immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006; 66: 1123-31.
 30. Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 2009; 50: 799-807.
 31. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 2014; 44: 1582-92.
 32. Sitrin J, Ring A, Garcia KC, Benoist C, Mathis D. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *J Exp Med* 2013; 210: 1153-65.
 33. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2012; 22: 275-81.
-

34. Wesolowski R, Markowitz J, Carson WE 3rd. Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *J Immunother Cancer* 2013; 1: 10. doi: 10.1186/2051-1426-1-10.
 35. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 162-74.
 36. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol Biol* 2011; 677: 375-93.
 37. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN, Banerjee SK. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PLoS One* 2015; 10: e0125270.
 38. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 5698931.
 39. Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; doi: 10.1002/term.2452.
 40. Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, Yu W, Shen C, Liu J, Ren X. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol* 2013; 190: 3783-97.
 41. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002; 107: 452-460.
 42. Sucher R, Kurz K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D, Brandacher G. IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the Pathogenesis of Malignant Tumor Disease. *International Journal of Tryptophan Research* 2010; 3: 113-120.
 43. Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Dendritic Cell Tolerogenicity. *Immunological investigations* 2012; 41: 738-764.
 44. Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A, Vitale M. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface
-

- expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 2006; 108: 4118-25.
45. Li R, Wei F, Yu J, Li H, Ren X, Hao X. IDO inhibits T-cell function through suppressing Vav1 expression and activation. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1402-8.
46. Kramer J, Moeller EL, Hachey A, Mansfield KG, Wachtman LM. Differential expression of GLUT2 in pancreatic islets and kidneys of New and Old World nonhuman primates. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296 (3): R786-93.
47. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 285: 1377-1383.
48. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 20:Unit 20.2. doi: 10.1002/0471142735.im2002s39.
49. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." *Cell*. 2004; 117: 927-939
50. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Nioewolna M, Hiraga T. Actions of Biphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2979-2988.
-
-