

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja A. Jelača

**UTICAJ ETANOLNOG EKSTRAKTA VIRKA  
(*ALCHEMILLA VULGARIS* AGG.) NA FENOTIP  
MALIGNNE ĆELIJE I MIKROSREDINU TUMORA  
U MIŠJIM SINGENIM MODELIMA MELANOMA  
I TUMORA DOJKE**

doktorska disertacija

Beograd, 2024



UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Sanja A. Jelača

**EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF  
LADY'S MANTLE (*ALCHEMILLA VULGARIS*  
AGG.) ON MALIGNANT CELL PHENOTYPE  
AND TUMOR MICROENVIRONMENT IN  
SYNGENIC MURINE MELANOMA AND  
BREAST CANCER MODELS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024



**MENTOR:****dr Danijela Maksimović-Ivanić,**

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:****dr Sanja Mijatović,**

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Ivan Jovanović,**

redovni profesor, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

**Prof. dr Zora Dajić-Stevanović,**

redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Biljana Božić Nedeljković,**

redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Bato Korać,**

vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (IBISS), Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta pod nazivom „Biološki efekti ekstrakata i molekula izolovanih iz biljaka sa teritorije Balkana“ (br. 06/2018) finansiranog od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije i Narodne Republike Kine. Istraživanje je dodatno finansirano sredstvima programa rada IBISS-a (Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije) za period od 2020. do 2024. godine (br. 451-039/2021-14/200007, 451-03-68/2022-14/200007, 451-03-47/2023-01/200007 i 451-03-66/2024-03/200007).





## ***Izjave zahvalnosti***

*Želim da izrazim zahvalnost svima koji su mi pomogli i podržali me tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Pre svega, zahvaljujem se mojoj mentorki, dr Danijeli Maksimović-Ivanić na njenom stručnom vođstvu, konstruktivnim savetima, neprocenjivoj pomoći i neiscrpnj inspiraciji i pozitivnoj energiji. Zaista je retkost biti u prilici da učiš i sazrevaš u prisustvu jednog takvog izvrsnog naučnika a pre svega kvalitetnog čoveka. Neizmerno sam zahvalna i privilegovana što sam imala tu čast i priliku. Takođe, zahvaljujem se i mojoj nezvaničnoj mentorki, dr Sanji Mijatović, na razumevanju, toploj reči i pogledu u svakom teškom trenutku. Njena vera u mene, kada ni sama nisam verovala da mogu, bila je moja zvezda vodilja i vetar u leđa, koji su mi davali nadu i snagu da nastavim dalje. Bez njihove lavovske borbe na svakom koraku, podrške i podsticaja, poslovno ali i privatno, ova disertacija ne bi bila moguća.*

*Takođe, zahvaljujem se svim članovima komisije za odbranu disertacije. Prof dr Zori Dajić-Stevanović i prof dr Ivanu Jovanoviću hvala na dugogodišnjoj divnoj saradnji i pomoći da savladam nove oblasti i obogatim svoje znanje i veštine. Zahvaljujući njihovim sugestijama, ova doktorska disertacija je dobila svoj konačni oblik. Prof dr Biljani Božić Nedeljković i prof dr Bati Koraću zahvaljujem na njihovom vremenu, pažnji i korisnim sugestijama i smernicama.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojim kolegama i saradnicima sa odeljenja za Imunologiju koji su mi pružili dragocenu pomoć, podršku i prijateljstvo.*

*Neizmerno hvala mojim dragim kolegama iz grupe za biologiju kancera. Mojim koleginicama i prijateljicama Tamari i Dijani hvala na ukazanom poverenju i strpljenju tokom upoznavanja sa eksperimentalnim radom i nesebičnom deljenju znanja i veština. Mariji, Ekatarini i Teodori hvala na svakodnevnoj podršci, iskrenom prijateljstvu, divnoj energiji i toplini, a kolegama Blagoju i Vuku hvala na stvaranju prijatne i opuštajuće atmosfere za rad, posebno Blagoju koji je svojim spontanim dosetkama i šalama doprineo da svaki novi radni dan bude opušteniji i mnogo lakši.*

*Veliko hvala prof dr Dušku Dunđeroviću, dr Antoaneti Trendafilovoj i svim kolegama i saradnicima iz Centar za molekulska medicinu i istraživanje matičnih ćelija Fakulteta Medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu na pomoći prilikom izvođenja pojedinih eksperimenata koji su ovu disertaciju značajno unapredili.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami Anđelki, tati Aleksandru i sestri Petri na njihovoj ljubavi, razumevanju, podršci, nesebičnoj žrtvi i strpljenju koje mi svakodnevno pružaju. Oni su moja snaga, podstrek, i pokretač i bez njih ne bih bila to što jesam. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima.*

*Last but not least, I owe my gratitude to my partner Mohamad. Without his love, care, support, patience, constructive criticism, and long scientific discussions over the last five years, none of this would have been possible. He has been my solid ground in this turbulent time, enriching my life in every way and making me a better version of myself.*



## Uticaj etanolnog ekstrakta virka (*Alchemilla vulgaris* agg.) na fenotip maligne ćelije i mikrosredinu tumora u mišjim singenim modelima melanoma i tumora dojke

### Sažetak

Virak (*Alchemilla vulgaris* agg.) je biljka sa dugom istorijom upotrebe u narodnoj medicini koja se koristi u lečenju različitih bolesti. U ovoj studiji ispitan je uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na rast ćelijskih linija melanoma i dojke različitog porekla *in vitro* dok su efekti *in vivo* praćeni na mišjim modelima melanoma (B16F1 i B16F10) i tumora dojke (4T1). Takođe, analiziran je i uticaj na lokalni i sistemski imunski odgovor u modelima B16F1 i 4T1. Pokazano je da ekstrakt ostvaruje snažan antitumorski efekat na svim ispitivanim linijama. Tretman ekstraktom je doveo do inhibicije proliferacije i indukcije smrti autofagijom u B16F1 ćelijama, dok je u B16F10 klonu suprimirana deoba praćena apoptozom nezavisnom od aktivacije kaspaza. Slično, 4T1 ćelije su pod tretmanom podlegle programiranoj ćelijskoj smrti tipa I i II dok su im proliferativni i klonogeni potencijal, adhezivnost, migratornost i invazivnost smanjeni kroz inhibiciju integrinskog signalnog puta. Delotvornost tretmana je potvrđena *in vivo*, sa značajnim smanjenjem finalnog volumena tumora u sva tri modela. Pored direktnog uticaja na tumorske ćelije u modelima B16F1 i 4T1 *in vivo*, ekstrakt stimuliše sistemski i lokalni antitumorski imunski odgovor. Imunosupresivno okruženje je potisnuto maturacijom dendritskih ćelija sa poboljšanom sposobnošću da prezentuju antigene i doprinesu aktivaciji CD8<sup>+</sup> T limfocita u oba modela. Dodatno, u modelu B16F1, tretman je povećao procenat Th-1 ćelija koje proizvode proinflamatorne citokine i smanjio prisustvo regulatornih T ćelija i proizvodnju antiinflamatornih citokina. Svi navedeni efekti su praćeni odsustvom toksičnosti. Rezultati ove studije predstavljaju prve naučne podatke o višestrukim antitumorskim potencijalima *A. vulgaris* ekstrakta *in vivo*.

**Ključne reči:** *Alchemilla vulgaris* agg., apoptoza, autofagija, imunski odgovor, invazija, melanom, migracija, mikrosredina tumora, tumor dojke

**Naučna oblast:** Biologija tumora

**Uža naučna oblast:** Eksperimentalna onkologija

**UDK broj:**



# **Effect of ethanolic extract of Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* agg.) on malignant cell phenotype and tumor microenvironment in syngenic murin melanoma and breast cancer models**

## **Abstract**

*Alchemilla vulgaris* agg. is a plant with a long history of use in folk medicine for the treatment of various diseases. This study investigated the effect of the ethanolic extract of *A. vulgaris* on melanoma and breast cancer cell lines *in vitro*, and its effect in murine models of melanoma (B16F1 and B16F10) and breast tumor (4T1) *in vivo*. Moreover, the impact on local and systemic immune response was analyzed in the B16F1 and 4T1 models. The results showed that the extract exerted a strong antitumor effect on all tested cells. In B16F1 cells, the treatment inhibited proliferation and induced autophagic cell death, while in B16F10 counterpart, the treatment led to caspase-independent apoptosis along with inhibition of proliferation. Similarly, 4T1 cells underwent type I and II programmed cell death under treatment, with reduced proliferative and clonogenic potential, adhesion, migration, and invasion due to inhibition of the integrin signaling pathway. The efficacy of the treatment was also confirmed *in vivo*, with a significant reduction in final tumor volume in all three models. Besides direct effects on tumor cells in B16F1 and 4T1 models, the extract significantly promoted systemic and local antitumor immune response. In both models, the immunosuppressive environment was alleviated by the maturation of dendritic cells, which showed an enhanced ability to present antigens and activate CD8<sup>+</sup> T cells. Also, in the B16F1 model, the extract increased the proportion of Th-1 cells producing pro-inflammatory cytokines, while it reduced the presence of regulatory T cells and the production of anti-inflammatory cytokines. Remarkably, no systemic toxicity was observed. This study is the first scientific proof of antitumor potential of *A. vulgaris* extract *in vivo*.

**Key words:** *Alchemilla vulgaris* agg., apoptosis, autophagy, immune response, invasion, melanoma, migration, tumor microenvironment, breast tumor

**Scientific field:** Tumor biology

**Scientific subfield:** Experimental oncology

**UDC number:**



## Lista skraćenica:

**3-MA** – 3-metiladenin

**ABB** – pufer za vezivanje aneksina (engl. *Annexin Binding Buffer*, ABB)

**AGC** – automatska kontrola pojačanja (engl. *Automatic Gain Control*, AGC)

**Ann V-FITC** – aneksin V konjugovan FITC

**ANOVA** – analiza varijanse (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA)

**AO** – akridin-oranž (engl. *Acridine Orange*, AO)

**APC** – alofikocijanin (engl. *Allophycocyanin*, APC)

**APĆ** – antigen-prezentujuća ćelija

**APS** – amonijum-persulfat

**ATCC** – Američka kolekcija kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC)

**ATP** – adenzin-trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*, ATP)

**a.u.** – proizvoljne jedinice (engl. *arbitrary units*, a.u.)

**BAX** – engl. *Bcl-2-Associated X*, BAX

**Bcl-2** – engl. *B-Cell Lymphoma 2*, Bcl-2

**BRAFK** – engl. *B-type Raf Kinase*, BRAFK

**BSA** – albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumine*, BSA)

**CAF** – fibroblasti fenotipa tipičnog za tumorsko tkivo (engl. *Cancer-Associated Fibroblast*, CAF)

**CFSE** – 5(6)-karboksifluorescein-diacetat-N-sukcinimidil-estar

**CGA** – hlorogenska kiselina (engl. *Chlorogenic Acid*, CGA)

**CGAE** – ekvivalenti hlorogenske kiseline (engl. *Equivalents of Chlorogenic Acid*, CGAE)

**Covid-19** – bolest korona virusa (engl. *Coronavirus Disease 2019*, Covid-19)

**CTC** – cirkulišuće tumorske ćelije (engl. *Circulating Tumor Cells*, CTC)

**CTLA-4** – engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4*, CTLA-4

**CTL** – citotoksični T limfociti (engl. *Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL)

**CV** – kristal violet (engl. *Crystal Violet*, CV)

**DAMP** – molekularni obrazac povezan sa oštećenjem (engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP)

**DC** – dendritska ćelija (engl. *Dendritic Cell*, DC)

**DHR 123** – dihidrorodamin 123

**dLN** – drenirajući limfni čvor (engl. *Draining Lymph Node*, dLN)

**DMSO** – dimetil-sulfoksid

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**DTT** – ditiotreitrol

**ECL** – engl. *Electrochemiluminescence*, ECL

**ECM** – vanćelijski matriks (engl. *Extra Cellular Matrix*, ECM)

**EDTA** – etilendiamintetrasirćetna kiselina

**EGFR** – receptora epidermalnog faktora rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR)

**EMT** – epitelno-mezenhimska tranzicija (engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT)

**ER** – estrogenski receptor

**FACS** – protočna citofluorimetrija ili sortiranje ćelija aktivirano fluorescencom (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS)

**FAK** – kinaza fokalne adhezije (engl. *Focal Adhesion Kinase*, FAK)

**FBS** – serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS)

**FDG** – fluorescein-di-β-D-galaktopiranozid

**FITC** – fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*, FITC)

**FMG** – fluorescein-monogalaktozid

**FoxP3** – engl. *Forkhead box protein P3*, FoxP3

**GA** – galna kiselina (engl. *Gallic Acid*, GA)

**GAE** – ekvivalenti galne kiseline (engl. *Equivalents of Gallic Acid*, GAE)

**HCA** – derivati dihidroksicimene kiseline (engl. *Dihydroxycinnamic Acid Derivatives*, HCA)

**HER2** – humani receptor epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2)

**HRMS** – masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS)

**HRP** – peroksidaza rena (engl. *Horse Radish Peroxidase*, HRP)

**HRT** – dugotrajna terapija zamene hormona (engl. *Long-term Hormone Replacement Therapy*, HRT)

**H&E** – hematoksilin-eozin

**IFN-γ** – interferon gama

**IL** – interleukin

**ILK** – engl. *Integrin-Linked Kinase*, ILK

**IMC** – nezrele mijeloidne ćelije (engl. *Immature Myeloid Cells*, IMC)

**LC3B** – engl. *Microtubule-associated protein Light Chain 3B*, LC3B

**MaCSC** – matične ćelije raka dojke (engl. *Mammary Cancer Stem Cells*, MaCSC)

**MBC** – metastatski rak dojke (engl. *Metastatic Breast Cancer*, MBC)



**MDSC** – supresorske ćelije mijeloidnog porekla (engl. *Myeloid Derived Suppressor Cell*, MDSC)

**MEK** – engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK/*Extracellular signal-Regulated Kinase*, ERK

**MET** – mezenhimalno-epitelna tranzicija (engl. *Mesenchymal-Epithelial Transition*, MET)

**MHC** – molekul glavnog kompleksa tkivne podudarnost (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC)

**MS** – maseni spektrometar

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid

**NF-κB** – nukleusni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*, NF-kB)

**NK ćelije** – urođenoubilačke ćelije (engl. *Natural Killer Cells*, NK cells)

**NO** – azot-monoksid (engl. *Nitric Oxide*, NO)

**NSCLC** – nesitnoćelijski karcinom pluća (engl. *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*, NSCLC)

**PAMP** – molekularni obrazac povezan sa patogenom (engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs)

**PARP** – poli(ADP-riboze) polimeraza (engl. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase*, PARP)

**PBS** – fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffer Saline*, PBS)

**PBSTw** – PBS sa 0,1% Tween 20

**PCNA** – engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA

**PD-1** – receptor programirane smrti-1 (engl. *Programmed Death-1 Receptor*, PD-1)

**PD-L1** – ligand programirane smrti 1 (engl. *Programmed Death-Ligand 1*, PD-L1)

**PE** – fikoeritrin (engl. *Phycoerythrin*, PE)

**PEF** – efikasnost sađenja (engl. *Plating Efficiency*, PEF)

**PEC** – ćelije peritonealnog eksudata (engl. *Peritoneal Exudate Cells*, PEC)

**PerCP** – engl. *Peridinin-Chlorophyll-Protein*, PerCP

**PFA** – paraformaldehid

**PGE2** – prostaglandin E2

**PI** – propidijum-jodid

**PI3K** – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K)

**PMA** – forbol-12-miristat-13-acetat (engl. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, PMA)

**PMSF** – fenilmetilsulfonilfluorid

**PR** – progesteronski receptor

**PVDF** – polivinil-difluoridna membrana

**Q** – kvercetin (engl. *Quercetin*, Q)

**QE** – ekvivalenti kvercetina (engl. *Equivalents of Quercetin*, QE)

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**ROS/RNS** – reaktivne vrste kiseonika i azota (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, ROS/RNS)

**RPMI** – medijum za kultivaciju ćelija (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI)

**RT** – sobna temperatura (engl. *Room Temperature*, RT)

**SD** – standardna devijacija

**SDS** – natrijum-dodecil-sulfat

**SF** – frakcija preživljavanja (engl. *Surviving Fraction*, SF)

**SRB** – sulforodamin B

**SV** – srednja vrednost

**TAM** – makrofagi asociirani sa tumorom (engl. *Tumor-Associated Macrophages*, TAM)

**TCA** – trihlorsirćetna kiselina

**TCR** – T ćelijski receptor (engl. *T Cell Receptor*, TCR)

**TEMED** – N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin

**TFC** – engl. *Total Flavonoid Content*, TFC

**TGB** – engl. *Tris-Glycine Buffer*, TGB

**TGF- $\beta$**  – faktor rasta transformacije  $\beta$  (engl. *Transforming Growth Factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ )

**Th ćelija** – pomoćnička T ćelija (engl. *T helper cell*, Th cell)

**TIL** – tumor infiltrišući leukociti (engl. *Tumor-Infiltrating Leukocytes*, TIL)

**TME** – mikrosredina tumora (engl. *Tumor Microenvironment*, TME)

**TNBC** – trostruko negativni rak dojke (engl. *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC)

**TNF- $\alpha$**  – faktor nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ )

**TNFR** – receptor faktora nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor*, TNFR)

**TPC** – engl. *Total Phenolic Content*, TPC

**T<sub>reg</sub>** – regulatorne T ćelije (engl. *Regulatory T cells*, T<sub>reg</sub> cells)

**TRIS-HCl** – trisaminometan-hidrohlorid

**UHPLC** – tečna hromatografija ultra visokih performansi (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC)

**UV** – ultraljubičasto (engl. *Ultraviolet*, UV)

**VEGF** – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF)

**WHO** – Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO)

**$\alpha$ -SMA** – aktin glatkih mišića (engl.  *$\alpha$  Smooth Muscle Actin*,  $\alpha$ -SMA)

## Sadržaj:

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Rak</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Metastaziranje .....	4
<b>1.2. Melanom</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3. Tumor dojke</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. Imunologija tumora</b> .....	<b>7</b>
1.4.1. Mikrosredina tumora .....	9
1.4.1.1. T limfociti .....	11
1.4.1.1.1. CD8 <sup>+</sup> citotoksični T limfociti.....	11
1.4.1.1.2. CD4 <sup>+</sup> T limfociti .....	12
1.4.1.1.3. Regulatorne T ćelije .....	13
1.4.1.2. Dendritske ćelije .....	13
1.4.1.3. Makrofagi .....	14
1.4.1.4. Urođenoubilačke ćelije .....	14
1.4.1.5. Supresorske ćelije mijeloidnog porekla.....	15
1.4.2. Sistemski imunski odgovor na antigene tumora.....	15
<b>1.5. Prirodni proizvodi u lečenju raka</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6. Virak (<i>Alchemilla vulgaris</i> agg.): botaničke osobine i upotreba u narodnoj i zvaničnoj medicini</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Ciljevi</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Materijal i metode</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. Reagensi</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2. Rastvori</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3. Biljni materijal</b> .....	<b>30</b>
3.3.1. Prikupljanje biljnog materijala i priprema ekstrakta .....	30
<b>3.4. Analiza hemijskog sastava etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i></b> .....	<b>31</b>
3.4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC).....	31
3.4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC).....	31
3.4.3. Sadržaj ukupnih derivata dihidroksicimetne kiseline (HCA).....	31
3.4.4. Karakterizacija pojedinačnih komponenti ekstrakta (UHPLC-HRMS).....	32
<b>3.5. Kulture ćelija</b> .....	<b>32</b>
3.5.1. B16F1 ćelije mišjeg melanoma .....	32

3.5.2. B16F10 ćelije mišjeg melanoma .....	33
3.5.3. A375 ćelije humanog melanoma .....	33
3.5.4. 518A2 ćelije humanog melanoma .....	33
3.5.5. FemX ćelije humanog melanoma .....	33
3.5.6. 4T1 ćelije mišjeg tumora dojke .....	33
3.5.7. MCF-7 ćelije humanog tumora dojke .....	34
3.5.8. MDA-MB-468 ćelije humanog tumora dojke .....	34
3.5.9. MDA-MB-361 ćelije humanog tumora dojke .....	34
3.5.10. MDA-MB-231 ćelije humanog tumora dojke .....	34
3.5.11. PEC .....	34
3.5.12. Uslovi kultivacije i priprema ćelija za rad .....	35
<b>3.6. Eksperimentalne životinje .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7. Korišćene metode .....</b>	<b>36</b>
3.7.1. Tripsinizacija i pasažiranje ćelija .....	36
3.7.2. Procena vijabilnosti i određivanje broja ćelija .....	36
3.7.3. Testovi vijabiliteta .....	36
3.7.3.1. MTT test .....	36
3.7.3.2. SRB test .....	36
3.7.4. Bojenje ćelija PI bojom .....	37
3.7.5. Bojenje ćelija AO bojom .....	37
3.7.6. Protočna citofluorimetrija .....	37
3.7.6.1. Analiza stope ćelijskih deoba .....	38
3.7.6.2. Detekcija ćelija u apoptozi .....	38
3.7.6.3. Detekcija aktiviranih kaspaza .....	39
3.7.6.4. Detekcija autofagije .....	39
3.7.6.5. Detekcija aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze .....	39
3.7.6.6. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota .....	40
3.7.7. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju .....	40
3.7.8. Immunoblot .....	40
3.7.9. Klonogeni esej .....	41
3.7.10. Esej za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija <i>in vitro</i> .....	42
3.7.11. Test zarastanja rana .....	42
3.7.12. Eseji za kvantifikovanje migracije i invazije ćelija <i>in vitro</i> .....	42
3.7.13. Indukcija solidnog melanoma (B16F1 i B16F10) i tretman životinja .....	43
3.7.14. Indukcija solidnog tumora dojke (4T1) i tretman životinja .....	43
3.7.15. Određivanje parametara toksičnosti u urinu korišćenjem semikvantitativne metode .....	43
3.7.16. Histologija .....	44
3.7.16.1. Histochemija (Hematoksilin-eozin bojenje) .....	44
3.7.16.2. Imunofluorescenca .....	44
3.7.17. Priprema jednoćelijskih suspenzija slezina i tumora za protočnu citofluorimetriju .....	44
3.7.18. Statistička obrada podataka .....	45

<b>4. Rezultati .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Fitohemijaska karakterizacija etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na vijabilitet ćelija melanoma i tumora dojke <i>in vitro</i> .....</b>	<b>51</b>
4.2.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt smanjuje vijabilitet različitih ćelijskih linija melanoma humanog i mišjeg porekla <i>in vitro</i> .....	51
4.2.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt smanjuje vijabilitet različitih ćelijskih linija tumora dojke humanog i mišjeg porekla <i>in vitro</i> .....	52
4.2.3. Tretman ekstraktom <i>A. vulgaris</i> pokazuje selektivnost prema malignom fenotipu <i>in vitro</i>	53
<b>4.3. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na proliferaciju i vitalnost ćelija melanoma <i>in vitro</i> .....</b>	<b>53</b>
4.3.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt ostvaruje svoj uticaj na B16F1 ćelije inhibicijom proliferacije, ubrzanim starenjem i indukcijom ćelijske smrti autofagijom .....	53
4.3.1.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt utiče na ekspresiju proteina relevantnih za proces autofagije kod B16F1 ćelija.....	56
4.3.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt ostvaruje svoj uticaj na B16F10 ćelije inhibicijom proliferacije i indukcijom programirane ćelijske smrti – apoptoze .....	57
4.3.3. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt stimuliše produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS/RNS) u kulturama B16F1 i B16F10 ćelija .....	59
4.3.4. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt različito reguliše MAPK i PI3K/Akt signalne puteve u B16F1 i B16F10 ćelijama melanoma različite invazivnosti .....	61
<b>4.4. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na rast solidnog melanoma niske i visoke invazivnosti <i>in vivo</i> .....</b>	<b>63</b>
4.4.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt smanjuje rast tumora u singenim modelima primarnih melanoma niske i visoke invazivnost <i>in vivo</i> .....	63
4.4.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt je smanjio veličinu tumora u nisko i visoko invazivnim singenim modelima melanoma različitim mehanizmima .....	64
<b>4.5. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na vitalnost 4T1 ćelija <i>in vitro</i> .....</b>	<b>65</b>
4.5.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt ostvaruje svoj antitumorski efekat na 4T1 ćelije indukcijom programirane ćelijske smrti tipa I i II. ....	65
<b>4.6. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na proliferaciju i metastatski potencijal 4T1 ćelija <i>in vitro</i> .....</b>	<b>68</b>
4.6.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt snažno smanjuje metastatski potencijal 4T1 ćelija <i>in vitro</i> .....	68
4.6.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt smanjuje ekspresiju proteina neophodnih za metastaziranje 4T1 ćelija .....	69
<b>4.7. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na rast solidnog tumora dojke <i>in vivo</i> .....</b>	<b>71</b>
4.7.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt smanjuje rast tumora <i>in vivo</i> u ortotopskom singenom modelu tumora dojke .....	71
4.7.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt sprečava pojavu metastaza <i>in vivo</i> u ortotopskom singenom modelu tumora dojke.....	72

<b>4.8. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na sistemski imunski odgovor i mikrosredinu tumora u modelima nisko invazivnog melanoma (B16F1) i tumora dojke (4T1) <i>ex vivo</i>.....</b>	<b>73</b>
4.8.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt pojačava sistemski imunski odgovor u solidnom modelu melanoma B16F1 .....	73
4.8.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt pojačava lokalni antitumorski imunski odgovor u solidnom modelu melanoma B16F1 .....	75
4.8.3. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt pojačava sistemski antitumorski imunski odgovor u 4T1 modelu tumora dojke.....	77
4.8.4. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt pojačava lokalni antitumorski imunski odgovor u 4T1 modelu tumora dojke .....	79
<b>4.9. Uticaj etanolnog ekstrakta <i>A. vulgaris</i> na pojavu sistemske toksičnosti kod C57BL/6 i BALB/C miševa .....</b>	<b>81</b>
4.9.1. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt ostvaruje snažan antitumorski efekat u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma bez značajne sistemske toksičnosti .....	81
4.9.2. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt ostvaruje antitumorski efekat na modelu tumora dojke bez značajne sistemske toksičnosti .....	83
4.9.3. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt nije doveo do promena telesne mase tretiranih životinja u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma i modelu tumora dojke.....	83
4.9.4. <i>A. vulgaris</i> ekstrakt ne pokazuje toksične efekte u urinu tretiranih životinja u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma i modelu tumora dojke.....	84
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>87</b>
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>101</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>105</b>

# **1. Uvod**





## 1.1. Rak

Proliferacija i rast somatskih ćelija je složen, višestepen proces, koji je u zdravim ćelijama regulisan različitim precizno izbalansiranim mehanizmima [1]. Neki faktori poput spontanijh mutacija izazvanih ultraljubičastim (engl. *Ultraviolet*, UV) zračenjem ili unošenje različitih supstanci sa kancerogenim delovanjem, mogu narušiti ovu dobro kontrolisanu ravnotežu i posledično dovesti do poremećaja regulacije ćelijskog rasta koji vodi u abnormalnu proliferaciju ćelija i nastanak benignog ili malignog tumora [2,3]. Otuda je rak definisan kao maligna neoplazija sa neregulisanom i abnormalnom proliferacijom ćelija. Međutim danas se susrećemo i sa nešto izmenjenim konceptom koji značajno relativizuje dosadašnje poimanje procesa maligne transformacije. Naime, suprotno prethodnim tvrdnjama da je preduslov za nastanak tumorske ćelije isključivo vezan za prisustvo spontanijh mutacija, kao i da je rak bolest nasumičnog karaktera, novija saznanja ukazuju da nije u potpunosti tako. Prvenstveno, pokazano je da ova bolest ne mora nužno biti povezana sa mutagenim promenama [4], a potom, i da frekvencija ovijh promena ne korelira sa gradusom bolesti [5]. Tumorske ćelije imaju sposobnost da drastično preoblikuju kako biosintetske tako i bioenergetske puteve u cilju održavanja svoje aberantne stope rasta. Dinamične intra- i ekstra-tumorske interakcije ćelija raka sa njihovim mikrookruženjem su od suštinskog značaja za heterogenost tkiva tumora i upravo su one odgovorne za neadekvatnu ili stečenu neosetljivost na različite terapije što ishoduje progresijom bolesti i metastaziranjem [6]. Takođe, dobro je poznato da ćelije raka mogu učiniti da ćelije u okruženju podržavaju njihov rast i širenje [7]. Naime, kao odgovor na nepovoljne uslove kao što su nedostatak kiseonika, nutrijenata, kiselost i akumulacija otpadnih materija u okruženju, ćelije raka preusmeravaju aktivnosti susednih nemalignijh ćelija uključujući fibroblaste i imunske ćelije kao i nećelijske komponente u svoju korist [8,9]. Sve navedeno ukazuje da se zapravo radi o savršenoj višećelijskoj organizaciji koja omogućava samoodrživost zbog čega rak predstavlja veliki problem javnog zdravlja i drugi je vodeći uzročnik smrti u svetu. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) iz 2019. godine, rak je prvi ili drugi vodeći uzrok smrti pre navršenijh 70 godina života u 112 od 183 zemlje i zauzima treće ili četvrto mesto u još 23 zemlje [10]. Uprkos napretku u pretrazi populacije, ranoj dijagnostici i razvoju inovativnijh pristupa u lečenju u poslednijh nekoliko decenija, ukupna incidencija je i dalje u porastu, te se očekuje da će nadmašiti kardiovaskularne bolesti koje su trenutno najveći uzrok mortaliteta širom sveta [11]. Pandemija bolesti izazvana korona virusom (engl. *Coronavirus disease 2019*, Covid-19) 2020. godine značajno je doprinela ovom bilansu. Smanjena kontrola zdravlja zbog zatvaranja zdravstvenijh ustanova i straha od izloženosti virusu doveli su do kašnjenja u dijagnostici i lečenju što je praćeno kasnijm otkrivanjem bolesti i posledično povećanim mortalitetom [12]. Prema poslednijm podacima iz 2022. godine, zabeleženo je 19,96 miliona novijh slučajeva raka i 9,7 miliona umrlijh od malignijh bolesti širom sveta. Iako Evropa obuhvata svega 9,6% svetske populacije, zabeleženo je čak 22,4% od ukupnog broja slučajeva raka i 20,4% smrtnijh ishoda uzrokovanih ovom bolešću što ukazuje na povećanu incidenciju raka u razvijenijm zemljama. Najčešće dijagnostikovani tip karcinoma širom sveta je rak pluća sa 12,4%. Slede karcinom dojke kod žena sa 11,6%, kolorektalni karcinom sa 9,6%, rak prostate sa 7,3% i rak želuca sa 4,9%. Rak pluća je vodeći uzrok mortaliteta (18,7%), a zatim slede kolorektalni karcinom (9,3%), rak jetre (7,8%), karcinom dojke kod žena (6,9%) i rak želuca (6,8%) [13].

Rak može biti uzrokovan unutrašnjim faktorima kao što su nasledne mutacije, hormonski status, disfunkcija imunskog sistema, ali i faktorima životne sredine kao i načinom života [14]. Literaturni podaci ukazuju da većina tumora nije naslednog porekla i da faktori načina života (pušenje, ishrana, gojaznost, konzumacija alkohola, infekcije, zagađivači životne sredine, zračenje i slično) kroz genetske, ali i epigenetske alteracije imaju najveći udeo u njihovom nastanku, dok je svega 5 do 10% svih slučajeva raka uzrokovano naslednijm mutacijama u onkogenima, tumor supresor genima kao i mutacijama u genima sistema za reparaciju DNK [14–16]. Ovo upućuje na to da promene u načinu života svakog pojedinca, uz pojačanu brigu o životnoj sredini, mogu biti ključni koraci ka značajnom smanjenju broja obolelijh i smrtnosti izazvanih ovom bolešću.

### 1.1.1. Metastaziranje

Osnovna odlika koja razlikuje maligne od benignih tumora je sposobnost širenja u susedna tkiva ili naseljavanje udaljenih tkiva i organa, što je označeno terminom metastaziranje. Metastaze su najsmrtonosniji događaj u tumorigenezi i odgovorne su za čak 90% smrtnih ishoda povezanih sa rakom. Ujedno, glavni su uzrok neuspelih terapija [17]. Na primer, u slučaju raka prostate, skoro svi smrtni slučajevi su posledica metastaza [18]. Ranije su metastaze posmatrane kao terminalni stadijum uznapredovalog tumora i krajnja faza progresije bolesti [19]. Međutim, nedavna istraživanja su ukazala na mogućnost pojave metastaza i u ranoj fazi tumorigeneze čime je pređašnji koncept relativizovan, a otvorene su brojne nedoumice o samom procesu rasejavanja tumora [17]. Metastaziranje je višestepen proces koji počinje odvajanjem tumorskih ćelija iz primarnog tumora a završava se kolonizacijom udaljenih mesta sekundarnim tumorima [20]. Ogromna složenost i nedostatak razumevanja ovog višestepenog događaja razlog je neuspeha medikamentozne terapije u suzbijanju metastaza i predstavlja izazov za istraživače u različitim oblastima – od biomedicine, preko hemije do tehnologije [21].

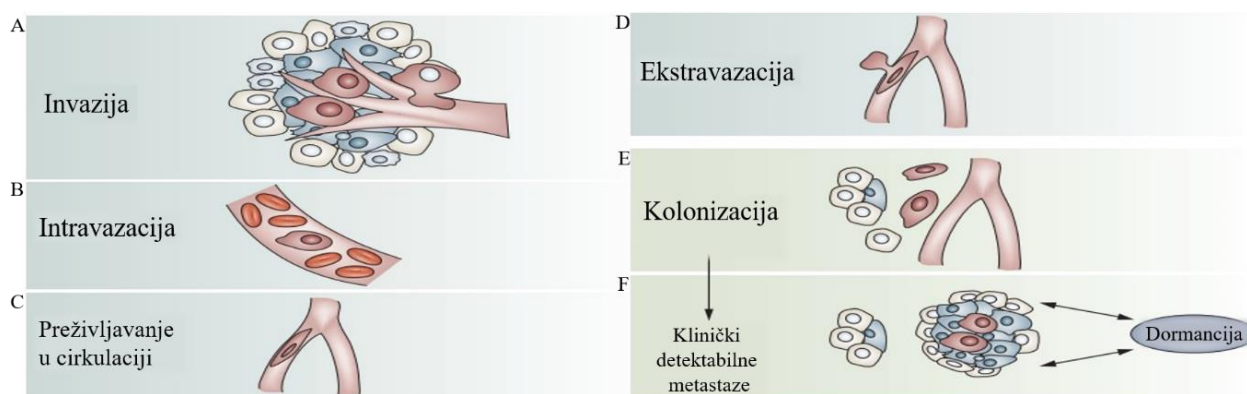
Da bi se pojedinačne ili male grupe tumorskih ćelija odvojile od primarnog tumora i pokrenule metastatski proces, one moraju da steknu sposobnost migracije i invazije. Ove osobine omogućavaju tumorskim ćelijama da razgrade vanćelijski matriks (engl. *Extra Cellular Matrix*, ECM) okolnog tkiva prema krvnim i limfnim sudovima koji im omogućavaju transport do udaljenih, sekundarnih mesta [22].

Diseminacija ćelija raka uslovljena je nizom uzastopnih događaja. Prvi neophodan korak u metastatskoj kaskadi je odvajanje ćelija raka od primarnog tumora. Raznovrsni faktori, izazvani spoljnim stimulusima, mogu inicirati ovaj proces. To mogu biti poremećaji cirkadijalnog ritma, starenje, mehanički pritisci na ECM, međućelijske interakcije, solubilni medijatori poput faktora rasta i citokina, intratumorska mikrobiota i slično [23,24]. U proteklih nekoliko decenija, prepoznat je i definisan biološki fenomen nazvan epitelno-mezenhimska tranzicija (engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) putem kojeg ćelije raka stiču sposobnost invazije, migracije i diseminacije [16,22]. Ovaj fenomen transdiferencijacije reguliše biohemijske promene koje omogućavaju ćelijama epitelnog fenotipa da se transformišu u nediferencirane ćelije nalik mezenhimalnim ćelijama. EMT je reverzibilan proces kojim se ćelije mezenhinskog fenotipa mogu vratiti u epitelno stanje procesom mezenhimsko-epitelne tranzicije (engl. *Mesenchymal-Epithelial Transition*, MET) [25]. Nakon što su podlegle EMT, ćelije raka se odvajaju od primarnog tumora kao pojedinačne ćelije ili u klasterima u kojima je većina ćelija epitelnog fenotipa, i migriraju i invadiraju stromu (Slika 1A). Osnovne karakteristike ćelija podleglih EMT su ekspresija integrina koji dalje omogućavaju migraciju kao i ekspresija proteolitičkih enzima koji razgradnjom proteine ECM omogućavaju angiogenezu i reorganizaciju tkiva [26]. Sledeći neophodan korak u metastatskoj kaskadi je proces intravazacije koji podrazumeva ulazak ćelija raka u krvne i limfne sudove usled čega dolazi do narušavanja integriteta bazalne membrane endotelnih ćelija (Slika 1B) [27]. Maligne ćelije koriste transportni sistem kako bi dospele do udaljenog tkiva ili organa i njihovo kretanje kroz cirkulaciju može se odvijati aktivno ili pasivno u zavisnosti od same vaskulature, ali i mikrosredine [21]. Tumorske ćelije koje su dospele u cirkulaciju se nazivaju cirkulišuće tumorske ćelije (engl. *Circulating Tumor Cells*, CTC) i mogu putovati pojedinačno ili u klasterima. Upravo postojanje klastera unutar kojih se ćelije raka međusobno štite od mehaničkih oštećenja ali i ćelija imunskog sistema koje im prete na putu do ciljnog organa, govori o potrebi ovih ćelija za međusobnom komunikacijom i saradnjom koja će im omogućiti efikasno formiranje metastaza (Slika 1C) [28,29].

Izlazak ćelija raka iz cirkulacije procesom ekstravazacije uključuje nekoliko načina (Slika 1D). Ćelije raka adheriraju za endotel putem povećane ekspresije adhezivnih receptora na svojoj površini koji im omogućavaju prepoznavanje odgovarajućih liganda na površini endotelnih ćelija [30]. Zatim CTC napuštaju cirkulaciju putem transendotelne migracije uz pomoć mijeloidnih ćelija koje povećavaju propustljivost sudova [31]. Takođe, može doći do zaglavlivanja CTC u kapilarima

ciljnih organa gde dolazi do lokalnog razmnožavanja i rasta ćelija unutar krvnih sudova. Ovo može uzrokovati pucanje zidova krvnih sudova čime CTC dospevaju u ciljni organ. Pored toga, ćelije raka mogu da izazovu programiranu nekrozu endotelnih ćelija, dovodeći time do ekstravazacije u ciljno tkivo [32]. Usled velike propustljivosti sinusoidnih sudova u jetri i kostima, dolazi do visoke stope metastaziranja CTC upravo u ove organe [33]. Ogromna većina ćelija raka koje su pretrpele ekstravazaciju, još uvek nisu u stanju da efikasno kolonizuju ciljni organ. Poznato je da se kod nekoliko tipova karcinoma, pojedinačne tumorske ćelije mogu otkriti u koštanoj srži godinama pre razvoja makroskopskih metastaza i većina ovih ćelija neće uspeti da razvije makrometastaze [34].

Poslednji korak u metastatskoj kaskadi i progresiji malignog tumora je kolonizacija sekundarnog mesta (Slika 1E). Ona u mnogome zavisi od sposobnosti ćelija raka da se prilagode novom mikrookruženju a faktori neophodni za uspešnu kolonizaciju podrazumevaju interakcije između ćelija raka i ćelija u ciljnom organu ali i uspešno uspostavljanje vaskularne mreže [21]. Pokazano je da primarni tumori, sekretuju brojne faktore i vezikule koje indukuju vaskularno curenje, imunosupresiju kao i preuređivanje ECM, čime favorizuju preživljavanje ćelija raka u udaljenim ciljnim organima i omogućavaju stvaranje kolonija [35]. Neki tipovi tumora, posebno melanomi, karcinomi dojke i prostate, nakon uklanjanja primarnog tumora mogu da razviju metastaze i nakon nekoliko godina ili decenija postoperativno. Do ovoga dolazi usled ulaska ćelija raka u stanje dormancije (stanje mirovanja) nakon kolonizacije ciljnog tkiva. Ovo stanje može trajati jako dugo i do aktiviranja ćelija raka dolazi zbog promena u mikrosredini (Slika 1F) [36,37].



Slika 1. **Kaskada uzastopnih događaja tokom procesa metastaziranja.** Preuzeto i modifikovano iz Mina i Sledge 2011 [38].

O kompleksnosti procesa metastaziranja govori činjenica da se ne radi o jednosmernom fenomenu. Naime, ćelije raka koje su formirale udaljene sekundarne tumore, mogu ponovo prodrati u cirkulaciju i nastaniti nove organe. Takođe, ćelije iz metastatskih kolonija mogu krvotokom ili limfotokom da se vrte na mesto primarnog tumora. Ono što je takođe važno je fenomen metastatskog organotropizma koji podrazumeva da većina tumora favorizuje metastaziranje u tačno određene ciljne organe [39]. Uprkos velikim naporima da se napravi iskorak u razumevanju ovog fenomena, proces metastaziranja ostaje enigma te svaki napredak na ovom polju predstavlja veliki korak u potencijalnom dizajniranju lekova za najteže forme malignih bolesti [21,40].

## 1.2. Melanom

Melanom je najsmrtonosniji oblik raka kože i kao takav predstavlja značajan problem za javno zdravlje. Njegova učestalost raste zabrinjavajućom stopom širom sveta [41,42]. Melanociti su ćelije koje potiču od embrionalnih ćelija nervne kreste i nalaze se u bazalnom epidermisu kože, folikulu dlake i sudovnjači oka [41,43]. Njihova osnovna uloga je produkcija pigmenta melanina koji potom biva preuzet od strane keratinocita gde apsorbuje UV zračenje i tako sprečava dalje oštećenje DNK [44]. Melanom nastaje neoplastičnom transformacijom melanocita i iako čini svega 5% svih

maliginiteta kože, zaslužan je za više od 50% mortaliteta [45,46]. Pored melanoma, razlikuju se još dve grupe malignih tumora kože (bazocelularni i skvamocelularni karcinom) koji spadaju u nemelanomske tumore. Za razliku od drugih tipova solidnih tumora koji se obično javljaju u starijoj populaciji, melanom se može razviti u ranoj životnoj dobi i odgovoran je za većinu smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom između 20 i 35 godina starosti [47]. Prema podacima globalne statistike u 2022. godini bilo je preko 330 hiljada novodijagnostifikovanih melanoma, što je dovelo do više od 58 hiljada smrtnih ishoda [13].

Najznačajniji faktor rizika za pojavu melanoma (u čak 60-70% slučajeva) je UV zračenje [48,49]. Pored UV zračenja, na pojavu melanoma mogu uticati pol, tip kože, lična i porodična anamneza, geografska pozicija, kao i prisustvo nevusa na koži [47,50–53]. Takođe, incidencija melanoma se značajno razlikuje između različitih etničkih grupa [50]. Dobro je poznato da melanom ima visok metastatski potencijal i da može metastazirati na susedna i/ili udaljena mesta. Kada su u pitanju regionalne metastaze, to su koža i limfni čvorovi, dok su pluća, mozak, creva, jetra i kosti najčešća udaljena mesta [54,55]. Jedan od glavnih razloga visokog mortaliteta je taj što agresivna invazija ćelija melanoma u susedno tkivo počinje kada je primarni tumor još uvek relativno neprimetan [56].

Terapija melanoma uključuje nekoliko različitih pristupa u lečenju poput hiruškog odstranjivanja, radioterapije, hemioterapije, imunoterapije, ali i ciljane terapije. Hiruška intervencija može biti efikasna u do 90% slučajeva samo kada se melanom otkrije u ranoj fazi, dok za pacijente sa metastatskim melanomom hiruško odstranjivanje nije opcija [57]. Tada se za sistemsko lečenje mogu primeniti radioterapija, hemioterapija, imunoterapija ili ciljana terapija. Kada je u pitanju hemioterapija, već nekoliko decenija kao zlatni standard upotrebljava se dekarbazin ali terapija može uključiti i druge citostatike poput cisplatine, karboplatine, temozolomida i hidrokisurida [58]. Međutim, upotreba ovih lekova je ograničena zbog niskog terapijskog indeksa, neželjenih efekata i lako stečene rezistencije [59]. Upravo iz tog razloga maligni melanom ima jako lošu prognozu, sa stopom preživljavanja od 6 do 9 meseci dok je petogodišnja stopa preživljavanja manja od 5% [60,61]. Razvoju ciljane i imunoterapije doprinela su nova otkrića molekularnih mehanizama koji leže u osnovi osobenosti melanoma ali i prirodni imunskog odgovora u pomenutoj patologiji, a primena ovih pristupa u lečenju dovela je do povećanja prosečne stope preživljavanja do 30 meseci u poslednjih desetak godina [62]. Kao deo ciljane terapije u postoperativnoj fazi, primenjuju se inhibitori kinaza MEK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK, odnosno *Extracellular Signal-Regulated Kinase*, ERK) i BRAF (engl. *B-type Raf Kinase*, BRAFK) kako bi se blokirali signalni putevi koji su uključeni u inicijaciju i progresiju određenih tipova melanoma. Kao deo imunoterapije upotrebljavaju se anti-CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4*, CTLA-4) i anti-PD-1 (engl. *Programmed Death 1 Receptor*, PD-1) antitela. Oživljavanje antitumorskih aktivnosti ćelija imunskog sistema primenom ovih terapijskih pristupa dovelo je do značajnih poboljšanja kod pacijenata [63–70].

Bez obzira na velike napore naučnika i istraživača, kao i nova otkrića, terapija melanoma je još uvek nedovoljno efikasna i zbog toga ovaj maligni tumor kože i dalje predstavlja veliki izazov kada je u pitanju njegovo lečenje.

### 1.3. Tumor dojke

Globalno tumor dojke je najučestaliji maligni tumor kod žena i predstavlja 24,5% svih malignih oboljenja u ženskoj populaciji. [71]. Prema najnovijoj statistici, drugi je najčešće dijagnostikovani tip raka u 2022. godini sa procenjenih 2,3 miliona novih slučajeva što čini 11,6% svih prijavljenih slučajeva malignih bolesti. Takođe, je bio drugi po učestalosti uzrok smrti od ovog tipa bolesti sa zabeleženih 665 hiljada smrtnih slučajeva u 2022. godini [13]. Budući da se radi o multifaktorijalnoj bolesti, brojni su razlozi koji mogu doprineti njenom nastanku poput genetske predispozicije, strukture populacije, životne sredine, izloženost estrogenima (endogenim i egzogenim uključujući dugotrajnu terapiju zamene hormona (engl. *Long-term Hormone*

*Replacement Therapy*, HRT), jonizujuće zračenje, ali i način ishrane, gojaznost, konzumacija alkohola kao i psihosomatski aspekti. Sve nabrojano utiče na povećanje prevalence tumora dojke širom sveta [72–75]. Incidencija tumora dojke je posledično povećana i zbog ranog otkrivanja bolesti uvođenjem mamografskog snimanja i nastavlja da raste sa povećanjem starosne granice populacije [75].

Najveći procenat tumora je rezultat benignih promena u dojci. Kada se radi o malignim promenama, većina se javlja u ćelijama koje oblažu kanale (duktalni karcinomi), dok neki nastaju u ćelijama koje oblažu lobule (lobularni karcinomi) [76]. Najčešći histološki tipovi tumora dojke uključuju medularni karcinom, metaplastični karcinom, apokrini karcinom, mucinozni karcinom, kribriiformni karcinom, tubularni karcinom, neuroendokrini karcinom, klasični lobularni karcinom i pleomorfni lobularni karcinom, pored invazivnog duktalnog karcinoma nespecifičnog tipa [77].

U zavisnosti od toga da li je tumor dojke dijagnostikovao u ranoj ili uznapređevaloj fazi, terapijski pristup se razlikuje. Ukoliko se otkrije u ranoj fazi, cilj terapije je potpuno izlečenje i sprečavanje rizika od ponovne pojave. Lečenje tumora dojke u ranoj fazi uključuje lokalne i sistemske metode, i u ovim okolnostima lokalne metode – operacija (hiruško uklanjanje) i zračenje (radioterapija) mogu zameniti sistemske metode uz postizanje istog efekta [75,78]. Sistemsko lečenje tumora dojke u ranom stadijumu podrazumeva hemioterapiju, antihormonsku terapiju, ciljanu biološku terapiju i imunoterapiju i dovodi do različitog procenta smanjenja rizika od širenja bolesti [79].

Metastatski rak dojke (engl. *Metastatic Breast Cancer*, MBC) se smatra neizlečivom bolešću pa se samim tim i pristup u lečenju razlikuje od onog otkrivenog u ranoj fazi. Osnovni cilj lečenja MBC je uspostavljanje kontrole bolesti i produženje preživljavanja uz koliko je moguće, očuvanje kvaliteta života pacijenta [80]. Zabeležena su poboljšanja u preživljavanju uz upotrebu odgovarajuće terapeutske strategije, a sistemska terapija je svakako terapija izbora [81–84]. Inovativni pristupi poput imunoterapije, konjugovanih antitela i modulacije metaboličkih puteva pokazali su obećavajuće rezultate [85].

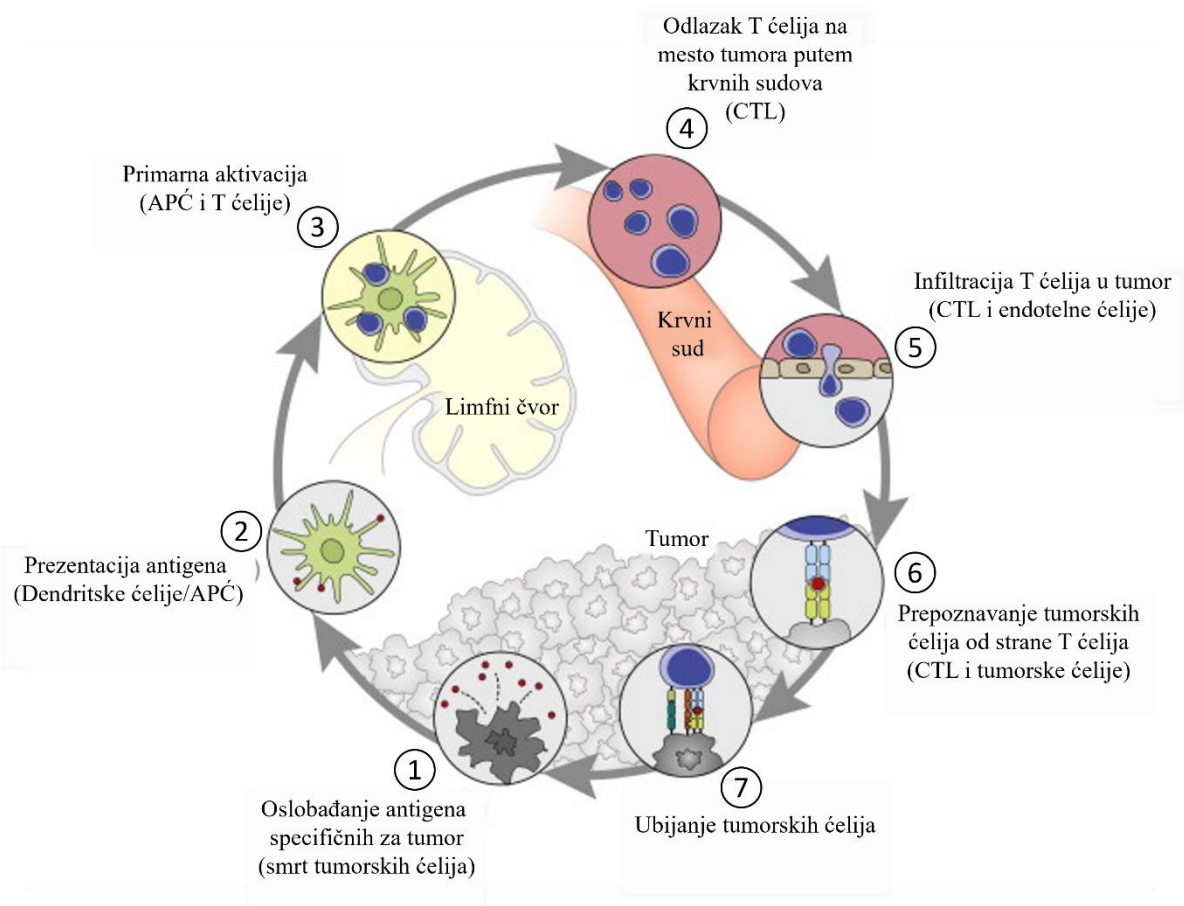
Jedan od kriterijuma za izbor načina lečenja tumora dojke jeste karakterizacija fenotipa ćelija kroz određivanje ekspresije receptora. Danas su u kliničkoj praksi uspostavljene četiri molekularne podgrupe: Luminalni tip A (hormon pozitivni i HER2 (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2) negativni), Luminalni tip B (hormon pozitivni i HER2 pozitivni), HER2 pozitivni i trostruko negativni tip [77]. Estrogenske receptore (ER) eksprimira oko 80% svih ćelija tumora dojke, dok 65% ovih ćelija dodatno eksprimira i progesteronski receptor (PR). Karcinomi dojke pozitivni na receptore za hormone mogu se lečiti modulatorima estrogenskih receptora kao što je tamoksifen ili inhibitorima aromataza poput anastrozola [86–88]. HER2 je prekomerno ekspimiran u oko 20% svih ćelija tumora dojke i u poređenju sa karcinomom dojke pozitivnim na receptore za hormone, ovi tumori su agresivniji i manje reaguju na konvencionalne hemioterapeutike. Međutim, oni se danas mogu lečiti primenom monoklonskih antitela koja ciljaju HER2 receptore kao što je trastuzumab ili odgovarajućim konjugatima antitelo-lek (trastuzumab emtanzin) [89,90]. Karcinomi dojke koji ne ekspimiraju ER, PR i HER2 označeni su kao trostruko negativni (engl. *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC). Ovaj tip raka dojke čini oko 10 do 20% svih karcinoma dojke i 25% tumora visokog gradusa [91,92]. Strategije lečenja koje se mogu primeniti u ovim slučajevima su, na primer, poli(ADP-riboze) polimeraze (engl. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase*, PARP) inhibitor kao što je olaparib ili blokatori liganda programirane smrti 1 (engl. *Programmed Death-Ligand 1*, PD-L1) kao što je atezolizumab [93,94] čime se oživljava aktivnost ćelija imunskog sistema. Međutim, zbog svoje visoko invazivne prirode i limitiranog učinka terapija, kreiranje novih pristupa u lečenju TNBC su i dalje veliki izazov za naučnike koji se bave problematikom malignih bolesti [95].

#### **1.4. Imunologija tumora**

Rak je složena bolest čiji ishod u velikoj meri zavisi od unakrsne komunikacije između ćelija tumora i drugih konstituenata njegovog mikrookruženja. Iako prve indicije o uključenosti imunskog

sistema u kontroli raka datiraju unazad više od jednog veka, imunologija tumora se može smatrati poljem u nastajanju [96]. Do procvata imunologije tumora došlo je u protekle dve decenije uvođenjem dva ključna koncepta koji stavljaju u prvi plan specifični imunski odgovor na tumor. Jedan je teorija o imunskom nadzoru, a druga o preuređenju (engl. *Immunoediting*) koja podrazumeva oblikovanje imunskog odgovora interakcijom ćelija tumora sa ćelijama imunskog sistema [97,98]. Koncept imunskog nadzora podrazumeva da imunski sistem štiti domaćina od nastanka malignog tumora. Iako je ova hipoteza bila predmet polemike, jasni su dokazi postojanja efikasnog imunskog nadzora raka [98–102]. Međutim, pokazano je da tumorske ćelije koje su pod pritiskom imunskog sistema pronalaze različite načine za izbegavanje mehanizama koji ih potiskuju. Upravo su te složene interakcije između ćelija raka i imunskog sistema dovele do razvoja koncepta preuređenja koje se odvija u nekoliko faza [100–102]. Prva faza je **faza eliminacije** tumorskih ćelija. Ovde se aktiviraju ćelije kako urođenog, tako i adaptivnog imunog sistema, koje zatim ispoljavaju svoja citotoksična svojstva. Obzirom da ovaj proces inhibira razvoj i/ili rast tumora i time redukuje broj nastalih tumora, ukoliko je nepotpun, može odvesti u drugu fazu – **fazu ravnoteže** u kojoj rezidualne ćelije raka opstaju u imunokompetentnom domaćinu. U fazi ravnoteže, ćelije imunskog sistema ne uspevaju da u potpunosti eliminišu tumor čime ćelije raka razvijaju sposobnost da zaobiđu imunosupresiju i prelaze u treću fazu – **fazu bekstva** koja dovodi do dalje progresije i metastaziranja tumora [102,103].

Genetske i negenetske promene koje čine ćelije raka drugačijim u odnosu na zdrave ekvivalente, omogućavaju imunskom sistemu generisanje odgovora posredovanog T limfocitima koji specifično prepoznaju i uklanjaju obolele ćelije. Da bi imunski sistem efikasno obavio ovaj posao, mora se pokrenuti čitav niz postepenih događaja. U prvom koraku, neoantigeni nastali u procesu onkogeneze, bivaju oslobođeni, prepoznati i uhvaćeni od strane antigen prezentujućih ćelija (APC) – dendritskih ćelija (engl. *Dendritic Cell*, DC). Da bi ovaj korak doveo do uspešnog odgovora T limfocita on mora biti praćen dopunskim signalima poput proinflammatoryh citokina i faktora koje oslobađaju umirujuće tumorske ćelije. Takođe je poznato da neoantigeni mogu biti prezentovani i od strane ćelija raka tako što se vezuju za molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnost klase I (engl. *Major Histocompatibility Complex Class I*, MHC I) na površini tumorskih ćelija. U sledećem koraku, DC prezentuju uhvaćene antigene u sklopu molekula MHC I i MHC II klase čime pokreću, odnosno aktiviraju imunski odgovor posredovan CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T limfocitima. Krajnji ishod ove komunikacije je uspostavljanje efikasnog odgovora efektorskih CD8<sup>+</sup> T limfocita specifičnih za antigene tumora. Konačno, ove ćelije infiltriraju tumor, specifično prepoznaju i vezuju se za ćelije raka kroz interakcije između receptora na T ćelijama (engl. *T Cell Receptor*, TCR) i adekvatnog antigena vezanog za MHC I klase na površini ćelija raka i ubijaju ih. Ovim putem dolazi do oslobađanja dodatnih antigena specifičnih za tumor čime se pojačava imunski odgovor po principu pozitivne povratne sprege (Slika 2) [104].



Slika 2. **Ciklus imunskog odgovora protiv tumora.** Preuzeto i modifikovano iz Chen i Mellman 2013 [104].

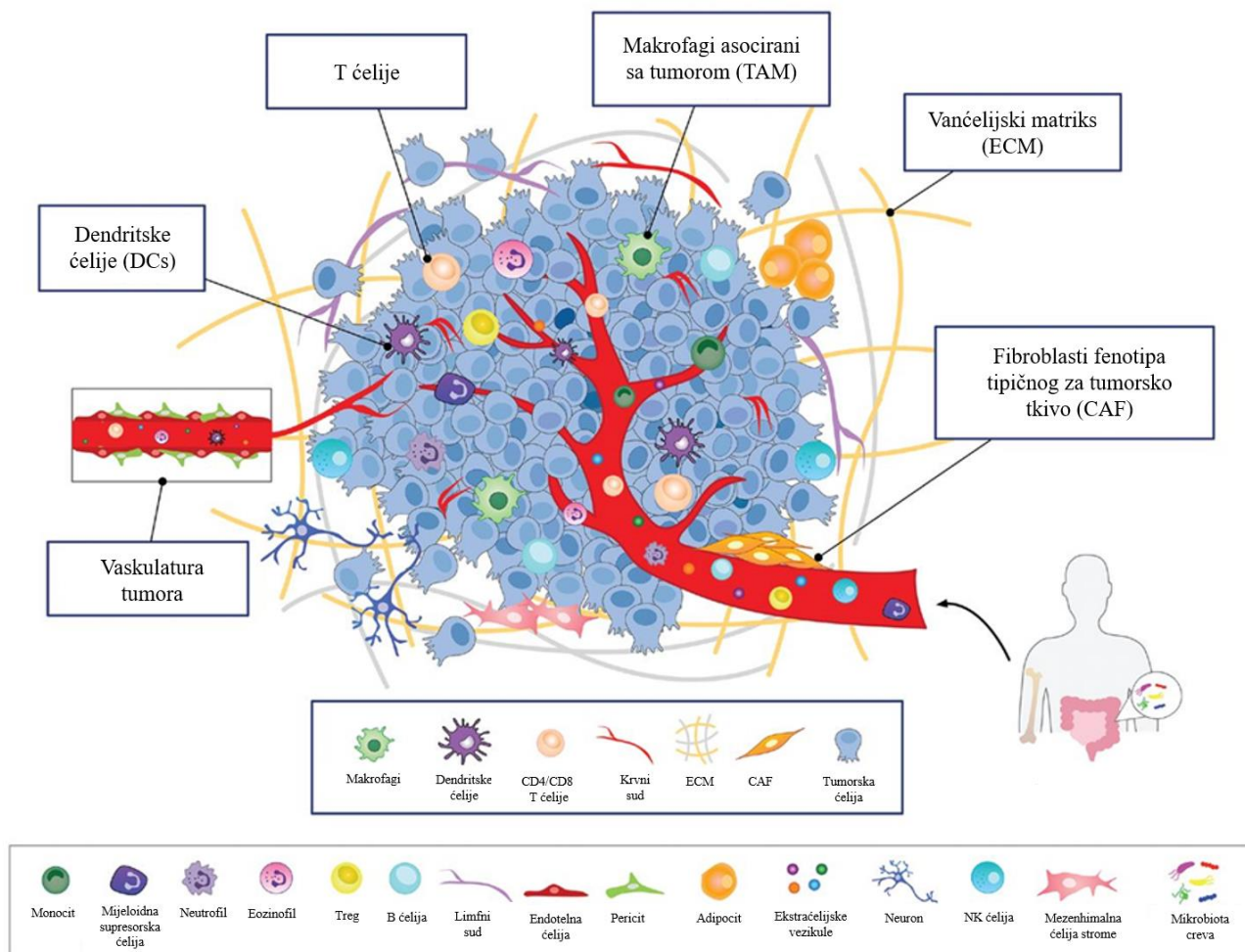
Međutim, kako ogranizam obolelo tkivo doživljava kao tkivo koje treba zalečiti, ovaj ciklus povlači aktivaciju inhibitornih signala i regulatornih mehanizama negativne povratne sprege što dovodi do zaustavljanja imunskog odgovora protiv raka. Paralelno, tumorske ćelije mogu da razviju različite načine izbegavanja imunskog odgovora u svim njegovim fazama od prepoznavanja do realizacije efektorskih funkcija. Prvenstveno, može se desiti da antigeni specifični za tumor ne budu otkriveni od strane APC. Pored toga, moguće je da DC i T limfociti tretiraju antigene oslobođene iz tumorskih ćelija kao sopstvene, a ne strane, stvarajući na taj način odgovor regulatornih T ćelija (engl. *Regulatory T cells*,  $T_{reg}$  cells), a ne odgovor efektorskih T limfocita. Takođe, T limfociti mogu biti sprečeni da infiltriraju tumor, ali isto tako, i faktori u mikrookruženju tumora mogu da inhibiraju efektorske T limfocite koji se već tamo nalaze [105].

Upravo je glavni cilj imunoterapije da započne ili ponovo pokrene ovaj samoodrživi ciklus antitumorskog imunskog odgovora uz svest o činjenici da eliminacijom inhibitornih signala može biti uništena homeostaza na drugim nivoim i tako pokrenuta ekspanzija autoimunskih odgovora i drugih neželjenih inflamatornih stanja koja mogu dovesti do oštećenja normalnih ćelija i tkiva. Zbog toga se imunoterapija mora pažljivo optimizovati kako bi se prevazišli mehanizmi negativne povratne sprege bez neželjenih posledica [104].

### 1.4.1. Mikrosredina tumora

Rak nije samo prosta skupina transformisanih tumorskih ćelija, već je sačinjen od mnoštva drugih tipova ćelija uključujući infiltrišuće imunske ćelije (B i T limfocite, makrofage asociirane sa tumorom (engl. *Tumor-Associated Macrophages*, TAM), DC, urođenoubilačke ćelije (engl. *Natural Killer cells*, NK), neutrofile i supresorske ćelije mijeloidnog porekla (engl. *Myeloid-Derived*

*Suppressor Cells*, MDSC)), stromalne ćelije kao što su fibroblasti fenotipa tipičnog za tumorsko tkivo (engl. *Cancer-Associated Fibroblast*, CAF), adipociti, periciti i vaskularne endotelne ćelije [6,106]. Svi ovi tipovi ćelija zajedno sa komponentama ECM i drugim izlučenim molekulima poput faktora rasta, citokina, hemokina i ekstracelularnih vezikula nazivaju se zajedničkim imenom mikrosredina tumora (engl. *Tumor Microenvironment*, TME) (Slika 3). Interakcije malignih ćelija sa komponentama TME podstiče njihovu fenotipsku i funkcionalnu plastičnost. Značaj TME u regulisanju progresije tumora i uticaja na terapijski ishod je sada široko prihvaćen i poslednjih nekoliko godina razvijeno je više terapija usmerenih na različite komponente TME [107].



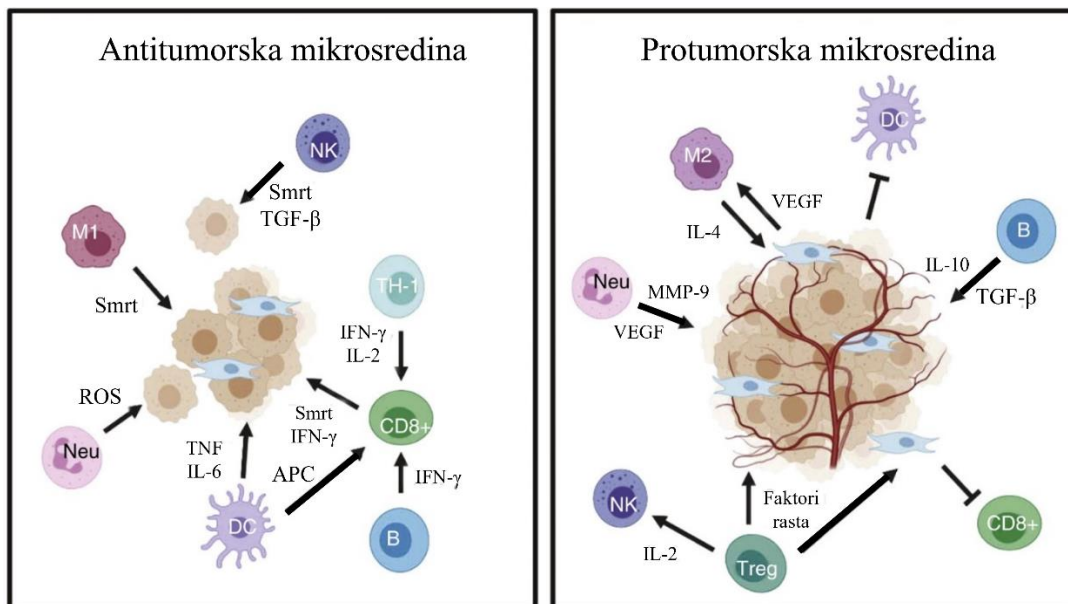
Slika 3. **Mikrosredina tumora.** Preuzeto i modifikovano iz Bejarano, Jordão i Joyce 2021 [107].

Različite vrste imunskih ćelija koje infiltriraju tumor uključene su u jačanje ili slabljenje imunskog odgovora, odnosno mogu obavljati antitumorske ili protumorske funkcije [108,109].

Uopšteno govoreći, imunске ćelije se mogu podeliti u dve kategorije: ćelije urođenog i stečenog imuniteta. Stečeni odnosno adaptivni imunitet se aktivira izlaganjem specifičnim antigenima i formiranjem imunološke memorije i pripadaju mu T i B limfociti. Sa druge strane, urođeni imunitet je nespecifični odbrambeni mehanizam koji se aktivira u roku od nekoliko sati po prepoznavanju molekularnog obrasca i sprovode ga makrofagi, neutrofil, eozinofili, bazofili, mastociti, NK ćelije i DC [110].

Glavnu ulogu u antitumorskom imunitetu imaju citotoksični CD8<sup>+</sup> T limfociti (engl. *Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL), pomoćnički CD4<sup>+</sup> T limfociti, DC, M1 makrofagi i NK ćelije [110–113], dok imunске ćelije koje podstiču rast i razvoj tumora uključuju T<sub>reg</sub>, M2 makrofage i heterogenu populaciju nezrelih ćelija – MDSC (Slika 4) [114,115].





Slika 4. **Različit uticaj imunskih ćelija u TME.** Preuzeto i modifikovano iz Anderson i Simon 2020 [110].

#### 1.4.1.1. T limfociti

T limfociti efikasno skeniraju gotovo sve delove tela u potrazi za neželjenim ili stranim materijalom. Shodno tome, naivni i efektorski T limfociti su centralni u imunskom nadzoru i razvoju stečenog imuniteta protiv raka. Transkripcioni faktori, citokini, hemokini i metabolički signali strogo regulišu diferencijaciju i fenotipove T limfocita, a loze T limfocita se smatraju fiksnim i međusobno isključivim [116].

##### 1.4.1.1.1. CD8<sup>+</sup> citotoksični T limfociti

CTL predstavljaju podskup limfocita koji se razvijaju u timusu i ključne su komponente imunskog sistema jer uklanjaju patogene i neoplastične ćelije putem detekcije unutarćelijskih antigena prezentovanih od strane molekula MHC I klase koji su ekspimirani u svim tipovima ćelija raka [117,118]. Ovi antigeni nastaju degradacijom proteina unutar citosola tumorskih ćelija pomoću velikih proteolitičkih kompleksa – proteazoma. Novonastali peptidi se transformišu u endoplazmatičnom retikulumu gde se spajaju sa molekulima MHC I klase i prenose na površinu ćelija raka pomoću Goldžijevog aparata [119]. CTL detektuju ove antigene i pokreću adekvatan imunski odgovor [118]. Kako bi ovaj odgovor bio efikasan, CD8<sup>+</sup> T limfociti moraju interagovati sa DC, NK ćelijama i CD4<sup>+</sup> T limfocitima. Nakon ovih interakcija dolazi do formiranja efektorskih citotoksičnih T limfocita koji su sposobni za direktno uklanjanje ćelija raka. Međutim, njihova funkcija je potisnuta imunosupresivnim aktivnostima ćelija kao što su CAF, T<sub>reg</sub> i M2 makrofagi. Pored toga, dugotrajna aktivacija CTL koja može trajati satima ili danima, ishoduje kako povećanom ekspresijom inhibitornih receptora na ovim ćelijama, ograničavajući njihovu infiltraciju u stromu tumora, tako i njihovom iscrpljenošću, što dovodi do dalje progresije tumora [120].

Pokretanje odgovora CD8<sup>+</sup> T limfocita na antigen označen terminom primarna aktivacija (engl. *priming*) T limfocita odvija se u limfnim tkivima [117,121]. DC koje regularno prezentuju antigene preuzete egzogenim putem, imaju sposobnost da fenomenom unakrsne prezentacije, iskažu antigene i u okviru molekula MHC I klase čineći ih vidljivim odgovarajućim CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Da bi ovaj kontakt rezultirao nastankom efektorskih CD8<sup>+</sup> T limfocita sa citotoksičnim kapacitetom, odnosno CTL, DC moraju da obezbede ko-stimulatorne signale kroz ekspresiju molekula CD70 i CD80-

CD86 koji se vezuju za odgovarajuće receptore CD27 i CD28 na CD8<sup>+</sup> T limfocitima [118]. CD4<sup>+</sup> T limfociti pomažu primarnoj aktivaciji CD8<sup>+</sup> T limfocita [121]. Nakon interakcije CD4<sup>+</sup> T limfocita i DC dolazi do sekrecije citokina od strane CD4<sup>+</sup> T limfocita koji stimulišu optimalnu proliferaciju i aktivaciju CD8<sup>+</sup> T limfocita [122]. CD4<sup>+</sup> T limfociti takođe mogu pomoći u aktivaciji DC i indukciji ekspresije ko-stimulatornih molekula, kao i sekreciji citokina koji dodatno doprinose primarnoj aktivaciji CD8<sup>+</sup> T limfocita. Sličnu funkciju vrše i NKT ćelije, čije interakcije sa DC stimulišu oslobađanje citokina od strane CD4<sup>+</sup> T limfocita. Prema tome, uspešna primarna aktivacija CD8<sup>+</sup> T limfocita uslovljena je mrežom opisanih interakcija [123,124].

Nakon aktivacije, efektorske CTL infiltriraju TME kako bi izvršile svoju funkciju [125]. Aktivirani CTL koriste dva osnovna mehanizma za uklanjanje ćelija raka: indukciju smrti granzim-perforin sistemom i/ili indukciju apoptoze posredovane Fas ligandom (FasL). Nakon susreta sa ćelijama raka, CTL proizvode perforin kako bi napravili pore na membrani tumorskih ćelija kroz koje granzim može ući u nju. Kada se nađe u citoplazmi ćelija raka, granzim razgrađuje ili inaktivira njihove intracelularne supstrate, izazivajući apoptozu tumorske ćelije. Paralelno ili alternativno, apoptoza ćelija raka može biti pokrenuta vezivanjem FasL za odgovarajući receptor smrti (engl. *Death receptor*) iz porodice TNF. CTL takođe oslobađaju interferon- $\gamma$  (engl. *Interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ), i faktor nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) da bi povećali citotoksičnost prema ćelijama raka [126]. IFN- $\gamma$  koji proizvode i CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T limfociti stimuliše antitumorski potencijal M1 makrofaga. Međutim, kao rezultat produžene stimulacije, aktivirani T limfociti vremenom počinju da ekspimiraju inhibitorne receptore kao što je PD-1. Do ovoga dolazi zbog uticaja IFN- $\gamma$  na ekspresiju PD-L1 na tumorskim ćelijama i M1 makrofagima. Takođe, ekspresija CTLA-4 od strane T<sub>reg</sub> može umanjiti aktivnost CD8<sup>+</sup> T limfocita čime se pokreće imunosupresivna aktivnost unutar TME [121]. Naime, CTLA-4 se nadmeće sa CD28 u vezivanju za CD80 i/ili CD86, ekspimiranim na DC, što rezultira smanjenom stimulacijom CD8<sup>+</sup> T limfocita i indirektnom supresijom ovog ogranka imunskog odgovora [127,128].

#### 1.4.1.1.2. CD4<sup>+</sup> T limfociti

CD4<sup>+</sup> T limfociti su raznovrsne polifunkcionalne ćelije koje doprinose adaptivnom imunitetu zajedno sa sestrinskom linijom CTL. Ove ćelije se diferenciraju u više funkcionalnih podtipova u odgovoru na različite signale, što im omogućava da pružaju pomoć odgovarajućim efektorskim ćelijama. CD4<sup>+</sup> T limfociti ekspimiraju TCR koji prepoznaje peptidne antigene predstavljene molekulima MHC II klase na APC [129]. Tokom razvoja timusa, sudbinu timocita određuje afinitet njihovih TCR za sopstvene peptid-MHC komplekse prezentovane od strane epitelnih ćelija timusa. Samo timociti sa srednjim afinitetom ispod praga negativne selekcije prolaze pozitivnu selekciju preko aktiviranja signala TCR i završavaju sazrevanje u timusu kao naivne konvencionalne T ćelije (Th-0), dok timociti sa previsokim ili niskim afinitetom ne preživljavaju. Takođe, neki timociti sa umereno visokim afinitetom prema sopstvenim antigenima, preusmeravaju se u razvojni put regulatornih T ćelija (tT<sub>reg</sub>), gde stiču imunosupresivnu funkciju da regulišu homeostazu tkiva i imunskih odgovora [130,131]. Nakon što prime signale iz citokinskog miljea, zajedno sa aktivacijom TCR, naivni CD4<sup>+</sup> T limfociti pojačavaju ekspresiju ključnih transkripcionih faktora koji regulišu diferencijaciju konkretne subpopulacije, što za uzvrat pokreće sekreciju glavnih efektorskih citokina povezanih sa svakim podtipom [132,133]. CD4<sup>+</sup> T limfociti aktivirani na periferiji takođe mogu da se diferenciraju u indukovane T<sub>reg</sub> (iT<sub>reg</sub>), koje su u stanju da posreduju imunosupresiji slično timusnim T<sub>reg</sub> (tT<sub>reg</sub>).

Za razliku od CD8<sup>+</sup> T limfocita, čija je primarna uloga da posreduju u citotoksičnosti zavisnoj od kontakta sa inficiranim ili malignim ćelijama, CD4<sup>+</sup> T limfociti pokazuju raznovrstan repertoar efektorskih funkcija, značajnu fenotipsku plastičnost i heterogenost u zavisnosti od lokalnog konteksta i mikrokruženja [132,133].

CD4<sup>+</sup> T limfociti mogu delovati protiv tumora na različite načine, direktno eliminišući tumorske ćelije putem citotoksičnih mehanizama ili indirektno modulacijom TME [134,135]. CD4<sup>+</sup> T limfociti stimulišu aktivaciju, efektorske i memorijske funkcije CD8<sup>+</sup> T limfocita i pomažu im da zaobiđu negativnu regulaciju čime se pojačava odgovor T limfocita protiv antigena povezanih sa tumorom bez inicijacije neželjenog autoimunskog odgovora [118]. Štaviše, u sekundarnim limfnim organima, CD4<sup>+</sup> T limfociti povećavaju obim i kvalitet odgovora B limfocita i CTL [136,137].

CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfociti prepoznaju odgovarajuće antigene na istim DC. Antigen-specifični kontakt sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima omogućava DC da optimizuje prezentaciju antigena i da isporuči specifične citokine i ko-stimulatorne signale CD8<sup>+</sup> T limfocitima, čime stimuliše njihovu klonalnu ekspanziju i diferencijaciju u efektorske ili memorijske T ćelije [138]. Pomoću CD4<sup>+</sup> T limfocita pokreće se program ekspresije gena u CD8<sup>+</sup> T limfocitima koji poboljšavaju funkciju CTL, omogućavajući im da prevaziđu prepreke koje tipično ometaju antitumorski imunski odgovor [139].

Dakle, CD4<sup>+</sup> T limfociti prvenstveno posreduju u realizaciji antitumorskog imunskog odgovora pružanjem pomoći CTL kao i humoralnom imunskom odgovoru zbog čega se nazivaju pomoćničke T 1 (engl. *T helper 1*, Th-1) ćelije, kao i putem sekrecije efektorskih citokina kao što su IFN- $\gamma$ , i TNF- $\alpha$ , ali i putem direktne citotoksičnosti protiv ćelija raka [140].

#### 1.4.1.1.3. Regulatorne T ćelije

T<sub>reg</sub> su imunosupresivna podgrupa CD4<sup>+</sup> T limfocita koje su u normalnim fiziološkim uslovima potrebne za suzbijanje inflamatornog odgovora i kontrolu autoimunosti. Ove ćelije su prvobitno identifikovane kao CD4<sup>+</sup> T limfociti koji ekspimiraju CD25, iako je CD25 opšti marker aktivacije T limfocita i ekspresija ovog proteina nije isključiva za T<sub>reg</sub>. Zbog toga se javila potreba za identifikacijom dodatnih specifičnih markera za ovaj tip ćelija. Otkriveno je da ih karakteriše ekspresija glavnog transkripcionog faktora (engl. *Forkhead Box Protein 3*, FoxP3) [141–145]. Ekspresija FoxP3 je uglavnom ograničena na populaciju T<sub>reg</sub> kod miševa dok kod ljudi ove ćelije mogu biti heterogene u pogledu njihovog fenotipa i funkcije [146].

U kontekstu TME, T<sub>reg</sub> podstiču progresiju tumora tako što suzbijaju antitumorski imunski odgovor. Ove ćelije ispoljavaju svoju imunosupresivnu funkciju različitim mehanizmima. T<sub>reg</sub> ćelije konstitutivno ekspimiraju  $\alpha$  subjedinicu receptora za IL-2 (CD25) i direktnom kompeticijom za IL-2 ograničavaju dostupnost ovog citokina efektorskim T limfocitima. Pored toga, konstitutivno ekspimiraju CTLA-4 koji se vezuje za CD80 i CD86 na APC prenoseći im supresivne signale i smanjujući njihov kapacitet da aktiviraju T limfocite. Štaviše, CTLA-4 se vezuje za CD80 i CD86 sa većim afinitetom od CD28, takmičeći se na taj način sa ovim ko-stimulatornim receptorom čime dodatno remeti primarnu aktivaciju T limfocita. Pored toga, T<sub>reg</sub> ćelije oslobađaju imunosupresivne citokine poput IL-10, IL-35 i faktor rasta transformacije  $\beta$  (engl. *Transforming Growth Factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) koji mogu smanjiti aktivnost APC i efektorskih T limfocita, ali i oslobađaju granzim i perforin koji mogu direktno da ubiju efektorske ćelije. I na kraju, T<sub>reg</sub> oslobađaju velike količine ATP-a koji se konvertuje u adenozin od strane CD39 i CD73 i time sprečava aktivaciju T limfocita [147–156].

#### 1.4.1.2. Dendritske ćelije

DC imaju ključnu ulogu u pokretanju i održavaju imunskog odgovora protiv malignih ćelija i predstavljaju glavne APC koje prepoznaju, hvataju i prikazuju antigene T limfocitima u sekundarnim limfnim organima (limfnim čvorovima) [110]. Ove ćelije predstavljaju sponu između urođenog i stečenog imuniteta i pokreću odgovor T limfocita. DC podležu aktivaciji iz nezrelog, tolerogenog stanja, do zrelog imunostimulatornog fenotipa nakon otkrivanja molekularnih obrazaca povezanih sa patogenom ili sa oštećenjem (engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP

ili *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP). Ovaj proces je neophodan kako bi DC pokrenule efikasan adaptivni imunski odgovor, pri čemu se CD8<sup>+</sup> ili CD4<sup>+</sup> T limfociti aktiviraju antigenom prezentovanim u okviru MHC I ili II klase, eksprimiranim na površini DC [157,158]. U ranim fazama maligne progresije, DC fagocituju ostatke apoptotskih tumorskih ćelija, nakon čega migriraju u drenirajuće limfne čvorove (engl. *Draining Lymph Node*, dLN) gde prezentuju ove antigene naivnim CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocitima čime ih aktiviraju [159–161]. Sudbinu DC u TME oblikuju signali koji promovisu ili antitumorski ili protumorski imunski odgovor. Primarno, DC su predodređene za antitumorsku funkciju ali citokini koji se izlučuju u TME mogu da inhibiraju DC zbog čega može doći do tolerancije na prisustvo tumorskih ćelija i blokiranja imunskog odgovora [110]. Višestruki medijatori u TME kao što su IL-10, TGF-β, VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), IL-6, prostaglandin E2 (PGE2), Wnt, mucini, galektini i/ili egzozomi mogu lako promeniti normalnu funkciju DC, inhibirajući antitumorski imunski odgovor. Ovi faktori mogu poremetiti diferencijaciju, sazrevanje ili ekspresiju ko-stimulativnih molekula DC.

### 1.4.1.3. Makrofagi

Makrofagi su mijeloidne ćelije i predstavljaju važne komponente urođenog imuniteta [162]. Ove ćelije imaju tri ključne funkcije: fagocitozu, prezentaciju antigena i imunomodulaciju kroz oslobađanje citokina i faktora rasta. Prezentacija antigena pomoću MHC molekula II klase je ključna za aktivaciju stečenog imuniteta. T limfociti, posebno pomoćnički T limfociti, prepoznaju komplekse MHC II klase na aktiviranim makrofagima preko svojih TCR što dovodi do aktivacije adaptivnog imunskog odgovora [163]. Pored toga, makrofagi su ključni za oporavak tkiva i zarastanje rana. Kroz fagocitozu oni efikasno eliminišu patogene i uklanjaju apoptotske ćelije domaćina [164]. Međutim, makrofagi nisu odgovorni samo za fagocitozu stranih antigena već koordinišu procese prilikom formiranja novih tkiva i krvnih sudova u normalnim fiziološkim uslovima [165,166]. Dakle, makrofagi igraju ključnu ulogu u homeostazi tkiva u fiziološkim uslovima ali i nakon oštećenja tkiva. Makrofagi diferencirani od monocitnih prekursora, mogu se kategorisati kao proinflamatorni M1 makrofagi, koje odlikuje visok kapacitet prezentacije antigena, sekrecija IL-12 i IL-23 kao i aktivacija Th-1 odgovora [163,167]. Oni inhibiraju proliferaciju ćelija i uzrokuju oštećenje tkiva kroz oslobađanje proinflamatornih citokina i azot-monoksida (engl. *Nitric Oxide*, NO) [162,168]. Drugu kategoriju čine antiinflamatorni odnosno imunosupresivni M2 makrofagi koji se odlikuju slabom sposobnošću da prezentuju antigene, i sekrecijom IL-10, IL-4 i IL-13 [163]. M2 makrofagi promovisu proliferaciju ćelija, popravku tkiva i angiogenezu i aktivatori su Th-2 odgovora [162,163,168]. Th-1 ćelije oslobađaju IFN-γ koji pokreće polarizaciju makrofaga prema M1 fenotipu, dok Th-2 ćelije oslobađaju IL-4 i IL-13 koji pokreću polarizaciju prema M2 fenotipu [169,170]. Takođe, utvrđeno je da je TNF pozitivan regulator M1 polarizacije kroz aktivaciju puta transkripcionog faktora kappa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*, NF-κB). Istovremeno, signalizacija preko receptora za TNF dovodi do negativne regulacije M2 polarizacije [171]. Iako se obe klase makrofaga mogu naći unutar tumora, TME favorizuje M2 fenotip kroz hipoksiju i oslobađanje odgovarajućih citokina, kako bi se podržao rast i napredovanje tumora. Povećano prisustvo makrofaga u TME može biti povezano sa lošom prognozom pacijenata obolelih od različitih tipova tumora kao što su karcinom dojke, pluća i želuca. Takođe, makrofagi koji okružuju krvne sudove u TME, luče VEGF i indukuju stvaranje novih krvnih sudova [172].

### 1.4.1.4. Urođenoubilačke ćelije

Važne ćelije urođenog imuniteta su i NK ćelije koje poseduju citotoksičnu aktivnost sličnu CD8<sup>+</sup> T limfocitima jer mogu da prepoznaju i uklone virusom inficirane ili transformisane ćelije ali ne eksprimiraju CD3 i TCR. Tokom infekcije i upale, NK ćelije se aktiviraju u kratkom vremenskom periodu i doprinose urođenom imunitetu [173,174]. Ove ćelije poseduju veliki broj receptora (aktivirajućih ili inhibitornih) koji prepoznaju izmenjenu ekspresiju proteina na ciljnim ćelijama

[175,176]. Prepoznavanje transformisanih ćelija od strane NK ćelija je posredovano signalima kao što su IL-12, IL-15 i IL-18 [177,178]. Slično drugim ćelijama urođenog imuniteta, NK ćelije nisu u stanju da precizno prepoznaju ciljane ćelije već se oslanjaju na druge stromalne ćelije uključujući DC koje posredstvom IL-15 aktiviraju NK ćelije [179]. Jednom aktivirane, NK ćelije liziraju tumorske ćelije oslobađanjem citotoksičnih molekula perforina i granzima, povećavaju ekspresiju FasL koji indukuje apoptozu tumorskih ćelija i oslobađaju citokine kao što je IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . NK ćelije se smatraju delom urođenog imuniteta, međutim, trenutno se definišu kao efektorske ćelije slične CTL jer ispoljavaju citotoksične efekte protiv tumora i metastaza inhibirajući proliferaciju, migraciju i kolonizaciju udaljenih tkiva [180]. Pored svog direktnog citotoksičnog potencijala, NK ćelije pokazuju i imunomodulatorne funkcije. Ove ćelije doprinose homeostazi imunskog sistema i promovišu aktivaciju i efektorske funkcije drugih urođenih ili adaptivnih imunskih ćelija putem sekrecije citokina i hemokina ili putem direktnih kontakata ćelija-ćelija [173,181]. Pa tako, NK ćelije oblikuju imunске odgovore putem unakrsne komunikacije sa T limfocitima, B limfocitima i DC. Pored toga, ove ćelije podstiču Th-1 polarizaciju proizvodnjom IFN- $\gamma$ . Takođe, indirektno pojačavaju imunski odgovor efektorskih T limfocita stimulišući sazrevanje DC [181,182]. Pokazano je i da NK ćelije poboljšavaju funkciju CD8<sup>+</sup> T limfocita kao i da je njihova pomoć ključna za antitumorske efekte CD8<sup>+</sup> T limfocita [183–186].

#### 1.4.1.5. Supresorske ćelije mijeloidnog porekla

MDSC su heterogena populacija ćelija koje se uglavnom sastoje od nezrelih mijeloidnih ćelija (engl. *Immature Myeloid Cells*, IMC) sa imunosupresivnom aktivnošću u TME [185,187]. U fiziološkim uslovima, IMC nastaju u koštanoj srži i odmah se diferenciraju u zrele monocite, DC i granulocite [188]. Međutim, u patološkom okruženju, naročito kod raka, diferencijacija i sazrevanje IMC je sprečena, što dovodi do ekspanzije MDSC *in vivo* [189,190]. U TME, aktivaciju, ekspanziju i imunosupresivne aktivnosti MDSC izazivaju različiti molekuli koje proizvode tumorske ćelije, stromalne ćelije i druge imunске ćelije. Aktivirane MDSC povećavaju proliferaciju, angiogenezu, migraciju ćelija raka i izbegavanje kontrolnih mehanizama imunskog sistema. MDSC koje infiltriraju TME odgovorne su za rezistenciju na primenjenu imunoterapiju i za lošu prognozu pacijenata [190].

#### 1.4.2. Sistemski imunski odgovor na antigene tumora

Rak je sistemska bolest koja izaziva mnoge funkcionalne promene u imunskom sistemu u celini. Stoga je za potrebe razumevanja imunskog odgovora na tumor neohodno proučavati i sistemski imunski odgovor izvan same mikrosredine tumora. Važno je istaći da je periferni imunski sistem neophodan za efikasno pokretanje kako prirodnog tako i terapijom indukovanog antitumorskog imunskog odgovora [191].

Polje imunologije tumora se u velikoj meri fokusiralo na lokalni imunski odgovor u TME iako je imunitet kordinisan i kroz druga tkiva. Na primer, ključni korak u aktivaciji T limfocita dešava se u limfnim tkivima [192,193]. Iz tih razloga, antitumorski imunski odgovor ne može postojati bez kontinuirane komunikacije sa periferijom. Štaviše, antitumorski imunski odgovor obuhvata sve tipove imunskih ćelija i u perifernom imunskom sistemu i u TME.

Mnogi tumori kod ljudi izazivaju opsežne poremećaje hematopoeze. Ovi poremećaji se najizraženije manifestuju u ekspanziji nezrelih neutrofila i monocita u perifernim organima koji se zatim transportuju u TME i doprinose lokalnoj imunosupresiji [194–196]. Hematopoetske matične ćelije i progenitorske ćelije proliferišu i diferenciraju se ka monocitnim i granulocitnim linijama, što rezultira u perifernoj ekspanziji i intratumorskoj akumulaciji nezrelih imunosupresivnih neutrofila, monocita i makrofaga [197–201]. Postoje studije koje otkrivaju povišene nivoe hematopoetskih

matičnih ćelija, multipotentnih progenitora, kao i granulocitnih i monocitnih progenitora u krvi pacijenata sa karcinomom dojke, grlića materice, jetre, pluća, jajnika i gastrointestinalnog trakta, što sugerše da je hematopoetska disregulacija uobičajena kod pacijenata obolelih od raka [199]. Velika većina istraživanja koja naglašavaju ove promene u imunskom sistemu na periferiji u kontekstu tumora, fokusirala se na povećanje nezrele i imunosupresivne mijeloidne populacije, međutim ova ekspanzija se često dešava zajedno sa promenama mnogih drugih populacija perifernih imunskih ćelija. Na primer, na tri različita modela tumora dojke (AT3, 4T1 i MMTV-PyMT) je pokazano obimno remodelovanje populacije imunskih ćelija slezine koju karakterišu fenotipske promene kao i povećana učestalost neutrofila, eozinofila i monocita zajedno sa smanjenjem učestalosti DC i populacija B i T limfocita [191]. Uočene su i promene u DC u perifernim limfnim organima pacijenata obolelih od raka. Ovo ima velike implikacije na razvoj antitumorskog imunskog odgovora pošto su DC neophodne za aktivaciju, diferencijaciju i proliferaciju CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T limfocita [202,203]. Učestalost različitih podgrupa DC je smanjena u perifernoj krvi pacijenata obolelih od karcinoma jajnika, prostate, dojke, pluća, bubrega, skvamoznog karcinoma glave i vrata i melanoma [204–209]. Poliklonalni memorijski CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfociti iz periferne krvi pacijenata sa rakom dojke imaju smanjen kapacitet proizvodnje IL-2 i INF- $\gamma$  u odgovoru na stimulaciju PMA (engl. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, PMA) i jonomiciom [191].

Najviše izučavan poremećaj efekorskog imunskog odgovora na tumor vezan je za fenomen ekspanzije supresivnih T<sub>reg</sub> na periferiji i njihovu infiltraciju u tumor [210]. Nedavna studija je pokazala da T<sub>reg</sub> prisutne u krvi pacijenata sa karcinomom dele fenotipske i TCR sa intratumorskim T limfocitima, što sugerše da značajan deo intratumorskih supresivnih T<sub>reg</sub> ćelija potiče od prirodnih T<sub>reg</sub> ćelija timusa a ne od tumorom indukovanih naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita [211–213]. Još jedna supresivna populacija limfocita koja igra važnu ulogu u progresiji tumora su regulatorni B limfociti koji se odlikuju proizvodnjom antiinflamatornog citokina IL-10 [213]. Slično T<sub>reg</sub> ćelijama, ekspanzija regulatornih B limfocita koji proizvode IL-10 zabeležena je u perifernoj krvi pacijenata sa karcinomom želuca i pacijenata sa karcinomom pluća, dok je učestalost ukupnih B limfocita ostala ne promenjena [214–216]. U 4T1 mišjem modelu tumora dojke, supresivne regulatorne B ćelije su povišene u slezini, limfnim čvorovima i krvi [191].

NK ćelije su još jedna važna komponenta antitumorskog imuniteta koja može direktno da ubije ćelije raka, kao i da utiče na antitumorsko ponašanje drugih imunskih ćelija [217]. NK ćelije pacijenata sa karcinomom dojke takođe imaju izmenjene fenotipove, koje karakterišu smanjena ekspresija aktivirajućih receptora i povećana ekspresija inhibitornog receptora NKG2A kao i smanjena sposobnost direktnog ubijanja tumorskih ćelija *in vitro* [218].

Sve u svemu, ovi podaci snažno podržavaju ideju da se sistemsko oštećenje imunološke organizacije javlja kod različitih vrsta tumora i da je neophodan dalji rad na potpunoj karakterizaciji različitih tipova imunoloških stanja kod pacijenata sa rakom. Uzimajući u obzir sve nevedeno, jasno je da je uloga imunskog sistema u borbi protiv raka velika i neizostavna. Stoga, dobra terapija ne bi trebalo da ima za cilj samo direktno uništavanje tumorskih ćelija već bi trebalo da dovede do pokretanja adekvatnog imunskog odgovora koji će pomoći u uspešnom suzbijanju rasta tumora.

## 1.5. Prirodni proizvodi u lečenju raka

Priroda je od davnina bila prepoznata kao beskonačan izvor lekovitih biljaka koje su se u tradicionalnoj medicini koristile kao potencijalni terapijski agensi za lečenje različitih patoloških stanja. Znanje o lekovitom bilju prenosilo se sa generacije na generaciju i značajno se razlikuje u svakoj zemlji i regionu sveta. Balkansko poluostrvo se smatra jednim od centara biodiverziteta u Evropi koje uz florističko bogatstvo obiluje i lekovitim biljem. Obzirom da neke od lekovitih biljaka sa ovih prostora još uvek nisu detaljno okarakterisane ili nema podataka o sadržaju njihovih bioaktivnih jedinjenja, naučna istraživanja igraju važnu ulogu u očuvanju tradicionalnog znanja o

lekovitim biljkama ali istovremeno pružaju više informacija o bezbednosti i efikasnosti njihove upotrebe [219].

Uprkos mnogobrojnim mogućnostima lečenja, recidivi i prateći problemi poput mnogobrojnih neželjenih efekata, sistemske toksičnosti lekova i agresivnog ponašanja tumora i dalje predstavljaju veliki problem za pacijente. Zbog toga se u poslednje vreme povećala upotreba nekih komplementarnih lekova kao što su fitoterapeutske proizvodi [220]. Prema procenama WHO, oko 80% ljudi koristi biljne proizvode kao suplemente i/ili kao alternativne lekove [221]. Lekovite biljke postaju sve popularnije jer su prepoznate kao efikasni i jeftini izvori novih bioaktivnih jedinjenja na osnovu kojih je moguće napraviti sintetičke analoge i poslednjih nekoliko godina su sve zastupljenije studije koje upravo proučavaju interakcije biljaka i konvencionalnih lekova [222,223]. Kombinovanje konvencionalnih terapija sa jedinjenjima izolovanih iz biljaka može pospešiti efekat lečenja usled interakcija poput potencijacije, sinergizma, ili adicije ali i smanjiti efekat ukoliko dođe do antagonizma zbog čega mora postojati oprez prilikom njihove paralelne upotrebe [224]. Iz istog razloga ukupni biljni ekstrakti, zbog mogućnosti međusobnih interakcija agenasa u svom sastavu, mogu predstavljati bolju opciju u odnosu na pojedinačne izolovane biljne komponente. Nadalje, različite bioaktivne materije prisutne u ekstraktu, mogu imati slična dejstva, ali putem različitih mehanizama. Time se povećava verovatnoća efikasnosti odgovarajuće smeše jedinjenja, a istovremeno se smanjuje mogućnost toksičnih efekata na zdrave ćelije. Rezistentnost na prirodne lekove je daleko manja u odnosu na sintetičke, dok je mogućnost da će imati pozitivno dejstvo kod različitih osoba u velikoj meri izvesna. Brojni literaturni podaci ukazuju da proizvodi biljnog porekla ostvaruju blagotvorni efekat na pacijente koji su oboleli od raka, utičući na poboljšanje kvaliteta i produženje dužine života. Oni mogu značajno smanjiti neželjena dejstva hemioterapeutika i radioterapije istovremeno povećavajući osetljivost na iste. Takođe mogu blagotvorno delovati na imunski sistem i na taj način dovesti do poboljšanja opšteg stanja pacijenta [225–228].

Brojni podaci ukazuju na tradicionalnu upotrebu lekovitih biljaka u lečenju raka, a danas smo svedoci sve češće upotrebe prirodnih komponenata izolovanih iz biljaka kao novih lekova za terapiju raka [229]. Čak 65% antitumorskih lekova koji su u zvaničnoj upotrebi predstavljaju prirodna jedinjenja biljnog porekla ili njihove derivate [230,231]. Prvi agensi koji su uvršćeni u kliničku praksu su bili tzv. vinka alkaloidi, vinblastin (VLB) i vinkristin (VCL), izolovani iz Madagaskarske vinke (*Catharanthus roseus* L., Apocynaceae). Primećeno je da ekstrakt ove biljke smanjuje broj belih krvnih zrnaca kao i broj hematopoetskih ćelija u koštanoj srži pacova, a kasnije je utvrđena i aktivnost protiv limfocitne leukemije kod miševa. Ustanovljeno je da su najveću antitumorsku aktivnost ispoljile komponente VLB i VCL izolovane iz ekstrakta. Takođe, paklitaksel (Taxol®), prvobitno izolovan iz kore Pacifičke tise (*Taxus brevifolia* L., Taxaceae), danas se koristi u lečenju raka dojke, jajnika i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (engl. *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*, NSCLC) [229]. Etopozid, izolovan iz Američke mandragore (*Podophyllum peltatum* L.), zatim izoflavon genistein, kao i kurkumin, takođe polifenolno jedinjenje (diarilheptanoid) su trenutno u nekoj od faza pretkliničkih ili kliničkih studija kao antitumorski agensi [232–235]. Jedan od najstarijih zvanično korišćenih biljnih lekova je kolhicin, izolovan iz mrazovca (*Colchicum autumnale*), koji se inače, više od jednog vek, koristi za lečenje gihta [236]. Osim što ima antiinflamatorni efekat, kolhicin je poznat kao destabilizator mikrotubula, čime ometa organizaciju mitotskog vretena i time uslovljava zaustavljanje ćelijskog ciklusa. Kolhicin se smatrao supstancom od interesa u onkološkim istraživanjima [237]. Prethodne studije su pokazale da kolhicin ima antitumorsko dejstvo kako *in vitro* tako i na životinjskim modelima *in vivo* [238–240]. Međutim, zbog izraženog citotoksičnog dejstva i mnogih neželjenih efekata, upotreba kolhicina je veoma ograničena, te je ustupila mesto drugim biljnim bioaktivnim molekulima, od kojih se, kako je i napomenuto, neki koriste u savremenoj hemioterapiji. Broj biljnih agenasa, uključujući pojedinačna jedinjenja, frakcije jedinjenja i čitave ekstrakte, za koje je naučno verifikavano antitumorsko dejstvo u *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* eksperimentima, sigurno prelazi nekoliko stotina. Međutim, zbog veoma stroge regulative primene, problema prilikom izolacije i

prečišćavanju, dostupnosti sirovina, i drugih faktora, prilično je sporo i izazovno njihovo uvođenje u zvaničnu terapiju.

Specifičnost prirodnih jedinjenja je u njihovom visokom adaptogenom potencijalu baziranom na istovremenom pružanju podrške zdravom tkivu i saniranju patoloških stanja. Danas se u istraživanjima fokus sve više prebacuje sa direktnog uništavanja oštećenih ćelija i patoloških mikroorganizama na aktiviranje i podršku sopstvenih potencijala organizma da se izbori sa bolešću. Ovo se reflektuje kako na tokove istraživačkog procesa tako i na kreiranje potencijalnih terapijskih pristupa u lečenju onkoloških pacijenata, a prirodni proizvodi time postaju sve aktuelniji kao potencijalni izvor savremenih terapeutika.

## **1.6. Virak (*Alchemilla vulgaris* agg.): botaničke osobine i upotreba u narodnoj i zvaničnoj medicini**

Među biljkama sa dugom istorijom upotrebe u narodnoj medicini, a koje su priznate u različitim farmakopejama su vrste roda *Alchemilla*.

Rod *Alchemilla* L. obuhvata preko 300 vrsta zeljastih višegodišnjih biljaka iz porodice ruža (Rosaceae), koje rastu na planinskim vlažnim livadama u Evropi, Zapadnoj Aziji i Severnoj Americi, ali ih ima i u planinskim predelima Južne Amerike i Afrike [241,242]. *Alchemilla vulgaris* L. u narodu poznatija kao virak ili gospin plašt (engl. *Lady's mantle*) je najproučavanija vrsta roda *Alchemilla*. Nedavna taksonomska tumačenja *A. vulgaris* pretpostavila su da je takson agregat vrsta koji se sastoji od 12 apomiktičkih morfološki sličnih mikrovvrsta koje često hibridizuju (*Alchemilla vulgaris* agg.). Prema evropskoj farmakopeji ovaj agregat vrsta se tretira kao *Alchemilla vulgaris* L. *sensu latiore* [241]. Euro+Med PlantBase (integrisana baza podataka Flora Europea, Med-Checklist, Flora Macaronesia i nacionalnih flora), takson *A. vulgaris* priznaje kao vrstu. Takođe, i prema flori Srbije važi naziv *Alchemilla vulgaris* L. gde se navodi da se na našem području javlja sa tri podvrste i to: *Alchemilla vulgaris* subsp. *montana*, *A. vulgaris* subsp. *pratensis* i *A. vulgaris* subsp. *vulgaris* [243,244].

Virak (*A. vulgaris*) je višegodišnja zeljasta biljka koju karakteriše kratak rizom. Prizemni listovi obrazuju rozetu iz koje izrasta zeljasto stablo veličine od 30 do 50 cm. Spiralno postavljeni listovi imaju duge peteljke koje se završavaju ovalnom, usečenom i režnjevitom liskom. Cvetovi su petočlani, relativno sitni, sa krunicom žuto-zelene boje, sakupljeni u grozdov a period cvetanja je od juna do septembra. Rasprostranjena je u različitim zajednicama livadske vegetacije klase Festuco-Brometea, obično na vlažnijim staništima od brdskih do visokoplaninskih predela.

Prema fitohemijskim podacima, nadzemni deo biljke sadrži uglavnom fenolna jedinjenja, pre svega veliku količinu tanina (elagitanin, agrimonin), fenolkarboksilnih kiselina (npr. elaginska, galna i kofeinska kiselina), kao i flavonoida (npr. kvercetin i kempferol kao i njihovi glikozidi) [245]. Prisustvo različitih tipova polifenolnih jedinjenja je u direktnoj korelaciji sa brojnim biološkim aktivnostima *A. vulgaris*. Stoga je ova biljka u širokoj upotrebi u narodnoj medicini, a njen lekoviti nadzemni deo (*Alchemillae herba*) opisan je u Evropskoj i mnogim nacionalnim farmakopejama, uključujući korišćenje i u homeopatskoj medicini.

Nadzemni delovi biljke se upotrebljavaju za lečenje dijabetesa, multiple skleroze, anemije, čireva, kile, ginekoloških i abdominalnih poremećaja, osipa, raznih upala i kao pomoćno sredstvo za zarastanje rana [246,247]. Na području Jugoistočne Evrope i na Balkanu, vrste roda *Alchemilla* se uglavnom koriste kod ginekoloških tegoba (dismenoreja, cista, fibroida, endometrioza, kod neplodnosti i ublažavanju menstrualnih i menopauzalnih tegoba), zatim kod respiratornih infekcija, dijareje, dijabetesa, bolesti bubrega i jetre, gubitka težine, kožnih poremećaja i različitih upalnih stanja [219,248,249]. Zanimljivo, upotreba *A. vulgaris* se ne spominje često u kineskoj, indijskoj i ruskoj narodnoj medicini, što je u najvećoj meri uslovljeno arealom vrste i roda (umerena i



subarktička zona Evroazije, pri čemu se *A. vulgaris* generalno može smatrati evropskom vrstom). Tako je širom Evrope virak izuzetno atraktivan i omiljen tradicionalni lek zbog svojih moćnih efekata i blagih ili nikakvih neželjenih dejstava. Ova biljka ispoljava snažna antibakterijska, antifungalna i antivirusna svojstva [248,249]. U kontekstu rezistencije bakterija na antibiotike, biljni lekovi i ekstrakti se smatraju moćnim agensima bez daljeg rizika od razvoja rezistencije na standardne antimikrobne lekove [250]. Nedavna studija o efektima infuzije *A. vulgaris* nakon izlaganja hipoksiji, ukazala je na neuroprotektivna svojstva ove biljke [245]. Takođe, pokazan je inhibitorski efekat *A. vulgaris* na enzime acetilholin-esterazu i tirozinazu pa se pretpostavlja da se ova vrsta može koristiti u prevenciji i lečenju neurodegenerativnih bolesti [251]. Nekoliko istraživačkih grupa, pokazalo je da virak ima izraženo antioksidativno dejstvo. Zbog visokog sadržaja fenola, *A. vulgaris* pokazuje veliki potencijal za uklanjanje superoksid anjon radikala [252–254]. Međutim, biološka aktivnost ekstrakta virka, njegovih frakcija i nekih pojedinačnih komponenti nije dovoljno proučena. Tome u prilog govori podatak da je antitumorska aktivnost *A. vulgaris* opisana do sada u samo dve studije [252,255] koje su urađene *in vitro*, dok su podaci o uticaju *A. vulgaris* na tumore prilično oskudni. Zbog velikog broja etnofarmakoloških podataka o pozitivnim efektima virka na ginekološka i kožna oboljenja, kompleksnog sastava nadzemnih delova *A. vulgaris*, kao i dostupnih podataka iz novije naučne literature, bilo je važno sagledati antitumorski potencijal ove biljke (*Alchemillae herba*).



Slika 5. *Alchemilla vulgaris* agg. sa prirodnog staništa u jugoistočnoj Srbiji

U okviru ove doktorske disertacije će se ispitivati delotvornost etanolnog ekstrakta *Alchemilla vulgaris* agg. u singenim mišjim modelima melanoma niske i visoke invazivnosti kao i trostruko negativnog tumora dojke. Značaj rezultata dobijenih ovim istraživanjem će omogućiti upoređivanje odgovora ćelija različitog porekla, invazivnosti i metastatskog potencijala na primenjeni tretman u užem kontekstu koji podrazumeva direktan odgovor maligne ćelije, ali i u okviru tumorske mikrosredine, lokalnog i sistemskog imunskog odgovora. Na ovaj način, pružiće se uvidi ne samo u efikasnost ekstrakta pomenute biljke, već i u postojanost njegovog delovanja u različitim fazama maligne bolesti.



## **2. Ciljevi**



Obzirom na oskudnost literaturnih podataka o antitumorskim svojstvima *A. vulgaris*, nameće se potreba za temeljnim istraživanjem antitumorskog potencijala ove biljke *in vitro* i *in vivo* na više modela tumora.

Uzimajući ovo u obzir, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom:

1. Fitohemijska karakterizacija etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*.
2. Ispitivanje antitumorskog potencijala etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na ćelijskim linijama melanoma (A375, 518A2, FemX, B16F1 i B16F10) i tumora dojke (MCF-7, MDA-MB-361, MDA-MB-468, MDA-MB-231 i 4T1) humanog i mišjeg porekla *in vitro*.
3. Definisane mehanizama putem kojih etanolni ekstrakt *A. vulgaris* ostvaruje svoje efekte na ćelijske linije mišjeg melanoma različitog stepena invazivnosti (B16F1 i B16F10) i mišjeg tumora dojke (4T1) *in vitro*.
4. Ispitivanje uticaja etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na metastatski potencijal 4T1 ćelija *in vitro*.
5. Ispitivanje antitumorskog potencijala i toksičnosti etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na mišjim singenim modelima solidnog melanoma različitog stepena invazivnosti (B16F1 i B16F10) i tumora dojke (4T1) *in vivo*.
6. Ispitivanje uticaja etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na sistemski imunski odgovor i mikrosredinu tumora u modelima nisko invazivnog melanoma (B16F1) i tumora dojke (4T1) *ex vivo*.



### **3. Materijal i metode**





### 3.1. Reagensi

Reagensi korišćeni u eksperimentalnom radu tokom izrade ove doktorske disertacije nabavljeni su od sledećih proizvođača:

Capricorn Scientific GmbH (Hesen, Nemačka) – medijum za kultivaciju ćelija RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI) i serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS); Sigma Aldrich (Sent Luis, SAD) – fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS), dimetilsulfoksid (DMSO), glutation (GSH), N-acetil-L-cistein (NAC), akridin-oranž (engl. *Acridine Orange*, AO), propidijum-jodid (PI), sulforodamin B (SRB), 5(6)-karboksifluorescein-diacetat-N-sukcinimidil-estar (CFSE), hlorokin, 3-metiladenin (3-MA), tripsin, trihlorsirćetna kiselina (TCA), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), jonomicin, PMA, bromfenol plavo, aprotinin, fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF), trisaminometan-hidrohlorid (TRIS-HCl), ditiotreitol (DTT), natrijum-azid ( $\text{NaN}_3$ ), RNaza, Tween-20, kolagenaza I, DNaza I, i Triton X-100; Biowest (Riversajd, SAD) – kristal violet (engl. *Crystal Violet*, CV); Galenika (Beograd, Srbija) – nistatin; Biological Industries (Kromvel, SAD) – penicilin/streptomycin i HEPES; AppliChem (Darmštat, Nemačka) – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT), natrijum-dodecil-sulfat (SDS),  $\beta$ -merkptoetanol, saharoza, amonijum-persulfat (APS) i albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA); Serva (Hajdelberg, Nemačka) – N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED), paraformaldehid (PFA), akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 i glicin; Merck (Darmštat, Nemačka) – dinatrijum-hidrogenfosfat-dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) i Folin-Ciocalteu reagens; eBioscience (San Dijego, SAD) – medijum za montiranje fluorescentno obojenih mikroskopskih preparata (Fluoromount-G); R&D Systems (Mineapolis, SAD) – pan-kaspazni inhibitor konjugovan FITC (ApoStat); BD Pharmingen (San Dijego, SAD) – FITC-konjugovani aneksin V (Ann V-FITC) i Goldži stop; Thermo Fisher Scientific (Valtam, SAD) – dihidrorodamin 123 (DHR) i marker definisanih molekulskih težina proteina (PageRuler); GE Healthcare (Bakinghemšir, Velika Britanija) – ECL reagens za detekciju; BD Bioscience (Bedford, SAD) – Matrigel<sup>®</sup> i citofiks/citoperm; Molar Chemicals (Budimpešta, Mađarska) – eozin Y; BioOptica (Milano, Italija) – Majerov hematoksin; Analytika (Prag, Češka Republika) – natrijum-dihidrogenfosfat-dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ); ICN (Aurora, SAD) – natrijum-hlorid (NaCl); ICN Biomedicals (Irvin, SAD) – trinatrijum-fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ); Carlo Erba (Milano, Italija) – natrijum-karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); LachNer (Neratovice, Češka Republika) – glicerol, natrijum-nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), natrijum-hidroksid (NaOH), kalijum-dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i kalijum-hlorid (KCl); Zorka (Šabac, Srbija) – vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sirćetna kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), bakar-sulfat-pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), hlorovodonična kiselina (HCl) i kalcijum-hlorid ( $\text{CaCl}_2$ ); Alkaloid (Skoplje, Makedonija) – kalijum-natrijum-tartarat; Centrohem (Stara Pazova, Srbija) – fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), natrijum-molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) i aluminijum-hlorid ( $\text{AlCl}_3$ ); Fluka (Selze, Nemačka) – tripan plavo i TRIS; Abcam (Kembridž, Velika Britanija) – fluorescein-di- $\beta$ -D-galaktopiranozid (FDG).

U tabeli 1 navedena su primarna i sekundarna antitela korišćena za imunoblot.

**Tabela 1.** Prikaz antitela korišćenih za imunoblot analizu

<b>Primarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Razblaženje</b>	<b>Proizvođač</b>
p-Akt	kunić	1:500	Cell Signaling Tehnology, SAD
Akt	kunić	1:1000	Cell Signaling Tehnology, SAD
p-p44/p42 MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204)	kunić	1:500	Cell Signaling Tehnology, SAD
p44/p42 MAPK (ERK1/2)	kunić	1:1000	Cell Signaling Tehnology, SAD
p-p70S6 kinaza (Thr389)	kunić	1:500	Cell Signaling Tehnology, SAD
p70S6 kinaza	kunić	1:1000	Cell Signaling Tehnology, SAD
Bcl-2	kunić	1:1000	Cell Signaling Tehnology, SAD
BAX	kunić	1:1000	Cell Signaling Tehnology, SAD
$\beta$ -aktin	miš	1:3000	Abcam, Velika Britanija
Beklin-1 (BECN1)	kunić	1:700	Elabscience Biotechnology Inc., Hjuston, SAD
SQSTM1/P62	kunić	1:1000	Elabscience Biotechnology Inc., Hjuston, SAD
LC3B	kunić	1:1000	Sigma Aldrich, SAD
Integrin $\beta$ -1	kunić	1:1000	Elabscience Biotechnology Inc., Hjuston, SAD
FAK	kunić	1:500	Elabscience Biotechnology Inc., Hjuston, SAD
Vinkulin	kunić	1:1000	Elabscience Biotechnology Inc., Hjuston, SAD
$\alpha$ -SMA	kunić	1:1000	Elabscience Biotechnology Inc., Hjuston, SAD
<b>Sekundarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Razblaženje</b>	<b>Proizvođač</b>
Anti-kunić, obeleženo peroksidazom rena	koza	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-miš, obeleženo peroksidazom rena	koza	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, SAD

Monoklonska antitela obeležena fluorohromom korišćena za protočnu citofluorimetriju su prikazana u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Prikaz antitela korišćenih za protočnu citofluorimetriju

Antitela	Fluorohroma	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
CD3	PerCP/PE	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD4	FITC/PerCP/APC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD8	FITC/PerCP	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD25	PerCp	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD40	FITC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD86	APC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
PD-1	PerCP	jermenski hrčak	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD11c	APC	jermenski hrčak	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
MHC II	PE	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
CD107a	FITC/PE	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
Perforin	APC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
Granzim	PerCP/PE	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
INF- $\gamma$	APC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
IL-10	PerCP/APC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
TNF- $\alpha$	FITC	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)
FoxP3	PE	pacov	1:100	eBioscience (San Dijego, SAD)

Antitelo korišćeno za detekciju nuklearnog antigena proliferišućih ćelija je poliklonsko anti-PCNA (engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA) antitelo (eBioscience, San Dijego, SAD) u razblaženju 1:100. Kao sekundarno antitelo korišćeno je anti-kunić Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD) u razblaženju 1:400.

### 3.2. Rastvori

Sve ćelijske linije korišćene u eksperimentalnom delu rada uzgajane su u RPMI-1640 medijumu obogaćenim 20 mM HEPES puferom, 2 mM L-glutaminom i 0,01% natrijum piruvatom. Takav medijum je suplementiran sa 10% FBS, antibioticima penicilinom (100 IJ/mL), streptomycinom (100  $\mu$ g/mL) i antimikotikom nistatinom (100 IJ/mL). U cilju inaktivacije komponenata komplementa, FBS je inkubiran 30 minuta na 56 °C, a potom je dodavan u medijum. PBS pufer, korišćen za ispiranje ćelija, sa vrednošću pH od 7,4, na sobnoj temperaturi (engl. *Room Temperature*, RT), pravljen je od: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  $\times$  2 H<sub>2</sub>O i 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Za odvajanje adherentnih ćelijskih linija od plastike upotrebljavan je rastvor tripsina (0,25%) i EDTA (0,02%) u PBS-u, dok je za potrebe brojanja ćelija upotrebljavan rastvor boje tripan plavo (0,1%) u PBS-u.

Za bojenje ćelija Ann V-FITC-om upotrebljavan je pufer za vezivanje aneksina (engl. *Annexin Binding Buffer*, ABB). ABB je sačinjen od 10 mM HEPES pH 7,4, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> i 140 mM NaCl.

Za određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju korišćeni su sledeći rastvori: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O i 2% K-Na-tartarat u dH<sub>2</sub>O, pomešani u razmeri 98:1:1.

Za potrebe imunoblot analize korišćeni su sledeći rastvori: rastvor za liziranje ćelija (62,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol i 50 mM DTT u dH<sub>2</sub>O) koji je neposredno pre korišćenja suplementiran inhibitorima proteaza (10 µg/mL aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF); 5 × PBS bez kalijuma (400 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 500 mM NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O u dH<sub>2</sub>O); pufer za nalivanje uzoraka na gel za elektroforezu – 4 × Lemlijev pufer (1 M TRIS-HCl pH 6,8, 20% SDS, 20% glicerol, 0,2 M β-merkaptotanol, 0,004% bromfenol plavo); 5 × pufer za elektroforezu (engl. *Tris-Glycine Buffer*, TGB) (125 mM TRIS, 0,5% SDS, 1,25 M glicin u dH<sub>2</sub>O); pufer za transfer proteina sa gela na membranu (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 10% CH<sub>3</sub>OH, 0,1% SDS u dH<sub>2</sub>O); rastvor za ispiranje membrana (0,1% Tween 20-PBS (PBSTw)); rastvor za blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela (5% BSA u PBSTw); rastvori antitela odgovarajućeg razblaženja pravljani su u PBSTw sa 1% BSA.

Za potrebe imunofluorescentnog bojenja pripremljeni su sledeći rastvori: rastvor za sprečavanje nespecifičnog vezanja antitela koji sadrži 5% BSA u PBS-u; rastvor za demaskiranje antigena koji obuhvata 10 mM Na-citrat-dihidrat sa 0,05% Tween-20, pH vrednosti 6; rastvori antitela odgovarajućeg razblaženja pravljani su u PBS-u.

Koncentrovani rastvor etanolnog ekstrakta virka (*Alchemilla vulgaris* agg.) pripreman je u DMSO neposredno pre upotrebe u koncentraciji 200 mg/mL. Radni rastvor etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* (3,125 – 200 µg/mL) za *in vitro* tretmane pripreman je u medijumu za kultivaciju ćelija neposredno pre upotrebe. Koncentracija DMSO-a u ćelijskoj kulturi nije prelazila 0,1%. Za *in vivo* tretmane, rastvor etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* je pripreman u dozi od 50 mg/kg u 4% DMSO-PBS, neposredno pre tretmana životinja.

### 3.3. Biljni materijal

#### 3.3.1. Prikupljanje biljnog materijala i priprema ekstrakta

Biljni materijal virka (*Alchemilla vulgaris* agg.) sakupljen je u Jugoistočnoj Srbiji, na području Vlasinske visoravni (N 42.8779987, E 22.0592615) tokom 2020. godine. Sakupljeni su nadzemni delovi biljke u fazi punog cvetanja. Taksonomski identitet biljnog materijala potvrdila je Prof. dr Zora Dajić-Stevanović, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Primerak vaučera (No. RS-120718-1) se čuva u Herbarijumu Katedre za primenjenu botaniku Poljoprivrednog fakulteta, univerziteta u Beogradu.

Nakon sakupljanja, nadzemni delovi biljnog materijala su osušeni na odgovarajući način, u dobro provetреноj prostoriji, u senci na RT. Posle sušenja materijal je samleven na laboratorijskom mlinu. Količina od 100 g biljnog materijala je ekstrahovana u 1 L vrućeg etanola na 60 °C tokom 2 h i ciklus je ponovljen tri puta. Nakon ekstrakcije, izvršeno je uparavanje putem rotacionog isparivača (vakuum na 60 °C), a dobijeni polučvrsti ekstrakt je čuvan na 4 °C za dalje analize.

### 3.4. Analiza hemijskog sastava etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*

Sadržaj odabranih frakcija u uzorku etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*, kao što su ukupni fenoli, flavonoidi i derivati dihidroksicimetne kiseline, je određen primenom standardnih spektrofotometrijskih metoda, kao što su Folin-Ciocalteu (ukupni fenoli; engl. *Total Phenolic Content*, TPC), aluminijum hlorid (ukupni flavonoidi; engl. *Total Flavonoid Content*, TFC) i Arnov's (ukupni derivati dihidroksicimetne kiseline; engl. *Total Dihydroxycinnamic Acid Derivatives*, HCA). Koncentracije su izražene kao mg/g ekvivalenta galne kiseline (engl. *Equivalents of Gallic Acid*, GAE), kvercetina (engl. *Equivalents of Quercetin*, QE) i hlorogenske kiseline (engl. *Equivalents of Chlorogenic Acid*, CGAE) izračunatih na osnovu težine osušenog uzorka (suve mase). Za detaljniju fitohemijsku karakterizaciju primenjena je tečna hromatografija ultra visokih preformansi (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) i masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS).

#### 3.4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC)

Folin-Ciocalteu metoda je korišćena za određivanje sadržaja TPC kako je prethodno opisano [256]. Razblažen ekstrakt *A. vulgaris* (0,625 mL) je pomešan sa 0,625 mL Folin-Ciocalteu rastvora. Istovremeno, pripremana je slepa proba (engl. *blank*) koja je sadržavala destilovanu vodu umesto ekstrakta *A. vulgaris*. Nakon toga je dodato 0,625 mL 7,5% rastvora natrijum-karbonata. Reakciona smeša je intenzivno pomešana i ostavljena u mraku na RT u trajanju od 90 minuta do razvijanja boje. Merenje apsorbance je vršeno na 765 nm pomoću UV-VIS spektrofotometra (Shimadzu UV-1800 UV-Vis, California NanoSystems Institute (CNSI), Kalifornija, Los Angeles, SAD). Kvantifikacija je urađena na osnovu kalibracione krive pripremljene korišćenjem galne kiseline (engl. *Gallic Acid*, GA) kao standarda [257,258]. Rezultati su izraženi kao mg GAE po g suve mase.

#### 3.4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC)

Određivanje sadržaja TFC izvršeno je pomoću sprektrofotometrijske metode koja je ranije detaljno opisana [259]. Nerazblažen ekstrakt (125 µL) je mešan sa 625 µL destilovane vode i 37,5 µL 5% NaNO<sub>2</sub>. Nakon 6 minuta inkubacije dodato je 75 µL 10% AlCl<sub>3</sub>. Smeša je ostavljena 5 minuta a zatim je dodato 250 µL 1M NaOH i 138 µL destilovane vode. Slepa proba je pripremljena zamenom ekstrakta *A. vulgaris* destilovanom vodom. Reakcione smeše su intenzivno mešane i apsorbance je merena na 510 nm UV-VIS spektrofotometrom (Shimadzu UV-1800 UV-Vis, California NanoSystems Institute (CNSI), Kalifornija, Los Angeles, SAD). TFC je određen korišćenjem kalibracione krive uz korišćenje kvercetina (engl. *Quercetin*, Q) kao standarda, a rezultati su izraženi kao mg QE po g suve mase.

#### 3.4.3. Sadržaj ukupnih derivata dihidroksicimetne kiseline (HCA)

Sadržaj HCA je procenjen metodom koju su opisali Fraisse i saradnici 2011 [260] uz malu modifikaciju. Naime, 0,2 mL nerazblaženog ekstrakta *A. vulgaris* pomešano je sa 0,4 mL 0,5 M HCl, 0,4 mL Arnov's reagensa (dobijenog rastvaranjem 10 g NaNO<sub>2</sub> i 10 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> u 100 mL destilovane vode), 0,4 mL 2,215 M NaOH i 0,6 mL destilovane vode. Slepa proba je napravljena tako što je umesto ekstrakta *A. vulgaris* u reakcionu smešu dodata destilovana voda. Nakon 20 minuta inkubacije na RT izmerena je apsorbance na 525 nm pomoću UV-VIS spektrofotometra (Shimadzu UV-1800 UV-Vis, California NanoSystems Institute (CNSI), Kalifornija, Los Angeles, SAD). Ukupan sadržaj HCA u ekstraktu određen je pomoću kalibracione krive uz korišćenje hlorogenske kiseline (engl. *Chlorogenic Acid*, CGA) kao standarda. Rezultati su izraženi kao mg CGAE po g suve mase.

### 3.4.4. Karakterizacija pojedinačnih komponenti ekstrakta (UHPLC-HRMS)

UHPLC je jedna od najmoćnijih tehnika u analitičkoj hemiji koja omogućava razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju jedinjenja prisutnih u uzorku dok HRMS omogućava detektovanje analita do 0,001 jedinica atomske mase.

UHPLC–HRMS analiza je izvršena korišćenjem tečnog hromatografa (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 RSLC, Germering, Bavarska, Nemačka) povezanog sa masenim spektrometrom (MS) (Termo Scientific Q Exactive Plus, Bremen, Nemačka). Razdvajanje je postignuto na reverzno-faznoj koloni (Kromasil Eternity XT C18, Nouryon, Göteborg, Švedska) (2,1 × 100 mm, 1,8 μm) opremljenoj predkolonom (Security Guard ULTRA UHPLC EVO C18, Phenomenex, Kalifornija, SAD) održavanoj na 40 °C. Binarna mobilna faza se sastojala od A: 0,1% mravlje kiseline u vodi i B: 0,1% mravlje kiseline u acetonitrolu. Ukupno vreme trajanja je bilo 34,5 minuta. Korišćen je sledeći gradijentni režim: mobilna faza (5% B tokom jednog minuta) postepeno je prelazila na 30% B tokom 24 minuta, zatim se postepeno povećavala na 40% B tokom 5 minuta, i finalno se povećavala na 95% B tokom 2,5 minuta. Održana je na 95% B tokom 2 minuta, a sistem je potom vraćen na početno stanje od 5% B i održan je tako tokom 4,5 minuta. Brzina protoka mobilne faze je bila podešena na 300 μL/min, dok je zapremina injektovanja iznosila 2 μL. Parametri podešavanja MS bili su sledeći: napon – 2,5 kV; protok gasa u omotaču – 38 proizvoljnih jedinica (engl. *arbitrary units*, a.u.); protok pomoćnog gasa – 12 a.u.; temperatura kapilare – 320 °C; referentni nivo S-objektiva – 50. Merenje je izvršeno u režimima MS za kompletno skeniranje i skeniranje zavisno od podataka MS2 (engl. *Data Dependent-MS2 mode*, ddMS2). Spektri kompletnog skeniranja u opsegu odnosa mase i naelektrisanja (m/z) od 100 do 1500 dobijeni su u negativnom jonizacionom režimu sa rezolucijom od 70 000. Ostali parametri instrumenta za kompletni MS režim su podešeni na sledeći način: Automatska kontrola pojačanja (engl. *Automatic Gain Control*, AGC) –  $3 \times 10^6$ ; maksimalno vreme ubrizgavanja (engl. *maximum Injection Time*, IT) – 80 ms. Za ddMS2 režim parametri instrumenta su bili sledeći: rezolucija – 17 500; AGC –  $1 \times 10^5$ ; maksimalno IT – 50 ms. Prikupljanje i obrada podataka obavljani su pomoću softvera (Xcalibur 4.0 software, Thermo Scientific, Inc., Valtam, SAD).

### 3.5. Kulture ćelija

U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće ćelijske linije: B16F1 i B16F10 ćelijske linije mišjeg melanoma, A375, 518A2 i FemX ćelijske linije humanog melanoma, 4T1 ćelijska linija mišjeg tumora dojke i MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-361 i MDA-MB-231 ćelijske linije humanog tumora dojke. Takođe je korišćena i jedna primarna ćelijska kultura – ćelije peritonealnog eksudata (engl. *Peritoneal Exudate Cells*, PEC) miša.

#### 3.5.1. B16F1 ćelije mišjeg melanoma

Ova ćelijska linija je izolovana iz melanoma C57BL/6 miša i pokazuje morfologiju koja je mešavina vretenastih ćelija i ćelija sličnih epitelnim. B16F1 linija predstavlja jednu od retkih pigmentisanih ćelijskih linija melanoma. Obzirom na izraženu pigmentaciju, jednostavna je za praćenje *in vivo* nakon indukcije tumora u singene miševе i samim tim je pogodan model za istraživanje melanoma. B16F1 ćelije imaju slabu sposobnost invazije, nizak metastatski potencijal i viši stupanj diferencijacije. B16F1 ćelijska linija mišjeg melanoma korišćena u ovoj studiji je poreklom iz Američke kolekcije kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC) (Rokvil, SAD).

### 3.5.2. B16F10 ćelije mišjeg melanoma

B16F10 ćelijska linija je izvedena iz roditeljske B16F1 ćelijske linije. Linija je nastala uzastopnim prenosom tumorskih ćelija koje su izolovane iz plućnih metastaza u 10 uzastopnih ciklusa [261]. B16F10 ćelije rastu kao adherentna ćelijska kultura sa visokim proliferativnim kapacitetom i vremenom deobe od samo 14 do 20 h *in vitro*, što ih čini visoko agresivnom i invazivnom linijom [262]. U slučaju potkožnog ubrizgavanja ovih ćelije u C57BL/6 miševu, formira se solidni tumor sa rastresitom strukturom i izraženom sklonošću ćelija da invadiraju u peritoneum i mogućnošću da metastaziraju na pluća. Injeciranje ovih ćelija u repnu venu dovodi do direktnog formiranja plućnih metastaza [263]. B16F10 linija je jako koristan model za proučavanje fenomena metastaziranja i invazivnosti. B16F10 ćelijska linija mišjeg melanoma, koja je korišćena u eksperimentalnom delu, dobijena je kao ljubazi poklon Prof. dr Ludgera Wessjohann (Lajbnić Institut za biljnu biohemiju Hale, Nemačka), a originalno je poreklom iz ATCC.

### 3.5.3. A375 ćelije humanog melanoma

Ćelijska linija A375 predstavlja amelanotične ćelije koje potiču od pacijenta sa malignim melanomom [264]. Reč je o anaplastičnoj ćelijskoj liniji koja pokazuje agresivna svojstva i ima veliki potencijal invadiranja u lokalna tkiva i formiranja metastaza. A375 ćelije humanog melanoma poseduju niži stupanj diferencijacije i odlikuje ih „stem“ fenotip. A375 ćelijska linija humanog melanoma korišćena u eksperimentalnom radu je ljubazni poklon Prof. dr Ferdinanda Nikoletija (Univerzitet u Kataniji, Sicilija, Italija), a originalno je poreklom iz ATCC.

### 3.5.4. 518A2 ćelije humanog melanoma

Adherentna ćelijska linija 518A2 predstavlja humani melanom koji je izolovan iz metastaze. 518A2 ćelijska linija humanog melanoma korišćena u eksperimentalnom radu je ljubazni poklon Prof. dr Gorana Kaluđerovića (Univerzitet primenjenih nauka, Merseburg, Nemačka).

### 3.5.5. FemX ćelije humanog melanoma

FemX je ćelijska linija izolovana iz metastataze u limfnom čvoru pacijenta obolelog od melanoma. Ove ćelije humanog melanoma korišćene u istraživanju su ljubazni poklon Dr. Milena Čavić (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd, Srbija).

### 3.5.6. 4T1 ćelije mišjeg tumora dojke

Ova ćelijska linija tumora dojke je izvedena iz tkiva mlečne žlezde miševa BALB/c soja [265]. 4T1 ćelije su epitelnog porekla i predstavljaju model za izučavanje IV stadijuma raka dojke jer rast i metastatsko širenje 4T1 ćelija kod BALB/c miševa blisko oponašaju bolest kod ljudi. Ove ćelije ne eksprimiraju ER, PR i HER2 [266]. Takođe, u literaturi je opisano da su 4T1 ćelije slabo imunogene kod miševa, što u potpunosti odgovara karakteristikama karcinoma dojke kod ljudi [265]. Po inokulaciji većeg broja 4T1 ćelija u BALB/C miševu, uočava se spontano formiranje metastaza na plućima, jetri, limfnim čvorovima i mozgu dok primarni tumor raste *in situ* [267]. 4T1 ćelijska linija mišjeg tumora dojke korišćena u istraživanju je ljubazni poklon Prof. dr Ludgera Wessjohann (Lajbnić Institut za biljnu biohemiju Hale, Nemačka), a originalno je poreklom iz ATCC.

### **3.5.7. MCF-7 ćelije humanog tumora dojke**

Ćelijska linija MCF-7 je izolovana 1970. godine iz 69. godišnje žene [268]. Naziv predstavlja skraćenicu od engl. *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7), i odnosi se na Institut u Detroitu gde je 1973. godine uspostavljena ova linija [269]. Pre ove ćelijske linije, istraživačima je bilo nemoguće da dobiju ćelijsku liniju raka dojke koja je bila sposobna da živi duže od nekoliko meseci u kulturi [270]. Ovu liniju karakteriše sposobnost obrade estradiola pomoću citoplazmatskih ER [271]. MCF-7 je jedna od ćelijskih linija raka dojke koje eksprimiraju estrogenski receptor alfa (ER $\alpha$ ) [272]. Takođe eksprimira androgene, progesteronske i glukokortikoidne receptore. MCF-7 ćelije humanog tumora dojke korišćene u izradi ove doktorske disertacije su poreklom iz ATCC.

### **3.5.8. MDA-MB-468 ćelije humanog tumora dojke**

Ova ćelijska linija je epitelne morfologije i izolovana je 1977. godine iz 51. godišnje žene sa metastatskim adenokarcinomom dojke [273]. Ćelije su ekstrahovane iz pleuralnog izliva mlečne žlezde i tkiva dojke i pokazale su se jako korisnim za proučavanje metastaza, migracije i proliferacije. MDA-MB-468 su trostruko negativne ćelije jer ne eksprimiraju ER, PR i HER2 [274]. MDA-MB-468 ćelijska linija humanog tumora dojke korišćena u ovoj studiji je ljubazni poklon Prof. dr Ludgera Wessjohann (Lajbnic Institut za biljnu biohemiju Hale, Nemačka), a originalno je poreklom iz ATCC.

### **3.5.9. MDA-MB-361 ćelije humanog tumora dojke**

Ova ćelijska linija je izolovana iz metastaze na mozgu 40. godišnje žene sa adenokarcinomom dojke. MDA-MB-361 su epitelne morfologije i visoko eksprimiraju ER $\alpha$  i HER2 ali ne eksprimiraju PR [275,276]. MDA-MB-361 ćelije humanog tumora dojke korišćene u izradi ove doktorske disertacije su poreklom iz ATCC.

### **3.5.10. MDA-MB-231 ćelije humanog tumora dojke**

Ova ćelijska linija je epitelna linija humanog raka dojke koja je uspostavljena iz pleuralne efuzije 51. godišnje žene sa metastatskim adenokarcinomom dojke i jedna je od najčešće korišćenih ćelijskih linija raka dojke u istraživanjima [273]. MDA-MB-231 je visoko agresivna, invazivna i nisko diferencirana ćelijska linija TNBC [274,277]. Takođe je odlikuje negativna regulacija kladina 3 i 4 i niska ekspresija markera proliferacije Ki-67 ali i pozitivna regulacija markera neophodnih za proces EMT i ekspresija markera povezanih sa stem ćelijama raka [278]. MDA-MB-231 ćelije humanog tumora dojke korišćene u ovom istraživanju su poreklom iz ATCC.

### **3.5.11. PEC**

Kao model zdravih ćelija korišćene su ćelije peritonealnog eksudata C57BL/6 miševa. U peritoneum životinja je ubrizgavan sterilan ledeno hladan rastvor PBS-a, a zatim je pipetom sakupljana tečnost sa ćelijama. Ćelije su potom centrifugirane na 500 g u trajanju od 5 minuta. U slučaju prisustva eritrocita u talogu, korišćen je pufer za liziranje eritrocita (0,1 mM EDTA, 12 mM NaHCO<sub>3</sub> i 155 mM NH<sub>4</sub>Cl u dH<sub>2</sub>O) u trajanju od 5 minuta na RT. Nakon zaustavljanja procesa hemolize, uzorci PEC su centrifugirani na 500 g u trajanju od 5 minuta. Nakon toga, ćelijski talog je resuspendovan u RPMI medijumu koji je suplementiran sa 5% FBS-a i antibioticima. Ćelije su dalje zasađene ( $2 \times 10^5$  po bunariću u 100  $\mu$ L medijuma) u sterilne ploče sa 96 bunarića i ostavljene da adheriraju. Nakon minimalno 2 h od sadnje, bunarići ploča su ispirani PBS-om radi uklanjanja nediferenciranih limfocita čime je dobijena populacija makrofaga.



### 3.5.12. Uslovi kultivacije i priprema ćelija za rad

Sve ćelijske linije su gajene u sterilnim plastičnim flaskovima za adherentne kulture zapremine 25 cm<sup>3</sup> ili 75 cm<sup>3</sup> (Sarstedt, Njuton, SAD) u 5 ili 10 mL medijuma pod standardnim uslovima za gajenje koji podrazumevaju korišćenje inkubatora sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37 °C i koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5%.

Za određivanje vijabiliteta ćelije su sađene u sterilne plastične ploče sa 96 bunarića ravnog dna koje su predviđene za rast adherentnih kultura (Sarstedt, Nimbreh, Nemačka) u sledećim gustinama: B16F1 (3 × 10<sup>3</sup> ćelija u 100 μL medijuma), B16F10 (2 × 10<sup>3</sup> ćelija u 100 μL medijuma), A375, 518A2, FemX (5 × 10<sup>3</sup> ćelija u 100 μL medijuma), 4T1, MDA-MB-361, MDA-MB-468 (4 × 10<sup>3</sup> ćelija u 100 μL medijuma), MDA-MB-231 (7 × 10<sup>3</sup> ćelija u 100 μL medijuma) i MCF-7 (10 × 10<sup>3</sup> ćelija u 100 μL medijuma).

Za analizu na nivou fluorescentne mikroskopije, 4T1 ćelije su sađene na sterilnim staklenim mikroskopskim pločicama sa 4 komorice (engl. *Chamber Slide*) (Millicell<sup>®</sup> EZ SLIDES, Merck Millipore Berlington, SAD) u gustini od 3 × 10<sup>4</sup> ćelija/bunariću u 400 μL medijuma.

Za citofluorimetrijsku i imunoblot analizu, ćelije su sađene u sterilne plastične ploče sa 6 bunarića ravnog dna (Sarstedt, Nimbreh, Nemačka) u sledećim gustinama: B16F1 (1,5 × 10<sup>5</sup> ćelija u 1 mL medijuma), B16F10 (1 × 10<sup>5</sup> ćelija u 1 mL medijuma) i 4T1 (1 × 10<sup>5</sup> ćelija u 1 mL medijuma). Za potrebe klonogenog eseja, 4T1 ćelije su sađene u sterilne plastične ploče sa 6 bunarića ravnog dna u gustini od 1 × 10<sup>3</sup> ćelija u 1 mL medijuma. Za izvođenje testa zarastanja rana 4T1 ćelije su sađene u sterilne plastične ploče sa 6 bunarića ravnog dna u gustini od 4 × 10<sup>5</sup> ćelija u 1 mL medijuma.

Za ispitivanje migratornosti i invazivnog kapaciteta 4T1 ćelija *in vitro*, korišćene su posebne komorice (engl. *Transwell Inserts*, BD Bioscience, Bedford, SAD) sa dnom u vidu porozne membrane, čiji je prečnik 6,4 mm i dijametar pora 8 μm. Komorice su postavljene u sterilne plastične ploče sa 24 bunarića ravnog dna (Sarstedt, Nimbreh, Nemačka) nakon čega su 4T1 ćelije sađene u gornji deo komorice u gustini od 7 × 10<sup>4</sup> u 200 μL medijuma sa 0,1% BSA.

Sve ćelije su inkubirane preko noći, nakon čega je dodavan radni rastvor etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* do finalne zapremine od 200 μL za ploče sa 96 bunarića, 800 μL za mikroskopske pločice sa 4 komorice, i do finalne zapremine od 2 mL za ploče sa 6 bunarića i inkubirane u trajanju od 72 h.

### 3.6. Eksperimentalne životinje

U ekperimentalnom radu su korišćeni C57BL/6 i BALB/c miševi ženskog pola, starosti od 6 do 10 nedelja. Eksperimentalne životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Životinje su držane pod standardnim laboratorijskim uslovima (bez patogena) sa neograničenim pristupom vodi i hrani. Svi eksperimenti u kojima su korišćene eksperimentalne životinje su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju kao i od strane nacionalne komisije Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (br. 323-07-12008/2020-05).

### **3.7. Korišćene metode**

#### **3.7.1. Tripsinizacija i pasažiranje ćelija**

Sve ćelijske linije korišćene u eksperimentalnom radu su redovno posmatrane pod svetlosnim mikroskopom i nakon procene da su ćelije dostigle oko 80% konfluentnosti, one su odvajane od podloge upotrebom rastvora tripsina (0,25%) i EDTA (0,02%) u PBS-u. Neposredno pre dodavanja tripsina, medijum u kome su ćelije rasle je prosipan, a flaskovi su ispirani sa 3-6 mL PBS-a kako bi se uklonile mrtve i odlepljene ćelije kao i zaostali tragovi medijuma koji sadrži FBS koji bi inhibirao proces tripsinizacije. Ovakvoj kulturi je zatim dodavano 0,5-1 mL rastvora tripsina koji prekida međućelijske veze i veze ćelija sa podlogom. Nakon 1,5-3 minuta inkubacije na 37 °C, odlepljenim ćelijama je dodavan medijum suplementiran sa 10% FBS-a čime se proces tripsinizacije prekida. Takva suspenzija ćelija je potom centrifugirana 3 minuta na 1000 rpm, a ćelijski talog je zatim resuspendovan u medijumu za kultivaciju i ćelije su potom prebrojane i korišćene za dalje eksperimente ili vraćane u flask kako bi ponovo rasle.

#### **3.7.2. Procena vijabilnosti i određivanje broja ćelija**

Kako bi se odredio ukupan broj ćelija nakon tripsinizacije, kao i relativan broj živih ćelija, pristupalo se brojanju ćelija pod svetlosnim mikroskopom u komori po Bürker-Türku. Za razlikovanje mrtvih od živih ćelija korišćen je 0,1% rastvor boje tripan plavo u PBS-u sa kojim je suspenzija ćelija mešana u odnosu 1:1. Pod svetlosnim mikroskopom jasno se razlikuju mrtve od živih ćelija jer tripan plavo boja ne može proći kroz ćelijsku membranu očuvanog integriteta i stoga se samo citoplazme mrtvih ćelija boje plavo. Za računanje broja ćelija po mL korišćena je sledeća formula: broj ćelija / broj polja  $\times 0,5 \times 10^6$ . Nakon izračunavanja broja ćelija, podešavana je njihova gustina za sadnju ili dalju kultivaciju razblaživanjem suspenzije medijumom za kultivaciju.

#### **3.7.3. Testovi vijabiliteta**

##### **3.7.3.1. MTT test**

MTT test je kolorimetrijski test koji se koristi za određivanje metaboličke aktivnosti ćelija, jer se zasniva na sposobnosti ćelija da redukuju tetrazolijumovu so (MTT) u formazan (precipitat ljubičaste boje). Intenzitet formirane ljubičaste boje je direktno proporcijalan broju vijabilnih ćelija.

Nakon završetka tretmana, sa ćelija je uklanjan supernatant, bunarići su ispirani dva puta sa 200  $\mu$ L PBS-a u cilju eliminisanja zaostalih tragova tretmana nakon čega je dodavano 50  $\mu$ L po bunariću rastvora MTT boje u medijumu za kultivaciju koji je prethodno zagrejan. Koncentracija rastvora je finalno iznosila 0,5 mg/mL. Nakon inkubacije u trajanju od 30 min do 1 h na 37 °C, MTT rastvor je odstranjen, a u bunariće je dodavano 50  $\mu$ L DMSO kako bi se formirani kristali formazana rastvorili. Merenjem apsorbance svetlosti na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006, LKB, Beč, Austrija) na 540 nm sa korekcijom na 670 nm određivan je intenzitet rastvorene boje nakon čega je vijabilitet ćelija predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrole (arbitrarno dodeljene vrednosti vijabilnosti od 100%).

##### **3.7.3.2. SRB test**

Sulforodamin B (SRB) test je jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje vijabilnosti ćelija ili procenu citotoksičnosti lekova a zasniva se na vezivanju SRB boje za osnovne aminokiseline ćelijskih proteina čija kolorimetrijska evaluacija daje procenu ukupnog broja ćelija.

Nakon završetka tretmana, sa ćelija je uklonjen supernatant, bunarići su oprani sa 200  $\mu$ L PBS-a nakon čega su ćelije fiksirane sa 10% TCA u trajanju od 2 h na 4 °C. Nakon fiksiranja, ćelije su isprane destilovanom vodom, a zatim obojene 0,4% rastvorom SRB boje u trajanju od 30 minuta na RT. Višak boje ispiran je sa 1% rastvorom sirćetne kiseline i nakon sušenja, boja je rastvorena upotrebom 10 mM rastvora Tris pufera. Nakon 20 minuta od dodavanja Tris pufera, merena je apsorbance svetlosti na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006, LKB, Beč, Austrija) na 540 nm sa korekcijom na 670 nm. Vijabilitet tretiranih ćelija je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrole (arbitrarno dodeljene vrednosti vijabilnosti od 100%).

#### **3.7.4. Bojenje ćelija PI bojom**

PI je fluorescentna boja sa visokim afinitetom vezivanja za regione DNK. Nakon završetku tretmana, supernatant je odlivan iz komorica, ćelije su oprane sa 500  $\mu$ L PBS-a, a zatim fiksirane u 4% PFA tokom 15 minuta na RT. Po isteku fiksacije, ćelije su oprane nekoliko puta sa 500  $\mu$ L PBS-a a zatim obojene rastvorom PI (50  $\mu$ g/mL) sa 0,1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% Triton X-100 i RNaze (85  $\mu$ g/mL) u PBS-u u trajanju od 1-2 minuta. Rastvor boje je odliven iz komorica, ćelije su dobro oprane od viška boje ispiranjem nekoliko puta sa 500  $\mu$ L PBS-a, a zatim su pločice montirane pomoću medijuma za montiranje fluorescentno obojenih mikroskopskih preparata (Fluoromount-G). Preparati su posmatrani, analizirani i fotografisani na invertnom fluorescentnom mikroskopu (Axio Observer Z1, Carl Zeiss AG, Oberkuhen, Nemačka) koristeći uveličanje objektiva od 400  $\times$ .

#### **3.7.5. Bojenje ćelija AO bojom**

Nakon isteka tretmana, supernatant je odlivan iz komorica, 4T1 ćelije su oprane sa 500  $\mu$ L PBS-a, a zatim obojene rastvorom AO (10  $\mu$ M) u trajanju od 15 minuta. Rastvor boje je odliven iz komorica, ćelije su dobro oprane od viška boje ispiranjem nekoliko puta sa 500  $\mu$ L PBS-a, a zatim su pločice montirane nakapavanjem PBS-a i pokrivanjem pokrovnim stakalcem. Preparati su posmatrani, analizirani i fotografisani na fluorescentnom mikroskopu neposredno nakon formiranja (Leica DM4 B, Leica Microsystems CMS GmbH, Veclar, Nemačka), sa DFC7000 T mikroskop kamerom koristeći uveličanje objektiva od 400  $\times$ .

#### **3.7.6. Protočna citofluorimetrija**

Protočna citofluorimetrija, poznata i kao sortiranje ćelija aktivirano fluorescencijom (engl. Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS), je brza i efikasna tehnika koja sa visokom osetljivošću i preciznošću omogućava detekciju fluorescentno obeleženih subpopulacija ćelija. Osnovne prednosti ovako visoko osetljivih metoda su mogućnost obeležavanja više različitih markera unutar i na površini pojedinačnih ćelija kao i mogućnost upotrebe nekoliko različitih fluorescentnih boja, a da se istovremeno ne ošteti ispitivani uzorak [279].

U ovom radu merenje intenziteta fluorescence obeleženih uzoraka vršeno je korišćenjem protočnog citofluorimetra (CyFlow<sup>®</sup> Space Partec, Minster, Nemačka). Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softverskih programa PartecFloMax<sup>®</sup> i Cyflogic.

Korišćene su sledeće fluorescentne boje: CFSE, PI, Ann V-FITC, FITC-konjugovani ApoStat, akridin-oranž (AO), DHR 123 i FDG, čiji su ekscitacioni i emisioni maksimumi prikazani u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Prikaz fluorescentnih boja korišćenih za protočnu citofluorimetriju

Fluorescentna boja	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
PI	536	617
FITC	494	518
CFSE	492	517
AO	488	530/640
FDG	490	514
DHR 123	500	536

$\lambda_{ex}$  – talasna dužina maksimuma ekscitacije;  $\lambda_{em}$  – talasna dužina maksimuma emisije

### 3.7.6.1. Analiza stope ćelijskih deoba

Kako bi se odredio uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na stopu ćelijske deobe korišćena je CFSE fluorescentna boja. Ova boja slobodno prolazi kroz ćelijske membrane i nakon obrade unutraćelijskim esterazama postaje fluorescentni karboksifluorescein-sukcinimidil-estar. On se potom kovalentno vezuje za unutarćelijske molekule posredstvom sukcinimidil grupe, prvenstveno lizinske ostatke, ali i druge izvore amina obeležavajući na taj način proteine citoplazme pri čemu ne remeti funkcije ćelije. Svakom deobom intenzitet fluorescence u potomačkim ćelijama postaje duplo slabiji, što ovaj molekul čini pogodnim za praćenje ćelijske proliferacije.

Ćelije melanoma (B16F1 i B16F10) kao i ćelije tumora dojke (4T1) su pre sadnje bojene rastvorom 1  $\mu$ M CFSE u 0,1% FBS-PBS-u tokom 10 minuta na 37 °C u inkubatoru. Proces bojenja je potom prekinut dodavanjem medijuma koji sadrži 10% FBS-a. Ovakva ćelijska suspenzija je centrifugirana na 1000 rpm 3 minuta, a talog ćelija je resuspendovan u PBS-u i ponovo centrifugiran na 1000 rpm 3 minuta kako bi se uklonio višak boje koja nije difundovala u ćelije. Nakon toga, ćelije su posađene i tretirane etanolnim ekstraktom *A. vulgaris*. Po isteku inkubacije od 72 h, odliveni su supernatanti, ćelije su oprane PBS-om a zatim tripsinizovane. Reakcija tripsinizacije je gašena dodavanjem medijuma sa 10% FBS-a i suspenzija ćelija je centrifugirana na 750 g 3 minuta. Nakon toga, usledilo je još jedno pranje PBS-om i intenzitet zelene fluorescence je detektovan i analiziran korišćenjem protočnog citofluorimetra (CyFlow® Space Partec, Minster, Nemačka) i softverskih programa PartecFloMax® i Cyflogic.

### 3.7.6.2. Detekcija ćelija u apoptozi

Jedno od glavnih morfoloških obeležja koje se uočava kod ćelija koje ulaze u ranu apoptozu je izvrtanje fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane [280]. Ova eksternalizacija fosfatidilserina omogućava fluorescentno obeleženom rekombinantnom proteinu Ann V-FITC da se veže za fosfolipide, posebno fosfatidilserine čime je omogućena identifikacija populacije ćelija koje su rano-apoptotske i čiji integritet ćelijske membrane još uvek nije narušen [281]. Upotrebom kontrastnog bojenja korišćenjem PI, omogućeno je razlikovanje ćelije koje su u ranoj apoptozi od kasno apoptotskih/nekrotskih ćelija čiji je integritet membrane narušen. Upotrebom dvostrukog bojanja u protočnoj citofluorimetriji moguće je razlikovati subpopulaciju rano apoptotskih ćelija pomoću profila Ann V<sup>+</sup>/PI, i subpopulaciju kasno apoptotskih ćelija pomoću profila Ann V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>.

Po isteku vremena kultivacije, supernatanti su sakupljeni u tubice, ćelije (B16F1, B16F10 i 4T1) su zatim oprane sa PBS-om i tripsinizovane. U bunariće je dodat medijum sa 10% FBS-a i ovakva suspenzija ćelija je pridružena prethodno sakupljenim supernatantima. Ćelije su potom centrifugirane na 750 g 3 minuta, talozi su resuspendovani i isprani u PBS-u. Nakon još jednog ciklusa centrifugiranja (750 g 3 minuta), na taloge ćelija dodato je 100  $\mu$ L ABB sa 15  $\mu$ g/mL aneksin V-FITC i 15  $\mu$ g/mL PI. Konačno, nakon 15 minuta inkubacije na RT u odsustvu svetlosti,

reakcija bojenja je zaustavljena dodavanjem 900  $\mu\text{L}$  ABB-a i intenzitet zelene i crvene fluorescence je očitana na FL1 i FL2 kanalima protočnog citofluorimetra (CyFlow<sup>®</sup> Space Partec, Minster, Nemačka). Analiza je urađena korišćenjem softverskih programa PartecFloMax<sup>®</sup> i Cyflogic.

### 3.7.6.3. Detekcija aktiviranih kaspaza

Kako bi se identifikovala i kvantifikovala aktivacija kaspaza korišćen je ApoStat (FITC-konjugovani inhibitor kaspaza). On slobodno prolazi kroz ćelijsku membranu i tom prilikom dolazi do ireverzibilnog vezivanja za aktivirane forme kaspaza. Intenzitet zelene fluorescence direktno odražava aktivnost kaspaza unutar ćelije.

Nakon isteka tretmana, supernatanti su sakupljeni u tubice, ćelije (B16F1, B16F10 i 4T1) su zatim oprane sa PBS-om i tripsinizovane. U bunariće je dodat medijum sa 10% FBS-a i ovakva suspenzija ćelija je pridružena prethodno sakupljenim supernatantima. Ćelije su dalje centrifugirane na 750 g 3 minuta, talozi su resuspendovani i isprani u PBS-u, potom centrifugirani (750 g 3 minuta), a na taloge ćelija dodavano je 100  $\mu\text{L}$  rastvora ApoStat (1  $\mu\text{L}$  u 5% FBS u PBS-u). Posle 30 minuta inkubacije na 37 °C, ćelije su isprane PBS-om da bi se uklonili ostaci boje. Talog ćelija je resuspendovan u 1 mL PBS-a i intenzitet zelene fluorescence je očitana na FL1 kanalu protočnog citofluorimetra (CyFlow<sup>®</sup> Space Partec, Minster, Nemačka), a dobijeni rezultati su analizirani korišćenjem softverskih programa PartecFloMax<sup>®</sup> i Cyflogic.

### 3.7.6.4. Detekcija autofagije

Za detekciju autofagije korišćena je AO boja koja se sa visokim afinitetom vezuje za acidofilne strukture u citoplazmi ćelija – autofagozome koji predstavljaju karakteristične markere autofagije. AO po ulasku u autofagozome i pri niskom pH emituje crvenu fluorescenciju čiji je intenzitet direktno proporcijalan broju autofagozoma.

Nakon isteka tretmana, supernatanti su sakupljeni u tubice, ćelije su zatim oprane sa PBS-om i tripsinizovane. U bunariće je dodat medijum sa 10% FBS-a i ovakva suspenzija ćelija je pridružena prethodno sakupljenim supernatantima. Ćelije su dalje centrifugirane na 750 g 3 minuta, a talozi resuspendovani, ispirani u PBS-u i ponovo centrifugirani (750 g 3 minuta). Na taloge ćelija je dodato 500  $\mu\text{L}$  rastvora 10  $\mu\text{M}$  AO boje u PBS-u i inkubirano u trajanju od 15 minuta na 37 °C. Konačno, ćelije su dva puta oprane PBS-om radi uklanjanja viška boje. Talog ćelija je resuspendovan u 1 mL PBS-a i intenzitet crvene fluorescence je očitana na FL3 kanalu protočnog citofluorimetra (CyFlow<sup>®</sup> Space Partec, Minster, Nemačka). Analiza rezultata je vršena korišćenjem softverskih programa PartecFloMax<sup>®</sup> i Cyflogic.

### 3.7.6.5. Detekcija aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze

Kako bi se detektovala senescencija B16F1 ćelija korišćen je fluorescein-di- $\beta$ -D-galaktopiranozid (FDG). Aktivnost enzima beta-galaktozidaze povezane sa senescencijom, omogućava identifikaciju i kvantifikaciju senescentnih ćelija u kulturi. Lizosomalna forma  $\beta$ -D-galaktozidaze je hidrolaza koja uklanja terminalnu  $\beta$ -galaktozu gangliozida i ostalih glikokonjugata [282,283]. Fluorogeni supstrat enzima  $\beta$ -galaktozidaze je FDG koji se hidrolizom konvertuje najpre u fluorescein monogalaktozid (FMG), a potom i u fluorescein koji emituje zelenu fluorescenciju nakon ekscitacije.

Po završetku tretmana, supernatanti su uklonjeni, ćelije su zatim oprane PBS-om i tripsinizovane. U bunariće je dodat medijum sa 10% FBS-a i ovakva suspenzija ćelija centrifugirana na 750 g 3 minuta. Talozi su resuspendovani u medijumu, jednaka zapremina ćelija (50  $\mu\text{L}$ ) je mešana sa istom

zapreminom 2 mM rastvora FDG (50  $\mu$ L) u sterilnoj dejonizovanoj vodi i inkubirana 1 minut na 37 °C. Dejonizovana voda permeabilizuje ćelije, olakšavajući ulazak FDG. Inkubacija je prekinuta dodavanjem 900  $\mu$ L ledeno hladnog medijuma. Uzorci su držani na ledu ne duže od 30 minuta pre merenja, kako bi se smanjio izlazak fluoresceina iz ćelija. Očitavanjem na FL1 kanalu protočnog citofluorimetra (CyFlow® Space Partec, Minster, Nemačka) registrovan je intenzitet zelene fluorescence. Analiza je urađena korišćenjem softverskih programa PartecFloMax® i Cyflogic.

### 3.7.6.6. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota

U cilju detektovanja produkovanih reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, ROS/RNS) u ćelijama melanoma (B16F1 i B16F10) i ćelijama tumora dojke (4T1) nakon izlaganja tretmanu etanolnim ekstraktom *A. vulgaris*, korišćena je DHR 123 boja. Radi se o nefluorescentnoj boji koja pasivno prolazi ćelijsku membranu, ulazi u ćelije i nakon interakcije sa ROS/RNS, konvertuje se u fluorescentni rodamin 123. Ovim je omogućeno merenje ukupne produkcije ROS/RNS u ćelijama u toku čitavog trajanja tretmana etanolnim ekstraktom *A. vulgaris*.

Ćelije su pre sadnje inkubirane na 37 °C u inkubatoru u 1  $\mu$ M rastvoru DHR 123 u medijumu. Nakon 20 minuta, ćelije su posađene i tretirane etanolnim ekstraktom *A. vulgaris*. Po isteku inkubacije, odliveni su supernatanti, ćelije su oprane PBS-om a zatim tripsinizovane. Reakcija tripsinizacije je gašena dodavanjem medijuma sa 10% FBS-a i suspenzija ćelija je centrifugirana na 750 g 3 minuta. Potom je sledilo je još jedno pranje PBS-om i intenzitet zelene fluorescence je detektovan i analiziran korišćenjem protočnog citofluorimetra (CyFlow® Space Partec, Minster, Nemačka) i softverskih programa PartecFloMax® i Cyflogic.

### 3.7.7. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima prethodno liziranih ćelija upotrebljena je metoda po Loriju. Osnova ove metode leži u reakciji bakra  $\text{Cu}^{2+}$  sa peptidnim vezama proteina u alkalnom okruženju, kao i u interakciji Folin-Ciocalteu reagensa sa bočnim ostacima aminokiselina tirozina i triptofana iz ispitivanog uzorka [284]. B16F1, B16F10 i 4T1 ćelije su tretirane etanolnim ekstraktom *A. vulgaris*, nakon čega su ćelije lizirane korišćenjem rastvora za liziranje ćelija u koji su neposredno pre korišćenja dodavani inhibitori proteaza. Svaki uzorak liziranih ćelija razblažen je 10 puta destilovanom vodom (do finalne zapremine 20  $\mu$ L). Razblaženi uzorci su zatim mešani sa 300  $\mu$ L rastvora tri jedinjenja (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH, 1%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  i 2% K-Na-tartarat u  $\text{dH}_2\text{O}$ ) u odnosu 98:1:1. Uzorci su inkubirani 15 minuta na RT, nakon čega je svim uzorcima dodavano po 60  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi i inkubacija je vršena 30 minuta na RT do razvijanja plave boje. Korišćenjem automatskog čitača za mikrotitarske ploče izmerena je apsorbancija uzoraka na 670 nm. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima vršeno je na osnovu standardne krive koja je dobijena merenjem apsorbancije rastvora poznatih koncentracija BSA.

### 3.7.8. Imunoblot

Najčešće korišćena metoda za kvantifikaciju i detekciju proteina u ćeliji je imunoblot metoda. U ovom radu ispitivana je ekspresija sledećih proteina: p-Akt, Akt, p-ERK1/2, ERK1/2, p-p70S6K, p70S6K, Bcl-2, BAX, beclin-1, SQSTM1/P62, LC3B, integrin  $\beta$ -1, FAK, vinkulin,  $\alpha$ -SMA i  $\beta$ -aktina (Tabela 1).

B16F1, B16F10 i 4T1 ćelije su tretirane etanolnim ekstraktom *A. vulgaris* ( $\text{IC}_{50}$  koncentracija). Tretman je prekidano u precizno određenim vremenskim intervalima (6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h, i 72 h) odstranjivanjem supernatanta. Zatim su bunarići prani ledeno hladnim rastvorom PBS-a.

Potom je u bunariće dodat ledeno hladan rastvor za liziranje ćelija (62,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol i 50 mM DTT u dH<sub>2</sub>O) u koji su neposredno pre korišćenja dodavani inhibitori proteaza (10 µg/mL aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF). Ćelijski lizati su denaturisani 5 minuta u ključaloj vodi, nakon čega je izvršena sonifikacija. Zatim su uzorci centrifugirani 20 minuta na 20 000 g na 4 °C. Po završenom centrifugiranju, jasno se odvaja supernatant od niti DNK. Supernatanti (sa rastvorenim proteinima) su prebačeni u nove, čiste tubice i čuvani na -20 °C do korišćenja. Pre nalivanja na gel, 30 µg proteina je mešano sa denaturišućim puferom za nalivanje uzoraka prema Lemliju i uzorci su denaturisani 5 minuta u ključaloj vodi. Potom su uzorci naliveni i razdvojeni elektroforezom na SDS–poliakrilamidnom gelu (10 do 12%). Nakon završene elektroforeze usledio je transfer proteina sa gela na polivinil-difluoridnu membranu (PVDF) (EMD Millipore, Bilerika, SAD) upotrebom polusuvog Fastblot B43 sistema za transfer (Biometra, Getingen, Nemačka), sa strujom od 5 mA/cm<sup>2</sup> gela. Inkubiranjem membrana u 5% BSA u PBSTw na RT u trajanju od 1 h, sprečeno je nespecifično vezivanje antitela. Potom su membrane inkubirane preko noći na 4 °C sa primarnim antitelima specifičnim za proteine prikazane u tabeli 1. Nakon završene inkubacije, membrane su oprane pet puta po 5 minuta u PBSTw. Nakon toga, ćelije su inkubirane sa sekundarnim antitelima (Tabela 1) u trajanju od 1 sata na RT. Antitela su razblaživana do finalne koncentracije u 1% BSA/PBSTw. Membrane su ponovo ispirane pet puta po 5 minuta u PBSTw kako bi se isprao višak nevezanog antitela. Zatim je usledila detekcija korišćenjem ECL sistema hemiluminescencije (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija). Trake su detektovane pomoću iBright™ FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD). Upotrebom iBright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD) denzitometrijski je izmerena količina proteina koja je potom izražena u odnosu na količinu totalnih, nefosforilisanih formi proteina ili na količinu β-aktina i rezultati su predstavljeni grafički.

### 3.7.9. Klonogeni esej

Test formiranja kolonija (klonogeni esej) je metoda koja se koristi za procenu preživljavanja i sposobnosti adherentnih ćelija da formiraju kolonije nakon primenjenog tretmana *in vitro*.

U ovoj studiji evaluirana je sposobnost 4T1 ćelija da formiraju kolonije nakon tretmana etanolnim ekstraktom *A. vulgaris*. 4T1 ćelije su posađene u 75 cm<sup>3</sup> flaskove i po dostizanju konfluentnosti od oko 70%, tretirane subtoksičnom IC<sub>25</sub> koncentracijom etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h. Po završetku inkubacije, supernatanti su odlivani iz flaskova, ćelije su oprane PBS-om i tripsinizovane. Zatim je usledilo brojanje ćelija i sadnja u ploče sa 6 bunarića predviđene za gajenje adherentnih kultura u maloj gustini od svega  $1 \times 10^3$  ćelija po bunariću. Ćelije su ostavljane da rastu i formiraju kolonije na 37 °C u trajanju od 7 dana, uz promenu medijuma na polovini vremena inkubacije. Po isteku inkubacije, medijum je uklonjen, kolonije su oprane PBS-om, a zatim fiksirane korišćenjem 4% PFA u trajanju od 30 minuta na RT. Zatim je usledilo bojenje kolonija 0,02% rastvorom CV na RT tokom 20 minuta. Višak boje je uklonjen ispiranjem bunarića PBS-om nakon čega su kolonije su posmatrane i digitalno fotografisane korišćenjem Nikon stereomikroskopa (SMZ800N, Nikon Instruments Inc., Melvil, SAD) na uveličanju od 4 ×. Kolonije su potom kvantifikovane upotrebom softverskog programa za analizu slika ImageJ. Kako bi se izračunala efikasnosti sađenja (engl. *Plating Efficiency*, PEF) i frakcija preživljavanja (engl. *Surviving Fraction*, SF) srednja vrednost broja kolonija dobijena iz tri bunara je uzeta kao osnova. Mera broja kolonija nastalih od pojedinačnih ćelija (PEF) je računata kao broj prebrojanih kolonija / broj posađenih ćelija × 100, dok je SF izračunata kao PEF tretiranih ćelija / PEF kontrolnih ćelija × 100. Rezultati su grafički prikazani u procentima.

### 3.7.10. Esej za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija *in vitro*

Ćelijska adhezija se definiše kao vezivanje ćelije za ECM, druge ćelije ili specifičnu površinu koja je ključna za rast, preživljavanje, međućelijsku komunikaciju kao i komunikaciju sa ćelijama u njihovim okruženjem. Jedan od načina za procenu metastatskog potencijala tumorskih ćelija je ispitivanje njihove adhezivnosti.

U ovoj studiji je vršena procena uticaja tretmana etanolnim ekstraktom *A. vulgaris* na adhezivnost 4T1 ćelija za plastiku ali i za *in vitro* model ekstraćelijskog matriksa – Matrigel®. Zbog toga što poseduje svojstva slična ECM u mnogim tkivima, Matrigel® je koristan supstrat za uzgoj ćelija [285]. 4T1 ćelije su posađene u 75 cm<sup>3</sup> flaskove i tretirane subtoksičnom IC<sub>25</sub> koncentracijom etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 72 h. Nakon završetku inkubacije, supernatanti su odliveni, ćelije su oprane PBS-om, tripsinizovane i sakupljene u tubice. Ćelije su ostavljane u suspenziji 30 minuta na RT kako bi došlo do rekonstrukcije ćelijskih membrana. Za evaluaciju adhezivnosti ćelija za ECM, sterilne ploče sa 96 ravni bunarića su obložene sa 50 mL po bunariću Matrigel®-a u koncentraciji 20 µg/mL i ostavljane na 4 °C preko noći kako bi gel polimerisao. Pre postavljanja ćelija, bunarići prekriveni gelom su 3 puta isprani rastvorom PBS-a. 4T1 ćelije su zatim posađene u gustini  $3 \times 10^4$  ćelija po bunaru. Ćelijama je zatim omogućeno da adheriraju za ECM i plastiku u trajanju od 1 h na 37 °C u inkubatoru. Nevezane ćelije su uklonjene ispiranjem PBS-om, a broj adheriranih ćelija određen je SRB testom. Ćelijska adhezija je određena merenjem apsorbance na 540 nm sa korekcijom na 670 nm pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006, LKB, Beč, Austrija).

### 3.7.11. Test zarastanja rana

Često primenjivana metoda za proučavanje pokretljivosti ćelija *in vitro* je test zarastanja rana, (engl. *Wound healing test*).

Korišćenjem ovog testa ispitan je efekat tretmana etanolnim ekstraktom *A. vulgaris* na pokretljivost 4T1 ćelija *in vitro*. 4T1 ćelije su gajene do oko 80% konfluentnosti u pločama koje su predviđene za uzgajanje adherentnih kultura sa 6 bunara. Po dostizanju odgovarajuće gustine formirana je „rana“ povlačenjem ravne linije vrhom sterilnog nastavka za pipete od 200 µL. Ploče su potom isprane nekoliko puta PBS-om kako bi se uklonile ostećene i plivajuće ćelije. Ćelije su potom tretirane subtoksičnom IC<sub>25</sub> koncentracijom etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 48 h na 37 °C. Po završetku inkubacije, ćelije su isprane PBS-om, a potom fiksirane 4% PFA u trajanju od 10 minuta na RT. Ćelije su zatim obojene 0,02% rastvorom CV tokom 5 minuta na RT. Usledilo je posmatranje i fotografisanje rane korišćenjem Nikon stereomikroskopa (SMZ800N, Nikon Instruments Inc., Melvil, SAD) pri uveličanju od 6 ×.

### 3.7.12. Eseji za kvantifikovanje migracije i invazije ćelija *in vitro*

Sposobnost ćelija da migriraju, odnosno da se kreću ka izvoru hemijskog ili fizičkog stimulusa ali i da tom prilikom enzimatski razgrade proteine ECM ili bazalne membrane (invazija), može se smatrati njihovim metastatskim svojstvom [286].

Za merenje migracionog i invazionog potencijala 4T1 ćelija *in vitro* korišćeni su transmigracioni i invazioni eseji. Upotrebljene su komorice sa dnom u vidu membrane čiji je prečnik 6,4 mm i dijametar pora 8 µm, koje su postavljane u sterilne ploče sa 24 bunarića ravnog dna. Za potrebe invazionog eseja korišćen je *in vitro* model ECM – Matrigel®. Gornja površina membrane je oblagana sa 20 µL Matrigel®-a u koncentraciji od 500 µg/mL u PBS-u, i komorice su ostavljane na 4 °C preko noći kako bi gel polimerisao. Pre sadnje, komorice obložene Matrigel®-om su isprane 2 puta PBS-om. U slučaju migracionog eseja membrana komorica je bila neobložena. 4T1 ćelije su



sađene u 75 cm<sup>3</sup> flaskove i tretirane subtoksičnom IC<sub>25</sub> koncentracijom etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*. Nakon 72 h tretmana, supernatanti su odliveni, ćelije su oprane PBS-om i tripsinizovane. Ćelije su izbrojane i zasađene u gustini od  $7 \times 10^4$  ćelija u 200 μL medijuma sa 0,1% BSA u gornji deo komorice. U bunariće ploča sipan je medijum sa 10% FBS-a koji je poslužio kao hemoatraktant za 4T1 ćelije i inkubacija na 37 °C je trajala 3 h za evaluaciju invazivnosti i migratornosti 4T1 ćelija. Po isteku inkubacije, ćelije koje nisu prošle kroz pore membrane ili sloj ECM, uklonjene su pamučnom vatom, dok su ćelije koje su invadirale ili migrirale fiksirane korišćenjem 4% PFA. Nakon završene fiksacije (10 minuta) usledilo je bojenje upotrebom 0,02% rastvora CV-a tokom 15 minuta na RT. Ćelije su potom oprane PBS-om i osušene na vazduhu. Naposletku su membrane isečene iz komorica i postavljane na mikroskopske pločice. Ćelije su posmatrane i digitalno fotografisane korišćenjem aparata za analizu ćelija (ZOE Fluorescent Cell Imager, Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD). Svaki eksperiment je urađen u triplikatu i prikazan je prosečan broj ćelija iz pet proizvoljno odabranih polja po membrani.

### 3.7.13. Indukcija solidnog melanoma (B16F1 i B16F10) i tretman životinja

B16F1 ćelije ( $1,8 \times 10^5$  u 100 μL PBS-a) ili B16F10 ćelije ( $2 \times 10^5$  u 100 μL PBS-a) ubrizgane su potkožno u desni dorzalni lumbosakralni region ženki C57BL/6 soja miševa. Kada su tumori postali palpabilni, 7 dana po indukciji bolesti, u slučaju B16F1, odnosno 9 dana u modelu bolesti indukovane B16F10 ćelijama, životinje su nasumično raspoređene u 2 grupe od po 10 životinja (kontrola i tretman) i tretman je otpočet. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* je aplikovan intraperitonealno (*i.p.*) tokom 5 dana sa dva dana pauze između u dozi 50 mg/kg u 4% DMSO-PBS, dok je kontrolna grupa životinja primala rastvarač ispitivane supstance (4% DMSO-PBS) u istom eksperimentalnom režimu kao i tretirana grupa. Rast tumora je svakodnevno praćen, a životinje su žrtvovane 22 dana nakon indukcije bolesti. Tumori su precizno izvađeni i isprani PBS-om. Veličina tumora je merena korišćenjem kalipera u tri dimenzije (širina, visina i dubina). Zapremina tumora (mm<sup>3</sup>) je računata po formuli:  $a \times b^2 \times 0,52$  ( $a$  je najduži, a  $b$  najkraći izmereni dijametar). Takođe, tokom čitavog trajanja eksperimenta svakodnevno je kontrolisano opšte stanje i dobrobit životinja.

### 3.7.14. Indukcija solidnog tumora dojke (4T1) i tretman životinja

Tumor mlečne žlezde je indukovano inokulacijom  $2 \times 10^4$  4T1 ćelija u 50 μL PBS-a u četvrto desno masno jastuče dojke ženki BALB/C soja miševa. Po pojavi tumora (5 dana nakon inokulacije), životinje su nasumično raspoređene u 2 grupe (10 životinja po grupi) i počeo je tretman intraperitonealnom injekcijom (*i.p.*). Tretirana grupa je primala etanolni ekstrakt *A. vulgaris i.p.* tokom 5 dana, sa dva dana pauze između, u dozi 50 mg/kg u 4% DMSO-PBS. Kontrolna grupa je primala rastvarač ispitivane supstance (4% DMSO-PBS) u istom režimu. Svakodnevno je vršeno praćenje rasta tumora, a 23 dana nakon indukcije bolesti životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Konačno, tumori prikupljeni iz obe grupe su isprani PBS-om, a veličina tumora je merena u tri dimenzije (širina, visina i dubina) pomoću elektronskog kalipera. Korišćenjem formule:  $a \times b^2 \times 0,52$  ( $a$  je najduži, a  $b$  najkraći izmereni dijametar) izračunata je zapremina tumora (mm<sup>3</sup>). Opšte zdravstveno stanje i dobrobit životinja su strogo kontrolisani tokom čitavog trajanja eksperimenta.

### 3.7.15. Određivanje parametara toksičnosti u urinu korišćenjem semikvantitativne metode

Kontrolnim i tretiranim životinjama su uzimani uzorci urina u tri vremenske tačke (pre početka tretmana, na sredini eksperimenta i na dan žrtvovanja) i biohemijska i hematološka analiza urina izvršena je korišćenjem Uriscan<sup>®</sup> traka (YD Diagnostics CORP., Gjongi-do, Republika Koreja).

### 3.7.16. Histologija

#### 3.7.16.1. Histochemija (Hematoksin-eozin bojenje)

Hematoksin-eozin (H&E) je najčešće upotrebljavano bojenje za histopatološku analizu tkiva. Ove dve boje zbog svoje različite hemijske prirode markiraju različite kompartmane unutar ćelija. Pa tako hematoksin (bazna, katjonska boja) boji nukleuse ćelija plavo/ljubičasto, dok eozin (kisela, anjonska boja) boji citoplazmu ćelije i vanćelijski matriks u roze/crveno [287].

Na kraju *in vivo* eksperimenata, životinje su žrtvovane a tumori, jetre i bubrezi su hirurški izolovani (n=5 po grupi). Organi su ispirani PBS-om i fiksirani u 10% puferisanom formalinu neutralnog pH tokom 24 h. Fiksirana kiva su potom presečena kroz najveću ravan i dodatno fiksirana 24 h. Dalje su obrađena u automatskom procesoru za tkiva (Milestone SRL LOGOS ONE, Sorisol, Italija). Sledilo je kalupljenje u parafinske blokove korišćenjem radne stanice za kalupljenje (SAKURA Tissue-Tek TEC 5, Sakura Finetek, Kalifornija, SAD). Preseci debljine 4 µm su dobijeni su pomoću mikrotoma LEICA RM 2245 (Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka). Zatim su preseci postavljani na mikroskopske pločice, a bojenje sa H&E je urađeno pomoću aparata za automatsko bojenje tkiva (MYREVA SS-30H, Especialidades Médicas MYR, S.L., Taragona, Španija). Za histopatološku analizu uzoraka korišćen je mikroskop (Olympus BX43, OLYMPUS EUROPA HOLDING GMBH, Hamburg, Nemačka), kao i skener pločica (Leica Aperio AT2, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka). Morfometrijska analiza skeniranih pločica je rađena korišćenjem softvera Leica AperioImageScope (version 12.4.6, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka) i FIJI-ImageJ (Nacionalni institut za zdravlje, SAD).

#### 3.7.16.2. Imunofluorescenca

Parafinski preseci tkiva su pred početak bojenja deparafinizovani, a zatim je izvršena je rehidratacije tkiva i demaskiranje antigena u citratnom puferu. Potom je izvršeno blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja antitela u 5% BSA/PBS na RT tokom 30 minuta. Preseci tkiva su inkubirani sa primarnim PCNA antitelom u razblaženju 1:100 u PBS-u na 4 °C u vlažnoj komori preko noći, nakon čega su više puta isprani PBS-om. Inkubacija u prisustvu sekundarnog antitela obeleženom fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltam, SAD) u razblaženju 1:400 je obavljena na RT tokom 2 h. Po završetku bojenja, pločice su ispirane PBS-om i izvršeno je kontrastno bojenje korišćenjem PI u finalnoj koncentraciji 1 mg/mL tokom 5 minuta. Pre montiranja pokrovnih stakala na pločice nanošen je fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, SAD) i iste su analizirane i fotografisane na konfokalnom mikroskopu (SP5, Leica Microsystems, Vetzlar, Nemačka).

#### 3.7.17. Priprema jednoćelijskih suspenzija slezina i tumora za protočnu citofluorimetriju

Jednoćelijske suspenzije slezine su dobijene mehaničkim protiskivanjem tkiva kroz najlonske mrežice sa porama 40 µm (engl. *nylon cell strainer*) (BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija, SAD) u medijumu za gajenje (5 mL 5% FBS/RPMI). Suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 1500 rpm. Ćelije u talogu su resuspendovane u puferu za lizu (0,1 mM EDTA, 12 mM NaHCO<sub>3</sub> i 155 mM NH<sub>4</sub>Cl u dH<sub>2</sub>O) (BD Pharmingen, San Dijego, SAD) kako bi eritrociti iz suspenzije bili uklonjeni. Posle 5 minuta inkubacije na ledu, liziranje je zaustavljano dodavanjem 5 mL 5% FBS/RPMI i uzorci su centrifugirani 5 minuta na 1500 rpm. Nakon tri pranja u PBS-u, ćelije su resuspendovane u medijumu za gajenje i profiltrirane kroz najlonske mrežice sa porama 40 µm i dodatno centrifugirane na već opisan način. Finalno, supernatanti su odlivani a talozi resuspendovani u 1 mL medijuma za gajenje. Splenociti su zatim brojani u razblaženju 1:10.

Jednoćelijske suspenzije tumora dobijene su enzimskom digestijom kao što je prethodno opisano [288]. Tumori su najpre mehanički iseckani makazicama i oprani u Petri šolji 2-3 puta u PBS-u. Zatim je vršena enzimska digestija tkiva u puferu sačinjenom od RPMI medijuma sa 1 mg/mL kolagenaze I, 1 mM EDTA, 2% FBS u trajanju od 1 h na 37 °C uz neprekidno mešanje. Uzorci su dalje centrifugirani 5 minuta na 1500 rpm, supernatanti su odlivani a talozima je dodato 5 mL 0,25% tripsina i digestija je trajala dodatnih 3 minuta. Reakcija je prekidana dodavanjem 5% FBS/RPMI i uzorci su centrifugirani 5 minuta na 1500 rpm. Supernatanti su odlivani, a talozima je dodat rastvor DNaze I (10 µg/mL) u trajanju od 1 minuta na 37 °C. Nakon završene inkubacije dodavano je 5 mL medijuma za gajenje i uzorci su centrifugirani 5 minuta na 1500 rpm. Supernatanti su odlivani, a talozi resuspendovani u 5 mL medijuma za gajenje i ćelije su zatim filtrirane kroz 40 µm najlonske mrežice. Posle dodatnog ciklusa centrifugiranja od 5 minuta na 1500 rpm, supernatant je odstranjen, a precipitat je resuspendovan u 1 mL medijuma za gajenje. Ćelije su zatim brojane u razblaženju 1:10.

Jednoćelijske suspenzije ( $2 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  ćelija) su obeležene monoklonskim antitelima (Tabela 2) konjugovanim sa fluorohromom (Tabela 4) ili relevantnim antitelom koje je služilo kao negativna kontrola i analizirane protočnom citofluorimetrijom (FACSCalibur, BD Bioscience, Bedford, SAD) korišćenjem softvera CELLQUEST (BD Bioscience, Bedford, SAD). Rezultati su analizirani pomoću programa FlowJo (verzija softvera: 10.0.7r2).

**Tabela 4.** Fluorohrome konjugovane sa monoklonskim antitelima korišćenim u protočnoj citofluorimetriji

Fluorohroma	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
PerCP	482	678
FITC	495	519
PE	566	574
APC	651	660

$\lambda_{ex}$  – talasna dužina maksimuma ekscitacije;  $\lambda_{em}$  – talasna dužina maksimuma emisije

Za unutarćelijska bojenja, ćelije su stimulisane sa PMA (50 ng/mL), jonomicinom (500 ng/mL) i Goldži stopom tokom 4 h, na 5% CO<sub>2</sub>, i zatim obojene antitelima specifičnim za CD4 ili CD8 obeleženim fluorescentnim bojama, a potom su fiksirane i permeabilizovane korišćenjem reagensa za fiksaciju i permealizaciju ćelija (cytofix/cytoperm, BD Bioscience, Bedford, SAD) i dodatno obojene antitelima za CD107a, perforin, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  i FoxP3 obeleženim fluorescentnim bojama.

### 3.7.18. Statistička obrada podataka

Rezultati *in vitro* eksperimenata su prikazani kao srednja vrednost (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD) triplikata kultura reprezentativnog od tri zasebno ponovljena eksperimenta. Procena statističke značajnosti izvršena je pomoću analize varijanse (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA), praćene Student *t*-testom ili alternativno Tukey HSD post hoc testom, a *p* vrednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim. U slučaju *in vivo* eksperimenata, procena statističke značajnosti izvršena je korišćenjem neparametarskog Mann-Whitney U testa, a *p* vrednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim. Obzirom da veličina tumora pojedinačnih životinja unutar grupe može značajno varirati, broj eksperimentalnih životinja neophodan za validnu statističku analizu po grupi je bio 10.



## **4. Rezultati**



#### 4.1. Fitohemijaska karakterizacija etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*

Kako se radi o taksonu shvaćenom kao „*sensu latiore*“, što podrazumeva prisustvo više međusobno hibridizujućih mikrovrsta sa nejasnim taksonomskim statusom, i kako hemijski sastav biljnih sirovina veoma varira u zavisnosti od populacije, uslova staništa i klimatskih faktora, detaljno je analiziran hemijski sastav etanolnog ekstrakta koji je bio korišćen u našim istraživanjima. Hemijski sastav etanolnog ekstrakta određen je metodom UHPLC-HRMS.

Ukupan sadržaj fenola, flavonoida i derivata dihidroksicimetne kiseline u ekstraktu *A. vulgaris* prikazan je u tabeli 5.

**Tabela 5.** Totalni fenoli, flavonoidi i derivati dihidroksicimetne kiseline u etanolnom ekstraktu *A. vulgaris*

TPC mg/g GAE	TFC mg/g QE	HCA mg/g CGAE
7,55 ± 0,43	6,99 ± 0,14	14,18 ± 0,28

Rezultati su prikazani kao SV±SD

Detaljan kvalitativni sastav ekstrakta *A. vulgaris* prikazan je u tabeli 6.

**Tabela 6.** Jedinjenja identifikovana u ekstraktu *A. vulgaris* pomoću UHPLC–HRMS analize

Redni broj	Retenciono vreme (min)	Jedinjenje	Jon	Jon prekursor ( <i>m/z</i> )	δ ppm	Molekulska formula	Jon produkt ( <i>m/z</i> )
1	1.68	Galna kiselina	[M–H] <sup>–</sup>	169.01331	1.66	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	169, <b>125*</b>
2	6.59	<i>p</i> -Kumaroil-heksoza 1	[M–H] <sup>–</sup>	325.09314	4.14	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	325, 163, <b>145</b> , 119, 117
3	6.69	Hlorogena kiselina	[M–H] <sup>–</sup>	353.08835	4.64	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	<b>191</b> , 173, 179, 135
4	6.73	Galoiil-heksahidroksidifenil-heksoza	[M–H] <sup>–</sup>	633.07430	1.52	C <sub>27</sub> H <sub>21</sub> O <sub>18</sub>	633, 463, <b>301</b> , 275, 229
5	6.98	Brevifolin-karboksilna kiselina	[M–H] <sup>–</sup>	291.01489	4.64	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	291, <b>247</b> , 219, 191
6	7.08	<i>p</i> -Kumaroil-heksoza 2	[M–H] <sup>–</sup>	325.09314	4.54	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	325, 163, <b>145</b> , 119, 117
7	7.14	Kofeinska kiselina	[M–H] <sup>–</sup>	179.03413	1.39	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179, <b>135</b> , 91
8	8.06	Kvercetin-heksozid-glukuronid	[M–H] <sup>–</sup>	639.12152	1.93	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>18</sub>	639, 463, <b>301</b> , 151
9	8.62	Kvercetin-3- <i>O</i> -arabinozid-7- <i>O</i> -glukozid	[M–H] <sup>–</sup>	595.13129	1.40	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	595, 463, 462, 433, 301, <b>299</b> , 271
10	9.10	<i>p</i> -Kumaroil-hininska kiselina 1	[M–H] <sup>–</sup>	337.09344	4.90	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	337, <b>191</b> , 163, 145, 119
11	9.78	Siringinska kiselina	[M–H] <sup>–</sup>	197.04489	2.24	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	<b>197</b> , 169, 153, 125
12	9.93	Miricetin 3- <i>O</i> -heksozid (glukozid ili galaktozid)	[M–H] <sup>–</sup>	479.08360	1.82	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	<b>479</b> , 317, 316, 287, 271, 179, 165, 139
13	10.12	<i>p</i> -Kumarna kiselina	[M–H] <sup>–</sup>	163.03917	1.22	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163, 119
14	10.24	Brevifolin	[M–H] <sup>–</sup>	247.02469	3.94	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	<b>247</b> , 219, 191, 173
15	10.42	<i>p</i> -Kumaroil-hininska kiselina 2	[M–H] <sup>–</sup>	337.09335	4.63	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	337, <b>191</b> , 163, 119
16	10.43	Heksoza elaginske kiseline	[M–H] <sup>–</sup>	463.05243	3.70	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>13</sub>	463, <b>301</b> , 283, 229

17	10.46	Gosipetin-7- <i>O</i> -ramnozid-3- <i>O</i> -heksozid	[M-H] <sup>-</sup>	625.14417	5.03	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub>	625, <b>479</b> , 463, 317, 316, 315, 287, 271
18	10.63	Gosipetin-7- <i>O</i> -ramnozid-3- <i>O</i> -dezoksiheksozid 1	[M-H] <sup>-</sup>	595.13116	1.18	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	595, 463, 462, <b>449</b> , 317, 316, 315, 287, 271
19	10.65	Gosipetin-7- <i>O</i> -ramnozid-3- <i>O</i> -dezoksiheksozid 2	[M-H] <sup>-</sup>	595.13116	1.18	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	595, 463, 462, <b>449</b> , 317, 316, 315, 287, 271
20	12.59	Kvercetin-3- <i>O</i> -vicianozid (Kvercetin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinopiranozil-(1-6)- $\beta$ -D-glukopiranozid)	[M-H] <sup>-</sup>	595.12927	-1.99	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	595, 301, <b>300</b> , 271, 255, 179
21	12.86	Kvercetin-3- <i>O</i> -pentoizid-7- <i>O</i> -dezoksiheksozid	[M-H] <sup>-</sup>	579.13635	3.29	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>15</sub>	579, 447, 446, 433, 301, <b>299</b> , 271, 179, 151
22	12.96	Pentoza elaginske kiseline	[M-H] <sup>-</sup>	433.04150	3.12	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	433, <b>301</b> , 283, 229, 185
23	13.61	Elaginska kiselina	[M-H] <sup>-</sup>	300.99902	0.10	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	<b>301</b> , 283, 245, 229, 201, 185, 173, 145
24	13.82	Rutin (kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid)	[M-H] <sup>-</sup>	609.1473	1.96	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609, <b>300</b> , 271, 255, 179, 151
25	13.94	Hiperozid	[M-H] <sup>-</sup>	463.08862	3.28	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	463, <b>300</b> , 301, 271, 255, 179, 151
26	14.02	Mikvelijanin (Kvercetin-3- <i>O</i> -glukuronid)	[M-H] <sup>-</sup>	477.06735	2.07	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub>	477, <b>301</b> , 255, 179, 151
27	14.10	Agrimoniin	[M-2H] <sup>-2</sup>	934.0721	0.78	C <sub>82</sub> H <sub>54</sub> O <sub>52</sub>	1567, 1265, 1085, 935, 897, 783, 633, <b>301</b>
28	14.25	Kempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	[M-H] <sup>-</sup>	593.15198	3.17	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	593, <b>285</b>
29	14.28	Izokvercetin (Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid)	[M-H] <sup>-</sup>	463.08875	3.55	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	463, 301, <b>300</b> , 271, 255, 179, 151
30	14.44	Cinarozid (luteolin-7- <i>O</i> -glukozid)	[M-H] <sup>-</sup>	447.09378	3.56	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	447, <b>285</b> , 199
31	15.05	Guajaverin (Kvercetin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinopiranozid)	[M-H] <sup>-</sup>	433.07797	3.31	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	433, <b>300</b> , 301, 271, 255, 179, 151
32	15.44	Avikularin (Kvercetin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinofuranozid)	[M-H] <sup>-</sup>	433.07773	2.75	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	433, <b>300</b> , 301, 271, 255, 179, 151
33	16.16	Kempferol-3- <i>O</i> -glukuronid	[M-H] <sup>-</sup>	461.07315	3.68	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub>	461, <b>285</b> , 229
34	16.29	Astragalin (Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid)	[M-H] <sup>-</sup>	447.09375	3.49	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	<b>447</b> , 300, 285, 284, 255, 227
35	17.04	Kempferol-3- <i>O</i> -ksilozid	[M-H] <sup>-</sup>	417.08323	3.83	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	<b>417</b> , 285, 284, 255, 227
36	18.83	Kvercetin-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)- $\beta$ -D-glukopiranozid	[M-H] <sup>-</sup>	505.09930	3.24	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub>	505, 301, <b>300</b> , 271, 255, 179, 151
37	20.78	Heksozid triterpenske kiseline	[M+HCOO] <sup>-</sup>	711.39728	1.64	C <sub>37</sub> H <sub>59</sub> O <sub>13</sub>	<b>503</b>
38	21.09	Hrizoeriol-7- <i>O</i> -glukuronid	[M-H] <sup>-</sup>	475.08850	2.94	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	<b>299</b> , 284, 255
39	21.31	Kempferol-3- <i>O</i> -acetilglukozid	[M-H] <sup>-</sup>	489.10428	3.12	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	489, 284, <b>255</b> , 227
40	21.45	Kvercetin	[M-H] <sup>-</sup>	301.03546	3.95	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	<b>301</b> , 179, 151
41	23.21	Tilirozid (kempferol-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -p-kumaroil)- $\beta$ -D-glukopiranozid)	[M-H] <sup>-</sup>	593.13086	3.19	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	593, <b>285</b> , 255, 227
42	27.18	Heksozid triterpenske kiseline 1	[M+HCOO] <sup>-</sup>	695.40216	1.38	C <sub>37</sub> H <sub>59</sub> O <sub>12</sub>	<b>487</b>



43	27.78	Heksozid triterpenske kiseline 2	[M+HCOO] <sup>-</sup>	695.40216	1.38	C <sub>37</sub> H <sub>59</sub> O <sub>12</sub>	487
44	27.87	Heksozid triterpenske kiseline 3	[M+HCOO] <sup>-</sup>	695.40216	1.38	C <sub>37</sub> H <sub>59</sub> O <sub>12</sub>	487
45	29.83	Arjungenin	[M-H] <sup>-</sup>	503.33853	3.61	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>6</sub>	503, 441, 409

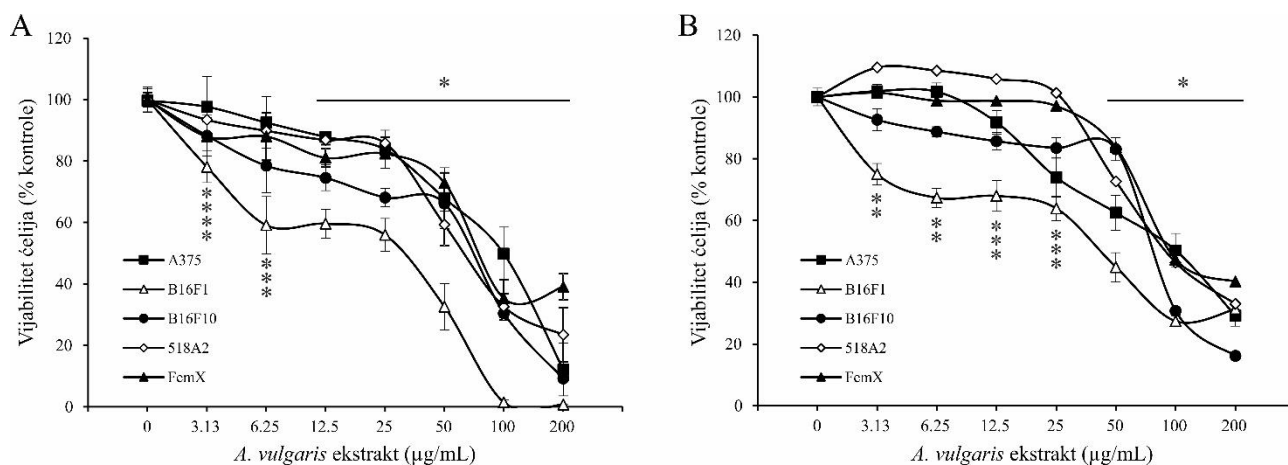
\* Osnovni pik

Ukupno 45 jedinjenja je okarakterisano na osnovu parametara hromatografske analize, kao i na osnovu poređenja sa podacima opisanim u literaturi i LC-MS bibliotekama. Identifikovana jedinjenja pripadaju različitim klasama metabolita, pretežno polifenolima.

## 4.2. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na vijabilitet ćelija melanoma i tumora dojke *in vitro*

### 4.2.1. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje vijabilitet različitih ćelijskih linija melanoma humanog i mišjeg porekla *in vitro*

Kako bi se ispitaio uticaja etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na vijabilitet različitih ćelijskih linija melanoma humanog i mišjeg porekla, ćelije su tretirane širokim opsegom koncentracija (3,13 – 200 µg/mL) etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*. Nakon isteka inkubacionog perioda od 72 h, upotrebom kolorimetrijskih testova MTT i SRB procenjen je vijabilitet ćelija. Kao što je prikazano na grafikonu 1, tretman ekstraktom *A. vulgaris* dovodi do smanjenja vijabiliteta svih ćelijskih linija melanoma na dozno zavistan način.



Grafikon 1. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje vijabilnost različitih ćelija melanoma *in vitro*. Vijabilitet ćelija melanoma tretiranih različitim koncentracijama ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h određen (A) MTT i (B) SRB testovima. Rezultati su izraženi kao procenat apsorbance kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100%. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. Statistički značajnim smatrane su *p* vrednosti manje od 0,05 u poređenju sa kontrolnim uzorkom (\*).

IC<sub>50</sub> vrednosti koje predstavljaju koncentracije ekstrakta *A. vulgaris* koje dovode do smanjenja vijabiliteta ćelija u kulturi za 50%, prikazane su u tabeli 7. Najveću osetljivost na tretman ekstraktom je pokazala ćelijska linija mišjeg melanoma B16F1, dok je osetljivost ostalih ćelija približno ista.

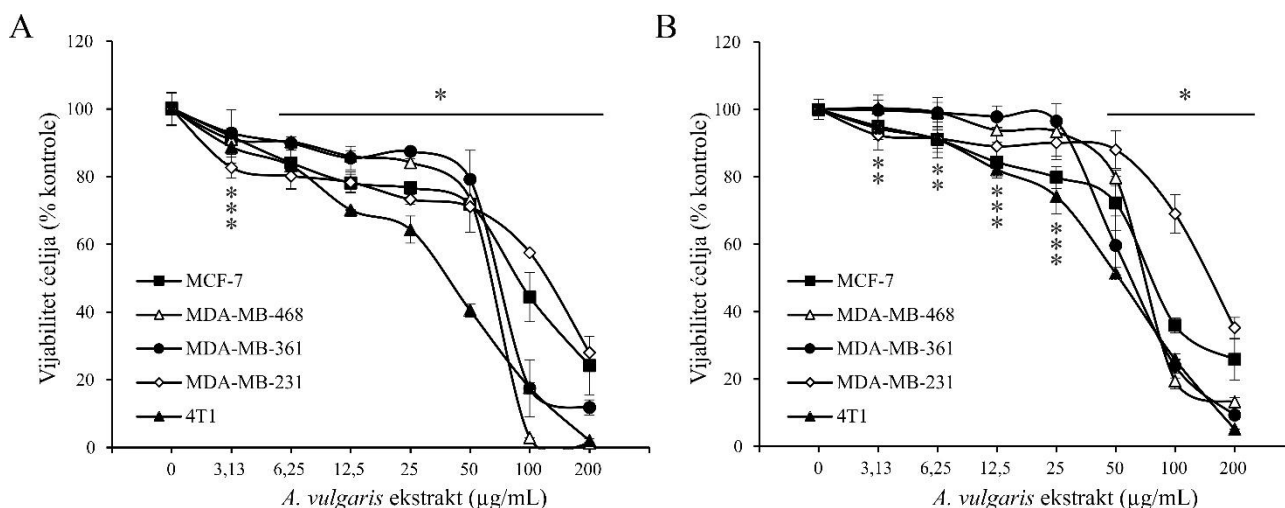
**Tabela 7.** IC<sub>50</sub> vrednosti ekstrakta *A. vulgaris* na ćelijskim linijama melanoma izračunate iz MTT i SRB testova nakon 72 h

	A375 μg/mL	518A2 μg/mL	FemX μg/mL	B16F1 μg/mL	B16F10 μg/mL
MTT	105,8 ± 8,7	62,75 ± 6,5	78,4 ± 5,20	34,3 ± 4,2	72,2 ± 2,7
SRB	106,4 ± 8,9	88,55 ± 6,29	90,3 ± 8,49	43,2 ± 0,1	80,9 ± 1,0

Rezultati su predstavljani kao SV ± SD tri nezavisno ponovljena eksperimenta

#### 4.2.2. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje vijabilitet različitih ćelijskih linija tumora dojke humanog i mišjeg porekla *in vitro*

U cilju ispitivanja uticaja etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na vijabilitet različitih ćelijskih linija tumora dojke humanog i mišjeg porekla, ćelije su izložene širokom opsegu koncentracija (3,13 – 200 μg/mL) ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 72 h. Nakon isteka inkubacionog perioda, vijabilitet ćelija je određivan upotrebom kolorimetrijskih testova MTT i SRB. Rezultati su pokazali da tretman ekstraktom *A. vulgaris* dovodi do smanjenja vijabiliteta svih ćelijskih linija tumora dojke (Grafikon 2) a IC<sub>50</sub> vrednosti su prikazane u tabeli 8.



**Grafikon 2.** *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje vijabilnost različitih ćelija tumora dojke *in vitro*. Vijabilitet ćelija tumora dojke tretiranih različitim koncentracijama ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h određen (A) MTT i (B) SRB testovima. Rezultati su izraženi kao procenat apsorbance kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100%. Rezultati su predstavljani kao SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. Statistički značajnim smatrane su *p* vrednosti manje od 0,05 u poređenju sa kontrolnim uzorkom (\*).

**Tabela 8.** IC<sub>50</sub> vrednosti ekstrakta *A. vulgaris* na ćelijskim linijama tumora dojke izračunate iz MTT i SRB testova nakon 72 h

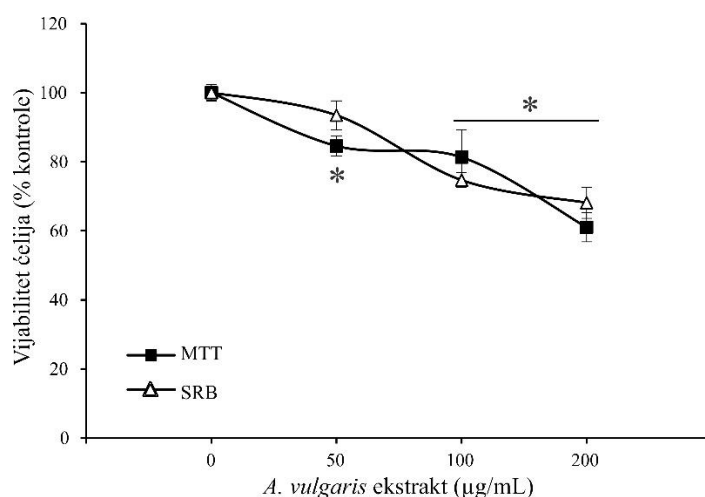
	MCF-7 μg/mL	MDA-MB-468 μg/mL	MDA-MB-361 μg/mL	MDA-MB-231 μg/mL	4T1 μg/mL
MTT	83,5 ± 8,9	65,6 ± 1,3	71,2 ± 1,9	122,2 ± 4,7	41,8 ± 3,3*
SRB	80,3 ± 0,4	71,9 ± 3,8	61,8 ± 2,3	160,4 ± 6,0	49,3 ± 3,0

Rezultati su predstavljani kao SV ± SD tri nezavisno ponovljena eksperimenta

Najveću senzitivnost na primenjeni tretman je pokazala ćelijska linija mišjeg karcinoma mlečne žlezde, dok su IC<sub>50</sub> vrednosti humanih hormon-zavisnih ćelija u istom opsegu. Najmanju osetljivost na tretman ekstraktom su pokazale humane trostruko negativne ćelije karcinoma dojke. Sumarno, dobijeni rezultati pokazuju izuzetan potencijal *A. vulgaris* ekstrakta da redukuje vijabilnost tumorskih ćelija različitog porekla i intracelularnih specifičnosti.

#### 4.2.3. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* pokazuje selektivnost prema malignom fenotipu *in vitro*

Obzirom da je ekstrakt *A. vulgaris* značajno smanjio vijabilitet različitih tumorskih ćelijskih linija, bilo je neophodno ispitati njegov uticaj na primarne ćelije *in vitro*. Kao model sistem primarne kulture, korišćene su ćelije peritonealnog eksudata miša. Ćelije su izložene visokim koncentracijama ekstrakta *A. vulgaris* (50, 100 i 200 µg/mL) tokom 72 h. Nakon isteka inkubacionog perioda, procena vijabiliteta je vršena MTT i SRB kolorimetrijskim testovima. Rezultati su pokazali da tretman ekstraktom *A. vulgaris* dovodi do blagog pada vijabiliteta ćelija ali bez dostizanja IC<sub>50</sub> vrednosti čak ni pri najvećoj koncentraciji što ukazuje na visoku selektivnost tretmana prema malignom fenotipu (Grafikon 3).



Grafikon 3. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje vijabilnost primarnih ćelija *in vitro* bez dostizanja IC<sub>50</sub> vrednosti. Vijabilnost ćelija peritonealnog eksudata miša tretiranih različitim koncentracijama ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h određen pomoću MTT i SRB testova. Rezultati su izraženi kao procenat apsorbance kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100% i predstavljeni su kao SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. Statistički značajnim smatrane su *p* vrednosti manje od 0,05 u poređenju sa kontrolnim uzorkom (\*).

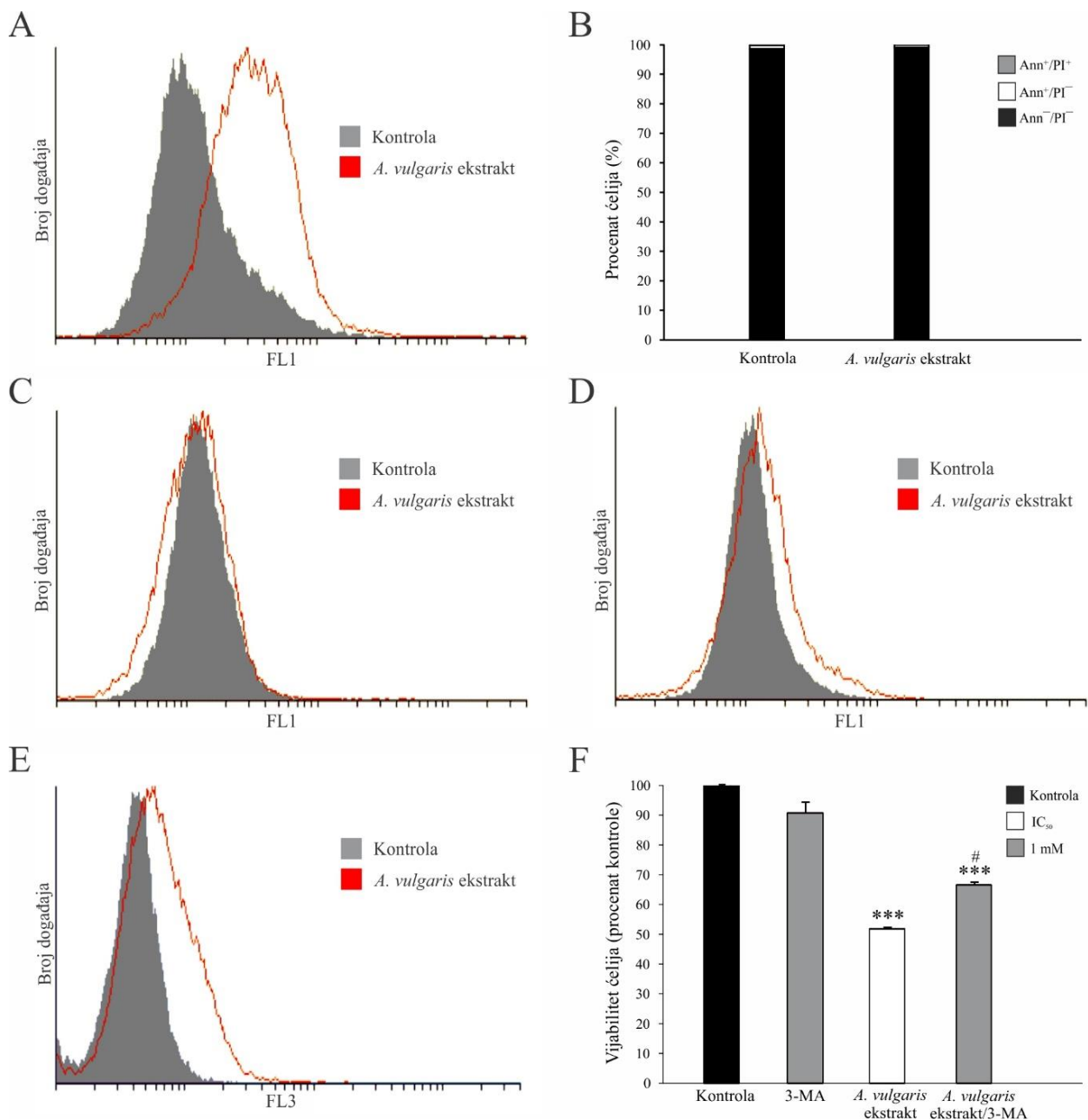
### 4.3. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na proliferaciju i vitalnost ćelija melanoma *in vitro*

#### 4.3.1. *A. vulgaris* ekstrakt ostvaruje svoj uticaj na B16F1 ćelije inhibicijom proliferacije, ubrzanim starenjem i indukcijom ćelijske smrti autofagijom

Kako bi se utvrdilo na koji način ekstrakt *A. vulgaris* dovodi do smanjenja broja B16F1 ćelija u kulturi, ćelije su nakon tretmana analizirane protočnom citofluorimetrijom. Uzimajući u obzir da smanjenje vijabiliteta ćelija može biti posledica citostatskog i/ili citocidnog efekta primenjenog tretmana, analizirano je prisustvo ćelijske smrti u kulturi ali i proliferativni potencijal B16F1 ćelija.

U svrhu analize proliferativnog potencijala, B16F1 ćelije su obojene CFSE bojom nakon čega su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 72 h. Rezultati su pokazali da tretman ekstraktom *A. vulgaris* snažno inhibira proliferaciju B16F1 ćelija (Slika 6 A). Sledeći korak podrazumevao je analizu prisustva programirane ćelijske smrti – apoptoze kao najčešćeg mehanizma putem kojeg se ostvaruje antitumorsko delovanje terapeutika. B16F1 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 72 h nakon čega su obojene Ann V-FITC/PI i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Tretman nije doveo do indukcije apoptoze, odnosno pojave rano-apoptotskih (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i kasno-apoptotskih/nekrotskih (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) u kulturi B16F1 ćelija (Slika 6 B). Paralelno se pristupilo analiziranju uloge kaspaza koje predstavljaju važne medijatore apoptoze ali mogu biti uključene i u druge ćelijske procese. Nisko invazivna ćelijska linija melanoma (B16F1) je tretirana IC<sub>50</sub> koncentracijom *A. vulgaris* ekstrakta tokom 72 h, da bi potom ćelije bile obojene apostatom (FITC-konjugovanim pan-kaspaznim inhibitorom) i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Kao što je prikazano na Slici 6 C, a saglasno sa prethodnim rezultatom, *A. vulgaris* ekstrakt nije uticao na aktivaciju kaspaza u kulturi B16F1 ćelija. Obzirom da je prilikom analize izgleda B16F1 ćelija u kulturi na nivou svetlosne mikroskopije nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* primećeno da tretman dovodi do pojave značajno većih ćelija sa krupnim jedrima koje morfološki podsećaju na senescentne ćelije, pristupilo se analizi prisustva senescencije protočnom citofluorimetrijom. B16F1 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h nakon čega su obojene korišćenje FDG-a koji omogućava detekciju prisustva enzima beta galaktozidaze, markera pomenutog procesa. Rezultati su pokazali da ekstrakt *A. vulgaris* dovodi do povećane aktivnosti pomenutog enzima, i spram toga senescencije umerenog intenziteta (Slika 6 D). Naredni korak bila je analiza prisustva autofagije u kulturi B16F1 ćelija ali i definisanje njene prirode, obzirom da se radi o procesu koji je u fiziološkim uslovima uključen u održavanje homeostaze ćelija i tkiva, a u patološkim može biti način umiranja ćelija. B16F1 ćelije su tretirane IC<sub>50</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h. Nakon isteka inkubacionog perioda, ćelije su obojene supravitalnoim bojom AO koja se u citoplazmi vezuje za autofagozome i lizosome. Kao što je prikazano na Slici 6 E, tretman je indukovao snažnu autofagiju u kulturi B16F1 ćelija. U cilju definisanja prirode detektovane autofagije ponovljen je tretman ekstraktom *A. vulgaris* (IC<sub>50</sub> koncentracija) u prisustvu inhibitora autofagije, 3-MA, tokom 72 h nakon čega je vijabilitet B16F1 ćelija procenjen SRB testom. Očekivano, sam tretman ekstraktom *A. vulgaris* smanjio je vijabilitet B16F1 ćelija u kulturi za 50%, dok je u prisustvu inhibitora autofagije 3-MA došlo do značajnog oporavka vijabiliteta za oko 20% (Slika 6 F), što potvrđuje njenu citodestruktivnu ulogu.

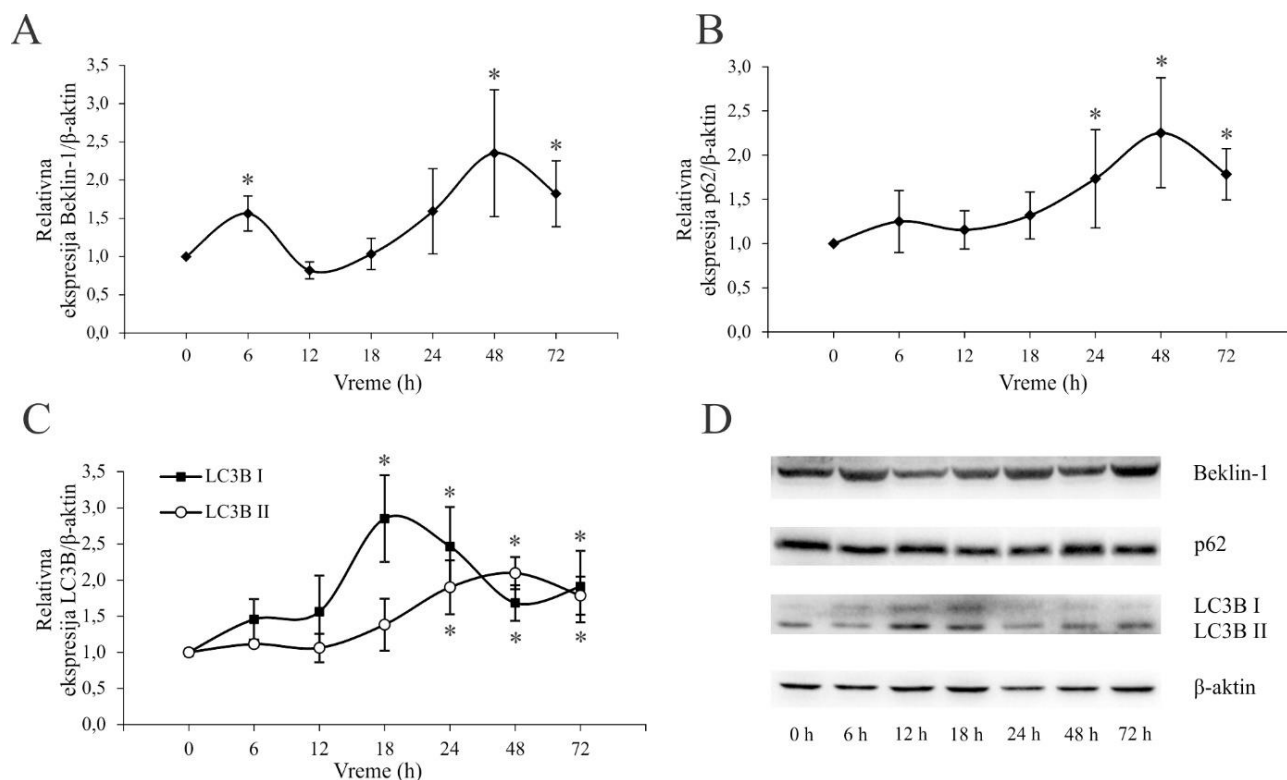
U celini, rezultati nedvosmisleno pokazuju da je smanjen broj ćelija u kulturi nakon tretmana ekstraktom posledica snažne inhibicije deobe uz ubrzano starenje, ali i indukcije ćelijske smrti autofagijom.



Slika 6. *A. vulgaris* ekstrakt inhibira proliferaciju B16F1 ćelija i indukuje senescenciju i ćelijsku smrt autofagijom. B16F1 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h i pripremljene za detekciju proliferacije, ćelijske smrti i senescencije, a rezultati su analizirani metodom protočne citofluorimetrije. A) Intenzitet fluorescence ćelija obojenih CFSE bojom, B) Procenat ćelija u apoptozi, C) Intenzitet fluorescence ćelija obojenih Apoptat bojom, D) Intenzitet fluorescence ćelija obojenih FDG bojom, E) Intenzitet fluorescence ćelija obojenih AO bojom. Prikazan je reprezentativan od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. F) Vijabilitet B16F1 ćelija nakon kombinovanog tretmana ekstraktom *A. vulgaris* i inhibitorom autofagije 3-MA tokom 72 h određen SRB testom. Rezultati su izraženi kao procenat apsorbance kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100% i predstavljeni su kao SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolne uzorke, #\*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na ćelije tretirane ekstraktom *A. vulgaris*.

#### 4.3.1.1. *A. vulgaris* ekstrakt utiče na ekspresiju proteina relevantnih za proces autofagije kod B16F1 ćelija

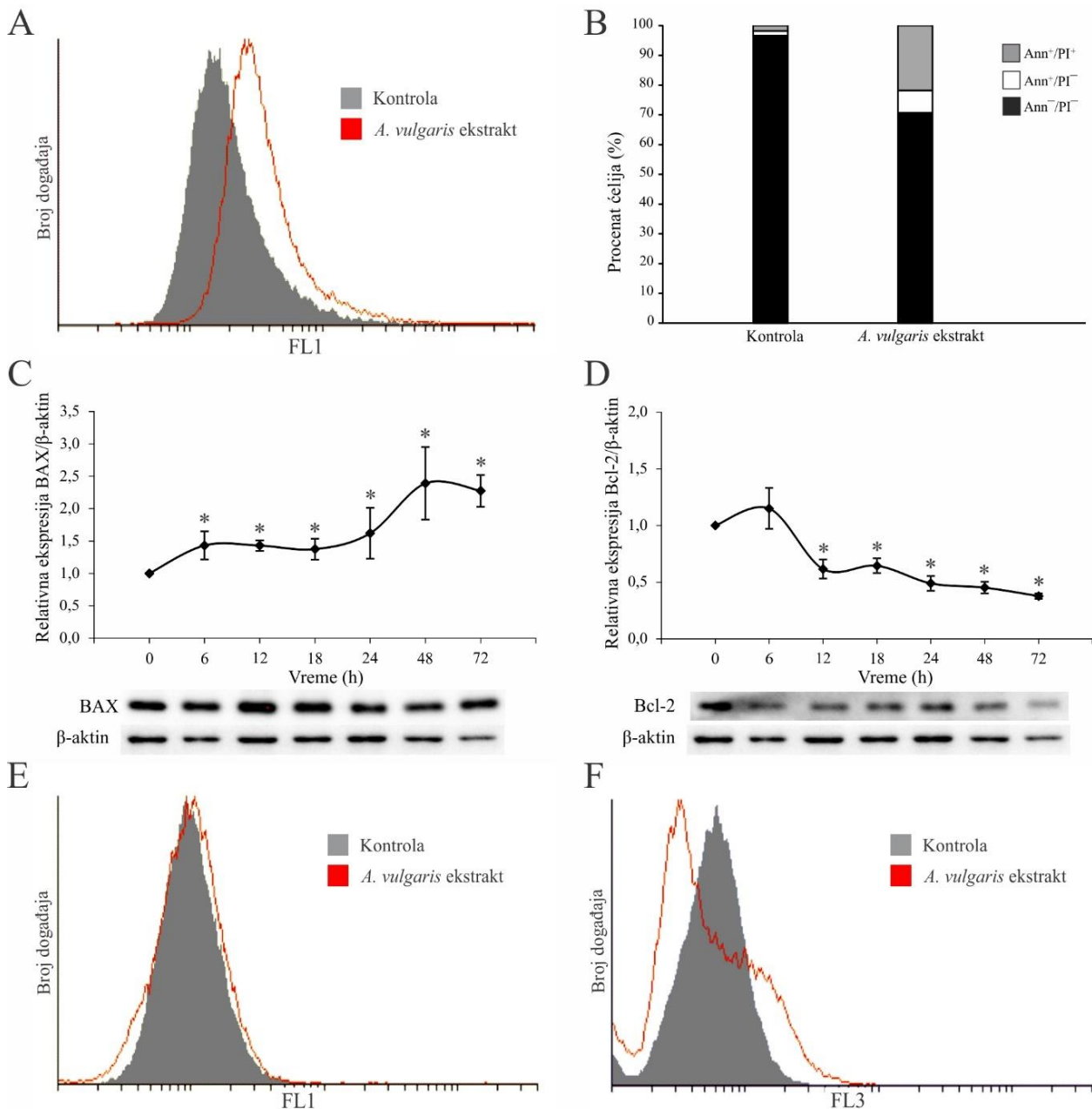
Kao što je pokazano metodom protočne citofluorimetrije, ekstrakt *A. vulgaris* indukuje autofagiju B16F1 ćelija. U cilju potvrde dobijenog rezultata, izvršena je analiza ekspresije proteina uključenih u proces autofagije imunoblot metodom. B16F1 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 6, 12, 18, 24, 48 i 72 h nakon čega je analizirana ekspresija relevantnih proteina (beklina-1, p62, LC3B). Kao što je predstavljeno na Slici 7 A, tretman ekstraktom *A. vulgaris* doveo je do povećanja ekspresije beklina-1, proteina uključenog u formiranje autofagozoma. Pored toga, nivo ekspresije proteina p62, pouzdanog indikatora broja autofagozoma u ćeliji, raste nakon tretmana B16F1 ćelija *A. vulgaris* ekstraktom (Slika 7 B). Analiziran je i nivo ekspresije proteina LC3B i to njegove citosolne forme (LC3B I), kao i forme koja se ugrađuje u membranu autofagozoma (LC3B II). Dobijeni rezultati pokazuju da nivo ekspresije citosolne forme (LC3B I) raste u početnim tačkama tretmana nakon čega dolazi do njegovog opadanja, dok nivo forme proteina koji se ugrađuje u membranu autofagozoma (LC3B II) kontinuirano raste (Slika 7 C). Ekspresioni profil ispitivanih proteina je popuno u saglasnosti sa prethodno detektovanim tipom ćelijske smrti autofagijom.



Slika 7. *A. vulgaris* ekstrakt utiče na ekspresiju proteina relevantnih za autofagiju kod B16F1 ćelija. Grafički su prikazane denzitometrijske analize ekspresije proteina u navedenim vremenskim tačkama A) Beklin-1, B) p62, C) LC3B i D) reprezentativni imunoblotovi. Normalizacija je vršena u odnosu na β-aktin. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD tri nezavisna eksperimenta, a *p* vrednosti manje od 0,05 u odnosu na kontrolne uzorke smatrane su statistički značajnim (\*).

#### 4.3.2. *A. vulgaris* ekstrakt ostvaruje svoj uticaj na B16F10 ćelije inhibicijom proliferacije i indukcijom programirane ćelijske smrti – apoptoze

Kako bi se ispitao uticaj *A. vulgaris* na proliferativni potencijal, B16F10 ćelija, iste su obojene CFSE bojom nakon čega su tretirane IC<sub>50</sub> koncentracijom ekstrakta u trajanju od 72 h. Kao što je prikazano na Slici 8 A, u poređenju sa netretiranom kontrolom u kulturama ćelija izloženih ekstraktu *A. vulgaris* uočava se značajno veći procenat nepodeljenih B16F10 ćelija. Obzirom da zastoj deobe često rezultira smrću ćelija, analizirano je prisustvo programirane ćelijske smrti – apoptoze. B16F10 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 72 h. Nakon isteka inkubacionog perioda, ćelije su obojene Ann V-FITC i PI i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Dok su u kontrolnoj kulturi umiruće ćelije detektovane u malom broju, tretman ekstraktom *A. vulgaris* je indukovao je snažnu apoptozu (~30%) B16F10 ćelija (Slika 8 B) sa dominantnom akumulacijom u kasnoj fazi (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Kako bi se potvrdio dobijeni rezultat, metodom imunoblota analizirana je ekspresija proteina uključenih u proces apoptoze. B16F10 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 6, 12, 18, 24, 48 i 72 h nakon čega je analizirana ekspresija proteina BAX i Bcl-2. Tretman ćelija ekstraktom *A. vulgaris* doveo je do povećanja ekspresije proapoptotskog proteina BAX (Slika 8 C). Sa druge strane, isti tretman je uslovio smanjenje ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 (Slika 8 D) što je u saglasnosti sa detektovanom apoptozom ćelija podvrgnutih tretmanu. Obzirom na značajnu ulogu aktivacije kaspaza u realizaciji apoptotskog procesa, analizirano je njihovo prisustvo metodom protočne citofluorimetrije. B16F10 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h nakon čega su ćelije bojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom – apostatom. Obzirom da nije uočena razlika u procentu aktiviranih ukupnih kaspaza u poređenju sa netretiranim ćelijama može se zaključiti da ekstrakt indukuje apoptozu nezavisnu od aktivacije kaspaza (Slika 8 E). Imajući u vidu prethodno opisane efekte tretmana na B16F1 ćelije, dalje je ispitivano da li tretman *A. vulgaris* dovodi i do programirane smrti tipa II – autofagije. B16F10 ćelije su obojene AO bojom i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Dobijeni rezultati su pokazali da autofagija izostaje u kulturi B16F10 ćelija nakon tretmana *A. vulgaris* što sugerise da je mehanizam delovanja ekstrakta uslovljen karakteristikama ćelija melanoma (Slika 8 F).

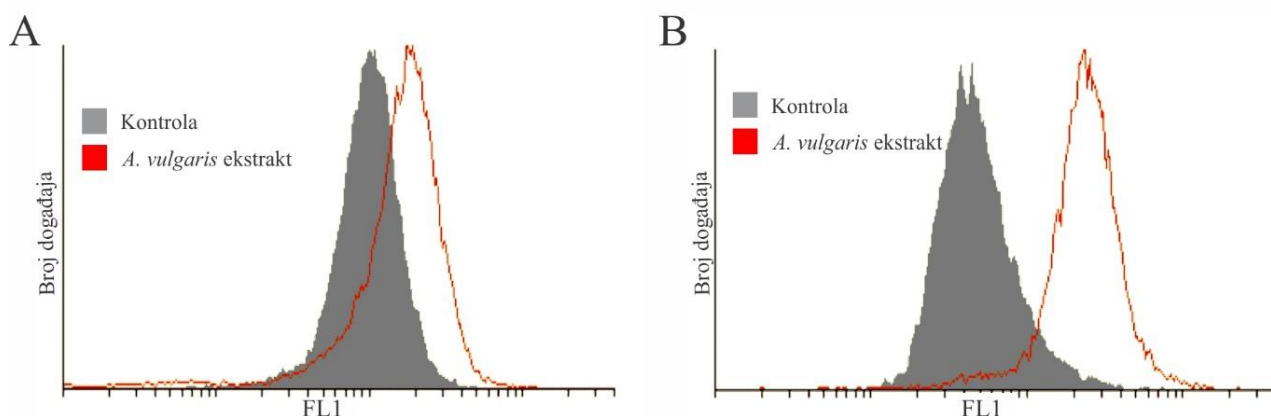


Slika 8. *A. vulgaris* ekstrakt inhibira proliferaciju B16F10 ćelija i indukuje programiranu ćelijsku smrt – apoptozu. Ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h i analizirane metodama protočne citofluorimetrije i imunoblota. A) Intenzitet fluorescence B16F10 ćelija obojenih CFSE bojom, B) Procenat živih (Ann<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), rano-apoptotskih (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i kasno-apoptotskih/nekrotskih (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) B16F10 ćelija. Prikazan je reprezentativan od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. C) Grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije proteina BAX u navedenim vremenskim tačkama i reprezentativni imunoblotovi, D) Grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije proteina Bcl-2 u navedenim vremenskim tačkama i reprezentativni imunoblotovi. Normalizacija je vršena u odnosu na β-aktin. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD tri nezavisna eksperimenta, a *p* vrednosti manje od 0,05 u odnosu na kontrolne uzorke smatrane su statistički značajnim (\*). E) Intenzitet fluorescence B16F10 ćelija obojenih Apostat bojom. F) Intenzitet fluorescence B16F10 ćelija obojenih AO bojom. Prikazan je reprezentativan od tri nezavisno ponovljena eksperimenta.



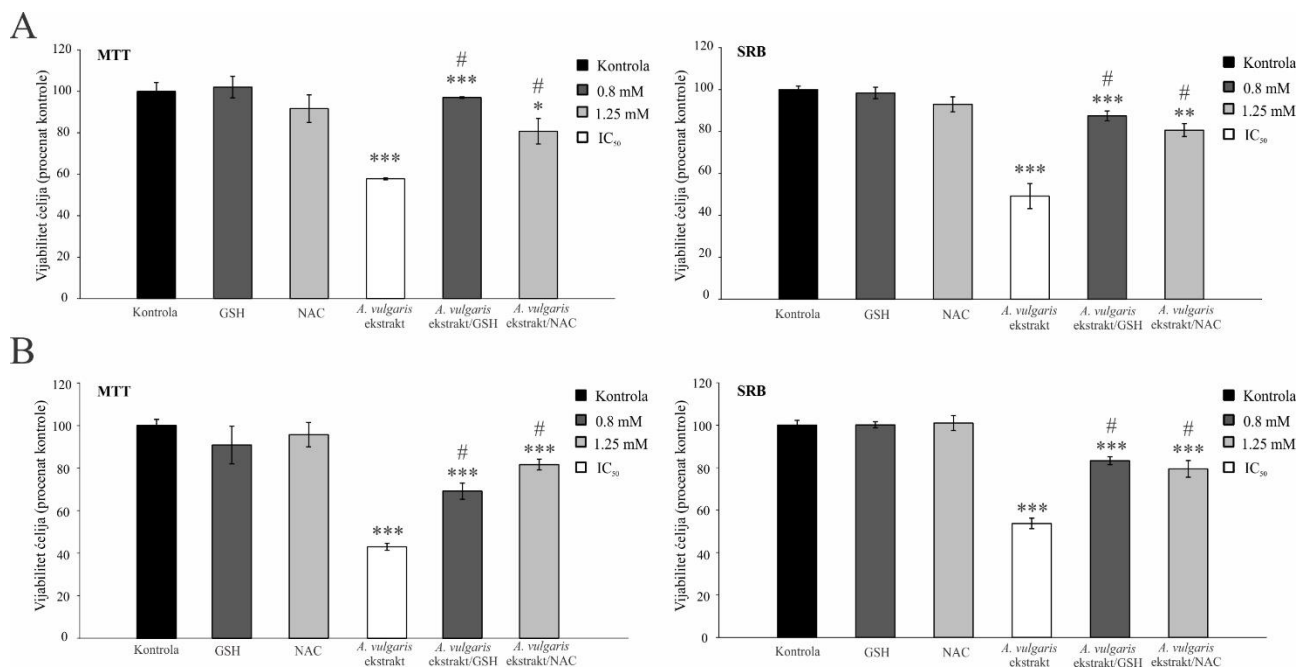
#### 4.3.3. *A. vulgaris* ekstrakt stimuliše produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS/RNS) u kulturama B16F1 i B16F10 ćelija

Opšte je poznato da reaktivne vrste kiseonika i azota mogu da posreduju u regulaciji velikog boja ćelijskih procesa kao što su proliferacija, diferencijacija ali i umiranje ćelija. Sa tim u vezi, bilo je važno proceniti uticaj ekstrakta *A. vulgaris* na produkciju ROS/RNS u kulturama B16F1 i B16F10 ćelija melanoma. Ćelije su prvobitno obojene redoks-senzitivnom bojom DHR 123, a potom izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h. Po isteku inkubacionog perioda, ćelije su analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su pokazali da tretman ekstraktom *A. vulgaris* dovodi do stimulacije produkcije vodonik-peroksida, peroksinitrita i hipohloraste kiseline kod obe ćelijske linije melanoma sa snažnijim efektom u visoko invazivnim B16F10 ćelijama (Slika 9 B) u odnosu na nisko invazivni B16F1 klon (Slika 9 A).

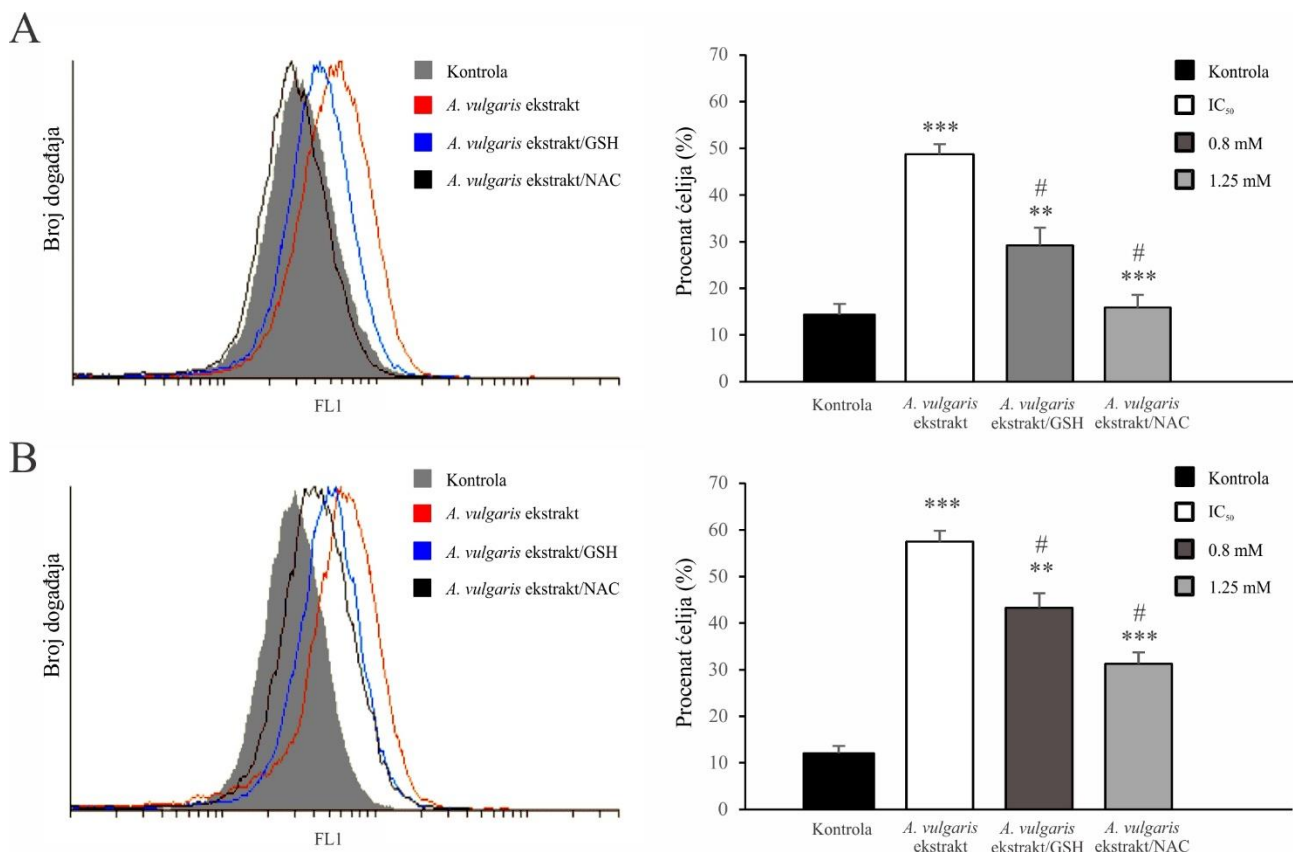


Slika 9. *A. vulgaris* ekstrakt stimuliše produkciju ROS/RNS u B16F1 i B16F10 ćelijskim linijama. Intenzitet fluorescence A) B16F1 i B) B16F10 ćelija obojenih redoks-senzitivnom bojom DHR 123 nakon tretmana *A. vulgaris* ekstraktom u trajanju od 72 h određen je protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su rezultati reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta.

Kako bi se utvrdilo da li produkcija ROS/RNS leži u osnovi potencijalnog mehanizma antitumorskog delovanja ekstrakta *A. vulgaris*, procenjen je vijabilitet ćelija u kombinovanom tretmanu *A. vulgaris* ekstrakta primenjenog u IC<sub>50</sub> koncentraciji i antioksidanasa GSH i NAC. Dobijeni rezultati su pokazali značajno povećanje vijabiliteta B16F1 i B16F10 ćelija u kombinovanom tretmanu u poređenju sa ćelijama izloženim samo IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* (Slika 10). Isti efekat je potvrđen korišćenjem protočne citofluorimetrije gde je produkcija ROS/RNS procenjena korišćenjem DHR 123 boje. Ćelije su bile izložene samo IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* ili alternativno u kombinaciji sa antioksidansima (GSH i NAC). Kao što je prikazano na slici 11, značajno manje ROS/RNS je detektovano u kombinovanom tretmanu što nedvosmisleno potvrđuje da su ove reaktivne vrste medijatori antitumorskog delovanja ekstrakta.



**Slika 10. Kombinovani tretman ekstrakta *A. vulgaris* i antioksidanasa GSH i NAC dovodi do oporavka vijabiliteta ćelija melanoma.** Vijabilitet A) B16F1 i B) B16F10 ćelija nakon kombinovanog tretmana ekstraktom *A. vulgaris* i antioksidansima GSH ili NAC tokom 72 h određen MTT i SRB testovima. Rezultati su izraženi kao procenat apsorbance kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100%. Rezultati su predstavljeni kao  $SV \pm SD$  reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolne uzorke, #\*  $p < 0,05$ , #\*\*  $p < 0,01$  i #\*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na ćelije tretirane ekstraktom *A. vulgaris*.

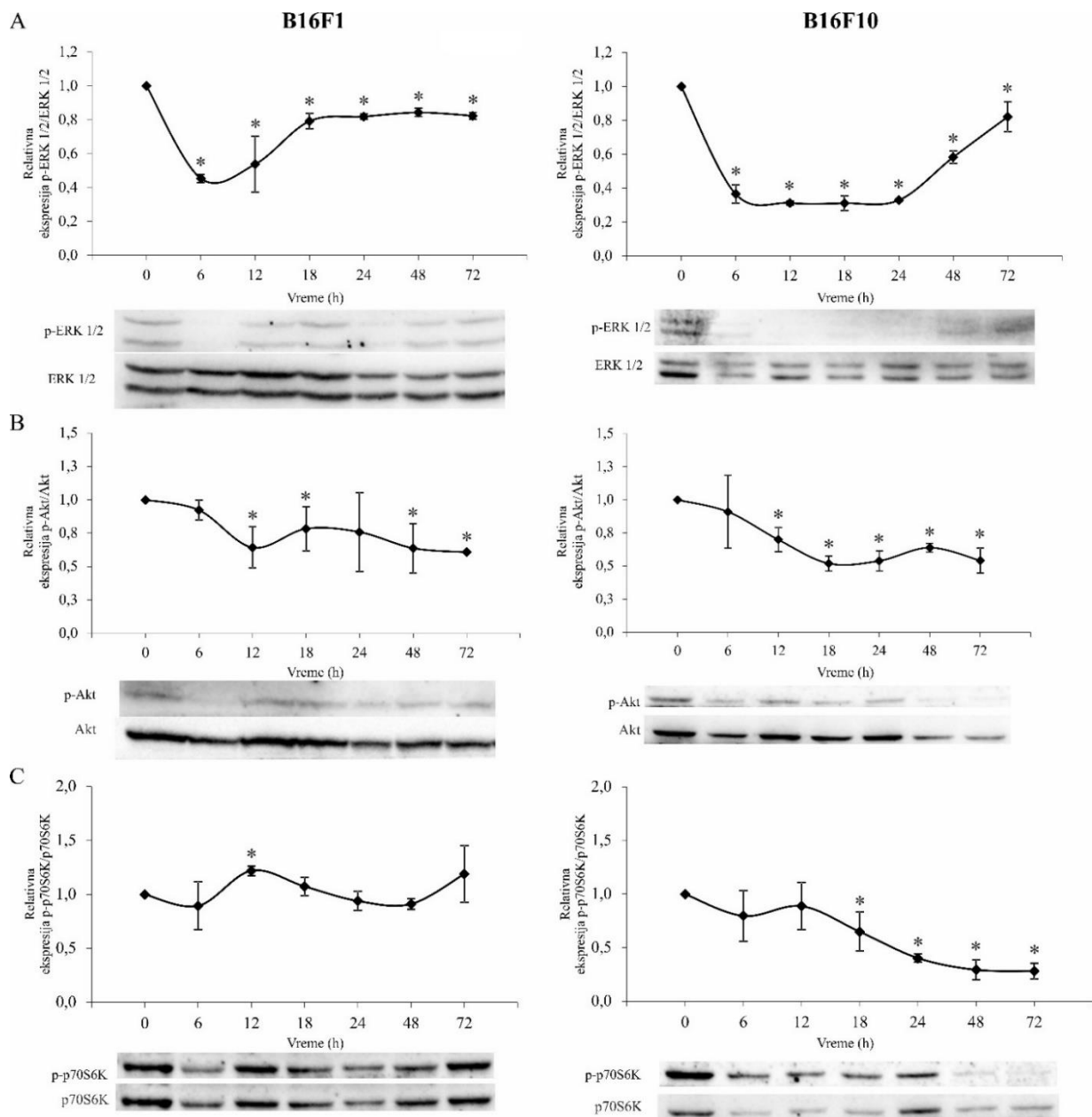


Slika 11. **Kombinovani tretman ekstraktom *A. vulgaris* i antioksidansima GSH ili NAC smanjuje produkciju ROS/RNS u ćelijama melanoma. Levi panel:** Intenzitet fluorescence A) B16F1 i B) B16F10 ćelija obojenih redoks-senzitivnom bojom DHR 123 nakon tretmana *A. vulgaris* ekstraktom (IC<sub>50</sub>) i kombinovanog tretmana sa antioksidansima GSH ili NAC u trajanju od 72 h određen protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su rezultati reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. **Desni panel:** Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD tri nezavisna eksperimenta. \*\*\**p* < 0,001 odnosu na kontrolne uzorke, #*p* < 0,01, #\*\*\**p* < 0,001 u odnosu na ćelije tretirane ekstraktom *A. vulgaris*.

#### 4.3.4. *A. vulgaris* ekstrakt različito reguliše MAPK i PI3K/Akt signalne puteve u B16F1 i B16F10 ćelijama melanoma različite invazivnosti

Različiti fundamentalni ćelijski procesi poput proliferacije, rasta, diferencijacije, pokretljivosti, odgovora na stres, apoptoze i preživljavanja, regulisani su serin/treonin proteinskim kinazama MAP i Akt [289]. Kako bi se definisao efekat ekstrakta *A. vulgaris* na glavne signalne puteve uključene u proliferaciju i ćelijsku smrt, B16F1 i B16F10 ćelije su tretirane IC<sub>50</sub> koncentracijom *A. vulgaris* ekstrakta tokom 6, 12, 18, 24, 48 i 72 h nakon čega je ekspresija proteina ERK1/2, Akt i S6 kinaze analizirana imunoblot metodom. Dobijeni rezultati su pokazali da je tretman doveo do smanjenja ekspresije ERK1/2 u obe ćelijske linije melanoma, koje je bilo najintenzivnije u vremenskom intervalu od 24 h (Slika 12 A). Dalje, ekspresija Akt pokazuje vremenski-zavistan trend smanjenja kako u nisko tako i u visoko invazivnim ćelijama melanoma (Slika 12 B). Ovi rezultati su u skladu sa uočenom inhibicijom proliferacije detektovanom protočnom citofluorimetrijom kod obe ćelijske linije. Pored toga, negativna regulacija Akt signalnog puta može biti uzrok indukcije autofagije kod B16F1 ćelijske linije. Sa druge strane, obzirom da je Akt negativni regulator nekih pro-apoptotskih proteina, njegova inhibicija u B16F10 ćelijskoj liniji ide u prilog detektovanoj apoptozi metodom protočne citofluorimetrije. Za razliku od slične regulacije ERK1/2 i Akt proteina, ekspresija nizvodnog proteina S6 kinaze je bila različita kod nisko i visoko invazivnih linija melanoma naglašavajući složenost signalne mreže i pružajući moguće objašnjenje za drugačiji ishod tretmana

u ovim ćelijskim linijama. Dok nivo ekspresije u B16F1 ćelijskoj liniji nije bio promenjen u svim ispitivani terminima, u visoko invazivnom klonu je uočena kontinuirana inhibicija ovog enzima pod delovanjem tretmana (Slika 12 C). Nepromenjena ekspresija p70S6 kinaze u B16F1 ćelijama bi mogla biti odgovorna za potenciranje autofagije, ali i uspostavljanje senescencije u preživeloj frakciji ćelija [290,291]. Nasuprot tome, u visoko invazivnoj liniji B16F10, ekstrakt *A. vulgaris* dovodi do smanjenja ekspresije S6 kinaze što rezultira indukcijom apoptoze (Slika 12 C).

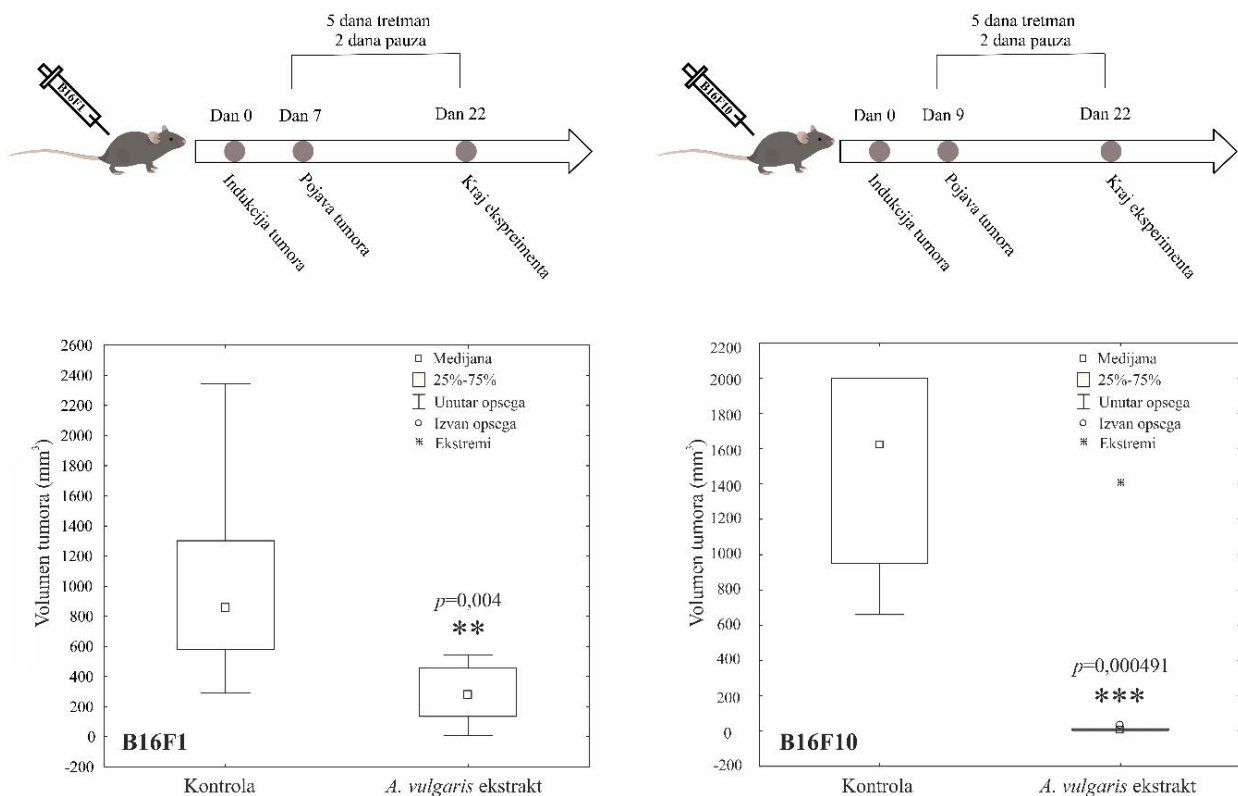


**Slika 12. *A. vulgaris* ekstrakt utiče na signalne puteve MAPK i PI3K/Akt u B16F1 i B16F10 ćelijskim linijama melanoma.** Obe ćelijske linije su izložene  $IC_{50}$  koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 6, 12, 18, 24, 48 i 72 h. Ekspresija A) ERK1/2 B) Akt i C) p70S6K je analizirana imunoblot metodom. Grafički su prikazane denzitometrijske analize ekspresije proteina u navedenim vremenskim tačkama i reprezentivni imunoblotovi. Normalizacija je vršena u odnosu na nefosforilisanu formu odgovarajućih proteina. Rezultati su predstavljeni kao  $SV \pm SD$  tri nezavisna eksperimenta, a  $p$  vrednosti manje od 0,05 u odnosu na kontrolne uzorke smatrane su statistički značajnim (\*).

#### 4.4. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na rast solidnog melanoma niske i visoke invazivnosti *in vivo*

##### 4.4.1. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje rast tumora u singenim modelima primarnih melanoma niske i visoke invazivnosti *in vivo*

Uzimajući u obzir ograničenja *in vitro* istraživanja, efikasnost ekstrakta *A. vulgaris* je dalje ispitivana korišćenjem singenih modela primarnih tumora melanoma niske i visoke invazivnosti indukovanih subkutanom inokulacijom B16F1 ili B16F10 ćelija. Ovakav pristup omogućava evaluaciju antitumorskog potencijala testiranog ekstrakta u kontekstu mikrosredine tumora i svih ostalih aspekata uključenih u interakcije tumor-domaćin koje u *in vitro* studiji, ali i ksenograft modelima izostaju, čime ovakva postavka najpribližnije oslikava bolest kod ljudi. Po pojavi tumora životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* *i.p.* pet dana uzastopno i dva dana pauze sve do momenta žrtvovanja. Nakon 22 dana po indukciji bolesti, životinje su žrtvovane i procenjen je finalni volumen tumora. Kao što je prikazano na Slici 13, ekstrakt *A. vulgaris* je značajno smanjio volumen tumora u oba modela u poređenju sa kontrolom, nezavisno od inicijalnih razlika u fenotipu ćelija i različitih invazivnih karakteristika istih. Međutim, iznenađujuće i suprotno *in vitro* rezultatima efekat je bio znatno uočljiviji kod visoko invazivnog modela B16F10, naglašavajući značaj mikrosredine tumora u odgovoru na terapiju i dodatno potvrđujući ograničenja *in vitro* istraživanja.

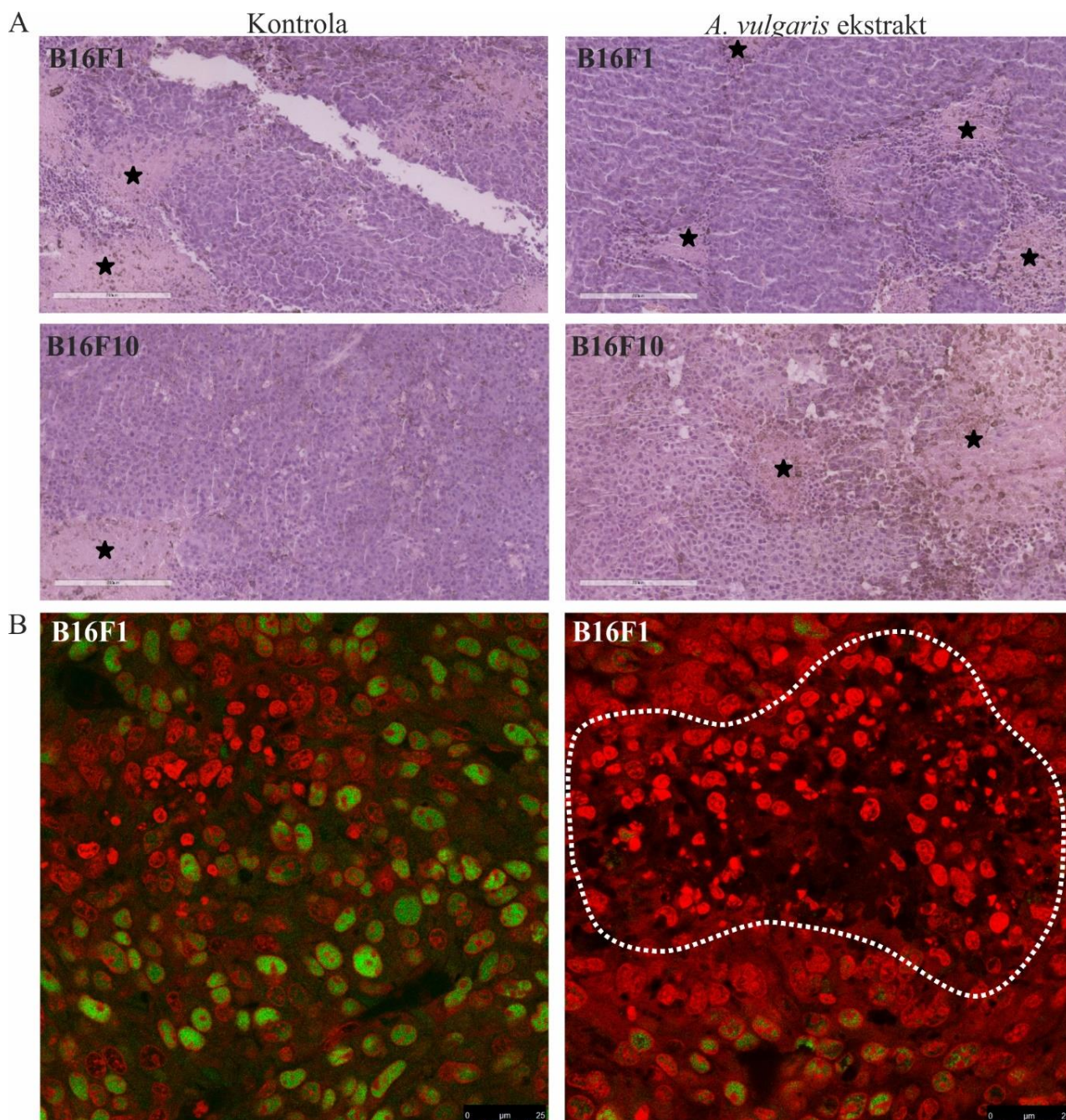


Slika 13. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje volumen primarnih tumora melanoma niske i visoke invazivnosti *in vivo*. Primarni tumori su indukovani subkutanom inokulacijom B16F1 ili B16F10 ćelija u C57BL/6 miševce. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentrom rastvarača (4% DMSO) (n=10 životinja po grupi). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.4.2. *A. vulgaris* ekstrakt je smanjio veličinu tumora u nisko i visoko invazivnim singenim modelima melanoma različitim mehanizmima**

Nakon žrtvovanja životinja, uzorkovani su tumori za potrebe histopatološke analize. Tkiva tumora su fiksirana, ukalupljena, obojena H&E i analizirana. Takođe, preseći tumora nisko invazivnog modela B16F1 su obojeni fluorescentno-obeženo antitelom na nuklearni antigen proliferišućih ćelija (PCNA). Histopatološka analiza tumorskog tkiva je pokazala veći procenat nekrotskih regija na presecima tumora indukovanih B16F10 ćelijama nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* u poređenju sa kontrolnom grupom (35% tretman i 20% kontrola) (Slika 14 A). Sa druge strane, iako je volumen tumora bio značajno smanjen i u B16F1 modelu, procenat nekroze je bio veći u kontrolnim uzorcima iz netretiranih životinja u poređenju sa životinjama tretiranim ekstraktom *A. vulgaris* (38% kontrola i 23% tretman), što je ukazalo da tretman u ovom modelu nije smanjio veličinu tumora indukcijom nekroze (Slika 14 A). Međutim, ekspresija PCNA bila je značajno redukovana u tumorima indukovanim B16F1 ćelijama nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* ukazujući da je njihov proliferativni kapacitet drastično manji (Slika 14 B). Suprotno odsustvu apoptoze B16F1 ćelija nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris in vitro*, na presecima tumora su evidentna apoptotska polja, što dodatno objašnjava smanjen volumen tumora u modelu solidnog melanoma niske invazivnosti (Slika 14 B).

Sumarno, mehanizam delovanja ekstrakta je bio uslovljen razlikama u mikrosredini nisko i visoko invazivne forme tumora. Poseban značaj ima činjenica da je ekstrakt pokazao veći potencijal u agresivnom modelu indukovanom B16F10 ćelijama koje karakteriše slabiji odgovor na tretman *in vitro*.



Slika 14. **Reprezentativne mikrografije tumorskog tkiva u modelima B16F1 i B16F10.** A) H&E bojenje. Crne zvezdice označavaju područja nekroze. B) PCNA imunoekspresija (zeleno), u tkivu melanoma kontrolnih životinja (levo) i životinja tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* (desno). Kao kontrastno bojenje je korišćen propidijum jodid (PI). Isprekidanom belom linijom je uokvireno apoptotsko područje.

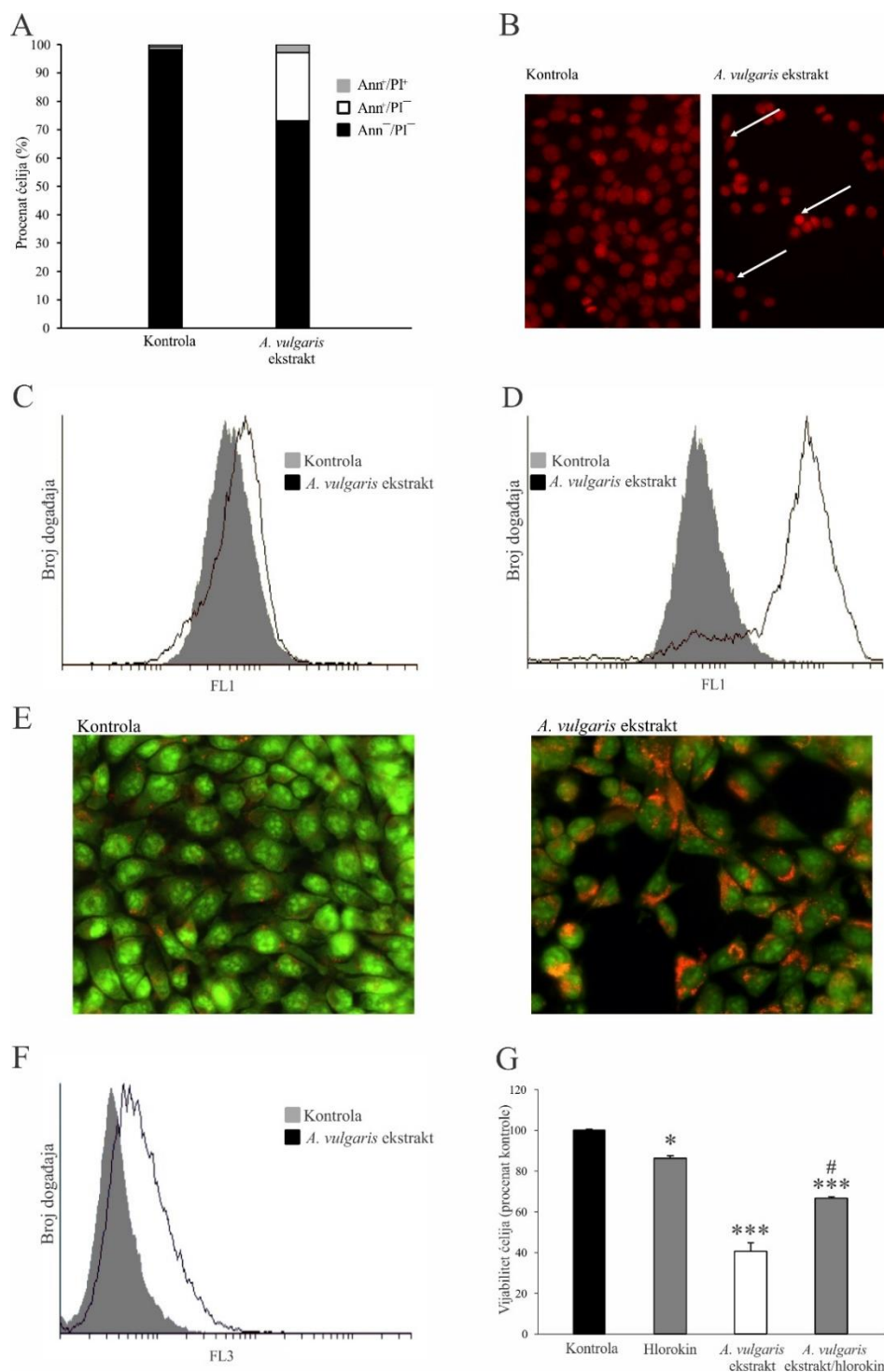
#### 4.5. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na vitalnost 4T1 ćelija *in vitro*

##### 4.5.1. *A. vulgaris* ekstrakt ostvaruje svoj antitumorski efekat na 4T1 ćelije indukcijom programirane ćelijske smrti tipa I i II.

Kako bi se ispitao potencijalni mehanizam delovanja testiranog ekstrakta koji je u osnovi pada vijabiliteta, ćelije tumora mlečne žlezde miša (4T1) su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A.*

*vulgaris* u trajanju od 72 h. Nakon isteka inkubacionog perioda, 4T1 ćelije su obojene Ann V-FITC i PI i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Analizom je utvrđen povećan procenat rano apoptotskih, Ann<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> ćelija, ukazujući da tretman izaziva programiranu ćelijsku smrt tipa I – apoptozu (Slika 15 A). Prisustvo apoptoze je dodatno potvrđeno fluorescentnom mikroskopijom. Naime, 4T1 ćelije su tretirane IC<sub>50</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* i nakon isteka 72 h obojene PI i analizirane fluorescentnim mikroskopom. Uočeni su tipični morfološki znaci apoptoze poput kondenzacije hromatina, pojave nepravilnog oblika nukleusa kao i prisustva apoptotskih tela (Slika 15 B). Dalje, kako bi se ispitalo da li je detektovana apoptoza praćena aktivacijom kaspaza, 4T1 ćelije su obojene apostat bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su pokazali da je apoptoza bila praćena blagom aktivacijom kaspaza u tretiranoj kulturi (Slika 15 C). Paralelno, citotoksični efekat ekstrakta *A. vulgaris*, bio je u korelaciji sa snažnom produkcijom ROS/RNS (Slika 15 D). Imajući u vidu prethodno pokazan uticaj ekstrakta na proces autofagije, ispitano je njeno prisustvo u kulturi 4T1 ćelija izloženih tretmanu *A. vulgaris* ekstraktom. U tu svrhu, ćelije su nakon tretmana obojene AO bojom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Pokazano je da ekstrakt *A. vulgaris* dovodi do porasta broja autofagozoma u citoplazmi 4T1 ćelija (Slika 15 E, F). Kako bi se ustanovila uloga detektovane autofagije, 4T1 ćelije su paralelno tretirane IC<sub>50</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* i specifičnim inhibitorom autofagije hlorokinom (20 μM) tokom 72 h. Nakon isteka inkubacionog perioda, vijabilitet ćelija je procenjen korišćenjem SRB testa. Obzirom da je vijabilitet 4T1 ćelija u prisustvu inhibitora povećan za približno 30% u poređenju sa ćelijama tretiranim samo IC<sub>50</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris*, može se zaključiti da je detektovana autofagija destruktivnog karaktera, odnosno da doprinosi citotoksičnosti *A. vulgaris* ekstrakta (Slika 15 G).





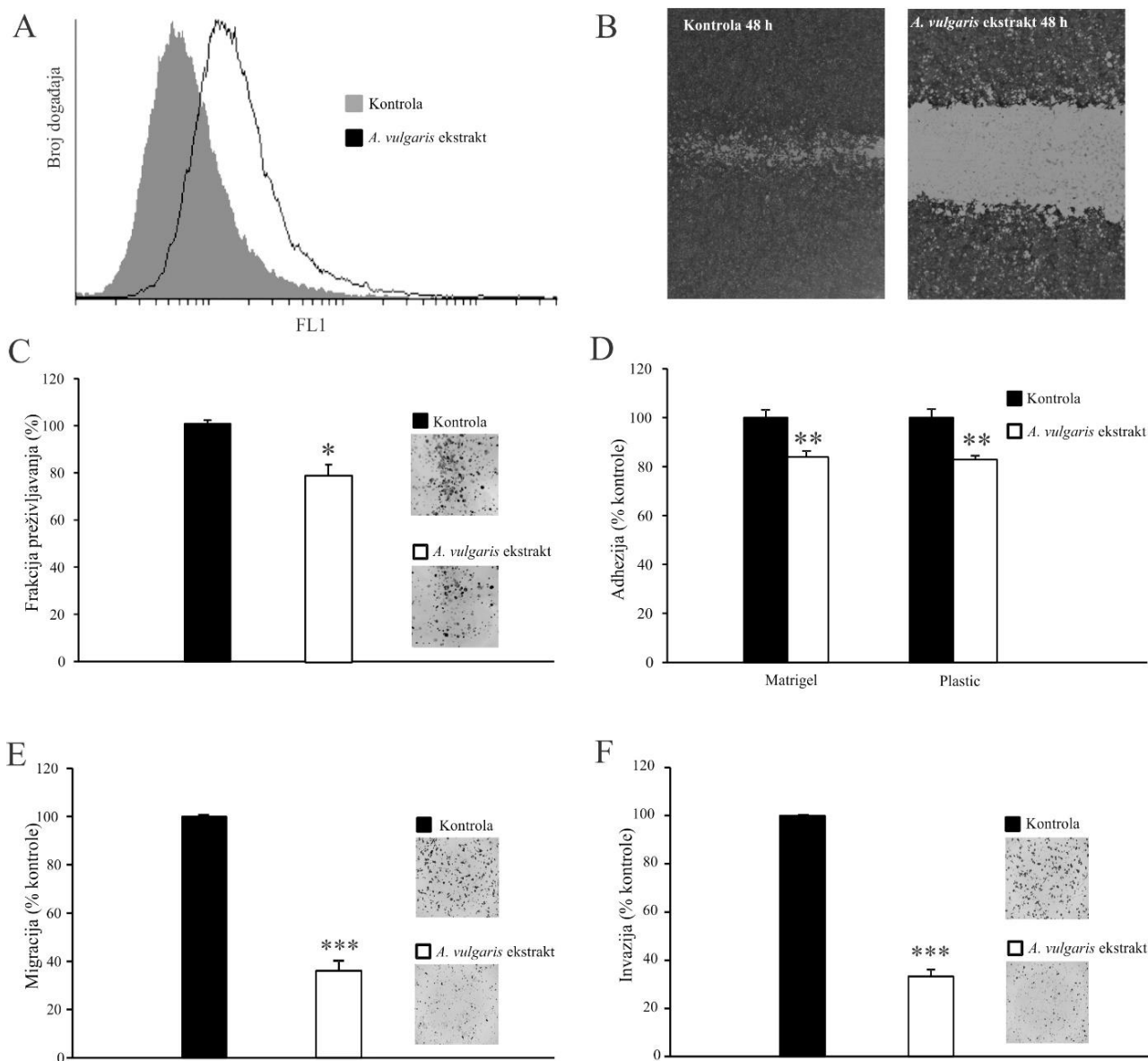
Slika 15. *A. vulgaris* ekstrakt ispoljava citocidno dejstvo na 4T1 ćelije i dovodi do produkcije ROS/RNS. 4T1 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h, nakon čega su ćelije analizirane protočnom citofluorimetrijom i fluorescentnom mikroskopijom. A) Procenat živih (Ann<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), rano-apoptotskih (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i kasno-apoptotskih/nekrotskih (Ann<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) 4T1 ćelija, B) PI bojenje, bele strelice označavaju apoptotske nukleuse, C) Intenzitet fluorescence 4T1 ćelija obojenih Apostat bojom, D) Intenzitet fluorescence 4T1 ćelija obojenih redoks-senzitivnom bojom DHR 123, E) Mikrografije ćelija nakon bojenja AO, F) Intenzitet fluorescence 4T1 ćelija obojenih AO bojom i G) Vijabilitet 4T1 ćelija nakon kombinovanog tretmana ekstrakta *A. vulgaris* i inhibitora autofagije hlorokina tokom 72 h određen SRB testom. Rezultati su izraženi kao procenat kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100%. Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolne uzorke, ###  $p < 0,001$  u odnosu na ćelije tretirane ekstraktom *A. vulgaris*.

## 4.6. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na proliferaciju i metastatski potencijal 4T1 ćelija *in vitro*

### 4.6.1. *A. vulgaris* ekstrakt snažno smanjuje metastatski potencijal 4T1 ćelija *in vitro*

Poznato je da su 4T1 ćelije visoko proliferativne, što je osnovno obeležje agresivnog malignog fenotipa i njihovog potencijala da formiraju metastaze. Kako bi se ispitalo da li ekstrakt *A. vulgaris* pokazuje sposobnost da spreči metastaziranje ćelija urađen je panel odgovarajućih testova. Ćelije obojene CFSE bojom su izložene tretmanu ekstraktom u trajanju od 72 h nakon čega je metodom protočne citofluorimetrije analiziran procenat podeljenih ćelija. Dok je kontrolna kultura netretiranih ćelija neometano proliferisala, tretman ekstraktom je doveo do zastoja u proliferaciji 4T1 ćelija (Slika 16 A). U cilju ispitivanja uticaja tretmana na pokretljivost 4T1 ćelija *in vitro*, korišćen je test zarastanja rana. Ćelije su kultivisane do konfluentnosti nakon čega je sterilnim nastavnom uklonjen region označen kao rana. Kako bi se eliminisao doprinos citotoksičnosti tretmana, 4T1 ćelije su tretirane subtoksičnom IC<sub>25</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris*. U poređenju sa kontrolom gde je nakon 72 h došlo do skoro potpunog zatvaranja rane, razmak između 4T1 ćelija u tretiranoj kulturi je bio potpuno očuvan što je ukazalo na smanjenu sposobnosti ćelija da migriraju i zatvore prazninu (Slika 16 B). Paralelno je procenjen uticaj tretmana ekstraktom *A. vulgaris* na sposobnost 4T1 ćelija da formiraju kolonije *in vitro*. U tu svrhu, korišćen je klonogeni esej. Ćelije tretirane subtoksičnom koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* su kultivisane u malom broju koji je omogućio formiranje kolonija poreklom od jedne ćelije. Rast kolonija je praćen tokom 7 dana. Dobijeni rezultati su pokazali da tretman smanjuje sposobnost ćelija da formiraju kolonije za oko 20% (Slika 16 C). Nakon što su prethodno opisani rezultati ukazivali na sposobnost ekstrakta da utiče na metastatska svojstva, pristupilo se analizi uticaja ekstrakta na adhezivnost, migratornost i invazivnost ćelija. Adhezija je jedan od ključnih koraka tokom metastaziranja ćelija zbog čega je bilo važno ispitati uticaj ekstrakta *A. vulgaris* na sposobnost 4T1 ćelija da prijanjaju na plastiku i vanćelijski matriks (Matrigel®). U cilju eliminacije citotoksičnog efekta tretmana ćelije su tretirane IC<sub>25</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h, nakon čega im je omogućeno vezivanje na plastiku ili podlogu vanćelijskog matriksa. Rezultati su pokazali da je ekstrakt *A. vulgaris* značajno smanjio adhezivne karakteristike 4T1 ćelija nezavisno od tipa podloge (plastika ili vanćelijski matriks) (Slika 16 D). Istovremeno tretirane ćelije su podvrgnute ispitivanju pokretljivosti u testovima migracije i invazije. Migratornost ćelija je stimulisana gradijentom FBS, dok je invazivnost merena kao sposobnost ćelija da razgrade vanćelijski matriks. Dobijeni rezultati su pokazali da je migratornost 4T1 ćelija kroz pore veličine 8 µm u odgovoru na hemostimulus za približno 60% manja u poređenju sa kontrolnom kulturom (Slika 16 E). Konačno, ispitivana je sposobnost ćelija da aktivno prodru u drugo tkivo pomoću enzimske digestije vanćelijskog matriksa – invazivnost. Porozne membrane (8 µm) su obložene tankim slojem vanćelijskog matriksa (Matrigel®) i ćelijama je dopušteno da migriraju ka izvoru hemostimulusa. U poređenju sa kontrolnom kulturom tretman je za oko 60% smanjio sposobnost 4T1 ćelija da razgrade barijeru (vanćelijski matriks) i posledično smanjio invazivne karakteristike 4T1 ćelija (Slika 16 F).

Inhibicija proliferacije 4T1 ćelijske linije, zajedno sa značajnim smanjenjem potencijala ćelija da formiraju kolonije, smanjenjem adhezivnosti, migracije i invazije ukazuje na promenu metastatskih karakteristika ovih ćelija nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*.



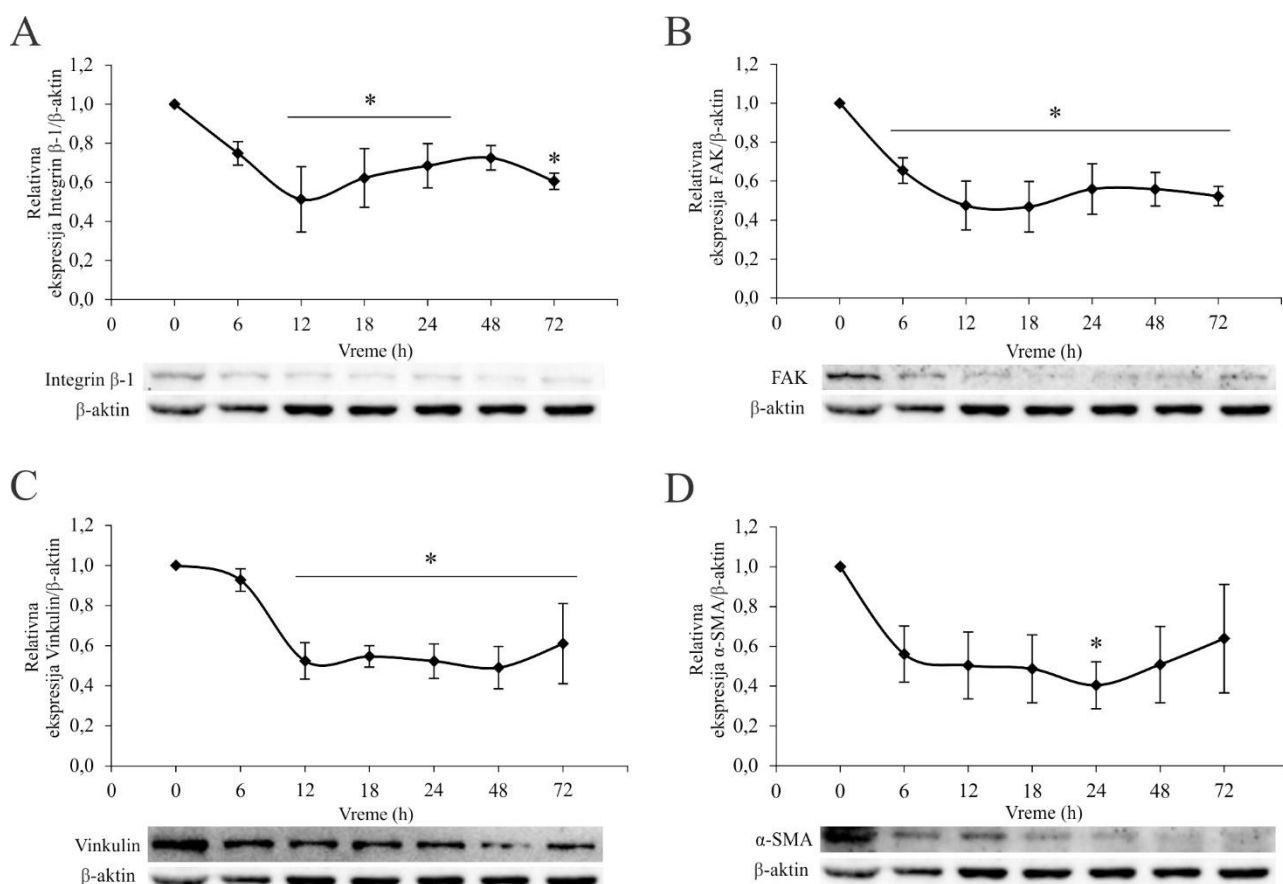
Slika 16. *A. vulgaris* ekstrakt snažno smanjuje metastatski potencijal 4T1 ćelija. A) Intenzitet fluorescence 4T1 ćelija prethodno obojenih CFSE i tretiranih IC<sub>50</sub> koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 72 h određen protočnom citofluorimetrijom. B) Reprerativne mikrofografije 4T1 ćelija nakon testa zarastanja rana dobijene svetlosnom mikroskopijom. Ćelije su izložene subtoksičnoj koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 48 h nakon čega su fiksirane, obojene rastvorom CV i digitalno fotografisane. C) Frakcija preživljavanja u kulturi 4T1 ćelija izloženih IC<sub>25</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h određena klonogenim esejem nakon 7 dana. D) Adhezivnost, E) Migracija i F) Invazija 4T1 ćelija pretretiranih subtoksičnom koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* tokom 72 h. Rezultati su izraženi kao procenat kontrole kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost od 100% i predstavljaju SV ± SD izračunate iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.6.2. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje ekspresiju proteina neophodnih za metastaziranje 4T1 ćelija

Da bi se potvrdio prethodno pokazan smanjen metastatski potencijal na molekularnom nivou, analiziran je efekat tretmana ekstraktom *A. vulgaris* na relevantne proteine uključene u proces metastaziranja. 4T1 ćelije su izložene IC<sub>50</sub> koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* tokom 6, 12, 18, 24,

48 i 72 h nakon čega je ekspresija proteina analizirana imunoblotom. Literaturni podaci potvrđuju da invazivnost i migracioni potencijal tumorskih ćelija zavise od angažovanja integrinskog receptora i nizvodne kaskade [292]. Iz tog razloga je prvo analizirana ekspresija transmembranskog receptora integrina  $\beta$ -1. Dobijeni rezultati su pokazali kontinuirano smanjenje relativne ekspresije integrina  $\beta$ -1 nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* (Slika 17 A). Nakon toga je analizirana ekspresija proteina koji su važni za fokalne adhezije (kinaza fokalne adhezije (engl. *Focal Adhesion Kinase*, FAK) i vinkulin). Tretman ekstraktom *A. vulgaris* je značajno smanjio ekspresiju oba navedena proteina (Slika 17 B i C). Konačno, ekspresija aktina glatkih mišića (engl.  *$\alpha$  Smooth Muscle Actin*,  $\alpha$ -SMA), proteina karakterističnog za maligni agresivni fenotip, je bila značajno inhibirana nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* (Slika 17 D).

Ekspresioni profil ispitanih proteina je potvrdio prethodno pokazanu sposobnost testiranog ekstrakta da redukuje metastatska svojstva ćelija dojke 4T1.



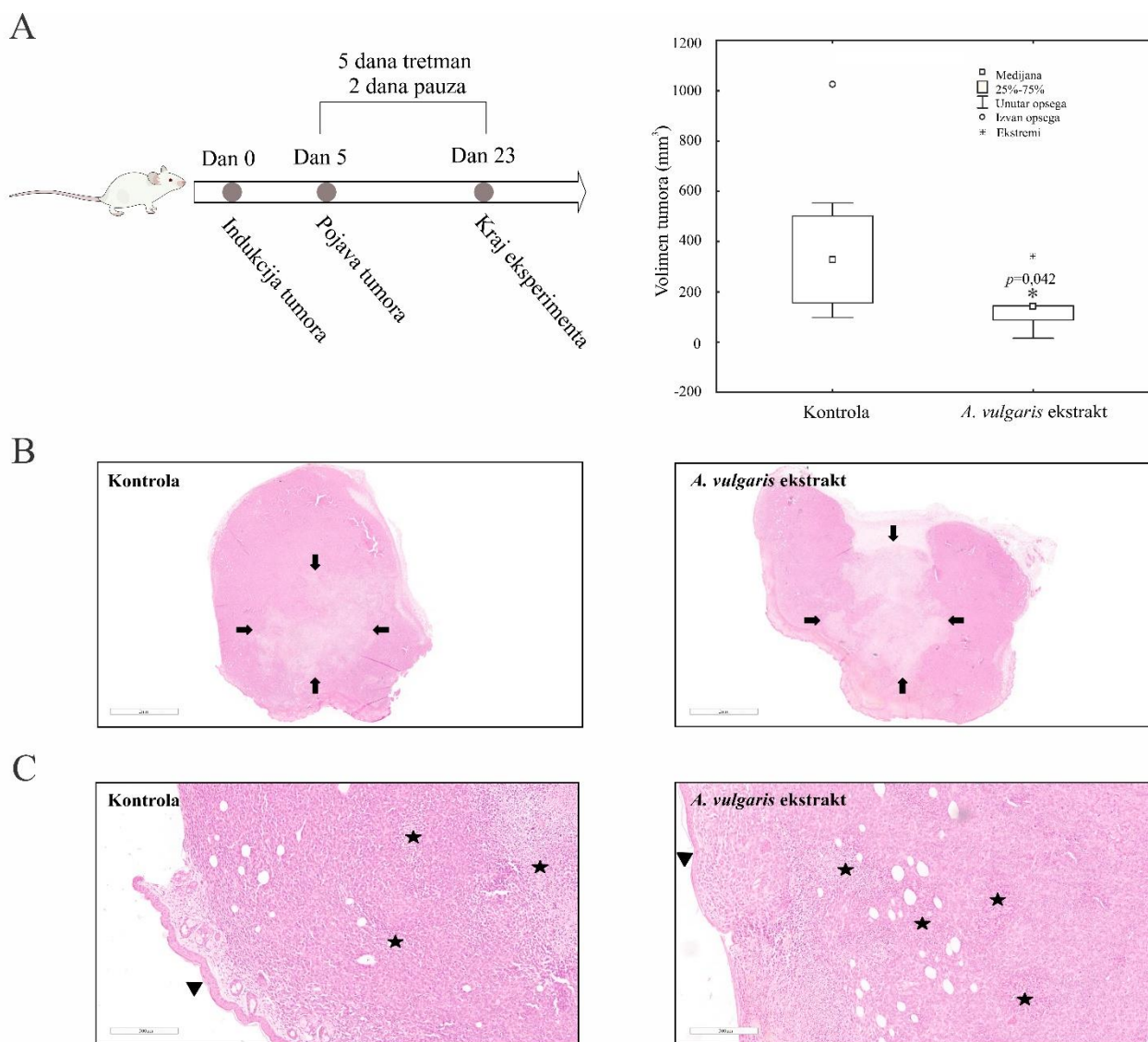
**Slika 17. *A. vulgaris* ekstrakt negativno reguliše signalni put integrina i ekspresiju  $\alpha$ -SMA u 4T1 ćelijama.** Ćelije su izložene  $IC_{50}$  koncentraciji ekstrakta *A. vulgaris* u trajanju od 6, 12, 18, 24, 48 i 72 h. Ekspresija A) integrina  $\beta$ -1, B) FAK, C) vinkulina i D)  $\alpha$ -SMA je analizirana imunoblot metodom. Grafički su prikazane denzitometrijske analize ekspresije proteina u navedenim vremenskim tačkama i reprezentativni imunoblotovi. Normalizacija je vršena u odnosu na  $\beta$ -aktin. Rezultati su predstavljeni kao  $SV \pm SD$  tri nezavisna eksperimenta, a  $p$  vrednosti manje od 0,05 u odnosu na kontrolne uzorke smatrane su statistički značajnim (\*).

#### **4.7. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na rast solidnog tumora dojke *in vivo***

##### **4.7.1. *A. vulgaris* ekstrakt smanjuje rast tumora *in vivo* u ortotopskom singenom modelu tumora dojke**

U cilju definisanja efekta tretmana ekstraktom *A. vulgaris in vivo*, tumori dojke su indukovani ortotopskom implantacijom 4T1 ćelija u BALB/C ženke miševe i tretman je otpočeo po pojavi tumora. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris*, dok je kontrolna grupa primala istu koncentraciju rastvarača (4% DMSO) u PBS-u. Režim davanja je podrazumevao intraperitonealnu aplikaciju (*i.p.*) ekstrakta 5 dana za redom sa dva dana pauze između, a životinje su žrtvovane 23 dana po indukciji bolesti i procenjena je finalna zapremina tumora. Ekstrakt *A. vulgaris* je značajno smanjio zapreminu tumora u poređenju sa kontrolom (Slika 18 A). Morfološka analiza tumora je pokazala da je procenat nekroze bio veći u tretiranoj grupi u odnosu na kontrolu (30% tretman i 25% kontrola). Uočena nekroza je bila uglavnom zastupljena u vidu velikih područja a u manjem broju u obliku mikroskopskih nekroptotskih žarišta (oko 2% u kontrolnoj grupi i manje od 1% u tretiranoj grupi). Konačno, nisu primećene nikakve vizuelne promene u obliku i veličini tumorskih ćelija između grupa (Slika 18 B, C).

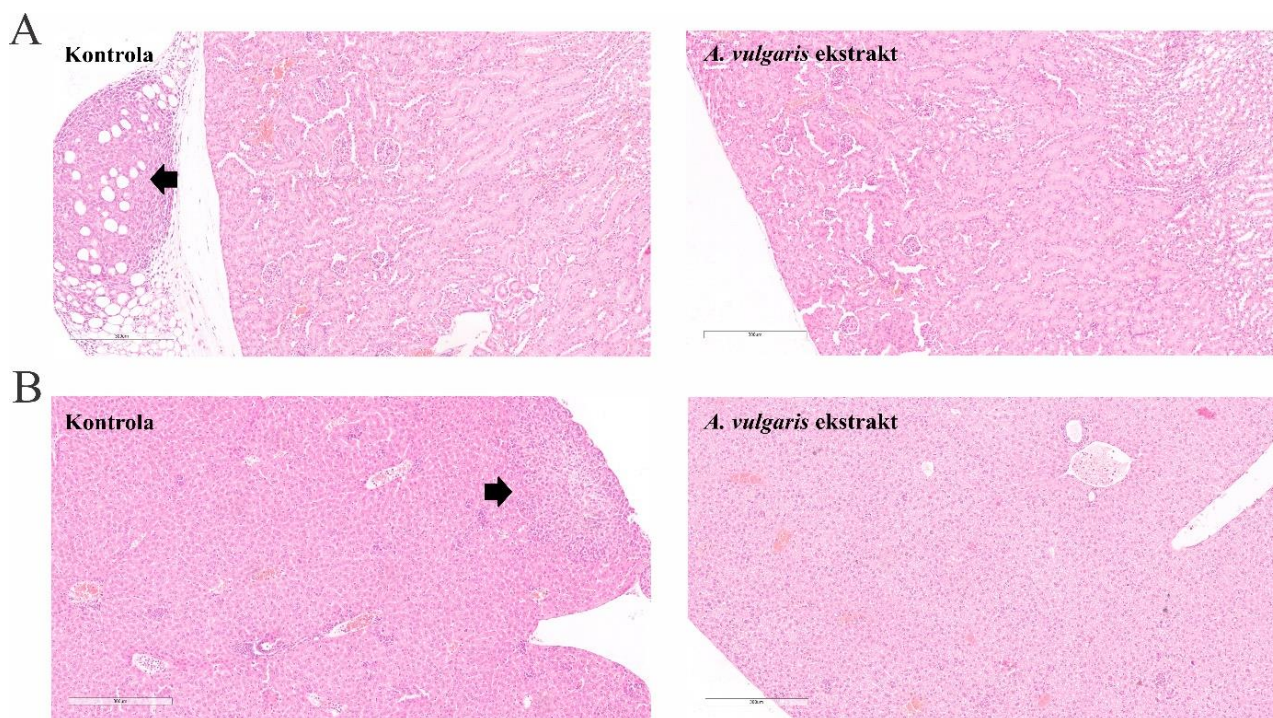
U celini, efekat tretmana manifestovan redukcijom volimena tumora se na osnovu histopatološke analize uzorka može dovesti u vezu sa intenzivnijom nekrozom.



Slika 18. *A. vulgaris* ekstrakt je smanjio veličinu tumora *in vivo* u modelu tumora dojke. 4T1 ćelije su inokulirane u masno jastuče dojke BALB/C ženki miševa i životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentrom rastvarača (4% DMSO) (n=10 životinja po grupi). A) Zapremina tumora određena nakon 23 dana. \*  $p < 0,05$ . B) Kontrolno tumorsko tkivo i tumorsko tkivo tretiranih životinja obojeno H&E, uveličanje 12× i C) Kontrolno tumorsko tkivo i tumorsko tkivo tretiranih životinja obojeno H&E, uveličanje 100×. Strelice pokazuju makroskopske oblasti nekroze, dok zvezdice označavaju mikroskopske oblasti nekroptoze. Vrhovi srelica označavaju epidermis na površini tumorskog tkiva.

#### 4.7.2. *A. vulgaris* ekstrakt sprečava pojavu metastaza *in vivo* u ortotopskom singenom modelu tumora dojke

Pored smanjenja same veličine tumora, tretman je uticao i na metastatski potencijal ćelija. Naime, u kontrolnoj grupi je primećeno prisustvo metastaza na jetri i bubrezima, što nije bio slučaj sa tretiranom grupom. Kada su u pitanju metastaze na bubrezima, kod tri od pet životinja iz kontrolne grupe je uočeno prisustvo metastaza u parakapsularnom regionu bubrega (Slika 19 A). Takođe, na jetri kod dve od pet životinja iz kontrolne grupe su bile prisutne subkapsularne metastaze (Slika 19 B). Istovremeno, metastaze nisu primećene na uzorcima tkiva životinja tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* što je u skladu sa prethodno pokazanim rezultatima *in vitro*.



Slika 19. *A. vulgaris* ekstrakt je sprečio pojavu metastaza *in vivo* u modelu tumora dojke. A) Reprezentativne mikrografije tkiva bubrega iz kontrolne grupe i grupe tretirane ekstraktom *A. vulgaris*, uveličanje 100×, boljenje H&E. Strelica označava metastazu u perirenalnom masnom tkivu, B) Reprezentativne mikrografije tkiva jetre iz kontrolne grupe i grupe tretirane ekstraktom *A. vulgaris*, uveličanje 100×, boljenje H&E. Strelica označava metastazu u subkapsularnom regionu jetre.

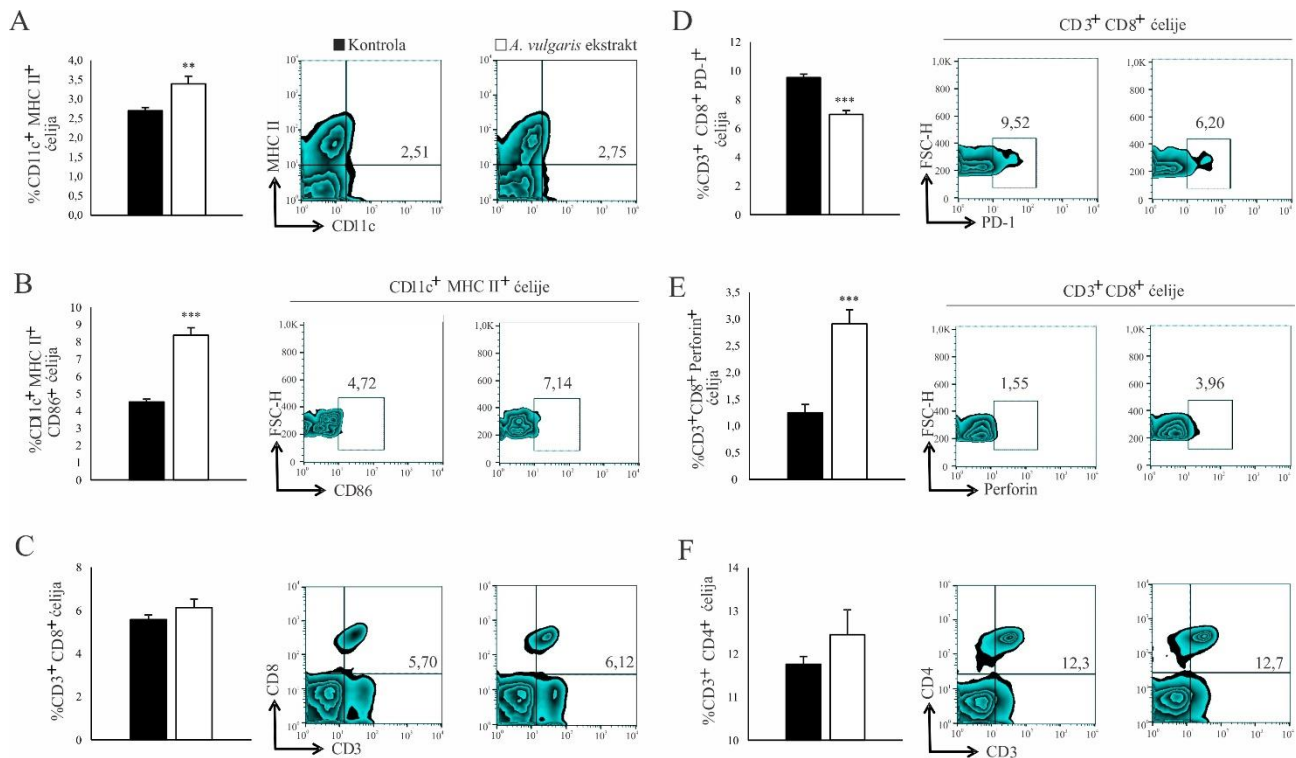
#### 4.8. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na sistemski imunski odgovor i mikrosredinu tumora u modelima nisko invazivnog melanoma (B16F1) i tumora dojke (4T1) *ex vivo*

##### 4.8.1. *A. vulgaris* ekstrakt pojačava sistemski imunski odgovor u solidnom modelu melanoma B16F1

Prema literaturnim podacima, kod tumora niskog gradusa, imunski sistem prelazi put od proinflatornog, antitumorskog do uspostavljanja imunosupresivnog, protumorskog okruženja. Iz tog razloga, ispitan je potencijal ekstrakta *A. vulgaris* da obnovi efikasan imunski odgovor na tumor pored njegovog direktnog delovanja na ćelije nisko invazivnog melanoma B16F1. Melanom je indukovano subkutanom inokulacijom B16F1 ćelija u C57BL/6 miševima i tretman je otpočeo po pojavi tumora. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris*, dok je kontrolna grupa primala istu koncentraciju rastvarača (4% DMSO) u PBS-u. Režim davanja je podrazumevao *i.p.* aplikaciju pet dana za redom sa dva dana pauze između i životinje su žrtvovane nakon 22 dana po indukciji bolesti, a slezine su hirurški izolovane iz 6 različitih životinja po grupi radi dobijanja jednoćelijskih suspenzija slezina. Jednoćelijske suspenzije su obeležene monoklonskim antitelima konjugovanim sa fluorohromom i analizirane pomoću protočne citofluorimetrije.

Primećeno je značajno povećanje procenta CD11c<sup>+</sup> DC koje eksprimiraju MHC II klase ( $p=0,009$ ; Slika 20 A) kao i kostimulatorni molekul CD86 ( $p<0,001$ ; Slika 20 B) u slezini miševa tretiranih ekstraktom *A. vulgaris*. Iako analiza funkcionalne subpopulacije T limfocita nije pokazala razliku u procentu CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita između ispitivanih grupa u slezini miševa tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* (Slika 20 C), primećeno je značajno smanjenje procenta CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita koji

eksprimiraju PD-1 ( $p < 0,001$ ; Slika 20 D). Pored toga, primećen je povećan procenat  $CD3^+CD8^+$  T limfocita koji proizvode perforin u slezini miševa tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* ( $p < 0,001$ ; Slika 20 E). Kada je reč o Th ćelijama, procenti  $CD3^+CD4^+$  T limfocita u slezini se nisu razlikovali između grupa (Slika 20 F).

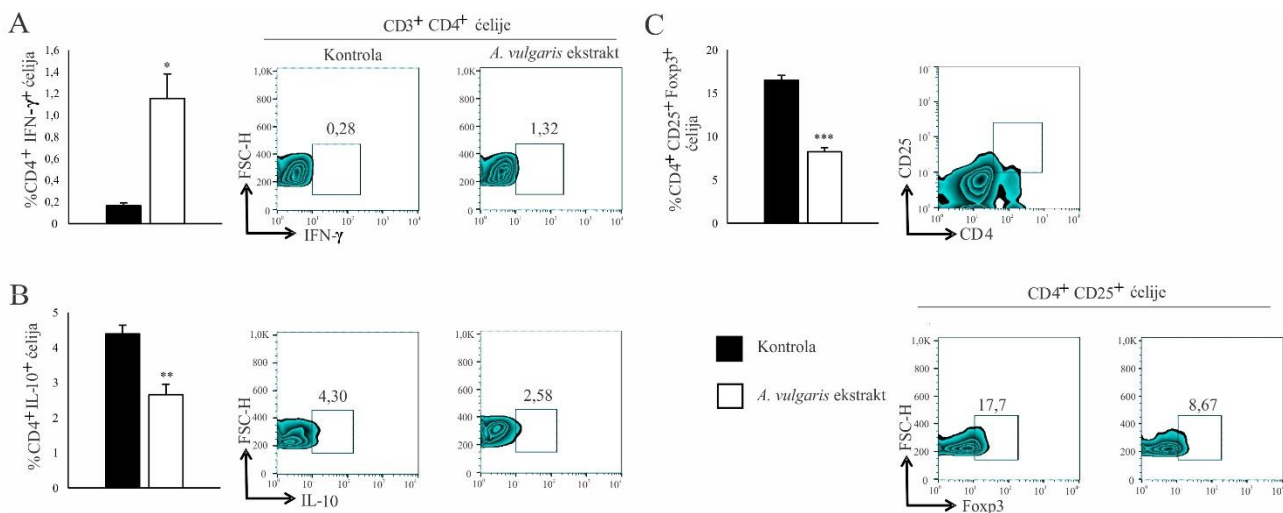


**Slika 20. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* utiče na broj i fenotip imunokompetentnih ćelija u slezini miševa sa melanomom.** Procenat A)  $CD11c^+MHC II^+$ , B)  $CD11c^+MHC II^+CD86^+$ , C)  $CD3^+CD8^+$ , D)  $CD3^+CD8^+PD-1^+$ , E)  $CD3^+CD8^+Perforin^+$  i F)  $CD3^+CD4^+$  ćelija u slezini miševa sa melanomom. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su  $SV \pm SEM$  6 miševa po grupi iz jednog reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Međutim, bez obzira na nepostojanje razlike u procentima  $CD3^+CD4^+$  T limfocita, primećen je značajno veći procenat  $CD3^+CD4^+$  T limfocita koji proizvode  $IFN-\gamma$  u slezini miševa tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* ( $p=0,001$ ; Slika 21 A). Takođe, uočen je značajno manji procenat  $CD3^+CD4^+$  T limfocita koje proizvode IL-10 ( $p=0,001$ ; Slika 21 B) u slezinama tretirane grupe. Pored toga, važno je da je ekstrakt *A. vulgaris* značajno smanjio procenat  $CD3^+CD25^+FoxP3^+$  regulatornih T ćelija ( $T_{reg}$ ) u slezinama miševa sa melanomom ( $p < 0,001$ ; Slika 21 C).

U celini, dobijeni rezultati pokazuju da ekstrakt *A. vulgaris* revitalizuje efikasan antitumorski imunski odgovor podržavajući funkcionalni kapacitet ćelija sa važnom ulogom u odbrani od tumora.



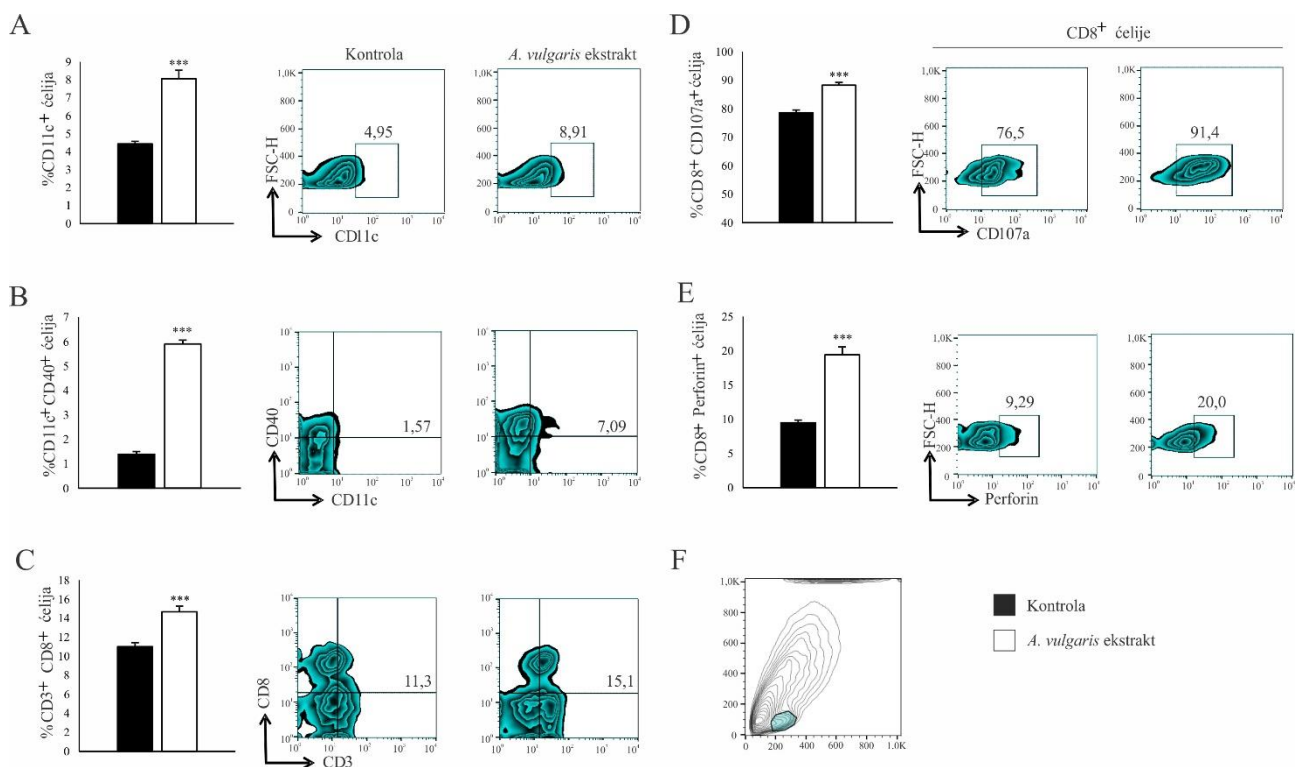


Slika 21. **Tretman ekstraktom *A. vulgaris* utiče na broj i fenotip imunokompetentnih ćelija u slezini miševa sa melanomom.** Procenat A) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, B) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> i C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ćelija u slezini miševa sa melanomom. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Rezultati su predstavljeni kao SV  $\pm$  SEM (šest miševa po grupi) iz reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.8.2. *A. vulgaris* ekstrakt pojačava lokalni antitumorski imunski odgovor u solidnom modelu melanoma B16F1

Po završetku eksperimenta, životinje su eutanazirane, a tumori su hirurški odstranjeni iz šest različitih životinja po grupi kako bi se dobile jednoćelijske suspenzije. Ove suspenzije su zatim obeležene monoklonskim antitelima konjugovanim sa fluorohromima i analizirane korišćenjem protočne citofluorimetrije.

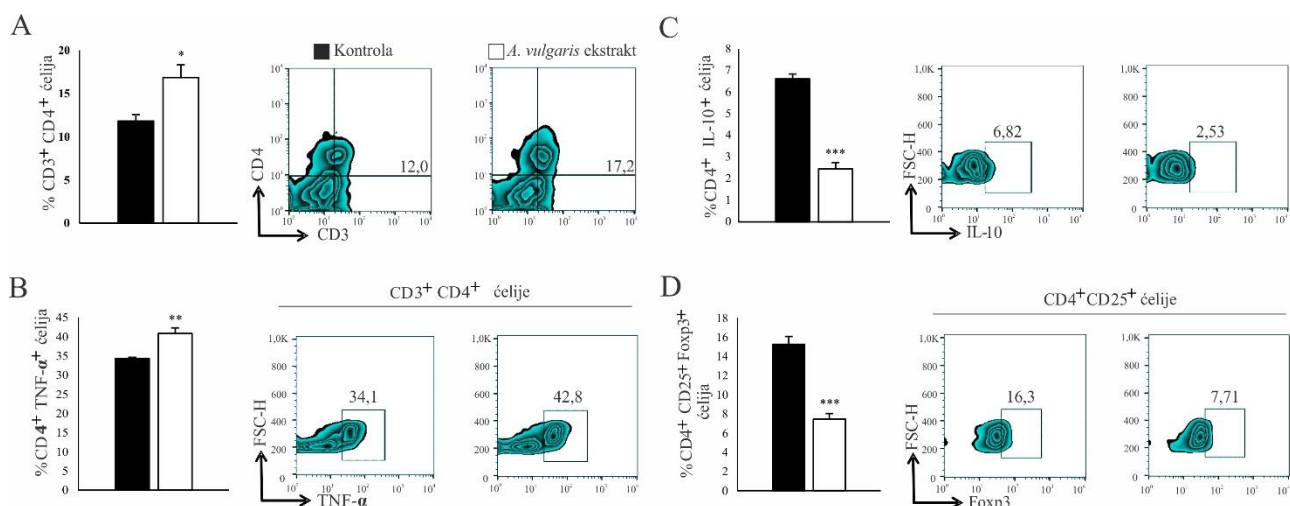
Slični rezultati su primećeni u analizi tumor infiltrišućih leukocita (engl. *Tumor-Infiltrating Leukocytes*, TILs) kao i u slezini. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* je doveo do povećanja procenta ukupnih CD11c<sup>+</sup> DC ( $p < 0,001$ ; Slika 22 A) ali i onih DC koje eksprimiraju CD40 unutar te populacije ( $p < 0,001$ ; Slika 22 B). Takođe, uočen je povećan procenat ukupnih CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita u primarnim tumorima ( $p < 0,001$ ; Slika 22 C). Pored toga, otkriveno je povećanje procenta CD107a<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ; Slika 25 D), kao i CD8<sup>+</sup> T limfocita koji proizvode perforin ( $p < 0,001$ ; Slika 22 E) u primarnim tumorima miševa tretiranih ekstraktom *A. vulgaris*.



**Slika 22. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* pojačava antitumorski imunski odgovor u TME.** Procenat A) CD11c<sup>+</sup>, B) CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, C) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, D) CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>, E) CD3<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> ćelija u TME i F) obeležavanje populacije mononuklearnih ćelije u mikrosredini tumora. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su SV ± SEM (6 miševa po grupi) reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Takođe, procenat CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T limfocita u TME je značajno povećan nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* ( $p=0,012$ ; Slika 23 A). Dalje, analiza funkcionalnog fenotipa CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T limfocita je otkrila povećanje procenta ovih ćelija koje proizvode TNF- $\alpha$  ( $p=0,006$ ; Slika 23 B) kao i smanjenje procenta ovih ćelija koje proizvode IL-10 ( $p<0,001$ ; Slika 23 C) nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*. Konačno, tretman je smanjio procenat CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija (T<sub>reg</sub>) u primarnim tumorima ( $p<0,001$ ; Slika 23 D) čime je omogućeno ponovno uspostavljanje aktivnog antitumorskog imunskog odgovora.

Sve ukupno, imunski odgovor u mikrosredini melanom indukovanog B16F1 ćelijama pod uticajem ekstrakta *A. vulgaris* pokazuje značajno snažniju antitumorsku aktivnost kroz jačanje svih relevantnih segmenata, počev od zastupljenosti i kapaciteta APC, brojčane i funkcionalne efikasnosti efektorskih i pomoćničkih limfocita, kao i redukciju imunosupresivnog ogranka.

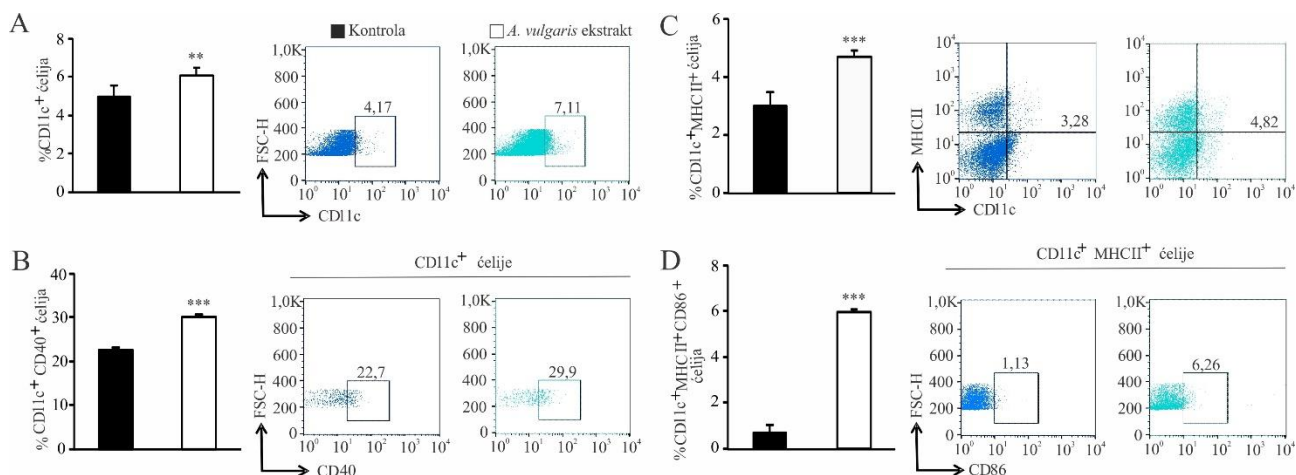


**Slika 23. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* pojačava antitumorski imunski odgovor u TME.** Procenat A) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, B) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, C) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> i D) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ćelija u TME. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su SV  $\pm$  SEM (6 miševa po grupi) reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.8.3. *A. vulgaris* ekstrakt pojačava sistemski antitumorski imunski odgovor u 4T1 modelu tumora dojke

Kako bi se ispitalo efekat tretmana ekstraktom *A. vulgaris* na imunski odgovor, tumori dojke su indukovani inokulacijom 4T1 ćelija umasno jastuče BALB/C miševa i tretman je otpočeo po pojavi tumora. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris*, dok je kontrolna grupa primala istu koncentraciju rastvarača (4% DMSO) u PBS-u. Režim davanja je podrazumevao *i.p.* aplikaciju pet dana za redom sa dva dana pauze između. Nakon 23 dana od indukcije bolesti, životinje su eutanazirane, a tumori su pažljivo odstranjeni hirurškim putem iz šest različitih jedinki po grupi kako bi se dobile jednoćelijske suspenzije koje su potom označene monoklonskim antitelima povezanim sa fluorohromima i analizirane su metodom protočne citofluorimetrije.

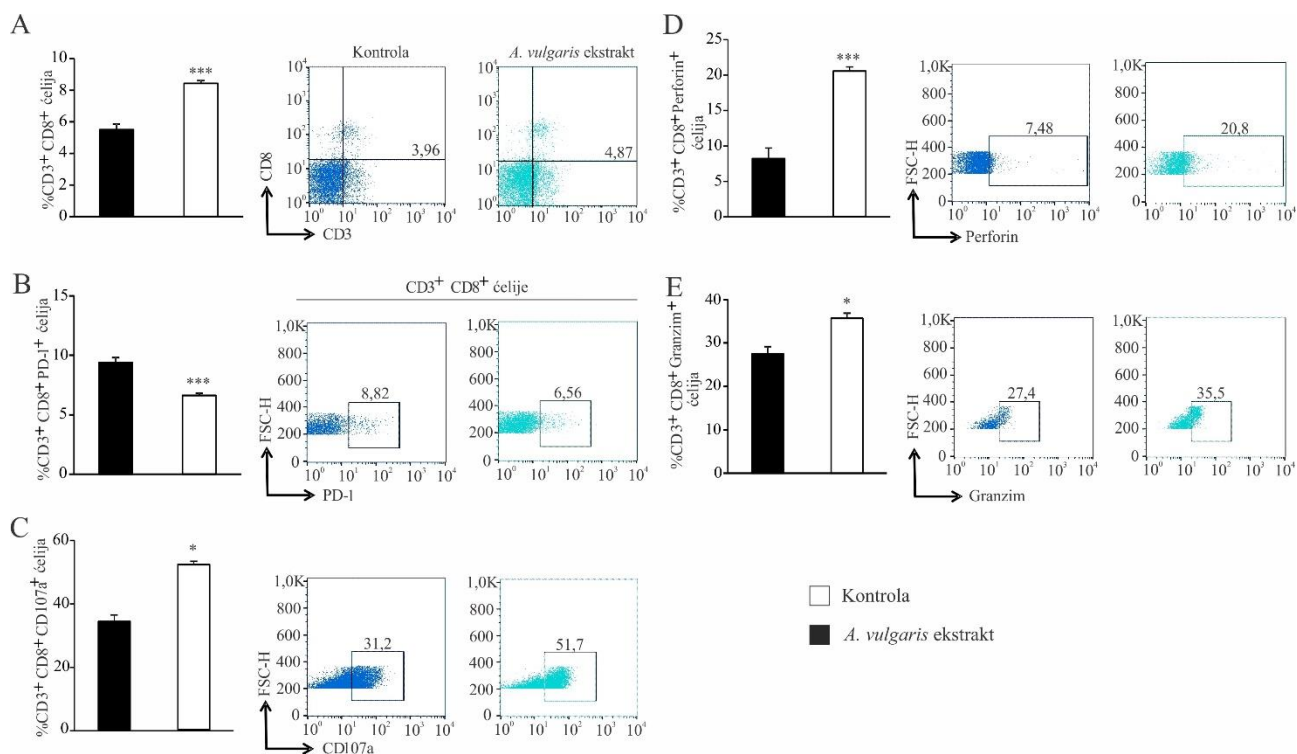
Primećeno je značajno povećanje procenta CD11c<sup>+</sup> DC u slezinama životinja tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* ( $p=0,005$ ; Slika 24 A). Pored toga, otkriveno je povećanje procenta DC koje eksprimiraju CD40 ( $p=0,000$ ; Slika 24 B) i MHC II ( $p=0,000$ ; Slika 24 C) unutar te populacije. Takođe, isti tretman je doveo do povećanja procenta MHC II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> DC u slezinama miševa sa tumorom dojke ( $p=0,000$ ; Slika 24 D).



**Slika 24. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* utiče na fenotip DC u slezinama miševa sa tumorom dojke.** Procenat A)  $CD11c^+$ , B)  $CD11c^+CD40^+$ , C)  $CD11c^+MHC\ II^+$  i D)  $CD11c^+MHC\ II^+CD86^+$  ćelija u slezinama životinja sa tumorom dojke. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su  $SV \pm SEM$  (6 miševa po grupi) reprezentativnog od tri nezavisno ponovljena eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Pored toga, primena ekstrakta *A. vulgaris* je značajno povećala procenat  $CD3^+CD8^+$  T limfocita u slezini miševa sa tumorom dojke ( $p=0,000$ ; Slika 25 A). Takođe, procenat  $CD3^+CD8^+$  T limfocita koje eksprimiraju PD-1 je značajno smanjen nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* ( $p=0,000$ ; Slika 25 B). Sa druge strane, procenat  $CD107a^+$ , perforin<sup>+</sup> i granzim<sup>+</sup>  $CD3^+CD8^+$  T limfocita je značajno povećan u slezinama miševa nakon primene ekstrakta *A. vulgaris* ( $p=0,016$  Slika 25 C;  $p=0,000$  Slika 25 D;  $p=0,033$  Slika 25 E).

Uopšte uzev, za razliku od sistemskog odgovora kod nisko invazivnog melanoma, imunski odgovor u slučaju agresivnog profila tumora dojke pokazuje snažniji potencijal brojčano i funkcionalno u svim segmentima, počev od zastupljenosti i zrelosti APC, preko akumulacije i efikasnosti efektorskih limfocita.

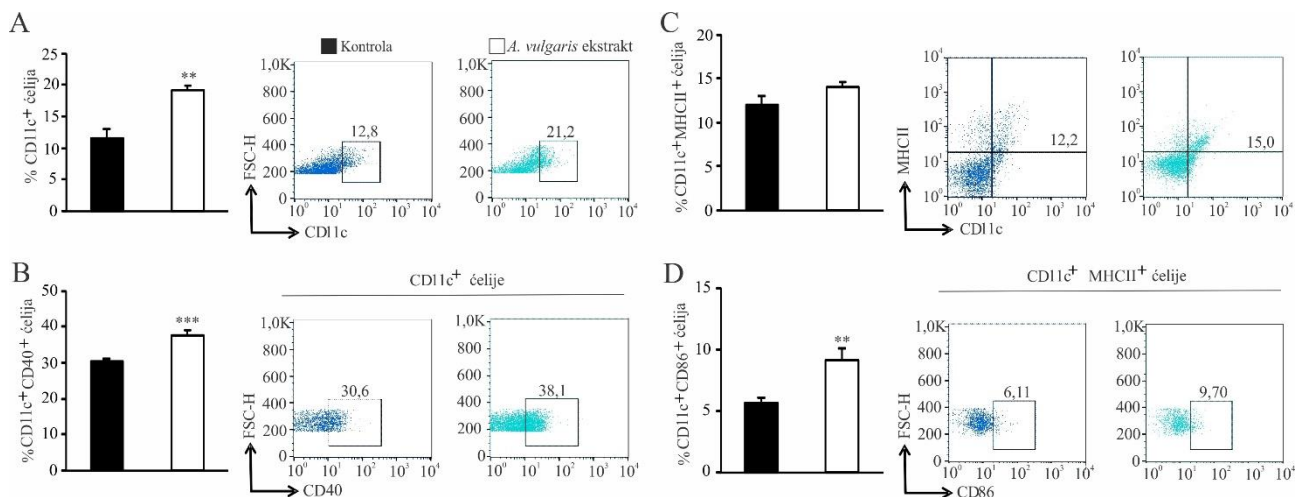


**Slika 25. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* aktivira citotoksične T limfocite u slezinama miševa sa tumorom dojke.** Procenat A)  $CD3^+CD8^+$ , B)  $CD3^+CD8^+PD-1^+$ , C)  $CD3^+CD8^+CD107a^+$ , D)  $CD3^+CD8^+perforin^+$  i E)  $CD3^+CD8^+granzim^+$  ćelija u slezinama životinja sa tumorom dojke. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su  $SV \pm SEM$  (6 miševa po grupi) reprezentativnog od tri zasebna eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.8.4. *A. vulgaris* ekstrakt pojačava lokalni antitumorski imunski odgovor u 4T1 modelu tumora dojke

Nakon 23 dana od početka eksperimenta, životinje su žrtvovane, a tumori su pažljivo uklonjeni hirurškim putem iz šest različitih ježivotinja po grupi radi pripreme jednoćelijskih suspenzija. Ove suspenzije su zatim označene fluorohromom-konjugovanim monoklonskim antitelima i analizirane korišćenjem protočne citofluorimetrije.

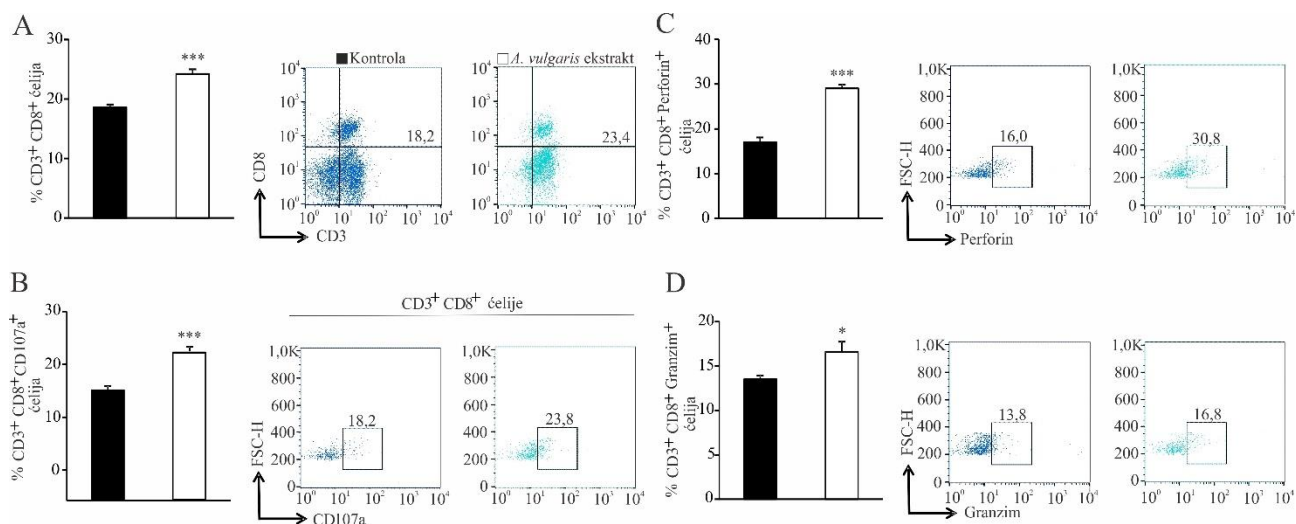
Kada je u pitanju TME, primena ekstrakta *A. vulgaris* je dovela do značajnog povećanja procenta  $CD11c^+$  DC ( $p=0,002$ ; Slika 26 A). Takođe, primećeno je i povećanje procenta  $CD40^+$  DC nakon primene istog tretmana ( $p=0,000$ ; Slika 26 B). Sličan trend je primećen u procentu  $MHC II^+$  (Slika 26 C) i  $MHC II^+CD86^+$  DC ( $p=0,000$ ; Slika 26 D) u primanim tumorima dojke nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*.



**Slika 26. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* utiče na fenotip DC u TME.** Procenat A) CD11c<sup>+</sup>, B) CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, C) CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> i D) CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> ćelija u mikrosredini tumora životinja sa tumorom dojke. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su SV ± SEM (6 miševa po grupi) reprezentativnog od tri zasebna eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Pored toga, tretman ekstraktom *A. vulgaris* je doveo do značajnog povećanja procenta CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita u TME ( $p=0,000$ ; Slika 27 A). Štaviše, procenat CD107a<sup>+</sup>, peforin<sup>+</sup> i granzim<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita u TME je takođe značajno povećan nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris* ( $p=0,000$  Slika 27 B;  $p=0,000$  Slika 27 C;  $p=0,024$  Slika 27 D).

Slično kao na sistemskom nivou, svi konstituenti imunskog odgovora u mikrosredini tumora dojke osnaženi su tretmanom počev od maturacije i prezentacije antigena od strane DC, preko zastupljenosti i efikasnosti efektorskog T ćelijskog imunskog odgovora.

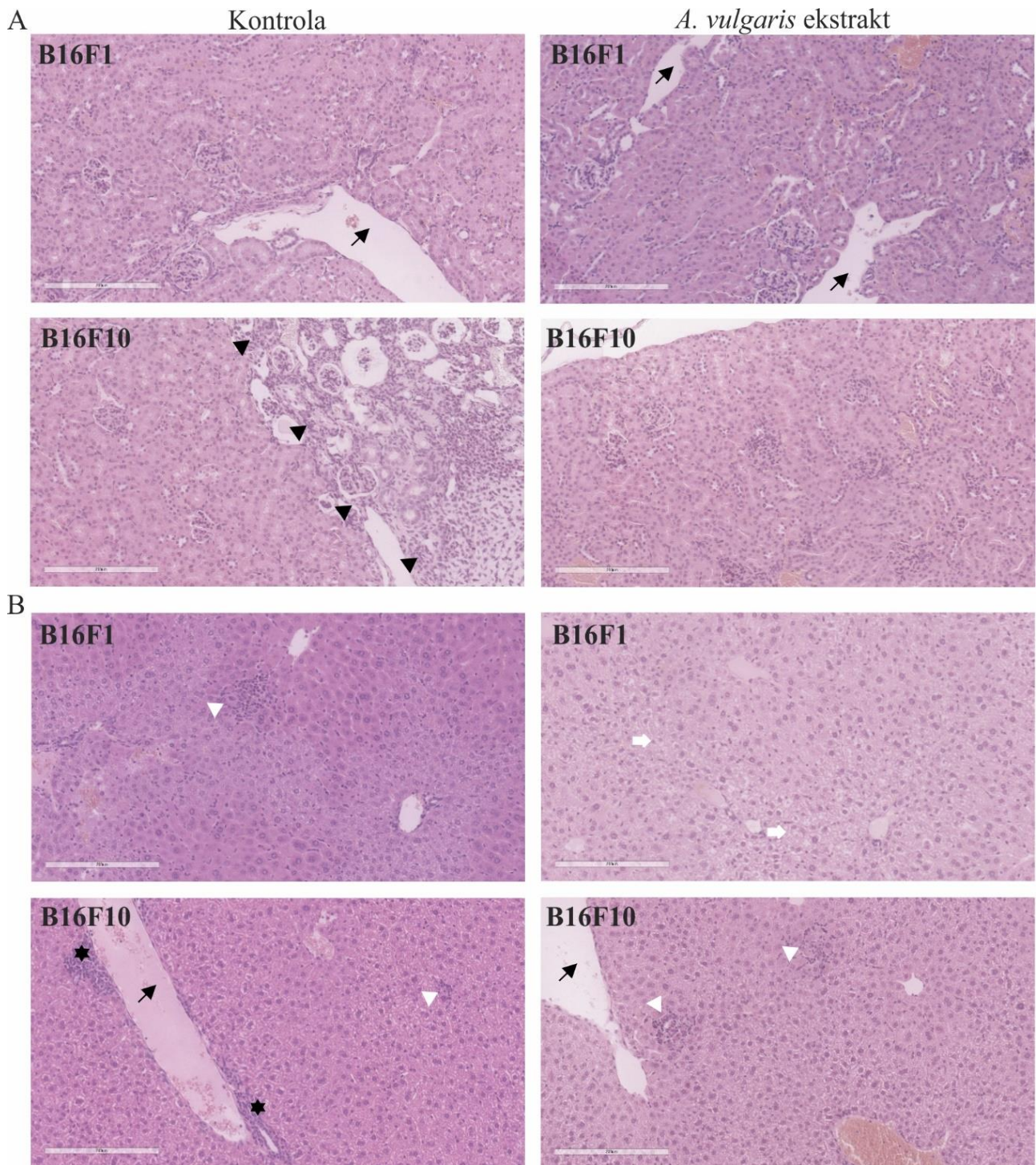


**Slika 27. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* aktivira citotoksične T limfocite u TME.** Procenat A) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, B) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>, C) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> i D) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>granzim<sup>+</sup> ćelija u TME životinja sa tumorom dojke. Životinje su tretirane sa 50 mg/kg ekstrakta *A. vulgaris* dok je kontrolna grupa primala PBS sa istim procentom rastvarača (4% DMSO). Prikazani rezultati su SV ± SEM (šest miševa po grupi) reprezentativnog od tri zasebna eksperimenta. Prikazani su i reprezentativni FACS plotovi. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.9. Uticaj etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* na pojavu sistemske toksičnosti kod C57BL/6 i BALB/C miševa

##### 4.9.1. *A. vulgaris* ekstrakt ostvaruje snažan antitumorski efekat u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma bez značajne sistemske toksičnosti

U svrhu ispitivanja uticaja primenjenog tretmana na zdrava tkiva, mikroskopski su analizirane histopatološke promene na bubrezima (Slika 28 A) i jetri (Slika 28 B) C57BL/6 miševa. Na kraju *in vivo* eksperimenata, životinje su žrtvovane a jetre i bubrezi su hirurški izolovani iz pet različitih životinja po grupi. Nikakve značajne promene nisu primećene na uzorcima tkiva životinja izloženih tretmanu ekstraktom *A. vulgaris*. Identifikovano je samo nekoliko oskudnih mononuklearnih intersticijalnih infiltrata i dilatacija kortikalnih venula u uzorcima tkiva bubrega zajedno sa retkim tubulama sa proteinskim agregatima. Takođe, analiza dilatacije portnih venula, vakuolarizacije periportalnih hepatocita, oskudnih žarišta ekstramedularne hematopoeze i područja infiltracije mononuklearnih ćelija nije pokazala značajne razlike između grupa. Pored evidentnog antitumorskog potencijala ekstrakta *A. vulgaris* na nisko i visoko invazivni melanom koji je ostvaren direktno, a u slučaju B16F1 i kroz interakciju direktnog dejstva na tumorske ćelije i uticaja na TME i sistemski imunski odgovor, isti nije uticao na zdrava tkiva, posebno ona koja su uključena u metabolizam i klirens biološki aktivnih komponenata ekstrakta, što može biti od velikog značaja za ishod lečenja.

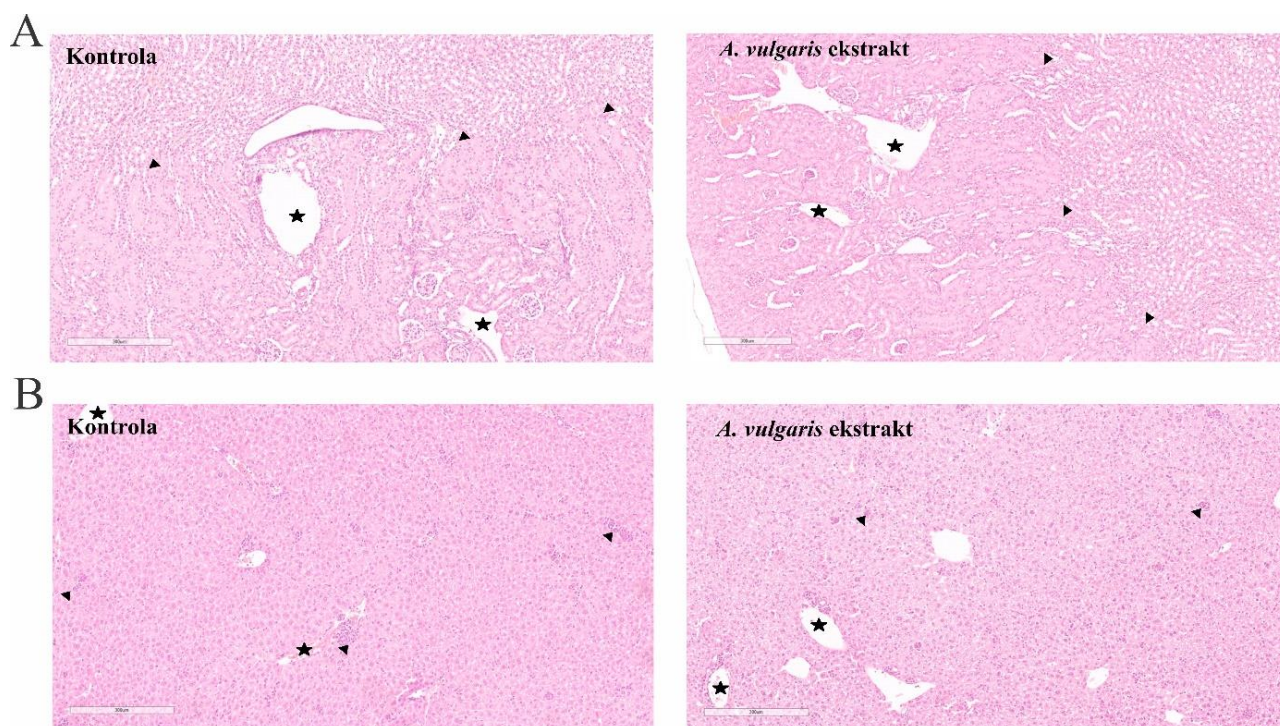


Slika 28. **Tretman ekstraktom *A. vulgaris* ne dovodi do sistemske toksičnosti C57BL/6 miševa u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma.** Reprezentativne mikrografije histopatoloških promena A) bubrega i B) jetre zabeleženih na modelima nisko invazivnog (B16F1) i visoko invazivnog (B16F10) melanoma. Crne strelice označavaju proširene venule. Crni vrhovi strelica razgraničavaju nezrelo bubrežno tkivo sa desne strane od zrelog sa leve strane. Bele strelice označavaju vakuolirane hepatocite. Beli vrhovi strelica pokazuju žarišta inflamatornih infiltrata u tkivu jetre. Sve slike predstavljaju H&E bojenje, uveličanja 200×.



#### 4.9.2. *A. vulgaris* ekstrakt ostvaruje antitumorski efekat na modelu tumora dojke bez značajne sistemske toksičnosti

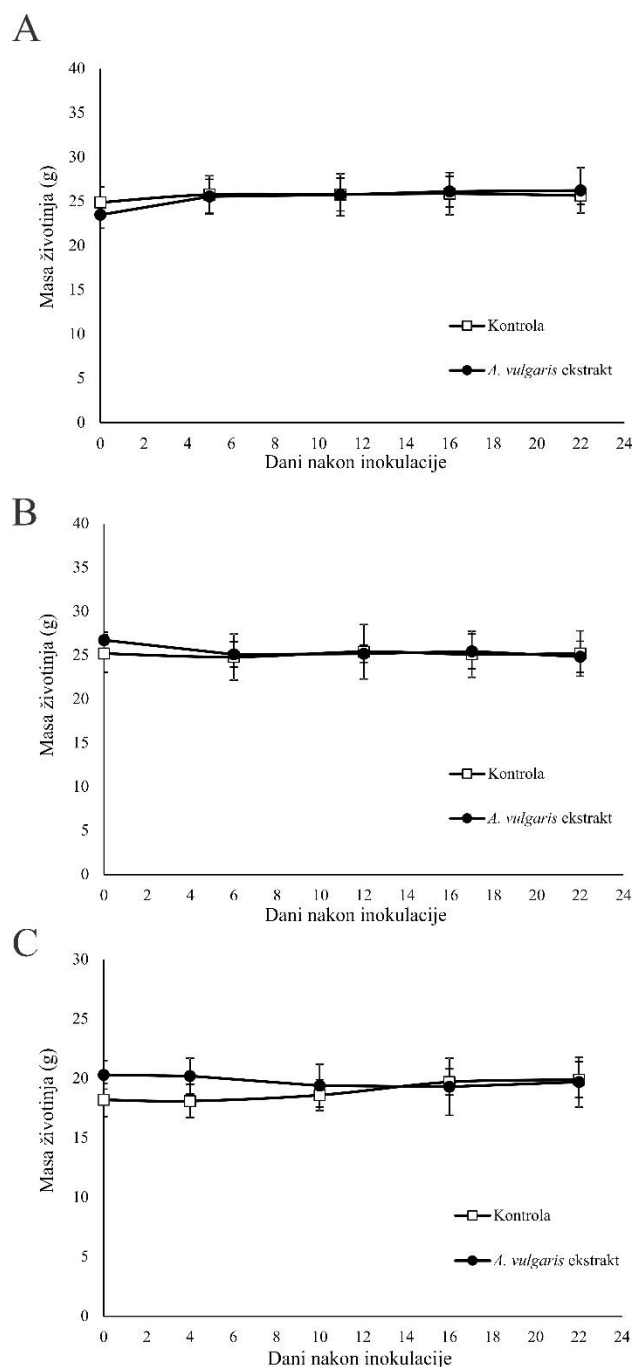
Kako bi se istražio uticaj tretmana ekstraktom *A. vulgaris* na zdrava tkiva, mikroskopski su analizirane histopatološke promene na bubrežima (Slika 29 A) i jetri (Slika 29 B) BALB/C miševa. Po završetku *in vivo* eksperimenata, životinje su žrtvovane a jetre i bubrezi su hirurški izolovana iz pet različitih životinja po grupi. Takođe, kao u prethodnom modelu, nisu primećeni znaci toksičnosti u tkivu bubrega ni u jednoj ispitanjoj grupi. Analiza je pokazala odsustvo atrofije, upale, edema kao i znakova ćelijske smrti. Kao i u bubrežima, analiza tkiva jetre je pokazala uglavnom iste morfološke promene kod kontrolne gupe i grupe tretirane ekstraktom *A. vulgaris*. Registrovana je sinusoidalna ekstramedularna hematopoeza, fokalna dilatacija venula, bez prisustva inflamacije, degeneracije hepatocita, i ćelijske smrti. Uzevši sve u obzir, tretman ekstraktom *A. vulgaris* je ostvario snažan antitumorski efekat na modelu tumora dojke bez sistemske toksičnosti.



Slika 29. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* ne dovodi do sistemske toksičnosti BALB/C miševa u modelu tumora dojke. Reprezentativne mikrografije histopatoloških promena A) bubrega i B) jetre zabeleženih na modelu tumora dojke (4T1). A) Zvezdice označavaju lako dilatirane krvne sudove kore. Vrhovi strelice pokazuju medulu. B) Zvezdice označavaju portne prostore; Vrhovi strelice označavaju fokuse sinusoidalne ekstramedularne hematopoeze. Sve slike predstavljaju H&E bojenje, uveličanja 200x.

#### 4.9.3. *A. vulgaris* ekstrakt nije doveo do promena telesne mase tretiranih životinja u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma i modelu tumora dojke

Kako je promena telesne mase jedan od indikatora toksičnosti primenjenog tretmana, životinjama su merene telesne mase u 5 vremenskih tačaka tokom trajanja eksperimenata. Kako je prikazano na grafikonu 4, tretman ekstraktom *A. vulgaris* nije uticao na promenu telesne mase životinja u sva tri modela (B16F1, B16F10 i 4T1) tokom čitavog trajanja eksperimenata što dodatno ukazuje na odsustvo sistemske toksičnosti.



Grafikon 4. **Tretman ekstraktom *A. vulgaris* ne dovodi promene telesne mase životinja.** A) Nisko invazivni melanom (B16F1) i B) visoko invazivni melanom (B16F10) i C) tumor dojke (4T1). Rezultati su predstavljeni kao SV  $\pm$  SD 10 životinja po eksperimentalnoj grupi.

#### 4.9.4. *A. vulgaris* ekstrakt ne pokazuje toksične efekte u urinu tretiranih životinja u modelima nisko i visoko invazivnog melanoma i modelu tumora dojke

Pored analize histopatoloških promena na tkivima jetre i bubrega, kao i praćenja promene telesne mase životinja, urađena je i semikvantitativna analiza biohemijskih parametara u urinu životinja u sva tri modela. Urin životinja je sakupljan u tri vremenske tačke (početak, sredina i kraj eksperimenta) i biohemijski parametri su određivani korišćenjem Uriscan<sup>®</sup> traka za analizu urina (Tabela 9). Analiza vrednosti svih ispitivanih biohemijskih parametara grupa tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* je pokazala da nema promena u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnim grupama u

sva tri modela tumora (B16F1, B16F10 i 4T1) što ukazuje na izostanak toksičnosti primenjenog tretmana.

**Tabela 9.** Prikaz biohemijskih i hematoloških parametara urina miševa sojeva C57BL/6 i BALB/C nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*

	<b>B16F1</b>		<b>B16F10</b>		<b>4T1</b>	
	<b>Kontrola</b>	<b><i>A. vulgaris</i> ekstrakt</b>	<b>Kontrola</b>	<b><i>A. vulgaris</i> ekstrakt</b>	<b>Kontrola</b>	<b><i>A. vulgaris</i> ekstrakt</b>
Specifična gustina	1028,3 ± 2,6*	1030 ± 0	1029,6 ± 1,4	1028,3 ± 2,6	1030 ± 0	1028,9 ± 2,2
pH	5,7 ± 0,5	6 ± 0	6,1 ± 0,3	6,1 ± 0,2	5,3 ± 0,5	5,6 ± 0,5
Glukoza (mg/100mL)	0	0	0	0	0	0
Nitriti	0	0	0	0	0	0
Proteini (mg/100mL)	22,5 ± 8,2	26,3 ± 7,5	10,3 ± 12,5	10 ± 0	14,4 ± 8,8	15 ± 9,2
Ketoni (mg/100mL)	10 ± 0	11,7 ± 5,8	8,8 ± 2,3	7,5 ± 2,7	6,4 ± 2,4	5 ± 0
Urobilinogen (mg/100mL)	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,4	2,3 ± 1,5	2 ± 1,5	2,1 ± 1,5	1 ± 0
Bilirubin (mg/100mL)	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0	0,6 ± 0,2	0,58 ± 0,2	0	0
Krv (eri/μL)	0	0	0	0	0	0
Leukociti (leu/μL)	0	0	0	0	0	0

\*Rezultati su predstavljeni kao SV ± SD



## **5. Diskusija**



Najviše izučavana biljna jedinjenja sa antitumorskim potencijalom, pored alkaloida, jesu polifenoli, kao najbrojnija i hemijski najraznolikija grupa (klasa) biljnih sekundarnih metabolita. S obzirom da se brojna patološka stanja ne mogu u potpunosti izlečiti upotrebom standardnih lekova, biljni preparati i ekstrakti predstavljaju značajan resurs potencijalnih terapeutika, ali i konceptualnih rešenja zbog visokog sadržaja međusobno kombinovanih i izbalansiranih bioaktivnih jedinjenja što rezultira minimalnim neželjenim efektima [293,294]. Naime, brojna iskustva prikupljena iz etnobotaničkih podataka i kliničke prakse potvrđuju da ukupni biljni ekstrakti ispoljavaju snažnije dejstvo od pojedinačnih izolovanih komponenti zbog mogućnosti međusobnih interakcija bioaktivnih jedinjenja u svom sastavu poput potencijacije, sinergizma ili adicije [295]. Polifenolna jedinjenja kao što su kvercetin, katehini, lignani, flavononi, rasveratrol i kurkumin mogu da izazovu apoptozu tumorskih ćelija, ali i da inhibiraju angiogenezu čime se smanjuje rast tumora [296]. Ova jedinjenja svoj uticaj na tumore ostvaruju direktno delujući na različite signalne puteve uključene u patogenezu raka, ali i indirektno modulacijom imunskog odgovora [297].

Preko 60% konvencionalnih antitumorskih lekova je biljnog porekla. Ovi lekovi su dobijeni direktnom izolacijom iz prirodnog izvora, strukturnom modifikacijom prirodnog jedinjenja ili sintezom novog jedinjenja po uzoru na prirodno jedinjenje [230,231].

Jedna od biljaka koja ima dugu istoriju upotrebe u narodnoj medicini na teritoriji Balkana i za koju se smatra da ispoljava različita biološka svojstva je *Alchemilla vulgaris* agg., u narodu poznatija kao virak ili gospin plašt. Međutim, i pored duge istorije upotrebe u tradicionalnoj medicini u lečenju mnogobrojnih oboljenja, malo je naučnih podataka o antitumorskim svojstvima ove biljke. Naime, antitumorska aktivnost *A. vulgaris* je do sada pokazana u samo dve studije [252,255].

Melanom predstavlja najagresivniji i najsmrtonosniji oblik raka kože. Terapijska strategija melanoma može uključivati pojedinačne agense ili kombinovane terapije u zavisnosti od opšteg zdravstvenog stanja pacijenta, stadijuma bolesti i lokalizacije tumora na koži. Međutim, efikasnost postojećih terapijskih pristupa je ograničena zbog razvoja različitih mehanizama rezistencije i postojanja brojnih neželjnih efekata [298]. Upravo zbog svega navedenog, cilj istraživača je uspostavljanje novih terapijskih protokola koji bi mogli dovesti do zadovoljavajućih rezultata u lečenju malignog melanoma različitog stepena invazivnosti. U tom kontekstu, nekoliko istraživačkih grupa je ukazalo na to da prirodna jedinjenja iz klase polifenola, tačnije flavonoida (apigenin, diosmin, luteolin, kvercetin i drugi), poseduju snažnu antitumorsku aktivnost i imaju potencijal u lečenju melanoma [299].

Sa druge strane, tumor dojke je drugi najčešće dijagnostikovani tip raka i drugi vodeći uzrok smrti u ženskoj populaciji širom sveta [13]. Jedan od najvećih izazova u lečenju ovog tipa maligne bolesti je njegova heterogena priroda na osnovu koje se određuju terapijske opcije [300]. TNBC je najagresivniji oblik tumora dojke i spram toga, od svih ostalih tipova tumora dojke, njegovo lečenje je najmanje uspešno. Uspešnost hemioterapije je svega 22%, a stopa recidiva i pojave metastaza zastrašujuće velika [301]. Uzimajući u obzir nezadovoljavajući ishod lečenja postojećom hemioterapijom, nove terapije za TNBC su preko potrebne. Različita bioaktivna jedinjenja iz biljaka su pokazala sposobnost da selektivno deluju na različite molekularne podtipove raka dojke kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Pokazano je da pojedini izoflavoni (npr. genistein) inhibiraju rast raka dojke, metastaze i indukuju apoptozu putem modulacije različitih signalnih puteva [302]. Takođe, kvercetin potiskuje rast brojnih ćelijskih linija, uključujući i one izvedene iz raka dojke [303].

Upravo činjenica da primena pojedinačnih pristupa u lečenju nije dala zadovoljavajuće rezultate i da je strategija kojom se maligne ćelije služe u fazi ekspanzije bolesti ostala nerazumljiva, prilikom izrade ove teze pošlo se od stanovišta da ukupni ekstrakt nadzemnog dela biljke *A. vulgaris* poseduje značajan broj biološki aktivnih komponenata koje u sadejstvu mogu ispoljiti veći potencijal. Naime, visok sadržaj polifenola i njihova komplementarnost pružaju mogućnost sinhronozovanog delovanja na različitim nivoima, kako direktno na maligne ćelije tako i posredno, na faktore mikrosredine tumora i imunski odgovor. Antitumorski efekat ove biljke je ispitan *in vitro*

na panelu ćelijskih linija melanoma i tumora dojke različitog porekla i stepena invazivnosti. Dalje, isti efekat je potvrđen u mišjim solidnim modelima nisko i visoko invazivnog melanoma i tumora dojke *in vivo*. Pored njegovog direktnog uticaja na tumorske ćelije, važan aspekt ove studije se odnosio na procenu uticaja ekstrakta *A. vulgaris* na sistemski i intratumorski (lokalni) imunski odgovor u pomenutim mišjim modelima.

Analiza hemijskog sastava etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* je pokazala prisustvo 45 jedinjenja koja pripadaju različitim klasama metabolita, pretežno fenolima. Brojne studije su ukazale na potencijalne zdravstvene dobrobiti polifenolnih jedinjenja poreklom iz biljaka. Zbog svojih moćnih antioksidativnih svojstava, biljni polifenoli uključujući fenolne kiseline, flavonoide, katehine, tanine, antocijanidine i druge, mogu sprečiti različite bolesti povezane sa oksidativnim stresom, kao i hronične bolesti, poput raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti [304]. Uprkos njihovoj širokoj zastupljenosti u biljnom carstvu, pomenuta svojstva fenolnih jedinjenja tek su poslednjih nekoliko godina u fokusu istraživanja [299,305]. Oksidativni stres igra važnu ulogu u tumorigenezi [306] te se fenoli sa svojim jakim antioksidativnim svojstvima smatraju korisnim u prevenciji i lečenju oksidativnih oštećenja koja mogu dovesti do nastanka raka. Međutim, uloga oksidativnih jedinjenja u progresiji tumora višestruko odstupa od pravolinijske. Poznato je da visoko invazivne i metastatske ćelije raka mogu zahtevati određenu količinu reaktivnih kiseoničnih jedinjenja za održavanje visokog nivoa proliferacije [307]. Primera radi, maligno transformisane ćelije mogu stvratiti značajno veće količine vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) u poređenju sa odgovarajućim normalnim ćelijama. Ovaj molekul u takvom miljeu aktivira transkripcione faktore regulisane mehanizmima koji uključuju reaktivna jedinjenja, a time i odgovarajuće gene, podstičući preživljavanje i proliferaciju ćelija raka [308]. Polifenoli sa antioksidativnom aktivnošću, poput kvercetina i galne kiseline, mogu da ostvare inhibitorski efekat na deobu ćelija raka, dvostrukim mehanizmima. Sa jedne strane, uklanjanjem  $H_2O_2$  koji proizvode ćelije raka, ali i pokretanjem drastične produkcije ovog molekula kako bi se dostigao nivo oksidativnog stresa u ćelijama raka koji bi ih vitalno ugrozio [309]. Pored antioksidativnih svojstava, polifenoli (npr. kvercetin i izokvercein) takođe utiču na aktivnost brojnih enzima i ćelijskih receptora, što ukazuje i na druga specifična dejstva u prevenciji i lečenju nekoliko bolesti, uključujući i rak [305]. Na primer, određena fenolna jedinjenja se povezuju sa regulacijom ekspresije gena uključenih u ćelijsku proliferaciju i apoptozu, kako *in vitro* tako i *in vivo*. Flavonoidi pripadaju klasi polifenolnih jedinjenja i brojni podaci ukazuju na njihov snažan uticaj na zdravlje ljudi. Nekoliko *in vitro* i *in vivo* studija pokazuje da flavonoidi, kao na primer kvercetin, rutin, izokvercetin, i galna kiselina, mogu zaustaviti različite faze kancerogeneze i to ne samo antioksidativnom aktivnošću već i drugim mehanizmima [310–315]. Pokazano je da flavonoidi utiču na ključne enzime i receptore uključene u puteve transdukcije signala ćelijske proliferacije, diferencijacije, apoptoze, inflamacije, angiogeneze i metastaziranja [316]. Jedinjenja iz grupe flavonola – kvercetin, rutin i izokvercetin, bilo kao glikozidi ili aglikoni, pokazuju antioksidativno, antiproliferativno, antiinflamatorno, antihipertenzivno i antidijabetičko dejstvo [317]. Specifičnost prirodnih jedinjenja je u njihovoj visokoj prilagodljivosti koja se ogleda u podršci zdravom tkivu i istovremenom saniranju patoloških stanja. Ovaj dvostruki potencijal određenih ekstrakata ili izolovanih prirodnih jedinjenja je često neobjašnjiv i mehanizmi koje oni pokreću mogu čak biti suprotni u različitim tkivima i ćelijama. Pa tako, izokvercetin sprečava lipidnu peroksidaciju ometanjem ksantin oksidaze ili putem direktnog uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika, ispoljavajući na taj način protektivno dejstvo [318]. Sa druge strane, isto jedinjenje menja aktivnost signalnih puteva uključenih u progresiju tumora, kao što su Wnt ili MAPK signalni put, direktno utičući na njegov rast [319]. Slično, kvercetin, pored svojih jakih citoprotektivnih sposobnosti, utiče na progresiju ćelijskog ciklusa u neoplastičnim ćelijama, inhibirajući njihovu proliferaciju, izazivajući programiranu ćelijsku smrt tipa I i II i sprečavajući metastaziranje [320]. U skladu sa tim, prethodno je pokazano da kvercetin značajno smanjuje rast primarnog melanoma u singenom modelu B16-BL6 uz značajno smanjenje broja metastatskih kolonija na plućima *in vivo*. Takođe, u istoj studiji je pokazana smanjena invazija B16-BL6 ćelija *in vitro* [321]. Pored toga, kvercetin inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu B16 ćelija melanoma *in*



*vitro* [322]. Štaviše, u subkutanom modelu melanoma indukovanog B16F10 ćelijama, kvercetin značajno smanjuje rast primarnog tumora [323]. Dodatno, Cao i saradnici su pokazali da kvercetin inhibira proliferaciju A375 ćelija melanoma, indukuje apoptozu, smanjuje migraciju i invaziju *in vitro* i inhibira pojavu metastaza na plućima u B16F10 intravenskom modelu *in vivo* [324]. Između ostalog, kvercetin je indukovao apoptozu i inhibirao proliferaciju MCF-7 i MDA-MB-231 ćelija humanog tumora dojke [325,326], kao i 4T1 ćelija mišjeg tumora dojke [327].

Pored toga, neka biljna jedinjenja poseduju visok selektivni potencijal i deluju kao ciljana terapija utičući na signalne puteve ili molekule važne za održavanje malignog fenotipa. Na primer, galna kiselina funkcioniše kao antagonist receptora epidermalnog faktora rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), potiskujući progresiju NSCLC uslovljenu ekspresijom i aktivnošću receptora za EGF [328]. Takođe, prethodno je pokazano da galna kiselina izaziva apoptozu MCF-7 ćelija humanog tumora dojke [329,330]. Istovremeno, galna kiselina indukuje apoptozu, i smanjuje migraciju i invaziju A375 ćelija humanog melanoma *in vitro* [331,332]. Još jedno jedinjenje prisutno u ekstraktu *A. vulgaris* – kempferol blagotvorno deluje na ljudsko zdravlje smanjujući rizik od hroničnih i malignih bolesti [333–335]. Pokazano je da kempferol reguliše glavne signalne puteve povezane sa apoptozom, angiogenezom, inflamacijom i metastaziranjem [333,335,336]. Štaviše, navodi se da kempferol inhibira migraciju i invaziju meduloblastoma i ćelija raka dojke [337,338]. Istovremeno, ovaj molekul pokazuje značajne antitumorske efekte na A375 ćelije humanog melanoma putem indukcije apoptoze, zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, i smanjenjem migracije [339]. Dodatno, ovo i njemu slična jedinjenja dobijena iz biljaka se koriste u kombinaciji sa hemio- i radioterapijom [340,341].

Takođe, elaginska kiselina prisutna u ekstraktu *A. vulgaris* ispoljava antioksidativne efekte bilo direktnim delovanjem ili posredno, aktiviranjem ćelijskih antioksidativnih enzimskih sistema [342,343]. Pored toga, utvrđeno je da elaginska kiselina inhibira proliferaciju tumorskih ćelija, indukuje apoptozu, inhibira migraciju, invaziju, i proliferaciju ćelija melanoma [344], kao i da remeti proces angiogeneze [345]. Ovaj efekat je uočen i u ksenograft modelu tumora dojke *in vivo* [346].

Osim pomenutih komponenata koje ulaze u sastav ekstrakta *A. vulgaris* – kvercetina, izokvercetina, kempferola, galne i elaginske kiseline, još nekoliko drugih jedinjenja prisutnih u ekstraktu korišćenom u ovoj studiji imaju potencijal da individualno utiču na progresiju tumora ali i indirektno, kroz interakcije sa prisutnim jedinjenjima u njegovom sastavu.

U našoj preliminarnoj studiji [252] gde je prvobitno dat osvrt i na sastav različitih tipova ekstrakata *A. vulgars* sa područja Srbije (vodeni, etanolni, metanolni i etil-acetatni), pokazano je da su od analiziranih polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu najzastupljeniji hlorogenska kiselina i luteolin-7-*O*- $\beta$ -glukozid, dok su neki poput kofeinske kiseline, rutina, kempferola-3-*O*-glukozida i drugih zastupljeni u manjoj meri. Biljni materijal korišćen u toj studiji je sakupljen sa istog područja, ali u ranijem periodu godine što se može dovesti u vezu sa razlikama u hemijskom sastavu u odnosu na ekstrakt korišćen u ovoj studiji jer veliki broj različitih faktora poput (mikro)klimatskih prilika, fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta, kao i vremena sakupljanja, ima veliki uticaj na hemijski sastav i sadržaj biljnih bioaktivnih komponenti. Pored toga, u zavisnosti od vrste i uslova ekstrakcije, sadržaj bioaktivnih jedinjenja u biljnim ekstraktima može značajno da se razlikuje što pruža dodatno objašnjenje uočenih razlika.

Zbog visokog sadržaja fenolnih jedinjenja etanolni ekstrakt *A. vulgaris* je ispoljio snažan antitumorski potencijal na različitim ćelijskim linijama melanoma i tumora dojke humanog i mišjeg porekla (A375, 518A2, FemX, B16F1, B16F10, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-468 i 4T1). Naime, testirani ekstrakt *A. vulgaris* je doveo do dozno-zavisnog pada vijabiliteta svih ispitanih ćelijskih linija sa IC<sub>50</sub> vrednostima u različitom opsegu koncentracija i najpotentnijim efektom na B16F1 i 4T1 ćelijama. Očekivano, zbog svoje visoko invazivne prirode, ćelijska linija melanoma B16F10 je slabije odgovorila na tretman u odnosu na nisko invazivni klon B16F1 u *in*

*vitro* uslovima. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim studijama gde je pokazano da *A. vulgaris* ekstrakti nadzemnog dela biljke dobijeni različitim procesima ekstrakcije snažno smanjuju vijabilitet tumorskih ćelija *in vitro* kao što su estrogen-zavisni tumori ženskih reproduktivnih organa (HeLa i A2780), ćelijske linije tumora dojke (MCF-7) i prostate (PC-3) [252]. Pored toga, pokazano je i da metanolni ekstrakt korena biljke *A. vulgaris* poseduje izuzetnu citotoksičnu aktivnost protiv humanih ćelijskih linija prostate (PC-3), tumora dojke (MCF-7) i kolorektalnog karcinoma (Caco2) [255]. Sa druge strane, ekstrakt virka primenjen u najvišim koncentracijama koje su testirane na tumorskim ćelijama nije doveo do narušavanja vijabiliteta primarne kulture – ćelija peritonealnog eksudata miša. Ovaj podatak sugerise selektivnost testiranog ekstrakta prema malignom fenotipu i u skladu je sa raspoloživim podacima u literaturi koji ukazuju na to da fenoli prisutni u ekstraktu nisu ispoljili citotoksični efekat na zdrave ćelije [347]. Slično je i sa metanolnim ekstraktom korena biljke *A. vulgaris* koji nije uticao na vijabilitet primarnih transformiranih Vero ćelija [255].

Literaturni podaci ukazuju na činjenicu da razlike u unutarćelijskim karakteristikama ali i trenutni metabolički status nisko i visoko invazivnih ćelija melanoma B16F1 i B16F10 mogu biti odgovorni za različite reakcije ovih ćelija na isti stimulus [348–350]. Naime, rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da je tretman ekstraktom *A. vulgaris* nije istovetno delovao na ćelije melanoma različitog stepena agresivnosti. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* je indukovao programiranu ćelijsku smrt tipa II – autofagiju u nisko invazivnim ćelijama melanoma B16F1. Detektovana autofagija je dalje potvrđena na unutarćelijskom nivou analizom relevantnih proteina za proces autofagije kao što su beclin-1, p62 i izoforme proteina LC3B I i II. Autofagija je proces koji se odigrava i u fiziološkim i u patološkim stanjima. U regionima gde dolazi do povećane stope ćelijske smrti mogu se naći mnogobrojne ćelije zahvaćene procesom autofagije. Međutim, reč je o procesu koji posreduju ambivalentni potencijal te aktivacija autofagije nije nužno i potvrda realizacije ćelijske smrti autodestrukcijom. Primera radi, u uslovima gladovanja može se uočiti veliki broj ćelija u procesu autofagije. Međutim, autofagija u ovom slučaju sprečava nekrozu izazvanu gladovanjem dok inhibicija autofagije ubrzava, a ne prevenira ćelijsku smrt [351]. Stoga se korišćenjem termina ćelijska smrt autofagijom definiše i njena uloga [352]. Ovaj termin treba koristiti samo u situaciji kada je korišćenjem inhibitora potvrđeno njeno citodestruktivno delovanje. U ovoj studiji, istovremeni tretman inhibitorom autofagije 3-MA je doveo do oporavka vijabiliteta B16F1 ćelija, čime se jasno ukazuje na destruktivnu prirodu ovog procesa. Iako veliki broj dokaza sugerise ključnu ulogu apoptoze u supresiji rasta tumora, eliminacija ćelija raka takođe može biti posredovana programiranom ćelijskom smrću tipa II – autofagijom. Postoje dokazi da je inhibicija autofagije povezana sa tumorigenezom, što potvrđuje esencijalnu ulogu ovog procesa u reparaciji oštećenja. Na primer, zabeleženi su niži nivoi proteina beklina-1 kod raka jajnika, dojke i prostate [353]. Štaviše, miševi koji su heterozigoti za beclin-1 gen imaju veći rizik od tumorigeneze [353,354]. Pored toga, mutacije koje dovode do gubitka funkcije LC3 podstiču progresiju glioblastoma [355] što sugerise da rezistencija na indukciju autofagije može usloviti progresiju tumora. Tretman ekstraktom *A. vulgaris* u ovoj studiji je doveo do povećanja nivoa ekspresije proteina uključenih u proces autofagije (beclin-1, p62 i LC3B) što na unutarćelijskom nivou potvrđuje detektovanu autofagiju. Za razliku od B16F1 ćelija, ekstrakt *A. vulgaris* je izazvao apoptozu visoko invazivnih ćelija melanoma B16F10. Ovaj efekat je potvrđen analizom relativne ekspresije dva proteina ključna za realizaciju procesa apoptoze, Bcl-2 i BAX, koji deluju kao inhibitor odnosno promoter ovog procesa i njihov odnos se smatra prognostičkim markerom kod različitih tipova raka [356]. BAX i Bcl-2 su glavni članovi Bcl-2 porodice proteina čije su uloge u progresiji tumora i prognozi različitih tipova humanih maligniteta bile u fokusu brojnih studija tokom poslednjih godina. BAX promovise apoptozu kroz permeabilizaciju spoljašnje membrane mitohondrija kao odgovor na različite stimulse. Nasuprot tome, Bcl-2 sprečava ovaj proces tako što inhibira BAX [357,358]. Prethodne studije su pokazale pozitivnu korelaciju između povećane ekspresije BAX u tumorskim ćelijama i produženog preživljavanja pacijenata [359,360]. Takođe, na grupi pacijenata koji su podvrgnuti samo operaciji je pokazano da je visoka ekspresija BAX povezana sa boljim preživljavanjem [361]. U skladu sa ovim, nakon tretmana ekstraktom *A.*

*vulgaris* detektovana je povećana ekspresija BAX proteina koji omogućava propagaciju signala i realizaciju apoptoze u B16F10 ćelijama. U isto vreme, ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 je bila smanjena pod tretmanom. Indukcija programirane ćelijske smrti tipa I – apoptoze leži u osnovi antitumorske aktivnosti brojnih prirodnih jedinjenja [362–364]. Takođe, pokazano je da veliki broj fenolnih jedinjenja ispoljava proapoptotska svojstva u različitim ćelijskim linijama humanih tumora pluća, debelog creva, dojke, prostate i leukemije [365]. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno opisanim zaustavljanjem PC-3 ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa i indukcijom apoptoze nakon tretmana metanolnim ekstraktom korena biljke *A. vulgaris* [255]. Međutim, tretman B16F10 ćelija nije indukovao aktivaciju kaspaza. Iako su ovi enzimi važni posrednici apoptoze, poznato je da do ove vrste ćelijske smrti može doći i bez njihovog učešća [366]. Pored toga, obe ćelijske linije su pokazale gubitak potencijala deobe nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*. Konačno, tretman ekstraktom *A. vulgaris* doveo je do snažne produkcije ROS/RNS kod obe ćelijske linije melanoma, sa izraženijim efektom na visoko invazivnim B16F10 ćelijama. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima u literaturi gde je pokazano da galna kiselina i kvercetin, jedinjenja prisutna u ekstraktu *A. vulgaris*, mogu izazvati snažnu produkciju ROS u ćelijama raka i time inhibirati njihovu proliferaciju [309]. Takođe, ovaj efekat na B16F10 ćelijama može biti povezan sa detektovanom apoptozom jer je već opisano u literaturi da je indukcija apoptoze rezultat proizvodnje velike količine ROS [367].

MAPK i PI3K/Akt signalni putevi imaju fundamentalnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji, rastu, diferencijaciji, pokretljivosti, odgovoru na stres, apoptozi i preživljavanju. Konstitutivna aktivacija MAPK i Akt signalnih puteva je čest događaj prilikom formiranju tumora i može dovesti do nekontrolisane proliferacije i preživljavanja što posledično dovodi do neoplastične transformacije i progresije [368,369]. Aktivacija MAPK i Akt signalnih puteva kod malignih tumora može biti pokrenuta pomoću nekoliko mehanizama, uključujući konstitutivnu aktivaciju tirozin kinazanih receptora koja može biti rezultat somatskih mutacija, amplifikacije gena kao i povećanih autokrinih ili parakrinih signala [368,370,371]. Uzimajući ovo u obzir, inhibicija ovih signalnih puteva može dovesti do antitumorskog efekta. Posledično, mnogi dvostruki inhibitori Raf/MEK i PI3K/mTOR su dospeli do I faze kliničkih studija [372–374]. Takođe su inhibitori MAPK signalnog puta doveli do značajnog napretka u lečenju pacijenata sa melanomom [375]. U ovoj studiji, tretman obe ćelijske linije melanoma (B16F1 i B16F10) ekstraktom *A. vulgaris* doveo je do značajnog smanjenja ekspresije ERK1/2 i Akt proteina. Ovi rezultati su u skladu sa uočenom inhibicijom proliferacije ćelija B16F1 i B16F10 pod tretmanom. Pored svojih efekata na proliferaciju ćelija, Akt je poznat i kao negativni regulator nekih proapoptotskih proteina, stoga inhibicija Akt kod B16F10 ćelija ide u prilog detektovanoj apoptozi. Dok je efekat tretmana bio isti na uzvodnom delu signalnih puteva, situacija je drugačija kod nizvodne kaskade. Naime, ekspresija p70S6K ostaje nepromenjena kod B16F1 ćelija, omogućavajući autofagiju i na taj način utičući na vijabilitet ćelija. Istovremeno, ovaj rezultat podržava uspostavljanje senescencije u preživeloj frakciji B16F1 ćelija [290,291]. Nasuprot tome, u visoko invazivnim B16F10 ćelijama, ekstrakt *A. vulgaris* dovodi do smanjene ekspresije p70S6K što rezultira pozitivnom regulacijom apoptotskog procesa.

Ozbiljni nedostaci u zaključcima koji proizilaze iz eksperimenata izvedenih u ćelijskoj kulturi se odnose na uprošćen sistem i nedostatak kompleksnosti koji bi odgovarao onome što se dešava u malignim bolestima. Kako bi se ispitao antitumorski potencijal ekstrakta *A. vulgaris* u kontekstu prethodno navedenog, pored *in vitro* sistema njegovi efekti su procenjeni i *in vivo* korišćenjem singenih modela melanoma niske i visoke invazivnosti. Ovaj pristup omogućava da se stekne uvid u osnovne razlike u odgovoru na primenjeno lečenje primarnog solidnog tumora različitog stepena diferencijacije i shodno tome agresivnosti. Osetljivost na primenjeni tretman detektovana *in vitro* bila je visoko reproducibilna *in vivo*. Naime, zabeleženo je značajno smanjenje finalne zapremine primarnog tumora u oba modela, ali sa jednom značajnom razlikom. Dok je *in vitro* odgovor B16F1 ćelija na tretman ekstraktom *A. vulgaris* bio značajno veći u poređenju sa B16F10 ćelijama, kako je i očekivano s obzirom na njihovu invazivnu prirodu, *in vivo* tretman je rezultirao očiglednim smanjenjem tumora u oba modela, ali ovog puta sa izraženijim efektom kod tumora indukovanih

B16F10 ćelijama. Ovo zapažanje podvlači specifičnost ekstrakta *A. vulgaris* da ispoljava još snažnije antitumorsko dejstvo u uznapredovalim stadijumima bolesti, što je posledica složenih interakcija unutar i izvan tumorskog tkiva. Histopatološka analiza tumora je pokazala da tretman *A. vulgaris* dovodi do pojačane nekroze kod visoko invazivnog modela tumora (B16F10), dok ovaj efekat izostaje u modelu tumora indukovanim subkutanom inokulacijom F1 generacije B16 ćelija. Sa druge strane, kod nisko invazivnog modela uočene su velike apoptotske regije kao i značajno smanjen mitotski indeks. Ovde posebno dolazi do izražaja značajno odstupanje podataka dobijenih upotrebom protočne citofluorimetrije *in vitro* od onih dobijenih *in vivo*, i najbolji je primer značaja TME i međusobnih interakcija ćelija koje ga čine za realizaciju potpunog antitumorskog efekta primenjenog leka. Osim sinhronizovane inhibicije proliferacije zabeležene i *in vitro* i *in vivo*, potpuno odsustvo apoptoze bio je očigledno u kulturama B16F1 dok su u uzorcima tkiva bile evidentne velike apoptotske regije izazvane tretmanom. Značajna nekroza izazavana ekstraktom *A. vulgaris* u uzorcima tkiva dobijenih iz B16F10 modela je u neskladu sa dominantnom programiranom ćelijskom smrću – apoptozom utvrđenom *in vitro* u ćelijskoj kulturi izloženoj tretmanu. Za razliku od ćelijske kulture, u tkivu se apoptotske ćelije uklanjaju fagocitozom koja je praćena uspostavljanjem antiinflamatornog ambijenta. Štaviše, masivna apoptoza koja je u osnovi primenjene radio- i hemioterapije, ukoliko nije izbalansirana sa drugim signalima koji ograničavaju antiinflamatorne i mitogene stimuluse koji se isporučuju direktnom ili indirektnom međućelijskom komunikacijom u područjima zahvaćenim apoptozom, promovise progresiju tumora i imunološko bekstvo kao i repopulaciju tumora do koje dolazi u odgovoru na radio- i hemioterapiju [376]. Delimično iz ovih razloga, utisak je da ukupni biljni ekstrakti zbog visokog sadržaja bioaktivnih jedinjenja sa sinergističkim interakcijama, utiču na TME na više različitih nivoa za razliku od dobro definisanih neselektivnih hemioterapeutika.

Pored modela melanoma niske i visoke invazivnosti, u ovoj studiji je korišćen i model tumora dojke. Efikasnost ekstrakta *A. vulgaris* je najpre detaljno ispitana na visoko agresivnim ćelijama tumora dojke mišjeg porekla (4T1) u kulturi a zatim je ista procenjena u singenom modelu tumora dojke *in vivo*. Protočna citofluorimetrija i fluorescentna mikroskopija su pokazale da ekstrakt *A. vulgaris* indukuje apoptozu 4T1 ćelija zavisnu od kaspaza. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim podacima u literaturi [255]. Takođe, mnoga prirodna jedinjenja izolovana iz biljaka indukuju apoptozu [362–364]. U ovoj studiji je saglasno tome i pokazano da tretman ekstraktom *A. vulgaris* dovodi do apoptoze visoko invazivne ćelijske linije melanoma B16F10. Pored detektovane apoptoze, uočena je značajna autofagija u 4T1 ćelijama izloženim ekstraktu *A. vulgaris*. Obzirom da je istovremeni tretman sa inhibitorom autofagije hlorokinom rezultirao oporavkom vijabiliteta ćelija, potvrđen je doprinos ovog procesa destruktivnoj aktivnosti tretmana. Kako je ranije pomenuto, isti fenomen je opisan i u kulturi B16F1 ćelija. Paralelno, snažna produkcija ROS/RNS zabeležena u kulturi 4T1 ćelija može biti dodatno odgovorna za citocidni efekat ekstrakta *A. vulgaris* [377].

Metastaziranje je proces u kome dolazi do desiminacije tumorskih ćelija iz primarnog tumora i naseljavanja i rasta u udaljenim sekundarnim tkivima i organima. Do nedavno su se istraživanja raka primarno fokusirala na razvijanje novih metoda ili agenasa koji će pomoći u otkrivanju tumora u ranoj fazi kao i na agense koji će inhibirati njegov rast. Napredak na ovom polju je doveo do toga da se sada većina solidnih tumora može izlečiti ako se dijagnostikuju i leče pre pojave metastaza. Međutim, kada dođe do širenja tumora izvan inicijalnog primarnog mesta nastanka, lečenje je mnogo kompleksnije i sa značajno manjim učinkom [378]. Zbog ozbiljnih nedostataka u razumevanju mehanizama koji leže u osnovi metastatskog procesa, postignut je ograničen uspeh u prevenciji i lečenju metastaza iako sadašnja nova generacija lekova protiv raka (pretežno neutrališuća antitela za faktore rasta i mali molekuli inhibitori kinaza) pokazuju efekte i na metastaze pored efekta na sam primarni tumor [379]. Napredak u razumevanju metastaziranja na molekularnom i ćelijskom nivou kao i na nivou signalnih puteva, bi pružio nove potencijalne mete za terapiju metastaza. Ovo se posebno odnosi na biohemijske procese i signalne puteve uključene u

odvajanje ćelija, migraciju, invaziju, adheziju i komunikaciju ćelija raka sa svojim mikrookruženjem.

4T1 ćelije su dobro poznate kao model najagresivnijeg oblika raka dojke sa visokim potencijalom za formiranje udaljenih metastaza u različitim organima [380,381]. U skladu sa efektom postignutim na ćelijama melanoma, tretman ekstraktom *A. vulgaris* je inhibirao proliferaciju 4T1 ćelija u kulturi. Takođe, isti tretman je značajno smanjio njihovu sposobnost da popune prazninu nastalu formiranjem rane ili da migriraju kroz porozne membrane privučene hemostimulusom. Pored toga, potencijal 4T1 ćelija da prođu kroz rekonstruisanu barijeru bazalne membrane je takođe značajno smanjen, potvrđujući da je tretman uticao i na invazivni potencijal ćelija. Ovaj rezultat predviđa smanjen prodor 4T1 ćelija u okolna tkiva *in vivo* nakon izlaganja ekstraktu *A. vulgaris*. Uzevši sve u obzir, pretretman subtoksičnom koncentracijom ekstrakta *A. vulgaris* koji ne smanjuje vijabilitet ćelija je značajno uticao na sve karakteristike važne za metastatski proces – adhezivnost, migraciju, invaziju i potencijal ćelija za formiranje kolonija. Istovremeno, tretman ekstraktom *A. vulgaris* je značajno inhibirao relativnu ekspresiju integrina  $\beta$ -1, FAK, vinkulina i  $\alpha$ -SMA. Prema literaturnim podacima, adhezija ćelija za ECM je ključan događaj u pokretanju metastatske kaskade [286]. Proteini koji povezuju ECM sa intracelularnim citoskeletom imaju važnu ulogu u adheziji, migraciji i invaziji. Literatura podržava činjenicu da migracioni potencijal tumorskih ćelija i invazivnost tumora zavise od integrinskog signalnog puta i propagacije nizvodnog signala, povezujući ECM sa unutarćelijskim citoskeletom, čime se omogućava adekvatan odgovor ćelija na signal spolja. Integrini se smatraju glavnim transmembranskim receptorima ćelijske adhezije koji imaju višestruke uloge [382,383]. Funkcije integrina zavise od delikatne ravnoteže između aktivnog i neaktivnog stanja putem više različitih mehanizama uključujući protein-protein interakcije i konformacione promene [384]. Ovi procesi se pokreću signalima koji potiču iznutra i spolja što rezultira propagacijom nizvodnog signala koji se ostvaruje kroz interakcije citoplazmatične  $\beta$ -subjedinice integrinskog receptora sa adapterskim proteinima kao što su  $\alpha$ -aktinin, talin, paksilin i vinkulin. Pored adapterskih proteina, unutarćelijska citoskeletna mašinerija i integrinski receptor mogu biti povezani i preko signalnih kinaza poput FAK, tirozin kinaze iz Src familije ili kinaze povezane sa integrinom (engl. *Integrin-Linked Kinase*, ILK) kao i malih G-proteina (Rho) [385–388]. Svi proteini koji omogućavaju ove kontakte deo su složenih struktura koje se nazivaju fokalne adhezije. Njihovo formiranje i rastavljanje je proces koji se dinamično reguliše tokom migracije tumorskih ćelija [286,389]. Uloga integrina  $\beta$ -1 kod malignih tumora zadobija veliku pažnju [390]. Prethodne studije su sugerisale da je integrin  $\beta$ -1 prekomerno eksprimiran u tumorskim ćelijama i da kontroliše različite procese uključujući angiogenezu, progresiju tumora i metastaziranje [391–396]. Druge studije su takođe pokazale da kod mnogih tipova malignih tumora integrin  $\beta$ -1 može izazvati rezistenciju na radio-, hemioterapiju i ciljanu terapiju [397–401]. Na osnovu ovih nalaza, integrin  $\beta$ -1 je intenzivno proučavan i pokazano je da je njegova prekomerena ekspresija na nivou proteina ili RNK loš prognostički faktor za pacijente sa nekoliko tipova tumora, uključujući rak pluća [402–405], želuca [406], dojke [407–409], prostate [410], pankreasa [411,412] i kolorektalnog karcinoma [413,414] što ga čini potencijalnim targetom za antitumorsku terapiju. Nasuprot tome, negativna regulacija integrina  $\beta$ -1 je dobar znak i poželjni terapijski odgovor ćelija kao što je primećeno i u ovoj studiji nakon izlaganja 4T1 ćelija ekstraktu *A. vulgaris*, a koji utiče i na svaki sledeći korak u metastatskoj kaskadi.

FAK je ključni regulator različitih ćelijskih procesa poput preživljavanja, proliferacije ćelija, migracije i invazije. Ova tirozin kinaza prenosi signal od fokalnih adhezija do ćelijskog citoskeleta [389]. FAK direktno učestvuje u kontroli oblika ćelija i migraciji tako što povezuje adaptorske proteine sa aktinom. Kako integrinski receptor nema sopstvenu enzimsku aktivnost, FAK prenosi signal sa integrinskih receptora na aktinske filamente i to vrši tako što fosforiliše različite proteine povezane sa ovim receptorom [389,415,416]. Dobro je poznato da je prekomerna ekspresija FAK povezana sa širokim spektrom karcinoma kod ljudi. Dalje, visok nivo ekspresije FAK je direktno povezan sa invazivnim potencijalom tumora i dovodi se u vezu sa lošom prognozom [416,417]. Velike baze podataka poput Atlasa genoma raka (engl. *The Cancer Genome Atlas*) pokazuju da su

nivoi FAK iRNK povećani kod tumora jajnika (~37%) [418] i invazivnog karcinoma dojke (~26%) [419] i da su ovi povišeni nivoi u korelaciji sa lošim ukupnim preživljavanjem pacijenata [420,421]. Povećani nivoi FAK iRNK su takođe pronađeni i u nekoliko drugih tipova malignih tumora kod ljudi. Takođe, prethodne studije su pokazale da se aktivacija FAK povećava sa progresijom tumora [422]. Pored toga, od inicijalne identifikacije FAK kao ključnog posrednika integrinske signalizacije, veliki broj studija poslednjih godina ističe njegovu važnu ulogu u razvoju i napredovanju tumora dojke. Takođe, sugerise se da integrinska signalizacija posredstvom FAK može uticati na progresiju raka dojke preko matičnih ćelija raka dojke (engl. *Mammary Cancer Stem Cells*, MaCSCs) [423,424]. Dalje, *in vivo* studija je pokazala da sistemska upotreba FAK inhibitora smanjuje progresiju metastaza dojke u mozak [425]. Shodno svemu navedenom, u ovoj studiji je pokazana kontinuirana inhibicija relativne ekspresije FAK u 4T1 ćelijama tumora dojke nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*. Ovaj rezultat je u skladu sa negativnom regulacijom ekspresije integrina  $\beta$ -1.

Vinkulin je takođe važan deo fokalnih adhezija. Njegova uloga je u regulaciji adhezije kroz direktno vezivanje za aktin, zbog čega bilo kakvi poremećaji u interakcijama vinkulin-aktin utiču na pokretljivost, adheziju i morfologiju ćelija [426], a njegovo suzbijanje nakon izlaganja testiranom ekstraktu *A. vulgaris* je usko povezano sa smanjenim migratornim i invazivnim karakteristikama 4T1 ćelija. U jednoj od studija je pokazano da su amplifikacija i prekomerna ekspresija vinkulina povezani sa povećanom proliferacijom tumorskih ćelija i progresijom kod uznapredovalog raka prostate [427]. Pored toga, pokazano je da utišavanje vinkulina može značajno inhibirati napredovanje raka prostate [428]. Takođe, povišena ekspresija vinkulina predviđa lošu prognozu i pojavu udaljenih metastaza kod pacijenata sa rakom želuca [429].

Na kraju je analiziran nivo ekspresije  $\alpha$ -SMA. Iako je zabeleženo svega nekoliko slučajeva ekspresije  $\alpha$ -SMA u samim tumorskim ćelijama kao i da je ista povezana sa agresivnim fenotipom, njegova ekspresija u tumorskom tkivu se prevashodno pripisuje CAF.  $\alpha$ -SMA pozitivni miofibroblasti predstavljaju važan prognostički faktor i povezani su sa lošom prognozom pacijenata sa invazivnim karcinomom dojke [430]. Povišena ekspresija  $\alpha$ -SMA u tumorskim ćelijama adenokarcinoma pluća bila usko povezana sa njegovom progresijom, a ovaj protein je bio uključen u sve procese metastatske kaskade [431]. U skladu sa prethodno navedenim, *A. vulgaris* ekstrakt inhibira ekspresiju  $\alpha$ -SMA, proteina koji je povezan sa niskodiferentovanim fenotipom i lošim preživljavanjem pacijenata sa uznapredovalim oblicima raka, čime se dodatno utišava agresivna priroda 4T1 ćelija [430–432].

Uzevši u obzir literaturne podatke i rezultate dobijene u ovoj studiji, jasno je da je tretman ekstraktom *A. vulgaris* ostvario negativan uticaj na karakteristike važne za metastatski proces 4T1 ćelija delujući na nivou fokalnih adhezija i integrinske signalizacije.

Kako bi se omogućilo prenošenje *in vitro* rezultata na *in vivo* sistem, efikasnost ekstrakta *A. vulgaris* je dalje detaljno ispitana u ortotopskom singenom životinjskom modelu tumora dojke indukovanom inokulacijom visoko-invazivnih 4T1 ćelija u masno jastuče dojke ženki miševa. Ovakav pristup omogućava sagledavanje uticaja tretmana sa više aspekata i u kontekstu TME. Činjenica da tumor ne predstavlja jednostavnu skupinu visokoproliferativnih ćelija abnormalnog fenotipa, već da više podseća na višćelijsku strukturu koja funkcioniše na impresivno organizovanom nivou [433–435], navodi na zaključak da bilo koji podatak dobijen *in vitro* ima ograničenu vrednost dok se isti ne potvrdi adekvatnim *in vivo* eksperimentima. Najveća prednost singenog modela je povezana sa očuvanim elementima i aktivnostima unutar TME ali i sveukupnoj podršci čitavom telu u borbi protiv bolesti, uključujući sistemski imunitet i aktivnost neimunskih ćelija relevantnih za terapijski ishod [436,437]. Dakle, antitumorska aktivnost ekstrakta *A. vulgaris* je ispitana u ortotopskom singenom modelu tumora dojke kao najprikladnijem modelu za simulaciju ponašanja tumora dojke u IV stadijumu. Primenjeni režim tretmana je doveo do statistički značajnog smanjenja finalne zapremine tumora. Histopatološka analiza tumora je otkrila povećan procenat nekroze unutar tumorske mase u tretiranoj grupi u odnosu na kontrolu. Podaci o

ulozi nekroze u progresiji tumora i odgovoru na terapiju mogu biti kontradiktorni i, po svojoj prilici, su uslovljeni širim kontekstom [438]. Naime, brojni autori su pokazali da je prisustvo nekroze loš prognostički marker kod različitih tipova tumora [439]. Međutim, kada je u pitanju tumor dojke, pokazalo se da postoji snažna korelacija između prisustva nekroze, agresivnosti tumora, kao i neželjenih ishoda, ali i situacije koje negiraju ovu zakonitost [440,441]. Pored toga, nekoliko studija je ukazalo na nekrozu kao važan prediktivni faktor za odgovor na terapiju [442]. Uzimajući u obzir da ćelije raka razvijaju brojne mehanizme za izbegavanje indukcije apoptoze, poslednjih godina se pojavilo veliko interesovanje za agense koji mogu da iniciraju regulisanu nekrozu. Nekroza izazvana primenjenom terapijom za razliku od spontano nastale nekroze često ima suprotan efekat na progresiju tumora i ishod bolesti [438]. Uočena nekroza izazvana tretmanom *A. vulgaris* je povezana sa smanjenom zapreminom tumora u ovoj studiji. Ovo ukazuje na njenu pozitivnu uključenost u terapijom indukovano oštećenje tumorskog tkiva.

Možda najznačajnije zapažanje *in vivo* studije na modelu tumor dojke je da je tretman ekstraktom *A. vulgaris* u potpunosti sprečio pojavu spontanih metastaza na bubrezima i jetri tretiranih životinja. U kontrolnoj grupi je utvrđeno prisustvo metastaza na makroskopskom nivou prilikom žrtvovanja životinja, nakog čega je isti rezultat dodatno potvrđen histopatološkom analizom gde su zabeležene metastaze u parakapsularnom regionu bubrega kod tri od pet ispitanih životinja iz kontrolne grupe. Takođe, uočeno je prisustvo subkapsularnih metastaza na jetri kod dve od pet životinja iz kontrolne grupe. U isto vreme, metastaze nisu primećene ni kod jedne životinje tretirane ekstraktom *A. vulgaris*, prilikom žrtvovanja životinja, kao ni na uzorcima organa koji su histopatološki analizirani. Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim *in vitro*, gde je tretman ekstraktom *A. vulgaris* u potpunosti uticao na smanjenje metastatskih karakteristika 4T1 ćelija.

Pored ćelija koje podlegle neoplastičnoj transformaciji, tumor sačinjavaju i drugi tipovi netumorskih ćelija kao što su adipociti, fibroblasti, endotelne ćelije, imunske ćelije (B i T limfociti, makrofagi, DC, NK ćelije, neutrofil i MDSC), kao i nećelijske komponente ekstracelularnog matriksa (kolagen, hijaluron, fibronektin, laminin i drugi). Svi ovi različiti tipovi ćelija zajedno sa nećelijskim komponentama ECM i drugim sekretovanim molekulima (faktori rasta, citokini, hemokini i ekstracelularne vezikule) čine TME [6]. Tumorske ćelije i ostale komponente TME su u stalnoj i recipročnoj komunikaciji i ta komunikacija omogućava malignim ćelijama fenotipsku i funkcionalnu plastičnost. Poslednjih godina se ističe značaj TME u regulisanju progresije tumora kao i uticaja na terapijski ishod. Stoga je razvijeno više tipova terapija koje su usmerene upravo na različite komponente TME [107]. Očekuje se da imunski sistem deluje kao odbrambeni mehanizam protiv stranih entiteta, uključujući i tumore, sa ciljem da spreči njihov rast i metastaziranje. Međutim, mnogo je podataka u literaturi koji ukazuju da imunske ćelije koje infiltriraju tumor mogu takođe biti uključene u slabljenje antitumorskog imuniteta. Do ovoga može doći iz više razloga, počevši od različitih strategija izbegavanja antitumorskog imuniteta, do regenerativnih aktivnosti imunskog sistema kao odgovora na spontana oštećenja unutar tumora nastala kao posledica intenzivne deobe u uslovima nedostatka kiseonika i hranljivih materija [108]. Uzevši u obzir sve navedeno, terapija tumora ne bi trebalo da ima za cilj samo direktno uništavanje tumorskih ćelija, već da pokrene i niz događaja koji bi doveli do oživljavanja antitumorskog imunskog odgovora. Pored toga, važno je istaći i da je rak sistemska bolest koja dovodi do mnogobrojnih funkcionalnih promena imunskog sistema u celini. Zbog toga je važno proučavati i sistemski imunski odgovor izvan TME kako bi stekao kompletan uvid u ishod primenjene terapije.

Imunoterapija je postala neizostavan trend u oblasti terapije raka i smatra se četvrtim tipom antitumorske terapije pored operacije, radio- i hemioterapije zbog očigledne efikasnosti i malo neželjenih efekata [443,444]. Uprkos tome što je imunoterapija raka do sada postigla izuzetne rezultate, njena upotreba se i dalje fokusira na nekoliko tipova tumora koji su visoko imunogeni i osetljivi na imunski sistem (tzv. „vrući tumori“) kao što je na primer melanom. Takođe, postoje tumori koji su slabo imunogeni (tzv. „hladni tumori“) kao što TNBC, kod kojih je imunoterapija još uvek nedovoljno efikasna [445,446].

Nekoliko studija je pokazalo da se genetska nestabilnost i heterogenost tkiva povećavaju u pretumorskim i tumorskim lezijama a da se neočekivano smanjuju kod tumora visokog gradusa. Ovo ukazuje da je ključni period za pokretanje, oblikovanje imunskog odgovora, ali i za i uspostavljanje imunosupresivnog okruženja upravo u tumorima nižeg gradusa [5,447]. Iz tih razloga je uticaj tretmana ekstraktom *A. vulgaris* na aktivnost imunskog sistema u celini, a samim tim, i na dalji tok bolesti ispitan u modelu nisko invazivnog melanoma B16F1. Shodno tome, procena TME i sastava ćelija u slezini životinja sa melanomom je pokazala da je ekstrakt *A. vulgaris* doveo do preokreta i ponovnog uspostavljanja antitumorskih aktivnosti imunskih ćelija. Zrele DC su najvažnije ćelije u pokretanju i regulisanju specifičnog imunskog odgovora na tumore, ali paralelno i jedna od uobičajenih meta imunosupresivnih aktivnosti tumorskih ćelija [448,449]. Do smanjene imunogenosti dolazi zbog nedostatka stimulacije T limfocita [450], gubitka ekspresije MHC molekula klase II [451,452], neadekvatne prezentacije antigena CD4<sup>+</sup> pomoćničkim T limfocitima [453], kao i proizvodnje imunosupresivnih faktora [454,455]. DC izložene ekstraktu *A. vulgaris*, počinju da ekspimiraju značajno više molekula MHC klase II i kostimulatornog molekula CD86 sistemski ali i da ekspimiraju više CD40 molekula lokalno, čime postaju kompetentne da pravilno prezentuju tumorske antigene i aktiviraju T ćelijski odgovor.

Iako je pokazano da CD4<sup>+</sup> T limfociti specifični za tumorske antigene mogu posredovati u eliminaciji tumorskih ćelija čak i u odsustvu endogene ekspresije MHC molekula klase II na tumorskim ćelijama, prisustvo zrelih potentnih DC je izuzetno važno za njihovu aktivaciju [456]. Nakon aktivacije, CD4<sup>+</sup> T limfociti se diferenciraju u ćelije Th-1 tipa koje proizvode visoke nivoe Th-1 citokina, za koje se smatra da su glavni posrednici u kontroli tumora [457,458]. Rezultati ove studije su pokazali da se aktivirani CD4<sup>+</sup> T limfociti diferenciraju u Th-1 smeru i da proizvode više INF- $\gamma$  u slezini nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*. INF- $\gamma$  može direktno da interaguje sa tumorskim ćelijama [459], ili da indirektno stimuliše diferencijaciju CTL [460]. Istovremeno, INF- $\gamma$  može olakšati ulazak CTL u ciljno tkivo. Povećana akumulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita koje proizvode TNF- $\alpha$  u TME je takođe primećena nakon tretmana ekstraktom *A. vulgaris*. Moguće je da TNF- $\alpha$  povećava osetljivost ciljnih ćelija na citolizu zavisnu od T limfocita i na taj način ubrzava smrt tumorskih ćelija [461]. U skladu sa dobijenim rezultatima, povećana proizvodnja TNF- $\alpha$  je neophodna za eliminaciju melanoma posredstvom Th-1 ćelija [462]. Pored stimulativnog efekta ekstrakta *A. vulgaris* na sazrevanje DC i diferencijaciju Th-1 ćelija, otkriveno je smanjenje akumulacije Th i T<sub>reg</sub> ćelija koje proizvode imunosupresivni IL-10 u slezini i primarnim tumorima. Ovaj efekat u velikoj meri doprinosi antitumorskom imunskom odgovoru i uspešnoj supresiji rasta tumora. Poznato je T<sub>reg</sub> ćelije igraju ključnu ulogu u supresiji imuniteta inhibicijom odgovora T limfocita specifičnih za tumor, i da je njihova infiltracija u tumor snažno povezana sa progresijom [463,464]. Takođe, odnos citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita i CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija može imati prediktivnu vrednost za ishod terapije melanoma [465].

Važna komponenta imunosupresije i tolerancije na antigene tumorskih ćelije usko je povezana sa signalnim putem PD-L1/PD-1 [454]. Iako CTL mogu prepoznati antigene prezentovane na tumorskim ćelijama, one generalno nisu u stanju da indukuju produktivni imunski odgovor zbog negativne signalizacije posredovane PD-1 [466,467]. DC kao profesionalne APĆ aktiviraju CD8<sup>+</sup> T limfocite. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da ekstrakt *A. vulgaris* značajno povećava akumulaciju CTL u TME sa smanjenim procentom onih koji na svojoj površini ekspimiraju inhibitorni molekul PD-1. CD107a (takođe poznat i kao LAMP-1) je marker citotoksične aktivnosti CTL, NK ćelija i  $\gamma\delta$  T ćelija, koji se pojavljuje na površini ćelija u kratkom vremenskom intervalu nakon degranulacije. Ekspresija CD107a je usko povezana sa ekspresijom INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i citotoksičnošću T limfocita [468]. U skladu sa smanjenom ekspresijom PD-1, povećana ekspresija markera citotoksične aktivnosti – CD107a i perforina u CD8<sup>+</sup> T limfocitima koje potiču iz slezine i primarnog tumora životinja tretiranih ekstraktom *A. vulgaris*, snažno podržavaju hipotezu o ponovnom uspostavljanju uspešnog antitumorskog imunskog odgovora.



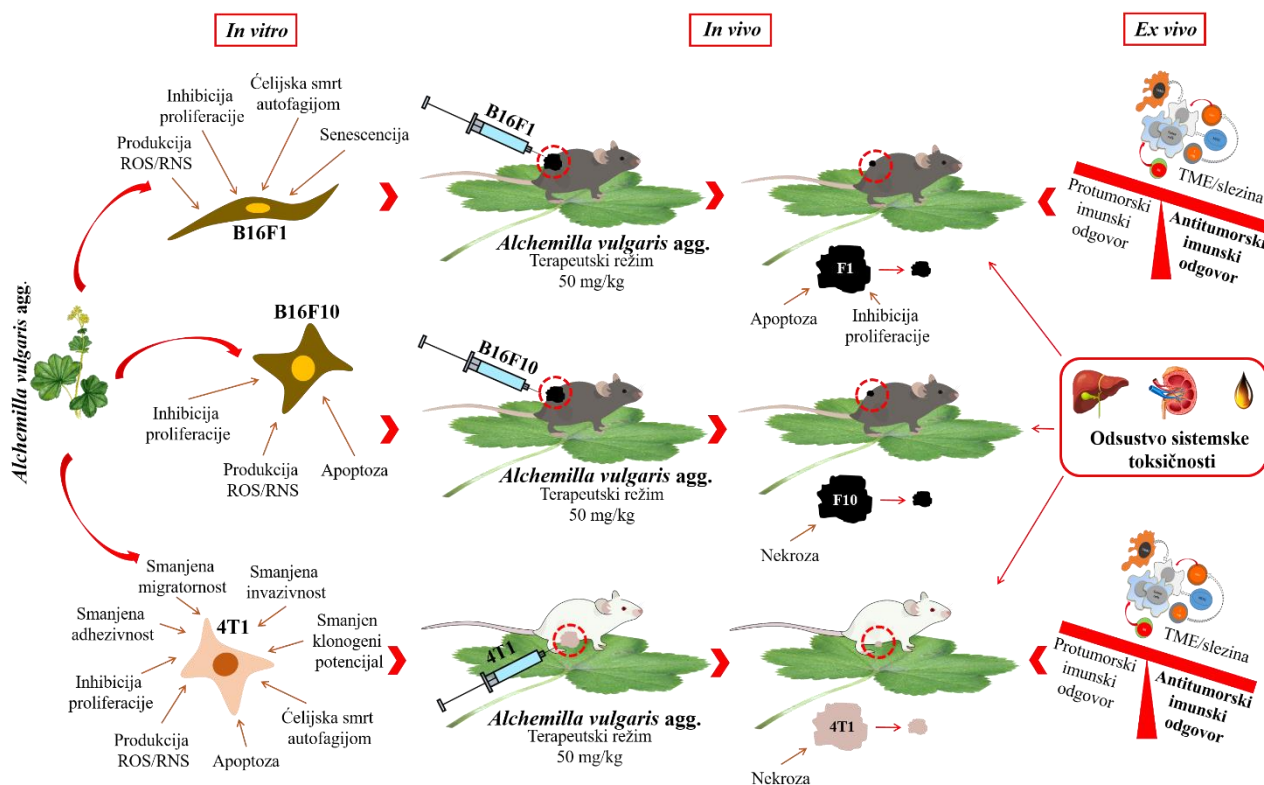
Čini se da bioaktivna jedinjenja iz ekstrakta *A. vulgaris* olakšavaju sazrevanje DC i diferencijaciju Th-1 i CTL. Ukratko, tretman ekstraktom *A. vulgaris* podržava antitumorski imunski odgovor na najmanje dva načina. Prvo, Th ćelije koje proizvode TNF- $\alpha$  i CTLs migriraju na mesto tumora, stupaju u kontakt sa tumorskim ćelijama i oslobađaju perforin koji posreduje u ubijanju tumorskih ćelija. Paralelno, inhibirana akumulacija immunosupresivnih ćelija u TME dodatno olakšava razvoj snažnog antitumorskog imunskog odgovora. Sve navedeno ide u prilog zaključku da ekstrakt *A. vulgaris* značajno modulira imunski odgovor na tumor u korist Th-1 limfocita i CTL, čija aktivnost može uspešno suzbiti rast i širenje tumora.

Dalje je uticaj ekstrakta *A. vulgaris* procenjen na sistemski i lokalni imunski odgovor i u 4T1 modelu tumora dojke koji se smatra slabo imunogenim. Dobijeni rezultati su otkrili višestruke i dobro orkestrirane promene koje utiču na progresiju i širenje tumora. Kako je već pomenuto, DC predstavljaju APC koje pokreću i oblikuju imunski odgovor [469,470]. Nakon prepoznavanja antigena, one stupaju u interakciju sa efektorskim ćelijama kao što su NK ćelije i T limfociti i imaju tendenciju da usmeravaju dalji tok imunskog odgovora [471,472]. Njihova važnost je takođe dobro ilustrovana u antitumorskom imunskom odgovoru kod mišjeg tumora dojke [473]. Poznato je da su DC prve ćelije koje se susreću sa tumorskim antigenima, migriraju ka limfnim čvorovima i obezbeđuju aktivirajuće signale za efektorske ćelije [469]. Međutim, različite maligne ćelije su razvile odbrambene mehanizme za izbegavanje prepoznavanja od strane DC, bilo ekspresijom inhibitornih signala ili metaboličkim onesposobljavanjem [158,474]. Primena etanolnog ekstrakta *A. vulgaris* je značajno povećala procenat DC i snažno stimulisala njihovo sazrevanje, što je ilustrovano izuzetnim porastom procenta molekula CD40, CD86 i MHC II klase. Uočene su identične promene fenotipa DC u slezini i TME tretiranih životinja. Ovi rezultati impliciraju da bi ekstrakt *A. vulgaris* mogao biti podjednako važan za pokretanje, ali i očuvanje antitumorskog imunskog odgovora na tumor dojke. Kao što je već poznato, smatra se da su 4T1 ćelije tumora dojke slabo do umereno imunogene i da aktivacija citotoksičnih limfocita može biti ometena [475]. Takođe, prisustvo malog broja DC i njihovih nezrelih oblika u tumorskom tkivu je još jedno od obeležja slabo imunogenog tumora [476]. Upravo rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazuju da primena ekstrakta *A. vulgaris* može povećati imunogenost tumora dojke, čineći antitumorski imunski odgovor efikasnijim. Kada su u pitanju citotoksični T limfociti, primena ekstrakta *A. vulgaris* povećava procenat CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita u slezini i tumorskom tkivu. Pored povećane učestalosti ovih ćelija u slezini i TME, njihov fenotip je takođe promenjen u pravcu citotoksičnog, što ilustruje značajan porast markera CD107a praćen povećanjem proizvodnje perforina i granzima. Pored toga, ekspresija inhibitornog markera PD-1 je značajno snižena u CTL slezine što implicira pozitivan efekat ekstrakta *A. vulgaris* na aktivnost CTL. Histopatološka analiza je pokazala pojačanu nekrozu primarnih tumora životinja tretiranih ekstraktom *A. vulgaris*. Prisustvo nekroze može favorizovati antitumorski imunski odgovor [477] pošto nekrotske ćelije olakšavaju sazrevanje DC [478,479]. Dakle, ekstrakt *A. vulgaris* stimuliše antitumorski imunski odgovor na najmanje dva načina, direktnom aktivacijom DC i CTL, i indirektno, preko tumorske nekroze koja olakšava sazrevanje DC koje zatim dalje aktiviraju CTL.

Još jedan od važnih aspekata ovog istraživanja odnosio se na utvrđivanje potencijalnog toksičnog efekta ispitivanog ekstrakta *A. vulgaris* na C57BL/6 i BALB/C miševe. Tokom čitavog perioda trajanja *in vivo* eksperimenata praćena je eventualna pojava znakova intoksikacije eksperimentalnih životinja poput gubitka telesne mase, promena u izgledu i ponašanju životinja, pojava dijareje ili inkontinencije. Takođe je na samom početku, sredini i kraju eksperimenata prikupljan urin životinja u cilju provere biohemijskih i hematoloških parametara toksičnosti. Pored toga, u svrhu ispitivanja uticaja primenjenog tretmana na zdrava tkiva i to posebno ona koja su uključena u metabolizam i klirens poput jetre i bubrega, mikroskopski su analizirane histopatološke promene na istim. Dobijeni rezultati pokazuju da etanolni ekstrakt *A. vulgaris*, primenjivan u dozi od 50 mg/kg u eksperimentalnom režimu pet dana tretmana sa dva dana pauze između nije pokazao nikakve znakove sistemske toksičnosti u svim *in vivo* eksperimentima obuhvaćenim ovom studijom. Stopa preživljavanja eksperimentalnih životinja pod tretmanom *A. vulgaris* je bila 100%. Takođe,

životinje nisu gubile na telesnoj masi tokom čitavog trajanja eksperimenata. Pored toga, semikvantitativna analiza parametara urina životinja je pokazala da se isti nisu menjali pod uticajem tretmana već da su parametri kontrolnih životinja i životinja tretiranih ekstraktom *A. vulgaris* bili unutar istih okvira. I najvažnije, isti tretman, i pored evidentnog dejstva na tumorske ćelije i uticaja na mikrosredinu, nije uticao na zdrava tkiva (jetru i bubrege), što može biti od velikog značaja za ishod lečenja. Uzevši u obzir sve navedeno, tretman *A. vulgaris* je ostvario snažan antitumorski efekat u modelima nisko i visoko invazivnog melanom i tumora dojke bez sistemske toksičnosti. Iako još uvek nisu zabeležene studije koje ispituju sistemske toksičnosti primene *A. vulgaris* prethodno je pokazano da primena *A. vulgaris* u različitim oblicima i koncentracijama ublažava štetne efekte i značajno poboljšava histopatološke i biohemijske parametre izazvane intoksikacijom ugljenik-tetrahloridom (CCl<sub>4</sub>) u jetri zbog čega je izveden zaključak da *A. vulgaris* ispoljava hepatoprotektivna svojstva koja se mogu pripisati visokom sadržaju fenolnih jedinjenja u njenom sastavu [480,481]. Takođe, pokazano je i da *A. vulgaris* ublažava morfološke i biohemijske markere oksidativnog oštećenja jetre, bubrega i testisa izazvanih upotrebom cisplatine. Pored toga, pokazalo se da *A. vulgaris* ima dobar potencijal da zaštiti različite organe od ksenobiotske toksičnosti [482]. Ovim se izvodi zaključak da *A. vulgaris* ne samo da ne dovodi do sistemske toksičnosti već ispoljava protektivna svojstva i ublažava simptome toksičnosti izazvane drugim agensima. Takođe, više decenijska tradicionalna upotreba ove biljke za lečenje različitih zdravstvenih tegoba i oboljenja upravo ukazuju na bezbednost njene primene.

Značaj rezultata predstavljenih u okviru ove doktorske disertacije ogleda se u pokazanoj delotvornosti ukupnog etanolnog ekstrakta nadzemnih delova biljke *Alchemilla vulgaris* agg. u terapiji solidnih melanoma različitog stepena invazivnosti kao i modelu TNBC *in vitro* i *in vivo*. Od najvećeg značaja su rezultati koji se tiču značaja TME za ishod lečenja. Konačno, primenjeni tretman ostvaruje antitumorska svojstva direktnim uticajem na tumorske ćelije ali i modulacijom imunskog odgovora na tumor stimulišući oba, sistemski i lokalni antitumorski imunski odgovor, istovremeno ne ostvarujući citotoksični efekat na zdrava tkiva. Zbog svega navedenog, *A. vulgaris* zaslužuje veću pažnju naučne zajednice u kontekstu antitumorskih svojstava koje poseduje što iziskuje dodatna ispitivanja na polju eksperimentalne onkologije u budućnosti.



Slika 30. Pregled ostvarenih efekata etanolnog ekstrakta *A. vulgaris*.

## **6. Zaključci**



U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Etanolni ekstrakt nadzemnog dela virka (*Alchemilla vulgaris* agg.) sakupljenog na prirodnom staništu u jugoistočnoj Srbiji ispoljio je složen hemijski sastav u kome je identifikovano 45 jedinjenja, pre svega flavonoida i flavonoidnih glikozida, fenolnih kiselina i tanina.
2. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* smanjuje vijabilitet ćelijskih linija melanoma (A375, 518A2, FemX, B16F1 i B16F10) i tumora dojke (MCF-7, MDA-MB-361, MDA-MB-468, MDA-MB-231 i 4T1) humanog i mišjeg porekla *in vitro*.
3. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* pokazuje značajnu selektivnost prema malignom fenotipu.
4. U osnovi citotoksičnog efekta ekstrakta *A. vulgaris* u kulturi B16F1 ćelija je indukcija programirane ćelijske smrti tipa II – autofagije. Detektovana autofagija u kulturi B16F1 ćelija je dodatno potvrđena na nivou ekspresije relevantnih proteina za proces autofagije (beklin-1, p62 i LC3B I i II).
5. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* indukuje programiranu ćelijsku smrt tipa I – apoptozu u kulturi B16F10 ćelija nezavisnu od aktivacije kaspaza. Detektovana apoptoza u kulturi B16F10 ćelija je dodatno potvrđena na nivou ekspresije relevantnih proteina za proces apoptoze (BAX i Bcl-2).
6. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza i destruktivnu autofagiju u kulturi 4T1 ćelija.
7. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* inhibira proliferaciju preživelih ćelija u kulturama B16F1, B16F10 i 4T1 ćelija.
8. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* indukuje snažnu produkciju ROS/RNS u kulturama B16F1, B16F10 i 4T1 ćelija što može biti odgovorno za citotoksične efekte tretmana.
9. Inhibicija proliferacije B16F1 i B16F10 ćelija, kao i indukcija apoptoze kod visoko invazivnog klona F10 i indukcija ćelijske smrti autofagijom kod nisko invazivnog klona F1 su u skladu sa detektovanim promenama u ekspresiji ključnih proteina MAPK i PI3K/Akt signalnih puteva uključenih u ćelijsku deobu i smrt.
10. Pored snažne inhibicije proliferacije 4T1 ćelija, etanolni ekstrakt *A. vulgaris* značajno smanjuje klonogeni potencijal, adhezivnost, migratornost i invazivnost ovih ćelija *in vitro* čime drastično smanjuje njihove metastatske karakteristike. Smanjen metastatski potencijal 4T1 ćelija je dodatno potvrđen negativnom regulacijom ekspresije proteina relevantnih za proces metastaziranja (integrin  $\beta$ -1, FAK, vinkulin i  $\alpha$ -SMA).
11. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* značajno smanjuje rast solidnog melanoma niske i visoke invazivnosti kao i tumora dojke *in vivo*.
12. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* stimuliše snažan antitumorski imunski odgovor aktivacijom DC, Th-1 limfocita i CTL sistemski i lokalno i dodatno inhibira akumulaciju imunosupresivnih ćelija u TME u modelu nisko invazivnog melanoma (B16F1).
13. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* stimuliše sistemski i lokalni antitumorski imunski odgovor aktivacijom DC i CTL u modelu tumora dojke (4T1).
14. Etanolni ekstrakt *A. vulgaris* ne dovodi do sistemske toksičnosti kod C57BL/6 i BALB/C miševa.



## **7. Literatura**





1. Karunagaran, D.; Joseph, J.; Santhosh Kumar, T.R. Cell Growth Regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 245–268.
2. Bunduc, S.; Iacob, R.; Costache, R.; Stoica, B.; Radu, C.; Gheorghe, C. Very Early Onset Pancreatic Adenocarcinoma - Clinical Presentation, Risk Factors and Therapeutic Options. *Chirurgia (Bucur)*. **2018**, *113*, 405–411.
3. Lambert, A.W.; Pattabiraman, D.R.; Weinberg, R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **2017**, *168*, 670–691.
4. Paige, A.J.W. Redefining Tumour Suppressor Genes: Exceptions to the Two-Hit Hypothesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2147–2163.
5. Tanić, N.; Tanić, N.; Milašin, J.; Vukadinović, M.; Dimitrijević, B. Genomic Instability and Tumor-Specific DNA Alterations in Oral Leukoplakias. *Eur. J. Oral Sci.* **2009**, *117*, 231–237.
6. Baghban, R.; Roshangar, L.; Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Ebrahimi-Kalan, A.; Jaymand, M.; Kolahian, S.; Javaheri, T.; Zare, P. Tumor Microenvironment Complexity and Therapeutic Implications at a Glance. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 1–19.
7. Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Zarghami, N. Tumor Vascular Infarction: Prospects and Challenges. *Int. J. Hematol.* **2017**, *105*, 244–256.
8. Jahanban-Esfahlan, R.; de la Guardia, M.; Ahmadi, D.; Yousefi, B. Modulating Tumor Hypoxia by Nanomedicine for Effective Cancer Therapy. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2019–2031.
9. Seidi, K.; Neubauer, H.A.; Moriggl, R.; Jahanban-Esfahlan, R.; Javaheri, T. Tumor Target Amplification: Implications for Nano Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2018**, *275*, 142–161.
10. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019 Available online: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gh-leading-causes-of-death> (accessed on 24 June 2024).
11. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33.
12. Yabroff, K.R.; Wu, X.C.; Negoita, S.; Stevens, J.; Coyle, L.; Zhao, J.; Mumphrey, B.J.; Jemal, A.; Ward, K.C. Association of the COVID-19 Pandemic With Patterns of Statewide Cancer Services. *J. Natl. Cancer Inst.* **2022**, *114*, 907–909.
13. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 229–263.
14. Anand, P.; Kunnumakara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Tharakan, S.T.; Lai, O.S.; Sung, B.; Aggarwal, B.B. Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2097–2116.
15. Irigaray, P.; Newby, J.A.; Clapp, R.; Hardell, L.; Howard, V.; Montagnier, L.; Epstein, S.; Belpomme, D. Lifestyle-Related Factors and Environmental Agents Causing Cancer: An Overview. *Biomed. Pharmacother.* **2007**, *61*, 640–658.
16. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.

17. Graham, T.A.; Shibata, D. Navigating the Path to Distant Metastasis. *Nat. Genet.* **2020**, *52*, 642–643.
18. Aytes, A.; Giacobbe, A.; Mitrofanova, A.; Ruggero, K.; Cyrta, J.; Arriaga, J.; Palomero, L.; Farran-Matas, S.; Rubin, M.A.; Shen, M.M.; et al. NSD2 Is a Conserved Driver of Metastatic Prostate Cancer Progression. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5201.
19. Hu, Z.; Curtis, C. Looking Backward in Time to Define the Chronology of Metastasis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3213.
20. Mortezaee, K. CXCL12/CXCR4 Axis in the Microenvironment of Solid Tumors: A Critical Mediator of Metastasis. *Life Sci.* **2020**, *249*, 117534.
21. Fares, J.; Fares, M.Y.; Khachfe, H.H.; Salhab, H.A.; Fares, Y. Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 28.
22. Chaffer, C.L.; Weinberg, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **2011**, *331*, 1559–1564.
23. Clark, A.G.; Vignjevic, D.M. Modes of Cancer Cell Invasion and the Role of the Microenvironment. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *36*, 13–22.
24. Cheung, K.J.; Ewald, A.J. A Collective Route to Metastasis: Seeding by Tumor Cell Clusters. *Science* **2016**, *352*, 167–169.
25. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196.
26. Friedl, P.; Locker, J.; Sahai, E.; Segall, J.E. Classifying Collective Cancer Cell Invasion. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 777–783.
27. Zervantonakis, I.K.; Hughes-Alford, S.K.; Charest, J.L.; Condeelis, J.S.; Gertler, F.B.; Kamm, R.D. Three-Dimensional Microfluidic Model for Tumor Cell Intravasation and Endothelial Barrier Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 13515–13520.
28. Labelle, M.; Hynes, R.O. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 1091–1099.
29. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122.
30. Reymond, N.; D'Água, B.B.; Ridley, A.J. Crossing the Endothelial Barrier during Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 858–870.
31. Wu, Q.D.I.; Wang, J.H.; Condrón, C.; Bouchier-Hayes, D.; Paul Redmond, H. Human Neutrophils Facilitate Tumor Cell Transendothelial Migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *280*, C814–C822.
32. Strilic, B.; Yang, L.; Albarrán-Juárez, J.; Wachsmuth, L.; Han, K.; Müller, U.C.; Pasparakis, M.; Offermanns, S. Tumour-Cell-Induced Endothelial Cell Necroptosis via Death Receptor 6 Promotes Metastasis. *Nature* **2016**, *536*, 215–218.
33. Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the Hallmarks of Cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1016.
34. Braun, S.; Vogl, F.D.; Naume, B.; Janni, W.; Osborne, M.P.; Coombes, R.C.; Schlimok, G.; Diel, I.J.; Gerber, B.; Gebauer, G.; et al. A Pooled Analysis of Bone Marrow

- Micrometastasis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 793–802.
35. Peinado, H.; Lavotshkin, S.; Lyden, D. The Secreted Factors Responsible for Pre-Metastatic Niche Formation: Old Sayings and New Thoughts. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21*, 139–146.
  36. Aguirre-Ghiso, J.A. Models, Mechanisms and Clinical Evidence for Cancer Dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 834–846.
  37. Endo, H.; Inoue, M. Dormancy in Cancer. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 474–480.
  38. Mina, L.A.; Sledge, G.W. Rethinking the Metastatic Cascade as a Therapeutic Target. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 325–332.
  39. Riggi, N.; Aguet, M.; Stamenkovic, I. Cancer Metastasis: A Reappraisal of Its Underlying Mechanisms and Their Relevance to Treatment. *Annu. Rev. Pathol.* **2018**, *13*, 117–140.
  40. Vineis, P.; Wild, C.P. Global Cancer Patterns: Causes and Prevention. *Lancet (London, England)* **2014**, *383*, 549–557.
  41. Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin Melanocytes: Biology and Development. *Postep. dermatologii i Alergol.* **2013**, *30*, 30–41.
  42. Schadendorf, D.; van Akkooi, A.C.J.; Berking, C.; Griewank, K.G.; Gutzmer, R.; Hauschild, A.; Stang, A.; Roesch, A.; Ugurel, S. Melanoma. *Lancet (London, England)* **2018**, *392*, 971–984.
  43. Kanitakis, J. Anatomy, Histology and Immunohistochemistry of Normal Human Skin. *Eur. J. Dermatol.* **2002**, *12*, 390–399.
  44. Lin, J.Y.; Fisher, D.E. Melanocyte Biology and Skin Pigmentation. *Nature* **2007**, *445*, 843–850.
  45. Erdei, E.; Torres, S.M. A New Understanding in the Epidemiology of Melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2010**, *10*, 1811–1823.
  46. Shain, A.H.; Bastian, B.C. From Melanocytes to Melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 345–358.
  47. Houghton, A.N.; Polsky, D. Focus on Melanoma. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 275–278.
  48. Gilchrest, B.A.; Eller, M.S.; Geller, A.C.; Yaar, M. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1341–1348.
  49. Koh, H.K.; Geller, A.C.; Miller, D.R.; Grossbart, T.A.; Lew, R.A. Prevention and Early Detection Strategies for Melanoma and Skin Cancer: Current Status. *Arch. Dermatol.* **1996**, *132*, 436–443.
  50. Wang, Y.; Zhao, Y.; Ma, S. Racial Differences in Six Major Subtypes of Melanoma: Descriptive Epidemiology. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 1–19.
  51. Lancaster, H. Some Geographical Aspects of the Mortality from Melanoma in Europeans - PubMed. *Med. J. Aust.* **1956**, *43*, 1082–1087.
  52. Gandini, S.; Sera, F.; Cattaruzza, M.S.; Pasquini, P.; Abeni, D.; Boyle, P.; Melchi, C.F. Meta-Analysis of Risk Factors for Cutaneous Melanoma: I. Common and Atypical Naevi. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 28–44.
  53. Goldstein, A.M.; Tucker, M.A. Genetic Epidemiology of Cutaneous Melanoma: A Global Perspective. *Arch. Dermatol.* **2001**, *137*, 1493–1496.

54. Ibrahim, N.; Haluska, F.G. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu. Rev. Pathol.* **2009**, *4*, 551–579.
55. Balch, C.M.; Houghton, A.N.; Sober, A.J.; Soong, S. Cutaneous Melanoma, 4th Edition. *Dermatologic Surg.* **2005**, *31*, 1715–1715.
56. Arozarena, I.; Wellbrock, C. Targeting Invasive Properties of Melanoma Cells. *FEBS J.* **2017**, *284*, 2148–2162.
57. Ross, M.I.; Gershenwald, J.E. Evidence-Based Treatment of Early-Stage Melanoma. *J. Surg. Oncol.* **2011**, *104*, 341–353.
58. Gupta, A.; Gomes, F.; Lorigan, P. The Role for Chemotherapy in the Modern Management of Melanoma. *Melanoma Manag.* **2017**, *4*, 125–136.
59. Gogas, H.J.; Kirkwood, J.M.; Sondak, V.K. Chemotherapy for Metastatic Melanoma: Time for a Change? *Cancer* **2007**, *109*, 455–464.
60. Sandru, A.; Voinea, S.; Panaitescu, E.; Blidaru, A. Survival Rates of Patients with Metastatic Malignant Melanoma. *J. Med. Life* **2014**, *7*, 572.
61. Cummins, D.L.; Cummins, J.M.; Pantle, H.; Silverman, M.A.; Leonard, A.L.; Chanmugam, A. Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin. Proc.* **2006**, *81*, 500–507.
62. Ribas, A.; Hamid, O.; Daud, A.; Hodi, F.S.; Wolchok, J.D.; Kefford, R.; Joshua, A.M.; Patnaik, A.; Hwu, W.J.; Weber, J.S.; et al. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* **2016**, *315*, 1600–1609.
63. Flaherty, K.T.; Puzanov, I.; Kim, K.B.; Ribas, A.; McArthur, G.A.; Sosman, J.A.; O'Dwyer, P.J.; Lee, R.J.; Grippo, J.F.; Nolop, K.; et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 809–819.
64. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–723.
65. Hauschild, A.; Grob, J.J.; Demidov, L. V.; Jouary, T.; Gutzmer, R.; Millward, M.; Rutkowski, P.; Blank, C.U.; Miller, W.H.; Kaempgen, E.; et al. Dabrafenib in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: A Multicentre, Open-Label, Phase 3 Randomised Controlled Trial. *Lancet (London, England)* **2012**, *380*, 358–365.
66. McArthur, G.A.; Chapman, P.B.; Robert, C.; Larkin, J.; Haanen, J.B.; Dummer, R.; Ribas, A.; Hogg, D.; Hamid, O.; Ascierto, P.A.; et al. Safety and Efficacy of Vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) Mutation-Positive Melanoma (BRIM-3): Extended Follow-up of a Phase 3, Randomised, Open-Label Study. *Lancet. Oncol.* **2014**, *15*, 323–332.
67. Long, G. V.; Stroyakovskiy, D.; Gogas, H.; Levchenko, E.; De Braud, F.; Larkin, J.; Garbe, C.; Jouary, T.; Hauschild, A.; Grob, J.J.; et al. Dabrafenib and Trametinib versus Dabrafenib and Placebo for Val600 BRAF-Mutant Melanoma: A Multicentre, Double-Blind, Phase 3 Randomised Controlled Trial. *Lancet* **2015**, *386*, 444–451.
68. Ribas, A.; Puzanov, I.; Dummer, R.; Schadendorf, D.; Hamid, O.; Robert, C.; Hodi, F.S.; Schachter, J.; Pavlick, A.C.; Lewis, K.D.; et al. Pembrolizumab versus Investigator-Choice Chemotherapy for Ipilimumab-Refractory Melanoma (KEYNOTE-002): A Randomised, Controlled, Phase 2 Trial. *Lancet. Oncol.* **2015**, *16*, 908–918.
69. Weber, J.S.; D'Angelo, S.P.; Minor, D.; Hodi, F.S.; Gutzmer, R.; Neyns, B.; Hoeller, C.;

- Khushalani, N.I.; Miller, W.H.; Lao, C.D.; et al. Nivolumab versus Chemotherapy in Patients with Advanced Melanoma Who Progressed after Anti-CTLA-4 Treatment (CheckMate 037): A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 375–384.
70. Schwartz, A.L.; Nath, P.R.; Allgauer, M.; Lessey-Morillon, E.C.; Sipes, J.M.; Ridnour, L.A.; Morillon, Y.M.; Yu, Z.; Restifo, N.P.; Roberts, D.D. Antisense Targeting of CD47 Enhances Human Cytotoxic T-Cell Activity and Increases Survival of Mice Bearing B16 Melanoma When Combined with Anti-CTLA4 and Tumor Irradiation. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, *68*, 1805–1817.
  71. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249.
  72. Zendejdel, M.; Niakan, B.; Keshtkar, A.; Rafiei, E.; Salamat, F. Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol. *Iran. J. Med. Sci.* **2018**, *43*, 1.
  73. Hortobagyi, G.N.; de la Garza Salazar, J.; Pritchard, K.; Amadori, D.; Haidinger, R.; Hudis, C.A.; Khaled, H.; Liu, M.C.; Martin, M.; Namer, M.; et al. The Global Breast Cancer Burden: Variations in Epidemiology and Survival. *Clin. Breast Cancer* **2005**, *6*, 391–401.
  74. Parkin, D.M.; Fernández, L.M.G. Use of Statistics to Assess the Global Burden of Breast Cancer. *Breast J.* **2006**, *12*, S70–S80.
  75. Cardoso, F.; Kyriakides, S.; Ohno, S.; Penault-Llorca, F.; Poortmans, P.; Rubio, I.T.; Zackrisson, S.; Senkus, E. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2019**, *30*, 1194–1220.
  76. Sharma, G.N.; Dave, R.; Sanadya, J.; Sharma, P.; Sharma, K.K. Various Types and Management of Breast Cancer: An Overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2010**, *1*, 109–126.
  77. Nascimento, R.G. do; Otoni, K.M. Histological and Molecular Classification of Breast Cancer: What Do We Know? *Mastology* **2020**, *30*, 1–8.
  78. Fisher, B.; Anderson, S.; Bryant, J.; Margolese, R.G.; Deutsch, M.; Fisher, E.R.; Jeong, J.-H.; Wolmark, N. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1233–1241.
  79. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for Early Breast Cancer on Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. *Lancet (London, England)* **2005**, *365*, 1687–1717.
  80. Cardoso, F.; Senkus, E.; Costa, A.; Papadopoulos, E.; Aapro, M.; André, F.; Harbeck, N.; Aguilar Lopez, B.; Barrios, C.H.; Bergh, J.; et al. 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)†. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2018**, *29*, 1634–1657.
  81. Gao, J.J.; Cheng, J.; Bloomquist, E.; Sanchez, J.; Wedam, S.B.; Singh, H.; Amiri-Kordestani, L.; Ibrahim, A.; Sridhara, R.; Goldberg, K.B.; et al. CDK4/6 Inhibitor Treatment for Patients with Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative, Advanced or Metastatic Breast Cancer: A US Food and Drug Administration Pooled Analysis. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 250–260.
  82. Bardia, A.; Hurvitz, S.A.; Tolaney, S.M.; Loirat, D.; Punie, K.; Oliveira, M.; Brufsky, A.;

- Sardesai, S.D.; Kalinsky, K.; Zelnak, A.B.; et al. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1529–1541.
83. Murthy, R.K.; Loi, S.; Okines, A.; Paplomata, E.; Hamilton, E.; Hurvitz, S.A.; Lin, N.U.; Borges, V.; Abramson, V.; Anders, C.; et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 597–609.
  84. Gennari, A.; André, F.; Barrios, C.H.; Cortés, J.; de Azambuja, E.; DeMichele, A.; Dent, R.; Fenlon, D.; Gligorov, J.; Hurvitz, S.A.; et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Staging and Treatment of Patients with Metastatic Breast Cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2021**, *32*, 1475–1495.
  85. Burguin, A.; Diorio, C.; Durocher, F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 808.
  86. Shagufta; Ahmad, I. Tamoxifen a Pioneering Drug: An Update on the Therapeutic Potential of Tamoxifen Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 515–531.
  87. Bobach, C.; Schurwanz, J.; Franke, K.; Denkert, A.; Sung, T. Van; Kuster, R.; Mutiso, P.C.; Seliger, B.; Wessjohann, L.A. Multiple Readout Assay for Hormonal (Androgenic and Antiandrogenic) and Cytotoxic Activity of Plant and Fungal Extracts Based on Differential Prostate Cancer Cell Line Behavior. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *155*, 721–730.
  88. Foglietta, J.; Inno, A.; de Iuliis, F.; Sini, V.; Duranti, S.; Turazza, M.; Tarantini, L.; Gori, S. Cardiotoxicity of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer Patients. *Clin. Breast Cancer* **2017**, *17*, 11–17.
  89. Diaby, V.; Alqhtani, H.; van Boemmel-Wegmann, S.; Wang, C.Y.; Ali, A.A.; Balkrishnan, R.; Ko, Y.; Palacio, S.; de Lima Lopes, G. A Cost-Effectiveness Analysis of Trastuzumab-Containing Treatment Sequences for HER-2 Positive Metastatic Breast Cancer Patients in Taiwan. *Breast* **2020**, *49*, 141–148.
  90. McKeage, K.; Perry, C.M. Trastuzumab: A Review of Its Use in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Overexpressing HER2. *Drugs* **2002**, *62*, 209–243.
  91. Perou, C.M.; Sørile, T.; Eisen, M.B.; Van De Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Ress, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslén, L.A.; et al. Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747–752.
  92. Foulkes, W.D.; Smith, I.E.; Reis-Filho, J.S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1938–1948.
  93. Heimes, A.S.; Schmidt, M. Atezolizumab for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2019**, *28*, 1–5.
  94. Lyons, T.G. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2019**, *20*, 82.
  95. Almansour, N.M. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 836417.
  96. Virchow, R. Cellular Pathology. As Based upon Physiological and Pathological Histology. Lecture XVI--Atheromatous Affection of Arteries. 1858. *Nutr. Rev.* **1989**, *47*, 23–25.
  97. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **2011**, *331*, 1565–1570.
  98. Shankaran, V.; Ikeda, H.; Bruce, A.T.; White, J.M.; Swanson, P.E.; Old, L.J.; Schreiber,

R.D. IFN $\gamma$  and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. *Nature* **2001**, *410*, 1107–1111.

99. Smyth, M.J.; Dunn, G.P.; Schreiber, R.D. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Adv. Immunol.* **2006**, *90*, 1–50.
100. Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **2004**, *21*, 137–148.
101. Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 329–360.
102. Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991–998.
103. Bhatia, A.; Kumar, Y. Cancer-Immune Equilibrium: Questions Unanswered. *Cancer Microenviron.* **2011**, *4*, 209–217.
104. Chen, D.S.; Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **2013**, *39*, 1–10.
105. Motz, G.T.; Coukos, G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity* **2013**, *39*, 61–73.
106. El-Deiry, W.S.; Taylor, B.; Neal, J.W. *Tumor Evolution, Heterogeneity, and Therapy for Our Patients With Advanced Cancer: How Far Have We Come?*; Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017, *37*, e8-e15.
107. Bejarano, L.; Jordão, M.J.C.; Joyce, J.A. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 933–959.
108. Liu, R.; Hu, R.; Zeng, Y.; Zhang, W.; Zhou, H.H. Tumour Immune Cell Infiltration and Survival after Platinum-Based Chemotherapy in High-Grade Serous Ovarian Cancer Subtypes: A Gene Expression-Based Computational Study. *EBioMedicine* **2020**, *51*, 102602.
109. Huang, L.; Chen, H.; Xu, Y.; Chen, J.; Liu, Z.; Xu, Q. Correlation of Tumor-Infiltrating Immune Cells of Melanoma with Overall Survival by Immunogenomic Analysis. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 8444–8456.
110. Anderson, N.M.; Simon, M.C. The Tumor Microenvironment. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, R921–R925.
111. Leignadier, J.; Favre, S.; Luther, S.A.; Luescher, I.F. CD8 Engineered Cytotoxic T Cells Reprogram Melanoma Tumor Environment. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1086861.
112. Chung, J.S.; Tamura, K.; Cruz, P.D.; Ariizumi, K. DC-HIL-Expressing Myelomonocytic Cells Are Critical Promoters of Melanoma Growth. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 2784–2794.
113. Ballas, Z.K.; Buchta, C.M.; Rosean, T.R.; Heusel, J.W.; Shey, M.R. Role of NK Cell Subsets in Organ-Specific Murine Melanoma Metastasis. *PLoS One* **2013**, *8*, e65599.
114. Gao, X.; Sui, H.; Zhao, S.; Gao, X.; Su, Y.; Qu, P. Immunotherapy Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 585214.
115. Tham, M.; Tan, K.W.; Keeble, J.; Wang, X.; Hubert, S.; Barron, L.; Tan, N.S.; Kato, M.; Prevost-Blondel, A.; Angeli, V.; et al. Melanoma-Initiating Cells Exploit M2 Macrophage

- TGF $\beta$  and Arginase Pathway for Survival and Proliferation. *Oncotarget* **2014**, *5*, 12027–12042.
116. Raskov, H.; Orhan, A.; Christensen, J.P.; Gögenur, I. Cytotoxic CD8+ T Cells in Cancer and Cancer Immunotherapy. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 359–367.
  117. Dranoff, G. Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 11–22.
  118. Borst, J.; Ahrends, T.; Bąbała, N.; Melief, C.J.M.; Kastenmüller, W. CD4+ T Cell Help in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 635–647.
  119. Coulie, P.G.; Van Den Eynde, B.J.; Van Der Bruggen, P.; Boon, T. Tumour Antigens Recognized by T Lymphocytes: At the Core of Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 135–146.
  120. Farhood, B.; Najafi, M.; Mortezaee, K. CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Immunotherapy: A Review. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 8509–8521.
  121. Topalian, S.L.; Taube, J.M.; Anders, R.A.; Pardoll, D.M. Mechanism-Driven Biomarkers to Guide Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 275–287.
  122. Kershaw, M.H.; Westwood, J.A.; Darcy, P.K. Gene-Engineered T Cells for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 525–541.
  123. Gottschalk, C.; Mettke, E.; Kurts, C. The Role of Invariant Natural Killer T Cells in Dendritic Cell Licensing, Cross-Priming, and Memory CD8+ T Cell Generation. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 379.
  124. Srivastava, R.M.; Lee, S.C.; Andrade Filho, P.A.; Lord, C.A.; Jie, H.B.; Davidson, H.C.; López-Albaitero, A.; Gibson, S.P.; Gooding, W.E.; Ferrone, S.; et al. Cetuximab-Activated Natural Killer and Dendritic Cells Collaborate to Trigger Tumor Antigen-Specific T-Cell Immunity in Head and Neck Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1858–1872.
  125. Gotwals, P.; Cameron, S.; Cipolletta, D.; Cremasco, V.; Crystal, A.; Hewes, B.; Mueller, B.; Quarantino, S.; Sabatos-Peyton, C.; Petruzzelli, L.; et al. Prospects for Combining Targeted and Conventional Cancer Therapy with Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 286–301.
  126. Thomas, D.A.; Massagué, J. TGF-Beta Directly Targets Cytotoxic T Cell Functions during Tumor Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 369–380.
  127. Nejad, E.B.; Van Der Sluis, T.C.; Van Duikeren, S.; Yagita, H.; Janssen, G.M.; Van Veelen, P.A.; Melief, C.J.M.; Van Der Burg, S.H.; Arens, R. Tumor Eradication by Cisplatin Is Sustained by CD80/86-Mediated Costimulation of CD8+ T Cells. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6017–6029.
  128. Varricchi, G.; Galdiero, M.R.; Marone, G.; Criscuolo, G.; Triassi, M.; Bonaduce, D.; Marone, G.; Tocchetti, C.G. Cardiotoxicity of Immune Checkpoint Inhibitors. *ESMO open* **2017**, *2*, e000247.
  129. König, R.; Huang, L.Y.; Germain, R.N. MHC Class II Interaction with CD4 Mediated by a Region Analogous to the MHC Class I Binding Site for CD8. *Nature* **1992**, *356*, 796–798.
  130. Owen, D.L.; Sjaastad, L.E.; Farrar, M.A. Regulatory T Cell Development in the Thymus. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 2031–2041.
  131. Spits, H. Development of Alphabeta T Cells in the Human Thymus. *Nat. Rev. Immunol.*



2002, 2, 760–772.

132. Zhou, L.; Chong, M.M.W.; Littman, D.R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **2009**, *30*, 646–655.
133. Zhu, J.; Yamane, H.; Paul, W.E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (\*). *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 445–489.
134. Melssen, M.; Slingluff, C.L. Vaccines Targeting Helper T Cells for Cancer Immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2017**, *47*, 85–92.
135. Kennedy, R.; Celis, E. Multiple Roles for CD4+ T Cells in Anti-Tumor Immune Responses. *Immunol. Rev.* **2008**, *222*, 129–144.
136. Bevan, M.J. Helping the CD8(+) T-Cell Response. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 595–602.
137. Castellino, F.; Germain, R.N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T Cells: When, Where, and How. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 519–540.
138. Laidlaw, B.J.; Craft, J.E.; Kaech, S.M. The Multifaceted Role of CD4(+) T Cells in CD8(+) T Cell Memory. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 102–111.
139. Ahrends, T.; Spanjaard, A.; Pilzecker, B.; Bąbała, N.; Bovens, A.; Xiao, Y.; Jacobs, H.; Borst, J. CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* **2017**, *47*, 848–861.
140. Tay, R.E.; Richardson, E.K.; Toh, H.C. Revisiting the Role of CD4+ T Cells in Cancer Immunotherapy-New Insights into Old Paradigms. *Cancer Gene Ther.* **2021**, *28*, 5–17.
141. Khattri, R.; Cox, T.; Yasayko, S.A.; Ramsdell, F. An Essential Role for Scurfin in CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 993–998.
142. Hori, S.; Nomura, T.; Sakaguchi, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* **2003**, *299*, 981–985.
143. Fontenot, J.D.; Gavin, M.A.; Rudensky, A.Y. Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 986–992.
144. Togashi, Y.; Nishikawa, H. Regulatory T Cells: Molecular and Cellular Basis for Immunoregulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *410*, 3–27.
145. Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M.; Toda, M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 1151–1164.
146. Tran, D.Q.; Ramsey, H.; Shevach, E.M. Induction of FOXP3 Expression in Naive Human CD4+FOXP3 T Cells by T-Cell Receptor Stimulation Is Transforming Growth Factor-Beta Dependent but Does Not Confer a Regulatory Phenotype. *Blood* **2007**, *110*, 2983–2990.
147. Thornton, A.M.; Shevach, E.M. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation in Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 287–296.
148. Wing, K.; Onishi, Y.; Prieto-Martin, P.; Yamaguchi, T.; Miyara, M.; Fehervari, Z.; Nomura, T.; Sakaguchi, S. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* **2008**, *322*, 271–275.

149. Perez, V.L.; Van Parijs, L.; Biuckians, A.; Zheng, X.X.; Strom, T.B.; Abbas, A.K. Induction of Peripheral T Cell Tolerance in Vivo Requires CTLA-4 Engagement. *Immunity* **1997**, *6*, 411–417.
150. Steinbrink, K.; Wöfl, M.; Jonuleit, H.; Knop, J.; Enk, A.H. Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 4772–4780.
151. Collison, L.W.; Workman, C.J.; Kuo, T.T.; Boyd, K.; Wang, Y.; Vignali, K.M.; Cross, R.; Sehy, D.; Blumberg, R.S.; Vignali, D.A.A. The Inhibitory Cytokine IL-35 Contributes to Regulatory T-Cell Function. *Nature* **2007**, *450*, 566–569.
152. Turnis, M.E.; Sawant, D. V.; Szymczak-Workman, A.L.; Andrews, L.P.; Delgoffe, G.M.; Yano, H.; Beres, A.J.; Vogel, P.; Workman, C.J.; Vignali, D.A.A. Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. *Immunity* **2016**, *44*, 316–329.
153. Jarnicki, A.G.; Lysaght, J.; Todryk, S.; Mills, K.H.G. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF-Beta-Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 896–904.
154. Deaglio, S.; Dwyer, K.M.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.F.; Enjoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; et al. Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1257–1265.
155. Wilson, J.M.; Ross, W.G.; Agbai, O.N.; Frazier, R.; Figler, R.A.; Rieger, J.; Linden, J.; Ernst, P.B. The A2B Adenosine Receptor Impairs the Maturation and Immunogenicity of Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4616–4623.
156. Grossman, W.J.; Verbsky, J.W.; Barchet, W.; Colonna, M.; Atkinson, J.P.; Ley, T.J. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity* **2004**, *21*, 589–601.
157. Du, X.; Chapman, N.M.; Chi, H. Emerging Roles of Cellular Metabolism in Regulating Dendritic Cell Subsets and Function. *Front. cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 152.
158. Giovanelli, P.; Sandoval, T.A.; Cubillos-Ruiz, J.R. Dendritic Cell Metabolism and Function in Tumors. *Trends Immunol.* **2019**, *40*, 699–718.
159. Gardner, A.; Ruffell, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 855–865.
160. Murphy, T.L.; Grajales-Reyes, G.E.; Wu, X.; Tussiwand, R.; Briseño, C.G.; Iwata, A.; Kretzer, N.M.; Durai, V.; Murphy, K.M. Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34*, 93–119.
161. Böttcher, J.P.; Reis e Sousa, C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in cancer* **2018**, *4*, 784–792.
162. Wang, N.; Liang, H.; Zen, K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1-M2 Polarization Balance. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 614.
163. Allavena, P.; Sica, A.; Solinas, G.; Porta, C.; Mantovani, A. The Inflammatory Micro-Environment in Tumor Progression: The Role of Tumor-Associated Macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**, *66*, 1–9.
164. Gordy, C.; Pua, H.; Sempowski, G.D.; He, Y.W. Regulation of Steady-State Neutrophil Homeostasis by Macrophages. *Blood* **2011**, *117*, 618–629.

165. Wynn, T.A.; Chawla, A.; Pollard, J.W. Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease. *Nature* **2013**, *496*, 445–455.
166. Oishi, Y.; Manabe, I. Macrophages in Inflammation, Repair and Regeneration. *Int. Immunol.* **2018**, *30*, 511–528.
167. Verreck, F.A.W.; De Boer, T.; Langenberg, D.M.L.; Hoeve, M.A.; Kramer, M.; Vaisberg, E.; Kastelein, R.; Kolk, A.; De Waal-Malefyt, R.; Ottenhoff, T.H.M. Human IL-23-Producing Type 1 Macrophages Promote but IL-10-Producing Type 2 Macrophages Subvert Immunity to (Myco)Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 4560–4565.
168. Fujiwara, N.; Kobayashi, K. Macrophages in Inflammation. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* **2005**, *4*, 281–286.
169. Bouhrel, M.A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Dièvert, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadzki, C.; Jude, B.; Torpier, G.; Marx, N.; et al. PPAR $\gamma$  Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-Inflammatory Properties. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 137–143.
170. Cohen, H.B.; Mosser, D.M. Extrinsic and Intrinsic Control of Macrophage Inflammatory Responses. *J. Leukoc. Biol.* **2013**, *94*, 913–919.
171. Kratochvill, F.; Neale, G.; Haverkamp, J.M.; Van de Velde, L.A.; Smith, A.M.; Kawauchi, D.; McEvoy, J.; Roussel, M.F.; Dyer, M.A.; Qualls, J.E.; et al. TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep.* **2015**, *12*, 1902–1914.
172. Boutilier, A.J.; ElSawa, S.F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6995.
173. Vivier, E.; Raulet, D.H.; Moretta, A.; Caligiuri, M.A.; Zitvogel, L.; Lanier, L.L.; Yokoyama, W.M.; Ugolini, S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* **2011**, *331*, 44–49.
174. Sun, J.C.; Beilke, J.N.; Lanier, L.L. Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells. *Nature* **2009**, *457*, 557–561.
175. Hilton, H.G.; Parham, P. Missing or Altered Self: Human NK Cell Receptors That Recognize HLA-C. *Immunogenetics* **2017**, *69*, 567–579.
176. Komori, H.K.; Meehan, T.F.; Havran, W.L. Epithelial and Mucosal Gamma Delta T Cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 534–538.
177. Brigl, M.; Tatituri, R.V.V.; Watts, G.F.M.; Bhowruth, V.; Leadbetter, E.A.; Barton, N.; Cohen, N.R.; Hsu, F.F.; Besra, G.S.; Brenner, M.B. Innate and Cytokine-Driven Signals, Rather than Microbial Antigens, Dominate in Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1163–1177.
178. Huntington, N.D.; Vosshenrich, C.A.J.; Di Santo, J.P. Developmental Pathways That Generate Natural-Killer-Cell Diversity in Mice and Humans. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 703–714.
179. Lucas, M.; Schachterle, W.; Oberle, K.; Aichele, P.; Diefenbach, A. Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by Trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity* **2007**, *26*, 503–517.
180. Chiossone, L.; Dumas, P.Y.; Vienne, M.; Vivier, E. Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 671–688.
181. Zhang, C.; Zhang, J.; Tian, Z. The Regulatory Effect of Natural Killer Cells: Do “NK-Reg Cells” Exist? *Cell. Mol. Immunol.* **2006**, *3*, 241–254.

182. Moretta, A.; Marcenaro, E.; Parolini, S.; Ferlazzo, G.; Moretta, L. NK Cells at the Interface between Innate and Adaptive Immunity. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 226–233.
183. Zheng, M.; Sun, R.; Wei, H.; Tian, Z. NK Cells Help Induce Anti-Hepatitis B Virus CD8+ T Cell Immunity in Mice. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 4122–4131.
184. Liu, Y.; Zheng, J.; Liu, Y.; Wen, L.; Huang, L.; Xiang, Z.; Lam, K.T.; Lv, A.; Mao, H.; Lau, Y.L.; et al. Uncompromised NK Cell Activation Is Essential for Virus-Specific CTL Activity during Acute Influenza Virus Infection. *Cell. Mol. Immunol.* **2018**, *15*, 827–837.
185. Tian, Z.; Gershwin, M.E.; Zhang, C. Regulatory NK Cells in Autoimmune Disease. *J. Autoimmun.* **2012**, *39*, 206–215.
186. Zhang, Q.; Bi, J.; Zheng, X.; Chen, Y.; Wang, H.; Wu, W.; Wang, Z.; Wu, Q.; Peng, H.; Wei, H.; et al. Blockade of the Checkpoint Receptor TIGIT Prevents NK Cell Exhaustion and Elicits Potent Anti-Tumor Immunity. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 723–732.
187. Gabrilovich, D.I.; Bronte, V.; Chen, S.H.; Colombo, M.P.; Ochoa, A.; Ostrand-Rosenberg, S.; Schreiber, H. The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 425–425.
188. Gabrilovich, D.I.; Nagaraj, S. Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 162–174.
189. Tian, J.; Rui, K.; Tang, X.; Ma, J.; Wang, Y.; Tian, X.; Zhang, Y.; Xu, H.; Lu, L.; Wang, S. MicroRNA-9 Regulates the Differentiation and Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells via Targeting Runx1. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 1301–1311.
190. Veglia, F.; Perego, M.; Gabrilovich, D. Myeloid-Derived Suppressor Cells Coming of Age. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 108–119.
191. Hiam-Galvez, K.J.; Allen, B.M.; Spitzer, M.H. Systemic Immunity in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *21*, 345–359.
192. Schultze, J.L.; Mass, E.; Schlitzer, A. Emerging Principles in Myelopoiesis at Homeostasis and during Infection and Inflammation. *Immunity* **2019**, *50*, 288–301.
193. Masopust, D.; Schenkel, J.M. The Integration of T Cell Migration, Differentiation and Function. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 309–320.
194. Gabrilovich, D.I.; Ostrand-Rosenberg, S.; Bronte, V. Coordinated Regulation of Myeloid Cells by Tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 253–268.
195. Jaillon, S.; Ponzetta, A.; Di Mitri, D.; Santoni, A.; Bonecchi, R.; Mantovani, A. Neutrophil Diversity and Plasticity in Tumour Progression and Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 485–503.
196. Canè, S.; Ugel, S.; Trovato, R.; Marigo, I.; De Sanctis, F.; Sartoris, S.; Bronte, V. The Endless Saga of Monocyte Diversity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1786.
197. Almand, B.; Clark, J.I.; Nikitina, E.; van Beynen, J.; English, N.R.; Knight, S.C.; Carbone, D.P.; Gabrilovich, D.I. Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 678–689.
198. Casbon, A.J.; Reynau, D.; Park, C.; Khu, E.; Gan, D.D.; Schepers, K.; Passegué, E.; Werb, Z. Invasive Breast Cancer Reprograms Early Myeloid Differentiation in the Bone Marrow to Generate Immunosuppressive Neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E566–E575.

199. Wu, W.C.; Sun, H.W.; Chen, H.T.; Liang, J.; Yu, X.J.; Wu, C.; Wang, Z.; Zheng, L. Circulating Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Are Myeloid-Biased in Cancer Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 4221–4226.
200. Kersten, K.; Coffelt, S.B.; Hoogstraat, M.; Verstegen, N.J.M.; Vrijland, K.; Ciampricotti, M.; Doornebal, C.W.; Hau, C.S.; Wellenstein, M.D.; Salvagno, C.; et al. Mammary Tumor-Derived CCL2 Enhances pro-Metastatic Systemic Inflammation through Upregulation of IL1 $\beta$  in Tumor-Associated Macrophages. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1334744.
201. Coffelt, S.B.; Kersten, K.; Doornebal, C.W.; Weiden, J.; Vrijland, K.; Hau, C.S.; Verstegen, N.J.M.; Ciampricotti, M.; Hawinkels, L.J.A.C.; Jonkers, J.; et al. IL-17-Producing  $\Gamma\delta$  T Cells and Neutrophils Conspire to Promote Breast Cancer Metastasis. *Nature* **2015**, *522*, 345–348.
202. Binnewies, M.; Mujal, A.M.; Pollack, J.L.; Combes, A.J.; Hardison, E.A.; Barry, K.C.; Tsui, J.; Ruhland, M.K.; Kersten, K.; Abushawish, M.A.; et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4 $^+$  T Cell Immunity. *Cell* **2019**, *177*, 556–571.
203. Hildner, K.; Edelson, B.T.; Purtha, W.E.; Diamond, M.; Matsushita, H.; Kohyama, M.; Calderon, B.; Schraml, B.U.; Unanue, E.R.; Diamond, M.S.; et al. Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 $\alpha^+$  Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* **2008**, *322*, 1097–1100.
204. Mastelic-Gavillet, B.; Sarivalasis, A.; Lozano, L.E.; Wyss, T.; Inoges, S.; de Vries, I.J.M.; Dartiguenave, F.; Jichlinski, P.; Derrè, L.; Coukos, G.; et al. Quantitative and Qualitative Impairments in Dendritic Cell Subsets of Patients with Ovarian or Prostate Cancer. *Eur. J. Cancer* **2020**, *135*, 173–182.
205. Della Bella, S.; Gennaro, M.; Vaccari, M.; Ferraris, C.; Nicola, S.; Riva, A.; Clerici, M.; Greco, M.; Villa, M.L. Altered Maturation of Peripheral Blood Dendritic Cells in Patients with Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 1463–1472.
206. Tabarkiewicz, J.; Rybojad, P.; Jabłonka, A.; Roliński, J. CD1c $^+$  and CD303 $^+$  Dendritic Cells in Peripheral Blood, Lymph Nodes and Tumor Tissue of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 237–243.
207. Van Crujisen, H.; Van Der Veldt, A.A.M.; Vroling, L.; Oosterhoff, D.; Broxterman, H.J.; Scheper, R.J.; Giaccone, G.; Haanen, J.B.A.G.; Van Den Eertwegh, A.J.M.; Boven, E.; et al. Sunitinib-Induced Myeloid Lineage Redistribution in Renal Cell Cancer Patients: CD1c $^+$  Dendritic Cell Frequency Predicts Progression-Free Survival. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 5884–5892.
208. Almand, B.; Resser, J.R.; Lindman, B.; Nadaf, S.; Clark, J.I.; Kwon, E.D.; Carbone, D.P.; Gaborilovich, D.I.; of Pathology I G, D.D.; D K, U.E.; et al. Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1755–1766.
209. Failli, A.; Legitimo, A.; Orsini, G.; Romanini, A.; Consolini, R. Numerical Defect of Circulating Dendritic Cell Subsets and Defective Dendritic Cell Generation from Monocytes of Patients with Advanced Melanoma. *Cancer Lett.* **2013**, *337*, 184–192.
210. Wolf, A.M.; Wolf, D.; Steurer, M.; Gastl, G.; Gunsilius, Eberhard, Grubeck-Loebenstein, B. Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients - PubMed. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 606–612.
211. Ahmadzadeh, M.; Pasetto, A.; Jia, L.; Deniger, D.C.; Stevanović, S.; Robbins, P.F.; Rosenberg, S.A. Tumor-Infiltrating Human CD4 $^+$  Regulatory T Cells Display a Distinct TCR Repertoire and Exhibit Tumor and Neoantigen Reactivity. *Sci. Immunol.* **2019**, *4*, ea04310.

212. Wang, L.; Simons, D.L.; Lu, X.; Tu, T.Y.; Solomon, S.; Wang, R.; Rosario, A.; Avalos, C.; Schmolze, D.; Yim, J.; et al. Connecting Blood and Intratumoral Treg Cell Activity in Predicting Future Relapse in Breast Cancer. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 1220–1230.
213. Yuen, G.J.; Demissie, E.; Pillai, S. B Lymphocytes and Cancer: A Love-Hate Relationship. *Trends in cancer* **2016**, *2*, 747–757.
214. Wang, W.; Yuan, X.; Chen, H.; Xie, G.; Ma, Y.; Zheng, Y.; Zhou, Y.; Shen, L. CD19+CD24hiCD38hiBregs Involved in Downregulate Helper T Cells and Upregulate Regulatory T Cells in Gastric Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 33486.
215. Murakami, Y.; Saito, H.; Shimizu, S.; Kono, Y.; Shishido, Y.; Miyatani, K.; Matsunaga, T.; Fukumoto, Y.; Ashida, K.; Sakabe, T.; et al. Increased Regulatory B Cells Are Involved in Immune Evasion in Patients with Gastric Cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13083.
216. Zhou, J.; Min, Z.; Zhang, D.; Wang, W.; Marincola, F.; Wang, X. Enhanced Frequency and Potential Mechanism of B Regulatory Cells in Patients with Lung Cancer. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 1–11.
217. Shimasaki, N.; Jain, A.; Campana, D. NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 200–218.
218. Mamessier, E.; Sylvain, A.; Thibult, M.L.; Houvenaeghel, G.; Jacquemier, J.; Castellano, R.; Gonçalves, A.; André, P.; Romagné, F.; Thibault, G.; et al. Human Breast Cancer Cells Enhance Self Tolerance by Promoting Evasion from NK Cell Antitumor Immunity. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 3609–3622.
219. Šavikin, K.; Zdunić, G.; Menković, N.; Živković, J.; Čujić, N.; Tereščenko, M.; Bigović, D. Ethnobotanical Study on Traditional Use of Medicinal Plants in South-Western Serbia, Zlatibor District. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 803–810.
220. Lopes, C.M.; Dourado, A.; Oliveira, R. Phytotherapy and Nutritional Supplements on Breast Cancer. *Biomed Res. Int.* **2017**, *12*, 1–42.
221. Ravelo, A.G.; Estevez-Braun, A.; Chavez-Orellana, H.; Perez-Sacau, E.; Mesa-Siverio, D. Recent Studies on Natural Products as Anticancer Agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 241–265.
222. Choi, J.G.; Eom, S.M.; Kim, J.; Kim, S.H.; Huh, E.; Kim, H.; Lee, Y.; Lee, H.; Oh, M.S. A Comprehensive Review of Recent Studies on Herb-Drug Interaction: A Focus on Pharmacodynamic Interaction. *J. Altern. Complement. Med.* **2016**, *22*, 262–279.
223. Omogbadegun, Z.O. Medicinal Plants-Based Foods for Breast Cancer Treatment: An Ethnobotanical Survey and Digitization. *Int. J. Med. Plants Altern. Med.* **2013**, *1*, 137–163.
224. Ma, X.H.; Zheng, C.J.; Han, L.Y.; Xie, B.; Jia, J.; Cao, Z.W.; Li, Y.X.; Chen, Y.Z. Synergistic Therapeutic Actions of Herbal Ingredients and Their Mechanisms from Molecular Interaction and Network Perspectives. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 579–588.
225. Yin, S.Y.; Wei, W.C.; Jian, F.Y.; Yang, N.S. Therapeutic Applications of Herbal Medicines for Cancer Patients. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 302426.
226. Ichikawa, H.; Nakamura, Y.; Kashiwada, Y.; Aggarwal, B.B. Anticancer Drugs Designed by Mother Nature: Ancient Drugs but Modern Targets. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3400–3416.
227. Sarkar, F.H.; Li, Y. Using Chemopreventive Agents to Enhance the Efficacy of Cancer Therapy. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3347–3350.
228. Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Cancer Genes and the Pathways They Control. *Nat. Med.*

2004, 10, 789–799.

229. Cragg, G.M.; Newman, D.J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72–79.
230. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803.
231. Gordaliza, M. Natural Products as Leads to Anticancer Drugs. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, *9*, 767–776.
232. Butler, M.S. Natural Products to Drugs: Natural Product-Derived Compounds in Clinical Trials. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475–516.
233. Mijatović, S.; Bramanti, A.; Nicoletti, F.; Fagone, P.; Kaluđerović, G.N.; Maksimović-Ivanić, D. Naturally Occurring Compounds in Differentiation Based Therapy of Cancer. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1622–1632.
234. Banerjee, S.; Li, Y.; Wang, Z.; Sarkar, F.H. Multi-Targeted Therapy of Cancer by Genistein. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 226–242.
235. Olivera, A.; Moore, T.W.; Hu, F.; Brown, A.P.; Sun, A.; Liotta, D.C.; Snyder, J.P.; Yoon, Y.; Shim, H.; Marcus, A.I.; et al. Inhibition of the NF-KB Signaling Pathway by the Curcumin Analog, 3,5-Bis(2-Pyridinylmethylidene)-4-Piperidone (EF31): Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 368–377.
236. Cocco, G.; Chu, D.C.C.; Pandolfi, S. Colchicine in Clinical Medicine. A Guide for Internists. *Eur. J. Intern. Med.* **2010**, *21*, 503–508.
237. Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. Anti-Mitotic Activity of Colchicine and the Structural Basis for Its Interaction with Tubulin. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 155–183.
238. Fakh, M.; Replogle, T.; Lehr, J.E.; Pienta, K.J.; Yagoda, A. Inhibition of Prostate Cancer Growth by Estramustine and Colchicine. *Prostate* **1995**, *26*, 310–315.
239. Craig, D.H.; Owen, C.R.; Conway, W.C.; Walsh, M.F.; Downey, C.; Basson, M.D. Colchicine Inhibits Pressure-Induced Tumor Cell Implantation within Surgical Wounds and Enhances Tumor-Free Survival in Mice. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 3170–3180.
240. Lin, Z.Y.; Wu, C.C.; Chuang, Y.H.; Chuang, W.L. Anti-Cancer Mechanisms of Clinically Acceptable Colchicine Concentrations on Hepatocellular Carcinoma. *Life Sci.* **2013**, *93*, 323–328.
241. Bradley, P.R. *British Herbal Compendium. Volume 2: A Handbook of Scientific Information of Widely Used Plant Drugs.*; British Herbal Medicine Association, 2006.
242. Gehrke, B.; Bräuchler, C.; Romoleroux, K.; Lundberg, M.; Heubl, G.; Eriksson, T. Molecular Phylogenetics of *Alchemilla*, *Aphanes* and *Lachemilla* (Rosaceae) Inferred from Plastid and Nuclear Intron and Spacer DNA Sequences, with Comments on Generic Classification. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2008**, *47*, 1030–1044.
243. Gajić, M. *Alchemilla L. – Flora SR Srbije 4*; 1972.
244. Tasić-Kostov, M.; Arsić, I.; Pavlović, D.; Stojanović, S.; Najman, S.; Naumović, S.; Tadić, V. Towards a Modern Approach to Traditional Use: In Vitro and in Vivo Evaluation of *Alchemilla Vulgaris* L. Gel Wound Healing Potential. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *238*, 111789.
245. Shilova, I. V.; Suslov, N.I.; Samylina, I.A.; Baeva, V.M.; Lazareva, N.B.; Mazin, E. V.

- Neuroprotective Properties of Common Lady's Mantle Infusion. *Pharm. Chem. J.* **2020**, *53*, 1059–1062.
246. Ghedira, K.; Goetz, P.; Le Jeune, R. *Alchemilla Vulgaris* L.: Alchémille (Rosaceae). *Phytothérapie* **2012**, *10*, 263–266.
247. Ergene, B.; Bahadır Acikara, Ö.; Bakar, F.; Saltan, G.; Nebioğlu, S. Antioxidant Activity and Phytochemical Analysis of *Alchemilla Persica* Rothm. *Ankara Univ. Eczac. Fak. Derg.* **2010**, *39*, 145–154.
248. Filippova, E.I. Antiviral Activity of Lady's Mantle (*Alchemilla Vulgaris* L.) Extracts against Orthopoxviruses. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2017**, *163*, 374–377.
249. Tadić, V.; Krgović, N.; Žugić, A. Lady's Mantle (*Alchemilla Vulgaris* L., Rosaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemical Profile, and Biological Properties. *Nat. Med. Mater.* **2020**, *40*, 66–74.
250. Atef, N.M.; Shanab, S.M.; Negm, S.I.; Abbas, Y.A. Evaluation of Antimicrobial Activity of Some Plant Extracts against Antibiotic Susceptible and Resistant Bacterial Strains Causing Wound Infection. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 1–11.
251. Neagu, E.; Paun, G.; Albu, C.; Radu, G.L. Assessment of Acetylcholinesterase and Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activity of *Alchemilla Vulgaris* and *Filipendula Ulmaria* Extracts. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2015**, *52*, 1–6.
252. Vlaisavljević, S.; Jelača, S.; Zengin, G.; Mimica-Dukić, N.; Berežni, S.; Miljić, M.; Stevanović, Z.D. *Alchemilla Vulgaris* Agg. (Lady's Mantle) from Central Balkan: Antioxidant, Anticancer and Enzyme Inhibition Properties. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 37474–37483.
253. Boroja, T.; Mihailović, V.; Katanić, J.; Pan, S.P.; Nikles, S.; Imbimbo, P.; Monti, D.M.; Stanković, N.; Stanković, M.S.; Bauer, R. The Biological Activities of Roots and Aerial Parts of *Alchemilla Vulgaris* L. *South African J. Bot.* **2018**, *116*, 175–184.
254. Kiselova, Y.; Ivanova, D.; Chervenkov, T.; Gerova, D.; Galunska, B.; Yankova, T. Correlation between the in Vitro Antioxidant Activity and Polyphenol Content of Aqueous Extracts from Bulgarian Herbs. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 961–965.
255. Ibrahim, O.H.M.; Abo-Elyousr, K.A.M.; Asiry, K.A.; Alhakamy, N.A.; Mousa, M.A.A. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity and In Vitro Antiproliferative Potential of *Alchemilla Vulgaris* Auct Root Extract against Prostate (PC-3), Breast (MCF-7) and Colorectal Adenocarcinoma (Caco-2) Cancer Cell Lines. *Plants* **2022**, *11*, 2140.
256. Ng, A.; Parker, M.L.; Parr, A.J.; Saunders, P.K.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. Physicochemical Characteristics of Onion (*Allium Cepa* L.) Tissues. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5612–5617.
257. Asemani, Y.; Zamani, N.; Bayat, M.; Amirghofran, Z. Allium Vegetables for Possible Future of Cancer Treatment. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 3019–3039.
258. Simin, N.; Orcic, D.; Cetojevic-Simin, D.; Mimica-Dukic, N.; Anackov, G.; Beara, I.; Mitic-Culafic, D.; Bozin, B. Phenolic Profile, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Small Yellow Onion (*Allium Flavum* L. Subsp. *Flavum*, Alliaceae). *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 139–146.
259. Kim, D.W.; Kim, M.J.; Shin, Y.; Jung, S.K.; Kim, Y.J. Green Pepper (*Piper Nigrum* L.) Extract Suppresses Oxidative Stress and LPS-Induced Inflammation via Regulation of JNK Signaling Pathways. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 2519.



260. Fraisse, D.; Felgines, C.; Texier, O.; Lamaison, J.-L.; Fraisse, D.; Felgines, C.; Texier, O.; Lamaison, J.-L. Caffeoyl Derivatives: Major Antioxidant Compounds of Some Wild Herbs of the Asteraceae Family. *Food Nutr. Sci.* **2011**, *2*, 181–192.
261. Briles, E.B.; Kornfeld, S. Isolation and Metastatic Properties of Detachment Variants of B16 Melanoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **1978**, *60*, 1217–1221.
262. Ohira, T.; Ohe, Y.; Heike, Y.; Podack, E.R.; Olsen, K.J.; Nishio, K.; Nishio, M.; Miyahara, Y.; Funayama, Y.; Ogasawara, H.; et al. In Vitro and in Vivo Growth of B16F10 Melanoma Cells Transfected with Interleukin-4 CDNA and Gene Therapy with the Transfectant. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 631–635.
263. Zang, G.; Gustafsson, K.; Jamalpour, M.; Hong, J.W.; Genové, G.; Welsh, M. Vascular Dysfunction and Increased Metastasis of B16F10 Melanomas in Shb Deficient Mice as Compared with Their Wild Type Counterparts. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 1–11.
264. Giard, D.J.; Aaronson, S.A.; Todaro, G.J.; Arnstein, P.; Kersey, J.H.; Dosik, H.; Parks, W.P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417–1423.
265. Pulaski, B.A.; Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, *39*, 20–22.
266. Schrörs, B.; Boegel, S.; Albrecht, C.; Bukur, T.; Bukur, V.; Holtsträter, C.; Ritzel, C.; Manninen, K.; Tadmor, A.D.; Vormehr, M.; et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1–14.
267. DuPré, S.A.; Redelman, D.; Hunter, K.W. The Mouse Mammary Carcinoma 4T1: Characterization of the Cellular Landscape of Primary Tumours and Metastatic Tumour Foci. *Int. J. Exp. Pathol.* **2007**, *88*, 351–360.
268. Lee, A. V.; Oesterreich, S.; Davidson, N.E. MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, djv073.
269. Soule, H.D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. A Human Cell Line from a Pleural Effusion Derived from a Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409–1416.
270. Cass, G. A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement. *Detroit Michigan Cancer Found.* **1990**.
271. Brandes, L.J.; Hermonat, M.W. Receptor Status and Subsequent Sensitivity of Subclones of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Surviving Exposure to Diethylstilbestrol. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 2831–2835.
272. Lippman, M.E.; Bolan, G. Oestrogen-Responsive Human Breast Cancer in Long Term Tissue Culture. *Nature* **1975**, *256*, 592–593.
273. Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q.V.J. Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines of Metastatic Origin: Preliminary Characterization. *In Vitro* **1978**, *14*, 911–915.
274. Chavez, K.J.; Garimella, S. V.; Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* **2010**, *32*, 35–48.
275. Ray, A.; Nkhata, K.J.; Cleary, M.P. Effects of Leptin on Human Breast Cancer Cell Lines in Relationship to Estrogen Receptor and HER2 Status. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 1499–1509.
276. Hevir, N.; Trošt, N.; Debeljak, N.; Lanišnik Rižner, T. Expression of Estrogen and

- Progesterone Receptors and Estrogen Metabolizing Enzymes in Different Breast Cancer Cell Lines. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *191*, 206–216.
277. Liu, H.; Zang, C.; Fenner, M.H.; Possinger, K.; Elstner, E. PPARgamma Ligands and ATRA Inhibit the Invasion of Human Breast Cancer Cells in Vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *79*, 63–74.
278. Holliday, D.L.; Speirs, V. Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 215.
279. Shapiro, H.M. *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons; 2005
280. Van Engeland, M.; Nieland, L.J.W.; Ramaekers, F.C.S.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C.P.M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **1998**, *31*, 1–9.
281. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A Novel Assay for Apoptosis Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39–51.
282. Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J.D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to Detect Senescence-Associated Beta-Galactosidase (SA-Betagal) Activity, a Biomarker of Senescent Cells in Culture and in Vivo. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1798–1806.
283. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al. A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 9363–9367.
284. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
285. Hughes, C.S.; Postovit, L.M.; Lajoie, G.A. Matrigel: A Complex Protein Mixture Required for Optimal Growth of Cell Culture. *Proteomics* **2010**, *10*, 1886–1890.
286. Guan, X. Cancer Metastases: Challenges and Opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 402–418.
287. Chan, J.K.C. The Wonderful Colors of the Hematoxylin-Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int. J. Surg. Pathol.* **2014**, *22*, 12–32.
288. Jovanovic, I.P.; Pejnovic, N.N.; Radosavljevic, G.D.; Pantic, J.M.; Milovanovic, M.Z.; Arsenijevic, N.N.; Lukic, M.L. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Growth and Metastases by Facilitating Intratumoral Accumulation of Immunosuppressive and Innate Lymphoid Cells. *Int. J. cancer* **2014**, *134*, 1669–1682.
289. Guo, Y.; Pan, W.; Liu, S.; Shen, Z.; Xu, Y.; Hu, L. ERK/MAPK Signalling Pathway and Tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 1997–2007.
290. Klionsky, D.J.; Meijer, A.J.; Codogno, P. Autophagy and P70S6 Kinase. *Autophagy* **2005**, *1*, 59–60.
291. Nacarelli, T.; Azar, A.; Sell, C. Aberrant MTOR Activation in Senescence and Aging: A Mitochondrial Stress Response? *Exp. Gerontol.* **2015**, *68*, 66–70.
292. Yousefi, H.; Vatanmakanian, M.; Mahdiannasser, M.; Mashouri, L.; Alahari, N. V.; Monjezi, M.R.; Ilbeigi, S.; Alahari, S.K. Understanding the Role of Integrins in Breast Cancer Invasion, Metastasis, Angiogenesis, and Drug Resistance. *Oncogene* **2021**, *40*, 1043–1063.

293. Redzić, S.S. The Ecological Aspect of Ethnobotany and Ethnopharmacology of Population in Bosnia and Herzegovina. *Coll. Antropol.* **2007**, *31*, 869–890.
294. Gibbons, S. An Overview of Plant Extracts as Potential Therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 489–497.
295. Rasoanaivo, P.; Wright, C.W.; Willcox, M.L.; Gilbert, B. Whole Plant Extracts versus Single Compounds for the Treatment of Malaria: Synergy and Positive Interactions. *Malar. J.* **2011**, *10*, 1–12.
296. Moein, S. Polyphenols and Cancer: A Review. *Mol. Med. J.* **2015**, *1*, 6–12.
297. Sanha, F.M.A.; Kumar, S.; Sharma, P.K. Phenolic Compounds from Plants-an Important Class of Phytomedicine in Wrestle against Cancer-a Review. *Leuk.* **2019**, *15*, 16.
298. Domingues, B.; Lopes, J.M.; Soares, P.; Pópulo, H. Melanoma Treatment in Review. *ImmunoTargets Ther.* **2018**, *7*, 35–49.
299. Júnior, R.G. de O.; Ferraz, C.A.A.; Silva, M.G. e; Lavor, É.M. de; Rolim, L.A.; Lima, J.T. de; Fleury, A.; Picot, L.; Quintans, J. de S.S.; Júnior, L.J.Q.; Almeida, J.R.G. da S. *Flavonoids: Promising Natural Products for Treatment of Skin Cancer (Melanoma)*; InTech, 2017, 161–210 .
300. Polyak, K. Heterogeneity in Breast Cancer. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 3786–3788.
301. Liedtke, C.; Mazouni, C.; Hess, K.R.; André, F.; Tordai, A.; Mejia, J.A.; Symmans, W.F.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hennessy, B.; Green, M.; et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 1275–1281.
302. Israel, B.B.; Tilghman, S.L.; Parker-Lemieux, K.; Payton-Stewart, F. Phytochemicals: Current Strategies for Treating Breast Cancer (Review). *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 7471–7478.
303. Hashemzaei, M.; Far, A.D.; Yari, A.; Heravi, R.E.; Tabrizian, K.; Taghdisi, S.M.; Sadegh, S.E.; Tsarouhas, K.; Kouretas, D.; Tzanakakis, G.; et al. Anticancer and Apoptosis-inducing Effects of Quercetin in Vitro and in Vivo. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 819–828.
304. Rudrapal, M.; Khairnar, S.J.; Khan, J.; Dukhyil, A. Bin; Ansari, M.A.; Alomary, M.N.; Alshabrm, F.M.; Palai, S.; Deb, P.K.; Devi, R. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 806470.
305. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352.
306. Liu, R.H. Health Benefits of Fruit and Vegetables Are from Additive And. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 517S–520S.
307. Wu, K.; El Zowalaty, A.E.; Sayin, V.I.; Papagiannakopoulos, T. The Pleiotropic Functions of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Nat. Cancer* **2024**, *5*, 384–399.
308. Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 579–591.
309. Loo, G. Redox-Sensitive Mechanisms of Phytochemical-Mediated Inhibition of Cancer Cell Proliferation. *J. Nutr. Biochem.* **2003**, *14*, 64–73.
310. Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M.B. Role of Dietary Flavonoids in Protection against Cancer and Coronary Heart Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 785–789.

311. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J. Antioxidant Activities of Flavonoids as Bioactive Components of Food. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 790–795.
312. Tham, D.M.; Gardner, C.D.; Haskell, W.L. Clinical Review 97: Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 2223–2235.
313. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.
314. Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark, H.L. Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381–406.
315. Kris-Etherton, P.M.; Hecker, K.D.; Bonanome, A.; Coval, S.M.; Binkoski, A.E.; Hilpert, K.F.; Griel, A.E.; Etherton, T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am. J. Med.* **2002**, *113*, 71–88.
316. Ravishankar, D.; Rajora, A.K.; Greco, F.; Osborn, H.M.I. Flavonoids as Prospective Compounds for Anti-Cancer Therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2821–2831.
317. Shamsudin, N.F.; Ahmed, Q.U.; Mahmood, S.; Shah, S.A.A.; Sarian, M.N.; Khattak, M.M.A.K.; Khatib, A.; Sabere, A.S.M.; Yusoff, Y.M.; Latip, J. Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12605.
318. Valentová, K.; Vrba, J.; Bancířová, M.; Ulrichová, J.; Křen, V. Isoquercitrin: Pharmacology, Toxicology, and Metabolism. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *68*, 267–282.
319. Orfali, G. di C.; Duarte, A.C.; Bonadio, V.; Martinez, N.P.; de Araújo, M.E.M.B.; Priviero, F.B.M.; Carvalho, P.O.; Priolli, D.G. Review of Anticancer Mechanisms of Isoquercitrin. *World J. Clin. Oncol.* **2016**, *7*, 189–199.
320. Tang, S.M.; Deng, X.T.; Zhou, J.; Li, Q.P.; Ge, X.X.; Miao, L. Pharmacological Basis and New Insights of Quercetin Action in Respect to Its Anti-Cancer Effects. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *121*, 109604.
321. Caltagirone, S.; Rossi, C.; Poggi, A.; Ranelletti, F.O.; Natali, P.G.; Brunetti, M.; Aiello, F.B.; Piantelli, M. Flavonoids Apigenin and Quercetin Inhibit Melanoma Growth and Metastatic Potential. *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 595–600.
322. Soll, F.; Ternent, C.; Berry, I.M.; Kumari, D.; Moore, T.C. Quercetin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of B16 Melanoma Cells In Vitro. *Assay Drug Dev. Technol.* **2020**, *18*, 261–268.
323. Kale, R.; Saraf, M.; Juvekar, A.; Tayade, P. Decreased B16F10 Melanoma Growth and Impaired Tumour Vascularization in BDF1 Mice with Quercetin-Cyclodextrin Binary System. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1351–1358.
324. Cao, H.H.; Tse, A.K.W.; Kwan, H.Y.; Yu, H.; Cheng, C.Y.; Su, T.; Fong, W.F.; Yu, Z.L. Quercetin Exerts Anti-Melanoma Activities and Inhibits STAT3 Signaling. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *87*, 424–434.
325. Deng, X.H.; Song, H.Y.; Zhou, Y.F.; Yuan, G.Y.; Zheng, F.J. Effects of Quercetin on the Proliferation of Breast Cancer Cells and Expression of Survivin in Vitro. *Exp. Ther. Med.* **2013**, *6*, 1155–1158.
326. Chien, S.Y.; Wu, Y.C.; Chung, J.G.; Yang, J.S.; Lu, H.F.; Tsou, M.F.; Wood, W.; Kuo, S.J.; Chen, D.R. Quercetin-Induced Apoptosis Acts through Mitochondrial- and Caspase-3-

Dependent Pathways in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **2009**, *28*, 493–503.

327. Kim, H.; Seo, E.M.; Sharma, A.R.; Ganbold, B.; Park, J.; Sharma, G.; Kang, Y.H.; Song, D.K.; Lee, S.S.; Nam, J.S. Regulation of Wnt Signaling Activity for Growth Suppression Induced by Quercetin in 4T1 Murine Mammary Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1319–1325.
328. Wang, D.; Bao, B. Gallic Acid Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Progression via Suppression of EGFR-Dependent CARM1-PELP1 Complex. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 1583–1592.
329. Aborehab, N.M.; Elnagar, M.R.; Waly, N.E. Gallic Acid Potentiates the Apoptotic Effect of Paclitaxel and Carboplatin via Overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2021**, *35*, e22638.
330. Wang, K.; Zhu, X.; Zhang, K.; Zhu, L.; Zhou, F. Investigation of Gallic Acid Induced Anticancer Effect in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2014**, *28*, 387–393.
331. Lo, C.; Lai, T.-Y.; Yang, J.-H.; Yang, J.-S.; Ma, Y.-S.; Weng, S.-W.; Chen, Y.-Y.; Lin, J.-G.; Chung, J.-G. Gallic Acid Induces Apoptosis in A375.S2 Human Melanoma Cells through Caspase-Dependent and -Independent Pathways. *Int. J. Oncol.* **2010**, *37*, 377–385.
332. Lo, C.; Lai, T.Y.; Yang, J.S.; Yang, J.H.; Ma, Y.S.; Weng, S.W.; Lin, H.Y.; Chen, H.Y.; Lin, J.G.; Chung, J.G. Gallic Acid Inhibits the Migration and Invasion of A375.S2 Human Melanoma Cells through the Inhibition of Matrix Metalloproteinase-2 and Ras. *Melanoma Res.* **2011**, *21*, 267–273.
333. Chen, A.Y.; Chen, Y.C. A Review of the Dietary Flavonoid, Kaempferol on Human Health and Cancer Chemoprevention. *Food Chem.* **2013**, *138*, 2099–2107.
334. Kim, S.H.; Choi, K.C. Anti-Cancer Effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models. *Toxicol. Res.* **2013**, *29*, 229–234.
335. Lee, J.; Kim, J.H. Kaempferol Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth and Migration through the Blockade of EGFR-Related Pathway In Vitro. *PLoS One* **2016**, *11*, e0155264.
336. Zhang, Y.; Chen, A.Y.; Li, M.; Chen, C.; Yao, Q. Ginkgo Biloba Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *J. Surg. Res.* **2008**, *148*, 17–23.
337. Labbé, D.; Provençal, M.; Lamy, S.; Boivin, D.; Gingras, D.; Béliveau, R. The Flavonols Quercetin, Kaempferol, and Myricetin Inhibit Hepatocyte Growth Factor-Induced Medulloblastoma Cell Migration. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 646–652.
338. Phromnoi, K.; Yodkeeree, S.; Anuchapreeda, S.; Limtrakul, P. Inhibition of MMP-3 Activity and Invasion of the MDA-MB-231 Human Invasive Breast Carcinoma Cell Line by Bioflavonoids. *Acta Pharmacol. Sin.* **2009**, *30*, 1169–1176.
339. Yang, J.; Xiao, P.; Sun, J.; Guo, L. Anticancer Effects of Kaempferol in A375 Human Malignant Melanoma Cells Are Mediated via Induction of Apoptosis, Cell Cycle Arrest, Inhibition of Cell Migration and Downregulation of m-TOR/PI3K/AKT Pathway. *J. BUON.* **2018**, *23*, 218–223.
340. Zhang, T.; Ma, L.; Wu, P.; Li, W.; Li, T.; Gu, R.; Dan, X.; Li, Z.; Fan, X.; Xiao, Z. Gallic Acid Has Anticancer Activity and Enhances the Anticancer Effects of Cisplatin in Non-small

Cell Lung Cancer A549 Cells via the JAK/STAT3 Signaling Pathway. *Oncol. Rep.* **2019**, *41*, 1779–1788.

341. Wang, H.; Oo Khor, T.; Shu, L.; Su, Z.-Y.; Fuentes, F.; Lee, J.-H.; Tony Kong, A.-N. Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 1281–1305.
342. Han, D.H.; Lee, M.J.; Kim, J.H. Antioxidant and Apoptosis-Inducing Activities of Ellagic Acid. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 3601–3606.
343. Priyadarsini, K.I.; Khopde, S.M.; Kumar, S.S.; Mohan, H. Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Phenolic Antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2200–2206.
344. Wang, F.; Chen, J.; Xiang, D.; Lian, X.; Wu, C.; Quan, J. Ellagic Acid Inhibits Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Melanoma via EGFR Pathway. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 2295.
345. Labrecque, L.; Lamy, S.; Chapus, A.; Mihoubi, S.; Durocher, Y.; Cass, B.; Bojanowski, M.W.; Gingras, D.; Béliveau, R. Combined Inhibition of PDGF and VEGF Receptors by Ellagic Acid, a Dietary-Derived Phenolic Compound. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 821–826.
346. Wang, N.; Wang, Z.Y.; Mo, S.L.; Loo, T.Y.; Wang, D.M.; Luo, H. Bin; Yang, D.P.; Chen, Y.L.; Shen, J.G.; Chen, J.P. Ellagic Acid, a Phenolic Compound, Exerts Anti-Angiogenesis Effects via VEGFR-2 Signaling Pathway in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *134*, 943–955.
347. Vizzotto, M.; Porter, W.; Byrne, D.; Cisneros-Zevallos, L. Polyphenols of Selected Peach and Plum Genotypes Reduce Cell Viability and Inhibit Proliferation of Breast Cancer Cells While Not Affecting Normal Cells. *Food Chem.* **2014**, *164*, 363–370.
348. Danciu, C.; Falamas, A.; Dehelean, C.; Soica, C.; Radeke, H.; Barbu-Tudoran, L.; Bojin, F.; Pînzaru, S.C.; Munteanu, M.F. A Characterization of Four B16 Murine Melanoma Cell Sublines Molecular Fingerprint and Proliferation Behavior. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 1–12.
349. Krajnović, T.; Kalucrossed D Signerović, G.N.; Wessjohann, L.A.; Mijatović, S.; Maksimović-Ivanić, D. Versatile Antitumor Potential of Isoxanthohumol: Enhancement of Paclitaxel Activity in Vivo. *Pharmacol. Res.* **2016**, *105*, 62–73.
350. Krajnović, T.; Drača, D.; Kaluđerović, G.N.; Dunderović, D.; Mirkov, I.; Wessjohann, L.A.; Maksimović-Ivanić, D.; Mijatović, S. The Hop-Derived Prenylflavonoid Isoxanthohumol Inhibits the Formation of Lung Metastasis in B16-F10 Murine Melanoma Model. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *129*, 257–268.
351. Shimizu, S.; Konishi, A.; Nishida, Y.; Mizuta, T.; Nishina, H.; Yamamoto, A.; Tsujimoto, Y. Involvement of JNK in the Regulation of Autophagic Cell Death. *Oncogene* **2010**, *29*, 2070–2082.
352. Tasdemir, E.; Galluzzi, L.; Maiuri, M.C.; Criollo, A.; Vitale, I.; Hangen, E.; Modjtahedi, N.; Kroemer, G. Methods for Assessing Autophagy and Autophagic Cell Death. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 29–76.
353. Qu, X.; Yu, J.; Bhagat, G.; Furuya, N.; Hibshoosh, H.; Troxel, A.; Rosen, J.; Eskelinen, E.L.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; et al. Promotion of Tumorigenesis by Heterozygous Disruption of the Beclin 1 Autophagy Gene. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1809–1820.
354. Yue, Z.; Jin, S.; Yang, C.; Levine, A.J.; Heintz, N. Beclin 1, an Autophagy Gene Essential for Early Embryonic Development, Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 15077–15082.

355. Huang, X.; Bai, H.M.; Chen, L.; Li, B.; Lu, Y.C. Reduced Expression of LC3B-II and Beclin 1 in Glioblastoma Multiforme Indicates a down-Regulated Autophagic Capacity That Relates to the Progression of Astrocytic Tumors. *J. Clin. Neurosci.* **2010**, *17*, 1515–1519.
356. Kulsoom, B.; Shamsi, T.S.; Afsar, N.A.; Memon, Z.; Ahmed, N.; Hasnain, S.N. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia: Are We Ready for Bcl-2-Directed Therapy? *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 403–416.
357. Mohan, S.; Abdelwahab, S.I.; Kamalidehghan, B.; Syam, S.; May, K.S.; Harmal, N.S.M.; Shafifiyaz, N.; Hadi, A.H.A.; Hashim, N.M.; Rahmani, M.; et al. Involvement of NF-KB and Bcl2/Bax Signaling Pathways in the Apoptosis of MCF7 Cells Induced by a Xanthone Compound Pyranocycloartobiloxanthone A. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 1007–1015.
358. Hector, S.; Prehn, J.H.M. Apoptosis Signaling Proteins as Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer: A Review. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1795*, 117–129.
359. Sturm, I.; Köhne, C.H.; Wolff, G.; Petrowsky, H.; Hillebrand, T.; Hauptmann, S.; Lorenz, M.; Dörken, B.; Daniel, P.T. Analysis of the P53/BAX Pathway in Colorectal Cancer: Low BAX Is a Negative Prognostic Factor in Patients with Resected Liver Metastases. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1364–1374.
360. Zeestraten, E.C.M.; Benard, A.; Reimers, M.S.; Schouten, P.C.; Liefers, G.J.; Velde, C.J.H. van de; Kuppen, P.J.K. The Prognostic Value of the Apoptosis Pathway in Colorectal Cancer: A Review of the Literature on Biomarkers Identified by Immunohistochemistry. *Biomark. Cancer* **2013**, *5*, BIC. S11475.
361. Katkoori, V.R.; Suarez-Cuervo, C.; Shanmugam, C.; Jhala, N.C.; Callens, T.; Messiaen, L.; James Posey, I.; Bumpers, H.L.; Meleth, S.; Grizzle, W.E.; et al. Bax Expression Is a Candidate Prognostic and Predictive Marker of Colorectal Cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **2010**, *1*, 76.
362. Kuno, T.; Tsukamoto, T.; Hara, A.; Tanaka, T.; Kuno, T.; Tsukamoto, T.; Hara, A.; Tanaka, T. Cancer Chemoprevention through the Induction of Apoptosis by Natural Compounds. *J. Biophys. Chem.* **2012**, *3*, 156–173.
363. Millimouno, F.M.; Dong, J.; Yang, L.; Li, J.; Li, X. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer and Perspectives with Natural Compounds from Mother Nature. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **2014**, *7*, 1081–1107.
364. Fulda, S. Modulation of Apoptosis by Natural Products for Cancer Therapy. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1075–1079.
365. Ramos, S. Effects of Dietary Flavonoids on Apoptotic Pathways Related to Cancer Chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 427–442.
366. Borner, C.; Monney, L. Apoptosis without Caspases: An Inefficient Molecular Guillotine? *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 497–507.
367. Tyurina, Y.Y.; Serinkan, F.B.; Tyurin, V.A.; Kini, V.; Yalowich, J.C.; Schroit, A.J.; Fadeel, B.; Kagan, V.E. Lipid Antioxidant, Etoposide, Inhibits Phosphatidylserine Externalization and Macrophage Clearance of Apoptotic Cells by Preventing Phosphatidylserine Oxidation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6056–6064.
368. Courtney, K.D.; Corcoran, R.B.; Engelman, J.A. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1075–1083.
369. Schubbert, S.; Shannon, K.; Bollag, G. Hyperactive Ras in Developmental Disorders and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 295–308.

370. Katz, M.; Amit, I.; Yarden, Y. Regulation of MAPKs by Growth Factors and Receptor Tyrosine Kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1161–1176.
371. Downward, J. Targeting RAS Signalling Pathways in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11–22.
372. Bendell, J.C.; Kelley, R.K.; Shih, K.C.; Grabowsky, J.A.; Bergsland, E.; Jones, S.; Martin, T.; Infante, J.R.; Mischel, P.S.; Matsutani, T.; et al. A Phase I Dose-Escalation Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Preliminary Efficacy of the Dual MTORC1/MTORC2 Kinase Inhibitor CC-223 in Patients with Advanced Solid Tumors or Multiple Myeloma. *Cancer* **2015**, *121*, 3481–3490.
373. Martinez-Garcia, M.; Banerji, U.; Albanell, J.; Bahleda, R.; Dolly, S.; Kraeber-Bodéré, F.; Rojo, F.; Routier, E.; Guarín, E.; Xu, Z.X.; et al. First-in-Human, Phase I Dose-Escalation Study of the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of RO5126766, a First-in-Class Dual MEK/RAF Inhibitor in Patients with Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4806–4819.
374. Rodon, J.; Pérez-Fidalgo, A.; Krop, I.E.; Burris, H.; Guerrero-Zotano, A.; Britten, C.D.; Becerra, C.; Schellens, J.; Richards, D.A.; Schuler, M.; et al. Phase 1/1b Dose Escalation and Expansion Study of BEZ235, a Dual PI3K/MTOR Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors Including Patients with Advanced Breast Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 285–298.
375. Sullivan, R.J.; Flaherty, K. MAP Kinase Signaling and Inhibition in Melanoma. *Oncogene* **2013**, *32*, 2373–2379.
376. Morana, O.; Wood, W.; Gregory, C.D. The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1328.
377. Hayes, J.D.; Dinkova-Kostova, A.T.; Tew, K.D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 167–197.
378. Wells, A.; Grahovac, J.; Wheeler, S.; Ma, B.; Lauffenburger, D. Targeting Tumor Cell Motility as a Strategy against Invasion and Metastasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 283–289.
379. Weber, G.F. Why Does Cancer Therapy Lack Effective Anti-Metastasis Drugs? *Cancer Lett.* **2013**, *328*, 207–211.
380. Garcia, C.M. de S.; de Araújo, M.R.; Lopes, M.T.P.; Ferreira, M.A.N.D.; Cassali, G.D. Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4t1. *Brazilian J. Vet. Pathol.* **2014**, *7*, 158–165.
381. Pulaski, B.; Ostrand-Rosenberg, S. Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases Following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7.1 Cell-Based Tumor Vaccines. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1486–1493.
382. Pang, X.; He, X.; Qiu, Z.; Zhang, H.; Xie, R.; Liu, Z.; Gu, Y.; Zhao, N.; Xiang, Q.; Cui, Y. Targeting Integrin Pathways: Mechanisms and Advances in Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 1.
383. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548.
384. Moreno-Layseca, P.; Icha, J.; Hamidi, H.; Ivaska, J. Integrin Trafficking in Cells and Tissues. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 122–132.



385. Harburger, D.S.; Calderwood, D.A. Integrin Signalling at a Glance. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 159–163.
386. Sun, Z.; Costell, M.; Fässler, R. Integrin Activation by Talin, Kindlin and Mechanical Forces. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 25–31.
387. Humphries, J.D.; Chastney, M.R.; Askari, J.A.; Humphries, M.J. Signal Transduction via Integrin Adhesion Complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *56*, 14–21.
388. Critchley, D.R.; Holt, M.R.; Barry, S.T.; Priddle, H.; Hemmings, L.; Norman, J. Integrin-Mediated Cell Adhesion: The Cytoskeletal Connection. *Biochem. Soc. Symp.* **1999**, *65*, 79–99.
389. Nagano, M.; Hoshino, D.; Koshikawa, N.; Akizawa, T.; Seiki, M. Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 310616.
390. Kenny, P.A.; Lee, G.Y.; Myers, C.A.; Neve, R.M.; Semeiks, J.R.; Spellman, P.T.; Lorenz, K.; Lee, E.H.; Barcellos-Hoff, M.H.; Petersen, O.W.; et al. The Morphologies of Breast Cancer Cell Lines in Three-dimensional Assays Correlate with Their Profiles of Gene Expression. *Mol. Oncol.* **2007**, *1*, 84–96.
391. Guo, G.; Gong, K.; Wohlfeld, B.; Hatanpaa, K.J.; Zhao, D.; Habib, A.A. Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3436–3441.
392. Fujita, S.; Watanabe, M.; Kubota, T.; Teramoto, T.; Kitajima, M. Alteration of Expression in Integrin B1-Subunit Correlates with Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Lett.* **1995**, *91*, 145–149.
393. Hu, C.; Ni, Z.; Li, B.S.; Yong, X.; Yang, X.; Zhang, J.W.; Zhang, D.; Qin, Y.; Jie, M.M.; Dong, H.; et al. HERT Promotes the Invasion of Gastric Cancer Cells by Enhancing FOXO3a Ubiquitination and Subsequent ITGB1 Upregulation. *Gut* **2017**, *66*, 31–42.
394. Zhou, P.; Erfani, S.; Liu, Z.; Jia, C.; Chen, Y.; Xu, B.; Deng, X.; Alfaro, J.E.; Chen, L.; Napier, D.; et al. CD151-A3 $\beta$ 1 Integrin Complexes Are Prognostic Markers of Glioblastoma and Cooperate with EGFR to Drive Tumor Cell Motility and Invasion. *Oncotarget* **2015**, *6*, 29675.
395. Williams, K.C.; Coppolino, M.G. SNARE-Dependent Interaction of Src, EGFR and B1 Integrin Regulates Invadopodia Formation and Tumor Cell Invasion. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 1712–1725.
396. Sun, Q.; Zhou, C.; Ma, R.; Guo, Q.; Huang, H.; Hao, J.; Liu, H.; Shi, R.; Liu, B. Prognostic Value of Increased Integrin-Beta 1 Expression in Solid Cancers: A Meta-Analysis. *Oncotargets Ther.* **2018**, *11*, 1787–1799.
397. Fedorenko, I. V.; Abel, E. V.; Koomen, J.M.; Fang, B.; Wood, E.R.; Chen, Y.A.; Fisher, K.J.; Iyengar, S.; Dahlman, K.B.; Wargo, J.A.; et al. Fibronectin Induction Abrogates the BRAF Inhibitor Response of BRAF V600E/PTEN-Null Melanoma Cells. *Oncogene* **2016**, *35*, 1225–1235.
398. Hirata, E.; Girotti, M.R.; Viros, A.; Hooper, S.; Spencer-Dene, B.; Matsuda, M.; Larkin, J.; Marais, R.; Sahai, E. Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin B1/FAK Signaling. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 574–588.
399. Huang, C.; Park, C.C.; Hilsenbeck, S.G.; Ward, R.; Rimawi, M.F.; Wang, Y. chao; Shou, J.; Bissell, M.J.; Osborne, C.K.; Schiff, R. B1 Integrin Mediates an Alternative Survival Pathway in Breast Cancer Cells Resistant to Lapatinib. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 1–15.

400. Damiano, J. Integrins as Novel Drug Targets for Overcoming Innate Drug Resistance. *Curr. Cancer Drug Targets* **2002**, *2*, 37–43.
401. Cordes, N.; Beinke, C. Fibronectin Alters Cell Survival and Intracellular Signaling of Confluent A549 Cultures after Irradiation. *Cancer Biol. Ther.* **2004**, *3*, 47–53.
402. Guo, L.; Zhang, F.; Cai, Y.; Liu, T. Expression Profiling of Integrins in Lung Cancer Cells. *Pathol. Res. Pract.* **2009**, *205*, 847–853.
403. Zheng, W.; Jiang, C.; Li, R. Integrin and Gene Network Analysis Reveals That ITGA5 and ITGB1 Are Prognostic in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Onco. Targets. Ther.* **2016**, *9*, 2317.
404. Chang, M.H.; Lee, K.; Lee, K.Y.; Kim, Y.S.; Kim, Y.K.; Kang, J.H. Prognostic Role of Integrin B1, E-Cadherin, and Rac1 Expression in Small Cell Lung Cancer. *APMIS* **2012**, *120*, 28–38.
405. Dingemans, A.M.C.; van den Boogaart, V.; Vosse, B.A.; van Suylen, R.J.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L. Integrin Expression Profiling Identifies Integrin Alpha5 and Beta1 as Prognostic Factors in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 1–9.
406. Zhao, Z.S.; Wang, Y.Y.; Chu, Y.Q.; Ye, Z.Y.; Tao, H.Q. SPARC Is Associated with Gastric Cancer Progression and Poor Survival of Patients. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 260–268.
407. Yao, E.S.; Zhang, H.; Chen, Y.Y.; Lee, B.; Chew, K.; Moore, D.; Park, C. Increased Beta1 Integrin Is Associated with Decreased Survival in Invasive Breast Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 659–664.
408. Petricevic, B.; Vrbanec, D.; Jakic-Razumovic, J.; Brcic, I.; Rabic, D.; Badovinac, T.; Ozimec, E.; Bali, V. Expression of Toll-like Receptor 4 and Beta 1 Integrin in Breast Cancer. *Med. Oncol.* **2012**, *29*, 486–494.
409. Lanzafame, S.; Emmanuele, C.; Torrasi, A. Correlation of Alpha 2 Beta 1 Integrin Expression with Histological Type and Hormonal Receptor Status in Breast Carcinomas. *Pathol. Res. Pract.* **1996**, *192*, 1031–1038.
410. Pontes, J.; Reis, S.T.; Bernardes, F.S.; Oliveira, L.C.N.; de Barros, É.A.F.; Dall'Oglio, M.F.; Timoscuk, L.M.S.; Ribeiro-Filho, L.A.; Srougi, M.; Leite, K.R.M. Correlation between Beta1 Integrin Expression and Prognosis in Clinically Localized Prostate Cancer. *Int. Braz J Urol* **2013**, *39*, 335–343.
411. Böttger, T.C.; Maschek, H.; Lobo, M.; Gottwohl, R.G.; Brenner, W.; Junginger, T. Prognostic Value of Immunohistochemical Expression of Beta-1 Integrin in Pancreatic Carcinoma. *Oncology* **1999**, *56*, 308–313.
412. Chiu, D.; Zhou, G.; Qin, D.; Niu, L.; Cai, J.; He, L.; Tan, D.; Xu, K. Expression of CD44v6 and Integrin-B1 for the Prognosis Evaluation of Pancreatic Cancer Patients after Cryosurgery. *Diagn. Pathol.* **2013**, *8*, 1–10.
413. Vassos, N.; Rau, T.; Merkel, S.; Feiersinger, F.; Geppert, C.I.; Stürzl, M.; Hohenberger, W.; Croner, R.S. Prognostic Value of B1 Integrin Expression in Colorectal Liver Metastases. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 288.
414. Liu, Q.Z.; Gao, X.H.; Chang, W.J.; Gong, H.F.; Fu, C.G.; Zhang, W.; Cao, G.W. Expression of ITGB1 Predicts Prognosis in Colorectal Cancer: A Large Prospective Study Based on Tissue Microarray. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 12802.
415. Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal Adhesion Kinase: In Command and Control of Cell Motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 56–68.

416. Schaller, M.D. Cellular Functions of FAK Kinases: Insight into Molecular Mechanisms and Novel Functions. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1007–1013.
417. McLean, G.W.; Carragher, N.O.; Avizienyte, E.; Evans, J.; Brunton, V.G.; Frame, M.C. The Role of Focal-Adhesion Kinase in Cancer - a New Therapeutic Opportunity. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 505–515.
418. Cancer Genome Atlas Research Network Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. *Nature* **2011**, *474*, 609–615.
419. Cancer Genome Atlas Network Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2012**, *490*, 61–70.
420. Sood, A.K.; Armaiz-Pena, G.N.; Halder, J.; Nick, A.M.; Stone, R.L.; Hu, W.; Carroll, A.R.; Spannuth, W.A.; Deavers, M.T.; Allen, J.K.; et al. Adrenergic Modulation of Focal Adhesion Kinase Protects Human Ovarian Cancer Cells from Anoikis. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1515–1523.
421. Ward, K.K.; Tancioni, I.; Lawson, C.; Miller, N.L.G.; Jean, C.; Chen, X.L.; Uryu, S.; Kim, J.; Tarin, D.; Stupack, D.G.; et al. Inhibition of Focal Adhesion Kinase (FAK) Activity Prevents Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Cell Growth and Tumor Progression. *Clin. Exp. Metastasis* **2013**, *30*, 579–594.
422. Zhao, J.; Guan, J.L. Signal Transduction by Focal Adhesion Kinase in Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 35–49.
423. Thakur, R.; Trivedi, R.; Rastogi, N.; Singh, M.; Mishra, D.P. Inhibition of STAT3, FAK and Src Mediated Signaling Reduces Cancer Stem Cell Load, Tumorigenic Potential and Metastasis in Breast Cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10194.
424. Guan, J.L. Integrin Signaling through FAK in the Regulation of Mammary Stem Cells and Breast Cancer. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 268–276.
425. Lorusso, G.; Wyss, C.B.; Kuonen, F.; Vannini, N.; Billottet, C.; Duffey, N.; Pineau, R.; Lan, Q.; Wirapati, P.; Barras, D.; et al. Connexins Orchestrate Progression of Breast Cancer Metastasis to the Brain by Promoting FAK Activation. *Sci. Transl. Med.* **2022**, *14*, eaax8933.
426. Bays, J.L.; DeMali, K.A. Vinculin in Cell-Cell and Cell-Matrix Adhesions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 2999–3009.
427. Ruiz, C.; Holz, D.R.; Oeggerli, M.; Schneider, S.; Gonzales, I.M.; Kiefer, J.M.; Zellweger, T.; Bachmann, A.; Koivisto, P.A.; Helin, H.J.; et al. Amplification and Overexpression of Vinculin Are Associated with Increased Tumour Cell Proliferation and Progression in Advanced Prostate Cancer. *J. Pathol.* **2011**, *223*, 543–552.
428. Zheng, X.; Xu, H.; Gong, L.; Cao, D.; Jin, T.; Wang, Y.; Pi, J.; Yang, Y.; Yi, X.; Liao, D.; et al. Vinculin Orchestrates Prostate Cancer Progression by Regulating Tumor Cell Invasion, Migration, and Proliferation. *Prostate* **2021**, *81*, 347–356.
429. Li, H.; Wang, C.; Lan, L.; Behrens, A.; Tomaschko, M.; Ruiz, J.; Su, Q.; Zhao, G.; Yuan, C.; Xiao, X.; et al. High Expression of Vinculin Predicts Poor Prognosis and Distant Metastasis and Associates with Influencing Tumor-Associated NK Cell Infiltration and Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer. *Aging (Albany NY)* **2021**, *13*, 5197.
430. Yamashita, M.; Ogawa, T.; Zhang, X.; Hanamura, N.; Kashikura, Y.; Takamura, M.; Yoneda, M.; Shiraishi, T. Role of Stromal Myofibroblasts in Invasive Breast Cancer: Stromal Expression of Alpha-Smooth Muscle Actin Correlates with Worse Clinical Outcome. *Breast Cancer* **2012**, *19*, 170–176.

431. Lee, H.W.; Park, Y.M.; Lee, S.J.; Cho, H.J.; Kim, D.H.; Lee, J. II; Kang, M.S.; Seol, H.J.; Shim, Y.M.; Nam, D.H.; et al. Alpha-Smooth Muscle Actin (ACTA2) Is Required for Metastatic Potential of Human Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5879–5889.
432. Nanda, S. Pancreatic Cancer: High Stromal Expression of  $\alpha$ -Smooth-Muscle Actin Correlates with Aggressive Pancreatic Cancer Biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *7*, 652–652.
433. Bukhari, I.; Zhang, Y.; Thorne, R.F.; Mi, Y. Editorial: Complexity of Tumor Microenvironment: A Major Culprit in Cancer Development. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **2022**, *13*, 1059885.
434. Baghban, R.; Roshangar, L.; Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Ebrahimi-Kalan, A.; Jaymand, M.; Kolahian, S.; Javaheri, T.; Zare, P. Tumor Microenvironment Complexity and Therapeutic Implications at a Glance. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 1–19.
435. Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Zarghami, N. Tumor Vascular Infarction: Prospects and Challenges. *Int. J. Hematol.* **2017**, *105*, 244–256.
436. Lal, J.C.; Townsend, M.G.; Mehta, A.K.; Oliwa, M.; Miller, E.; Sotayo, A.; Cheney, E.; Mittendorf, E.A.; Letai, A.; Guerriero, J.L. Comparing Syngeneic and Autochthonous Models of Breast Cancer to Identify Tumor Immune Components That Correlate with Response to Immunotherapy in Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2021**, *23*, 1–24.
437. Gutierrez, W.R.; Scherer, A.; McGivney, G.R.; Brockman, Q.R.; Knepper-Adrian, V.; Laverty, E.A.; Roughton, G.A.; Dodd, R.D. Divergent Immune Landscapes of Primary and Syngeneic Kras-Driven Mouse Tumor Models. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–14.
438. Woo, Y.; Lee, H.J.; Jung, Y.M.; Jung, Y.J. Regulated Necrotic Cell Death in Alternative Tumor Therapeutic Strategies. *Cells* **2020**, *9*, 1–17.
439. Richards, C.H.; Mohammed, Z.; Qayyum, T.; Horgan, P.G.; McMillan, D.C. The Prognostic Value of Histological Tumor Necrosis in Solid Organ Malignant Disease: A Systematic Review. *Future Oncol.* **2011**, *7*, 1223–1235.
440. Dietzel, M.; Baltzer, P.A.T.; Vag, T.; Herzog, A.; Gajda, M.; Camara, O.; Kaiser, W.A. The Necrosis Sign in Magnetic Resonance-Mammography: Diagnostic Accuracy in 1,084 Histologically Verified Breast Lesions. *Breast J.* **2010**, *16*, 603–608.
441. Zhang, Y.; Ou, Y.; Yu, D.; Yong, X.; Wang, X.; Zhu, B.; Zhang, Q.; Zhou, L.; Cai, Z.; Cheng, Z. Clinicopathological Study of Centrally Necrotizing Carcinoma of the Breast. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 1–8.
442. Pu, R.T.; Schott, A.F.; Sturtz, D.E.; Griffith, K.A.; Kleer, C.G. Pathologic Features of Breast Cancer Associated with Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy: Importance of Tumor Necrosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **2005**, *29*, 354–358.
443. Mellman, I.; Coukos, D.; Dranoff, G. Cancer Immunotherapy Comes of Age. *Nature* **2011**, *480*, 480–489.
444. Finck, A.; Gill, S.I.; June, C.H. Cancer Immunotherapy Comes of Age and Looks for Maturity. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–4.
445. Dong, S.; Guo, X.; Han, F.; He, Z.; Wang, Y. Emerging Role of Natural Products in Cancer Immunotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 1163–1185.
446. Galon, J.; Bruni, D. Approaches to Treat Immune Hot, Altered and Cold Tumours with

Combination Immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 197–218.

447. Markovic, J.; Stojsic, J.; Zunic, S.; Ruzdijic, S.; Tanic, N. Genomic Instability in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Assessed by the Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Cancer Invest.* **2008**, *26*, 262–268.
448. Gottfried, E.; Kunz-Schughart, L.A.; Ebner, S.; Mueller-Klieser, W.; Hoves, S.; Andreesen, R.; Mackensen, A.; Kreutz, M. Tumor-Derived Lactic Acid Modulates Dendritic Cell Activation and Antigen Expression. *Blood* **2006**, *107*, 2013–2021.
449. Engelhardt, J.J.; Boldajipour, B.; Beemiller, P.; Pandurangi, P.; Sorensen, C.; Werb, Z.; Egeblad, M.; Krummel, M.F. Marginating Dendritic Cells of the Tumor Microenvironment Cross-Present Tumor Antigens and Stably Engage Tumor-Specific T Cells. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 402–417.
450. Townsend, S.E.; Allison, J.P. Tumor Rejection after Direct Costimulation of CD8+ T Cells by B7-Transfected Melanoma Cells. *Science* **1993**, *259*, 368–370.
451. Seliger, B.; Maeurer, M.J.; Ferrone, S. TAP Off--Tumors On. *Immunol. Today* **1997**, *18*, 292–299.
452. Maeurer, M.J.; Gollin, S.M.; Martin, D.; Swaney, W.; Bryant, J.; Castelli, C.; Robbins, P.; Parmiani, G.; Storkus, W.J.; Lotze, M.T. 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*, 1633–1641.
453. Ossendorp, F.; Mengedé, E.; Camps, M.; Filius, R.; Melief, C.J.M. Specific T Helper Cell Requirement for Optimal Induction of Cytotoxic T Lymphocytes against Major Histocompatibility Complex Class II Negative Tumors. *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 693–702.
454. Jiang, X.; Wang, J.; Deng, X.; Xiong, F.; Ge, J.; Xiang, B.; Wu, X.; Ma, J.; Zhou, M.; Li, X.; et al. Role of the Tumor Microenvironment in PD-L1/PD-1-Mediated Tumor Immune Escape. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 1–17.
455. S, W.-P. Reversal of Tumor-Induced Immunosuppression: A New Approach to Cancer Therapy. *J. Immunother.* **1997**, *20*, 165–177.
456. Haabeth, O.A.W.; Tveita, A.A.; Fauskanger, M.; Schjesvold, F.; Lorvik, K.B.; Hofgaard, P.O.; Omholt, H.; Munthe, L.A.; Dembic, Z.; Corthay, A.; et al. How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 174.
457. Jorgovanovic, D.; Song, M.; Wang, L.; Zhang, Y. Roles of IFN- $\gamma$  in Tumor Progression and Regression: A Review. *Biomark. Res.* **2020**, *8*, 1–16.
458. Li, T.; Wu, B.; Yang, T.; Zhang, L.; Jin, K. The Outstanding Antitumor Capacity of CD4+ T Helper Lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. cancer* **2020**, *1874*, 188439.
459. Braumüller, H.; Wieder, T.; Brenner, E.; Abmann, S.; Hahn, M.; Alkhaled, M.; Schilbach, K.; Essmann, F.; Kneilling, M.; Griessinger, C.; et al. T-Helper-1-Cell Cytokines Drive Cancer into Senescence. *Nature* **2013**, *494*, 361–365.
460. Matsuzaki, J.; Tsuji, T.; Luescher, I.F.; Shiku, H.; Mineno, J.; Okamoto, S.; Old, L.J.; Shrikant, P.; Gnjatic, S.; Odunsi, K. Direct Tumor Recognition by a Human CD4(+) T-Cell Subset Potently Mediates Tumor Growth Inhibition and Orchestrates Anti-Tumor Immune Responses. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14896.

461. Chun, N.; Ang, R.L.; Chan, M.; Fairchild, R.L.; Baldwin, W.M.; Horwitz, J.K.; Gelles, J.D.; Chipuk, J.E.; Kelliher, M.A.; Pavlov, V.I.; et al. T Cell–derived Tumor Necrosis Factor Induces Cytotoxicity by Activating RIPK1-Dependent Target Cell Death. *JCI Insight* **2021**, *6*, e148643.
462. Shklovskaya, E.; Terry, A.M.; Guy, T. V.; Buckley, A.; Bolton, H.A.; Zhu, E.; Holst, J.; De St Groth, B.F. Tumour-Specific CD4 T Cells Eradicate Melanoma via Indirect Recognition of Tumour-Derived Antigen. *Immunol. Cell Biol.* **2016**, *94*, 593–603.
463. Facciabene, A.; Motz, G.T.; Coukos, G. T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2162–2171.
464. Dang, N.; Waer, M.; Sprangers, B.; Lin, Y. Improved Anti-Tumour Adaptive Immunity Can Overcome the Melanoma Immunosuppressive Tumour Microenvironment. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 1694.
465. Jacobs, J.F.M.; Nierkens, S.; Figdor, C.G.; de Vries, I.J.M.; Adema, G.J. Regulatory T Cells in Melanoma: The Final Hurdle towards Effective Immunotherapy? *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 32–42.
466. Chemnitz, J.M.; Parry, R. V.; Nichols, K.E.; June, C.H.; Riley, J.L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 945–954.
467. Liu, Y.; Liang, X.; Dong, W.; Fang, Y.; Lv, J.; Zhang, T.; Fiskesund, R.; Xie, J.; Liu, J.; Yin, X.; et al. Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8+ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 480–494.
468. Aktas, E.; Kucuksezer, U.C.; Bilgic, S.; Erten, G.; Deniz, G. Relationship between CD107a Expression and Cytotoxic Activity. *Cell. Immunol.* **2009**, *254*, 149–154.
469. Gardner, A.; de Mingo Pulido, Á.; Ruffell, B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 924.
470. Balan, S.; Saxena, M.; Bhardwaj, N. Dendritic Cell Subsets and Locations. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2019**, *348*, 1–68.
471. Segura, E. Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1423*, 3–15.
472. Silvano, A. Dendritic Cells: Phenotypic and Functional Heterogeneity. *Ital. J. Anat. Embryol.* **2014**, *119*, 304–330.
473. Jovanovic, I.; Radosavljevic, G.; Mitrovic, M.; Lisnic Juranic, V.; Mckenzie, A.N.J.; Arsenijevic, N.; Jonjic, S.; Lukic, M.L. ST2 Deletion Enhances Innate and Acquired Immunity to Murine Mammary Carcinoma. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 1902–1912.
474. Sadeghzadeh, M.; Bornehdeli, S.; Mohahammadrezakhani, H.; Abolghasemi, M.; Poursaei, E.; Asadi, M.; Zafari, V.; Aghebati-Maleki, L.; Shanebandi, D. Dendritic Cell Therapy in Cancer Treatment; the State-of-the-Art. *Life Sci.* **2020**, *254*, 117580.
475. Oh, E.; Choi, I.K.; Hong, J.W.; Yun, C.O. Oncolytic Adenovirus Coexpressing Interleukin-12 and Decorin Overcomes Treg-Mediated Immunosuppression Inducing Potent Antitumor Effects in a Weakly Immunogenic Tumor Model. *Oncotarget* **2017**, *8*, 4730–4746.
476. Ma, Y.; Adjemian, S.; Mattarollo, S.R.; Yamazaki, T.; Aymeric, L.; Yang, H.; Portela Catani, J.P.; Hannani, D.; Duret, H.; Steegh, K.; et al. Anticancer Chemotherapy-Induced

- Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity* **2013**, *38*, 729–741.
477. Leek, R.D.; Landers, R.J.; Harris, A.L.; Lewis, C.E. Necrosis Correlates with High Vascular Density and Focal Macrophage Infiltration in Invasive Carcinoma of the Breast. *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 991–995.
478. Milosavljevic, M.Z.; Jovanovic, I.P.; Pejnovic, N.N.; Mitrovic, S.L.J.; Arsenijevic, N.N.; Markovic, B.J.S.; Lukic, M.L. Deletion of IL-33R Attenuates VEGF Expression and Enhances Necrosis in Mammary Carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 18106–18115.
479. Sauter, B.; Albert, M.L.; Francisco, L.; Larsson, M.; Somersan, S.; Bhardwaj, N. Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 423–433.
480. El-Hadidy, E.M.; Refat, O.G.; Halaby, M.S.; Elmetwaly, E.M.; Omar, A.A.; El-Hadidy, E.M.; Refat, O.G.; Halaby, M.S.; Elmetwaly, E.M.; Omar, A.A. Effect of Lion's Foot (*Alchemilla Vulgaris*) on Liver and Renal Functions in Rats Induced by CCl<sub>4</sub>. *Food Nutr. Sci.* **2018**, *9*, 46–62.
481. El-Hadidy, E.M.; Omar, A.A. Protective Effect on Lipids Profile of Lion's Foot (*Alchemilla Vulgaris*) Leaves against Ccl<sub>4</sub> Toxicity and Its Fortified to Guava and Mango Pulp. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* **2019**, *8*, 394–400.
482. Jurić, T.; Katanić Stanković, J.S.; Rosić, G.; Selaković, D.; Joksimović, J.; Mišić, D.; Stanković, V.; Mihailović, V. Protective Effects of *Alchemilla Vulgaris* L. Extracts against Cisplatin-Induced Toxicological Alterations in Rats. *South African J. Bot.* **2020**, *128*, 141–151.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Sanja Jelača je rođena 13. februara 1993. godine u Jagodini, gde je završila osnovno i srednje obrazovanje. U školskoj 2012/13. godini upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modulu Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne studije završila je 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,08. Iste godine, upisala je master studije na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija, smeru Humana molekularna biologija na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Master rad pod nazivom „Signalni put glukokortikoida u jetri pacova tretiranog 5 $\alpha$  dihidrotestosteronom kao animalnom modelu sindroma policističnih jajnika“, pod mentorstvom dr Danijele Vojnović Milutinović i dr Gorana Brajuškovića odbranila je 2017. godine sa ocenom 10. Doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2018/19. godine na studijskom programu Biologija, modulu Molekularna onkologija. Uspešno je položila sve ispite predviđene programom, sa prosečnom ocenom 9,64. Od 15. januara 2019. godine, zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za imunologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju. Zvanje istraživač saradnik stekla je 16. septembra 2021. godine. Kao učesnik na dva DAAD projekta, boravila je dva meseca na Leibniz Institutu za biljnu biohemiju u Haleu, i jedan mesec na „Saxon Incubator for Clinical Translation“, Univerziteta u Lajpcigu, Nemačka. Do danas, Sanja Jelača je autor ili koautor 15 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 18 saopštenja na skupovima međunarodnog i dva na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su tri rada, od kojih su dva u časopisima M21 i M22 kategorije.



**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Сања Јелача

Број индекса Б3004/2018

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај етанолног екстракта вирка (*Alchemilla vulgaris* agg.) на фенотип малигне ћелије и миросредину тумора у мишијим сингеним моделима меланома и тумора дојке“

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Сања Јелача

Број индекса Б3004/2018

Студијски програм Биологија – Молекуларна онкологија

Наслов рада „Утицај етанолног екстракта вирка (*Alchemilla vulgaris* agg.) на фенотип малигне ћелије и миросредину тумора у мишјим сингеним моделима меланома и тумора дојке“

Ментор др Данијела Максимовић-Иванић

Потписани/а \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Утицај етанолног екстракта вирка (*Alchemilla vulgaris* agg.) на фенотип малигне ћелије и микросредину тумора у мишијим сингеним моделима меланома и тумора дојке“

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 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 дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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.