

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija J. Đorđić Crnogorac

**ZNAČAJ RAZLIKA NIVOVA
IMUNOGLOBULINA SPECIFIČNIH ZA
MELANIN I TIROZINAZU U
ANTITUMORSKOJ IMUNOSTI
BOLESNIKA SA MELANOMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija J. Đorđić Crnogorac

**THE IMPORTANCE OF THE
DIFFERENCES IN IMMUNOGLOBULIN
LEVELS SPECIFIC FOR MELANIN AND
TYROSINASE IN ANTITUMOR
IMMUNITY IN PATIENTS WITH
MELANOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTORI:

dr sc. Biljana Božić

vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr sc. Ivana Matić

naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

ČLAN KOMISIJE:

dr sc. Goran Brajušković

vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:

Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta 175011 „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom naučnog savetnika Zorice Juranić. Eksperimenti u okviru doktorske disertacije urađeni su u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ivani Matić pre svega na velikom strpljenju i podršci, nesebičnim savetima i idejama, i naravno na svemu što me je svojim znanjem i iskustvom naučila, počevši od prvog eksperimenta i ulaska u laboratoriju, pa sve do završetka doktorske disertacije. Takođe, zahvaljujem se dr Zorici Juranić, rukovodiocu projekta, na ukazanoj prilici, savetima i velikoj podršci. Na dragocenim sugestijama i stručnoj pomoći zahvalna sam svom mentoru dr Biljani Božić, kao i profesoru dr Goranu Brajuškoviću.

Svojim kolegama iz Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora, Ani, Branki, Nadi, Irini i Željku hvala zato što su bili tu da pomognu kada je trebalo, pre svega u radu, ali i u opuštanju u toku mnogobrojnih “inkubacija”. Hvala vam na svakom trenutku provedenom zajedno i na prijateljstvima koja su se u tim trenucima gradila. Posebno bih se zahvalila našem laboratorijskom tehničaru, Tanji Petrović, koja me je rame uz rame sa mentorom naučila radu i ponašanju u laboratoriji, i kojoj nije bilo teško i po nekoliko puta pokazivati gde se nešto nalazi i uvek pomagati u potrazi za istim. Naravno, veliko hvala na podršci sadašnjem rukovodiocu laboratorije dr Tatjani Stanojković.

Svim svojim prijateljima i porodici, i ostalim kolegama sa Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, hvala na podršci i strpljenju.

Značaj razlika nivoa imunoglobulina specifičnih za melanin i tirozinazu u antitumorskoj imunosti bolesnika sa melanomom

Rezime

Melanom je visoko imunogeno maligno oboljenje. Melanomski antigeni imaju sposobnost imunizacije i stimulacije sinteze specifičnih antitela. Antitela specifična za iste, melanomske antigene, koji su prisutni kako na neoplastično transformisanim, tako i na neizmenjenim melanocitima, pronađeni su i kod bolesnika sa vitiligom. Pojava hipopigmentacija sličnih vitiligu kod bolesnika sa melanomom utiče na bolju prognozu preživljavanja, što ukazuje na značaj veze između tumorske imunosti i autoimunosti kod ovih bolesnika. Čelije melanoma karakteriše povećano prisustvo melanina i tirozinaze, a u serumu bolesnika sa metastatskim melanomom uočena je tirozinazna aktivnost. Dipeptidil peptidaza IV (DPPIV/CD26) je transmembranski glikoprotein koji se eksprimira na površini limfocita, i predstavlja važan marker aktivacije ćelija imunskog sistema. Upravo su limfociti jedan od najznačajnijih izvora solubilne forme ovog proteina u serumu. DPPIV ima značajnu ulogu u regulaciji imunskih funkcija i procesu neoplastične transformacije.

Osnovni cilj ovog istraživanja je bio da se ispitaju razlike u nivoima IgG, IgA i IgM klasa antitela specifičnih za melanin i tirozinazu u bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Od značaja je bilo i da se ispita postojanje razlika u humoralnom imunskom odgovoru između bolesnika sa melanomom bez metastaza i bolesnika sa melanomom i metastazama. S ciljem dodatne karakterizacije imunskog odgovora, određivan je procenat CD16⁺ i CD16⁺CD56⁺ limfocita, i CD89⁺ granulocita kod bolesnika sa melanomom, kao i

bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba, a zatim je ispitivana povezanost nivoa antitela i CD16/CD89⁺ ćelija u grupi bolesnika sa melanomom. Kako bi se ispitala uloga DPPIV u patogenezi melanoma i mogući klinički značaj kao dijagnostičkog markera, od važnosti je bilo da se odredi enzimski aktivnost dipeptidil peptidaze IV u serumu, procenat CD26⁺ limfocita i ekspresija CD26 antigena na limfocitima kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.

Rezultati istraživanja su pokazali da bolesnici sa melanomom bez metastaza imaju statistički značajno viši nivo anti-melaninskih IgG antitela u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe, i što je još bitnije u odnosu na bolesnike sa melanomom i metastazama. Kod bolesnika sa melanomom sa i bez metastaza, i bolesnika sa vitiligom pronađen je niži nivo anti-tirozinaznih IgG antitela u poređenju sa nivoom ovih antitela kod zdravih osoba. Nizak nivo anti-tirozinaznih IgG antitela kod bolesnika sa melanomom u skladu je sa smanjenom IgG posredovanom citotoksičnošću, kao i sa dobijenim nižim procentom CD16⁺ limfocita i CD16⁺CD56⁺ limfocita, kod ovih bolesnika u odnosu na zdrave osobe i bolesnike sa vitiligom.

Nivoi anti-melaninskih i anti-tirozinaznih IgM antitela su bili statistički značajno niži u bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Većina bolesnika sa melanomom koji su imali niske nivoe anti-tirozinaznih i anti-melaninskih IgM antitela imali su metastaze. Ovaj podatak ističe značaj anti-melanomskih IgM antitela u kontroli melanoma i destruktiji melanocita.

Nivoi anti-melaninskih i anti-tirozinaznih IgA antitela bili su viši u bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Takođe, bolesnici sa melanomom imali su i viši procenat CD89⁺ granulocita i povećan procenat ukupnih granulocita. Postojanje pojačanog imunskog odgovora posredovanog IgA klasom antitela u bolesnika sa melanomom ukazuje na moguću imunosupresivnu, odnosno blokirajuću ulogu anti-melanomskih antitela IgA klase.

Određivanje ekspresije CD26 antigena na površini limfocita, kao i enzimski aktivnosti DPPIV, pokazali su da bolesnici sa

melanomom imaju statistički značajno niži procenat CD26⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita, kao i statistički značajno nižu aktivnost DPPIV u serumu u poređenju sa zdravim osobama i bolesnicima sa vitiligom. Statistički značajno smanjen procenat ukupnih limfocita kod bolesnika sa melanomom predstavlja još jednu potvrdu slabijeg imunskog odgovora ove grupe bolesnika.

Izmenjeni nivoi antitela IgG, IgA i IgM klase specifičnih za melanomske antigene, melanin i tirozinazu, kod bolesnika sa melanomom u poređenju sa zdravim osobama ukazuju na značaj specifičnog imunskog odgovora u patogenezi melanoma. Od posebne važnosti je podatak da nivoi anti-melaninskih IgG, IgA i IgM antitela, i anti-tirozinaznih IgA i IgM antitela imaju statistički značajnu moć diskriminacije između bolesnika sa melanomom i zdravih osoba. Statistički značajna moć diskriminacije između bolesnika sa melanomom i zdravih osoba koju imaju nivo enzimske aktivnosti DPPIV u serumu, i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita, potvrđuje vezu DPPIV i imunskog sistema i ukazuje na moguću značajnu ulogu DPPIV u mehanizmima patogeneze melanoma.

Ključne reči: Melanom, melanin, tirozinaza, vitiligo, antitela, CD16⁺ limfociti, CD89⁺ granulociti, DPPIV/CD26

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Eksperimentalna onkologija

UDK broj: [616-006.81:616-097]:[[616.5-003.829:[612.015.4:616.5]]:616-097]

The importance of the differences in immunoglobulin levels specific for melanin and tyrosinase in antitumor immunity in patients with melanoma

Abstract

Melanoma is a highly immunogenic malignancy. Melanoma antigens are capable of immunization and stimulation of the synthesis of specific antibodies. Antibodies specific for same, melanoma antigens, which are present both on the neoplastically transformed, as well as on the non-transformed melanocytes, were also found in patients with vitiligo. The presence of vitiligo-like hypopigmentations in patients with melanoma is associated with a better survival prognosis, indicating the importance of the link between tumor immunity and autoimmunity. The increased presence of melanin and tyrosinase is characteristic of melanoma cells, while the tyrosinase activity was observed in the sera of patients with metastatic melanoma. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is a transmembrane glycoprotein which is expressed on the surface of lymphocytes, and represents an important marker of activation of immune system cells. Lymphocytes represent one of the major sources of soluble form of this protein in the serum. DPPIV is implicated in the regulation of immune functions and neoplastic transformation.

The main goal of this study was to examine the differences in the levels of IgG, IgA and IgM classes of antibodies specific for melanin and tyrosinase in patients with melanoma, compared with the group of patients with vitiligo and the group of healthy individuals. The examination of the presence of differences in the humoral immune response between patients with melanoma without metastases and patients with melanoma and metastases was also significant for our research. To further characterize the immune response, it was important to determine the percentage of CD16⁺ and CD16⁺CD56⁺ lymphocytes and CD89⁺ granulocytes in patients with melanoma, as well as patients with vitiligo and healthy persons, and also to

investigate the connection between the levels of antibodies and CD16/CD89⁺ cells in the group of patients with melanoma. In order to evaluate the role of DPPIV in the pathogenesis of melanoma and its possible clinical significance as a diagnostic marker, we determined the enzymatic activity of dipeptidyl peptidase IV in the serum, the percentage of CD26⁺ lymphocytes and the expression of CD26 antigen on the lymphocytes in patients with melanoma, patients with vitiligo and healthy persons.

The results of our research showed that patients with melanoma without metastases had significantly higher levels of anti-melanin IgG antibodies than patients with vitiligo and healthy persons, and what is even more important they had significantly higher levels of anti-melanin IgG antibodies than patients with melanoma and metastases. In melanoma patients who had metastases and patients without metastases, and patients with vitiligo, lower levels of anti-tyrosinase IgG antibodies were found compared with the levels of these antibodies in healthy people. Low levels of anti-tyrosinase IgG antibodies in patients with melanoma is in accordance with reduced IgG-mediated cytotoxicity, as well as obtained lower percentage of CD16⁺ lymphocytes and CD16⁺CD56⁺ lymphocytes in these patients than in healthy persons and patients with vitiligo.

The levels of IgM antibodies specific for both melanin and tyrosinase were significantly lower in patients with melanoma than in patients with vitiligo and in healthy people. Most of the patients with melanoma who had low levels of anti-melanin and anti-tyrosinase IgM antibodies belong to the group of patients with metastases. These data highlights the importance of anti-melanoma IgM antibodies in the control of melanoma and destruction of melanocytes.

The levels of anti-melanin and anti-tyrosinase IgA antibodies were higher in patients with melanoma in comparison to patients with vitiligo and healthy control persons. Also, patients with melanoma had a higher percentage of CD89⁺ granulocytes and an increased percentage of total granulocytes. The existence of increased IgA antibodies-mediated immune response in melanoma patients suggest the immunosuppressive, or the blocking role of anti-melanoma antibodies of IgA class.

Determination of the expression levels of CD26 on the surface of lymphocytes and the enzymatic activity of DPPIV in the sera of patients with melanoma, showed that the group of patients with melanoma had a significantly lower percentage of CD26⁺ lymphocytes in population of overall leukocytes, in addition to significantly lower serum DPPIV enzymatic activity when compared to healthy persons and patients with vitiligo. A statistically significant reduction in the percentage of lymphocytes in patients with melanoma represents another confirmation of weaker immune response in this group of patients.

Altered levels of IgG, IgA and IgM classes of antibodies specific for melanoma antigens, melanin and tyrosinase, in melanoma patients when compared to healthy individuals indicate the importance of the specific immune response in the pathogenesis of melanoma. The finding that the levels of anti-melanin IgG, IgA and IgM antibodies, and anti-tyrosinase IgA and IgM antibodies possess a significant power of discrimination between melanoma patients and healthy persons is of crucial importance. The significant power of discrimination between melanoma patients and healthy individuals which have DPPIV serum enzymatic activity and the percentage of CD26⁺ lymphocytes in the population of overall leukocytes confirms the relationship between DPPIV and the immune system and suggest the possible important role of DPPIV in the mechanisms of melanoma pathogenesis.

Key words: Melanoma, melanin, tyrosinase, vitiligo, antibodies, CD16⁺ lymphocytes, CD89⁺ granulocytes, DPPIV/CD26

Scientific field: Biology

Scientific discipline: Experimental oncology

UDC number: [616-006.81:616-097]:[[616.5-003.829:[612.015.4:616.5]]:616-097]

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Melanom.....	1
1.2. Epidemiologija melanoma.....	5
1.3. Dijagnostikovanje melanoma	5
1.4. Faktori rizika za nastanak melanoma	9
1.5. Melanom i imunski sistem.....	12
1.6. Tirozinaza	16
1.7. Povezanost i razlike imunskog odgovora kod melanoma i vitiliga	18
1.8. Antitumorski efektorski mehanizmi	20
1.9. Dipeptidil peptidaza IV	26
1.10. DPPIV i imunski sistem	30
1.11. Uloga DPPIV u malignim bolestima.....	32
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
3. MATERIJAL I METODE	39
3.1. Selekcija bolesnika	39
3.2. Prikupljanje kliničkih podataka	40
3.3. Izolovanje seruma.....	41
3.4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	41
3.5. Analiza protočnom citometrijom.....	42
3.6. Određivanje aktivnosti DPPIV u serumu	44
3.7. Statistička obrada rezultata.....	45
4. REZULTATI	47
4.1. Određivanje nivoa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase u serumu bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	47
4.1.1. Određivanje nivoa anti-melaninskih antitela IgG, IgA i IgM klase u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	47

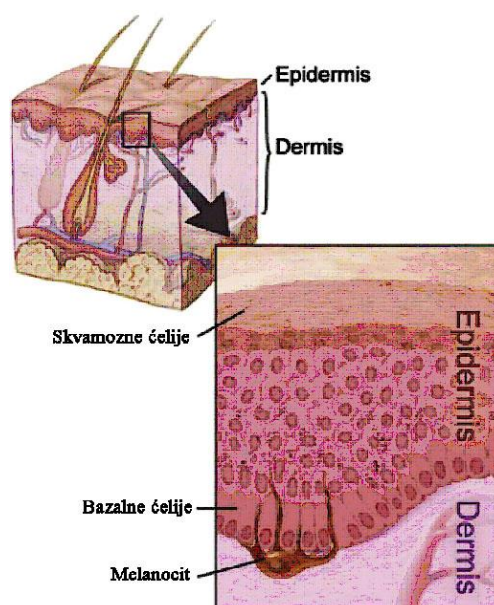
4.1.2. Određivanje nivoa anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	50
4.1.3. ROC analiza nivoa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase u odnosu na postojanje melanoma.....	53
4.1.4. Učestalosti bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba sa izmenjenim nivoom anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela	60
4.2. Ekspresija CD16 i CD56 antigena na površini limfocita i ekspresija CD89 antigena na površini granulocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba	62
4.2.1. Ekspresija CD16 i CD56 antigena na površini limfocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	62
4.2.2. Ekspresija CD89 antigena na površini granulocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	69
4.3. Aktivnost dipeptidil peptidaze IV u serumu i ekspresija CD26 antigena na limfocitima kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba ...	71
4.3.1. Enzimski aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	71
4.3.2. Ekspresija CD26 antigena na površini limfocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.....	73
4.3.3. ROC analiza enzimske aktivnosti DPPIV i učestalosti CD26 ⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na postojanje melanoma	75
4.4. Učestalost limfocita i granulocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba	79
4.5. Korelacije između učestalosti CD16 ⁺ i CD16 ⁺ CD56 ⁺ limfocita, odnosno CD89 ⁺ granulocita i nivoa pojedinačnih klasa antitela specifičnih za melanin i tirozinazu kod bolesnika sa melanomom.....	81
5. DISKUSIJA	82
6. ZAKLJUČCI	99
7. LITERATURA	101

1. UVOD

1.1. Melanom

Melanom je maligni tumor koji nastaje neoplastičnom transformacijom epidermalnih melanocita koji se predominantno nalaze u koži, ali i u gastrointestinalnom traktu, ušima, očima, oralnoj i genitalnoj mukozi, pa shodno tome melanom može nastati u bilo kom od ovih tkiva (Cummins i sar., 2006; Gordon, 2013). Proces neoplastične transformacije melanocita nije još uvek potpuno razjašnjen. Smatra se da u osnovi ovog procesa leži akumulacija genetičkih promena koje utiču na regulaciju ćelijskog ciklusa melanocita i čine ove ćelije podložnijim kancerogenim efektima ultravioletnog (UV) zračenja (Demierre i Nathanson, 2003; McCourt i sar., 2014).

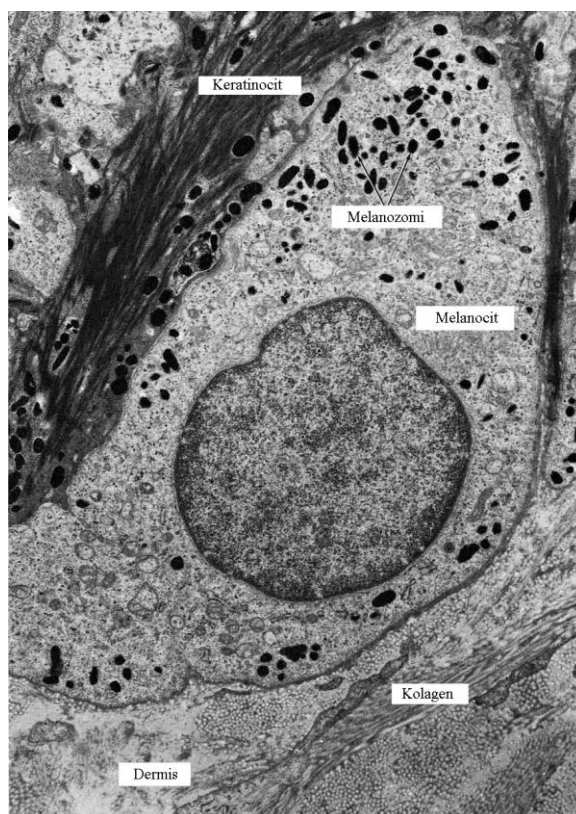
Melanom kože nastaje kao posledica neoplastične transformacije epidermalnih melanocita koji pripadaju sloju epidermisa pod nazivom *stratum basale* (Gordon, 2013).



Slika 1.1. Normalna anatomija kože (Gordon, 2013)

Melanociti vode poreklo od neuralne kreste. Prekursorske ćelije melanocita nalaze se u samoj koži i smatra se da postoji bar dva tipa prekursora melanocita: rani i intermedijerni prekursori. Funkcionalno sazrevanje melanocita odigrava se prolaskom kroz ove stadijume, dok se ćelije bilo kog od ovih prelaznih stanja mogu transformisati i dati nevus ili melanom. Od nevusa se kasnije može razviti melanom, ili se ćelije nevusa mogu diferencirati u nemaligne, Švanove ćelije (Herlyn, 1990).

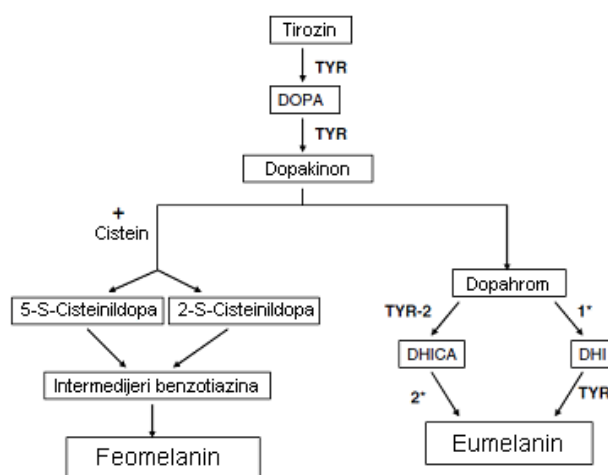
Kako od već postojećih lezija ili nevusa, melanom može nastati i na zdravoj koži. Najčešći nevusi prekursori melanoma su uobičajeni stečeni nevusi, displastični nevusi, kongenitalni nevusi i plavi nevusi (Velho, 2012). Međutim, najveći broj melanoma nastaje *de novo* od samih melanocita, ćelija čija je funkcija sinteza pigmenta melanina, njegovo deponovanje i transfer u paketima do keratinocita (Gruber i sar., 2008; Marković i sar., 2007). Melanin se u keratinocitima raspoređuje iznad površine jedra, paralelno sa površinom kože, i na taj način apsorbuje UV zračenje i neutrališe dejstvo slobodnih radikala nastalih kao posledica delovanja UV zračenja (Marković i sar., 2007).



Slika 1.2. Melanocit u dermoepidermalnom prostoru (Fawcett, 1980)

Biolška jedinstvenost melanocita je upravo u postojanju biohemijskog puta za konverziju tirozina u melanin u visoko specijalizovanim organelama, melanozomima. Ovakva osobina je jedinstvena za melanocyte i značajno je izmenjena u neoplastično transformisanim melanocitima. Ove izmene podrazumevaju promene u strukturi melanozoma, nivou deponovanja melanina, kao i tipu melanina (Jimbow i sar., 1993). Melanociti čoveka sintetišu dve forme melanina: eumelanin, tamniji melanin, i feomelanin, svetliji melanin (Li i sar., 2004; Ram i Shoenfeld, 2007).

Tirozinaza je ključni enzim u metabolizmu melanina u pigmentnim ćelijama i kateholamina u neuroendokrinom sistemu. Katalizuje prvi korak u sintezi melanina, odnosno konverziju tirozina u 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA), kao i nekoliko kasnijih koraka u sintezi obe forme melanina, eumelanina i feomelanina (Ram i Shoenfeld, 2007).



Slika 1.3. Biosinteza eumelanina i feomelanina

1* - spontana dekarboksilacija dopahroma do DHI; 2* - oksidacija DHICA - kod ljudi se odigrava pomoću enzima tirozinaze, a kod miševa pomoću TRP-1; TYR = tirozinaza, DHICA = 5,6-dihidroksi-indole-2-karboksilna kiselina (engl. *5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid*); DHI = 5,6-dihidroksi-indol (engl. *5,6-dihydroxyindole*) (Ram i Shoenfeld, 2007)

Iz melanocita su izolovane dve izoforme enzima tirozinaze. Obe izoforme su eksprimirane u pigmentnim tkivima i pokazuju blisku homologiju u aminokiselinskim sekvencama. Zastupljenija forma tirozinaze je intraćelijski enzim vezan za ćelijsku membranu, dok drugu formu predstavlja solubilni enzim.

Mutacije u ključnim genima, produkcija autokrinih faktora rasta i gubitak adhezionih receptora omogućuju melanocitima da izbegavaju regulaciju aktivnosti od strane keratinocita. Melanociti proliferišu i stiču sposobnost širenja, pre svega u radijalnom smeru, što se naziva faza radijalnog rasta, a kao rezultat nastaju intraepidermalne lezije. Ove ćelije zatim mogu preći u fazu vertikalnog rasta, kada stiču metastatski potencijal i mogu izvršiti invaziju u dermis. Radijalna i vertikalna faza rasta mogu nastati i nezavisno, od pojedinačnih melanocita i nevusa, dok se metastatski melanom može razviti direktno iz obe faze (Gray-Schopfer i sar., 2007).

Melanom kože, odnosno kutani melanom, se klasifikuje u četiri osnovna klinička tipa: (1) površinsko šireći melanom (engl. *superficial spreading melanoma*, SS-M), (2) lentigo maligni melanom, (3) nodularni melanom, (4) akralni lentiginozni melanom. Melanom *in situ* i lentigo melanom se smatraju premalignim lezijama (McCourt i sar., 2014).

- (1) Površinsko šireći melanom je najučestaliji tip melanoma i uglavnom ga karakteriše intraepidermalna proliferacija. Inicijalna faza rasta tumora može dugo da traje, dok maligne ćelije vrše invaziju ili samo u epidermisu ili u površinski deo dermisa. U radijalnoj fazi rasta, maligne ćelije se u dermisu mogu naći ili u malim grupama ili kao pojedinačne tumorske ćelije.
- (2) Za razliku od prethodnog tipa, lentigo maligni melanom je značajno manje učestao tip melanoma. Nastaje od lentigo maligne lezije koja se sporo menja, i često pokazuje sporu progresiju do lentigo malignog melanoma. Vertikalnu fazu rasta ovog tipa melanoma uglavnom čine ćelije vretenastog oblika.
- (3) Akralni lentiginozni melanom je tip melanoma koji se javlja na palčevima ruku ili stopalima. U početku predstavlja glatku i tanku leziju kože koja kasnije postaje deblja i nepravilne površine.
- (4) Nodularni melanom predstavlja tip melanoma kože koji može nastati na bilo kom delu tela, ali se najčešće javlja na istaknutim delovima glave i vrata, i uglavnom se javlja u obliku brzorastuće izrasline. Iz inicijalne faze, nodularni melanom odmah započinje vertikalnu progresiju, vršeći invaziju u dublje slojeve kože (Braud i sar., 2003; McCourt i sar., 2014).

Pored ova četiri osnovna tipa melanoma kože, postoje još i mukozni melanom, dezmodoplastični melanom, amelanocitni melanom, uvealni melanom i pedijatrijski atipični spitzoidni tumor, koji se znatno ređe javljaju (Kauffmann i Chen, 2014).

1.2. Epidemiologija melanoma

Uprkos tome što predstavlja formu koja se najređe javlja, melanom je maligni tumor kože koji uzrokuje najveću smrtnost (McCourt i sar., 2014; Gordon, 2013). Učestalost melanoma ubrzano raste širom sveta u poslednjih nekoliko godina. Razlika u učestalosti se javlja između polova, pa je tako učestalost melanoma u Evropi kod muškaraca 11.4, dok kod žena iznosi 11.0 (Ferlay i sar., 2013). Takođe, veliki uticaj na učestalost melanoma ima geografski položaj posmatrane populacije, tj. razlika u učestalosti zavisna je od rase populacije (Tuong i sar., 2012). Melanom pokazuje značajno nižu i stabilniju učestalost kod tamnoputih populacija, dok Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) navodi podatak da je najveća nacionalna učestalost melanoma prisutna u populaciji Australije i Novog Zelanda (Birachi i sar., 2010; Dummer i sar., 2011). Standardizovana stopa učestalosti za oba pola, prema populaciji Evrope, za Srbiju iznosi 9.2, standardizovana stopa smrtnosti 2.9, dok petogodišnje preživljavanje za oba pola iznosi 3.5% (EUCAN, 2012).

1.3. Dijagnostikovanje melanoma

Prilikom postavljanja kliničke dijagnoze melanoma veoma je bitno obratiti pažnju na veličinu, lokalizaciju, istoriju promene boje ili oblika lezije. Ove karakteristike obuhvaćene su u takozvano ABCDE pravilo za prepoznavanje melanoma na osnovu fizičkih karakteristika (Friedman i sar., 1985). ABCDE pravilo podrazumeva A za asimetriju (engl. *Asymmetry*), B za nepravilne ivice (engl. *Border irregularity*), C za variranje u boji (engl. *Colour variegation*), D za dijametar veći od

6 mm (engl. *Diameter*) i E za razvijanje, odnosno promenu lezije tokom vremena (engl. *Evolving*). Međutim, bilo kakva promena nevusa ili lezija kože zahteva klinički pregled, jer melanom ne pokazuje uvek uobičajene, klasične karakteristike. Na primer, oko 5% svih melanoma su nepigmentisane lezije (Giuliano i sar., 1982). Kao rezultat toga, amelanocitni melanomi su ponekad pogrešno dijagnostikovani kao bazocelularni ili skvamozni karcinomi kože, ili čak kao inflamatorne lezije, seboreične keratoze ili bradavice. Nodularni melanom češće nema evidentnu pigmentaciju u odnosu na površinsko šireći melanom. U više od 50% slučajeva nodularni melanom je predominantno amelanocitna lezija, crvene ili roze boje (Chamberlain i sar., 2003), dok su skoro svi površinsko šireći melanomi crne ili braon boje. Ako je klinička dijagnoza nepouzdana, sledeći korak u postavljanju dijagnoze je biopsija lezije. Biopsijom se dobijaju podaci o debljini tumora u milimetrima ili Breslow indeks (Tabela 1.1.) (Breslow, 1970), broju mitoza i prisustvu ulceracija i regresije, koji su od velike važnosti za određivanje stadijuma bolesti (Thompson i sar., 2005).

Za određivanje invazivnosti tumora koristi se sistem opisan od strane Clark i sar. na osnovu koga su stadijumi invazivnosti klasifikovani u odnosu na dubinu invazije tumora u kožu (Tabela 1.2.) (Clark i sar., 1969; Marković i sar., 2007).

Tabela 1.1. Stadijum bolesti po Breslow-u (Breslow, 1970)

<i>Breslow indeks</i>	<i>Debljina tumora u mm</i>
I	< 0,75
II	0,75 – 1,5
III	1,51 – 2,25
IV	2,25 – 3,00
V	> 3,01

Tabela 1.2. Stadijum bolesti po Clark-u (Clark i sar., 1969)

<i>Stadijum bolesti</i>	<i>Dubina invazije tumora</i>
I	zahvaćen samo epidermis (<i>in situ</i> melanom); neinvazivna lezija
II	infiltrira papilarni dermis
III	ispunjava papilarni dermis
IV	infiltrira retikularni dermis
V	infiltrira subkutano masno tkivo

Za određivanje stadijuma melanoma koristi se TNM klasifikacija Američkog komiteta za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) iz 2009. godine (Balch i sar., 2009). TNM klasifikacija podrazumeva klasifikaciju stadijuma melanoma na osnovu debljine lezije, odnosno Breslow indeksa, prisustva ulceracija i broja mitoz, T (engl. *Thickness*), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, N (engl. *Node*) i prisustva udaljenih metastaza, M (engl. *Metastasis*). Nezavisni prognostički faktori razmatrani su od strane AJCC Komiteta za melanom za definisanje TNM kategorija i grupisanja stadijuma na osnovu rezultata iz literature i analiza prognostičkih faktora iz baze podataka "AJCC Melanoma Staging Database". Broj mitoz je prvi put uveden u TNM sistem klasifikacije, i definiše se kao broj mitoz/mm². Povišen nivo serumske laktat dehidrogenaze (LDH) se takođe pokazao kao veoma bitan prognostički faktor, i koristi se pri M klasifikaciji. TNM klasifikacija predstavljena je u tabeli (Tabela 1.3.).

Tabela 1.3. TNM klasifikacija

<i>Klasifikacija</i>	<i>Debljina tumora u mm</i>	<i>Ulceracije/Broj Mitoza</i>
T		
Tis	NA	NA
T1	≤ 1,00	a: bez ulceracije, br. mitoza < 1mm ² b: sa ulceracijom ili br. mitoza ≥ 1mm ²
T2	1,01 – 2,00	a: bez ulceracije b: sa ulceracijom
T3	2,01 – 4,00	a: bez ulceracije b: sa ulceracijom
T4	> 4,00	a: bez ulceracije b: sa ulceracijom
N	<i>Broj regionalnih limfnih čvorova sa metastazom</i>	<i>Vrsta metastaze</i>
N0	0	NA
N1	1	a: mikrometastaze ¹ b: makrometastaze ²
N2	2-3	a: mikrometastaze b: makrometastaze c: <i>in transit</i> metastaze ili sateliti bez metastaza regionalnih limfnih čvorova
N3	4 ili više ili <i>in transit</i> metastaze ili sateliti uz metastaze regionalnih limfnih čvorova	
M	<i>Lokalizacija udaljenih metastaza</i>	<i>Serumski LDH</i>
M0	bez udaljenih metastaza	NA
M1a	koža, potkožno tkivo, limfni čvorovi	Normalan
M1b	pluća	Normalan
M1c	ostali visceralni organi ili bilo koja druga udaljena metastaza	Normalan Povišen

NA, nije primenljivo (engl. *not applicable*); LDH, laktat dehidrogenaza

¹Mikrometastaze su dijagnostikovane nakon biopsije limfnih čvorova

²Makrometastaze su definisane kao klinički detektabilne, patološki potvrđene nodalne metastaze

1.4. Faktori rizika za nastanak melanoma

Izlaganje UV zračenju jedan je od najvažnijih faktora rizika za nastanak i razvoj melanoma. UV zračenje dovodi do pojave oštećenja u molekulu DNK, genskih mutacija, oksidativnog stresa, imunosupresije i inflamatornog odgovora (Deevya i sar., 2010). UVB zraci su mnogo efikasniji od UVA zraka u inicijaciji melanoma. Oštećenje u molekulu DNK koje se predominantno javlja kao posledica delovanja UVB zraka je formiranje ciklobutanskih pirimidinskih dimera, koje ukoliko se ne popravi reparacionim mehanizmima dovodi do nastanka mutacija tipa tranzicija C u T ili CC u TT (Ravanat i sar., 2001). S druge strane, posledica delovanja UVA zraka je pojava oksidativnih oštećenja u molekulu DNK (Noonan i sar., 2012). Stoga, smanjena učestalost kožnih maligniteta kod populacija sa tamnom bojom kože je posledica veće količine epidermalnog melanina koji apsorbuje više UVA i UVB zraka, u poređenju sa populacijama sa svetlijom bojom kože (Gloster, 2006).

Pored spoljašnjih faktora rizika za razvoj melanoma izuzetno su važni genetički faktori rizika. Oko 10% bolesnika sa melanomom ima pozitivnu istoriju bolesti u porodici. Tipičan fenotip osoba obolelih od melanoma podrazumeva bledo belu kožu, riđu ili plavu kosu i plave oči. Ovakav fenotip povezan je sa mutacijama u genu za receptor za melanokortin-1, (engl. *melanocortin-1 receptor*, MRC-1) (Azoury i Lange, 2014; Eggermont i sar., 2014). Ovaj gen lociran je na hromozomu 16q24, visoko je polimorfan i odgovoran je za osetljivost na sunce (Rees, 2004). Nekoliko gena povezano je sa pojavom i nasleđivanjem melanoma. Najbolje opisan gen u tom smislu je gen *CDKN2A* koji kodira ciklin-zavisni inhibitor kinaze 2A, (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, CDKN2A). Mutacije u ovom genu u ćelijama germinativne linije detektovane su kod trećine familijarnih melanoma, ali i kod sporadičnih melanoma (Marković i sar., 2007). Gen *CDKN2A* kodira dva supresorska proteina, protein p16, inhibitor kinaze 4A, i protein p14 ili Arf (engl. *alternative reading frame*). Studije na porodicama sa predispozicijom za razvoj melanoma u smislu nedostatka proteina p16 pokazale su da nosioci mutacija gena *MRC-1* ranije razvijaju melanom (van der Velden i sar., 2001). Protein p16 inhibira formiranje kompleksa ciklin D/ciklin-zavisna kinaza 4 (engl. *cyclin-dependent kinase 4*, CDK4) i ciklin-zavisna kinaza 6 (engl.

cyclin-dependent kinase 6, CDK6), koji fosforilišu retinoblastoma protein (engl. *retinoblastoma protein*, pRB), što uvodi ćeliju u ćelijsku deobu (Gruber i sar., 2008). Funkcija p14 proteina je da veže i inhibira Mdm2 protein, koji je negativni regulator p53 tumor supresora. Gubitak Arf proteina smanjuje aktivnost p53 i inhibira apoptozu mutiranih ćelija (Boukamp, 2005). Stoga, mutacije gena *CDKN2A* dovode do gubitka pRB i p53 kontrolisanih regulatornih procesa u ćeliji (Gruber i sar., 2008).

Nešto ređe, kod bolesnika sa melanomom, pre svega onih sa familijarnim melanomom, zastupljene su mutacije gena za ciklin-zavisnu kinazu 4 (Marković i sar., 2007).

Kod oko 60% slučajeva melanoma prisutna je mutacija u *BRAF* protoonkogenu. Ova mutacija predstavlja najučestaliju mutaciju melanoma, a posebno kod tumora lokalizovanih na regijama koje se slabo ili uopšte ne izlažu suncu. Pored toga što se javlja u primarnim i metastatskim melanomima, *BRAF* mutacija se javlja i kod nevocitnih nevusa i za posledicu ima aktivaciju Raf/MEK signalnog puta (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*, Raf; *mitogen-activated protein kinase kinase*, MAP2K, MKK ili MEK). S obzirom da se javlja i u nevusima, smatra se da ova mutacija ima više uticaja na proliferaciju nego na samu tumorigenezu, i verovatno predstavlja rani događaj u tumorigenezi koji uz druge genske promene dovodi do neoplastične transformacije. Internacionalna studija na 126 slučajeva melanoma pokazala je da je kod mukoznog i akralnog melanoma čest gubitak gena *CDKN4*, dok *BRAF* mutacija ima veću učestalost kod melanoma lokalizovanih na trupu (Curtin i sar., 2005).

Mutacija koja se često javlja zajedno sa *BRAF* mutacijom je mutacija gena *PTEN* za protein pod nazivom fosfataza i tenzin homolog (engl. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN). Ova fosfataza reguliše ekstraćelijske signale rasta preko fosfatidilinozitol fosfataze (PIP3), dok prisustvo mutacije dovodi do progresije ćelijskog ciklusa i inhibicije apoptoze. Delecija *PTEN*, njegova inaktivacija mutacijom, i redukovana ekspresija, javljaju se kod 25-50% nefamilijarnih melanoma (Kumar i sar., 2004; Goel i sar., 2006; Gruber i sar., 2008). Mutacije *PTEN* podrazumevaju tačkaste *missense* mutacije, insercije, *splice site* mutacije i manje ili veće delecije. Većina ovih alteracija dovodi do prevremene terminacije i skraćenih

transkripata ili do funkcionalne inaktivacije proteina (Aguissa-Touré A-HH i Li G, 2012).

Prisustvo mutacije gena *RAS* pokazano je kod oko 20% melanoma, kao i u samim nevusima. Najčešće se radi o *N-RAS* izoformi mutacije ovog gena. Dosadašnje studije su pokazale da *N-RAS* i *BRAF* mutacije nisu istovremeno prisutne kod melanoma (Bennett, 2008; Gruber i sar., 2008).

Istraživanja melanoma su pokazala da se *p53* mutacije prilično retko detektuju kod melanoma (u oko 10% slučajeva), a još ređe se nalaze kod nevusa (Bennett, 2008). Međutim, protein *p53* može biti prekomerno eksprimiran, posebno u regijama koje su izložene sunčevoj svetlosti. UV zračenje mišje i humane kože dovodi do povećanja nivoa *p53*, što dovodi do stimulacije sinteze α -melanotropina (α MSH) u keratinocitima i melanocitima, pa samim tim i do stimulacije pigmentacije (Cui i sar., 2007; Gruber i sar., 2008).

Mutacija gena *MITF* (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*, *MITF*) u germinativnim ćelijama takođe predstavlja predispoziciju za nastanak melanoma, ali i tumora bubrežnih ćelija, kao i njihovo istovremeno pojavljivanje. Ova mutacija dovodi do povećanog vezivanja *MITF* proteina za *HIF1A* promotor, i povećane invazivnosti i migracije melanocita i bubrežnih ćelija (Bertolotto i sar., 2011; Yokoyama i sar., 2011).

Još neke genetičke predispozicije za razvoj melanoma su: mutacije u genu *BAP1* (engl. *BRCA-associated protein 1*, *BAP1*) i genu *BRCA2* (engl. *breast cancer 2, early onset*, *BRCA2*), prisutno oboljenje *xeroderma pigmentosum*, i mutacija u genu *RBI* (Fletcher i sar., 2004; Njauw i sar., 2012; Debniak i sar., 2008).

Bolesnici sa stečenim sindromom imunodeficijencije, zatim bolesnici sa hematološkim malignitetima, kao i oni koji primaju imunosupresivnu terapiju zbog transplantacije organa imaju povišen rizik za nastanak melanoma (Marković i sar., 2007). Brojne studije ukazuju na to da UV zračenje, pored toga što indukuje nastanak malignih tumora, uzrokuje i imunosupresiju. U jednoj studiji tumori kože indukovani UV zračenjem pokazali su se kao visoko imunogeni, i bili su odbačeni nakon transplantacije u singene (genetički identične) miševe (Kripke, 1974). Tumori su brže rasli u miševima koji su bili izlagani UV zračenju, što je ukazivalo na vezu sa smanjenjem imunskog odgovora. Ovakvi rezultati navode na to da UV zračenje

suprimira imunski sistem i da imunosupresija indukovana UV zračenjem interferira sa antitumorskim imunskim mehanizmima (Kripke i Fisher, 1976; Kripke, 1986). Smatralo se da samo UVB zračenje ima sposobnost imunosupresije kroz indukovanje oštećenja u molekulu DNK. Međutim, kasnije studije su pokazale da i UVA zračenje takođe dovodi do imunosupresije menjajući prezentovanje antigena putem gubitka Langerhansovih ćelija iz epidermisa, indukcije regulatornih T-limfocita, produkcije IL-10 i TNF α (engl. *tumor necrosis factor alpha*). Rezultat je smanjen ćelijski imunski odgovor i inhibicija aktivnosti NK ćelija, dok humoralni imunski odgovor ostaje nepromenjen (Santo Domingo i sar., 2007).

1.5. Melanom i imunski sistem

Prvi jasan dokaz da imunski sistem može dovesti do regresije invazivnog humanog malignog tumora dobijen je iz studije u kojoj je bolesnicima sa metastatskim tumorom bubrega, melanomom ili non-Hočkinovim limfomom u terapiji davan interleukin-2 (IL-2). Prilikom davanja visoke doze rekombinantnog IL-2, uočeno je da dolazi do regresije tumora, čak i kod bolesnika sa velikim invazivnim tumorima (Rosenberg i sar., 1985).

Slučajevi spontane regresije tumora kod bolesnika sa metastatskim melanomom ukazali su da bi imunoterapija mogla imati značajniji uticaj na ishod metastatskog melanoma u odnosu na druge tumore (Rosenberg i sar., 2004; Mouawad i sar., 2010).

Modulatori biološkog odgovora, pre svega interleukin-2 i interferon- α (IFN- α), pokazali su veoma bitnu ulogu u adjuvantnoj terapiji i tretmanu metastatskog melanoma (Rosenberg i sar., 2004). IL-2, citokin koga proizvode CD4 T-limfociti, ima snažne imunske regulatorne efekte, uključujući stimulaciju citotoksičnih ćelija, aktivaciju NK ćelija, B-limfocita i makrofaga, indukciju produkcije ostalih citokina (Feldmann, 1998; Mouawad i sar., 2010) i ekspanziju limfocita aktiviranih specifičnim antigenom. IL-2 nema direktnog uticaja na tumorske ćelije, nego svoj antitumorski efekat ispoljava upravo ekspanzijom limfocita sa antitumorskom aktivnošću (Rosenberg, 2001). Nakon sprovedenih kliničkih studija, u kojima je davanje visokih doza IL-2 bolesnicima sa melanomom u stadijumu IV, gde je IL-2 izazvao odgovor na

terapiju kod značajnog procenta bolesnika, IL-2 je odobren kao terapeutik kod bolesnika sa neoperabilnim metastatskim melanomom od strane Američke administracije za hranu i lekove (engl. *Food i Drug Administration*, FDA). S druge strane, IFN- α , ima antiproliferativni, antiangiogenetski, kao i imunomodulatorni efekat (Slaton i sar., 1999), odnosno povećava ekspresiju MHC molekula klase I i infiltraciju CD4 T-limfocita u melanom (Hakansson i sar., 1998). Nije se pokazao kao dovoljno efikasan da se uvede u terapiju metastatskog melanoma (Mouawad i sar., 2010).

Nekoliko studija na eksperimentalnim životinjama je pokazalo da je ćelijski imunski odgovor više odgovoran za odbacivanje transplantiranih tumora ili alogenih tkiva od humoralnog imunskog odgovora. Citotoksični CD8 T-limfociti i CD4 pomoćnički T-limfociti prepoznaju peptidne antigene prezentovane od strane humanih leukocitnih antigena (HLA, humani analog glavnog kompleksa histokompatibilnosti, MHC molekula). CD8 T-limfociti prepoznaju peptide nastale od intraćelijskih citoplazmatskih proteina, prezentovanih na površinskim HLA molekulima klase I, dok CD4 T-limfociti prepoznaju peptide ekstraćelijskih proteina digestovanih u intraćelijskim endozomima i prezentovanih na površinskim HLA molekulima klase II (Rosenberg, 2001). CD8 i CD4 T-limfociti ispoljavaju antitumorski efekat prepoznavanjem specifičnih tumorskih antigena prezentovanih na MHC molekulima (Diamond i sar., 2011; van der Bruggen i sar., 1991; Marcus i sar., 2014). Iako je veliki broj studija već dokazao značaj T-limfocita u antitumorskom imunskom odgovoru, ipak adaptivni tj. specifični imunski sistem ne učestvuje sam u antitumorskoj imunosti. Veliku ulogu u imunskom odgovoru na tumor imaju ćelije urođenog, odnosno nespecifičnog imunskog sistema koje imaju sposobnost razlikovanja tumorskih od neizmenjenih ćelija. Ćelije prirodne ubice (engl. *natural killer*, NK) su najbolje opisani medijatori urođenog imunskog odgovora na tumor. Jedna od osobina NK ćelija je sposobnost da ubiju tumorske ćelije *in vitro* bez prethodne senzitivacije, a brojne studije su pokazale da NK ćelije učestvuju u antitumorskom imunskom odgovoru. Klinička istraživanja su pokazala da prisustvo NK ćelijskih infiltrata u tumoru, pronađenih tokom biopsije, ukazuju na bolju prognozu bolesnika sa malignim tumorima (Coca i sar., 1997; Ishigami i sar., 2000; Marcus i sar., 2014).

Ćelije imunskog sistema mogu dvojako uticati na razvoj malignog tumora. S jedne strane mogu imati tumor-stimulišuću ulogu, kako u inicijalnoj fazi tako i u fazi metastaziranja, dok s druge strane imaju zaštitnu, odnosno tumor-suprimirajuću ulogu (Hagerling i sar., 2014). Veliki broj dokaza ukazuje na postojanje veze između malignih bolesti i hronične inflamacije, odnosno da hronična inflamacija koja se razvija u tumorskoj mikrosredini stimuliše pojavu imunosupresije (Umansky i Sevko, 2012).

Ćelije melanoma indukuju imunosupresiju posredstvom nekoliko mehanizama: odsustvo kostimulatornih molekula na ćelijama melanoma (Ostri-Rosenberg, 2008), smanjena ekspresija tumorskih antigena (Rivoltini i sar., 2005), MHC molekula I klase (Ferrone i Marincola, 1995), i liganada za receptore na NK ćelijama (Burke i sar., 2010), zatim intenzivna sekrecija imunosupresivnih faktora kao što su vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), transformišući faktor rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF- β), interleukin-10 (IL-10), azot-monoksid (NO) ili prostaglandini (Ostri-Rosenberg, 2008; Kusmartsev i Gabrilovich, 2006; Umansky i Sevko, 2012). Takođe, ovi mehanizmi uključuju i povećanu ekspresiju gena koji stimulišu funkciju regulatornih T-limfocita (T_{reg}) (McCarter i sar., 2007). T_{reg} ćelije na svojoj površini ekspimiraju CD4 antigen i visok nivo CD25 antigena. Takođe, T_{reg} ekspimiraju FoxP3 transkripcioni faktor koji je ključan za razvoj i funkcionalnost ovih ćelija (Fontenot i sar., 2003; Viguier i sar., 2004). U normalnim fiziološkim uslovima, T_{reg} imaju bitnu ulogu u supresiji autoimunskih reakcija indukujući toleranciju na sopstvene antigene. S druge strane, ove ćelije smanjuju intenzitet antitumorskog imunskog odgovora, što dovodi do progresije melanoma i drugih maligniteta. T_{reg} sekretuju imunosupresivne citokine i suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T-limfocita kako u mehanizmima nezavisnim od ćelijskog kontakta, tako i u zavisnim (Dieckmann i sar., 2001; Baumgartner i sar., 2007). Učestalost T_{reg} ćelija je povećana u metastatskim limfnim čvorovima melanoma u odnosu na nezahvaćene satelitske limfne čvorove i autologe mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC). T_{reg} ćelije u metastatskim limfnim čvorovima ekspimiraju FoxP3, pokazuju fenotip aktiviranih memorijskih T-limfocita i inhibiraju *in vitro* proliferaciju autologih infiltrirajućih

CD25⁺ CD4⁺ T-limfocita i CD8⁺ T-limfocita i produkciju citokina na kontakt-zavisan način (Viguier i sar., 2004).

Brojni su dokazi koji ukazuju na to da je melanom imunogeno oboljenje. Melanom stimuliše imunski sistem da pokrene humoralni, antitelima posredovani, i ćelijski, citotoksičnim limfocitima posredovani, imunski odgovor specifičan za citoplazmatske i membranske antigene melanocita (Ram i Shoenfeld, 2007; González i Torres-López, 2014). Pokazano je da kod pojedinih bolesnika može da dođe do spontane regresije melanoma. Jedna od bitnih osobina melanoma kao imunogenog tumora je prisustvo infiltrirajućih T-limfocita u melanocitnim lezijama. Vezu između inflamacije i razvoja tumora i prisustvo inflamatornih ćelija unutar tumora prvi put je pokazao nemački lekar Rudolf Virchow, u devetnaestom veku. (Virchow, 1881).

Tumor infiltrirajući T-limfociti (engl. *Tumor infiltrating lymphocytes*, TIL) imaju veoma važan efekat na kliničku sliku malignih tumora. Intenzivna limfocitna infiltracija je povezana sa dobrim kliničkim ishodom bolesnika sa različitim malignim oboljenjima, uključujući i melanom (Fridman i sar., 2012). Međutim, ovo se odnosi samo na melanom u vertikalnoj fazi rasta i limfocite koji infiltriraju tumor. Prisustvo limfocita tokom ranije, radijalne faze rasta nema prognostički značaj, kao ni ukoliko se radi o limfocitima koji se nalaze u okolini tumora (Clark i sar., 1989; Cipponi i sar., 2011). Pretpostavlja se da TIL uključuju i T-ćelije specifične za tumorske antigene, spontano aktivirane u imunskom odgovoru na rastući tumor (Gajewski i sar., 2013).

Ćelije tumora eksprimiraju sopstvene antigene koje prepoznaju ćelije imunskog sistema. Kod bolesnika sa melanomom identifikovani su brojni melanomski antigeni, kao i spontana aktivacija T-limfocita i produkcija antitela specifičnih za melanomske antigene. Tumorske ćelije i neizmenjene ćelije istog tipa eksprimiraju iste sopstvene antigene. Funkcionalni genom melanomskih ćelija skoro potpuno reflektuje gene koji se eksprimiraju u neizmenjenim melanocitima na istom nivou diferencijacije i u sličnom fiziološkom kontekstu. Antigeni prisutni kod ćelija melanoma i takođe kod neizmenjenih ćelija istog tipa (melanocita), nazivaju se diferencijacioni antigeni (Boyse i Old, 1969). U ovu grupu antigena spadaju i proteini, tj. enzimi koji učestvuju u sintezi pigmenta melanina, tirozinaza, gp100 (engl. *glycoprotein 100*), MART-1/Melan-A (engl. *melanoma antigen recognized by T cells 1*), TRP-1 (engl. *tyrosinase-related protein-1*) i TRP-2 (engl. *tyrosinase-related protein-2*). TRP-1 je

prvi melanomski autoantigen identifikovan na molekularnom nivou. Takođe, TRP-1 je i prvi diferencijacioni antigen prepoznat od strane imunskog sistema, odnosno antigen koji je izazvao imunski odgovor (Thomson i sar., 1988). IgG antitelima iz seruma bolesnika sa melanomom uspešno je izvršena imunoprecipitacija TRP-1 (Mattes i sar., 1983). Ubrzo nakon definisanja TRP-1 kao imunogenog melanomskog antigena, tirozinaza i drugi proteini membrane melanozoma identifikovani su kao nosioci epitopa koje prepoznaju T-limfociti (Ramirez-Montagut, 2003).

1.6. Tirozinaza

Ćelije metastatskog melanoma imaju sposobnost sinteze melanina, dok se stepen sinteze razlikuje kod različitih ćelijskih linija metastatskog melanoma (Kushimoto i sar., 2001; Watabe i sar., 2008; Godbole i sar., 2006; Mikami i sar., 2013). Pokazano je da je stepen sinteze melanina u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću tirozinaze u ovim ćelijama (Mikami i sar., 2013).

Peptidi tirozinaze su veoma često prezentovani na MHC (engl. *major histocompatibility complex*) molekulima melanomskih ćelija (Kang i sar., 1995; Topalian i sar., 1996). Razvoj imunoterapije se velikim delom zasniva na angažovanju citotoksičnih T-limfocita u prepoznavanju peptida tirozinaze kao imunogena (Cormier i sar., 1998; Akiyama i sar., 2004). Produkcija ovih imunogenih peptida zavisi od prisustva tirozinaze i produkata njene proteolitičke degradacije. Prezentovanje tirozinaznih peptida je zapravo aberantan fenotip melanomskih ćelija, jer tirozinaza u neizmenjenim melanocitima predstavlja stabilan enzim, lokalizovan u melanozomima, odnosno mestu sinteze melanina (Halaban i sar., 2002).

Melanom-reaktivni T-limfociti koji specifično prepoznaju tirozinazu prezentovanu kako na MHC molekulima klase I tako i na MHC molekulima klase II, izolovani su iz mononuklearnih ćelija periferne krvi kao i iz tumor infiltrirajućih limfocita. Identifikovani T-ćelijski epitopi koji prepoznaju tirozinazu prezentovanu na MHC molekulima ograničeni su na HLA-A1 (Kawakami i sar., 1998; Kittlesen i sar., 1998), HLA-A2.1 (Wölfel i sar., 1994), HLA-A24 (Kang i sar., 1995), HLA-B35

(Morel i sar., 1999), HLA-B44 (Brichard i sar., 1996), kao i HLA-DR1 (Lucchese i sar., 2005), HLA-DR4 (Topalian i sar., 1996) i HLA-DR15 (Kobayashi i sar., 1998).

Tirozinaza je visoko specifičan i senzitivan marker diferencijacije melanocita. Naročito je visoko eksprimirana u melanocitima junkcionalnih nevusa i junkcionalne zone složenih nevusa (Ordóñez, 2014). U dermalnoj komponenti složenih nevusa ekspresija tirozinaze progresivno opada prema dubljim slojevima (Jungbluth i sar., 2000). Takođe, pokazano je da se tirozinaza eksprimira u oko 90% primarnih melanoma (Orchard, 2000; Reinke i sar., 2005; Ordóñez, 2014).

Solubilna forma tirozinaze neoplastično transformisanih i neizmenjenih pigmentnih ćelija predstavlja jedan od diferencijacionih antigena koji ima sposobnost da pokrene proizvodnju autoantitela (Baharav i sar., 1996), i visoko je eksprimirana kod malignog melanoma. Takođe, tirozinaza je često eksprimirana kod metastatskog melanoma. Pojedine studije pokazuju procenat pozitivne ekspresije tirozinaze kod metastatskog melanoma u rasponu od 63% do 92% slučajeva (Orchard, 2000; Kaufmann i sar., 1998; Hofbauer i sar., 1998; Fetsch i sar., 2000; Ordóñez, 2014). Antigen-specifični citotoksični T-limfociti imaju sposobnost da specifično prepoznaju tirozinazu kao diferencijacioni antigen (Byrne i Turk, 2011; Byrne i sar., 2011; Riker i sar., 2014). Karg i saradnici su još 1990. godine pokazali da ćelije melanoma u *in vitro* kulturi otpuštaju tirozinazu u medijum (Karg i sar., 1990), a takođe je pokazano da se tirozinazna aktivnost detektuje u serumu bolesnika sa metastatskim melanomom (Sohn i sar., 1969; Nishioka i sar., 1979; Agrup i sar., 1989). Melanociti pokazuju fagocitnu aktivnost i ekspimiraju MHC molekule II klase na svojoj površini (Al Badri i sar., 1993), pa stoga predstavljaju antigen-prezentujuće ćelije (engl. *antigen presenting cell*, APC). Prisustvo anti-tirozinaznih antitela kod bolesnika sa melanomom (Bouchard i sar., 1994; Baharav i sar., 1995), kao i to da tirozinaza eksprimirana na ćelijama melanoma predstavlja antigen koga prepoznaju autologi citotoksični T-limfociti bolesnika sa melanomom (Brichard i sar., 1993), ukazuju da u patološkim stanjima imunski sistem može da reaguje specifično na tirozinazu. Naime, Brichard i saradnici su pokazali da autologi citotoksični T-limfociti dva bolesnika sa melanomom prepoznaju tirozinazu kao antigen prezentovan na HLA-A2 melanomskim ćelijama ovih bolesnika i dovode do lize melanomskih ćelija (Brichard i sar., 1993). Anti-melanocitna antitela,

odnosno antitela specifična za tirozinazu, pronađena su i u serumu bolesnika sa vitiligom (Ram i Shoenfeld, 2007).

Nekoliko poliklonskih i mišjih monoklonskih antitela, uključujući i T311, SMP360, 2A2-A4, i 3J24, koja mogu biti uspešno korišćena na formalinom fiksiranim parafinskim tkivnim uzorcima, su već komercijalno dostupna. Monoklonsko antitelo T311, proizvedeno upotrebom rekombinantne neglikozilovane tirozinaze kao imunogena, je najviše korišćeno u do sada objavljenim studijama (Ordóñez, 2014).

1.7. Povezanost i razlike imunskog odgovora kod melanoma i vitiliga

Vitiligo je oboljenje kože koje karakteriše gubitak pigmentacije kože kao rezultat destrukcije melanocita (Fishman i sar., 1993; Naughton i sar., 1983). Poznato je da enzimi mogu da se ponašaju kao autoantigeni kod različitih autoimunskih oboljenja (Tomer i sar., 1995), pa se pretpostavlja da i vitiligo zbog prisustva anti-melanocitnih antitela pripada ovoj grupi bolesti (Baharav i sar., 1996; Ram i Shoenfeld, 2007). Melanocit-reaktivni CD8 T-limfociti su brojniji u perifernoj krvi bolesnika sa progresivnim vitiligom u odnosu na zdrave osobe, sa značajnim brojem T-limfocita koji prepoznaju diferencijacione melanocitne antigene MART-1, tirozinazu i gp100 (Ogg i sar., 1998; Pittet i sar., 1999; Palermo i sar., 2001). Infiltrirajući CD8 T-limfociti u okolini kožne lezije takođe imaju sposobnost prepoznavanja melanocitnih antigena i ispoljavaju citotoksičnost prema autologim melanocitima (Wankowicz-Kalinska i sar., 2003; Webb i sar., 2014).

Bilo da su autoantitela prisutna kod bolesnika sa vitiligom uzrok ili posledica ovog oboljenja, pokazano je da imaju kapacitet da oštete pigmentne ćelije. Ista grupa istraživača je pokazala da serum bolesnika sa vitiligom može da uništi humane melanocite u *in vitro* kulturi, i to putem ćelijske citotoksičnosti zavisne od antitela (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC), i citotoksičnosti zavisne od komplementa (engl. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC) (Norris i sar., 1988). Takođe, pokazano je da prisustvo i nivo antitela specifičnih za antigene na

površini melanocita u serumu ovih bolesnika korelira sa stepenom bolesti (Merimsky i sar., 1998; Uchi i sar., 2006; Ram i Shoenfeld, 2007).

Oko 10% bolesnika sa melanomom razvija depigmentacije slične vitiligu, koje se nazivaju hipopigmentacije povezane sa melanomom (Ram i Shoenfeld, 2007). Ove hipopigmentacije posledica su snažnog anti-melanomskog imunskog odgovora koji zahvata i neizmenjene melanocite, kao rezultat ekspresije istih melanocitnih diferencijacionih antigena (Teulings i sar., 2015).

Jedan od najranijih slučajeva na osnovu koga je uspostavljena veza između vitiliga i melanoma objavljen je 1953. godine gde se radilo o bolesniku sa melanosarkomom kod koga su se razvile depigmentisane lezije (Matsuzawa i sar., 1953). Drugi slučaj objavljen 1960. godine odnosio se pojavu sistemske depigmentacije kod bolesnika sa melanomom koji je bio na radioterapiji (Karcher, 1960). Nekoliko godina kasnije, Smith i Sehlin objavili su podatak o razvoju vitiliga kod nekoliko bolesnika sa melanomom kod kojih je došlo do spontane regresije tumora (Smith i Stehlin, 1965). Ovi podaci bili su među prvima koji su ukazivali na vezu između autoimunosti i tumorske imunosti. Milton i saradnici su 1971. godine došli do zaključka da je antitumorski imunski odgovor doveo do regresije primarnog melanoma (Milton i sar., 1971). Autoantitela specifična za tirozinazu, TRP-1 i TRP-2 detektovana su u serumu bolesnika sa melanomom i bolesnika sa vitiligom (Ram i Shoenfeld, 2007). Takođe, pokazano je da autoantitela iz seruma bolesnika sa vitiligom imaju sposobnost da liziraju melanocite i ćelije melanoma *in vitro* (Naughton i sar., 1986; Byrne i Turk, 2011).

CD8 T-limfociti predstavljaju posrednike u razvoju depigmentacije povezane sa melanomom. CD8 T-limfociti izolovani iz lezija vitiliga pokazuju sposobnost da ubiju ćelije melanoma *ex vivo* (Oyarbide-Valencia i sar., 2006), dok CD8 T-limfociti izolovani iz tumora i periferne krvi bolesnika sa melanomom imaju potencijal da ubiju neizmenjene melanocite (Anichini i sar., 1993). Kod bolesnika sa melanomom koji su razvili depigmentacije pronađeni su klonotipski identični T-limfociti unutar tumora i u regiji oko depigmentisanih lezija (Becker i sar., 1999). Većinu ovih limfocita čine CD8 T-limfociti koji prepoznaju kako neizmenjene melanocite, tako i ćelije melanoma (Le Gal i sar., 2001; Byrne i Turk, 2011).

Rezultati epidemioloških studija pokazuju da bolesnici sa melanomom koji razvijaju hipopigmentacije imaju bolju prognozu preživljavanja, što ukazuje na značaj veze između tumorske imunosti i autoimunosti kod bolesnika sa melanomom. To se pre svega odnosi na bolesnike sa melanomom u III i IV stadijumu bolesti (Quaglino i sar., 2010; Teulings i sar., 2015).

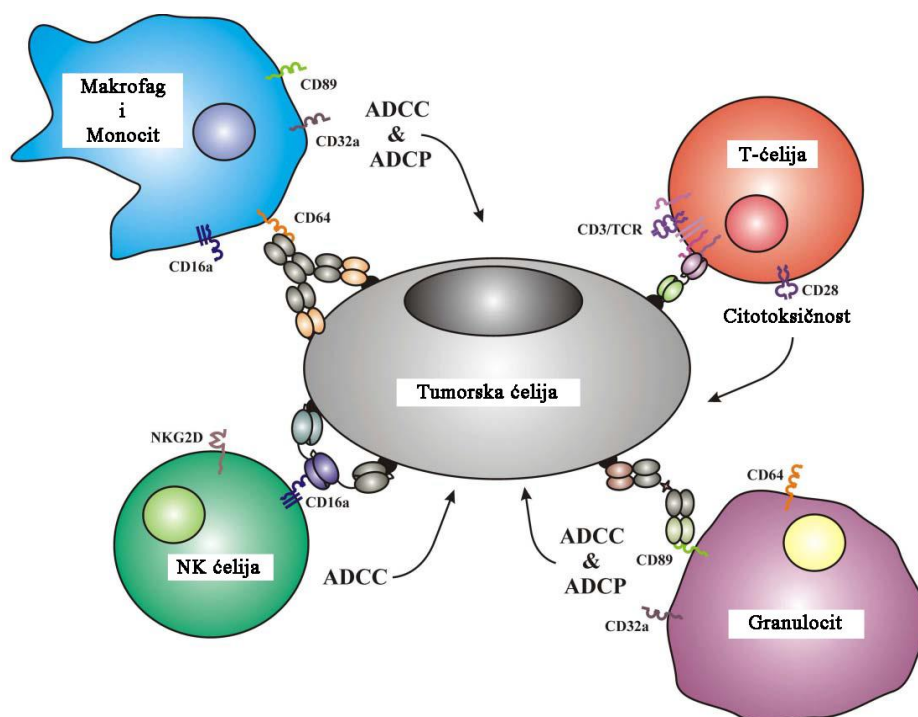
Grupa istraživača je dokazala da se autoantitela iz seruma bolesnika sa vitiligom specifično vezuju za antigene na ćelijama melanoma *in vitro* i *in vivo*. Pokazali su da izlaganje melanomskih ćelija autoantitelima iz seruma bolesnika sa vitiligom inhibira proliferaciju ćelija melanoma, i da aktivna antitela predstavljaju IgG izotip (Fishman i sar., 1993). Takođe, postoje podaci koji ukazuju da je nivo razvijenosti vitiliga povezan i sa nivoom IgA anti-melanocitnih antitela (Kemp i sar., 2007).

Merimsky i saradnici pokazali su postojanje značajno višeg nivoa anti-tirozinaznih antitela u serumu bolesnika sa vitiligom u odnosu na bolesnike sa melanomom, bolesnike sa hipopigmentacijama povezanim sa melanomom i u odnosu na zdrave osobe. Značajno niži nivo antitela kod bolesnika sa melanomom mogao bi da bude posledica nemogućnosti imunskog sistema da spontano reaguje protiv malignog tumora, dok *in vitro* tretman IgG antitelima iz seruma bolesnika sa vitiligom pokazuje značajnu inhibiciju proliferacije melanomskih ćelija i smanjenu učestalost i broj metastaza u animalnim modelima (Merimsky i sar., 1996; Merimsky i sar., 1998).

1.8. Antitumorski efektorski mehanizmi

Antitumorske efektorske funkcije posredovane antitelima podrazumevaju ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela, ćelijsku fagocitozu zavisnu od antitela (engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) (slika 1.4.) i citotoksičnost zavisnu od komplementa (López-Guillermo i Mercadal, 2007). ADCC i ADCP efekat ostvaruju se interakcijom Fc domena imunoglobulina i Fc receptora (FcR) na površini efektorskih ćelija, dok se citotoksičnost zavisna od komplementa aktivira vezivanjem Fc domena za proteine komplementa. FcR se eksprimiraju na površini membrane leukocita, epitelijalnih i endotelijalnih ćelija, i dele se u tri grupe: Fc α , Fc ϵ i Fc γ

receptori (Stein i sar., 2012). Receptori za IgG klasu antitela, Fc γ receptori (Fc γ R), imaju dominantnu ulogu u posredovanju imunskog odgovora na prisustvo antitela (Clynes i sar., 1998).



Slika 1.4. Eliminacija tumorske ćelije efektorским ćelijama. Zavisno od tipa efektorske ćelije i aktivacionog molekula, mehanizam eliminacije tumorske ćelije može biti ADCC, ADCP ili mehanizam posredovan citotoksičnim T-limfocitima (Modifikovano Stein i sar., 2012).

Fc γ receptori se dele u tri podgrupe (Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) i Fc γ RIII (CD16)), i mogu da se jave u aktivirajućoj i inhibirajućoj varijanti (Stein i sar., 2012).

Humani Fc γ RIII se javlja u dve izoforme, Fc γ RIIIA i Fc γ RIIIB, koje imaju 96% identične sekvence u svojim ekstraćelijskim imunoglobulin-vezujućim domenima (Radaev i sar., 2001). Aktivirajuća transmembranska Fc γ RIIIA izoforma, odnosno CD16, eksprimirana je na NK ćelijama, makrofagima i mastocitima i posreduje u imunskim efektorским mehanizmima ćelija, kao što su ADCC i NK aktivnost (Bulliard i sar., 2013; Nimmerjahn i Ravetch, 2006). Fc γ RIIIB izoforma prisutna je isključivo na neutrofilima, za čiju plazma membranu je vezana preko glikozil-fosfatidilinozitola (GPI). Intraćelijski domen Fc γ RIIIA se vezuje za imunoreceptorski tirozinski

aktivacioni motiv (engl. *immunoreceptor tyrosin-based activation motif*, ITAM) koji sadrži FcεRI γ-lanac ili ζ-lanac T-ćelijskog receptora za transdukciju signala, dok FcγRIIIB izoformi nedostaje signalna komponenta, i poseduje samo dva ekstraćelijska imunoglobulinu-slična domena, D1 i D2, koji su isti kao i kod FcγRIIIA izoforme (Kimberly i sar., 1990; Unkeless i sar., 1995; Radaev i sar., 2001; Sibéřil i sar., 2006). D2 domen ima direktnu ulogu u vezivanju imunoglobulina IgG, dok D1 distalni domen, lociran na NH₂ terminusu receptora, ima ulogu u stabilizaciji kompleksa FcγR/IgG ili formiranju sekundarnog vezujućeg mesta (Gavin i sar., 1998; Sibéřil i sar., 2006). FcγRIIIB ima aktivnu ulogu u mobilizaciji Ca²⁺ i degranulaciji neutrofila (Kimberly i sar., 1990; Unkeless i sar., 1995; Radaev i sar., 2001). U kombinaciji sa FcγRIIA, FcγRIIIB posreduje u procesima fagocitoze, degranulacije i oksidativnog praska kojima neutrofilu uklanjaju opsonizovane patogene (Galon i sar., 1996; Radaev i sar., 2001).

Varijante Fcγ receptora imaju različitu sposobnost vezivanja različitih IgG podtipova. IgG3 podklasa, kao i najzastupljenija serumska izoforma IgG1 vezuju se za sve podtipove receptora, dok se IgG2 podklasa antitela vezuje samo za FcγRIIA izoformu receptora (Sibéřil i sar., 2006). Sa izuzetkom FcγRI, FcγR u principu imaju nizak afinitet za vezivanje IgG antitela i nisu u stanju da vežu monomerna IgG antitela u fiziološkim uslovima. Da bi pokrenuli ćelijski odgovor i efektorske mehanizme ovi receptori moraju da vežu multimerne komplekse IgG antitela, ili IgG-opsonizovane targete. Ishod uspostavljanja interakcija IgG antitela sa FcγR zavisi od afiniteta Fc regiona da se veže za specifični FcγR i od ekspresije ovih receptora na efektorskim ćelijama. IgG-posredovan imunski odgovor će stoga zavisiti od balansa aktivacionih i inhibitornih signala sprovedenih od strane aktivacionih ili inhibitornih FcγR (Nimmerjahn i Ravetch, 2006; Bournazos i sar., 2015).

Manipulacija Fc regionima IgG monoklonskih antitela u cilju modifikovanja IgG/FcγR interakcija je glavni cilj današnjih studija sa terapijskim antitelima. Dizajnirana su antitela sa Fc varijantama sa pojačanim vezivanjem za aktivirajuću izoformu receptora, FcγRIIIA. Ove varijante takođe su pokazale pojačan FcγRIIIA-posredovan ADCC efekat (Presta i sar., 2002; Lazar i sar., 2006; Sibéřil i sar., 2006).

Ekspresija FcγRIII receptora, odnosno CD16 molekula na NK ćelijama omogućava ovim ćelijama da učestvuju u ADCC nakon regrutovanja od strane IgG

klase antitela vezanih za inficirane ćelije, odnosno tumorske ćelije (Trinchieri, 1989; Bryceon i sar., 2011). Naime, adaptivni imunski sistem dovodi do produkcije IgG antitela koja se vezuju za antigene eksprimirane na inficiranim, odnosno tumorskim ćelijama. CD16 molekul eksprimiran na NK ćelijama ima sposobnost da veže Fc region ovih IgG antitela. Kao rezultat, CD16 generiše aktivacione signale koji pokreću ADCC, odnosno NK ćelije ubijaju inficirane tj. tumorske ćelije (Abbas i sar., 2015).

NK ćelije čine približno 15% od ukupnih limfocita čoveka. Osnovne fenotipske karakteristike ovih ćelija su ekspresija CD56 molekula i odsustvo ekspresije CD3 molekula na svojoj površini (Robertson i Ritz, 1990). CD56 je izoforma neuralnog ćelijskog adhezionog molekula sa nepoznatom funkcijom na NK ćelijama (Lanier i sar., 1989). Većina NK ćelija ima nižu gustinu ekspresije CD56 (CD56^{dim}), i eksprimira visok nivo CD16, dok oko 10% NK ćelija ima visoku gustinu ekspresije CD56 (CD56^{bright}) i čini CD56^{bright}CD16^{dim} ili CD56^{bright}CD16⁻ ćelije. Ranije studije pokazale su da CD56^{dim} ćelije imaju veću citotoksičnost u odnosu na CD56^{bright}-ćelije (Lanier i sar., 1986; Cooper i sar., 2001).

CD16 molekul na NK ćelijama prepoznaje i vezuje opsonizovane (antitelima obložene) ciljne ćelije i signalizira aktiviranje ADCC mehanizma (Leibson, 1997). Većina CD56^{bright} NK ćelija (oko 50-70%) ne eksprimira CD16, dok ostatak ovih ćelija ima nisku gustinu ekspresije CD16 (CD16^{dim}). Suprotno tome, više od 95% CD56^{dim} NK ćelija su CD16^{bright} (Lanier i sar., 1986). Shodno tome CD56^{dim} ćelije pokazuju veću ADCC aktivnost u poređenju sa CD56^{bright} (Nagleri sar., 1989), tj. razlike u nivou ekspresije CD16 imaju funkcionalne posledice za ADCC mehanizam NK ćelija (Cooper i sar., 2001).

Humane NK ćelije su veoma brojne i u pre-aktiviranom stanju ne zahtevaju nikakvu dodatnu aktivaciju za ispoljavanje efektorske funkcije u procesu antitelima posredovane lize tumorskih ćelija (Stein i sar., 2012).

Fcα receptor (FcαR, CD89) je jedini receptor za IgA klasu antitela i eksprimiran je na ćelijama mijeloidne loze: monocitima, makrofagima, neutrofilima, eozinofilima (Hamre i sar., 2003; Morton i Britzaeg, 2001). Kod ljudi postoje dve subklase IgA antitela, IgA1 i IgA2, koje su različito distribuirane u sistemskom (serum) i mukoznom kompartmentu. U serumu je predominantno zastupljena IgA1 monomerna subklasa antitela, dok IgA2 dimerna ili polimerna subklasa dominira u mukoznim delovima.

IgA antitela koja se javljaju u mukozi creva predstavljaju primarne medijatore humoralnog imunskog odgovora na mukoznim površinama. Dimerizacija IgA antitela kontrolisana je malim peptidom koji se naziva J lanac (Koshli, 1985; Kerr, 1990; Otten i van Egmond, 2004). J lanac takođe omogućava vezivanje IgA za polimerni Ig receptor (pIgR) koji transportuje dimerni IgA kroz mukozne epitelne ćelije u lumen creva (Rojas i Apodaca, 2002; Norderhaug i sar., 1999). Na apikalnoj površini epitelnih ćelija dolazi do proteolitičkog odsecanja pIgR, što rezultira otpuštanjem dimernih IgA vezanih za odsečeni ektodomen pIgR-a koji se naziva sekretorna komponenta (Britzaeg i Prydz, 1984; Norderhaug i sar., 1999; Morton i Britzaeg, 2001). Ovi kompleksi dimernih, odnosno polimernih IgA antitela i sekretorne komponente nazivaju se sekretorna IgA antitela (sIgA) (Mostov, 1994; Norderhaug i sar., 1999) i predstavljaju primarne medijatore humoralnog imunskog odgovora mukoznih površina (Morton i Britzaeg, 2001).

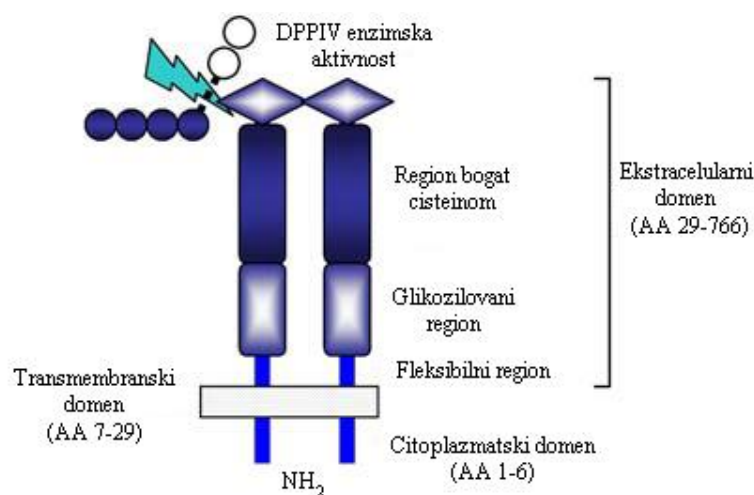
Pored jednostavnog prepoznavanja i vezivanja antigena, sposobnost različitih klasa Ig da pokrenu sekundarne efektorske funkcije, poput aktivacije komplementa, je ključna za njihovu efektivnost kao antitela. U poređenju sa IgM i IgG, IgA klasa je slab aktivator komplementa. Stoga, IgA posredovane efektorske funkcije zavise od specifičnih receptora za ovu klasu antitela, kao što je CD89 (Morton i Britzaeg, 2001).

CD89 se sastoji iz dva ekstraćelijska imunoglobulinima slična domena, transmembranskog domena i citoplazmatskog repa. Citoplazmatski region CD89 ne poseduje signalne motive, pa se zato Fc α RI vezuje za FcR γ lanac koji nosi aktivacioni motiv ITAM i na taj način omogućava prenošenje signala (Reth, 1989; Egmond i sar., 2001). CD89 ima potencijal da aktivira efektorske funkcije poput oksidativnog praska, oslobađanja citokina, fagocitoze i ADCC efekta. Serumski IgA antitela su se pokazala efikasnijim od sekretornih u inicijaciji oksidativnog praska od strane neutrofila (Stewart i sar., 1994; Van Egmond i sar., 2000), dok sekretorna IgA obezbeđuju jači stimulus za inicijaciju degranulacije eozinofila što je povezano sa ekspresijom jedinstvenog receptora za sekretornu komponentu na ovim ćelijama (Abu-Ghazaleh i sar., 1989; Lamkhioued i sar., 1995; Otten i van Egmond, 2004). Stimulacija monocita kako serumskim tako i sekretornim IgA antitelima preko CD89 dovodi do produkcije superoksida (Shen i Collins, 1989), a takođe do otpuštanja različitih citokina i inflamatornih medijatora (Morton i Britzaeg, 2001), dok neutrofili pokazuju

sposobnost fagocitoze IgA-opsonizovanih bakterija i partikula kvasaca (Gorter i sar., 1987; Weisbart i sar., 1988; Yeaman i Kerr, 1987), kao i sekrecije aktivirane kolagenaze i laktoferina (Blackburn i sar., 1995; Zhang i Lachmann, 1996; Morton i Britzaeg, 2001). CD89 se takođe smatra snažnim aktivatorom neutrofila za lizu tumorskih ćelija (Otten i sar., 2005). IgA antitela predstavljaju potencijalne kandidate za imunoterapiju malignih bolesti s obzirom da CD89 veoma efikasno pokreće ADCC efekat od strane neutrofila i monocita, odnosno makrofaga (Valerius i sar., 1997; Van Egmond i sar., 1999; Keler i sar., 2000; Otten i van Egmond, 2004). Zapravo, pokazano je da Fc α RI predstavlja najefikasniji Fc receptor na neutrofilima za inicijaciju ubijanja malignih ćelija (Huls i sar., 1999; Stockmeyer i sar., 2000; Van Egmond i sar., 2001; Otten i van Egmond, 2004).

1.9. Dipeptidil peptidaza IV

Dipeptidil peptidaza IV (DPPIV, CD26) je transmembranski glikoprotein molekulske mase 110 kD, koji se u formi dimera nalazi na površini epitelnih ćelija mnogih tkiva, endotelnih ćelija krvnih sudova, kao i na površini limfocita, monocita i makrofaga (Pro i Dang, 2004; Fox i sar., 1984; Cordero i sar., 2009). DPPIV je transmembranski glikoprotein tipa II izgrađen od 766 aminokiselina (AK), koji pripada serin proteaznoj familiji i poseduje citoplazmatski domen od 6 AK (Tanaka i sar., 1992).



Slika 1.5. Struktura CD26 (Modifikovano Ohnuma i sar., 2008)

Ekstraćelijski domen dipeptidil peptidaze IV ima serin proteaznu aktivnost koja se ogleda u odsecanju dipeptida sa aminoterminalnog kraja polipeptida koji na predzadnjem mestu nose L-prolin ili L-alanin (Hosono i sar., 2003). Supstrati za enzimsku aktivnost DPPIV su mnogobrojni hemokini, integrini i neuropeptidi, čija se biološka aktivnost menja na ovaj način, u smislu njihove aktivacije ili inaktivacije. Odsecanje dipeptida sa hemokina, od strane DPPIV, favorizuje privlačenje pomoćničkih T-limfocita i aktivaciju neutrofila i makrofaga (Boonacker i Noorden, 2003). Pored toga, DPPIV svojom enzimskom aktivnošću obeležava proteine za proteolitičku degradaciju (Cordero i sar., 2009).

CD26 je receptor za adenozin deaminazu (ADA), enzim koji ima ključnu ulogu u razvoju i funkciji limfoidnog tkiva (Kameoka i sar., 1993). ADA je enzim esencijalan za metabolizam purina, i katalizuje deaminaciju adenzina i 2'-deoksiadenozina do inozina i 2'-deoksiinozina. Ovaj enzim je eksprimiran u svim sisarskim ćelijama i lokalizovan je uglavnom u citosolu, mada je eksprimiran i na površini B- i T-limfocita. Ekspresija ADA na površini B- i T-limfocita povećana je kod aktiviranih ćelija (Boonacker i Noorden, 2003). Gubitak ovog enzima dovodi do snažne imunodeficijencije zbog osetljivosti B- i T-limfocita na adenozin i deoksiadenozin, koji inhibiraju aktivnost ovih ćelija (Pro i Dang, 2004). S druge strane, ćelije koje na svojoj površini eksprimiraju ADA i CD26 pokazuju veću otpornost na inhibiciju posredovanu adenzinom, a kompleks ADA-CD26 ima sposobnost da redukuje lokalnu koncentraciju adenzina. Stoga, ADA bi mogla da bude uključena u imunsku regulaciju zajedno sa CD26, kroz deaminaciju ekstraćelijskog adenzina (Dong i sar., 1996; Boonacker i Noorden, 2003).

CD26 predstavlja funkcionalni receptor za proteine ekstraćelijskog matriksa, kolagen i fibronektin, ima sposobnost da razgrađuje kolagen i na taj način olakša prolazak ćelija kroz ekstraćelijski matriks. Ovaj enzim je jedan od posrednika migracije limfocita tokom sazrevanja u timusu od kortikalnog regiona do medule (Savino i sar., 1993). Interakcija sa kolagenom odigrava se preko regiona DPPIV koji je bogat cisteinom i koji nema katalitičku funkciju (Löster i sar., 1995). Vezivanje fibronektina za CD26 veoma je važno za adheziju ćelija (Havre i sar., 2008).

CD26 interaguje i sa transmembranskom tirozin fosfatazom CD45, hemokinskim receptorom CXCR4, fibroblast aktivacionim proteinom - alfa (FAP- α), plazminogenom-2 (Pg2), i manoza-6-fosfat/insulinu sličan faktor rasta II receptorom (M6P/IGFIIR) (Havre i sar., 2008).

U interakciji sa CD45 tirozin fosfatazom, koja je neaktivna u formi dimera (Desai i sar., 1993), CD26 ima kostimulatornu ulogu. CD26 dovodi do povećanja aktivnosti tirozin fosfataze indukovanjem monomerizacije CD45 i stimuliše signalizaciju putem T-ćelijskog receptora (engl. *T Cell Receptor*, TCR), odnosno TCR signalizaciju (Braun i sar., 1998).

CXCR4 je receptor za jedan od supstrata CD26, pod nazivom SDF-1 α . Vezivanje SDF-1 α za CXCR4 dovodi do hemotaksije i antiviralne aktivnosti pomoćničkih T-

limfocita Th2 (engl. *T helper 2*). S obzirom da CD26 ima sposobnost da seče SDF-1 α , kompleks CXCR4-CD26 verovatno ima ulogu funkcionalne jedinice u kojoj CD26 direktno utiče na SDF-1 α indukovanu hemotaksiju i antiviralnu aktivaciju limfocita. Fizička veza CXCR4 i CD26 ukazuje na ulogu CD26 u patofiziologiji virusne infekcije. Komodulacija CXCR4 i CD26/DPPIV pomoću SDF-1 α ukazuje na to da su ADA-CD26/DPPIV i CXCR4-CD26/DPPIV kompleksi veoma važni za funkcionalnost limfocita (Herrera i sar., 2001; Boonacker i Noorden, 2003).

FAP- α je membranski protein sa dugačkim ekstraćelijskim domenom, transmembranskim segmentom i citoplazmatskim repom koji ima 48% aminokiselinske sekvence identične sa DPPIV. FAP- α je eksprimiran tokom invazije kroz ekstraćelijski matriks na površini ćelija melanoma (Monsky i sar., 1994), karcinoma dojke (Kelly i sar., 1998) i endotelnim ćelijama (Gherzi i sar., 2006). Ekspresija oba proteina na ćelijama dovodi do formiranja heterodimernog kompleksa. Formiranje kompleksa na invadopodijima migrirajućih fibroblasta neophodno je za invaziju ćelija kroz kolageni matriks. Antitela specifična za želatin-vezujući domen DPPIV redukuju ćelijsku migraciju i degradaciju kolagena (Gherzi i sar., 2002; Havre i sar., 2008).

Vezivanje Pg2 za CD26 prvi put je detektovano kod sinovijalnih fibroblasta u reumatoidnom artritisu (Gonzalez-Gronow i sar., 1994), i pokazano je da zavisi od sadržaja sijalinske kiseline određenih izoformi plazminogena. Pg 2- γ , Pg 2- δ i Pg 2- ϵ su izoforme plazminogena-2 koje mogu da se vežu za CD26, dok se Pg 2- α i Pg 2- β ne vezuju za ovaj enzim. S obzirom da je pokazano da Pg 2- ϵ kod ćelija tumora prostate indukuje ekspresiju i sekreciju matriksne metaloproteinaze-9 (Gonzalez-Gronow i sar., 2001), sposobnost CD26 da se veže za plazminogen mogla bi predstavljati jedan od faktora invazivnosti kod pojedinih malignih tumora (Havre i sar., 2008).

Interakcija CD26 sa M6P/IGFIIR ostvaruje se preko manozna-6-fosfatnih ostataka CD26, i neophodna je za DPPIV posredovanu aktivaciju i migraciju T-limfocita. Endotelne ćelije koje na svojoj površini eksprimiraju M6P/IGFIIR vezuju se za M6P na solubilnoj formi CD26 (sCD26), ukazujući da je sCD26/DPPIV uključena u migraciju T-limfocita kroz interakciju sa M6P/IGFIIR. Takođe, pojačana migracija zavisna je od DPPIV enzimske aktivnosti. Nakon aktivacije T-limfocita, pojačava se

fosforilacija manoze na CD26 i povećava se broj manoz-6-fosfatnih ostataka što dovodi do pojačanog vezivanja za M6P/IGFIR, a kao rezultat toga dolazi do internalizacije CD26 (Ikushima i sar., 2000; Havre i sar., 2008).

Solubilna forma CD26 (sCD26) nalazi se u serumu, plazmi, urinu, cerebrospinalnoj i sinovijalnoj tečnosti. U sastav sCD26 ne ulazi intraćelijski i transmembranski domen (Durinx i sar., 2000; Yu i sar., 2011). Pretpostavka je da se sCD26 procesom proteolitičkog odsecanja odvaja sa plazma membrana ćelija koje eksprimiraju CD26 i koje su u kontaktu sa krvlju, mada se smatra da su glavni izvor serumske DPPIV hepatociti i limfociti (Iwaki-Egawa i sar., 1998; Cordero i sar., 2009). Nivo CD26 u serumu je često snižen u različitim patološkim stanjima, za razliku od ozleda jetre ili stanja u kojima dolazi do obimne proliferacije limfocita. U jednoj studiji desetostruko povišen nivo CD26 u serumu prilikom regeneracije jetre nije se pokazao kao posledica povećane ekspresije DPPIV na hepatocitima (Abbott i sar., 1995). Pretpostavlja se da oštećena jetra otpušta u krvotok više CD26 koji nastaje u hepatocitima. Smatra se da se promene nivoa CD26 u serumu u drugim stanjima ogledaju u promenama otpuštenog CD26 od strane limfocita (Gorrell i sar., 2001).

Dosadašnji podaci ukazuju na tri biološke funkcije solubilne forme CD26: (1) uloga u aktivaciji, odnosno deaktivaciji određenih hemokina i inflamatornim procesima; (2) inaktivacija biološki aktivnih supstrata u krvi kao što su vaskulatorni regulatorni peptidi (Byrd i sar., 2008), faktori rasta ili hormoni (Baggio i Drucker, 2007; Drucker i Nauck, 2006); (3) uloga u procesima ćelijske adhezije tokom neoplastične transformacije posredstvom vezivanja za fibronektin, ADA ili kolagen (Cordero i sar., 2001; Herrera i sar., 2001; Hashikawa i sar., 2004; Martín i sar., 1995; Cordero i sar., 2009).

Brojne studije ukazuju na izmenjen nivo enzimske aktivnosti DPPIV u serumu kao i na izmenjenu koncentraciju solubilnog CD26 u različitim patološkim stanjima. U serumu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom pokazan je redukovan nivo sCD26, naročito u ranom stadijumu bolesti, u poređenju sa zdravim osobama (Cordero i sar., 2013; Ayude i sar., 2004; Cordero i sar., 2009).

Aktivnost DPPIV povišena je kod bolesnika sa karcinomom jetre (Kojima i sar., 1979), hepatitisom, osteoporozaom (Gotoh i sar., 1988), holestazom (Perner i sar., 1999) i drugim oboljenjima jetre (Lakatos i sar., 1999; Irieu i sar., 2003), kao i kod

bolesnika sa poremećajima ishrane kao što su anoreksija ili bulimija (Hildebrit i sar., 1999; Van West i sar., 2000). Suprotno od koncentracije proteina, povišena aktivnost DPPIV je uočena u kolorektalnom karcinomu (de la Haba-Rodríguez i sar., 2002), reumatoidnom artritisu (Küllertz i Boigk, 1986), sistemskom eritemskom lupusu i Sjogrenovom sindromu (Cuchacovich i sar., 2001; Cordero i sar., 2009). Druge studije pokazale su suprotne rezultate, tj. sniženu aktivnost DPPIV u reumatoidnom artritisu (Cuchacovich i sar., 2001), kolorektalnom karcinomu (Haacke i sar., 1986; Ayude i sar., 2004) i sistemskom eritemskom lupusu (Kobayashi i sar., 2002; Cordero i sar., 2009). Takođe nizak nivo aktivnosti DPPIV uočen je kod inflamatorne bolesti creva (Hildebrit i sar., 2001), zdravih pušača (Van Der Velden i sar., 1999), zatim trudnica (Krepela i sar., 1983), osoba sa dijabetesom tipa II (Mannucci i sar., 2005), alkoholičara i osoba koje pate od depresije (Maes i sar., 1999; Maes i sar., 1997; Maes i sar., 1996). Redukovana DPPIV aktivnost povezana je sa simptomima depresije i anksioznosti, za razliku od stanja anoreksije i bulimije (Hildebrit i sar., 1999; Van West i sar., 2000; Cordero i sar., 2009).

Nizak nivo DPPIV/sCD26 obično se registruje u bolestima koje karakteriše oslabljeni imunski sistem, uključujući pojedine hematološke i solidne malignitete, dok se povišen nivo javlja kod inflamatornih i infektivnih bolesti, nekih tipova hematoloških maligniteta i bolesti jetre (Cordero i sar., 2009).

1.10. DPPIV i imunski sistem

DPPIV ima veoma značajnu ulogu u fiziologiji humanih T-limfocita, i predstavlja diferencijacioni antigen T-limfocita. Ekspresija CD26 povećana je nakon aktivacije T-limfocita, pa stoga ovaj molekul predstavlja marker aktivacije T-limfocita, pre svega memorijskih CD4 T-limfocita. Ova populacija humanih CD4 T-limfocita je jedina koja ima sposobnost odgovora pri ponovnom „susretu“ sa antigenom, zatim koja indukuje sintezu B ćelijskih imunoglobulina (IgG) i aktivira MHC ograničene citotoksične T-limfocite (T-limfociti koji prepoznaju samo peptide prezentovane na MHC molekulima, odnosno zahtevaju prezentaciju antigena na MHC molekulima) (Morimoto et al., 1989; Dang i sar., 1990a). CD4 T-limfociti kojima nedostaje CD26

nisu sposobni da se aktiviraju i obavljaju funkcije pomoćničkih ćelija, ali imaju sposobnost da odgovore na mitogene i aloantigene. Nakon što je okarakterisan kao aktivacioni antigen T-limfocita, pokazano je da je CD26 snažno eksprimiran kako na CD4 tako i CD8 aktiviranim T-limfocitima (Morimoto et al., 1989). Pored toga, CD26 ima ulogu i u T-ćelijskoj signalnoj transdukciji kao kostimulatorni molekul (Torimoto i sar., 1991; Pro i Dang, 2004). CD26 predstavlja kostimulatorni molekul u indukciji proliferacije T-ćelija i sekrecije limfokina posredovane CD3/TCR kompleksom (Geppert i sar., 1990; Morimoto i Schlossman, 1998).

Enzimaska aktivnost DPPIV/CD26 je neophodna za CD26 posredovanu T-ćelijsku kostimulaciju. Eksperimentalno je potvrđeno da CD26⁺ Jurkat T-ćelijska maligna linija (humana T-limfocitna leukemija) pokazuje značajno veću aktivaciju u odnosu na CD26⁻ ili CD26⁺ ćelije sa CD26 molekulom mutiranim na mestu koje ima serin proteaznu aktivnost (Tanaka i sar., 1993). Takođe, potvrđeno je da CD26⁺ Jurkat-ćelije nakon stimulacije anti-CD3 i anti-CD26 antitelima proizvode više IL-2 nego mutirane odnosno CD26 deficitne Jurkat-ćelije. DPPIV aktivnost može da promeni odgovor T-ćelija na brojne spoljne stimulse, kroz CD26 i/ili CD3/TcR kompleks, da regulišu produkciju IL-2. Dakle, enzimaska aktivnost CD26 je veoma važna za povećanu ćelijsku aktivnost u odgovoru na spoljne stimulse (Ohnuma i sar., 2008).

Što se tiče NK ćelija, pokazano je da samo mali broj perifernih NK ćelija eksprimira na svojoj površini CD26. Madueño i saradnici su analizirali litički kapacitet posredovan CD16 molekulom na K562 ćelijskoj liniji hronične mijeloidne leukemije, tako što su stimulisali CD26⁺ i CD26⁻ efektorske ćelije anti-CD26 antitelima. Pokazali su da CD26⁻ ćelije pokazuju značajno slabiju CD16-zavisnu lizu u odnosu na CD26⁺ ćelije. Međutim, ovo nije bio slučaj i sa NK ćelijama, kod kojih nije bilo razlike u litičkom kapacitetu između CD26⁺ i CD26⁻ ćelija (Madueño i sar., 1993). Ipak, druga studija je pokazala da je NK ćelijska citotoksičnost smanjena kod pacova sa mutiranim CD26 (CD26 deficitni i sa redukovanom CD26 ekspresijom) ukazujući da je DPPIV aktivnost povezana sa citotoksičnošću NK ćelija (Shingu i sar., 2003; Ohnuma i sar., 2008).

Kaveolin-1 je identifikovan kao molekul na antigen prezentujućim ćelijama koji takođe vezuje CD26. CD26 na aktiviranim T-ćelijama se direktno vezuje za kaveolin-1 na monocitima i učestvuje u uspostavljanju imunološke sinapse u interakciji T-ćelija i

antigen prezentujućih ćelija. Interakcija CD26 sa kaveolinom-1 dovodi do pojačane ekspresije CD86, što rezultuje u pojačanoj interakciji CD86 i CD28 na T-ćelijama, što zatim dovodi do antigen-specifične proliferacije i aktivacije T-ćelija (Ohnuma i sar., 2004). sCD26 takođe ima sposobnost da učestvuje na ovaj način u imunskom odgovoru tj. u aktivaciji T-ćelija preko APC i CD86 zavisnoj aktivaciji APC (Ohnuma i sar., 2008).

Istraživanja ukazuju da CD26/DPPIV ima veoma bitnu ulogu u patofiziologiji imunski posredovanih i autoimunskih oboljenja, a sve je veći broj studija koji ukazuje na vezu ovog molekula sa različitim malignim oboljenjima (Hosono i sar., 2003; Cordero i sar., 2009).

1.11. Uloga DPPIV u malignim bolestima

Nivo ekspresije DPPIV/CD26 ispitivan je u mnogim uzorcima malignog tkiva u pokušaju da se ukaže na potencijalnu ulogu ovog molekula u procesima neoplastične transformacije. Dok u pojedinim malignim tumorima ekspresija CD26 pokazuje korelaciju sa manjim rizikom za progresiju tumora, u drugim je povezana sa i agresivnijim tokom bolesti i lošijom prognozom (Pro i Dang, 2004). Kod nekih malignih tumora dolazi do gubitka ekspresije CD26, dok druge tumore karakteriše značajno povišen nivo ekspresije CD26 i DPPIV enzimaska aktivnost, i to ne samo u malignom tumorskom tkivu, već i u sistemske cirkulaciji (Cordero i sar., 2009). Različita uloga DPPIV u različitim tipovima malignih tumora mogla bi da se objasni visokom multifunkcionalnošću ovog molekula (Pro i Dang, 2004).

S obzirom na sposobnost da se veže za proteine ekstraćelijskog matriksa kao što su kolagen i fibronektin, CD26 bi mogao imati ulogu u procesima migracije i metastaziranju malignih ćelija (Dang i sar., 1990b; Loster i sar., 1995; Cordero i sar., 2009). Cheng i saradnici pokazali su da vezivanje CD26 za fibronektin ima ulogu u metastaziranju tumora dojke u pluća. CD26 koji se nalazi na površini endotelijalnih ćelija pluća interaguje sa fibronektinom, ekspimiranim na površini metastatskih ćelija. Vezivanje cirkulišućih tumorskih ćelija za endotelne ćelije preko adhezivnih molekula smatra se odgovornim za organ-specifično metastaziranje (Cheng i sar., 1998). CD26,

takođe prisutan na invadopodijima, zajedno sa ektopeptidazama i metaloproteinazama može učestvovati u malignoj transformaciji i progresiji tumora posredstvom vezivanja za kolagen i fibronektin (Chen i Kelly, 2003; Werb, 1997; Cordero i sar., 2009).

Interakcija CD26 sa ADA pokazuje bitnu ulogu u tumorigenezi, u smislu da kompleks CD26-ADA može učestvovati u kontaktu dve ćelije (Pacheco i sar., 2005), ili posredstvom katalize adenzina do inozina. Proliferišuće ćelije akumuliraju visoku ekstraćelijsku koncentraciju adenzina koji može biti toksičan ili imati uticaj na proliferativni potencijal ćelija, u zavisnosti od ekspresije i tipa adenzinskog receptora, AR. Stoga, različit nivo kompleksa na površini ćelija i ekspresije AR na površini tumorskih ćelija može dovesti do nastanka novih klonova tumorskih ćelija ili adenzin-posredovane inhibicije antitumorskog imunskog odgovora (Sedo i sar., 2008; Hashikawa i sar., 2004; Hoskin i sar., 2008; Cordero i sar., 2009).

CD26/DPPIV je visoko ekspimiran na neizmenjenim melanocitima, ali ne i na ćelijama melanoma (Houghton i sar., 1988). Tokom neoplastične transformacije melanocita, kada ćelije postaju nezavisne od egzogenih faktora rasta, dolazi do gubitka CD26 (Albino i sar., 1992; Morrison i sar., 1993). Tetraciklinima indukovana ekspresija CD26 u ćelijama melanoma čoveka koje su transfektovane sa genom *CD26*, indukuje promenu fenotipa maligne ćelije u nemaligni fenotip. Reekspresija CD26 dovodi do inhibicije razvoja malignog tumora, odnosno do inhibicije tumorigeneze, i nekontrolisanog rasta ćelija. Podaci ukazuju da melanomske ćelije MEL-22a ćelijske linije imaju blokadu u diferencijaciji koja je povezana sa fenotipom nepigmentisanih, nezrelih melanocita (Houghton i sar., 1987). Diferencijaciju melanocitnih ćelija pored pojave pigmentacije karakteriše i ekspresija melanozomalnih membranskih glikoproteina uključenih u metabolizam melanina, kao što su tirozinaza i TRP. Ekspresija DPPIV, ali ne i ekspresija mutirane forme DPPIV, korelira sa povećanom ekspresijom humane tirozinaze. Dakle, reekspresija CD26 dovodi do prekida blokade diferencijiranja kod melanomskih ćelija. Takođe, ponovna ekspresija DPPIV dovodi i do uspostavljanja ponovne zavisnosti od spoljašnjih faktora rasta neophodnih za preživljavanje ćelije. Procesi supresije razvoja tumora i ukidanje blokade u diferencijaciji pokazali su se zavisni od DPPIV aktivnosti (Wesley i sar., 1999). Pojedine studije na ćelijama melanoma koje su ekspimirale mutirani CD26 kome je nedostajala ekstraćelijska serin proteazna aktivnost ili citoplazmatski deo proteina

pokazale su da ni enzimski aktivnost ni citoplazmatski deo DPPIV nisu neophodni za smanjenje metastatskog potencijala (Pethiyagoda i sar., 2000). Takođe, zavisnost od egzogenih faktora rasta nije se pokazala kao povezana sa DPPIV enzimskom aktivnošću (Wesley i sar., 1999). Smanjena ekspresija CD26, odnosno DPPIV, izgleda ima važnu ulogu u ranom razvoju melanoma. S obzirom da CD26 ima sposobnost da inaktivira cirkulišući oslobađajući faktor za hormon rasta (engl. *growth hormone-releasing factor*, GHRF) (Frohman i sar., 1989), smanjena ekspresija CD26 može olakšati rast tumora prolongirajući prisustvo GHRF u cirkulaciji, što za rezultat ima viši nivo hormona rasta (Boonacker i Noorden, 2003).

Gubitak ili smanjenje DPPIV aktivnosti pokazano je i kod hepatocelularnog karcinoma, kao i promena u distribuciji ovog enzima u odnosu na distribuciju u neizmenjenim ćelijama jetre (Stecca i sar., 1997).

DPPIV ima važnu ulogu i u supresiji rasta i progresiji nesitnoćelijskog karcinoma pluća (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC). U odnosu na neizmenjene ćelije, DPPIV pokazuje smanjenu ekspresiju i enzimsku aktivnost u ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća (Wesley i sar., 2004).

Rezultati nekoliko studija ukazuju na regulatornu ulogu DPPIV u razvoju i progresiji karcinoma ovarijuma. U različitim ćelijskim linijama karcinoma ovarijuma pokazani su različiti nivoi ekspresije DPPIV. Odnosno, ekspresija ovog enzima je u negativnoj korelaciji sa invazivnim potencijalom. Transfekcija DPPIV ćelijske linije karcinoma ovarijuma dovodi do redukovanja invazivnosti i migracije, kao i do smanjenja intraperitonealne diseminacije i produženog preživljavanja *in vivo* (Kajiyama i sar., 2002).

Ekspresija DPPIV pokazala je korelaciju i sa ekspresijom E-kadherina i tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza. E-kadherin je transmembranski glikoprotein koji ima važnu ulogu u interakciji ćelija. Povećana ekspresija DPPIV dovodi do povećane ekspresije E-kadherina i tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza što rezultira smanjenim metastatskim potencijalom (Kajiyama i sar., 2003).

Istraživanja su pokazala da je DPPIV uključena i u neoplastičnu transformaciju i progresiju endometrijalnog karcinoma. DPPIV se eksprimira u neizmenjenom endometriju, kako u proliferativnoj, tako i u sekretornoj fazi. U adenokarcinomu

endometrijuma ekspresija DPPIV je jaka ili umerena u gradusu 1, a slaba ili negativna u gradusu 2 i 3. (Khin i sar., 2003).

CD26 ima važnu ulogu u razvoju i progresiji hematoloških maligniteta. Visok nivo CD26 eksprimiran je na ćelijama B-limfocitne leukemije, suprotno od neizmenjenih B ćelija. Takođe, ekspresija CD26 na ćelijama T-ćelijskih neoplazmi korelira sa lošijom prognozom. Povećan nivo ekspresije CD26 je većinom pokazan u agresivnim tipovima non-Hoćkinovog limfoma, kao što su T-limfoblastni limfom (LBL), T akutna limfoblastna leukemija (ALL) i T-ćelijski CD30⁺ anaplastični „*large cell*“ (ALC) limfom (Carbone i sar., 1994, 1995). Nivo ekspresije CD26 je povezan i sa agresivnijim kliničkim ishodom T-ćelijske „*large granular*“ limfocitne leukemije (T-LGLL) (Dang et al., 2003), dok je kod pojedinih drugih T-ćelijskih limfoma CD26 odsutan ili slabo eksprimiran (Pro i Dang, 2004). S obzirom na ulogu CD26 u biologiji T-ćelija i T-ćelijskih maligniteta, CD26 bi mogao da predstavlja novi ciljni molekul u terapiji ovih malignih bolesti.

Brojna klinička istraživanja vezana za aktivnost imunskog sistema pokazala su da imunski sistem prirodno ima sposobnost da učestvuje u kontroli melanoma, odnosno ima sposobnost da se spontano aktivira u slučaju ove bolesti (Faries i Morton, 2003). Stoga pronalaženje novih imunoterapijskih pristupa predstavlja veoma važan aspekt u istraživanju melanoma u smislu omogućavanja manipulacije imunskim sistemom koje bi doprinelo pojačanju imunskog odgovora bolesnika sa melanomom (Faries i Morton, 2003; Maio, 2012). Antigeni povezani sa tumorom (engl. *tumor associated antigen*, TAA) prepoznati od strane autologih antitela i T-limfocita, sposobni da indukuju anti-tumorski imunski odgovor, identifikovani su kod melanoma pre nego kod ostalih tipova tumora (Houghton i sar., 2001; Boon i van der Bruggen, 1996; Maio, 2012). Svi antigeni povezani sa tumorom odnosno antigeni povezani sa melanomom su potencijalni kandidati za razvoj imunoterapijskih pristupa kontrole melanoma (Maio, 2012). Prisustvo antitela specifičnih za melanomske antigene u serumu bolesnika sa melanomom takođe potvrđuje važnost ovih antigena za antitumorski imunski odgovor, kao i njihovu moguću ulogu u imunoterapiji melanoma. Ispitivanje prisustva i nivoa pojedinačnih klasa antitela specifičnih za melanomske antigene prisutnih u serumu bolesnika sa melanomom, kao i analiza ekspresije Fc receptora za određene klase antitela na subpopulacijama leukocita ovih

bolesnika, doprinelo bi definisanju značaja anti-melanomskih antitela u antitumorskom imunskom odgovoru, odnosno određenim efektorskim mehanizmima.

Za procenu stanja bolesnika obolelih od različitih tipova malignih bolesti pokazalo se da je veoma bitna analiza ekspresije CD26, kao i analiza enzimske aktivnosti ovog proteina. DPPIV reguliše različite biološke mehanizme koji kontrolišu funkcije povezane sa procesom neoplastične transformacije, kao što su ćelijska proliferacija, diferencijacija, migracija, adhezija i preživljavanje (Arscott i sar., 2009). Eksperimentalno je pokazano da anti-CD26 monoklonska antitela poseduju antitumorsku aktivnost (Ho i sar., 2001), kao i da je enzimska aktivnost DPPIV važna za određivanje osetljivosti neoplastičnih ćelija na citotoksične agense (Sato i Dang, 2003). Povećana ili smanjena ekspresija i enzimska aktivnost CD26/DPPIV pokazala se kao tkivno specifična, pa čak i specifična za određene ćelijske tipove u različitim malignitetima (Iwata i Morimoto, 1999).

Podatak da neizmenjeni melanociti visoko ekspimiraju CD26, dok se tokom transformacije melanocita ekspresija ovog molekula, kao i njegova enzimska aktivnost smanjuju upravo ukazuje na moguću bitnu ulogu CD26 u kontroli melanoma. Pretpostavka je da CD26 degraduje autokrine faktore rasta i na taj način reguliše, odnosno suprimira rast neizmenjenih melanocita (Houghton i sar., 1988; Albino i sar., 1992; Morrison i sar., 1993; Iwata i Morimoto, 1999).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu literaturnih saznanja postavljena je radna hipoteza da:

1. Određivanje koncentracije imunoglobulina specifičnih za melanomske antigene, melanin i tirozinazu, IgM, IgG i IgA klase kod bolesnika sa melanomom je od važnosti za rasvetljavanje značaja humoralnog imunskog odgovora u patogenezi melanoma.

Razlike u nivoima ovih antitela između bolesnika sa melanomom bez metastaza i bolesnika sa melanomom sa metastazama mogu da ukažu na njihov značaj za klinički tok i ishod ovog imunogenog malignog oboljenja. Dobijeni podaci bi mogli da doprinesu razvoju boljih imunoterapijskih pristupa u lečenju melanoma. Određivanje specifičnih subpopulacija leukocita kod bolesnika sa melanomom, kao i određivanje ekspresije receptora za određene klase antitela na efektorskim ćelijama dodatno bi doprinelo karakterizaciji antitumorskog imunskog odgovora bolesnika sa melanomom.

2. Određivanje enzimske aktivnosti DPPIV u serumu i nivoa ekspresije CD26 na limfocitima bolesnika sa melanomom će ukazati na ulogu ovog proteina u patogenezi i progresiji melanoma. Promene enzimske aktivnosti DPPIV i ekspresije CD26 na limfocitima kod bolesnika sa melanomom mogu da imaju klinički značaj kao potencijalni dijagnostički markeri.

Za proveru postavljene radne hipoteze postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Odrediti nivo IgG, IgA i IgM klase antitela specifičnih za melanin i tirozinazu u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, kao i serumu bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.
2. Odrediti procenat limfocita koji na svojoj površini ekspimiraju FcγRIIIA, odnosno CD16, procenat limfocita koji na svojoj površini

ekspimiraju CD56, kao i procenat limfocita koji ekspimiraju i CD16 i CD56, kod navedenih grupa ispitanika.

3. Odrediti procenat granulocita koji ekspimiraju Fc α RI, odnosno CD89, kod navedenih grupa ispitanika.
4. Ispitati povezanost nivoa antitela specifičnih za melanin i tirozinazu i CD16/CD89⁺ ćelija u grupi bolesnika sa melanomom.
5. Odrediti enzimsku aktivnost dipeptidil peptidaze IV u serumu, procenat CD26⁺ limfocita i ekspresiju CD26 antigena na limfocitima kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Selekcija bolesnika

U ovo istraživanje bilo je uključeno 90 bolesnika sa patohistološki potvrđenom dijagnozom melanoma, koji u trenutku uzimanja bioloških uzoraka nisu primali nikakvu vrstu onkološke terapije. Svi bolesnici lečeni su na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Od 90 bolesnika, 30 bolesnika nije imalo razvijene metastaze, dok je 60 bolesnika imalo metastaze u trenutku uzimanja uzorka. Starost bolesnika bila je u intervalu od 23 do 86 godina, a prosečna starost iznosila je 54,83 godine.

Pre učešća u studiji bolesnici su pročitali "Informaciju za bolesnike" i potpisali „Obrazac pisane saglasnosti bolesnika“. Istraživanje je prethodno odobreno od strane Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Drugu grupu bolesnika koja je učestvovala u istraživanju činilo je 40 bolesnika sa kliničkom dijagnozom vitiliga lečenih u Kliničkom centru Srbije, na Klinici za dermatovenerologiju. Starost bolesnika sa vitiligom bila je u intervalu od 18 do 70 godina, a prosečna starost iznosila je 44,77 godine. Ovi bolesnici su pre učešća u istraživanju pročitali "Informaciju za bolesnike" i potpisali „Obrazac pisane saglasnosti bolesnika“. Istraživanje na ovoj grupi bolesnika odobreno je od Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije.

U istraživanje je bilo uključeno i 74 zdravih osoba, bez kliničkih znakova melanoma i/ili vitiliga, koje su činile kontrolnu grupu. Starost indivuda koji su činili kontrolnu grupu bila je u intervalu od 24 do 74 godine, a prosečna starost iznosila je 38,1 godinu. Zdave osobe su pre uključivanja u istraživanje pročitali "Informaciju za dobrovoljne davaoce krvi" i potpisali „Obrazac pisane saglasnosti dobrovoljnog davaoca krvi“.

Uzorci pune periferne krvi prikupljeni su od 90 bolesnika sa kliničkom dijagnozom melanoma. Uzorci su prikupljeni i od bolesnika sa vitiligom i zdravih individua.

Prilikom uzimanja uzoraka, bolesnicima kao i zdravim osobama uzeto je 10 ml pune periferne krvi, i 10 ml krvi sa heparinom (antikoagulans).

3.2. Prikupljanje kliničkih podataka

Dijagnostika melanoma sprovedena je prema standardnom kliničkom protokolu, od strane kliničkog lekara. Standardni protokol uključuje klinički pregled, ekscizionu biopsiju i patohistološku analizu lezije kože, i pregled i biopsiju regionalnih limfnih čvorova. Klinički pregled lezije kože, odnosno melanoma, podrazumeva pregled okom ili pregled lupom, prilikom čega se primenjuje ABCDE pravilo. Nakon hirurške intervencije i na osnovu patohistoloških nalaza, po potrebi su vršeni radiološki pregledi. Na osnovu histopatološke analize određivan je tip lezije, dok je klinički stadijum melanoma utvrđivan prema TNM sistemu.

Prilikom formiranja grupe bolesnika sa melanomom koji su uključivani u istraživanje prikupljeni su sledeći podaci: starost, precizno postavljena dijagnoza, prisustvo metastaza u trenutku uzimanja uzorka, pojava recidiva, kasnija pojava metastaza, period do ponovne pojave bolesti, odluke o daljem lečenju, prisustvo drugih oboljenja, kao i stanje poslednje kontrole. Kriterijumi za uključivanje bolesnika sa melanomom u istraživanje bili su da su bolesnici stariji od 18 godina; da je bolesnicima postavljena dijagnoza melanoma; da do trenutka uzimanja uzorka nisu primali onkološku terapiju; da bolesnicima nije postavljena dijagnoza nekog drugog oboljenja koje bi uticalo na ishod istraživanja.

Grupa bolesnika sa vitiligom formirana je na osnovu kliničkog pregleda dermatovenerologa. Prikupljeni podaci bolesnika podrazumevali su: starost i pol bolesnika, precizno postavljenu dijagnozu, kao i prisustvo pridruženih oboljenja. Bolesnici nisu klasifikovani na osnovu tipa oboljenja, u smislu da li se radilo o difuznom ili lokalizovanom tipu vitiliga. Svi bolesnici sa vitiligom uključeni u studiju bili su stariji od 18 godina.

3.3. Izolovanje seruma

Krv bez dodatka heparina u sterilnoj epruveti stajala je do 30 min na sobnoj temperaturi da bi se napravio koagulum, a zatim se centrifugirala 10 min na 2000 rpm. Nakon centrifugiranja izdvajan je serum, koji je, potom, u zapreminama od 200 μ l izdvajan u eppendorf epruvete, u kojima je na -20°C bio zamrznut do upotrebe.

3.4. ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

U ovom istraživanju, određivanje koncentracije antitela specifičnih za melanomske antigene (melanin i tirozinazu) IgA, IgG i IgM klase u serumu, vršeno je ELISA testom (Merimsky i sar., 1996; Besu i sar., 2009). Polistirenske mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (F96 MaxiSorp Thermo Scientific™ Nunc™, Danska) oblagane su sintetičkim melaninom finalne koncentracije 50 $\mu\text{g/ml}$ bikarbonatnog pufera, odnosno tirozinazom iz pečuraka (Sigma Aldrich Sent Luis, Misuri, Sjedinjene Američke Države) (Merimsky i sar., 1996) finalne koncentracije 20 $\mu\text{l/ml}$ bikarbonatnog pufera i inkubirane tokom noći na 4°C . Sledećeg dana ploče sa antigenom su isprane 3 puta u rastvoru PBS-a (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) sa 0,05% Tween 20 deterdžentom. Zatim je u bunariće dodavano po 200 μl 1% BSA (goveđi serumski albumin, engl. *bovine serum albumin*, BSA) u TTBS puferu (smeša Tween 20 i Tris-Buffered Saline, TBS) u svojstvu bloker za blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja. Ploče sa nalivenim blokerom inkubirane su sat vremena, isprane su 3 puta, a zatim su sipani uzorci seruma. Svaki uzorak seruma (primarno antitelo) razblažen je u 1% BSA u TTBS-u u odnosu 1:100. Razblaženi uzorci seruma sipani su u duplikatu u količini od po 50 μl , nakon čega je sledila inkubacija. Nakon sat vremena inkubacije ploča sa nalivenim uzorcima, antitela u serumu vezana za antigene detektovana su pomoću sekundarnih anti-humanih ovčijih antitela, konjugovanih sa peroksidazom rena. Nakon inkubacije uzoraka, ploče su isprane 3 puta i zatim su sekundarna IgG, IgA i IgM antitela dodavana u količini po 50 μl po bunariću, nakon

čega je sledila inkubacija od još sat vremena. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima ploče su ispirane 5 puta, a zatim je u bunariće dodavano po 100 µl rastvora boje; kao supstrat za detekciju korišćen je tetrametilbenzidin. Reakcija je prekidana dodavanjem 50 µl 2M sumporne kiseline. Apsorbancija je očitavana na talasnoj dužini od 450 nm na čitaču Multiskan EX Thermo LabSystems u roku od 15 minuta.

Nivoi IgG, IgA i IgM antitela specifičnih za melanin, odnosno tirozinazu, predstavljeni su u arbitrarnim jedinicama AU/ml. Za kalibraciju su korišćeni humani serumi sa najvišim nivoom anti-melaninskih, odnosno anti-tirozinaznih IgG, IgA i IgM antitela. Referentne, odnosno *cut-off* vrednosti za definisanje povišenih, odnosno sniženih nivoa antitela dobijene su na osnovu analize seruma 52 zdrave kontrole u slučaju anti-melaninskih i 46 zdravih kontrola u slučaju anti-tirozinaznih antitela. Predstavljene su kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($X_{av} \pm SD$), pre čega su iz referentnih vrednosti izbačene kontrole čija je koncentracija imunoglobulina prelazila granicu od $X_{av} + 2,5SD$. Referentne vrednosti za nivoe antitela specifičnih za melanin i tirozinazu predstavljene su u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Referentne vrednosti za nivoe antitela specifičnih za melanin i tirozinazu

Referentne vrednosti (AU/mL)			
Antigen	Nivo IgG antitela	Nivo IgA antitela	Nivo IgM antitela
Melanin	2,21 – 69,58	4,37 – 78,57	13,80 – 98,98
Tirozinaza	20,19 – 148,59	6,89 – 17,88	17,06 – 80,00

3.5. Analiza protočnom citometrijom

Određivanje nivoa ekspresije CD16, CD56 i CD26 antigena na površini membrane limfocita, kao i CD89 antigena na površini membrane granulocita rađena je iz uzoraka pune krvi primenom fluorescentno obeleženih monoklonskih antitela. Monoklonsko antitelo specifično za CD56 bilo je obeleženo fluorescein izotiocijanatom (FITC), dok su monoklonska antitela specifična za CD16, CD89 i CD26 bila obeležena fikoeritriinom (PE). Sva pomenuta antitela bila su proizvod kompanije Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA.

U dve epruvete za citometar sipano je po 2,5 μ L monoklonskih antitela - CD89PE, odnosno CD26PE, u koje je potom dodato po 50 μ L pune krvi. U treću epruvetu pre dodavanja monoklonskih antitela CD16PE i CD56FITC, sipano je 50 μ L pune krvi, i uzorak je ispran. U četvrtu epruvetu dodato je po 2,5 μ L monoklonskih antitela IgG1PE i IgG1FITC (izotipske kontrole), a zatim je dodato 50 μ L pune krvi. Svi uzorci su potom inkubirani 15 min u mraku, a zatim je dodato 800 μ L rastvora za liziranje (*FACS Lysing solution*, BD Biosciences). Nakon ponovne inkubacije u mraku u trajanju od 10 min uzorci su centrifugirani 5 min na 1600 rpm. Uzorci su zatim isprani dva puta *cell wash*-om i na kraju je dodato po 200 μ L *cell fix* rastvora za fiksaciju (*CellFIX*, BD Biosciences).

Ekspresija CD16, CD56, i CD26 antigena na limfocitima i CD89 antigena na granulocitima određena je primenom FACSCalibur protočnog citometra (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Iz svakog uzorka je prikupljeno 10000 ćelija periferne krvi, odnosno leukocita, a prikupljeni podaci su analizirani CELLQuest softverom (BD Biosciences). Referentne vrednosti za procenat CD16⁺, CD56⁺, CD26⁺ limfocita i CD89⁺ granulocita u populaciji ukupnih leukocita (*total*, t) i u populaciji limfocita, odnosno granulocita (*gated*, g), i referentne vrednosti procenta ukupnih limfocita, ukupnih granulocita i srednjeg intenziteta fluorescencije ekspresije CD26 na površini limfocita (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI) predstavljene su u tabelama 3.2. i 3.3. Referentne vrednosti određene su kao $X_{av} \pm SD$, na osnovu rezultata analize zdravih osoba.

Tabela 3.2. Referentne vrednosti za učestalost CD16⁺, CD56⁺, CD26⁺ limfocita i CD89⁺ granulocita

	Referentne vrednosti				
	% CD16 ⁺ limfocita	% CD56 ⁺ limfocita	% CD16 ⁺ CD56 ⁺ limfocita	% CD26 ⁺ limfocita	% CD89 ⁺ granulocita
total, (t)	1,48 – 4,37	0,26 – 4,81	0,34 – 3,28	6,00 – 16,52	54,37 – 76,23
gated, (g)	11,87 – 26,28	6,43 – 23,58	4,44 – 17,31	38,48 – 62,17	97,40 – 100,00

Tabela 3.3. Referentne vrednosti za učestalost limfocita i granulocita, i MFI CD26

Referentne vrednosti		
% limfocita	% granulocita	Srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26
11,86 – 28,92	58,27 – 79,53	139,59 – 417,23

3.6. Određivanje aktivnosti DPPIV u serumu

Za određivanje enzimske aktivnosti DPPIV u serumu bolesnika i zdravih kontrola korišćena je direktna fotometrijska metoda koja je u izvesnoj meri modifikovana (Jarmolowska i sar., 2007). U mikrotitarske ploče sa 96 bunarića, u uzorke seruma, kao i u njihove blankove, dodato je 50 µL 0.3 M glicin/NaOH pufera (pH 8.7), 20 µL 1.5 mM Gly-Pro-p-nitroanilid p-toluensulfonata (supstrat DPPIV, Sigma G2901) i 50 µL destilovane vode. Standardni uzorci su sadržali 20 µL 1.5 mM p-nitroanilina – produkt enzimske reakcije DPPIV (Sigma N2128) umesto supstrata, a njihovi blankovi su sadržali 20 µL destilovane vode. Nakon 30 min inkubacije na 37°C, u blankove serumskih uzoraka dodato je 50 µL ohlađenog (4°C) 1M acetatnog pufera (pH 4.2), kako bi se sprečila enzimska reakcija. Potom je dodato 10 µL seruma u uzorke i odgovarajuće blankove. U uzorke standarda i blankove standarda dodato je 10 µL destilovane vode umesto seruma. Uzorci su potom inkubirani 30 min na 37°C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µL ohlađenog 1M acetatnog pufera (pH 4.2) u uzorcima koji su sadržali serum.

Apsorbancija (A) je merena na talasnoj dužini od 405 nm. Aktivnost DPPIV u serumu računata je prema formuli:

$$\text{Enzimska aktivnost} = \frac{(A \text{ uzorka} - A \text{ blanka uzorka})}{(A \text{ standarda} - A \text{ blanka standarda})} * 100$$

Enzimska aktivnost: IU/L= 1 µM/min/L seruma.

Svi eksperimenti rađeni su u triplikatu.

Referentne vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu određene su kao $\bar{X} \pm SD$, na osnovu rezultata analize zdravih osoba, i prikazane su u tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Referentne vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu

Referentne vrednosti	
DPPIV aktivnost [IU/L]	20,03 – 34,03

3.7. Statistička obrada rezultata

Prilikom statističke obrade podataka za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost $\alpha=0.05$, dok je u slučaju višestrukog testiranja nad istim setom podataka, korišćena Bonferoni korekcija (engl. *Bonferroni correction*) α -vrednosti ($\alpha_1=0.05/3=0.0167$; $\alpha_2=0.05/6=0.0083$).

Za testiranje razlika između grupa, a u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara, korišćeni su: Pirsonov χ^2 test (engl. *Pearson χ^2 test*); Kruskal Valisov test (engl. *Kruskal Wallis test*); Vilkoksonov test sume rangova (engl. *Wilcoxon rank sum test*) i Vilkoksonov test sume rangova sa korekcijom kontinuiteta (engl. *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*).

Za ispitivanje linearne povezanosti parametara od značaja korišćen je Spirmanov test korelacije rangova, a za model njihove veze korišćena je linearna regresija.

Ispitivanje dijagnostičkog potencijala inicijalnih vrednosti ispitivanih parametara za dihotomni ishod (0-zdravi; 1-melanom) korišćena je metodologija ROC krive (engl. *receiver-operating-characteristic curve*):

- Za određivanje površine ispod ROC krive i odgovarajuće 95% intervale poverenja (95%CI) korišćen je DeLong metod.
- Za testiranje značajnosti diskriminacionog potencijala (AUC ROC) parametara od značaja za dihotomni ishod (0-zdravi; 1-melanom), korišćena je logistička regresiona analiza i test odnosa verovatnoća (engl. *Likelihood Ratio test*).

-
-
- Za najbolju graničnu vrednost parametara sa značajnim dijagnostičkim potencijalom izabrana je vrednost za koju je postignuta maksimalna senzitivnost i specifičnost.

Ovim testiranjem dobijena je dodatna potvrda prethodno urađenih statističkih analiza. Dijagnostičku tačnost određuje površina ispod ROC krive (engl. *area under an ROC*, AUC), koja je uvek $\geq 0,5$, a vrednosti se kreću od 0,5 do 1,0. AUC pokazuje koliko je ROC kriva zapravo blizu najboljoj mogućnosti, a to je $AUC = 1,0$. AUC predstavlja verovatnoću da će nasumično izabrani bolesnik sa melanomom imati višu ili nižu (zavisno od toga da li bolesnici inače imaju više ili niže vrednosti od kontrola) vrednost datog parametra nego nasumično izabrana kontrola. Potom je statistički potvrđeno da li se AUC značajno razlikuje od 0,5 ili ne.

Granične vrednosti dobijene analizom ROC krive pokazuju najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti. Za razliku od određivanja referentnih vrednosti koje se statistički dobijaju samo na osnovu analize zdravih osoba, ROC krive se baziraju na odnosu zdravih i bolesnih.

Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 3.1.1 (2014-07-10) "Sock it to Me" Copyright (C) 2014 The R Foundation for Statistical Computing Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit) (preuzeto: 22.10.2014.) Za grafički prikaz podataka korišćen je Microsoft Office Excel 2010 i GraphPad Prism5.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje nivoa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase u serumu bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

4.1.1. Određivanje nivoa anti-melaninskih antitela IgG, IgA i IgM klase u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Serumski nivoi antitela specifičnih za melanin IgG, IgA i IgM klase određivani su kod 89 bolesnika sa melanomom, od kojih je 30 bolesnika inicijalno bilo bez metastaza, a 59 sa metastazama, 40 bolesnika sa vitiligom, i 52 zdrave osobe.

Rezultati ispitivanja u odnosu na grupe ispitanika predstavljeni su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Nivoi anti-melaninskih IgG, IgA i IgM antitela kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	Nivo anti-melaninskih IgG antitela (AU/ml)	Nivo anti-melaninskih IgA antitela (AU/ml)	Nivo anti-melaninskih IgM antitela (AU/ml)
Bolesnici sa melanomom	89	55,64 ± 45,42	79,06 ± 106,59	41,78 ± 47,88**
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	30	76,71 ± 51,88*	88,62 ± 119,39	39,92 ± 33,68
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	59	44,93 ± 37,92	74,2 ± 100,2	42,72 ± 53,93
Bolesnici sa vitiligom	40	62,09 ± 106,47	51,95 ± 64,36	62,09 ± 53,29
Zdrave osobe	52	37,82 ± 36,13	46,28 ± 50,49	58,86 ± 45,79

* $p = 0.002$ u odnosu na bolesnike sa melanomom sa metastazama, $p = 0.008$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0.0002$ u odnosu na zdrave osobe

** $p = 0.013$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe

N – broj bolesnika ili zdravih osoba

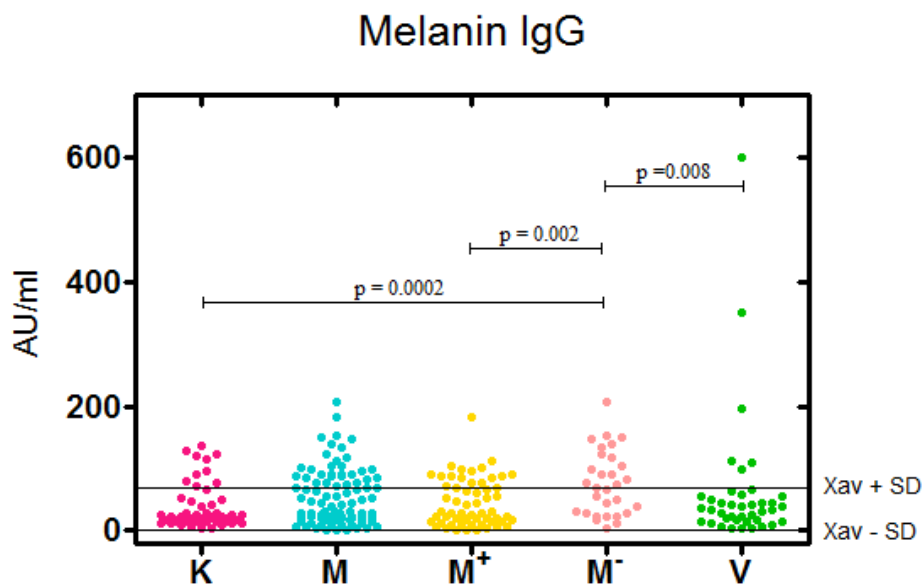
Nivo anti-melaninskih IgG antitela u serumu bolesnika sa melanomom bez metastaza je bio statistički značajno viši u odnosu na nivo anti-melaninskih IgG antitela u serumu bolesnika sa melanomom sa metastazama, kao i u odnosu na nivo antitela u serumu bolesnika sa vitiligom i serumu zdravih osoba. Najviši nivo anti-melaninskih IgG antitela zapažen je u grupi bolesnika sa melanomom bez metastaza, dok je najnižu vrednost ove klase antitela imala grupa zdravih individua.

Kao što se vidi iz tabele 4.1. bolesnici sa melanomom imali su viši nivo anti-melaninskih IgA antitela od bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba. Međutim, nije uočeno prisustvo statistički značajnih razlika u nivoima anti-melaninskih IgA antitela između grupa ispitanika.

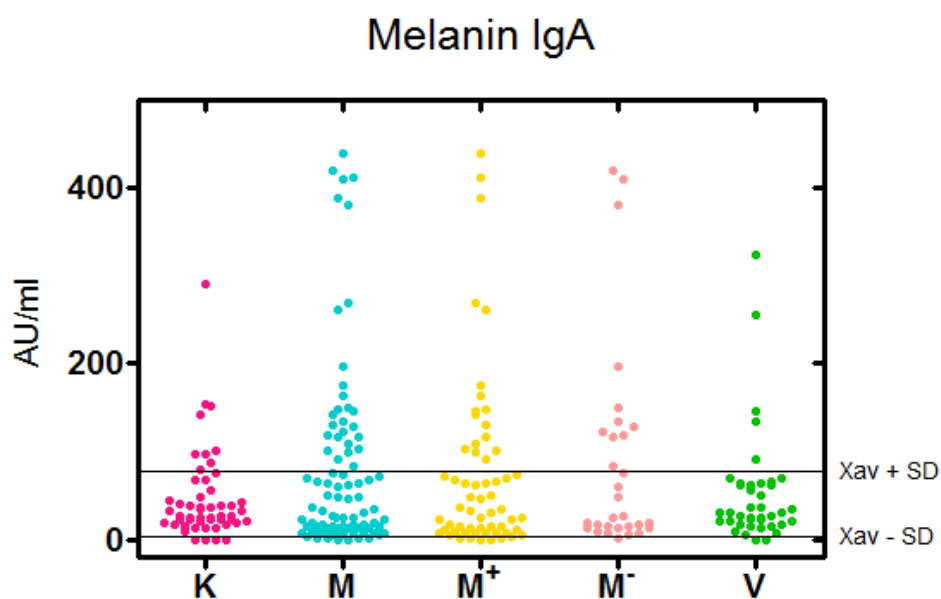
Što se tiče vrednosti nivoa anti-melaninskih IgM antitela, bolesnici sa melanomom i sa i bez metastaza imali su niže nivoe anti-melaninskih IgM antitela od bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba, dok su najviši nivo imali bolesnici sa vitiligom.

Nivo anti-melaninskih IgM antitela bio je statistički značajno niži kod bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe.

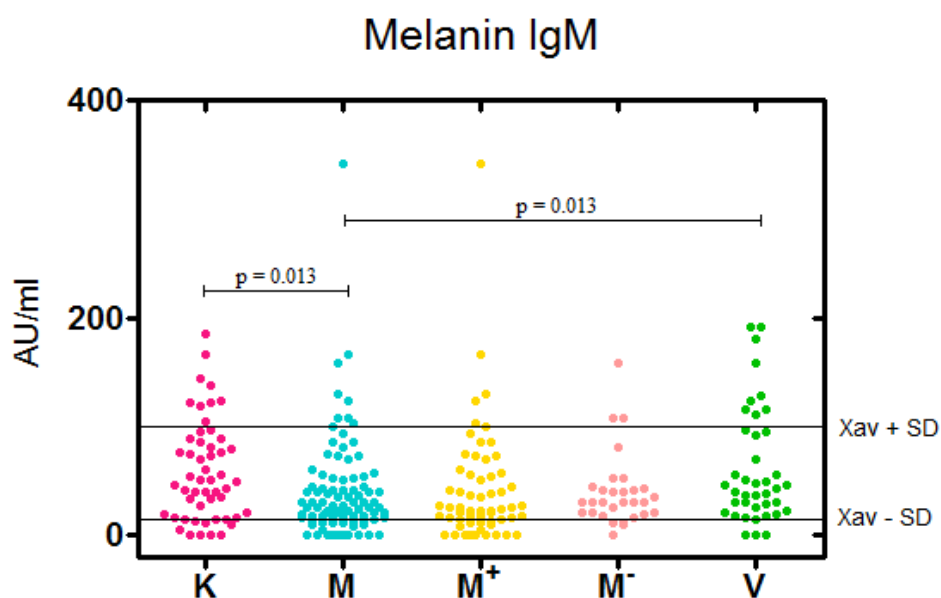
Distribucija anti-melaninskih IgG, IgA i IgM klase antitela u serumu bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba prikazana je na graficima 4.1., 4.2. i 4.3.



Grafik 4.1. Nivoi anti-melaninskih IgG antitela u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.2. Nivoi anti-melaninskih IgA antitela u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.3. Nivoi anti-melaninskih IgM antitela u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.1.2. Određivanje nivoa anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Nivoi IgG, IgA i IgM antitela u serumu, specifičnih za tirozinazu, određivani su kod 90 bolesnika sa melanomom, od kojih je 30 bolesnika inicijalno bilo bez metastaza, a 60 sa metastazama, 40 bolesnika sa vitiligom, kao i 46 zdravih osoba.

Rezultati određivanja nivoa antitela specifičnih za tirozinazu IgG, IgA i IgM klase u navedenim grupama ispitanika predstavljeni su u Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Nivoi anti-tirozinaznih IgG, IgA i IgM antitela kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	Nivo anti-tirozinaznih IgG antitela (AU/ml)	Nivo anti-tirozinaznih IgA antitela (AU/ml)	Nivo anti-tirozinaznih IgM antitela (AU/ml)
Bolesnici sa melanomom	90	78,17 ± 117,58	19,75 ± 16,09	26,46 ± 20,13*
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	30	76,39 ± 68,32	18,84 ± 16,24	32,63 ± 23,87
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	60	79,06 ± 136,23	20,20 ± 16,12	23,38 ± 17,38**
Bolesnici sa vitiligom	40	58,17 ± 57,85	15,87 ± 9,50	34,61 ± 23,94
Zdrave osobe	46	90,29 ± 75,06	13,58 ± 7,86	51,23 ± 36,09

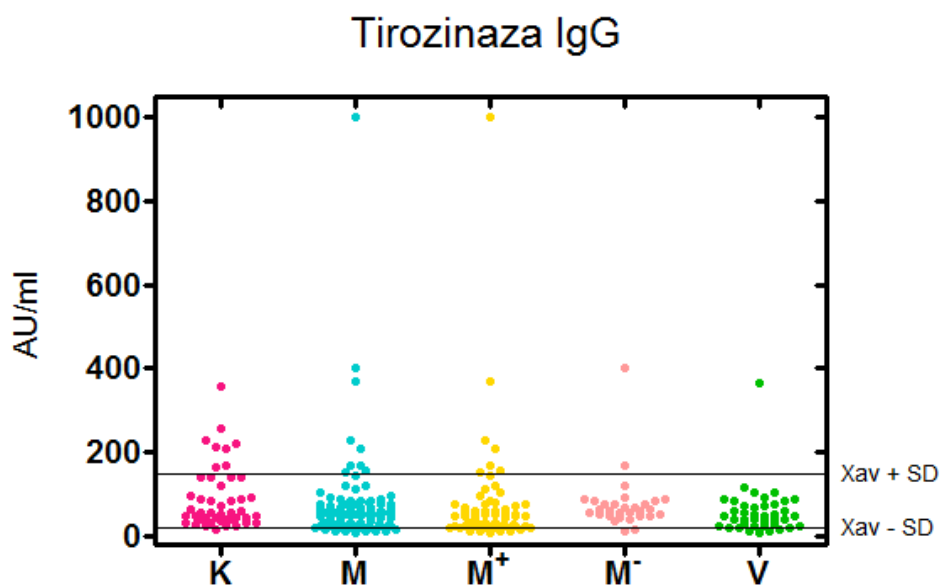
* $p = 4,42 \cdot 10^{-6}$ u odnosu na zdrave osobe
 ** $p = 0,005$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom i $p = 9,78 \cdot 10^{-7}$ u odnosu na zdrave osobe
 N – broj bolesnika ili zdravih osoba

Nije uočeno prisustvo statistički značajnih razlika u nivoima anti-tirozinaznih IgG antitela između grupa ispitanika. Grupa zdravih kontrola imala je najviši nivo anti-tirozinaznih IgG antitela u odnosu na ostale grupe ispitanika, dok su bolesnici sa vitiligom imali najniži nivo pomenutih antitela.

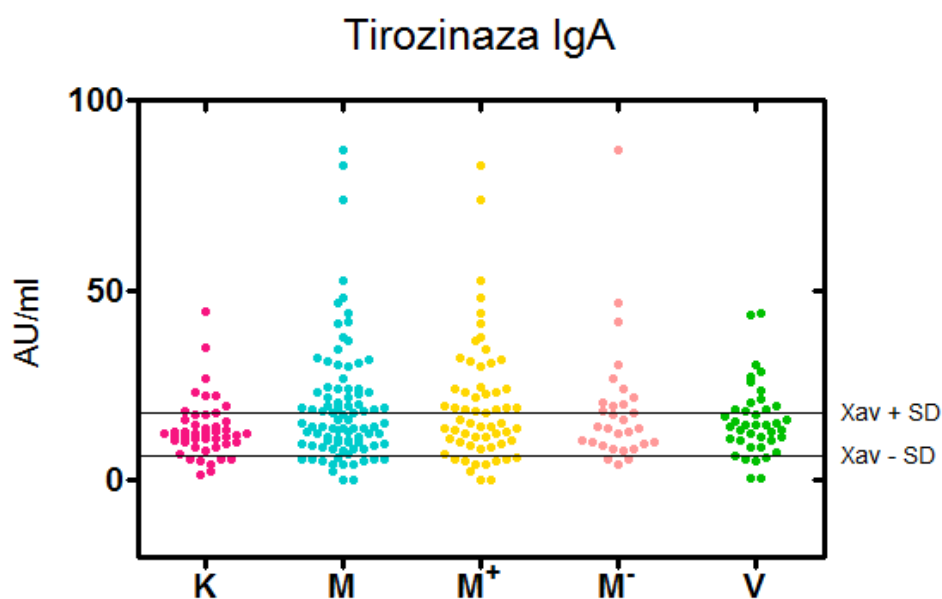
Takođe, nisu dobijene statistički značajne razlike u nivoima anti-tirozinaznih IgA antitela između ispitivanih grupa, iako je zapaženo da su bolesnici sa melanomom imali viši nivo IgA antitela specifičnih za tirozinazu u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe.

Nivo anti-tirozinaznih IgM antitela bio je statistički značajno niži u grupi bolesnika sa melanomom u odnosu na grupu zdravih osoba. Nije uočena statistički značajna razlika u nivoima IgM antitela specifičnih za tirozinazu između bolesnika sa melanomom i bolesnika sa vitiligom, dok je nivo anti-tirozinaznih IgM antitela kod bolesnika sa melanomom sa metastazama bio statistički značajno niži u odnosu na nivo anti-tirozinaznih IgM antitela kod bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba.

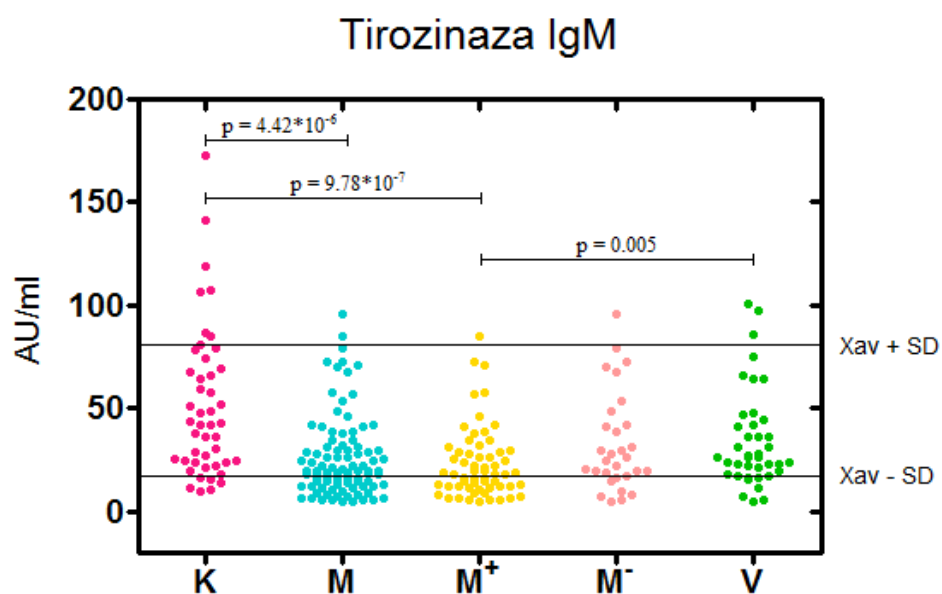
Distribucija serumskih anti-tirozinaznih IgG, IgA i IgM klasa antitela kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa melanomom sa metastazama i bolesnika bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i kod zdravih osoba prikazana je na graficima 4.4., 4.5. i 4.6.



Grafik 4.4. Nivoi anti-tirozinaznih IgG antitela u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



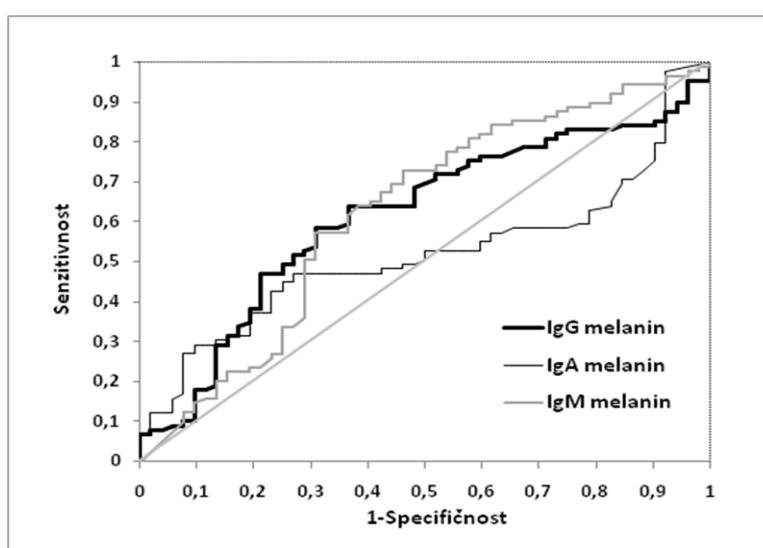
Grafik 4.5. Nivoi anti-tirozinaznih IgA antitela u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



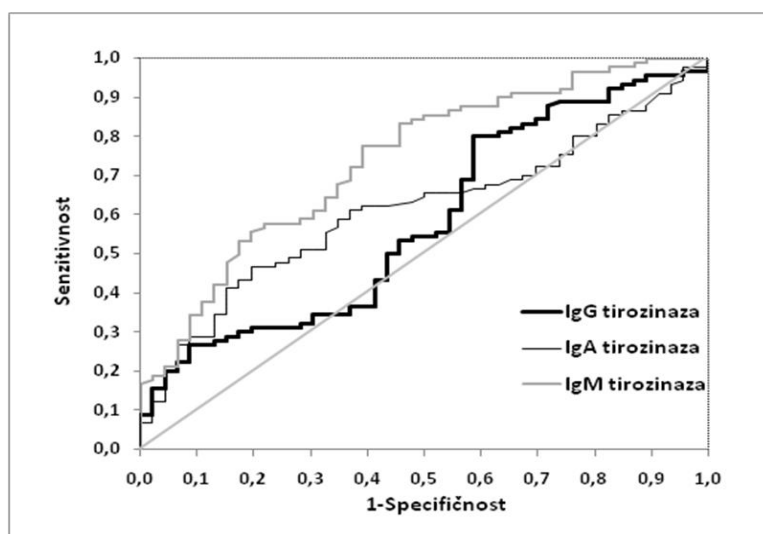
Grafik 4.6. Nivoi anti-tirozinaznih IgM antitela u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.1.3. ROC analiza nivoa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase u odnosu na postojanje melanoma

ROC analiza je urađena kako bi se procenila senzitivnost i specifičnost nivoa serumskih antitela specifičnih za melanin i tirozinazu IgG, IgA i IgM klase između grupe bolesnika sa melanomom i grupe zdravih osoba. U tabelama 4.3. i 4.4. prikazani su dobijeni rezultati. ROC krive anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgA i IgM klase za prisustvo melanoma prikazane su na graficima 4.7 i 4.8.



Grafik 4.7. ROC krive anti-melaninskih IgG, IgA i IgM antitela u odnosu na postojanje melanoma



Grafik 4.8. ROC krive anti-tirozinaznih IgG, IgA i IgM antitela u odnosu na postojanje melanoma

Tabela 4.3. ROC analiza za vrednosti nivoa serumskih anti-melaninskih IgG, IgA i IgM klasa antitela u odnosu na postojanje melanoma

Parametar	AUC ROC* sa 95%CI	Test odnosa verovatnoća [#]
IgG	61,61% (52,06%-71,17%)	p = 0,01349
IgA	51,79% (42,18%-61,41%)	p = 0,02612
IgM	62,54% (52,57%-72,51%)	p = 0,04042

*Area Under the Curve ROC, površina ispod krive (po metodi DeLong-a)

[#]Ispitivanje značajnosti dijagnostičkog potencijala parametra na ishod od interesa (postojanje melanoma) predstavlja ispitivanje značajnosti odgovarajuće logističke regresije (test odnosa verovatnoća, engl. Likelihood ratio test)

Tabela 4.4. ROC analiza za vrednost nivoa serumskih anti-tirozinaznih IgG, IgA i IgM klasa antitela u odnosu na postojanje melanoma

Parametar	AUC ROC* sa 95%CI	Test odnosa verovatnoća [#]
IgG	58,18% (47,94%-68,41%)	p = 0,5318
IgA	61,33% (51,81%-70,84%)	p = 0,007039
IgM	74,12% (65,39%-82,85%)	p = 1,549·10⁻⁶

*Area Under the Curve ROC, površina ispod krive (po metodi DeLong-a)

[#]Ispitivanje značajnosti dijagnostičkog potencijala parametra na ishod od interesa (prisustvo melanoma) predstavlja ispitivanje značajnosti odgovarajuće logističke regresije (test odnosa verovatnoća, engl. Likelihood ratio test)

Površina pod ROC krivom za nivo anti-melaninskih antitela IgG klase je bila 61,61% (95% CI 52,06% - 71,17%), p = 0,01349, za nivo anti-melaninskih IgA antitela dobijena je vrednost 51,79% (95% CI 42,18% - 61,41%), p = 0,02612, dok je za nivo anti-melaninskih IgM antitela površina ispod ROC krive bila 62,54% (95% CI 52,57% - 72,51%), p = 0,04042 (grafik 4.7).

Površina pod ROC krivom za nivo anti-tirozinaznih antitela IgG klase je bila 58,18% (95% CI 47,94% - 68,41%), p = 0,5318, za nivo anti-tirozinaznih IgA antitela dobijena je vrednost 61,33% (95% CI 51,81% - 70,84%), p = 0,007039, dok je za nivo anti-tirozinaznih IgM antitela površina ispod krive bila 74,12% (95% CI 65,39% - 82,85%), p = 1,549·10⁻⁶ (grafik 4.8).

Statistička obrada dobijenih rezultata pokazala je da vrednosti nivoa anti-melaninskih IgG, IgA i IgM antitela, kao i vrednosti nivoa anti-tirozinaznih IgA i IgM antitela, imaju statistički značajnu moć diskriminacije bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave osobe, dok vrednosti nivoa anti-tirozinaznih IgG antitela nemaju statistički značajan diskriminacioni potencijal za postojanje melanoma.

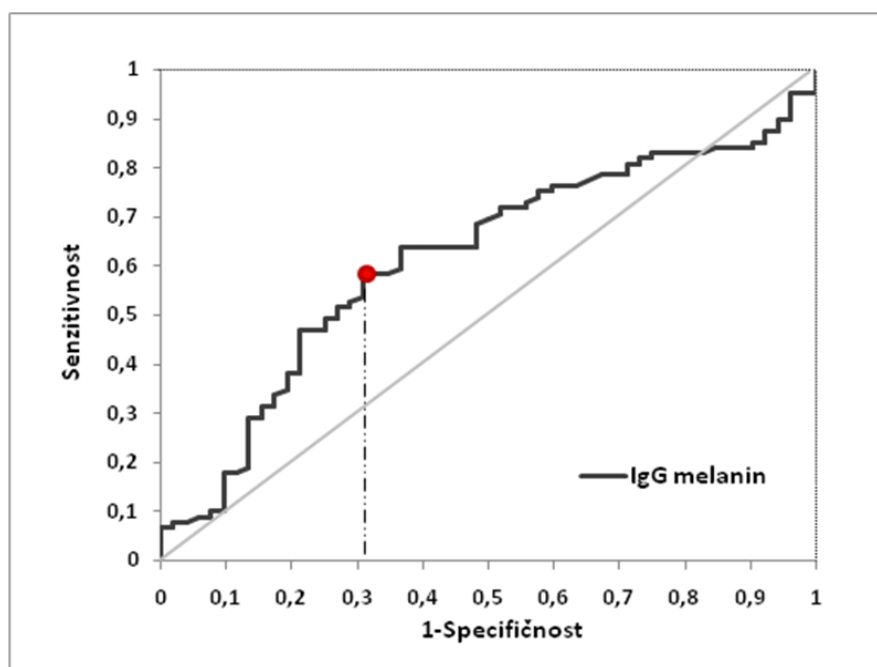
Ispitivane su i najbolje granične vrednosti za nivoe antitela specifičnih za melanin i tirozinazu IgG, IgA i IgM klase za postojanje melanoma.

Dobijena najbolja granična vrednost za nivo anti-melaninskih IgG antitela je 28,95 AU/ml, za najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti (Se = 58,43%, Sp = 69,23%); za nivo anti-melaninskih IgA antitela najbolja granična vrednost za najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti iznosi 45,7 AU/ml (Se = 47,19%, Sp = 73,08%); za nivo antitela specifičnih za melanin IgM klase najbolja granična vrednost za optimalan odnos senzitivnosti i specifičnosti iznosi 45,6 AU/ml (Se = 73,03%, Sp = 53,85%). Najbolje granične vrednosti ispitivanih parametara za prisustvo melanoma prikazane su u tabeli 4.5. kao i na graficima 4.9 – 4.11.

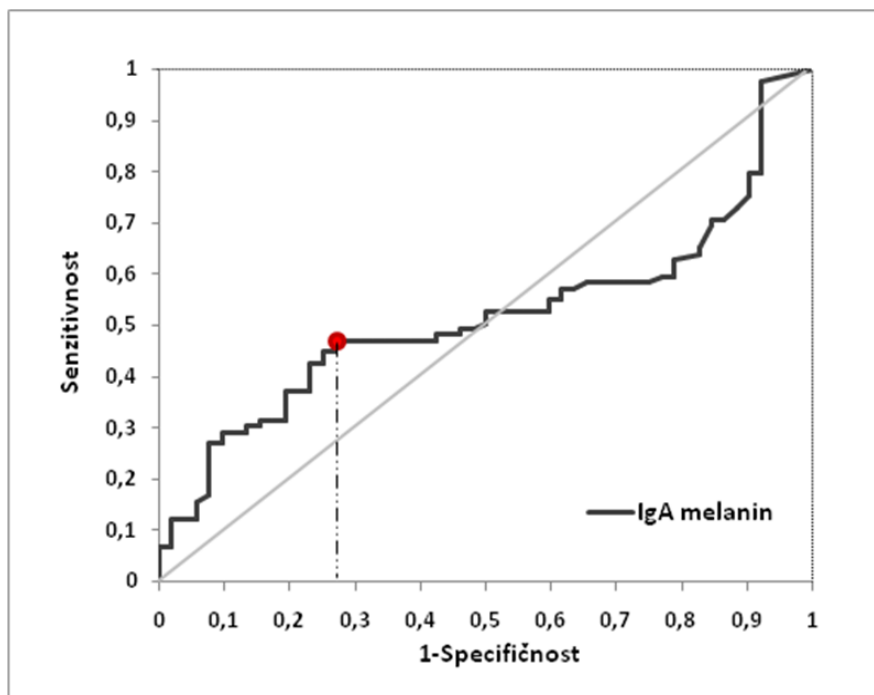
Tabela 4.5. Najbolje granične vrednosti nivoa anti-melaninskih IgG, IgA i IgM antitela u odnosu na postojanje melanoma

Parametar	Najbolja granična vrednost*	Senzitivnost (95%CI) (%)	Specifičnost (95% CI) (%)
IgG	28,95	58,43 (48,31-68,54)	69,23 (55,77-80,77)
IgA	45,7	47,19 (37,08-57,3)	73,08 (61,54-84,62)
IgM	45,6	73,03 (64,04-82,02)	53,85 (40,38-67,31)

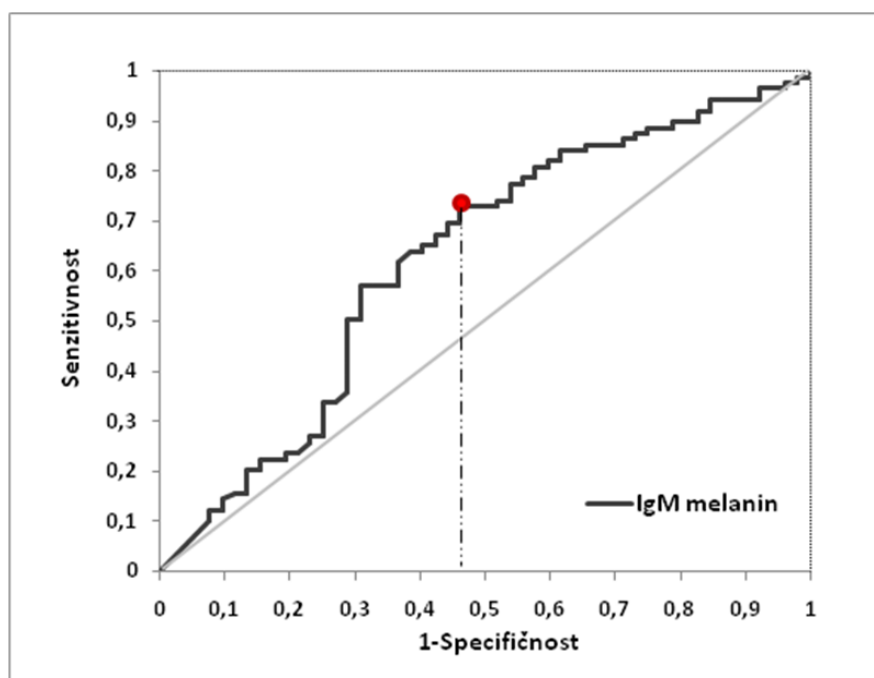
*Vrednost za koju je postignuta maksimalna senzitivnost i specifičnost



Grafik 4.9. Najbolje granične vrednosti anti-melaninskih IgG antitela u odnosu na postojanje melanoma



Grafik 4.10. Najbolje granične vrednosti anti-melaninskih IgA antitela u odnosu na postojanje melanom



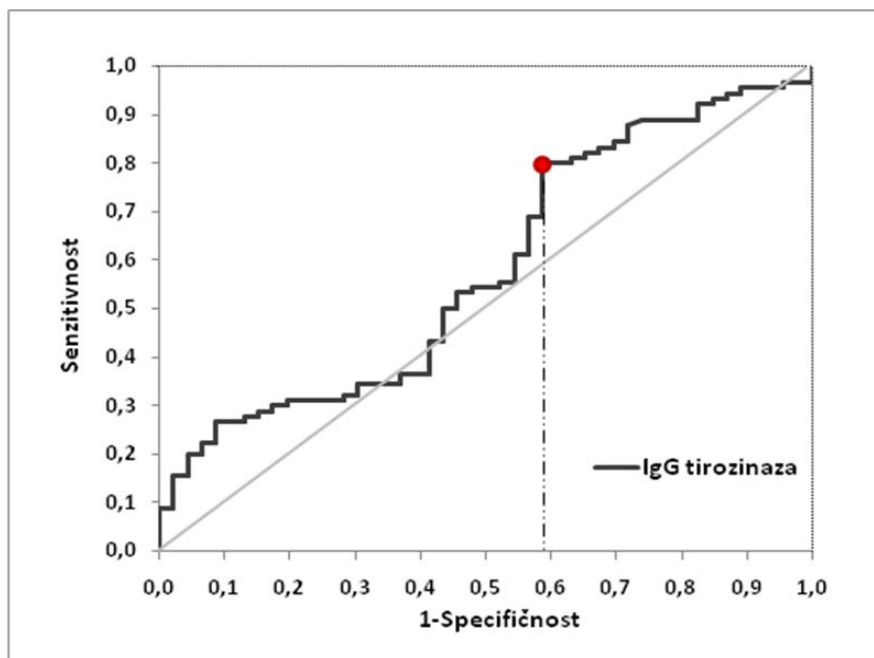
Grafik 4.11. Najbolje granične vrednosti anti-melaninskih IgM antitela u odnosu na postojanje melanoma

Dobijena najbolja granična vrednost za nivo anti-tirozinaznih IgG antitela je 28,95 AU/ml, za najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti (Se = 58,43%, Sp = 69,23%); za nivo anti-tirozinaznih IgA antitela najbolja granična vrednost za najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti iznosi 45,7 AU/ml (Se = 47,19%, Sp = 73,08%); za nivo antitela specifičnih za tirozinazu IgM klase najbolja granična vrednost za optimalan odnos senzitivnosti i specifičnosti iznosi 45,6 AU/ml (Se = 73,03%, Sp = 53,85%). Najbolje granične vrednosti ispitivanih parametara za prisustvo melanoma prikazane su u tabeli 4.6. kao i na graficima od 4.12 – 4.14.

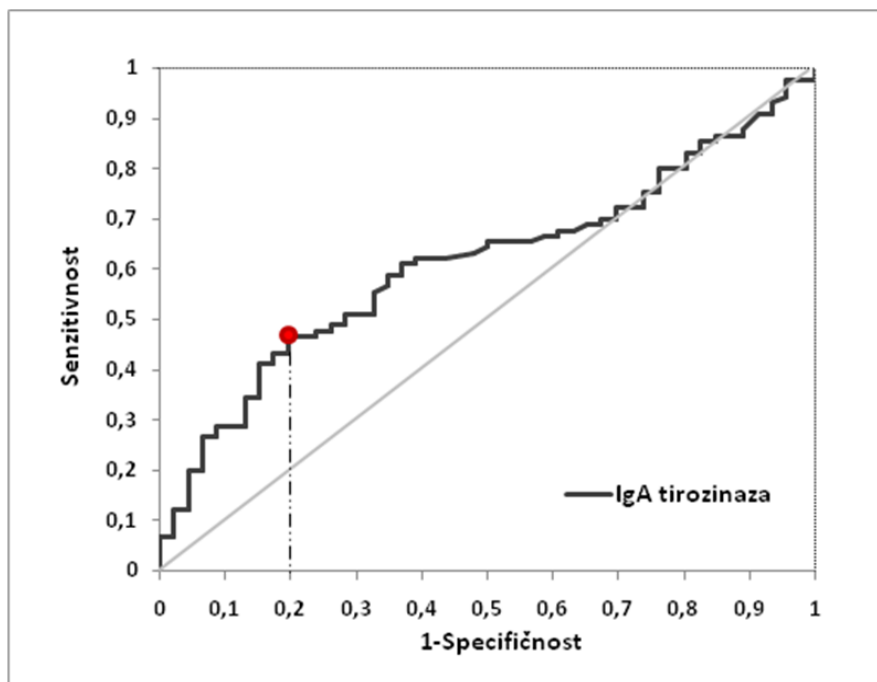
Tabela 4.6. Najbolje granične vrednosti nivoa anti-tirozinaznih IgG, IgA i IgM antitela u odnosu na postojanje melanoma

Parametar	Najbolja granična vrednost*	Senzitivnost (95%CI) (%)	Specifičnost (95%CI) (%)
IgG	84,75	80 (71,11-87,78)	41,3 (28,26-56,52)
IgA	17,4	46,67 (36,67-56,67)	80,43 (67,39-91,3)
IgM	35,2	77,78 (70-86,67)	60,87 (45,65-73,91)

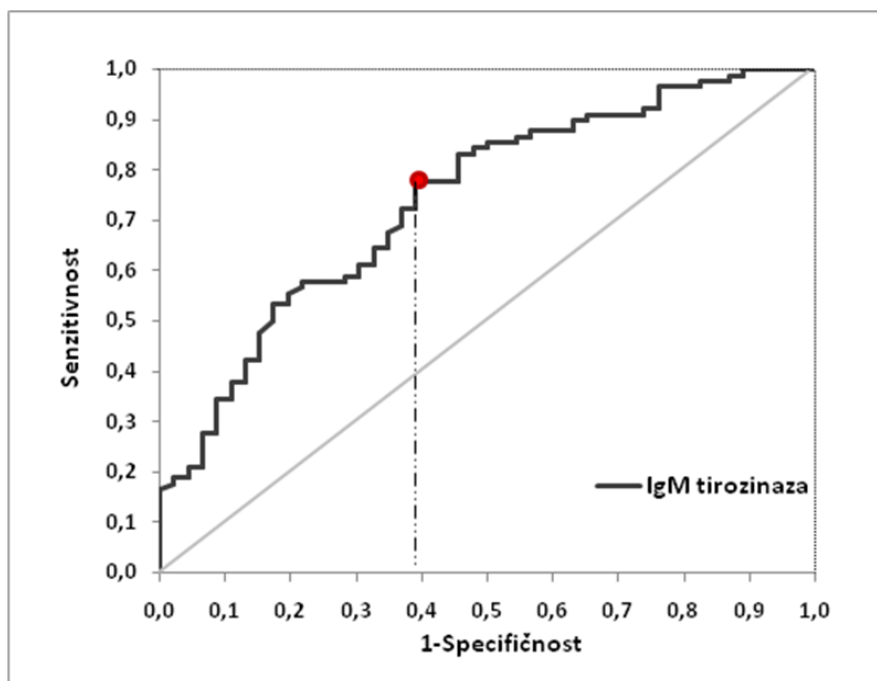
*Vrednost za koju je postignuta maksimalna senzitivnost i specifičnost



Grafik 4.12. Najbolje granične vrednosti anti-tirozinaznih IgG antitela u odnosu na postojanje melanoma



Grafik 4.13. Najbolje granične vrednosti anti-tirozinaznih IgA antitela u odnosu na postojanje melanoma



Grafik 4.14. Najbolje granične vrednosti anti-tirozinaznih IgM antitela u odnosu na postojanje melanoma

Da bi se pokazala značajnost dobijenih rezultata, odnos šansi (engl. *odds ratio*, OR) je korišćen kao pokazatelj odnosa između bolesnika sa melanomom i zdravih osoba u odnosu na date *cut-off* vrednosti. OR vrednosti za nivoe anti-melanomskih antitela prikazane su u tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Odds ratio za nivoe anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela

	OR (95% CI)	p vrednost
Anti-melaninska IgG antitela	1,011 (1,002 – 1,020)	p < 0,05
Anti-melaninska IgA antitela	1,005 (0,999 – 1,010)	p = 0,0516
Anti-melaninska IgM antitela	0,992 (0,985 – 1)	p = 0,0503
Anti-tirozinazna IgG antitela	0,999 (0,996 – 1,002)	p = 0,532
Anti-tirozinazna IgA antitela	1,046 (1,007 – 1,087)	p < 0,05
Anti-tirozinazna IgM antitela	0,967 (0,951 – 1,008)	p < 0,001

Iz tabele 4.7. vidi se da OR kao i 95-procentni intervali poverenja za nivoe anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgM i IgA klasa ukazuju na to da ne postoji značaj ovih parametara za nepovoljan ishod, odnosno razvoj bolesti. Dobijeni rezultati, gde interval poverenja obuhvata vrednost 1 i OR ima vrednost blisku 1, ukazuju na nepostojanje veze između ispitivanih parametara i melanoma.

4.1.4. Učestalosti bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba sa izmenjenim nivoom anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela

Učestalosti bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba sa izmenjenim nivoom anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela, predstavljene su u tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Učestalosti zdravih osoba i bolesnika sa izmenjenim nivoom anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela

	Zdrave kontrole (%)	Vitiligo (%)	Melanom (%)	Melanom bez metastaza (%)	Melanom sa metastazama (%)
Povišen nivo anti-melaninskih IgM antitela	17	27,5	10	10	10
Sniženi nivo anti-melaninskih IgM antitela	15	7,5	22,5	13	27
Povišen nivo anti-melaninskih IgA antitela	17	12,5	31,5	37	29
Sniženi nivo anti-melaninskih IgA antitela	8	5	8	3	10
Povišen nivo anti-melaninskih IgG antitela	17	15	35	50	27
Sniženi nivo anti-melaninskih IgG antitela	0	0	2	0	3
Povišen nivo anti-tirozinaznih IgM antitela	17	7,5	2	3	1,7
Sniženi nivo anti-tirozinaznih IgM antitela	11	22,5	38	23	45
Povišen nivo anti-tirozinaznih IgA antitela	19,5	32,5	44	4	47
Sniženi nivo anti-tirozinaznih IgA antitela	15	15	14	10	17
Povišen nivo anti-tirozinaznih IgG antitela	15	2,5	10	7	12
Sniženi nivo anti-tirozinaznih IgG antitela	2	15	14,5	7	18
N - melanin	52	40	89	30	59
N - tirozinaza	46	40	90	30	60

Iz tabele 4.8. se vidi da je od 90 bolesnika sa melanomom, 38% bolesnika imalo snižen nivo anti-tirozinaznih IgM antitela, i 45% bolesnika sa melanomom sa metastazama. Bolesnici sa melanomom sa metastazama čine 79% bolesnika sa melanomom sa sniženim anti-tirozinaznim IgM antitelima. Takođe, snižen nivo anti-melaninskih IgM antitela imalo je 22,5% bolesnika sa melanomom, od kojih 80% čine bolesnici sa metastazama. Od ukupnih bolesnika sa melanomom sa metastazama snižen nivo anti-melaninskih IgM antitela uočen je kod 27% bolesnika. Povišen nivo antitela specifičnih za melanin IgM klase imalo je 27,5% bolesnika sa vitiligom.

Nivo anti-tirozinaznih IgA antitela bio je povišen kod 44% bolesnika sa melanomom, kao i 47% bolesnika sa melanomom sa metastazama, koji čine 70% od ukupnih bolesnika sa melanomom sa povišenim nivoom anti-tirozinaznih IgA antitela. Povišen nivo anti-tirozinaznih IgA antitela uočen je kod 32,5% bolesnika sa vitiligom. Povišen nivo anti-melaninskih IgA antitela dobijen je kod 31,5% bolesnika sa melanomom, 37% bolesnika bez metastaza i 29% bolesnika sa metastazama.

Od 89 bolesnika sa melanomom, 35% bolesnika je imalo povišen nivo anti-melaninskih IgG antitela. Učestalost bolesnika sa melanomom sa i bez metastaza u grupi bolesnika sa melanomom sa povišenim nivoom anti-melaninskih IgG antitela bila je gotovo jednaka. Međutim, 50% od ukupnog broja bolesnika sa melanomom bez metastaza pokazalo je povišenu vrednost nivoa anti-melaninskih IgG antitela.

4.2. Ekspresija CD16 i CD56 antigena na površini limfocita i ekspresija CD89 antigena na površini granulocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Određivanje ekspresije CD16 i CD56 antigena na površini membrane limfocita i CD89 antigena na površini membrane granulocita, odnosno ispitivanje procentualne zastupljenosti CD16⁺ i CD56⁺ limfocita i CD89⁺ granulocita vršena je na uzorcima pune krvi bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba. Procentualna zastupljenost specifičnih subpopulacija imunskih ćelija određivana je u odnosu na populaciju ukupnih leukocita (engl. *total*, t), i u odnosu na određenu tj. „gejtovanu“ (engl. *gated*, g) populaciju leukocita (populacija limfocita ili populacija granulocita). Referentne vrednosti određene su kao $X_{av} \pm SD$, na osnovu rezultata analize zdravih osoba.

4.2.1. Ekspresija CD16 i CD56 antigena na površini limfocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Učestalost CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g), u navedenim grupama ispitanika prikazana je u tabeli 4.9.

Procenat CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita bio je statistički značajno niži kod bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe.

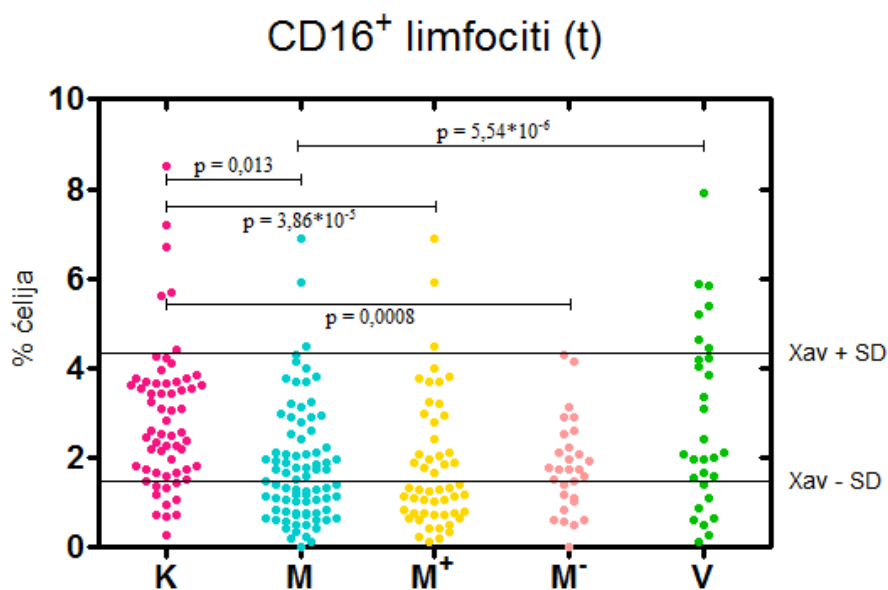
Zdrave osobe imale su i statistički značajno viši % CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na bolesnike sa melanomom sa metastazama i bolesnike sa melanomom bez metastaza, odnosno bolesnici sa melanomom imali su statistički značajno niži % CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na zdrave individue.

Tabela 4.9. Učestalost CD16⁺ limfocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

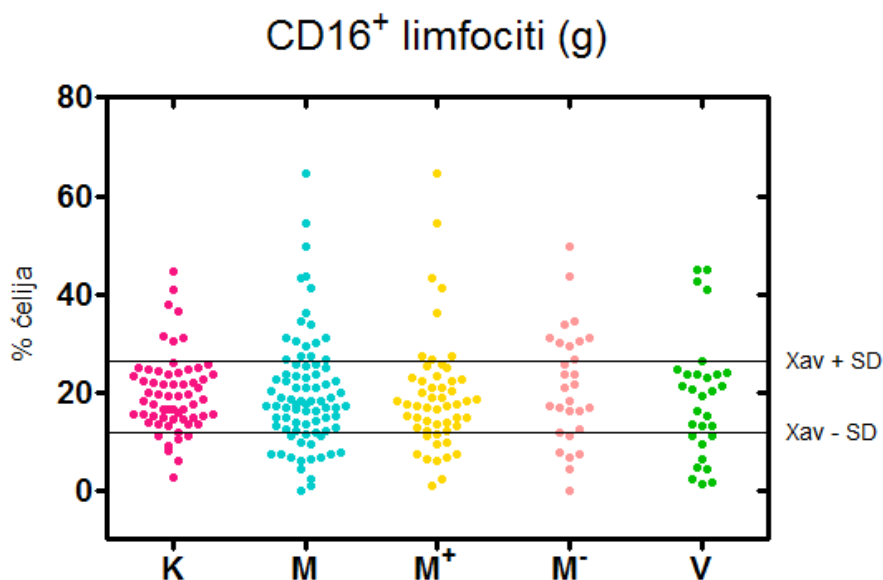
Grupe ispitanika	N	% CD16⁺ limfocita (t)	% CD16⁺ limfocita (g)
Bolesnici sa melanomom	82	1,82 ± 1,31*	19,99 ± 11,63
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	29	1,81 ± 1,03**	21,33 ± 11,68
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	53	1,82 ± 1,45***	19,25 ± 11,65
Bolesnici sa vitiligom	30	2,84 ± 1,98	18,98 ± 12,3
Zdrave osobe	62	2,90 ± 1,58	19,73 ± 7,92

* $p = 0,013$ u odnosu na zdrave osobe i $p = 5,54 \cdot 10^{-6}$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom
 ** $p = 0,0008$ u odnosu na zdrave osobe
 *** $p = 3,86 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na zdrave osobe
N – broj bolesnika ili zdravih osoba
t – ukupna populacija leukocita; *g* – populacija limfocita

Distribucija učestalosti CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g) kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba prikazana je na graficima 4.15. i 4.16.



Grafik 4.15. Učestalost CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.16. Učestalost CD16⁺ limfocita u populaciji limfocita (g) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

Učestalost CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g), u navedenim grupama ispitanika prikazana je u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Učestalost CD56⁺ limfocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	% CD56⁺ limfocita (t)	% CD56⁺ limfocita (g)
Bolesnici sa melanomom	69	1,24 ± 0,88*	14,33 ± 8,6
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	25	1,09 ± 0,61**	14,15 ± 9,61
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	44	1,32 ± 0,99***	14,44 ± 8,08
Bolesnici sa vitiligom	26	1,57 ± 1,35	11,71 ± 9,98
Zdrave osobe	54	2,42 ± 2,03	15,39 ± 8,05

* $p = 2,797 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na zdrave osobe

** $p = 0,0002$ u odnosu na zdrave osobe

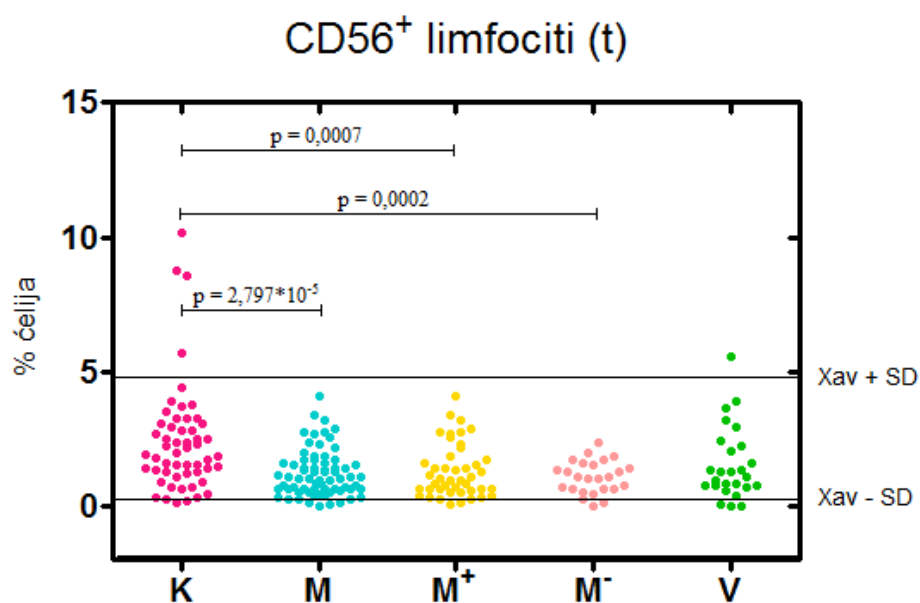
*** $p = 0,0007$ u odnosu na zdrave osobe

N – broj bolesnika ili zdravih osoba

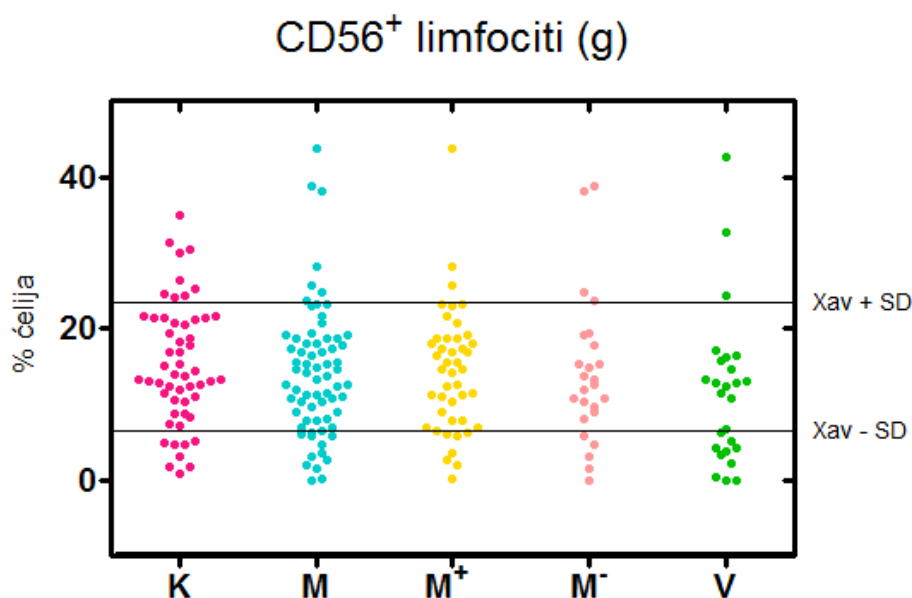
t – ukupna populacija leukocita; *g* – populacija limfocita

Bolesnici sa melanomom imali su statistički značajno niži procenat CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na zdrave osobe. Takođe, pokazano je i da su zdrave osobe imale statistički značajno viši % CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na bolesnike sa melanomom sa metastazama i bolesnike sa melanomom bez metastaza.

Distribucija učestalosti CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g) kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba prikazana je na graficima 4.17. i 4.18.



Grafik 4.17. Učestalost CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.18. Učestalost CD56⁺ limfocita u populaciji limfocita (g) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

Učestalost limfocita koji na svojoj površini ekspimiraju i CD16 i CD56 antigen u populaciji limfocita (g), kao i u populaciji ukupnih leukocita (t) u grupama ispitanika predstavljena je u tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Učestalost CD16⁺CD56⁺ limfocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	% CD16⁺CD56⁺ limfocita (t)	% CD16⁺CD56⁺ limfocita (g)
Bolesnici sa melanomom	69	1,00 ± 0,76*	11,17 ± 7,43
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	25	0,81 ± 0,52**	10,47 ± 7,59
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	44	1,09 ± 0,84***	11,52 ± 7,4
Bolesnici sa vitiligom	26	1,45 ± 1,41	10,37 ± 9,67
Zdrave osobe	54	1,74 ± 1,34	11,17 ± 6,17

* $p = 0,0003$ u odnosu na zdrave osobe

** $p = 0,0006$ u odnosu na zdrave osobe,

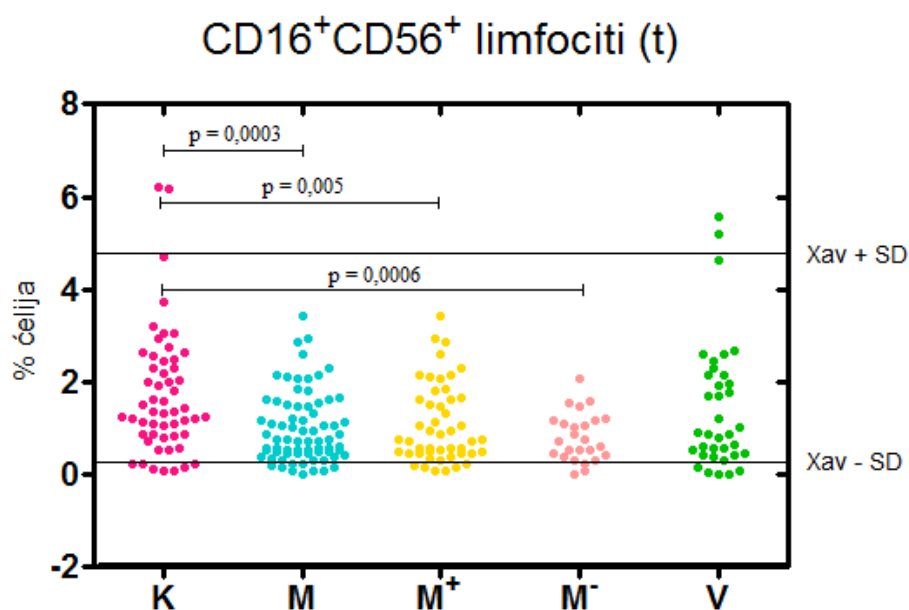
*** $p = 0,005$ u odnosu na zdrave osobe

N – broj bolesnika ili zdravih osoba

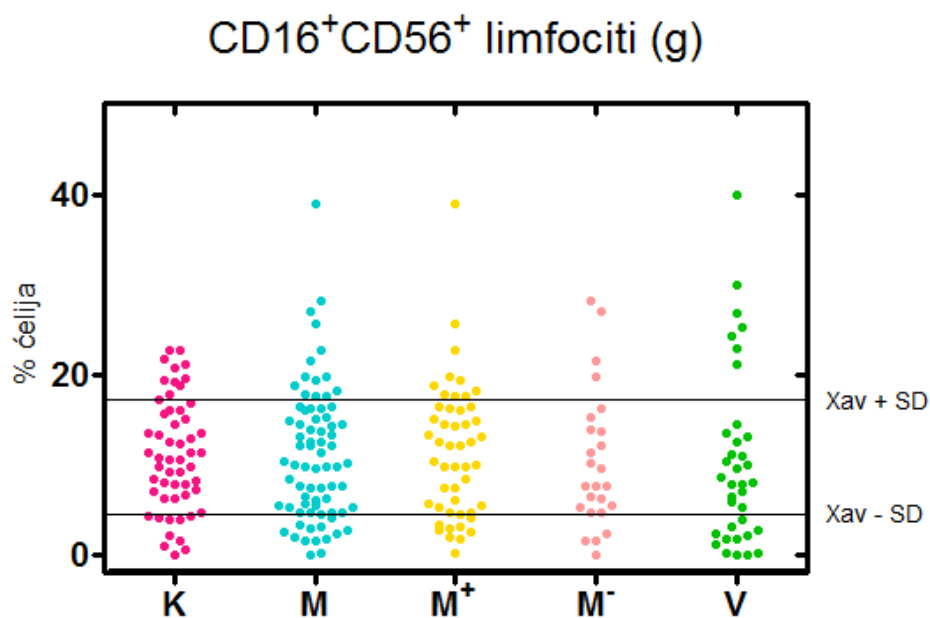
t – ukupna populacija leukocita; *g* – populacija limfocita

Bolesnici sa melanomom imali su statistički značajno niži % CD16⁺CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na zdrave osobe, dok su zdrave osobe imale statistički značajno viši % CD16⁺CD56⁺ limfocita u populaciji leukocita, kako u odnosu na bolesnike sa melanomom bez metastaza, tako i u odnosu na bolesnike sa melanomom sa metastazama.

Relativna učestalost CD16⁺CD56⁺ limfocita u ukupnoj populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g) kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba, prikazana je na graficima 4.19. i 4.20.



Grafik 4.19. Učestalost CD16⁺CD56⁺ limfocita u populaciju leukocita (t) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.20. Učestalost CD16⁺CD56⁺ limfocita u populaciji limfocita (g) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.2.2. Ekspresija CD89 antigena na površini granulocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Učestalost CD89⁺ granulocita u populaciji leukocita (t) i populaciji granulocita (g) u grupama ispitanika prikazana je u tabeli 4.12.

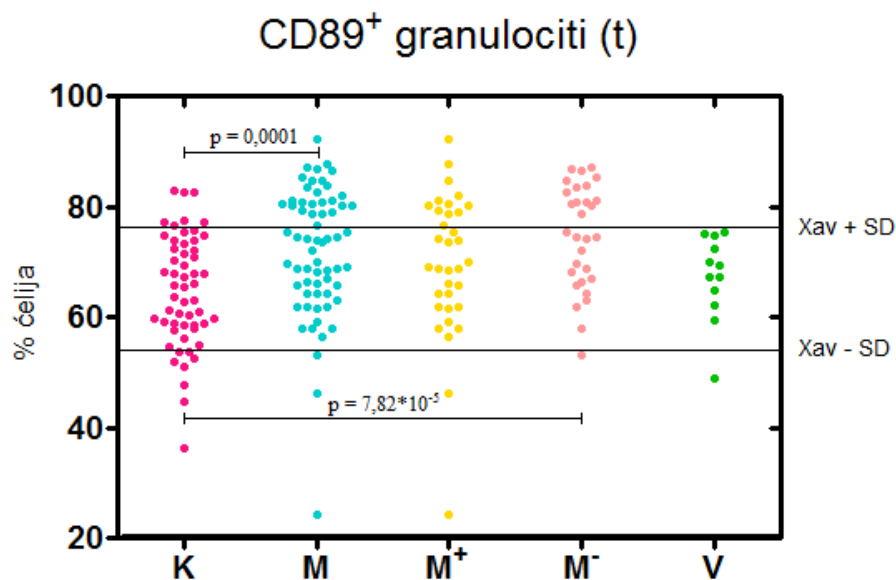
Tabela 4.12. Učestalost CD89⁺ granulocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	% CD89⁺ granulocita (t)	% CD89⁺ granulocita (g)
Bolesnici sa melanomom	64	72,15 ± 11,57*	99,21 ± 1,95
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	30	74,71 ± 9,36**	99,05 ± 2,12
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	34	69,88 ± 12,94	99,36 ± 1,81
Bolesnici sa vitiligom	12	67,37 ± 7,71	98,1 ± 3,42
Zdrave osobe	55	64,84 ± 10,05	99,18 ± 1,71

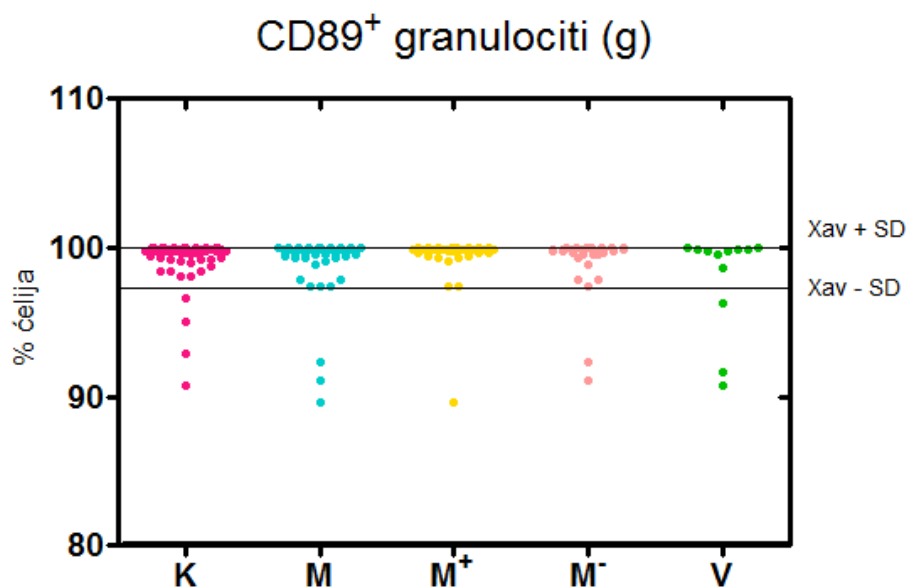
* $p = 0,0001$ u odnosu na zdrave osobe
 ** $p = 7,82 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na zdrave osobe
 N – broj bolesnika ili zdravih osoba
 t – ukupna populacija leukocita; g – populacija limfocita

Uočeno je da su bolesnici sa melanomom imali statistički značajno viši % CD89⁺ granulocita u ukupnoj populaciji leukocita u odnosu na zdrave osobe, kao i to da se to pre svega odnosi na bolesnike sa melanomom bez metastaza, koji su imali statistički značajno viši % CD89⁺ granulocita u populaciji leukocita u odnosu na zdrave osobe, za razliku od bolesnika sa melanomom sa metastazama. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji ukazuju da nema statistički značajnih razlika u % CD89⁺ granulocita u populaciji samih granulocita između ispitivanih grupa.

Distribucija procenta CD89⁺ granulocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji granulocita (g) kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba, prikazana je na graficima 4.21. i 4.22.



Grafik 4.21. Učestalost CD89⁺ granulocita u populaciju leukocita (t) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.22. Učestalost CD89⁺ granulocita u populaciji granulocita (g) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.3. Aktivnost dipeptidil peptidaze IV u serumu i ekspresija CD26 antigena na limfocitima kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

4.3.1. Enzimaska aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Rezultati određivanja enzimske aktivnosti DPPIV u serumu u ispitivanim grupama prikazani su u tabeli 4.13. Aktivnost DPPIV izražena je u IU/L.

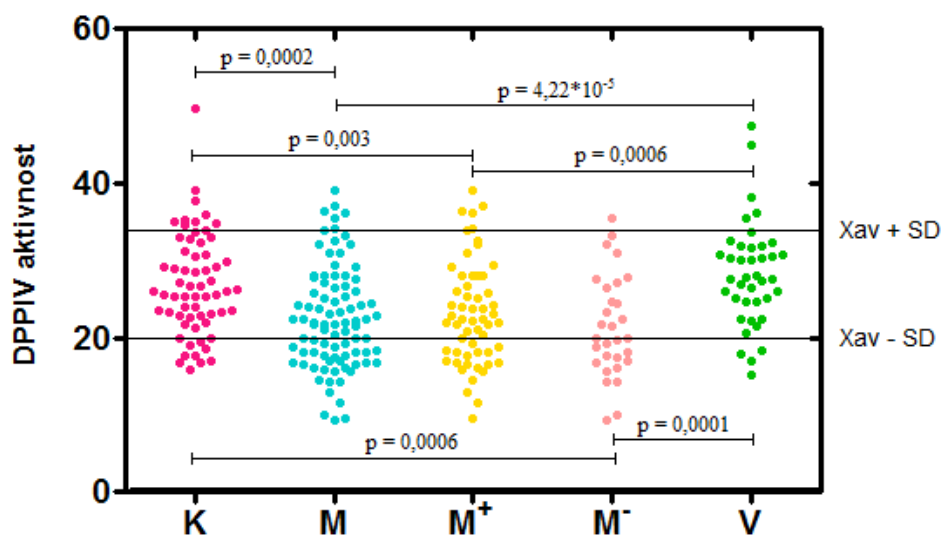
Tabela 4.13. Enzimaska aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	aktivnost DPPIV
Bolesnici sa melanomom	89	22,64 ± 6,68*
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	30	21,48 ± 6,55**
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	57	23,24 ± 6,72***
Bolesnici sa vitiligom	40	28,28 ± 6,72
Zdrave osobe	62	26,93 ± 6,55

* $p = 4,22 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0,0002$ u odnosu na zdrave osobe
** $p = 0,0001$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0,0006$ u odnosu na zdrave osobe
*** $p = 0,0006$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0,003$ u odnosu na zdrave osobe
N – broj bolesnika ili zdravih osoba

Na osnovu dobijenih rezultata statističke analize vidi se da su bolesnici sa melanomom imali statistički značajno niže vrednosti enzimske aktivnosti DPPIV u serumu u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Statistički značajno niže vrednosti enzimske aktivnosti DPPIV u serumu u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe pokazali su i bolesnici sa melanomom sa metastazama i bolesnici sa melanomom bez metastaza.

Distribucija vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba prikazana je na grafiku 4.23.



Grafik 4.23. Enzimska aktivnost DPPIV u serumu zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.3.2. Ekspresija CD26 antigena na površini limfocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Učestalost CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i populaciji limfocita (g) i vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije ekspresije CD26 na limfocitima u grupama ispitanika prikazani su u tabeli 4.14.

Tabela 4.14. Učestalost CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i populaciji limfocita (g) i srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26 na površini limfocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	%CD26 ⁺ limfocita (t)	%CD26 ⁺ limfocita (g)	Srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26
Bolesnici sa melanomom	89	6,67 ± 4,14*	51,37 ± 10,9	371,00 ± 476,97
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	30	6,43 ± 3,32**	52,42 ± 10,15	382,70 ± 656,37
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	59	6,80 ± 4,52***	50,84 ± 11,31	365,00 ± 360,09
Bolesnici sa vitiligom	37	8,55 ± 4,36	46,26 ± 12,80	469,40 ± 643,67
Zdrave osobe	62	10,38 ± 4,75	50,67 ± 12,13	421,60 ± 719,19

* $p = 0,0099$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 3,85 \cdot 10^{-7}$ u odnosu na zdrave osobe

** $p = 5,75 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na zdrave osobe,

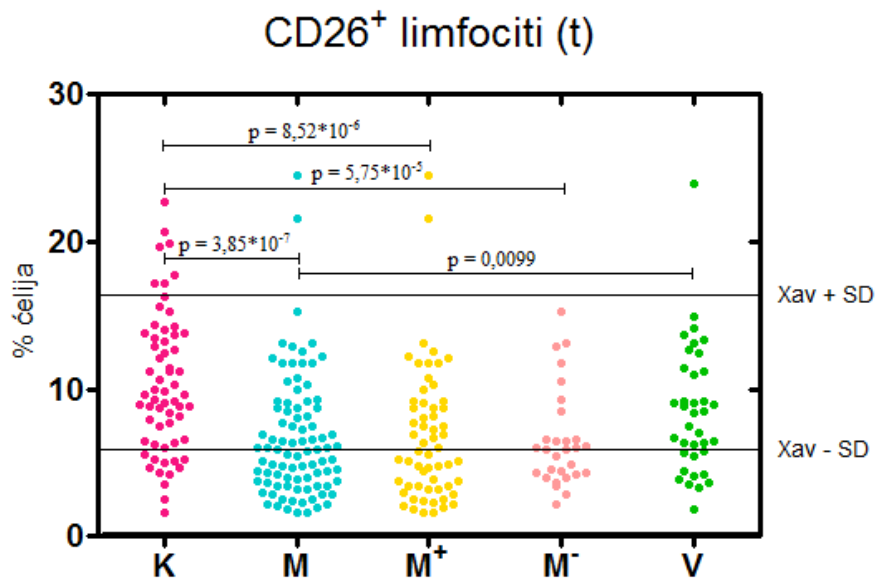
*** $p = 8,52 \cdot 10^{-6}$ u odnosu na zdrave osobe

N – broj bolesnika ili zdravih osoba

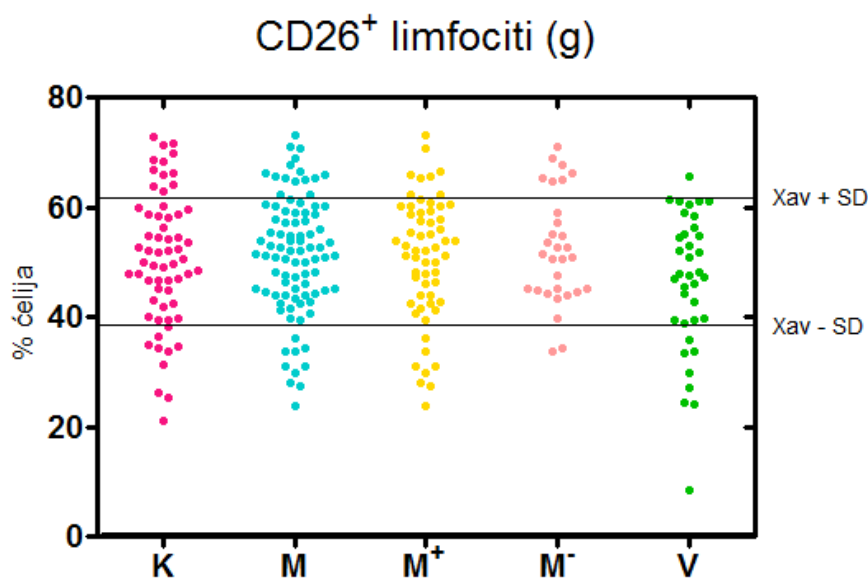
Bolesnici sa melanomom su imali statistički značajno niži % CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe.

Zdrave osobe imale su statistički značajno viši % CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na bolesnike sa melanomom bez metastaza i bolesnike sa melanomom sa metastazama.

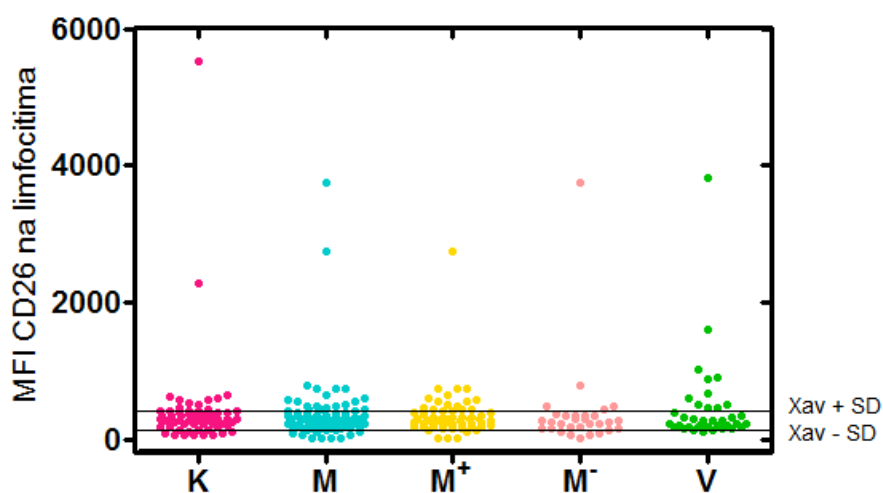
Distribucija učestalosti CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) i populaciji limfocita (g), kao i srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26 na površini limfocita kod ispitivanih grupa prikazani su na graficima od 4.24. do 4.26.



Grafik 4.24. Učestalost CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita (t) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.25. Učestalost CD26⁺ limfocita u populaciji limfocita (g) kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



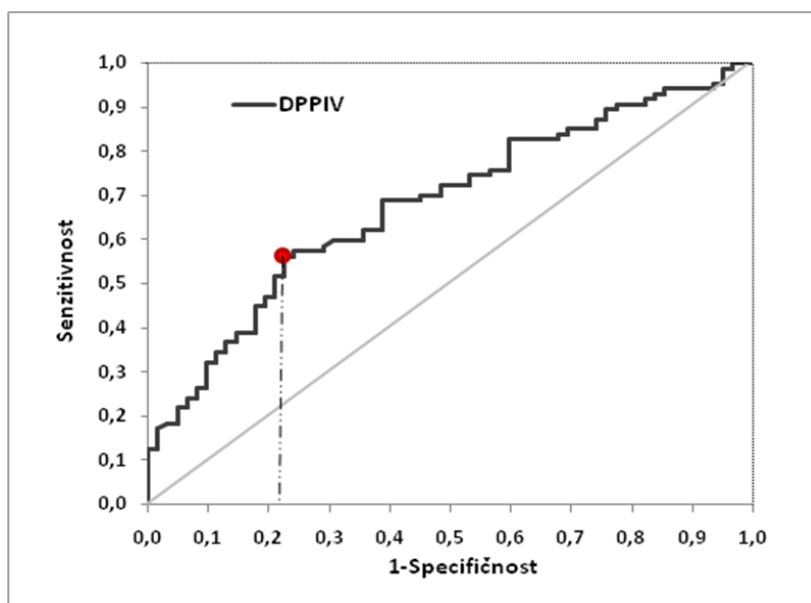
Grafik 4.26. Srednji intenzitet fluorescencije (MFI) ekspresije CD26 na površini limfocita kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.3.3. ROC analiza enzimske aktivnosti DPPIV i učestalosti CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na postojanje melanoma

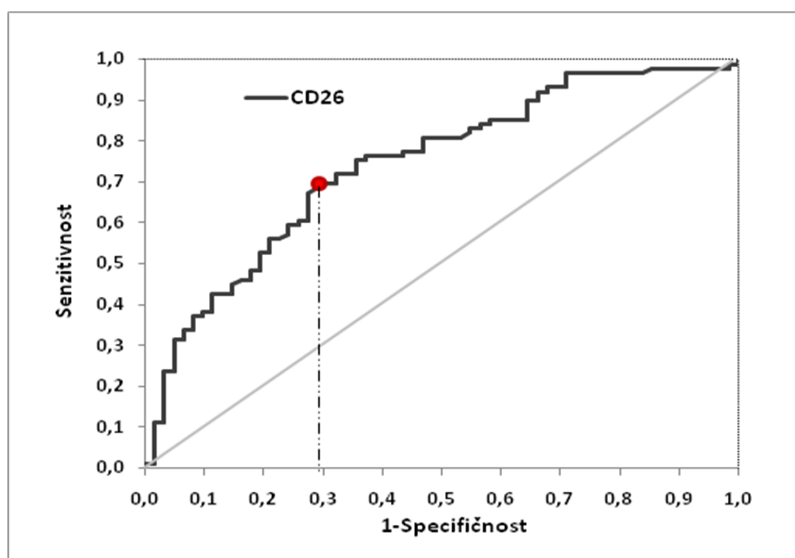
ROC analiza je urađena kako bi se procenila senzitivnost i specifičnost enzimske aktivnosti DPPIV u serumu, kao i učestalosti CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita između grupe bolesnika sa melanomom i grupe zdravih osoba.

ROC krive za analizirane parametre prikazane su na graficima 4.27. i 4.28.

U tabeli 4.15. prikazani su dobijeni rezultati.



Grafik 4.27. ROC kriva i najbolja granična vrednost enzimske aktivnosti DPPIV u serumu u odnosu na postojanje melanoma



Grafik 4.28. ROC kriva i najbolja granična vrednost procenta CD26⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita u odnosu na postojanje melanoma

Tabela 4.15. ROC analiza enzimske aktivnosti DPPIV u serumu i učestalosti CD26⁺ limfocita u populaciju ukupnih leukocita u odnosu na postojanje melanoma

Parametar	AUC ROC* sa 95%CI	Likelihood ratio test [#]
DPPIV	68,15% (59,6%-76,7%)	p = 0,0001422
%CD26 ⁺ limfocita	74,33% (66,37%-82,29%)	p = 1,172·10 ⁻⁶

*Area Under the Curve ROC, površina ispod ROC krive (po metodi DeLong-a)

[#]Ispitivanje značajnosti dijagnostičkog potencijala parametra na ishod od interesa (prisustvo melanoma) predstavlja ispitivanje značajnosti odgovarajuće logističke regresije (Likelihood ratio test)

Površina pod ROC krivom za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu je bila 68,15% (95% CI 59,6% - 76,7%), p = 0,0001422 (grafik 4.27.), dok je za procenat CD26 limfocita (t) iznosila 74,33% (95% CI 66,37% - 82,29%), p = 1,172·10⁻⁶ (grafik 4.28.), što ukazuje na pouzdanu dijagnostičku tačnost testa.

Statistička obrada dobijenih rezultata pokazala je da enzimska aktivnost DPPIV u serumu i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita imaju statistički značajnu moć diskriminacije bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave individue.

Ispitivanjem najboljih graničnih vrednosti za ove parametre u odnosu na postojanje melanoma, dobijene su vrednosti prikazane u tabeli 4.16. i na graficima 4.27. i 4.28.

Tabela 4.16. Najbolja granična vrednost enzimske aktivnosti DPPIV u serumu i procenta CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na postojanje melanoma i pripadajuća senzitivnost i specifičnost, sa odgovarajućim 95%CI

Parametar	Najbolja granična vrednost*	Senzitivnost (95%CI) (%)	Specifičnost (95%CI) (%)
DPPIV	22,59	56,32 (45,98-66,67)	77,42 (66,13-87,1)
%CD26 ⁺ limfocita	7,68	69,66 (60,67-78,65)	70,97 (59,68-82,26)

*Vrednost za koju je postignuta maksimalna senzitivnost i specifičnost

Najbolja granična vrednost enzimske aktivnosti DPPIV u serumu je 22,59 IU/L, za najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti (Se = 56,32%, Sp = 77,42%), dok je najbolja granična vrednost procenta CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita koja pokazuje najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti 7,68% (Se = 69,66%, Sp = 70,97%).

Da bi se pokazala značajnost dobijenih rezultata za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu i % CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita, OR je korišćen kao pokazatelj odnosa između bolesnika sa melanomom i zdravih osoba u odnosu na date *cut-off* vrednosti. OR vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita prikazane su u tabeli 4.17.

Tabela 4.17. Odds Ratio za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita

	OR (95% CI)	p vrednost
DPPIV	0,828 (0,760 – 0,902)	p < 0,001
%CD26⁺ limfocita	0,907 (0,860 – 0,957)	p < 0,001

Interval poverenja i OR za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu, kao i za procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita ukazuju na postojanje značajne veze ovih parametara sa razvojem melanoma. U oba slučaja interval poverenja obuhvata vrednosti manje od 1, dok OR ima vrednost manju od 1, što ukazuje da ispitivani parametri imaju statistički značajan uticaj na nepovoljan ishod.

4.4. Učestalost limfocita i granulocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Učestalost limfocita i granulocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba prikazana je u tabeli 4.18.

Tabela 4.18. Učestalost limfocita i granulocita i populaciji leukocita kod bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba

Grupe ispitanika	N	% limfocita	% granulocita
Bolesnici sa melanomom	90	13,1 ± 8,24*	76,04 ± 10,92 [▲]
Bolesnici sa melanomom bez metastaza	30	12,42 ± 6,31**	77,57 ± 8,74 ^{▲▲}
Bolesnici sa melanomom sa metastazama	60	13,44 ± 9,08***	75,28 ± 11,86 ^{▲▲▲}
Bolesnici sa vitiligom	40	18,71 ± 6,88	68,51 ± 8,53
Zdrave osobe	62	18,85 ± 8,22	69,03 ± 10,29

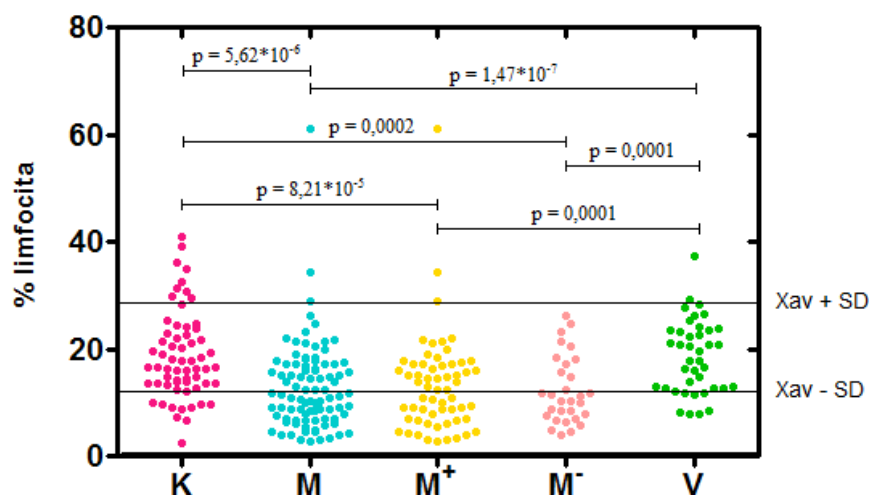
* $p = 1,47 \cdot 10^{-7}$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 5,62 \cdot 10^{-6}$ u odnosu na zdrave osobe
 ** $p = 0,0001$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0,0002$ u odnosu na zdrave osobe
 *** $p = 0,0001$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 8,21 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na zdrave osobe
 ▲ $p = 1,47 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 2,99 \cdot 10^{-5}$ u odnosu na zdrave osobe
 ▲▲ $p = 0,0001$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0,0002$ u odnosu na zdrave osobe
 ▲▲▲ $p = 0,0002$ u odnosu na bolesnike sa vitiligom, $p = 0,0006$ u odnosu na zdrave osobe
 N – broj bolesnika ili zdravih osoba

Procenat limfocita bio je statistički značajno niži kod bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Kako bolesnici sa melanomom bez metastaza tako i bolesnici sa melanomom sa metastazama imali su statistički značajno niži procenat limfocita u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave individue.

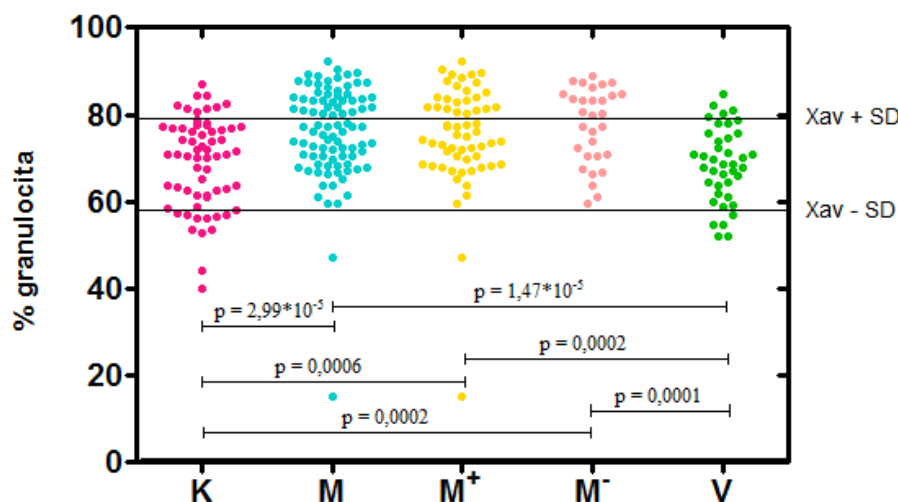
Procenat granulocita bio je statistički značajno viši i kod bolesnika sa melanomom bez metastaza i kod bolesnika sa melanomom sa metastazama u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Takođe, kod grupe bolesnika sa melanomom

procenat granulocita bio je statistički značajno viši u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe.

Distribucija procenta limfocita i granulocita kod bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba prikazana je na graficima 4.29. i 4.30.



Grafik 4.29. Učestalost limfocita u populaciji leukocita kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)



Grafik 4.30. Učestalost granulocita u populaciju leukocita kod zdravih kontrola (K), bolesnika sa melanomom (M), bolesnika sa melanomom sa metastazama (M⁺), bolesnika sa melanomom bez metastaza (M⁻) i bolesnika sa vitiligom (V)

4.5. Korelacije između učestalosti CD16⁺ i CD16⁺CD56⁺ limfocita, odnosno CD89⁺ granulocita i nivoa pojedinačnih klasa antitela specifičnih za melanin i tirozinazu kod bolesnika sa melanomom

Ispitivanje korelacija između procenta CD89⁺ granulocita, CD16⁺, odnosno CD16⁺CD56⁺ limfocita i nivoa pojedinačnih klasa antitela specifičnih za melanomske antigene, melanin i tirozinazu kod bolesnika sa melanomom vršeno je određivanjem Spirmanovog koeficijenta korelacije rangova. Rezultati ove analize prikazani su u tabelama 4.19. i 4.20.

Tabela 4.19. Korelacije između % CD16⁺ i % CD16⁺CD56⁺ limfocita i antitela specifičnih za melanomske antigene IgG klase

	%CD16 ⁺ limfocita (t)	%CD16 ⁺ limfocita (g)	%CD16 ⁺ CD56 ⁺ limfocita (t)	%CD16 ⁺ CD56 ⁺ limfocita (g)
Nivo anti-melaninskih IgG antitela	$\rho = -0,03$	$\rho = 0,06$	$\rho = 0,11$	$\rho = 0,16$
	$p = 0,810$	$p = 0,569$	$p = 0,353$	$p = 0,166$
Nivo anti-tirozinaznih IgG antitela	$\rho = -0,05$	$\rho = 0,17$	$\rho = -0,07$	$\rho = 0,13$
	$p = 0,661$	$p = 0,134$	$p = 0,539$	$p = 0,275$

Tabela 4.20. Korelacije između % CD89⁺ granulocita i antitela specifičnih za melanomske antigene IgA klase

	%CD89 ⁺ granulocita (t)	%CD89 ⁺ granulocita (g)
Nivo anti-melaninskih IgA antitela	$\rho = 0,020$	$\rho = -0,0008$
	$p = 0,876$	$p = 0,995$
Nivo anti-tirozinaznih IgA antitela	$\rho = 0,160$	$\rho = -0,119$
	$p = 0,21$	$p = 0,349$

Ispitivanjem korelacija pokazano je da ne postoji linearna povezanost između testiranih parametara.

5. DISKUSIJA

Terapija melanoma se već dugi niz godina značajno ne menja, i predstavlja veliki problem uprkos dostignućima eksperimentalne onkologije, poput otkrića brojnih lekova koji direktno ili indirektno utiču na razvoj i progresiju melanoma. Najveći broj istraživanja poslednjih godina fokusiran je na ispitivanje imunoterapijskih pristupa i uspostavljanju veze između imunskog odgovora bolesnika sa melanomom i same bolesti.

Jedan od najbitnijih principa imunoterapije melanoma zasniva se na pretpostavci da endogene T-ćelije uglavnom nemaju značajnu protektivnu ulogu, i da uspešna imunoterapija mora da uključi *de novo* T-ćelije specifične za tumorske antigene posredstvom antigen-specifičnih vakcina (Pfirschke i sar., 2015). Međutim, pokazano je da prisustvo već postojećih endogenih T-ćelija specifičnih za tumorske antigene ima veliki prognostički i terapijski potencijal (Galon i sar., 2006; Halama i sar., 2011; Al-Shibli i sar., 2008; Fukunaga i sar., 2004; Pfirschke i sar., 2015). T-ćelije specifične za tumor-asocirane antigene nisu prisutne samo u krvi i limfoidnim organima već se mogu izolovati i iz populacije tumor infiltrirajućih limfocita, što ukazuje na njihov značaj i ulogu u kontroli tumora (Rosenberg i sar., 2015; Beckhove i sar., 2004). Prisustvo i zastupljenosti T-ćelija specifičnih za tumorske antigene kod bolesnika sa melanomom predstavlja veoma važnu odrednicu za prognozu i uspešnost imunoterapije i može služiti kao biomarker (Griewank i sar., 2013). Ključni uslov za uključivanje podatka o prisutnosti T-ćelija specifičnih za melanomske antigene u odluku o lečenju melanoma jeste odabir odgovarajućeg tumorskog antigena (Pfirschke i sar., 2015). Skorašnje studije su pokazale efikasan prognostički značaj T-ćelija specifičnih za sopstvene tumorske antigene kod bolesnika sa melanomom (Weide i sar., 2012). Ovakve T-ćelije su mnogobrojne u tumorskom tkivu i njihova *in situ* aktivnost korelira sa povišenim preživljavanjem bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (Reissfelder i sar., 2015; Pfirschke i sar., 2015).

Od posebnog značaja su saznanja da imunski sistem bolesnika sa melanomom prepoznaje melanomske antigene koji su većinom identični antigenima neizmenjenih melanocita. To su tzv. diferencijacioni antigeni. Do sada identifikovani diferencijacioni melanomski antigeni su gp100, tirozinaza, TRP-1, TRP-2 i MART-1/Melan-A. Primena monoklonskih antitela specifičnih za diferencijacione antigene nije imala uspeha, jer bi u tom slučaju monoklonska antitela prepoznavala antigene na melanomskim ćelijama, ali i neizmenjenim melanocitima, i pojedinih drugih ćelija organizma. Prvi okarakterisan tumor-specifični antigen je mutirana forma CDK4 (Wölfel i sar., 1995).

Imunogena uloga tirozinaze kod melanoma je već pokazana, i rezultati prikazani u ovom radu su u skladu sa do sada objavljenim podacima o prisustvu antitela specifičnih za tirozinazu kod bolesnika sa melanomom, kao i kod bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba (Baharav i sar., 1996; Merimsky i sar., 1999; Fishman i sar., 1997). Podaci o prisustvu antitela specifičnih za iste antigene kod bolesnika sa melanomom i bolesnika sa vitiligom, kao i da određeni procenat bolesnika sa melanomom razvija lezije slične vitiligu, tzv. hipopigmentacije povezane sa melanomom, ukazuju na važnu vezu između tumorske imunosti i autoimunosti. Takođe, pokazano je da i melanin kao antigen ima važnu ulogu u kontroli melanoma od strane imunskog sistema. Anti-melaninska IgM antitela obeležena sa (188) Re pokazala su se kao veoma uspešna u radioimunoterapiji eksperimentalnog metastatskog melanoma, u svojstvu radionuklida (Revskeya i sar., 2009). Radioimunoterapija koristi antitela specifična za tumorske antigene kao vektore za radionuklide. Na mestu malignog tumora radionuklidi otpuštaju tumoricidne doze radijacije i ubijaju maligne ćelije (Milenic i sar., 2004; Sharkey i Goldenberg, 2005). Smatra se da u *in vivo* uslovima ćelije melanoma oslobađaju melanin usled ćelijske nekroze koja se javlja kao posledica izuzetno brzog rasta ovih ćelija. Zbog svoje visoke nerastvorljivosti melanin biva zarobljen u tumorskoj mikrosredini, gde predstavlja idealan ciljni molekul za dopremanje citotoksične radijacije putem radioobeleženih antitela specifičnih za melanin (Dadachova i sar., 2004). Takođe, pokazano je i da neobeležena 6D2 monoklonska antitela IgM izotipa imaju tumor-supresorski efekat na rast tumora u *in vivo* eksperimentalnim modelima (Dadachova i sar., 2004; Revskaya i sar., 2009; Jil i sar., 2013). Mehanizam kojim ova monoklonska

antitela specifična za melanin pokazuju svoje antitumorsko dejstvo je citotoksičnost posredovana komplementom, što je u skladu sa klasom 6D2 monoklonskog antitela. Međutim, u *in vitro* sistemu pokazano je da prisustvo melanina nije dovelo do povećanja citotoksičnosti pokrenute 6D2 monoklonskim antitelom, već naprotiv do smanjenja citotoksičnosti posredovane komplementom. Pretpostavka je da dolazi do formiranja kompleksa 6D2 monoklonskog antitela sa melaninom koji se u toku eksperimenta gube ispiranjem, što dovodi do manje koncentracije 6D2, pa samim tim i smanjene citotoksičnosti posredovane komplementom. Monoklonska antitela 6D2 takođe imaju sposobnost i da povećaju infiltraciju limfocita u tumorsko tkivo (Jil i sar., 2013). Ovi podaci ukazuju na važnost melanina kao antigena, kao i značaj anti-melaninskih antitela IgM klase u ovoj patologiji.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije zasnovana su na prethodno pomenutim imunološkim aspektima melanoma i vitiliga, odnosno na postojanju zajedničkih anti-melanocitnih antigena, tj. diferencijacionih antigena melanocita, i prisustvu specifičnog imunskog odgovora na ove antigene kod oba oboljenja. Dobijeni rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju nova saznanja o humoralnoj imunosti bolesnika sa melanomom, odnosno vitiligom specifičnoj za melanin i tirozinazu kao antigene. Primarni cilj ovog istraživanja bio je da se ispituju razlike u nivoima IgG, IgA i IgM klase antitela specifičnih za tirozinazu i melanin u bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa kliničkom slikom vitiliga i zdrave osobe. Takođe, akcenat je stavljen i na ispitivanje postojanja razlike u imunskom odgovoru između bolesnika sa melanomom bez metastaza i bolesnika sa melanomom sa metastazama.

Prisustvo serumskih antitela specifičnih za melanin do sada nije ispitivano kod bolesnika sa melanomom i bolesnika sa vitiligom. Pokazano je da melanin može da izazove imunski odgovor kod miševa, u smislu sinteze antitela specifičnih za melanin, tj. da je melanin sopstveni antigen koji može biti prepoznat od strane imunskog sistema (Nosanchuk i sar., 1998).

U ovom istraživanju nivo anti-melaninskih IgG antitela kod bolesnika sa melanomom bez metastaza bio je statistički značajno viši u odnosu na nivo IgG antitela specifičnih za melanin kod bolesnika sa melanomom sa metastazama, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba. Ovakav rezultat ukazuje na intenzivniji imunski

odgovor bolesnika sa melanomom bez metastaza u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe što je u skladu sa tim da je melanom visoko imunogeno oboljenje. Intenzivniji imunski odgovor bolesnika sa melanomom bez metastaza u odnosu na bolesnike sa melanomom i metastazama mogao bi se objasniti time da bolesnici sa melanomom u nižem stadijumu bolesti imaju efikasniji antitumorski imunski odgovor. Po teoriji o imunoeditovanju tumora imunski sistem ovih bolesnika je efikasniji u početnim fazama nastanka tumora. Prisustvo pojačane tumor-specifične imunosupresije kod bolesnika sa melanomom sa metastazama dovodi do slabijeg imunskog odgovora (Banchereau i sar., 2001; Gilboa, 1999; Pardoll, 1998; Fong i Engleman, 2000). Bolesnici sa melanomom sa metastazama imali su niži nivo anti-melaninskih IgG antitela i od bolesnika sa vitiligom. Nizak nivo anti-melaninskih IgG antitela kod bolesnika sa melanomom sa metastazama mogao bi da ukaže i na smanjenu ADCC aktivnost i citotoksičnost posredovanu kompleментом pokrenute ovom specifičnom klasom antitela, i eventualno usmeri dalja istraživanja u smeru poboljšanja antitumorskog imunskog odgovora ovih bolesnika modifikacijom nivoa ovih specifičnih IgG antitela. IgG imunski kompleksi imaju sposobnost da pokrenu inflamatorne reakcije na koži čak i u odsustvu komplemента, ali pokazuju neizbežnost aktiviranja FcγRIII (Hazenbos i sar., 1996). Statistički značajno niži procenat CD16⁺ limfocita u bolesnika sa melanomom sa i bez metastaza ide u prilog smanjenom citotoksičnom efektu IgG antitela. Dominantna uloga receptora FcγRIII, odnosno molekula CD16 u ispoljavanju citotoksičnosti IgG antitela, pre svega IgG1, IgG2a i IgG2b izotipova IgG klase antitela je već pokazana u nekim studijama (Ravetch i Bolli, 2001; Albanesi i sar., 2012). U singenim mišjim modelima metastatskog melanoma, IgG2a anti-melanocitna antitela dovela su do smanjenja metastaza kod *wild type* miševa, dok kod FcRγ-deficijentnih miševa nije detektovan ovaj efekat (Clynes i sar. 1998), što potvrđuje ulogu CD16 u posredovanju citotoksičnog efekta IgG antitela.

Do intenzivnijeg imunskog odgovora kod bolesnika sa melanomom moglo bi da dovede povećanje nivoa anti-melanomskih IgG antitela, s obzirom na podatak da IgG izotip autoantitela iz seruma bolesnika sa vitiligom inhibira proliferaciju ćelija melanoma (Fishman i sar., 1993). Povećanje ekspresije CD16 na površini limfocita kod bolesnika sa melanomom takođe bi moglo pozitivno da utiče na imunski odgovor ovih bolesnika. Pokazano je da matriksne metaloproteinaze imaju ulogu u sečenju

CD16 sa površine NK ćelija što dovodi do povećanja nivoa solubilnog CD16 molekula (Peruzzi i sar., 2013; Bazil i sar., 1994; Galon i sar., 1998). Povećanje nivoa solubilnog CD16, odnosno smanjenje nivoa CD16 vezanog za membranu ćelija za rezultat ima smanjenje citotoksične aktivnosti NK ćelija aktiviranih IgG antitelima (Mota i sar., 2003). S obzirom da je pokazano da je ekspresija matriksnih metaloproteinaza pojačana u slučaju invazivnog melanoma (Montgomery i sar. 1993; MacDougall i sar. 1995; Mueller, 1996; Durko i sar. 1997; Hofmann i sar., 2000), pretpostavlja se da je nivo solubilnog CD16 molekula veći u bolesnika sa melanomom sa metastazama, što bi moglo da uzrokuje smanjen nivo detektovanih IgG antitela specifičnih za melanin kod ovih bolesnika zbog pojačanog vezivanja IgG antitela za solubilni CD16.

Niži nivo anti-melaninskih IgG antitela kod bolesnika sa melanomom sa metastazama takođe bi mogao da bude posledica ekspresije Fc γ RIIb (CD32) inhibitornog receptora na ćelijama metastatskog melanoma. Naime, ovaj receptor ima ulogu u inhibiciji imunskog odgovora i pokazano je da je eksprimiran na površini ćelija metastatskog melanoma, dok se ne eksprimira na površini neizmenjenih melanocita, i veoma retko je eksprimiran na ćelijama primarnog melanoma (Cassard i sar., 2008). Fc γ RIIb na ćelijama metastatskog melanoma vezuju anti-melanomska IgG antitela koja samim tim ne mogu biti prepoznata od strane Fc γ receptora efektorskih ćelija (Cohen-Solal i sar., 2010), niti detektovana u serumu ovih bolesnika. Međutim, posledica vezivanja antitela za Fc γ RIIb na ćelijama melanoma može da dovede do inhibicije ili do stimulacije proliferacije melanomskih ćelija, što zavisi od tipa antigena koje prepoznaju anti-melanomska antitela u smislu da li ovi antigeni promovišu ili ne fosforilaciju intraćelijskog domena Fc γ RIIb (Pearse i sar., 1999; Cassard i sar., 2002; Cassard i sar., 2008; Cohen-Solal i sar., 2010). U zavisnosti od tipa anti-melanomskog antigena koga prepoznaju specifična IgG antitela zavisi da li će selekcijom biti favorizovane melanomske ćelije koje ekspimiraju ili ne ekspimiraju Fc γ RIIb, što može da ima uticaja na tok bolesti s obzirom na prethodno pomenuti podatak da metastatske ćelije melanoma ekspimiraju Fc γ RIIb.

Nivo IgG antitela specifičnih za melanin kod bolesnika sa vitiligom nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na zdrave osobe, ali treba napomenuti da su ovi bolesnici imali višu srednju vrednost nivoa anti-melaninskih IgG antitela od grupe zdravih osoba, što bi se moglo i očekivati s obzirom na etiologiju i mehanizme

patogeneze vitiliga, odnosno destrukciju melanocita koja predstavlja glavno obeležje ove bolesti. Rezultat povišenog nivoa antitela kod bolesnika sa vitiligom u odnosu na zdrave osobe bio je očekivan s obzirom da je i kod vitiliga, kao i kod melanoma, pokazano prisustvo citotoksičnih T-limfocita specifičnih za melanocitne diferencijacione antigene, odnosno sopstvene antigene eksprimirane kako na neizmenjenim melanocitima tako i na i ćelijama melanoma (Le Gal i sar., 2001; Mielcorn-Monson i sar., 2003; Ogg i sar., 1998; Garbelli i sar., 2005). Značajna uloga citotoksičnih T-limfocita specifičnih za melanocitne diferencijacione antigene kod bolesnika sa vitiligom dokazana je i postojanjem direktne povezanosti učestalosti ovih limfocita u ukupnom pulu T-ćelija i aktivnosti bolesti (Ogg i sar., 1998; Garbelli i sar., 2005).

U slučaju anti-tirozinaznih IgG antitela, testiranjem u odnosu na grupe dobijena je statistički značajna razlika u vrednosti nivoa anti-tirozinaznih IgG antitela, međutim po parovima grupa nije pokazana statistički značajna razlika. Zdrave osobe su imale najviši, a bolesnici sa vitiligom najniži nivo anti-tirozinaznih IgG antitela. Na osnovu do sada poznatih podataka očekivali smo da će najviši nivo anti-tirozinaznih IgG antitela imati bolesnici sa vitiligom (Merimsky i sar., 1998). Međutim, podaci iz literature pokazuju da nivo anti-tirozinaznih IgG antitela kod bolesnika sa vitiligom zavisi od tipa bolesti, odnosno od toga da li se radi o difuznom ili lokalizovanom vitiligu. Bolesnici sa difuznim vitiligom pokazivali su značajno viši nivo anti-tirozinaznih IgG antitela u odnosu na bolesnike sa lokalizovanom bolešću i zdrave osobe, dok su bolesnici sa lokalizovanim vitiligom imali niži nivo IgG antitela specifičnih za tirozinazu čak i od zdravih osoba (Baharav i sar., 1996). U našem istraživanju nije rađena kategorizacija bolesnika sa vitiligom prema tipu bolesti, i to može biti jedan od uzroka suprotnog rezultata. Bolesnici sa melanomom imali su niži nivo IgG antitela specifičnih za tirozinazu u odnosu na zdrave osobe, pri čemu nisu uočene statistički značajne razlike u nivoima anti-tirozinaznih IgG antitela između bolesnika sa metastazama i bolesnika bez metastaza, što je u skladu je sa rezultatima iz literature (Merimsky i sar., 1996). Snižen nivo anti-tirozinaznih IgG antitela u bolesnika sa melanomom u skladu je i sa uočenim statistički značajno nižim procentom CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita, odnosno limfocita koji eksprimiraju FcγRIII za IgG antitela kod bolesnika sa melanomom sa i bez metastaza u

odnosu na zdrave osobe, kao i sa statistički značajno nižim procentom limfocita, što odlikuje snižen imunski odgovor ovih bolesnika.

Niži nivo detektovanih anti-tirozinaznih IgG antitela u serumu obe grupe bolesnika sa melanomom i bolesnika sa vitiligom u skladu je sa podatkom da neizmenjeni melanociti i ćelije melanoma imaju sposobnost da apsorbuju antitela specifična za tirozinazu (Merimsky i sar., 1996; Merimsky i sar., 1998). U skorašnjoj studiji pokazano je da je dizajnirana vakcina, sastavljena od 6 intraćelijskih peptida poreklom od melanocitnih diferencijacionih proteina, dovela do indukcije IgG humoralnog imunskog odgovora kao i CD4 T-ćelijskog odgovora. Najveću imunogenost upravo su pokazali peptidi poreklom od tirozinaze (Reed i sar., 2015).

Razlika u odnosima nivoa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih IgG antitela kod bolesnika sa melanomom sa i bez metastaza delom bi mogla da bude posledica različitog tipa antigena u smislu da li favorizuju fosforilaciju intraćelijskog domena Fc γ RIIb tj. da li su favorizovane melanomske ćelije koje ekspimiraju ili ne ekspimiraju Fc γ RIIb.

Manipulacija interakcijama IgG i Fc receptora mogla bi da dovede do povećanja terapijske koristi citotoksičnih antitela kod infektivnih i malignih oboljenja ili do onesposobljavanja antitela u pokretanju efektorskog odgovora u slučaju lečenja organ-specifičnih autoimunskih bolesti posredovanih IgG antitelima, ili smanjenja štetnih efekata pojedinih antitela koja se koriste u terapijama (Ravetch i Bolli, 2001). Citotoksična IgG antitela pronađena kod različitih autoimunskih oboljenja koriste se za terapijske indikacije prilikom lečenja mnogih infektivnih i malignih oboljenja (Ravetch i Bolli, 2001). Spontana indukcija sinteze antitela specifičnih za tumorske antigene mogla bi da doprinese uspešnosti antitumorskog imunskog odgovora ili da interferira sa njim. Pojedina istraživanja ukazuju na to da je indukovani IgG humoralni imunski odgovor povezan sa poboljšanim preživljavanjem bolesnika sa melanomom (Reed i sar., 2015), dok druga navode da IgG antitelima posredovan humoralni imunski odgovor ima za rezultat promovisanje rasta tumora (Ireu i sar., 2010), tj. da je spontani specifični anti-tumorski odgovor antitela povezan sa lošijom prognozom i da bi određivanje statusa i profila IgG posredovanog humoralnog imunskog odgovora specifičnog za tumorske antigene samo doprinelo identifikaciji bolesnika visokog rizika (Zörnig i sar., 2015).

Procenat CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita bolesnika sa vitiligom bio je gotovo jednak procentu ovih ćelija u zdravih osoba. Pored statistički značajno sniženog procenta CD16⁺ limfocita, značajno niži procenat CD16⁺CD56⁺ limfocita, dobijen u ovom istraživanju, ukazuje na već poznatu deficijenciju ovih ćelijskih subpopulacija, kao i na suprimiran NK efekat i IgG posredovan ADCC efekat antitumorske imunosti bolesnika sa melanomom (Holtan i sar., 2011; Cartei i sar., 1993). Bolesnici sa melanomom sa i bez metastaza imali su statistički značajno niži procenat CD56⁺ i CD16⁺CD56⁺ limfocita u odnosu na zdrave osobe. Iako nije bilo statistički značajne razlike, bolesnici sa vitiligom takođe su imali niži procenat CD56⁺ i CD16⁺CD56⁺ limfocita u odnosu na zdrave osobe, što je u suprotnosti sa nekim literaturnim podacima (Basak i sar., 2008). Veći procenat ovih subpopulacija imunskih ćelija kod bolesnika sa vitiligom u odnosu na bolesnike sa melanomom je bio očekivan rezultat zbog autoimunskog aspekta vitiliga, iako nije detektovana statistička značajnost.

Nivo IgA klase antitela specifičnih za melanin nije pokazao statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa, mada su bolesnici sa melanomom, kako sa tako i bez metastaza, imali viši nivo anti-melaninskih IgA antitela u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Isti rezultat dobijen je i u slučaju IgA klase antitela specifičnih za tirozinazu. S obzirom na dobijen statistički značajno viši procenat CD89⁺ granulocita kod bolesnika sa melanomom bez metastaza u odnosu na zdrave osobe, može se zaključiti da ovi bolesnici imaju pojačan ADCC antitumorski efekat posredovan anti-melanomskim IgA antitelima (Teillaud, 2012). Takođe, bolesnici sa melanomom i metastazama su u ovom istraživanju imali viši procenat CD89⁺ granulocita u odnosu na zdrave osobe, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Povišen procenat CD89⁺ granulocita u skladu je sa statistički značajno višim procentom granulocita u bolesnika sa melanomom, sa i bez metastaza u odnosu na zdrave osobe. Povišen broj granulocita pokazao se kao nezavisan prognostički faktor za smanjeno ukupno preživljavanje bolesnika sa melanomom u IV stadijumu bolesti (Schmidt i sar., 2007; Bouwhuis i sar., 2011).

Povišen nivo anti-melaninskih IgA antitela pokazalo je 28 od 89 bolesnika sa melanomom bez značajne razlike u učestalosti povišenog nivoa antitela između bolesnika sa i bez metastaza, dok je povišen nivo anti-tirozinaznih IgA antitela

pokazalo 40 od 90 bolesnika sa melanomom, gde je od 40 bolesnika 28 imalo metastaze. Značajno viša produkcija anti-tirozinaznih antitela IgA klase kod bolesnika sa melanomom sa metastazama, mogla bi da ukaže na to da IgA posredovan imunski odgovor bolesnika sa melanomom nema značajnu ulogu u imunskom odgovoru indukovanom u cilju eliminacije tumora. Naprotiv, povišen nivo IgA antitela mogao bi da ukaže na moguću imunosupresivnu, odnosno blokirajuću ulogu IgA antitela kod melanoma, jer kao što je već poznato IgA antitela imaju sposobnost da blokiraju odnosno inhibiraju IgG posredovanu ADCC reakciju i citotoksičnost zavisnu od komplementa (Pearson i sar., 1978; Mathew i sar., 1980; Lohse i sar., 2010; Juranić i sar., 2003). Bolesnici sa vitiligom imali su niži nivo anti-melaninskih i anti-tirozinaznih IgA antitela od bolesnika sa melanomom, ali viši od zdravih osoba. Viši nivo IgA antitela specifičnih za melanin i tirozinazu kod bolesnika sa vitiligom u odnosu na zdrave osobe u skladu je sa podatkom iz literature da je stepen razvijenosti vitiliga povezan sa nivoom antimelanocitnih IgA antitela (Kemp i sar., 2007).

Nivo IgM antitela specifičnih za melanin kod bolesnika sa melanomom bio je statistički značajno niži u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Bolesnici sa vitiligom imali su viši nivo anti-melaninskih IgM antitela u odnosu na zdrave osobe, mada se ova razlika nije pokazala kao statistički značajna. IgM antitela imaju sposobnost aktivacije sistema komplementa i prva se sintetišu u humoralnom imunskom odgovoru. Takođe, pokazano je da IgM antitela poput IgG antitela imaju ulogu u pokretanju ADCC reakcije, (Dennert i Lennox, 1973; Blair i sar., 1976). Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa oslabljenim imunskim odgovorom bolesnika sa melanomom, i ukazuju na mogućí značaj IgM antitela specifičnih za melanin u antitumorskom imunskom odgovoru, odnosno kontroli maligne bolesti, kao i u destrukciji melanocita kod vitiliga. Merimsky i saradnici pretpostavljaju da je nizak nivo anti-melanomskih antitela posledica apsorpcije antitela od strane melanomskih ćelija, što dovodi do redukcije slobodne frakcije antitela u serumu (Merimsky i sar., 1998). Nizak nivo anti-tirozinaznih IgM antitela takođe je bio statistički značajno niži kod bolesnika sa melanomom, pre svega bolesnika sa metastazama, u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Viši nivo IgM anti-melanomskih antitela kod bolesnika sa vitiligom u odnosu na bolesnike sa melanomom je bio očekivan rezultat s obzirom da je vitiligo autoimunsko oboljenje koje odlikuje destrukcija melanocita.

Međutim, u slučaju IgM antitela specifičnih za tirozinazu, bolesnici sa vitiligom imali su niži nivo anti-tirozinaznih IgM antitela u serumu u odnosu na nivo ovih antitela u serumu zdravih osoba, ali bez statistički značajne razlike. Nizak nivo slobodnih anti-melanomskih IgM antitela mogao bi da bude i posledica učešća cirkulišućih IgM antitela u diseminaciji malignih ćelija krvnim sudovima. Naime, Tsai i saradnici su pokazali da anti-tumorska IgM antitela učestvuju u formiranju agregata tumorskih ćelija i na taj način promovišu hematogenu diseminaciju tumora (Tsai i sar., 2003). Ovaj podatak mogao bi delom da objasni snižen nivo anti-tirozinaznih IgM antitela u bolesnika sa melanomom i metastazama.

Posmatrajući učestalost bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba sa izmenjenim vrednostima nivoa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela, dobijeno je da od 90 bolesnika sa melanomom, 34 bolesnika imaju snižen nivo anti-tirozinaznih IgM antitela, od kojih je 27 bolesnika sa melanomom imalo metastaze. Ipak, nije dobijena statistički značajna razlika prilikom testiranja u odnosu na grupe sa posebno grupisanim bolesnicima sa melanomom sa i bez metastaza, nego samo za celu grupu bolesnika sa melanomom. Ovakav rezultat mogao bi da bude posledica malog broja ispitanika. Takođe, snižen nivo anti-melaninskih IgM antitela imalo je 20 od 89 bolesnika sa melanomom, od kojih je 16 bolesnika imalo metastaze. Povišen nivo IgM antitela specifičnih za melanin imalo je 11 od 40 bolesnika sa vitiligom.

Träger i saradnici su takođe ukazali na važnost imunskog odgovora specifičnog za melanomske antigene posredovanog antitelima IgM klase, kao i na vezu između autoimunosti i tumorske imunosti (Träger i sar., 2012). Naime, oni su pretpostavili da se prema antigenima povezanim sa melanomom, koji su zapravo sopstveni antigeni ekspimirani na melanocitima, razvija imunološka tolerancija i da je upravo ona delom odgovorna za smanjen anti-tumorski imunski odgovor. Pokazali su da bolesnici oboleli od autoimunske bolesti koja se naziva autoimunska poliendokrinopatija sa kiidijazom i ektodermalnom distrofijom (APECED) i nastaje usled mutacije *AIRE* gena, pokazuju IgM antitelima posredovan imunski odgovor specifičan za 5 različitih humanih ćelijskih linija melanoma. Takođe su pokazali da je kod *AIRE*^{-/-} miševa nakon injekcije B16F10 melanomskih ćelija dolazilo do odbacivanja tumora za razliku od *AIRE*^{+/+} miševa kod kojih je predominantno dolazilo do razvoja tumorske mase, kao i

da se kod 20% svih miševa na mestu injekcije ćelija pojavljivala depigmentacija, koja se razvijala i širila po celom telu samo kod *AIRE*^{-/-} miševa. Određivanjem nivoa antitela kod jedne i druge grupe miševa pokazali su da su *AIRE*^{-/-} miševi imali značajno viši nivo B16F10-specifičnih IgM antitela u odnosu na *AIRE*^{+/+} miševe, kako pre tako i posle injekcije melanomskih ćelija. Nivo B16F10-specifičnih IgG antitela se značajno povisio nakon injekcije melanomskih ćelija, ali bez razlike između grupa miševa što je pokazalo da su T pomoćnički limfociti aktivni i u prisustvu i u odsustvu *AIRE*. Kao i IgM antitela, i IgG antitela su bila značajno povišena kod *AIRE*^{-/-} miševa pre injekcije tumorskih ćelija, u odnosu na *AIRE*^{+/+} grupu miševa, što ukazuje da su pomoćničke T-ćelije bile izložene melanomskim antigenima, eksprimiranim na melanocitima, i pre izlaganju B16F10 ćelijama. Takođe su zaključili da odbacivanje melanoma nije posredovano imunskim mehanizmima pokrenutim IgG antitelima (Träger i sar., 2012).

Značajnost produkcije različitih izotipova antitela specifičnih za melanin i tirozinazu u bolesnika sa melanomom dodatno je potvrđena ROC analizom koja je pokazala da anti-melaninska antitela IgG, IgA i IgM klase, kao i anti-tirozinazna antitela IgA i IgM klase, imaju statistički značajnu moć diskriminacije između bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave osobe. Međutim, odds ratio vrednosti za nivo anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela IgG, IgM i IgA klasa nisu ukazale na značaj ovih parametara za nepovoljan ishod, odnosno razvoj bolesti.

Dobijeni rezultati ukazuju da se nivoi analiziranih klasa imunoglobulina specifičnih za melanomske antigene značajno razlikuju kod bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave osobe, kao i da variraju u zavisnosti od prisustva metastaza.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bila su usmerena i na određivanje ekspresije CD26/DPPIV antigena na površini limfocita, kao i na određivanje enzimske aktivnosti DPPIV u serumu, u bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba, u cilju rasvetljavanja moguće uloge CD26/DPPIV u razvoju i progresiji melanoma, kao i potencijalnog dijagnostičkog značaja ovih parametara.

CD26/DPPIV je multifunkcionalni protein, koji ima značajnu regulatornu ulogu u brojnim fiziološkim procesima zavisno od tipa ćelija i uslova u kojima je eksprimiran (Boonacker i Noorden, 2003). U literaturi postoji dosta podataka o vezi CD26/DPPIV sa različitim tipovima maligniteta. Dok je u pojedinim tipovima

malignih tumora ekspresija i/ili enzimska aktivnost ovog molekula povišena u odnosu na zdrave osobe, u drugim tipovima malignih tumora nivo ekspresije i enzimska aktivnost DPPIV u serumu su snižene (Cordero i sar., 2009; Havre i sar., 2008). Pokazano je da DPPIV kod nekih tipova malignih tumora može imati tumor-suprimirajuću ulogu, kao i suprotnu, odnosno tumor-promovišuću ulogu kod drugih tipova malignih tumora. Smatra se da tumor-promovišuća, odnosno tumor-suprimirajuća uloga ovog multifunkcionalnog proteina zavisi od nivoa ekspresije DPPIV, kao i interakcija sa specifičnim biomolekulima uključenim u inicijaciju, razvoj i progresiju malignih tumora.

U slučaju melanoma, ekspresija CD26 u do sada objavljenim istraživanjima praćena je na neoplastično transformisanim melanocitima, dok je u ovom istraživanju po prvi put određivana ekspresija CD26 na površini limfocita, kao i enzimska aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom. Rezultati ovog istraživanja su pokazali statistički značajno nižu enzimsku aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Smanjenje enzimske aktivnosti DPPIV nije bilo zavisno od prisustva metastaza, s obzirom da razlike između vrednosti aktivnosti DPPIV u serumu u bolesnika sa melanomom sa metastazama i bolesnika sa melanomom bez metastaza nisu bile statistički značajne. Podaci iz literature za referentne vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu se značajno razlikuju u pojedinim studijama što zavisi od eksperimentalne procedure, kao i od broja zdravih osoba koji su učestvovali u studiji, dok su referentne vrednosti za aktivnost DPPIV u serumu dobijene u ovom istraživanju u skladu sa sa nekim od objavljenih radova (Hino i sar. 1975; Mannucci i sar., 2005; Scharpé i sar., 1988; Durinx i sar., 2001). Nekoliko studija (Cordero i sar., 2000; Javidroozi i sar., 2012) pokazalo je da je koncentracija solubilne forme DPPIV u serumu takođe značajno niža kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom u odnosu na zdrave osobe, kao i da bolesnici sa kolorektalnim karcinomom sa metastazama imaju povišen nivo ovog enzima u odnosu na bolesnike bez metastaza (Cordero i sar., 2000; Javidroozi i sar., 2012; Lam i sar., 2014). Sa druge strane Larrinaga i saradnici su dobili rezultate koji pokazuju sniženu enzimsku aktivnost DPPIV kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom ali bez razlike između bolesnika sa metastazama i bolesnika bez metastaza (Larrinaga i sar., 2015). Ovi rezultati podudaraju se sa rezultatima

dobijenim u našem istraživanju, u smislu da enzimski aktivnost DPPIV u serumu nije u korelaciji sa metastatskim statusom bolesnika. Neslaganje između studija moglo bi da bude posledica razlike u broju bolesnika sa i bez metastaza. Takođe, trebalo bi uzeti u obzir i nekoliko već opisanih bioloških fenomena koji mogu uticati na promenu aktivnosti enzima DPPIV bez uticaja na nivo samog enzima. Pokazano je prisustvo cirkulišućih molekula koji imaju sposobnost da menjaju enzimsku aktivnost DPPIV (Cordero i sar., 2011; Nazarian i sar., 2014). Nazarian i saradnici pokazali su da bolesnici sa karcinomom prostate sa metastazama imaju sniženu aktivnost DPPIV u serumu, dok je nivo samog proteina u serumu sličan nivou kod bolesnika sa lokalizovanim primarnim tumorom, što ukazuje na moguće postojanje cirkulišućih peptida koji deluju inhibitorno na aktivnost DPPIV (Nazarian i sar., 2014; Cordero i sar., 2011; Larrinaga i sar., 20015). Snižen nivo solubilnog CD26 u serumu takođe je pronađen kod bolesnika sa karcinomom želuca u odnosu na zdrave osobe, nezavisno od godina, pola ili drugih tumorskih biomarkera.

Ovakvi podaci ukazuju na potencijalnu važnost uporednog ispitivanja enzimski aktivnosti DPPIV i koncentracije ovog enzima u serumu kod bolesnika sa malignim tumorima. Značajno niža aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave osobe ukazuje na to da bi promene u enzimskoj aktivnosti DPPIV mogle da imaju ulogu u razvoju i progresiji melanoma. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se rasvetlio uzrok i značaj promena u enzimskoj aktivnosti DPPIV u bolesnika sa melanomom, a posebno mogući prognostički značaj.

Bolesnici sa melanomom imali su statistički značajno niži procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe. Rezultati istraživanja ukazuju da prisustvo metastaza nema uticaja ni na procenat CD26⁺ limfocita, kao ni na promene u enzimskoj aktivnosti DPPIV u serumu. Snižena aktivnost DPPIV u serumu, kao i snižen procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita, mogli bi da se objasne statistički značajno smanjenim procentom limfocita kod bolesnika sa melanomom. Uočeno sniženje procenta limfocita, koji predstavljaju jedan od najznačajnijih izvora solubilne forme DPPIV u serumu, moglo bi da bude uzrokovano tumor-specifičnom imunosupresijom ili promenama u „homing“-u limfocita (engl. *lymphocytes homing*, proces u kome pojedine subklase limfocita selektivno naseljavaju pojedina tkiva) indukovanim promenama u gradijentu hemokina

(Cordero i sar., 2009). Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima o postojanju korelacije između promena aktivnosti DPPIV u serumu i broja limfocita, T-limfocita ili CD26⁺ limfocita, kao i nivoa ekspresije CD26 na površini membrane limfocita (Cordero i sar., 2009). U ovom istraživanju određivali smo takođe i srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26 na limfocitima u grupama bolesnika sa melanomom, bolesnika sa vitiligom i zdravih osoba. Iako su bolesnici sa melanomom pokazali najnižu vrednost ovog parametra, ipak nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Snižena ekspresija CD26 na površini limfocita je bio očekivana kod bolesnika sa melanomom, s obzirom na snižen procenat CD26⁺ ćelija i sniženu aktivnost DPPIV u serumu ovih bolesnika. Promene u ekspresiji CD26, pre svega smanjenje ekspresije CD26 na limfocitima, moglo bi da dovede do promena u broju ukupnih limfocita kao posledica povećanja koncentracije adenoza, s obzirom da CD26 vezivanjem za adozin deaminazu omogućava efikasnu inaktivaciju toksičnog adenoza do netoksičnog inozina (Boonacker i Noorden, 2003; Cordero i sar., 2009; Lambeir i sar., 2003). Interakcija adozin deaminaze vezane za receptor na dendritskim ćelijama sa CD26 na limfocitima ima kostimulatornu ulogu, odnosno dovodi do pojačanog imunskog odgovora tj. do povećane aktivacije T-ćelija (Pacheco i sar., 2005). S obzirom na činjenicu da imunosupresivni faktor TGF- β_1 , koga sintetišu maligne ćelije, smanjuje ekspresiju CD26 na limfocitima *in vitro* i nivo solubilnog CD26 u supernatantu kulture (Uematsu i sar., 2004), postoji mogućnost da TGF- β_1 takođe smanjuje nivo solubilnog CD26 kod bolesnika sa malignim oboljenjem, što rezultuje T-ćelijskom tolerancijom (Cordero i sar., 2009). Pokazano je da kod bolesnika sa melanomom postoji povišena koncentracija TGF- β_1 u serumu, i da njegova povećana koncentracija u serumu predstavlja nepovoljan prognostički faktor za preživljavanje ovih bolesnika (Tas i sar., 2014). Kao mogući uzrok smanjenja procenta CD26⁺ limfocita treba napomenuti i činjenicu da je sekrecija IL-12, koji ima sposobnost da stimuliše ekspresiju CD26 na T-limfocitima, u malignim oboljenjima smanjena usled neadekvatnog antitumorskog imunskog odgovora (O'Hara i sar., 1998; Cordero i sar., 1997; Boccardi i sar., 2015).

Značajno niži procenat limfocita u grupi bolesnika sa melanomom u odnosu na grupu zdravih osoba, i grupu zdravih kontrola u skladu je sa do sada objavljenim literaturnim podacima. Naime, Bernengo i saradnici su pokazali da snižen nivo

limfocita kod bolesnika sa melanomom ukazuje na lošiju prognozu u odnosu na bolesnike sa normalnim brojem limfocita (Bernengo i sar., 1983; Bouwhuis i sar., 2011). Takođe, kod bolesnika sa metastatskim melanomom koji su primali terapiju IL-2, broj limfocita nakon terapije bio je značajno viši kod bolesnika koji su odgovarali na terapiju u odnosu na bolesnike koji nisu davali povoljan odgovor na terapiju (Phan i sar., 2001; Rosenberg i sar., 1998; West i sar., 1987; Bouwhuis i sar., 2011).

Pokazano je da reekspresija CD26 dovodi do povećanja ekspresije humane tirozinaze, odnosno do uklanjanja blokade normalnog diferenciranja melanocitnih ćelija koja se dešava tokom neoplastične transformacije ćelije. U toku normalne diferencijacije melanocita, povećana ekspresija tirozinaze dešava se u kasnijoj fazi (Wesley i sar., 1999), što ukazuje da ćelije melanoma imaju niži nivo ekspresije ovog enzima. Ovakav podatak je u skladu sa sniženim nivoom IgG i IgM antitela specifičnih za tirozinazu kod bolesnika sa melanomom. Povećanje ekspresije CD26 dovelo bi do povećane ekspresije tirozinaze kod ovih bolesnika što bi moglo da dovede do povećanja sinteze antitela specifičnih za tirozinazu i samim tim do pojačanog antitumorskog imunskog odgovora.

Mogući klinički značaj snižene aktivnosti DPPIV u serumu, kao i sniženog procenta CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa melanomom, dodatno je potvrđen ROC analizom, koja je pokazala da oba parametra imaju značajnu moć diskriminacije između grupe bolesnika sa melanomom i grupe zdravih osoba. Odds ratio (OR<1) vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita ukazale su da rezultat sniženih vrednosti navedenih parametara upravo pokazuje veći rizik za nepovoljan ishod, odnosno za nastanak melanoma. Enzimska aktivnost DPPIV u serumu i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji leukocita stoga pokazuju dijagnostički značaj, odnosno protektivni efekat, što je u skladu sa našim rezultatima da su kod bolesnika sa melanomom vrednosti ovih parametara snižene. S obzirom da je pokazano da CD26 molekul u melanomu ima tumor-suprimirajuću ulogu, pomenuti podaci, uz uočeno sniženje ekspresije CD26 na površini limfocita u grupi bolesnika sa melanomom, u odnosu na grupu zdravih osoba, ukazuju da bi kod bolesnika sa melanomom trebalo pojačati ekspresiju CD26 na limfocitima. Dobijeni rezultati potvrđuju vezu DPPIV i imunskog sistema i ukazuju na potencijalnu ulogu DPPIV u mehanizmima patogeneze melanoma. Na osnovu

dobijenih rezultata, možemo zaključiti da bi stimulacija ekspresije CD26 i enzimske aktivnosti DPPIV mogla da dovede do intenzivnijeg imunskog odgovora u bolesnika sa melanomom.

Pokazano je da bi određivanje koncentracije CD26/DPPIV u serumu moglo da bude od velike važnosti i u drugim tipovima malignih oboljenja. U slučaju kolorektalnog karcinoma enzim DPPIV je pokazao prognostički značaj, a takođe i značaj u postavljanju rane dijagnoze ovog oboljenja (Larrinaga i sar., 2015). Prognostički značaj nivoa CD26 u serumu pokazan je i u slučajevima karcinoma želuca, kod kojih je nivo DPPIV u serumu značajno niži u odnosu na zdrave osobe. Važnost ovog enzima kod bolesnika sa karcinomom želuca potvrđuje i podatak da se njegov nivo u serumu značajno povećava nakon hirurške intervencije (Boccardi i sar., 2015).

Specifična aktivacija imunskog sistema u kontroli maligne bolesti predstavlja glavni cilj medikalne onkologije. Naši rezultati dokazali su postojanje specifičnog imunskog odgovora bolesnika sa melanomom. Identifikacija antigena povezanih sa malignim tumorom obezbeđuje osnovu za koncipiranje novih strategija antigen-specifične imunoterapije. Izmenjeni nivoi pojedinačnih klasa antitela specifičnih za melanin i tirozinazu kod bolesnika sa melanomom u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe, ukazuju na moguću imunomodulatorni značaj ovih melanomskih antigena. Stimulacija, odnosno inhibicija biosinteze pojedinačnih klasa anti-melaninskih i anti-tirozinaznih antitela mogla bi da ima značajni uticaj na antitumorski imunski odgovor bolesnika sa melanomom. Poseban značaj ima podatak o IgG anti-melaninskim antitelima, koji ukazuje i na diskriminaciju prisustva metastaza kod bolesnika sa melanomom. IgG klasa antitela ima najveći afinitet za antigene povezane sa tumorom, najlakše penetrira u tumor i u najvećoj meri posreduje u antitelo zavisnoj ćelijskoj citotoksičnosti (Adamina i Oertli, 2005), pa bi se stoga stimulacijom biosinteze specifičnih anti-melanomskih IgG antitela kao glavnih medijatora antitumorskog imunskog odgovora mogao postići intenzivniji antitumorski imunski odgovor ovih bolesnika. Intenzivniji IgG antitelima posredovan specifičan imunski odgovor mogao bi se postići imunizacijom specifičnim, odnosno melanomskim antigenima, ili korišćenjem specifičnih tj. anti-idiotipskih monoklonskih antitela. Antitumorski humoralni imunski odgovor indukovani vakcinacijom mogao bi dovesti do

veoma povoljnog ishoda ovih bolesnika (Livingston i sar., 1994). Naime, prirodno indukovana biosinteza antitumorskih antitela povezana je sa dužim preživljavanjem bolesnika sa tumorom (Jones i sar., 1981; von Mensdorff-Pouilly i sar., 2000). Da li će antitumorska antitela promovisati ili kontrolisati rast i progresiju tumora može zavistiti od ravnoteže između sposobnosti antitela da promovišu agregaciju i diseminaciju malignih ćelija, kao što je to slučaj sa IgM antitumorskim antitelima, i antitumorske aktivnosti antitela, u smislu efikasnosti aktivacije komplementa ili sposobnosti aktivacije efektorskih ćelija (Tsai i sar., 2003).

Promene u enzimskoj aktivnosti DPPIV u serumu i ekspresiji CD26 na površini limfocita, kao i izmenjeni nivoi pojedinačnih klasa antitela specifičnih za melanomske antigene, melanin i tirozinazu, kod bolesnika sa melanomom u poređenju sa zdravim osobama ukazuju na značaj specifičnog imunskog odgovora u patogenezi melanoma. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju značaj veze između antitumorskog imunskog odgovora i autoimunosti kod bolesnika sa melanomom. Iako prisustvo melanom specifičnih citotoksičnih T-limfocita kod bolesnika sa melanomom ukazuje da maligne ćelije ne mogu u potpunosti da izbegnu prepoznavanje od strane imunskog sistema, imunski sistem veoma retko može da zaustavi rast tumora kod bolesnika sa progresivnom bolešću (Ferrone i Marincola, 1995; Hahne i sar., 1996; Maeurer i sar., 1996; Garbelli i sar., 2005). Stoga bi imunski odgovor specifičan za melanocitne diferencijacione antigene prisutan kod bolesnika sa vitiligom mogao da predstavlja efikasnu formu antitumorskog imunskog odgovora kod bolesnika sa melanomom. Ovi podaci, čine melanom/vitiligo dihotomiju važnim modelom za imunološka ispitivanja koja bi trebalo da doprinesu razvoju novih efikasnijih imunoterapijskih pristupa (Garbelli i sar., 2005).

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, a na osnovu iznetih rezultata mogu se formulirati sledeći zaključci:

1. Bolesnici sa melanomom bez metastaza imaju statistički značajno viši nivo anti-melaninskih IgG antitela u odnosu na bolesnike sa melanomom i metastazama.
2. Bolesnici sa vitiligom i bolesnici sa melanomom bez i sa metastazama imaju niži nivo IgG antitela specifičnih za tirozinazu u odnosu na zdrave osobe.
3. Bolesnici sa melanomom imaju statistički značajno manji procenat CD16⁺ limfocita u populaciji leukocita, značajno manji procenat CD56⁺ i CD16⁺CD56⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita, kao i značajno manji procenat limfocita u odnosu na zdrave osobe.
4. Bolesnici sa melanomom imaju viši nivo anti-melanininskih i anti-tirozinaznih IgA antitela u odnosu na bolesnike sa vitiligom i zdrave osobe, a bolesnici sa vitiligom imaju viši nivo ovih antitela u poređenju sa zdravim osobama.
5. Nivoi anti-melaninskih i anti-tirozinaznih IgM antitela kod bolesnika sa melanomom su statistički značajno niži u odnosu na nivoe ovih antitela kod zdravih osoba.
6. Nivoi anti-melaninskih IgG, IgA i IgM antitela, i anti-tirozinaznih IgA i IgM antitela imaju statistički značajnu moć diskriminacije bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave osobe.

-
-
7. Bolesnici sa melanomom imaju statistički značajno nižu aktivnost DPPIV u serumu i značajno manji procenat CD26⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita u odnosu na grupu zdravih osoba i grupu bolesnika sa vitiligom.
 8. Smanjenje enzimske aktivnosti DPPIV, i procenta CD26⁺ limfocita, kod bolesnika sa melanomom nije zavisno od prisustva metastatske bolesti.
 9. Enzimska aktivnost DPPIV u serumu, i procenat CD26⁺ limfocita u populaciji ukupnih leukocita imaju statistički značajnu moć diskriminacije bolesnika sa melanomom u odnosu na zdrave osobe.

7. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier, Philadelphia. 8th edition, 2015.

Abbott CA, Gorrell MD, Kobayashi Y, Kawasaki T, Liddle C, Bishop GA, i sar. Increased serum levels of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in rats undergoing liver regeneration. *Int Hepatol Commun*. 1995;4(3):165-74.

Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ. IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol*. 1989;142(7):2393-400.

Adamina M, Oertli D. Antigen specific active immunotherapy: lessons from the first decade. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(15-16):212-21.

Agrup P, Carstam R, Wittbjer A, Rorsman H, Tosengren E. Tyrosinase activity in serum from patients with malignant melanoma. *Acta Derm Venereol*. 1989;69:120-4.

Aguissa-Touré A-HH, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell Mol Life Sci*.;69(9):1475-91.

Al Badri AMT, Foulis AK, Todd PM, Garioch JJ, Gudgeon JE, Stewart DG, i sar. Abnormal expression of MHC class II and ICAM-1 by melanocytes in vitiligo. *J Pathol*. 1993;169:203-6.

Albanesi M, Mancardi DA, Macdonald LE, Iannascoli B, Zitvogel L, Murphy AJ, i sar. Cutting edge: FcγRIII (CD16) i FcγRI (CD64) are responsible for anti-glycoprotein 75 monoclonal antibody TA99 therapy for experimental metastatic B16 melanoma. *J Immunol*. 2012;189(12):5513-7.

Albino AP, Sozzi G, Nanus DM, Jhanwar SC, Houghton AN. Malignant transformation of human melanocytes: induction of a complete melanoma phenotype and genotype. *Oncogene*. 1992;7(11):2315-21.

Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund L-TT. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5220-7.

Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, i sar. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med*. 1993;177:989-98.

Arcott WT, LaBauve AE, May V, Wesley UV. Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation. *Oncogene*. 2009;28(4):479-91.

Ayude D, de la Cadena M, Cordero O, Nogueira M, Ayude J, Fernández-Briera A, i sar. Clinical Interest of the Combined Use of Serum CD26 and Alpha-L-Fucosidase in the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. *Dis Markers*. 2004;19(6):267-72.

Ayude D, Páez de la Cadena M, Cordero OJ, Nogueira M, Ayude J, Fernández-Briera A, i sar. Clinical interest of the combined use of serum CD26 and alpha-L-fucosidase in the early diagnosis of colorectal cancer. *Dis Markers*. 2003;19(6):267-72.

Azoury S, Lange J. Epidemiology, Risk Factors, Prevention, i Early Detection of Melanoma. *Surg Clin North Am*. 2014;94:945-62.

Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 i GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-57.

Baharav E, Merimski O, Shoenfeld Y, Zigelman R, Gilbrud B, Yechezkel G, i sar. Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin Exp Immunol*. 1996;105(1):84-8.

Baharav E, Merimsky O, Altomonte M, Shoenfeld Y, Pavlovic M, Maio M, i sar. Anti-tyrosinase antibodies participate in the immune response to vaccination with anti-idiotypic antibodies mimicking the high-molecular-weight melanoma-associated antigen. *Melanoma Res*. 1995;5(5):337-43.

Balch C, Gershenwald J, Soong S, Thompson J, Atkins M, Byrd D, i sar. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging i Classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.

Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolli A, i sar. Immune i clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res*. 2001;61(17):6451-8.

Basak PY, Adiloglu AK, Koc IG, Tas T, Akkaya VB. Evaluation of activatory and inhibitory natural killer cell receptors in non-segmental vitiligo: a flow cytometric study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22(8):970-6.

Baumgartner J, Wilson C, Palmer B, Richter D, Banerjee A, McCarter M. Melanoma induces immunosuppression by up-regulating FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Surg Res.* 2007;141(1):72-7.

Bazil V, Strominger JL. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of 1-selectin via CD16. *J Immunol.* 1994;152:1314-22.

Becker JC, Guldberg P, Zeuthen J, Brocker EB, Straten PT. Accumulation of identical T cells in melanoma and vitiligo-like leukoderma. *J Invest Dermatol.* 1999;113:1033-8.

Beckhove P, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, et al. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest.* 2004;114(1):67-76.

Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21(1):27-38.

Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature.* 2011;480(7375):94-8.

Besu I, Jankovic L, Magdu IU, Konic-Ristic A, Raskovic S, Juranic Z. Humoral immunity to cow's milk proteins and gliadin within the etiology of recurrent aphthous ulcers? *Oral Dis.* 2009;15(8):560-4.

Biarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract.* 2010, 2010 pii: 583748.

Blackburn WD, Minghetti PP, Schrohenloher RE, Chatham WW. Activation of human neutrophils by surface-associated IgA is associated with the release of activated collagenase. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;76(3 Pt 1):241-7.

Blair PB, Lane MA, Mar P. Antibody in the sera of tumor-bearing mice that mediates spleen cell cytotoxicity toward the autologous tumor. *J Immunol.* 1976;116(3):606-9.

Boccardi V, Marano L, Rossetti R, Rizzo M, Martino N, Paolisso G. Serum CD26 levels in patients with gastric cancer: a novel potential diagnostic marker. *Bmc Cancer.* 2015;15(1):703.

Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;183(3):725-9.

Boonacker E, Noorden C. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPiV. *Eur J Cell Biol.* 2003;82(2):53-73.

Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN. Production and characterization of antibodies against human tyrosinase. *J Invest Dermatol.* 1994;102:291-5.

Boukamp P. UV-induced skin cancer: similarities-variations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005;3(7):493-503.

Bournazos S, DiLillo DJ, Ravetch JV. The role of Fc–FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *J Exp Med.* 2015;212(9):1361-9.

Bouwhuis M, Hagen T, Eggermont A. Immunologic functions as prognostic indicators in melanoma. *Mol Oncol.* 2011;5(2):183-9.

Boyse EA, Old LJ. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Ann. Rev. Genet.* 1969;3:269-90.

Braud F, Khayat D, Kroon B, Valdagni R, Bruzzi P, Cascinelli N. Malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;47(1):35-63.

Braun AR, Balkin TJ, Wesensten NJ, Gwady F, Carson RE, Varga M, i sar. Dissociated pattern of activity in visual cortices i their projections during human rapid eye movement sleep. *Science.* 1998;279(5347):91-5.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172(5):902-8

Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plean E, Lethe' B, i sar. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanoma. *J Exp Med.* 1993;178:489-95.

Brichard VG, Herman J, Van Pel A, Wildmann C, Gaugler B, Wölfel T, i sar. A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1996;26(1):224-30.

Britzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature.* 1984;311(5981):71-3.

Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, i sar. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun.* 2011;3(3):216-26.

Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue S, Ettenberg S, Knee D, i sar. Activating Fc γ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med.* 2013;210(9):1685-93.

Burke S, Lakshmikanth T, Colucci F, Carbone E. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends Immunol.* 2010;31:339-45.

Byrd JB, Touzin K, Sile S, Gainer JV, Yu C, Nadeau J, i sar. Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema. *Hypertension*. 2008;51(1):141-7.

Byrne K, Côté A, Zhang P, Steinberg S, Guo Y, Allie R, i sar. Autoimmune melanocyte destruction is required for robust CD8⁺ memory T cell responses to mouse melanoma. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1797-809.

Byrne KT, Turk MJ. New perspectives on the role of vitiligo in immune responses to melanoma. *Oncotarget*. 2011;2(9):684-94.

Carbone A, Cozzi M, Gloghini A, Pinto A. CD26/dipeptidyl peptidase IV expression in human lymphomas is restricted to CD30-positive anaplastic large cell and a subset of T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol*. 1994;25(12):1360-5.

Carbone A, Gloghini A, Zagonel V, Aldinucci D, Gattei V, Degan M, i sar. The expression of CD26 i CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non-Hodgkin's lymphomas/leukemias. *Blood*. 1995;86(12):4617-26.

Cartei G, Sala PG, Sanzari M, Ceschia V, Clocchiatti L, Sibau A, i sar. Reduced lymphocyte subpopulations in patients with advanced or disseminated melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28:738-44.

Cassard L, Cohen-Solal JF, Fournier EM, Camilleri-Broët S, Spatz A, Chouaïb S, i sar. Selective expression of inhibitory Fcγ receptor by metastatic melanoma impairs tumor susceptibility to IgG-dependent cellular response. *Int J Cancer*. 2008;123(12):2832-9.

Cassard L, Cohen-Solal JF, Galinha A, Sastre-Garau X, Mathiot C, Galon J, i sar. Modulation of tumor growth by inhibitory Fc(γ) receptor expressed by human melanoma cells. *J Clin Invest*. 2002;110(10):1549-57.

Chamberlain AJ, Fritschi L, Kelly JW. Nodular melanoma: patients' perceptions of presenting features and implications for earlier detection. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48:694-701.

Chen WT, Kelly T. Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(2-3):259-69.

Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC, Pauli BU. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion i metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem*. 1998;273(37):24207-15.

Christopherson KW 2nd, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*. 2004;305(5686):1000-3.

Ciil A, Rey C, Delgado J. Malignant Melanoma. *ISRN Dermatol*. 2012;2012.

Cipponi A, Wieers G, Baren N, Coulie P. Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(8):1153-60.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29:705-27.

Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, i sar. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81(24):1893-904.

Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch J. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(2):652-6.

Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, i sar. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1997;79(12):2320-8.

Cohen-Solal JF, Cassard L, Fournier EM, Loncar SM, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Metastatic melanomas express inhibitory low affinity fc gamma receptor and escape humoral immunity. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010:657406.

Cooper M, Fehniger T, Caligiuri M. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633-40.

Cordero O, Salgado F, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(11):1723-47.

Cordero OJ, Ayude D, Nogueira M, Rodriguez-Berrocal FJ, de la Cadena MP. Preoperative serum CD26 levels: diagnostic efficiency i predictive value for colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000;83(9):1139-46.

Cordero OJ, Imbernon M, Chiara LD, Martinez-Zorzano VS, Ayude D, de la Cadena MP, i sar. Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection. *World J Clin Oncol.* 2011;2(6):245-61.

Cordero OJ, Salgado FJ, Fernández-Alonso CM, Herrera C, Lluís C, Franco R, i sar. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):920-30.

Cordero OJ, Salgado FJ, Mera-Varela A, Nogueira M. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, i adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2001;21(2):69-74.

Cordero OJ, Salgado FJ, Viñuela JE, Nogueira M. Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology*. 1997;197(5):522-33.

Cormier JN, Abati A, Fetsch P, Hijazi YM, Rosenberg SA, Marincola FM, i sar. Comparative analysis of the *in vivo* expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J Immunother*. 1998;21(1):27-31.

Cuchacovich M, Gatica H, Pizzo SV, Gonzalez-Gronow M. Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19(6):673-80.

Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, i sar. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*. 2007;128(5):853-64.

Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(4):500-7.

Curtin JA, Fridlyi J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, i sar. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-47.

Dadachova E, Nosanchuk JD, Shi L, Schweitzer AD, Frenkel A, Nosanchuk JS, i sar. Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(41):14865-70.

Dang NH, Aytac U, Sato K, O'Brien S, Melenhorst J, Morimoto C, i sar. T-large granular lymphocyte lymphoproliferative disorder: expression of CD26 as a marker of clinically aggressive disease and characterization of marrow inhibition. *Br J Haematol*. 2003;121(6):857-65.

Dang NH, Torimoto Y, Deusch K, Schlossman SF, Morimoto C. Comitogenic effect of solid-phase immobilized anti-1F7 on human CD4 T cell activation via CD3 and CD2 pathways. *J Immunol*. 1990a;144(11):4092-100.

Dang NH, Torimoto Y, Schlossman SF, Morimoto C. Human CD4 helper T cell activation: functional involvement of two distinct collagen receptors, 1F7 i VLA integrin family. *J Exp Med*. 1990b;172(2):649-52.

De Chiara L, Rodríguez-Piñeiro AM, Cordero OJ, Vázquez-Tuñas L, Ayude D, Rodríguez-Berrocal FJ, i sar. Postoperative serum levels of sCD26 for surveillance in colorectal cancer patients. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107470.

De Chiara L, Rodríguez-Piñeiro AM, Rodríguez-Berrocal FJ, Cordero OJ, Martínez-Ares D, Páez de la Cadena M. Serum CD26 is related to histopathological

polyp traits and behaves as a marker for colorectal cancer and advanced adenomas. *BMC Cancer*. 2010;10:333.

de la Haba-Rodríguez J, Macho A, Calzado MA, Blázquez MV, Gómez MA, Muñoz EE, i sar. Soluble dipeptidyl peptidase IV (CD26) in serum of patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2002;49(5):307-11.

Debniak T, Scott RJ, Gorski B, Cybulski C, van de Wetering T, Serrano-Fernandez P, i sar. Common variants of DNA repair genes and malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2008;44(1):110-4.

Demierre MF, Nathanson L. Chemoprevention of melanoma: an unexplored strategy. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):158-65.

Dennert G, Lennox ES. Phagocytic cells as effectors in a cell-mediated immunity system. *J Immunol*. 1973;111(6):1844-54.

Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A. Ligi-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*. 1993;73(3):541-54.

Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, i sar. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med*. 2011;208:1989-2003.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. *Ex vivo* isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193(11):1303-10.

Don W. Fawcett. *The Cell*. 2nd ed. Philadelphia: W B Saunders Co.; 1980.

Dong RP, Kameoka J, Hegen M, Tanaka T, Xu Y, Schlossman SF, i sar. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J Immunol*. 1996;156(4):1349-55.

Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.

Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, i sar. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5608-13.

Durko M, Navab R, Shibata HR, Brodt P. Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1356:271-80.

Eggermont A, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet*, 2014; 383:816-27.

Egmond M, Damen C, Spriel A, Vidarsson G, Garderen E, Winkel J. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* 2001;22(4):205-11.

Erić-Nikolić A, Matić IZ, Đorđević M, Milovanović Z, Marković I, Džodić R, i sar. Serum DPPIV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. *Immunobiology.* 2011;216(8):942-6.

EUCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization 2012. <http://eu-cancer.iarc.fr/EUCAN>

Faries MB, Morton DL. Melanoma: is immunotherapy of benefit? *Adv Surg.* 2003;37:139-69.

Feldmann M. Cell cooperation in the antibody response. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 5th edition Mosby: London;1998;147-55.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, i sar. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374-403.

Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995;16:487-94.

Fetsch PA, Riker AI, Marincola FM, Abati A. Tyrosinase immunoreactivity in fine-needle aspiration samples of metastatic malignant melanoma. *Cancer.* 2000;90(4):252-7.

Fishman P, Azizi E, Shoenfeld Y, Sredni B, Yechezkel G, Ferrone S, i sar. Vitiligo autoantibodies are effective against melanoma. *Cancer.* 1993;72(8):2365-9.

Fishman P, Merimski O, Baharav E, Shoenfeld Y. Autoantibodies to tyrosinase: the bridge between melanoma and vitiligo. *Cancer* 1997;79(8):1461-4.

Fletcher O, Easton D, Ierson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:357-63.

Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:245-73.

Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.

Fox DA, Hussey RE, Fitzgerald KA, Acuto O, Poole C, Palley L, et al. Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1984;133(3):1250-6.

Fridman W, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:298-306.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin.* 1985;35:130-51.

Frohman LA, Downs TR, Heimer EP, Felix AM. Dipeptidylpeptidase IV i trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1533-40.

Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, et al. CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004;28(1):e26-31.

Gajewski T, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014-22.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960-4.

Galon J, Gauchat JF, Mazières N, Spagnoli R, Storkus W, Lötze M, et al. Soluble Fcγ receptor type III (FcγRIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J Immunol.* 1996;157(3):1184-92.

Galon J, Moldovan I, Galinha A, Provost-Marloie MA, Kaudewitz H, Roman-Roman S, et al. Identification of the cleavage site involved in production of plasma soluble Fc gamma type III (CD16). *Eur J Immunol.* 1998;28:2101-7.

Garbelli S, Mantovani S, Palermo B, Giachino C. Melanocyte-specific, cytotoxic T cell responses in vitiligo: the effective variant of melanoma immunity? *Pigment Cell Res.* 2005;18(4):234-42.

Gavin A, Hulett M, Hogarth PM. *Molecular basis for the interaction of Fc receptors with immunoglobulins.* New York: Kluwer Academic Publishers; 1998.

Geppert TD, Davis LS, Gur H, Wacholtz MC, Lipsky PE. Accessory cell signals involved in T-cell activation. *Immunol Rev.* 1990;117:5-66.

Gherzi G, Dong H, Goldstein LA, Yeh Y, Hakkinen L, Larjava HS, et al. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem.* 2002;277(32):29231-41.

Gherzi G, Zhao Q, Salamone M, Yeh Y, Zucker S, Chen WT. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res.* 2006;66(9):4652-61.

Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity.* 1999;11(3):263-70.

Giuliano AE, Cochran AJ, Morton DL. Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. *Semin Oncol.* 1982;9:442-47.

Gloster HM, Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55:741-60; quiz 761-4.

Godbole D, Mojamdar M, Pal JK. Increased level of p27 subunit of proteasomes and its co-localization with tyrosinase in amelanotic melanoma cells indicate its direct role in the regulation of melanin biosynthesis. *Cell Biol Int.* 2006;30(11):895-902.

Goel V, Lazar A, Warneke C, Redston M, Haluska F. Examination of mutations in BRAF, NRAS, i PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126:154-60.

González R, Torres-López E. Immunological basis of melanoma-associated vitiligo-like depigmentation. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(2):122-7.

Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. Characterization of the plasminogen receptors of normal and rheumatoid arthritis human synovial fibroblasts. *J Biol Chem.* 1994;269(6):4360-6.

Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Weber MR, Gawdi G, Pizzo SV. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J.* 2001;355(Pt 2):397-407.

Gorrell M, Gysbers V, McCaughan G. CD26: A Multifunctional Integral Membrane and Secreted Protein of Activated Lymphocytes. *Sci J Immunol.* 2001;54(3):249-64.

Gorter A, Hiemstra PS, Leijh PC, van der Sluys ME, van den Barselaar MT, van Es LA, i sar. IgA- and secretory IgA-opsonized *S. aureus* induce a respiratory burst and phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 1987;61(3):303-9.

Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clin Chem.* 1988;34(12):2499-501.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007;445: 851-7.

Griewank KG, Ugurel S, Schadendorf D, Paschen A. New developments in biomarkers for melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2013;25(2):145-51.

Gruber F, Kastelan M, Brajac I, Saftić M, Peharda V, Cabrijan L, i sar. Molecular and genetic mechanisms in melanoma. *Coll Antropol.* 2008;32(2):147-52.

Haacke W, Küllertz G, Barth A. Diagnostic value of the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) in abdominal cancers. *Arch Geschwulstforsch.* 1986;56(2):145-53.

Hagerling C, Casbon A-J, Werb Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biolol.* 2015;25(4):214-20.

Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, i sar. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science.* 1996;274(5291):1363-6.

Hakansson A, Gustafsson B, Krysiar L, Hakansson L. Effect of IFN-alpha on tumor-infiltrating mononuclear cells and regressive changes in metastatic malignant melanoma. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18(1):33-9.

Halaban R, Patton R, Cheng E, Svedine S, Trombetta E, Wahl M, i sar. Abnormal Acidification of Melanoma Cells Induces Tyrosinase Retention in the Early Secretory Pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14821-8.

Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, i sar. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2011;71(17):5670-7.

Hamre R, Farstad IN, Britzaeg P, Morton HC. Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR gamma chain on myeloid cells in blood and tissue. *Sci J Immunol.* 2003;57(6):506-16.

Hashikawa T, Hooker SW, Maj JG, Knott-Craig CJ, Takedachi M, Murakami S, i sar. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J.* 2004;18(1):131-3.

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008;13:1634-45.

Hazenbos WL, Gessner JE, Hofhuis FM, Kuipers H, Meyer D, Heijnen IA, i sar. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity.* 1996;5(2):181-8.

Herlyn M. Human melanoma: Development and progression. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9(2):101-12.

Herrera C, Casadó V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C, i sar. Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol*. 2001;59(1):127-34.

Herrera C, Morimoto C, Blanco J, Mallol J, Arenzana F, Lluís C, i sar. Comodulation of CXCR4 i CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19532-9.

Hildebrit M, Rose M, Mayr C, Schüler C, Reutter W, Salama A, i sar. Alterations in expression and in serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) in patients with hyporectic eating disorders. *Sci J Immunol*. 1999;50(5):536-41.

Hildebrit M, Rose M, Rüter J, Salama A, Mönnikes H, Klapp BF. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease. *Sci J Gastroenterol*. 2001;36(10):1067-72.

Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsens R, Böni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol*. 1998;25(4):204-9.

Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol*. 2000;115(3):337-44.

Holtan SG, Creedon DJ, Thompson MA, Nevala WK, Markovic SN. Expansion of CD16-negative natural killer cells in the peripheral blood of patients with metastatic melanoma. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:316314.

Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells. *Int J Oncol*. 2008;32(3):527-35.

Hosono O, Ohnuma K, Dang N, Morimoto C. CD26: a key molecule in immune regulation and autoimmune diseases. *Mod Rheumatol*. 2003;13(3):199-204.

Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(2):134-40.

Houghton AN, Real FX, Davis LJ, Cordon-Cardo C, Old LJ. Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J Exp Med*. 1987;164(3):812-29.

Huls G, Heijnen IA, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel JG, i sar. Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1999;59(22):5778-84.

Ikushima H, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Terashima M, Tanaka H, i sar. Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8439-44.

Ireu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, i sar. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2010;17(2):121-34.

Irieu T, Thibault V, Malet I, Laporte J, Bauvois B, Agut H, i sar. Similar increased serum dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C and other viral infections. *J Clin Virol*. 2003;27(1):59-68.

Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, i sar. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 2000;88(3):577-83.

Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem*. 1998;124(2):428-33.

Iwata S, Morimoto C. Cd26/Dipeptidyl Peptidase IV in Context The Different Roles of a Multifunctional Ecto-enzyme in Malignant Transformation. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;190(3):301-6.

Jarmolowska B, Bielikowicz K, Iwan M, Sidor K, Kostyra E, Kaczmarek M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breastfed infants with symptoms of allergy. *Peptides*. 2007, 28(3):678-82.

Javidroozi M, Zucker S, Chen W-TT. Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease i prognosis in cancer. *Dis Markers*. 2012;32:309-20.

Jil T, Revskaya E, Jiang Z, Bryan R, Casadevall A, Dadachova E. Complement-dependent cytotoxicity of an antibody to melanin in radioimmunotherapy of metastatic melanoma. *Immunother*. 2013;5(4):357-64.

Jil T, Revskaya E, Jiang Z, Harris M, Dorokhova O, Tsukrov D, i sar. Melanoma stem cells in experimental melanoma are killed by radioimmunotherapy. *Nucl Med Biol*. 2013;40(2):177-81.

Jimbow K, Lee S, King M, Hara H, Chen H, Dakour J, i sar. Melanin Pigments and Melanosomal Proteins as Differentiation Markers Unique to Normal and Neoplastic Melanocytes. *J Invest Dermatol*. 1993;259S-268S.

Jimenez M, Lee Maloy W, Hearing VJ. Specific identification of an authentic clone for mammalian tyrosinase. *J Biol Chem*. 1989;264:3397-403.

Jones PC, Sze LL, Liu PY, Morton DL, Irie RF. Prolonged survival for melanoma patients with elevated IgM antibody to oncofetal antigen. *J Natl Cancer Inst*. 1981;66(2):249-54.

Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Kolb D, Stockert E, Chen YT, i sar. T311--an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. *Pathol Res Pract.* 2000;196(4):235-42.

Juranic ZD, Stanojevic-Bakic N, Zizak Z, Babovic N, Radovic-Kovacevic V, Stanojkovic T, i sar. Antimelanoma immunity in vitiligo and melanoma patients. *Neoplasma.* 2003;50(4):305-9.

Kajiyama H, Kikkawa F, Khin E, Shibata K, Ino K, Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003;63(9):2278-83.

Kajiyama H, Kikkawa F, Suzuki T, Shibata K, Ino K, Mizutani S. Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(10):2753-7.

Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science.* 1993;261(5120):466-9.

Kang X, Kawakami Y, el-Gamil M, Wang R, Sakaguchi K, Yannelli JR, i sar. Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 1995;155(3):1343-8.

Karcher K. Systematisierte Depigmentierung bei strahlenbehaltenen Melanomen. *Dermatologica.* 1960;120:255-63.

Karg E, Hultberg B, Isaksson A, Rosengren E, Rorsman H. Enzyme release from cultured human melanoma cells. *Acta Derm Venereol.* 1990;70(4):286-90.

Kauffmann R, Chen S. Workup and Staging of Malignant Melanoma. *Surg Clin North Am.* 2014;94(5):963-72.

Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol.* 1998;11(8):740-6.

Kawakami Y, Robbins P, Wang X, Tupesis J, Parkhurst M, Kang X, i sar. Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1998;161(12):6985-92.

Keler T, Wallace PK, Vitale LA, Russoniello C, Sundarapiyan K, Graziano RF, i sar. Differential effect of cytokine treatment on Fc receptor I-and Fc receptor I-mediated tumor cytotoxicity by monocyte-derived macrophages. *J Immunol.*; 2000;164(11):5746-52.

Kelly T, Kechelava S, Rozypal TL, West KW, Korourian S. Seprase, a membrane-bound protease, is overexpressed by invasive ductal carcinoma cells of human breast cancers. *Mod Pathol*. 1998;11(9):855-63.

Kemp EH, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Weetman AP. Autoantibody responses to melanocytes in the depigmenting skin disease vitiligo. *Autoimmun Rev*. 2007;6(3):138-42.

Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J*. 1990;271(2):285-96.

Khin EE, Kikkawa F, Ino K, Kajiyama H, Suzuki T, Shibata K, i sar. Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(3):670-6.

Kimberly RP, Ahlstrom JW, Click ME, Edberg JC. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc gamma RIIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from Fc gamma RII. *J Exp Med*. 1990;171(4):1239-55.

Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):7-17.

Kittlesen D, Thompson L, Gulden P, Skipper J, Colella T, Shabanowitz J, i sar. Human melanoma patients recognize an HLA-A1-restricted CTL epitope from tyrosinase containing two cysteine residues: implications for tumor vaccine development. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998;160(5):2099-106.

Kobayashi H, Hosono O, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, i sar. Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2002;29(9):1858-66.

Kobayashi H, Kokubo T, Sato K, Kimura S, Asano K, Takahashi H, i sar. CD4⁺ T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated tyrosinase. *Cancer Res*. 1998;58(2):296-301.

Kojima J, Kanatani M, Kato M, Tojoh F, Nakamura N. Serum glycyLproline dipeptidyl aminopeptidase activity in human hepatic cancer. *Clin Chim Acta*. 1979;93(2):181-7.

Koshli ME. The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu Rev Immunol*. 1985;3:425-53.

Krepela E, Kasářírek E, Vicar J, Kraml J. An assay of dipeptidyl peptidase IV activity in human serum and serum of pregnant women with glycyL-L-proline-1-naphthylamide and other glycyL-L-proline-arylamides as substrates. *Physiol Bohemoslov*. 1983;32(4):334-45.

Kripke ML, Fisher MS. Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1976;57(1):211-5.

Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(5):1333-6.

Kripke ML. Immunology and photocarcinogenesis. New light on an old problem. *J Am Acad Dermatol.* 1986;14(1):149-55.

Küllertz G, Boigk J. [Dipeptidyl peptidase IV activity in the serum and synovia of patients with rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol.* 1986;45(2):52-6.

Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* 2004;122(2):342-8.

Kushimoto T, Basrur V, Valencia J, Matsunaga J, Vieira WD, Ferrans VJ, i sar. A model for melanosome biogenesis based on the purification i analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10698-703.

Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006(3);25:323-31.

Lakatos PL, Firneisz G, Rákóczy G, Selmei L, Szalay F. Elevated serum dipeptidyl peptidase IV (CD26, EC 3.4.14.5) activity in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1999;30(4):740.

Lam CS, Cheung AH, Wong SK, Wan TM, Ng L, Chow AK, i sar. Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e98582.

Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003;40(3):209-94.

Lamkhioed B, Gounni AS, Gruart V, Pierce A, Capron A, Capron M. Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur J Immunol.* 1995;25(1):117-25.

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) i Leu-19 (NKH -1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136(12):4480-6.

Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med.* 1989;169(6):2233-8.

Larrinaga G, Perez I, Sanz B, Beitia M, Errarte P, Fernández A, i sar. Dipeptidyl-Peptidase IV Activity Is Correlated with Colorectal Cancer Prognosis. *Plos One*. 2015;10(3):e0119436.

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, i sar. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(11):4005-10.

Le Gal FA, Avril MF, Bosq J, Lefebvre P, Deschemin JC, Irieu M, i sar. Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2001;117(6):1464-70.

Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*. 1997;6(6):655-61.

Li EJ, Ramsden CA, Riley PA. Quinone chemistry and melanogenesis. *Methods Enzymol*. 2004;378:88-109.

Livingston PO, Wong GY, Adluri S, Tao Y, Padavan M, Parente R, i sar. Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol*. 1994;12(5):1036-44.

Lohse S, Peipp M, Beyer T, Valerius T, Dechant M. Impact of human IgA antibodies on complement-dependent cytotoxicity mediated by combinations of EGF-R-directed antibodies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010;58(4):303-12.

López-Guillermo A, Mercadal S. The clinical use of antibodies in haematological malignancies. *Ann Oncol*. 2007;18(suppl 9):ix51-ix57.

Löster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217(1):341-8.

Lucchese A, Willers J, Mittelman A, Kiuc D, Dummer R. Proteomic scan for tyrosinase peptide antigenic pattern in vitiligo and melanoma: role of sequence similarity and HLA-DR1 affinity. *J Immunol*. 2005;175(10):7009-20.

MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS. The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res*. 1995;55:4174-81.

Madueño JA, Muñoz E, Blazquez V, Gonzalez R, Aparicio P, Peña J. The CD26 antigen is coupled to protein tyrosine phosphorylation and implicated in CD16-mediated lysis in natural killer cells. *Sci J Immunol*. 1993;37(4):425-9.

Maeurer M, Gollin S, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, i sar. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated

with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest.* 1996;98(7):1633-41.

Maes M, De Meester I, Scharpe S, Desnyder R, Ranjan R, Meltzer HY. Alterations in plasma dipeptidyl peptidase IV enzyme activity in depression and schizophrenia: effects of antidepressants and antipsychotic drugs. *Acta Psychiatr Sci.* 1996;93(1):1-8.

Maes M, De Meester I, Verkerk R, De Medts P, Wauters A, Vanhoof G, i sar. Lower serum dipeptidyl peptidase IV activity in treatment resistant major depression: relationships with immune-inflammatory markers. *Psychoneuroendocrinology.* 1997;22(2):65-78.

Maes M, Lin A, Bonaccorso S, Violaeghe E, Song C, Goossens F, i sar. Lower activity of serum peptidases in abstinent alcohol-dependent patients. *Alcohol.* 1999;17(1):1-6.

Maio M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann Oncol.* 2012;23(suppl 8):viii10-viii14.

Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, i sar. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2005;48(6):1168-72.

Marcus A, Gowen B, Thompson T, Iannello A, Ardolino M, Deng W, i sar. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91-128.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, i sar. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(3):364-80.

Marković SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, i sar. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(4):490-513.

Martín M, Huguet J, Centelles JJ, Franco R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J Immunol.* 1995;155(10):4630-43.

Mathew GD, Qualtiere LF, Neel HB 3rd, Pearson GR. IgA antibody, antibody-dependent cellular cytotoxicity i prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1981;27(2):175-80.

Matsuzawa T, Watanabe M, Kondo R. Case of leukoderma in X-Ray portion of patient with Melanosarcoma. *Shinshu Med J.* 1953;2:254-8.

Mattes MJ, Thomson TM, Old LJ, Lloyd KO. A pigmentation-associated, differentiation antigen of human melanoma defined by a precipitating antibody in human serum. *Int J Cancer.* 1983;32(6):717-21.

McCarter M, Baumgartner J, Escobar G, Richter D, Lewis K, Robinson W, i sar. Immunosuppressive Dendritic and Regulatory T Cells are Upregulated in Melanoma Patients. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(10):2854-60.

McCourt C, Dolan O, Gormley G. Malignant Melanoma: A Pictorial Review. *Ulster Med J.* 2014;83(2):103-10.

Merimsky O, Baharav E, Shoenfeld Y, Chaitchik S, Tsigelman R, Cohen-Aloro D, i sar. Anti-tyrosinase antibodies in malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;42(5):297-302.

Merimsky O, Shoenfeld Y, Baharav E, Zigelman R, Fishman P. Reactivity to tyrosinase: expression in cancer (melanoma) and autoimmunity (vitiligo). *Hum Antibodies Hybridomas.* 1996;7(4):151-6.

Merimsky O, Shoenfeld Y, Fishman P. A focus on anti-tyrosinase antibodies in melanoma and vitiligo. In *The Decade of Autoimmunity*. Edited by. Amsterdam: Elsevier Science B.V; 1999:261-7.

Merimsky O, Shoenfeld Y, Fishman P. The clinical significance of antityrosinase antibodies in melanoma and related hypopigmentary lesions. *Clin Rev Allergy Immunol.* 1998;16(3):227-36.

Mielcorn-Monson RL, Shear NH, Yau E, Sambhara S, Barber BH, Spaner D, i sar. Cytotoxic T lymphocyte reactivity to gp100, MelanA/MART-1, and tyrosinase, in HLA-A2-positive vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 2003;121(3):550-6.

Mikami M, Sonoki T, Ito M, Funasaka Y, Suzuki T, Katagata Y. Glycosylation of tyrosinase is a determinant of melanin production in cultured melanoma cells. *Mol Med Rep.* 2013;8(3):818-22.

Milenic DE, Brady ED, Brechbiel MW. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(6):488-99.

Milton GW, McCarthy WH, Carlon A. Malignant melanoma and vitiligo. *Australas J Dermatol.* 1971;12(3):131-42.

Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, i sar. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 1994;54(21):5702-10.

Montgomery AM, De Clerck YA, Langley KE, Reisfeld RA, Mueller BM. Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways. *Cancer Res.* 1993;53(3):693-700.

Morel S, Ooms A, Van Pel A, Wölfel T, Brichard VG, van der Bruggen P, i sar. A tyrosinase peptide presented by HLA-B35 is recognized on a human melanoma by autologous cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer.* 1999;83(6):755-9.

Morimoto C, Schlossman S. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev.* 1998;161(1):55-70.

Morimoto C, Torimoto Y, Levinson G, Rudd CE, Schrieber M, Dang NH, i sar. 1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. *J Immunol.* 1989;143(11):3430-9.

Morrison ME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med.* 1993;177(4):1135-43.

Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, i sar. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg.* 2005; 242(3):302-11.

Morton HC, Britzaeg P. CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2001;49(3):217-29.

Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:63-84.

Mota G, Moldovan I, Calugaru A, Hirt M, Kozma E, Galatiuc C, i sar. Interaction of human immunoglobulin G with CD16 on natural killer cells: ligand clearance, FcγRIIIA turnover and effects of metalloproteinases on FcγRIIIA-mediated binding, signal transduction and killing. *Sci J Immunol.* 2004;59(3):278-84.

Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano J-P, Khayat D. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;74(1):27-39.

Mueller BM. Different roles for plasminogen activators and metalloproteinases in melanoma metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;213:65-80.

Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 1989;143(10):3183-91.

Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol.* 2010;49:978-86.

Naughton GK, Eisinger M, Bystryn JC. Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. *J Exp Med*. 1983;158(1):246-51.

Naughton GK, Reggiardo D, Bystryn JC. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15:978-81.

Nazarian A, Lawlor K, Yi SS, Philip J, Ghosh M, Yaneva M, i sar. Inhibition of circulating dipeptidyl peptidase 4 activity in patients with metastatic prostate cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(11):3082-96.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: Old friends and new family members. *Immunity* 2006;24(1):19-28.

Nishioka K, Romsdahl MM, McMurtrey MJ. Adaptation of triitated tyrosinase assay to serum tyrosinase and its specific elevation in melanoma. In: Klaus SN, ed. *Pigmented cell*. 1979;5:300-4.

Noonan F, Zaidi M, Wolnicka-Glubisz A, De Fabo E. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat Commun*. 2012;3:884.

Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, Britzaeg P. Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol*. 1999;19(5-6):481-508.

Norris D, Kissinger R, Naughton G, Bystryn J. Evidence for Immunologic Mechanisms in Human Vitiligo: Patients' Sera Induce Damage to Human Melanocytes *In Vitro* by Complement-Mediated Damage and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J Invest Dermatol*. 1988;90(6):783-9.

Nosanchuk JD, Rosas AL, Casadevall A. The antibody response to fungal melanin in mice. *J Immunol*. 1998;160(12):6026-31.

Njauw C-NJN, Kim I, Piris A, Gabree M, Taylor M, Lane AM, i sar. Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. *PLoS ONE*. 2012;7:e35295.

O'Hara RJ, Greenman J, Drew PJ, McDonald AW, Duthie GS, Lee PW, i sar. Impaired interleukin-12 production is associated with a defective anti-tumor response in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1998;41(4):460-3.

Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen J-L, Cerundolo V. High Frequency of Skin-homing Melanocyte-specific Cytotoxic T Lymphocytes in Autoimmune Vitiligo. *J Exp Med*. 1998;188(6):1203-8.

Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol*. 2008;29(6):295-301.

Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci.* 2008;13:2299-310.

Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, Nishibashi K, Yoshikawa N, Shimizu N, i sar. CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(39):14186-91.

Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J.* 2000;32(8):475-81.

Ordóñez N. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum Pathol.* 2014;45(2):191-205.

Ostri-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18:11-8.

Otten MA, Rudolph E, Dechant M, Tuk CW, Reijmers RM, Beelen RH, i sar. Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. *J Immunol.* 2005;174(9):5472-80.

Otten MA, van Egmond M. The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89). *Immunol Lett.* 2004;92(1-2):23-31.

Oyarbide-Valencia K, van den Boorn JG, Denman CJ, Li M, Carlson JM, Herniez C, i sar. Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev.* 2006;5(7):486-92.

Pacheco R, Martinez-Navio J, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell J, i sar. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102(27):9583-8.

Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelme E, Brazzelli V, i sar. Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan-A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(2):326-32.

Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med.* 1998;4(5):525-31.

Pearse RN, Kawabe T, Bolli S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity.* 1999;10(6):753-60.

Pearson GR, Johansson B, Klein G. Antibody-dependent cellular cytotoxicity against Epstein-Barr virus-associated antigens in African patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 1978;22(2):120-5.

Perner F, Gyuris T, Rákóczy G, Sárváry E, Görög D, Szalay F, i sar. Dipeptidyl peptidase activity of CD26 in serum and urine as a marker of cholestasis: experimental and clinical evidence. *J Lab Clin Med*. 1999;134(1):56-67.

Peruzzi G, Femnou L, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, Krzewski K, i sar. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase regulates the activation-induced downmodulation of CD16 in human primary NK cells. *J Immunol*. 2013;191(4):1883-94.

Pethiyagoda CL, Welch DR, Fleming TP. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(5):391-400.

Pfirschke C, Gebhardt C, Zörnig I, Pritsch M, Eichmüller S, Jäger D, i sar. T cell responses in early-stage melanoma patients occur frequently and are not associated with humoral response. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(11):1369-81.

Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Liénard D, Lejeune F, i sar. High Frequencies of Naive Melan-a/Mart-1-Specific CD8⁺ T Cells in a Large Proportion of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (Hla)-A2 Individuals. *J Exp Med*. 1999;190(5):705-16.

Presta LG, Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG. Engineering therapeutic antibodies for improved function. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(4):487-90.

Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1345-51.

Quaglino P, Marengo F, Osella-Abate S, Cappello N, Ortoncelli M, Salomone B, i sar. Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann Oncol*. 2010;21(2):409-14.

Radaev S, Motyka S, Fridman W-H, Sautes-Fridman C, Sun P. The Structure of a Human Type III Fcγ Receptor in Complex with Fc. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16469-77.

Ram M, Shoenfeld Y. Harnessing autoimmunity (vitiligo) to treat melanoma: a myth or reality? *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1110:410-25.

Ramirez-Montagut T, Turk M, Wolchok J, Guevara-Patino J, Houghton A. Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene*. 2003;22(20):3180-7.

Ravanat JL, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63(1-3):88-102.

Ravetch JV, Bolli S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90.

Reed CM, Cresce ND, Mauldin IS, Slingsluff CL, Olson WC. Vaccination with Melanoma Helper Peptides Induces Antibody Responses Associated with Improved Overall Survival. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3879-87.

Rees JL. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet*. 2004;75:739-51.

Reinke S, Königer P, Herberth G, Audring H, Wang H, Ma J, i sar. Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2005;27(5):401-6.

Reissfelder C, Stamova S, Gossmann C, Braun M, Bonertz A, Walliczek U, i sar. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *J Clin Invest*. 2015;125(2):739-51.

Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 1989;338(6214):383-4.

Revskeya E, Jongco AM, Sellers RS, Howell RC, Koba W, Guimaraes AJ, i sar. Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2373-9.

Riker A, Rossi G, Masih P, Alsfeld L, Denham F, Tennant L, i sar. Combination immunotherapy for high-risk resected and metastatic melanoma patients. *Ochsner J*. 2014;14(2):164-74.

Rivoltini L, Canese P, Huber V, Iero M, Pilla L, Valenti R, i sar. Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5:463-76.

Gordon R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. *Semin Oncol Nurs*. 2013;29(3):160-9.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.

Rojas R, Apodaca G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(12):944-55.

Rosenberg S. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 2001;411(6835):380-4.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985;313(23):1485-92.

Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science.* 2015;348(6230):62-8.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004;10(9):909-15.

Ross MI. Sentinel node biopsy for melanoma: an update after two decades of experience. *Semin Cutan Med Surg.* 2010;29(4):238-48.

Santo Domingo D, Yang MF, Cooper KD, Baron ED. Ultraviolet induced immune suppression a brief review. *G Ital Dermatol Venereol.* 2007;142(3):251-8.

Sato K, Dang NH. CD26: a novel treatment target for T-cell lymphoid malignancies? *Int J Oncol.* 2003;22(3):481-97.

Savino W, Villa-Verde DM, Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration i differentiation? *Immunol Today.* 1993;14(4):158-61.

Sedo A, Stremenová J, Bušek P, Duke-Cohan JS. Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy? *Expert Opin Med Diagn.* 2008;2(6):677-89.

Sharkey RM, Goldenberg DM. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 2005;46 Suppl 1:115S-27S.

Shen L, Collins J. Monocyte superoxide secretion triggered by human IgA. *Immunology.* 1989;68(4):491-6.

Shibahara S, Tomita Y, Sakahura T, Nagar C, Chaudhuri B, Muller R. Cloning and expression of DNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:2413-27.

Shingu K, Helfritz A, Zielinska-Skowronek M, Meyer-Olson D, Jacobs R, Schmidt RE, et al. CD26 expression determines lung metastasis in mutant F344 rats: involvement of NK cell function and soluble CD26. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(9):546-54.

Sibénil S, Dutertre CA, Boix C, Bonnin E, Ménez R. Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunology Lett.* 2006;106(2):111-8.

Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are

dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res.* 1999;5 (10):2726-34.

Smith JL, Jr., Stehlin JS, Jr. Spontaneous regression of primary malignant melanomas with regional metastases. *Cancer.* 1965;18:1399-415.

Sohn N, Gang H, Gumport SL, Goldstein M, Depisch LM. Generalized melanosis secondary to malignant melanoma. *Cancer.* 1969;24:897-903.

Stecca BA, Nardo B, Chieco P, Mazziotti A, Bolondi L, Cavallari A. Aberrant dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) expression in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1997;27(2):337-45.

Stein C, Schubert I, Fey G. Natural Killer (NK)- and T-Cell Engaging Antibody-Derived Therapeutics. *Antibodies.* 2012;1(1): 88-123.

Stewart WW, Mazengera RL, Shen L, Kerr MA. Unaggregated serum IgA binds to neutrophil Fc alpha R at physiological concentrations and is endocytosed but cross-linking is necessary to elicit a respiratory burst. *J Leukoc Biol.* 1994;56(4):481-7.

Stockmeyer B, Dechant M, van Egmond M, Tutt AL, Sundarapiiyan K, Graziano RF, i sar. Triggering Fc alpha-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy. *J Immunol.* 2000;165(10):5954-1.

Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J, i sar. Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol.* 1992;149(2):481-6.

Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(10):4586-90.

Tas F, Karabulut S, Yasasever C, Duranyildiz D. Serum transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels have diagnostic, predictive, and possible prognostic roles in patients with melanoma. *Tumor Biol.* 2014;35(7):7233-7.

Teillaud JL. Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). 2012; In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000498.pub2

Teulings H-EE, Limpens J, Jansen SN, Zwinderman AH, Reitsma JB, Spuls PI, i sar. Vitiligo-Like Depigmentation in Patients With Stage III-IV Melanoma Receiving Immunotherapy and Its Association With Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2015;33(7):773-81.

Thompson J, Scolyer R, Kefford R. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2005;365(9460):687701.

Thomson TM, Real FX, Murakami S, Cordon-Cardo C, Old LJ, Houghton AN. Differentiation antigens of melanocytes and melanoma: analyse of melanosome and cell surface markers of human pigmented cells with monoclonal antibodies. *J Invest Dermatol.* 1988;90(4):459-66.

Tomer Y, Gilburd B, Blank M, Lider O, Hershkovich R, Fishman P, et al. Characterization of biologically active antineutrophil cytoplasmic antibodies induced in mice. Pathogenetic role in experimental vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(10):1375-81.

Topalian S, Gonzales M, Parkhurst M, Li Y, Southwood S, Sette A, et al. Melanoma-specific CD4⁺ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med.* 1996;183(5):1965-71.

Torimoto Y, Dang NH, Vivier E, Tanaka T, Schlossman SF, Morimoto C. Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J Immunol.* 1991;147(8):2514-7.

Träger U, Sierro S, Djordjevic G, Bouzo B, Khiwala S, Meloni A, et al. The immune response to melanoma is limited by thymic selection of self-antigens. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e35005.

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187-376.

Tsai NM, Chen BM, Wei SL, Wu CW, Roffler SR. Anti-tumor immunoglobulin M increases lung metastasis in an experimental model of malignant melanoma. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(2):103-9.

Tuong W, Lily S. Cheng, April W. Armstrong. Melanoma: Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Outcomes. *Dermatol Clin.* 2012;30(1):113-24.

Uchi H, Stan R, Turk MJ, Engelhorn ME, Rizzuto GA, Goldberg SM, et al. Unraveling the complex relationship between cancer immunity and autoimmunity: lessons from melanoma and vitiligo. *Adv Immunol.* 2006;90:215-41.

Uematsu T, Tanaka H, Yamaoka M, Furusawa K. Effects of oral squamous cell carcinoma-derived TGF-beta1 on CD26/DPPIV expression in T cells. *Anticancer Res.* 2004;24(2B):619-24.

Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(4):319-26.

Umansky V, Sevko A. Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(2):275-82.

Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. *Semin Immunol.* 1995;7(1):37-44.

Valerius T, Stockmeyer B, van Spriel AB, Graziano RF, van den Herik-Oudijk IE, Repp R, i sar. FcalphaRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood*. 1997;90(11):4485-92.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, i sar. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991;254(5038):1643-7.

van der Velden PA, Sikuijl LA, Bergman W, Pavel S, van Mourik L, Frants RR, i sar. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am J Hum Genet*. 2001;69(4):774-9.

Van Der Velden VH, Naber BA, Van Hal PT, Overbeek SE, Hoogsteden HC, Versnel MA. Peptidase activities in serum and bronchoalveolar lavage fluid from allergic asthmatics-comparison with healthy non-smokers and smokers and effects of inhaled glucocorticoids. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(6):813-23.

Van Egmond M, Hanneke van Vuuren AJ, van de Winkel JG. The human Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) on transgenic peritoneal macrophages triggers phagocytosis and tumor cell lysis. *Immunol Lett*. 1999;68(1):83-7.

Van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, Damen CA, van Amersfoort ES, van Zibergen G, i sar. FcalphaRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med*. 2000;6(6):680-5.

Van Egmond M, van Spriel AB, Vermeulen H, Huls G, van Garderen E, van de Winkel JG. Enhancement of polymorphonuclear cell-mediated tumor cell killing on simultaneous engagement of fcgammaRI (CD64) i fcalphaRI (CD89). *Cancer Res*. 2001;61(10):4055-60.

Van West D, Monteleone P, Di Lieto A, De Meester I, Durinx C, Scharpe S, i sar. Lowered serum dipeptidyl peptidase IV activity in patients with anorexia and bulimia nervosa. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2000;250(2):86-92.

Velho T. Metastatic melanoma – a review of current and future drugs. *Drugs Context* 2012; 2012:212242, doi:10.7573/dic.212242.

Viguiier M, Lemaître F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L, i sar. Foxp3 expressing CD4⁺CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol*. 2004;173(2):1444-53.

Virchow R. An address on the value of pathological experiments. *Br Med J* 1881;2:198-203.

von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG, Kok A, Van Kamp GJ, i sar. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by

a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol.* 2000;18(3):574-83.

Wankowicz-Kalinska A, van den Wijngaard RM, Tigges BJ, Westerhof W, Ogg GS, Cerundolo V, i sar. Immunopolarization of CD4⁺ i CD8⁺ T cells to Type-1-like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. *Lab Invest.* 2003;83(5):683-95.

Watabe H, Valencia JC, Le Pape E, Yamaguchi Y, Nakamura M, Rouzaud F, i sar. Involvement of Dynein and Spectrin with Early Melanosome Transport and Melanosomal Protein Trafficking. *J Invest Dermatol.* 2008;128(1):162-74.

Webb K, Eby J, Hariharan V, Herniez C, Luiten R, Poole I. Enhanced bleaching treatment: opportunities for immune-assisted melanocyte suicide in vitiligo. *Exp Dermatol.* 2014;23(8):529-33.

Weide B, Zelba H, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Di Giacomo AM, i sar. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J Clin Oncol.* 2012;30(15):1835-41.

Weisbart RH, Kacena A, Schuh A, Golde DW. GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature.* 1988;332(6165):647-8.

Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997;91(4):439-42.

Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med.* 1999;190(3):311-22.

Wesley UV, Tiwari S, Houghton AN. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2004;109(6):855-66.

Whiteman D, Green A. Epidemiology of Malignant Melanoma. In: Dummer R, Pittelkow MR, Iwatsuki K, Green A, Elwan NM, eds. *Skin Cancer – A World Wide Perspective.* Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 13-26.

Wittbjer A, Odh G, Rosengren AM, Rorsman H. Isolation of soluble tyrosinase from human melanoma. *Acta Derm Venereol.* 1990;70(4):291-4.

Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, i sar. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science.* 1995;269(5228):1281-4.

Wölfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer zum Büschenfelde KH, i sar. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2

melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1994;24(3):759-64.

Yamamoto H, Takeuchi S, Kudo T, Sato C, Takeuchi T. Melanin production in culture albino melanocytes transfected with mouse tyrosinase cDNA. *Jap J Genet.* 1989;64(2):121-35.

Yeaman GR, Kerr MA. Opsonization of yeast by human serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol.* 1987;68(1):200-8.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, i sar. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature.* 2011;480 (7375):99-103.

Yu D, Slaitini L, Gysbers V, Riekhoff A, Kähne T, Knott H, i sar. Soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase IV Enhances Human Lymphocyte Proliferation *In Vitro* Independent of Dipeptidyl Peptidase Enzyme Activity and Adenosine Deaminase Binding. *Sci J Immunol.* 2011;73(2):102-11.

Zhang W, Lachmann PJ. Neutrophil lactoferrin release induced by IgA immune complexes can be mediated either by Fc α I receptors or by complement receptors through different pathways. *J. Immunol.* 1996;156(7):2599-606.

Zörnig I, Halama N, Bermejo J, Ziegelmeier C, Dickes E, Migdoll A, i sar. Prognostic significance of spontaneous antibody responses against tumor-associated antigens in malignant melanoma patients. *Int J Cancer.* 2015;136(1):138-51.

Marija Đorđić Crnogorac je rođena 06.08.1982. godine u Sremskoj Mitrovici. Završila je gimnaziju „Ivo Lola Ribar“ u Sremskoj Mitrovici, a nakon toga upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je u junu 2010. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, smer Eksperimentalna biomedicina, sa prosečnom ocenom 8.54 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. U oktobru 2010. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju. Iste godine upisala je doktorske akademske studije, smer Molekularna biologija eukariota na Biološkom fakultetu. Angažovana je na projektu 175011 „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Zorice Juranić. Zvanje istraživač-saradnik stekla je 2012. godine. Do sada je publikovala 6 naučnih radova: 2 M21 kategorije, 2 M22 kategorije i 2 M23 kategorije, kao i veći broj saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima. Od 2010. godine član je Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR) i Srpskog društva istraživača raka (SDIR) od 2011. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Марија Ђорђевић Црногорац _____

Број индекса _____ Б3054/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај разлика нивоа имуноглобулина специфичних за меланин и тирозиназу у
антитуморској имуности болесника са меланомом

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

Потпис аутора

У Београду, 25.10.2016.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Ђорђевић Црногорац

Број индекса Б3054/2010

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Значај разлика нивоа имуноглобулина специфичних за меланин и тирозиназу у антитуморској имуности болесника са меланомом

Ментор проф. др. Биљана Божић, научни сарадник др Ивана Матић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 25.10.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Значај разлика нивоа имуноглобулина специфичних за меланин и тирозиназу у антитуморској имуности болесника са меланомом

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 25.10.2016.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.