

Биолошки факултет
Број захтева:15/218-1
Датум: 06.04.2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Функционалне и имунофенотипске карактеристике NK ћелија регионалних лимфних чворова оболелих од меланома и њихова *in vitro* активација IL-2 и IL-15“.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија, Биологија тумора.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Мр Ана М. Вулетић

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање:

Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

3. Година дипломирања: 1999.

4. Назив магистарске тезе кандидата: „Утицај 13-цис-ретиноичне киселине на пролиферацију и диференцијацију HL-60 ћелија промијелоцитне леукемије“.

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена:

Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

6. Година одбране магистарске тезе: 2007.

7. Година и назив факултета на коме је кандидат уписао докторске студије: /

Обавештамо Вас да је Наставно- научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.

2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.

3. Подаци о ментору.

4. Одлука Етичког одбора Института за онкологију и радиологију Србије.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/218-06.04.2012.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 12. Статута Биолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно-научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости теме докторске дисертације кандидата:

Мр Ане М. Вулетић, дипломираног молекуларног биолога и физиолога, под насловом:

„Функционалне и имунофенотипске карактеристике NK ћелија регионалних лимфних чворова оболелих од меланома и њихова *in vitro* активација IL-2 и IL-15“.

За менторе се именују:

1. Др Гордана Коњевић, научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду;
2. Др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: **мр Ану Вулећ**

А. Име и презиме ментора: **др Гордана Коњев**

Звање: **научни саветник Института за онкологију и радиологију Србије, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Konjević G**, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Babović N. In-vitro IL-2 or IFN- α -induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* 2010 Dec;20(6):459-67
2. **Konjević G**, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Radenković S. Novel aspects of *in vitro* IL-2 or IFN- α enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. *Biomed Pharmacother.* 2010 Dec;64(10):663-71.
3. **Konjević G**, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Jurišić V, Spuzić I. Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals. *J Membr Biol.* 2009 Aug;230(3):113-23.
4. **Konjević G**, Jović V, Vuletić A, Radulović S, Jelić S, Spuzić I. CD69 on CD56+ NK cells and response to chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. *Eur J Clin Invest.* 2007 Nov;37(11):887-96.
5. **Konjević G**, Mirjačić Martinović K, Jurišić V, Babović N, Spuzić I. Biomarkers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells. *Biomarkers.* 2009 Jun;14(4):258-70.

Б. Име и презиме ментора: **др Гордана Матић**

Звање: **редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду , научни саветник Института за биолошка истраживања Синиша Станковић,**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Savic D, Knezevic G, Damjanovic S, Spiric Z, **Matic G**. The role of personality and traumatic events in cortisol levels - Where does PTSD fit in? *Psychoneuroendocrinology.* 2011 Nov 29.
2. Milutinović DV, Macut D, Božić I, Nestorov J, Damjanović S, **Matić G**. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hypersensitivity and glucocorticoid receptor expression and function in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011 Nov;119(10):636-43.

3. Djordjevic A, Djordjevic J, Elaković I, Adzic M, **Matić G**, Radojčić MB. Fluoxetine affects hippocampal plasticity, apoptosis and depressive-like behavior of chronically isolated rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Jan 10;36(1):92-100.

4. Elaković I, Djordjevic A, Adzic M, Djordjevic J, Radojčić M, **Matić G**. Gender-specific response of brain corticosteroid receptors to stress and fluoxetine. Brain Res. 2011 Apr 12;1384:61-8. Epub 2011 Jan 31.

5. Macut D, Vojnović Milutinović D, Božić I, **Matić G**, Brkljačić J, Panidis D, Petakov M, Spanos N, Bjekić J, Stanojlović O, Petrović Milinković A, Radojčić Z, Damjanović S. Age, body mass index, and serum level of DHEA-S can predict glucocorticoid receptor function in women with polycystic ovary syndrome. Endocrine. 2010 Feb;37(1):129-34.

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В, или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релеватне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа, коју ће на предлог Универзитета донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41, и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски магистара наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужуј научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

Декан Биолошког факултета

Датум: 06.04.2012.

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

**NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU
BIOLOŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na III redovnoj sednici Naučno–nastavnog veća Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 9.12.2011. godine, određeni smo u Komisiju za ocenu ispunjenosti uslova i naučne zasnovanosti predložene teme za izradu doktorske disertacije mr Ane Vuletić, pod naslovom: „Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma i njihova *in vitro* aktivacija IL-2 i IL-15“

Na osnovu podnete dokumentacije i uvida u dosadašnji rad mr Ane Vuletić, Komisija podnosi Nastavno-naučnom veću Biološkog fakulteta sledeći:

I Z V E Š T A J

A. Opšti podaci o kandidatu:

Ime, srednje slovo i prezime: Ana M Vuletić
Datum i mesto rođenja: 10.12.1973., Beograd
Zaposlen (radna organizacija): Institut za onkologiju i radiologiju Srbije
Kontakt telefoni: 064 247 33 06
E-mail: radovanovica@ncrc.ac.rs

Obrazovanje:

1999- diplomirani molekularni biolog i fiziolog
2007- magistar bioloških nauka

Stručno usavršavanje:

1. Evropska škola onkologije: „Molekularna epidemiologija,“ 27-28. septembar 2001. Beograd.
2. European Summer School: “Pharmacology of New Anticancer Drugs,” 1-6. jul 2002. Bordo, Francuska.

Projekti:

- 2002-2005. Projekat broj 1602: Imunske disfunkcije u malignim oboljenjima i mogućnosti imunomodulacije.
- 2007-2010. Projekat broj 145056: Izučavanje regulatornih mehanizama vezanih za imunomodulaciju u malignim bolestima

2010- Projekat broj 41031: Identifikacija molekulskih markera za predikciju, progresiju tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti

Članstvo u naučnim društvima:

Evropsko društvo za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR), Društvo imunologa Srbije i Srpsko društvo istraživača raka (SDIR)

Strani jezici:

Engleski i ruski jezik

Naučna oblast:

Biologija

Uža naučna oblast:

Biologija tumora

Posebne aktivnosti i priznanja:

B. Bibliografija:

1. Publikovani naučni i stručni radovi iz uže naučne oblasti:

M21

1. Konjević G, Jović V, Vuletić A, Radulović S, Jelić S, Spuzić I. CD69 on CD56+ NK cells and response to chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. Eur J Clin Invest. 2007;37(11): 887-896.

M22

2. Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Babović N. In-vitro IL-2 or IFN- α -induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients. Melanoma Res. 2010;20(6):459-67.
3. Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Radenković S. Novel aspects of *in vitro* IL-2 or IFN-alpha enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. Biomed Pharmacother. 2010;64(10):663-71.
4. Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jurisić V, Spuzić I. Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals. J Membr Biol. 2009;230(3):113-23.
5. Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurisić V, Babović N, Spuzić I. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. Clin Exp Metastasis. 2007;24(1):1-11.

M23

6. Vuletic A, Konjevic G, Milanovic D, Ruzdijic S, Jurisic V. Antiproliferative effect of 13-cis-retinoic acid is associated with granulocyte differentiation and decrease in cyclin B1 and Bcl-2 protein levels in G0/G1 arrested HL-60 cells. *Pathol Oncol Res.* 2010;16(3):393-401.

2. Magistarska teza: 2007. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

„Uticaj 13-cis-retinoične kiseline na proliferaciju i diferencijaciju HL-60 ćelija promijelocitne leukemije“

C. Tema doktorske disertacije:

Naslov disertacije:

„Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma i njihova *in vitro* aktivacija IL-2 i IL-15“

Područje istraživanja:

Imunologija tumora

Polazne osnove:

Važnu ulogu u sprečavanju nastanka i širenja tumora imaju ćelije prirodne ubice- NK ćelije (engleski „natural killer cells“- NK ćelije) koje kao važna subpopulacija sistema urođene imunosti mogu neposredno da prepoznaju izmenjene ćelije i da ih unište putem citotoksičnosti.

Pored toga što sintetišu citolitičke enzime (perforin, granzime) i brzo ispoljavaju direktnu citotoksičnu aktivnost u odnosu na maligno transformisane i na ćelije inficirane virusima bez prethodne stimulacije i MHC restrikcije, NK ćelije sintetišu i brojne citokine i hemokine i time regulišu adaptivni imunski odgovor. Poznato je da su NK ćelije zastupljenije u perifernoj krvi (PK) gde čine 10-20% limfocita, dok su u limfnim čvorovima (LČ) manje prisutne i predstavljaju 0.5- 5 % limfocitne populacije. Imunofenotipski NK ćelije su CD3⁻CD56⁺ a obuhvataju dve funkcionalno različite subpopulacije NK ćelija: citotoksičnu, CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciju i imunoregulatornu, CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciju, sa većom gustinom CD56 antigena koja je odgovorna za sintezu citokina i hemokina. Za razliku od PK, u LČ zastupljenija je imunoregulatorna, CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija koja se smatra nezrelijom. Noviji podaci ukazuju da NK ćelije iz PK dospevaju u parafolikularnu T ćelijsku zonu LČ zahvaljujući prisustvu svojih receptora za udomljavanje koji su svojstveni CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji. U T ćelijsku zonu LČ perifernom cirkulacijom dospevaju i brojne dendritične i druge antigen prezentujuće ćelije koje dolaze u blizak kontakt sa CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelijama. Prema novim saznanjima u LČ pod uticajem endogenih citokina odvija se sazrevanje nezrelih NK ćelija i diferencijacija NK ćelijskih prekursora kroz 5 sukcesivnih faza. Ovi prekursori u LČ najpre diferenciraju u nezrelije CD3⁻CD56^{sjajno+} ćelije od kojih delimičnim gubitkom CD56, pojavom CD16 receptora, inhibitornih KIR receptora i citotoksičnih molekula postaju zrelije CD3⁻CD56^{potmulo+} ćelije koje ubrzo napuštaju LČ.

Regionalni LČ predstavljaju prvu barijeru za proces metastaziranja malignih tumora. NK ćelije kao značajni efektori urođene antitumorske imunosti, do sada su u malignim bolestima kod ljudi izučavane uglavnom u PK, dok su njihove imunofenotipske i funkcionalne karakteristike u regionalnim LČ obolelih slabo opisane. U literaturi postoje samo podaci o procentualnoj zastupljenosti NK ćelija u limfocitnoj subpopulaciji u regionalnim LČ kod melanoma i karcinoma dojke, dok ekspresija specifičnih aktivacionih i inhibitrnih receptora čijim balansom je regulisana NK ćelijska citotoksična aktivnost, do sada nije ispitivana u regionalnim LČ obolelih od malignih tumora. NK ćelijska antitumorska aktivnost posredovana je aktivacionim NK ćelijskim receptorima koji vezivanjem za stresogene proteine na tumorskim ćelijama indukuju lizu maligno transformisanih ćelija, a inhibirana je inhibitornim NK ćelijskim receptorima koji vezivanjem za odgovarajuće alele MHC molekula klase I onemogućavaju NK ćelijsku aktivnost.

Predmet istraživanja:

S obzirom na značaj uticaja mikrosredine na funkcionalne i imunofenotipske osobine NK ćelija, u ovom radu izučavale bi se i poredile NK ćelije iz populacije sveže izolovanih limfocita LČ koji su infiltrisani malignim ćelijama i iz neinfiltrisanih LČ obolelih od melanoma. U tom smislu, kod infiltrisanih i neinfiltrisanih LČ, izučavala bi se dva važna aspekta NK ćelijske funkcije: sposobnost NK ćelija da liziraju ciljane tumorske ćelije i intraćelijska produkcija IFN γ . Pored zastupljenosti NK ćelija u limfocitnoj populaciji, u tumor infiltrisanim i neinfiltrisanim LČ, ispitivala bi se procentualna zastupljenost dve funkcionalne NK ćelijske subpopulacije (citotoksične CD3⁺CD56^{potmulo+} i imunoregulatorne CD3⁺CD56^{sjajno+}) kao i ekspresija nekoliko NK ćelijskih receptora novije generacije na ukupnim NK ćelijama i na njihovim funkcionalno različitim CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama. Kod infiltrisanih amlignih ćelijama i neinfiltrisanih LČ pratila bi se na NK ćelijama ekspresija NKG2D receptora koji se vezuje za ligande (MICA/B, ULBP1-4) na tumorskim ćelijama i značajan je u antitumorskom imunskom odgovoru, CD16 citotoksičnog receptora, dva inhibitorna KIR-a, CD158a i CD158b, koji se vezuju za najčešće alele MHC molekula klase I (-Cw4,5,6 i -Cw1,3,7 epitope), ranih aktivacionih antigena CD69, CD25 i HLA-DR.

Drugi deo istraživanja vršio bi se na *in vitro* kultivisanim limfocitima iz LČ infiltrisanih tumorskim ćelijama i iz neinfiltrisanih LČ u prisustvu IL-2 koji se već više od decenije primenjuje u terapiji metastatskog melanoma i pospešuje NK ćelijsku antitumorsku citotoksičnost i produkciju Th1 citokina ali pored toga ima i neželjeno imunosupresivno dejstvo jer stimuliše diferencijaciju T regulatornih limfocita i ispoljava veliku sistemsku toksičnost. Pored IL-2 na ovaj način ispitivao bi se uticaj IL-15 koji indukuje sazrevanje NK ćelija u LČ i trenutno je u fazi prekliničkih ispitivanja, manje je toksičan od IL-2 i slabije stimuliše T regulatorne limfocite.

Izolovani limfociti bi se kultivisali u periodu od 72 sata i 7 dana u hranljivoj podlozi za ćelijsku kulturu (RPMI 1640), u RPMI 1640 sa rekombinantnim humanim IL-2 (rh IL-2) i u RPMI 1640 sa IL-15. Pratio bi se uticaj ovih citokina nakon 72 sata i 7 dana *in vitro* tretmana na NK ćelijsku citotoksičnost kod LČ infiltrisanih tumorskim ćelijama i kod

neinfiltrisanih LČ. Pored toga, nakon duže kultivacije od 7 dana osim citotoksičnosti pratio bi se uticaj ovih citokina na ekspresiju NK ćelijskih aktivacionih (NKG2D, CD16, CD69) i inhibitornih receptora KIR-ova (CD158a i CD158b) na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama i njihovim CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama. Iz proteina izolovanih nakon ovih tretmana određivala bi se sposobnost IL-2 i IL-15 da indukuje signalne molekule pSTAT1 i pSTAT5 koji su važni kod indukcije citotoksičnosti ovim ispitivanim citokina, kako kod tumor infiltrisanih, tako i kod neinfiltrisanih LČ.

Ovi *in vitro* efekti IL-2 i IL-15 na CD3⁺CD56⁺ bi se poredili kod infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane LČ.

Cilj i zadaci istraživanja:

Cilj ovog istraživanja na sveže izolovanim NK ćelijama iz LČ bio bi da se utvrdi da li prisustvo tumorskih ćelija u LČ i u kom smislu utiče na NK ćelijsku funkciju i na ekspresiju aktivacionih i inhibitornih NK ćelijskih receptora kojima je regulisana NK ćelijska citotoksična funkcija.

Cilj ovog istraživanja na *in vitro* tretiranim limfocitima regionalnih LČ obolelih od melanoma je da se kroz tretmane IL-2, koji se primenjuje u lečenju metastatskog melanoma i IL-15 koji je važan za sam proces sazrevanja NK ćelija u LČ, ispita kakvo dejstvo ima njihova primena na funkciju i imunofenotip NK ćelija regionalnih LČ obolelih od melanoma.

Ispitivanje sposobnosti IL-2 i IL-15 da indukuju aktivnost NK ćelija LČ obolelih od melanoma može da utvrdi u kojoj meri je inducibilna NK ćelijska citotoksičnostovim citokinima kod tumor infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane LČ.

Praćenjem uticaja ovih citokina na ispoljavanje NK ćelijskih aktivacionih i inhibitornih receptora kako na ukupnim NK ćelijama tako i na njihovim funkcionalnim citotoksičnim CD3⁺CD56^{potmulo+} i imunoregulatornim CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama ispitala bi se povezanost između promene ekspresije ovih receptora i potencijalne indukcije NK ćelijske citotoksične funkcije.

Praćenjem uticaja citokina na ekspresiju receptora kao i indukciju STAT1 i 5 molekula koji su signalnom putu ovih citokina, dobio bi se bolji uvid u mehanizam delovanja citokina na NK ćelijsku antitumorsku citotoksičnost s obzirom na to da STAT1 kao transkripcioni faktor može da aktivira transkripciju gena za citotoksične medijatore (perforin i granzime).

Hipoteze istraživanja:

U ovoj doktorskoj disertaciji polazi se od sledećih hipoteza:

Maligne ćelije lučenjem bioaktivnih molekula i faktora rasta mogu da utiču na funkcionalne osobine NK ćelija kao i na ispoljavanje NK ćelijskih receptora kojima je regulisana NK ćelijska citotoksičnost.

In vitro kultura limfocita iz LČ IL-2 i IL-15 mogla bi da dovede do aktivacije i sazrevanja funkcionalno nezrelih slabo citotoksičnih NK ćelija LČ u smislu povećanja njihove antitumorske citotoksičnosti.

Aktivacija NK ćelija ovim citokinima mogla bi da bude posledica indukcije ekspresije nekih od ispitivanih aktivacionih NK ćelijskih receptora

Metode istraživanja:

Deo tkiva regionalnih LČ nakon hirurške intervencije kod obolelih od melanoma, bio bi mehanički isitnjen i profiltriran kroz mikro mrežicu da bi se dobila jednoćelijska suspenzija. Druga polovina LČ bila bi poslata na standardni patohistološki pregled da bi se utvrdilo da je čvor infiltrisan malignim ćelijama. Limfociti iz ćelijske suspenzije LČ bili bi izolovani na gustinskom gradijentu Histopaque. Nakon toga deo izolovanih limfocita bi se kultivisao u RPMI 1640 hranljivoj podlozi sa i bez 200 IU/ml rIL-2, sa i bez 25 ng/ml IL-15 u periodu od 72 sata i 7 dana.

NK ćelijska citotoksična aktivnost određivala bi se na gama brojaču na osnovu stepena lize ciljnih K562 tumorskih ćelija eritromijedne leukemije, merenjem otpuštanja radiokativnog hroma kojim su prethodno obeležene ove tumorske ćelije.

Zastupljenost CD3⁺CD56⁺ NK ćelija, njihovih funkcionalnih CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3-CD56^{sjajno+} subpopulacija, ekspresija CD16, NKG2D, KIR-ova(CD158a i CD158b), CD69, CD25 i HLA-DR na celokupnoj CD3⁺CD56⁺ populaciji NK ćelija i na obe funkcionalne subpopulacije utvrđivao bi se metodom direktne imunofluorescence na protočnom citometru.

Koncentracija proteina izolovanih iz kultivisanih limfocita nakon 72 sata sa i bez IL-2, ili IL-15 merila bi se na spektrofotometru metodom po Lowry-ju. Indukcija fosforilisanih formi STAT1, STAT5 signalnih molekula utvrđivala bi se Western blot metodom.

Očekivani rezultati i naučni doprinos:

Kako NK ćelije imaju značajnu ulogu u urođenoj antitumorskoj imunosti, uvidom u funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija iz regionalnih LČ kod obolelih od melanoma i njihovim poređenjem kod tumorskim ćelijama infiltrisanih i neinfiltrisanih LČ, mogu da se dobiju novi podaci o uticaju tumorskog okruženja na citotoksičnu i imunoregulatornu funkciju NK ćelija i ekspresiju ispitivanih aktivacionih i inhibitornih receptora.

Podaci dobijeni *in vitro* tretmanima NK ćelija regionalnih LČ obolelih od melanoma IL-2 i IL-15 mogu da ukažu kakve su mogućnosti NK ćelijske aktivacije ovim citokinima u samom LČ potencijalnom lokalnom terapijskom primenom. Očekuje se da se nakon *in vitro* tretmana svakim od ovih citokina NK iz LČ obolelih od melanoma poveća NK ćelijska citotoksičnost u odnosu na ciljnu tumorsku ćelijsku liniju. S obzirom da nova klinička ispitivanja u oblasti onkologije, se razvijaju u pravcu terapijske primene *ex vivo* aktiviranih NK ćelija IL-2 i IL-15 u lečenju melanoma i nekih pedijatrijskih solidnih tumora, ovim istraživanjem mogu da se dobiju novi podaci o mogućnostima aktivacije do sada slabo izučavane populacije NK ćelija iz regionalnih LČ bolesnika sa melanomom.

Relevantni polazni bibliografski izvori o predloženom istraživanju:

1. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Münz C. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol.* 2004;172(3):1455-62.
2. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003;101(8):3052-7.
3. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Münz C, Thiel A, Moretta L, Ferlazzo G. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol.* 2007;178(8):4947-55.
4. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, Nuovo GJ, Hughes TL, Marburger TB, Sung J, Baiocchi RA, Guimond M, Caligiuri MA. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity.* 2005; 22(3):295
5. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med.* 2006; 203(4):1033-43.
6. Lucas, M. et al. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007; 26, 503–517.
7. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Münz C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(47):16606-11.
8. Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med.* 2005;202(12):1679-89.
9. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfner S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A, Pende D, Groh V, Biassoni R, Höglund P, Kato M, Shibuya K, Schadendorf D, Anichini A, Ferrone S, Velardi A, Kärre K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines *in vitro* and in vivo. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1251-63.
10. Farzad Z, Cochran AJ, McBride WH, Gray JD, Wong V, Morton DL. Lymphocyte subset alterations in nodes regional to human melanoma. *Cancer Res.* 1990; 50(12):3585-8.
11. Farzad Z, Cochran AJ, McBride WH, Gray JD, Wong V, Morton DL. Lymphocyte subset alterations in nodes regional to human melanoma. *Cancer Res.* 1990; 50(12):3585-8.

12. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2002;13(2):169-83.
13. Hoyer KK, Doms H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. Immunol Rev. 2008; 226:19-28.
14. Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. Cytokine Growth Factor Rev. 2011; 22(2):99-108.

Institucije u kojima će se obaviti istraživanja

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju,
Laboratorija za imunologiju

D. Zaključak i predlog:

S obzirom na dosadašnje rezultate mr Ane Vuletić, kao i na izrazitu aktuelnost predloženog ispitivanja, čiji su hipoteza, cilj, metodologija, očekivani rezultati i naučni doprinos u skladu sa opšte prihvaćenim pravilima u naučnom istraživanju, zaključujemo da su ispunjeni uslovi da mr Ana Vuletić radi na predloženoj disertaciji i da postoji naučna zasnovanost predložene teme za izradu doktorske disertacije pod naslovom „Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma i njihova *in vitro* aktivacija IL-2 i IL-15“. Zato predlažemo Nastavno-naučnom veću Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati predloženu temu.

Prof dr Gordana Konjević, Naučni savetnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Nikola Tanć, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković
