

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dragica M. Mićanović

**Uticaj vodenog ekstrakta ploda aronije na
imunski sistem u mišjim modelima infekcije i
melanoma**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dragica M. Mićanović

**Effects of chokeberry fruit water extract on
the immune system in mouse models of
infection and melanoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Tamara Saksida, naučni savetnik

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

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Ivana Stojanović, naučni savetnik

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

dr Katarina Šavikin, naučni savetnik

Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

dr Katarina Mitić, viši naučni saradnik

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (OI173013) i projekata 451-03-68/2020-14/200007, 451-03-9/2021-14/200007 i 451-03-68/2022-14/200007 finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se

dr Tamari Saksida, mojoj mentorki u svakom smislu te reči, na vođenju najpre kroz eksperimentalni rad, a potom i kroz ulazak u naučni svet. Hvala na strpljenju i verovanju u mene. Hvala na razgovorima i savetima koji prevazilaze okvire nauke.

dr Biljani Božić Nedeljković, na posvećenosti, izdvojenom vremenu i konstruktivnoj diskusiji o rezultatima, kao i sugestijama i savetima koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.

dr Ivani Stojanović, pre svega na prepoznavanju mog potencijala, kog ni sama nisam bila svesna, na prilici da uđem u naučni svet, na odličnom vođenju naše grupe i na uvek dobrom raspoloženju. Hvala za podršku tokom pisanja ove doktorske disertacije i hvala na korisnim savetima koji su je poboljšali.

dr Katarini Šavikin, na ažurnosti i stručnim i korisnim sugestijama koje su umnogome uticale na kvalitet ove doktorske disertacije.

dr Katarini Mitić, na izdvojenom vremenu i konstruktivnim savetima koji su unapredili ovu doktorsku disertaciju.

dr Đorđu Miljković, na ukazanoj prilici da se uključim u eksperimentalni rad Odeljenja za imunologiju. Hvala na nesebičnom zalaganju za svoje saradnike, na entuzijazmu i večitom podsetniku da ni jedan razlog nije dovoljno dobar da se nešto ne završi do zadatog roka.

Milici i Ivanu na razumevanju, razgovorima, smehu. Pored njih je sve bilo lakše.

Nedi, na razgovorima u bašti koji su mi u tom periodu puno značili.

Bokiju, Milji i Goranu na puno smeha i pozitivne energije.

Nadi, Miri, Milici V, Suzani i Nataliji hvala na uvek lepoj atmosferi u kancelariji i osećaju pripadnosti.

dr Mariji Mostarica-Stojković na deljenju znanja i kritičkom aspektu u analizi naučnih radova iz čega je moglo mnogo da se nauči.

Svim saradnicima Odeljenja za imunologiju i svim korisnicima laba 66 (i laba 2) na kolegijalnosti i uvek prijatnoj atmosferi.

Goranu Đmuri što je unapredio uslove u životinjskom bloku i što nas je sve razmazio svojom voljom, trudom i brigom o životinjama.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj mami, na nesebičnom davanju, na borbi, upornosti i veri u nas dve. Milici, što mi je uvek krčila put i bila prava starija sestra. Saletu, koji čini da sve bude jednostavnije, lakše i lepše. Hvala na ljubavi, razumevanju i podršci. Mojoj Andrejki i Kokoškama hvala što su uvek tu za mene. Lepo je imati baš njih za prijatelje.

Uticaj vodenog ekstrakta ploda aronije na imunski sistem u mišjim modelima infekcije i melanoma

Sažetak

Aronija (lat. *Aronia melanocarpa*), voće karakteristično po tamnim bobicama oporog ukusa, sadrži mnoštvo fenolnih jedinjenja zaslužnih za njena biološka svojstva. Vodeni ekstrakt ploda aronije (VEPA) pokazao je proinflamacijsko dejstvo. *In vitro* primena povećala je fagoctinu sposobnost makrofaga i stimulisala produkciju azot-monoksida iz dendritskih ćelija, kao i diferencijaciju proinflamacijskih CD4⁺ T limfocita. *In vivo*, oralni tretman zdravih miševa doveo je do promene distribucije ćelija imunskog sistema u crevu i povećane produkcije IFN- γ u slezini. Efekat VEPA na imunski sistem ispitan je u mišjim modelima infekcije unutarćelijskom bakterijom *Listeria monocytogenes* i melanoma, indukovanog subkutanim injeciranjem B16 ćelija. Pretretman VEPA ublažava kliničku sliku i doprinosi eliminaciji infekcije tako što na mestu inicijacije infekcije – u Pejerovim pločama i u ciljnom tkivu – slezini, povećava zastupljenost CD8⁺ T limfocita i makrofaga, pri čemu su efektorska svojstva makrofaga naročito stimulisana. U modelu melanoma pretretman VEPA smanjio je incidencu bolesti i zapreminu tumora, istovremeno povećavajući infiltraciju ćelija imunskog sistema u tumor. Zastupljenost NK ćelija, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita unutar tumora povećana je usled pretretmana VEPA, kao i ekspresija IFN- γ u ovim ćelijama, dok je zastupljenost supresivnih ćelija smanjena. Produkcija IFN- γ povećana je i u mezenteričnim limfnim čvorovima, slezini i serumu pretretiranih životinja. Splenociti ove grupe životinja pokazali su veću citotoksičnost prema ćelijama melanoma, zavisnu od IFN- γ . Izostanak direktnog uticaja na B16 ćelije dodatno ukazuje na imunomodulacijska svojstva VEPA. Ovi rezultati ukazuju na potencijal primene aronije u prevenciji stanja i bolesti u kojima je neophodna stimulacija proinflamacijskog imunskog odgovora.

Ključne reči: *Aronia melanocarpa*, ekstrakt aronije, *Listeria monocytogenes*, unutarćelijska bakterija, melanom, B16, imunomodulacija, proinflamacijski odgovor, antibakterijski odgovor, antitumorski odgovor

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

Effects of chokeberry fruit water extract on the immune system in mouse models of infection and melanoma

Abstract

Chokeberry (*Aronia melanocarpa*), fruit with black berries that leave an astringent mouthfeel after consumption, is rich in polyphenols responsible for its bioactive properties. Chokeberry extract (VEPA) showed profound *in vitro* and *in vivo* pro-inflammatory effects. When applied *in vitro*, VEPA stimulated phagocytic ability of macrophages and NO production from dendritic cells, as well as differentiation of pro-inflammatory CD4⁺ T cells. *In vivo* oral treatment of healthy mice changed the distribution of immune cells within the gut and increased production of IFN- γ in the spleen. In the mouse model of infection with intracellular bacteria *Listeria monocytogenes* VEPA accelerated eradication of infection and improved their general appearance. Also, VEPA pretreatment increased proportions of macrophages and CD8⁺ T cells both in the gut and the spleen of infected mice and mainly affected effector functions of macrophages. In the mouse model of melanoma, induced by subcutaneous injection of B16 cells, VEPA delayed melanoma appearance, decreased tumor volume and increased infiltration of immune cells in the tumor. Proportion of NK cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells within the tumor was increased, as well as the expression of IFN- γ within these cells, with downregulated frequency of cells that suppress the immune cells. Additionally, the production of IFN- γ was enhanced in the mesenteric lymph nodes, spleen and the serum of pretreated animals. Splenocytes from these animals showed enhanced cytotoxicity towards melanoma cells, dependent on IFN- γ . These results point to the applicative potential of VEPA in the prevention of different states and diseases where an enhanced pro-inflammatory response is needed.

Key words: *Aronia melanocarpa*, chokeberry extract, *Listeria monocytogenes*, intracellular bacteria, melanoma, B16, immunomodulation, pro-inflammatory response, antibacterial response, antitumor response

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunobiology

Lista skraćénica

- ABB – pufer za vezivanje aneksina V (engl. Annexin V binding buffer)
- APĆ – antigen-prezentujuće ćelije
- BHI – engl. Brain Heart Infuzion
- BSA – goveđi albumin iz seruma (engl. Bovine Serum Albumine)
- CFU – jedinica formiranja kolonija bakterija (engl. Colony Forming Unit)
- ConA – konkanavalin A (engl. Concanavalin A)
- CTLA-4 – antigen 4 koji je asociran sa citotoksičnim T limfocitima (engl. Cytotoxic T-lymphocyte Associated protein 4)
- CV – kristal violet (engl. Crystal Violet)
- DHR – dihidrorodamin 123
- DTT – ditiotreitól
- EDTA – etilen diamin tetra sirćetna kiselina (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
- FCS – serum fetusa govečeta (engl. Fetal Calf Serum)
- GM-CSF – faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
- HEPES – engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HPLC – engl. High Performance Liquid Chromatography
- HRP – peroksidaza iz rena (engl. Horse Radish Peroxidase)
- IFN – interferon
- IL – interleukin
- iNOS – inducibilna sintaza azot-monoksida (engl. inducible Nitric Oxide Synthase)
- LDH – laktat dehidrogenaza
- LLO – listeriolizin O
- LPS – lipopolisaharid
- MDSC – supresorske ćelije mijeloidnog porekla (engl. Myeloid Derived Suppressor Cells)
- MFI – prosečni intenzitet fluorescence (engl. Mean Fluorescence Intensity)
- MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex)
- MLĆ – mezenterični limfni ćvor
- MTT – (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
- NF-κB – nuklearni faktor kapa B
- NK ćelije – urođenoubilačke ćelije (engl. Natural Killer)
- NO – azot-monoksid
- PB – pufer za permeabilizaciju (engl. Permeabilization Buffer)
- PBS – puferisani rastvor fosfatnih soli (engl. Phosphate Buffered Saline)
- PBST – PBS 0,05% Tween-20
- PBSTw – PBS 0,1% Tween-20
- PD-1 – protein 1 programirane ćelijske smrti (engl. Programmed cell Death protein 1)
- PI – propidijum jodid (engl. Propidium Iodide)
- ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species)
- RPMI – engl. Roswell Park Memorial Institute
- RT – reverzna transkripcija
- RT-PCR – reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time Polymerase Chain Reaction)
- SD – standardna devijacija
- SDS – natrijum dodecil sulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
- SV – srednja vrednost
- TGF-β – faktor transformacije rasta β (engl. Transforming Growth Factor- β)
- Th – pomoćnički T limfocit (engl. T helper)
- TIL – limfociti koji infiltriraju tumor (engl. Tumor Infiltrating Lymphocytes)
- TME – mikrosredina tumora (engl. Tumor Microenvironment)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor)

Treg – regulatorni T limfociti

VEPA – vodeni ekstrakt ploda aronije

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. <i>Aronia melanocarpa</i>	2
1.1.1. Sastav ploda aronije.....	2
1.1.2. Biološka svojstva crne aronije.....	3
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.2.1. Etiologija i epidemiologija infekcije	5
1.2.2. Kolonizacija domaćina	6
1.2.3. Imunski odgovor na <i>L. monocytogenes</i>	7
1.2.4. Eksperimentalni modeli infekcije <i>L. monocytogenes</i>	9
1.3. Melanom.....	11
1.3.1. Etiologija i epidemiologija melanoma	11
1.3.2. Imunski odgovor na melanom.....	12
1.3.3. Mehanizmi izbegavanja imunskog odgovora od strane tumora	13
1.3.4. Eksperimentalni modeli melanoma	15
2. Ciljevi.....	17
3. Materijal i metode.....	20
3.1. Reagensi i rastvori.....	21
3.2. Biljni materijal	22
3.2.1. Prikupljanje biljnog materijala i priprema ekstrakta.....	22
3.3. Priprema <i>L. monocytogenes</i> za inficiranje miševa	23
3.4. Kulture ćelija	23
3.5. Eksperimentalne životinje	24
3.5.1. Tretman miševa vodenim ekstraktom ploda aronije.....	24
3.6. Metode izolovanja ćelija.....	25
3.6.1. Izolovanje ćelija limfnih čvorova	25
3.6.2. Izolovanje splenocita	25
3.6.3. Izolovanje ćelija Pejerovih ploča.....	25
3.6.4. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka	25
3.6.5. Izolovanje intraepitelnih ćelija iz tankog creva.....	25
3.6.6. Izolovanje tumor-infiltrirajućih limfocita.....	26
3.7. Određivanje broja živih ćelija	26
3.8. Određivanje broja CFU <i>L. Monocytogenes</i> u tkivima inficiranih miševa	26
3.9. <i>In vitro</i> diferencijacija ćelija	26
3.9.1. Diferencijacija dendritskih ćelija <i>in vitro</i>	26
3.9.2. Prečišćavanje naivnih T limfocita magnetnom separacijom i <i>in vitro</i> diferencijacija ka Th1, Th17 i Treg subpopulacijama	27
3.10. Testovi za određivanje vijabilnosti i funkcija ćelija imunskog sistema	28

3.10.1. Određivanje vijabilnosti ćelija MTT testom	28
3.10.2. Određivanje vijabilnosti ćelija kristal violet testom	28
3.10.3. Određivanje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura Griess reakcijom.....	28
3.10.4. Određivanje produkcije citokina ELISA metodom	28
3.10.5. Oslobođanje laktat dehidrogenaze (LDH) – test citotoksičnosti	29
3.11. Histološka analiza	30
3.11.1. Priprema histoloških preparata u parafinu	30
3.11.2. Bojenje tkivnih preseka hematoksilinom i eozinom	30
3.12. Analiza ćelija metodom protočne citofluorimetrije.....	30
3.12.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula	31
3.12.2. Imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula	32
3.12.3. Detekcija fagocitoze	33
3.12.4. Detekcija ćelijske smrti.....	34
3.12.6. Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika	34
3.13. Imunoblot.....	34
3.13.1. Izolacija proteina	34
3.13.2. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu, transfer proteina na membranu i vizuelizacija proteinskih traka	35
3.14. Metoda reakcije lančanog umnožavanja.....	36
3.14.1. Izolacija celokupne RNK.....	36
3.14.2. Reakcija reverzne transkripcije	36
3.14.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR).....	36
3.15. Statistička obrada podataka	37
4. Rezultati	38
4.1. Određivanje sadržaja fenola u VEPA.....	39
4.2. Efekat primene VEPA na ćelije imunskog sistema C57BL/6 miša <i>in vitro</i>	39
4.2.1. Uticaj primene VEPA na ćelije urođene imunosti <i>in vitro</i>	39
4.2.2. Uticaj primene VEPA na ćelije adaptivne imunosti <i>in vitro</i>	42
4.3. Efekat primene VEPA na ćelije imunskog sistema <i>in vivo</i>	45
4.3.1. Uticaj tretmana VEPA na ćelije imunskog u limfnom tkivu creva C57BL/6 miševa	46
4.3.2. Uticaj tretmana VEPA na ćelije imunskog sistema u slezini C57BL/6 miševa	50
4.4. Efekat primene VEPA na infekciju <i>L. monocytogenes</i>	51
4.4.1. Uticaj pretretmana VEPA na eliminaciju infekcije <i>L. monocytogenes</i>	51
4.4.2. Uticaj pretretmana VEPA na zastupljenost ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu creva	53
4.4.3. Uticaj pretretmana VEPA na zastupljenost ćelija imunskog sistema u slezini	54
4.4.4. Uticaj pretretmana VEPA na produkciju citotoksičnih medijatora	55
4.4.5. Mehanizam dejstva VEPA na mijeloidne ćelije.....	57
4.5. Efekat primene VEPA na razvoj melanoma	62
4.5.1. Uticaj pretretmana VEPA na incidencu i razvoj melanoma	62
4.5.2. Uticaj pretretmana VEPA na imunski profil unutar tumora	63

4.5.3. Uticaj pretretmana VEPA na zastupljenost ćelija imunskog sistema unutar MLČ-a	69
4.5.4. Uticaj pretretmana VEPA na produkciju citokina u slezini i serumu	71
4.5.5. Uticaj VEPA na B16 ćelije melanoma	72
5. Diskusija.....	76
6. Zaključci.....	88
7. Literatura	91

1. Uvod

1.1. *Aronia melanocarpa*

Crna aronija (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliot; Slika 1) je višegodišnja voćna vrsta iz familije Rosaceae, koja se odlikuje tamnim bobicama oporog ukusa. Ova žbunasta biljka poreklom iz Severne Amerike preneti je u Evropu početkom 20. veka i ubrzo je počela intenzivno da se koristi za pravljenje sokova, džemova i vina, ali je postala popularna i kao bogat izvor prirodne prehranbene boje (Kokotkiewicz i sar., 2010). Pored toga, aronija je brzo našla primenu i u tradicionalnoj medicini, u lečenju ateroskleroze i u snižavanju krvnog pritiska (Domarew i sar., 2002).

1.1.1. Sastav ploda aronije

Najzastupljenije komponente ploda aronije su fenolna jedinjenja, među kojima dominiraju procijanidini, antocijani i fenolne kiseline (Oszmiański i Wojdyło, 2005). Polifenoli su zaslužni za karakterističan ukus, miris i boju plodova aronije, kao i njihovu antioksidativnu aktivnost (Jurendić i Ščetar, 2021). Na hemijski sastav ploda aronije utiču različiti faktori, kao što su klimatski uslovi, zrelost ploda, uslovi gajenja ili skladištenja (Tolić i sar., 2017). Shodno tome varira i ukupni sastav fenolnih jedinjenja zabeležen u literaturi i on se kreće od 3440 mg/100 g suve težine (Kolesnikov i Gins, 2010) do 7849 mg/100 g suve težine (Oszmiański i Wojdyło, 2005). Osim toga, sastav polifenola može varirati i unutar vrste ili kultivara. Tako, za antocijane, čiji udeo u sastavu polifenola ploda aronije može dostizati i preko 40 % (Jakobek i sar., 2007) je pokazano da njihov sadržaj, osim što je viši u plodu crne aronije u odnosu na crvenu aroniju (Taheri i sar., 2013), može varirati i između različitih kultivara crne aronije. Za kultivare „Viking“ i „Nero“ pokazano je da sadrže više antocijana u odnosu na divlju aroniju (Jakobek i sar., 2012).

Osim što zastupljenost fenolnih jedinjenja u plodu aronije varira, da bi se njihov visok sadržaj zadržao i nakon ekstrakcije potrebno je pažljivo izvršiti skladištenje i čuvanje plodova, ali odabrati odgovarajuće tehnološke uslove prerade i ekstrakcije. Temperatura je jedan od najvažnijih faktora, jer je pokazano da pri izlaganju soka od aronije temperaturama od 60 °C tokom 8 h nivo antocijana opada za 30 %, dok je njihova antioksidativna aktivnost smanjena za više od 50 % (Kokotkiewicz i sar., 2010). Takođe, sadržaj antocijana u soku od aronije značajno opada tokom šest meseci na temperaturi od 25 °C, za razliku od flavonola, ukupnih proantocijanidina i hidoksinaminskih kiselina (Wilkes i sar., 2014). Drugi važan faktor predstavlja sam proces ekstrakcije. Pokazano je da je za očuvanje visokog sadržaja antocijana najpogodnije korišćenje zakišljenog metanola kao rastvarača prilikom ekstrakcije (Gazdik i sar., 2008). Pored ovih, postoje i studije koje su ispitivale efekte kombinovanja različitih načina ekstrakcije pri različitim temperaturama (Zeković i sar., 2014; D'Alessandro i sar., 2014; Yong, 2016).



Slika 1. Plod aronije. Slika preuzeta sa web adrese:
<https://www.exotic-seeds.store/sr/home/aronia-aronija-seme-aronia-melanocarpa.html>

Pored polifenola, plodovi aronije sadrže i dijetetska vlakna, u koja spadaju celuloza, hemiceluloza, lignin i pektin, zatim organske kiseline, kao što su jabučna i limunska kiselina, šećere glukoze, fruktozu i sorbitol. Takođe, bobice aronije su izvor masti i proteina, a od vitamina i minerala plodovi aronije sadrže kalijum i cink, vitamine B₁, B₂, B₆, vitamin C, pantotensku kiselinu i niacin (Kulling i Rawel, 2008; Tanaka i Tanaka, 2001). Sva ova jedinjenja doprinose biološkoj aktivnosti aronije, koja postaje sve češći predmet interesovanja istraživača.

1.1.2. Biološka svojstva crne aronije

Zahvaljujući hemijskom sastavu plodova aronije, koji obiluju biološki aktivnim komponentama, ekstrakti ploda, kao i komina i sok od aronije ispitani su u brojnim studijama, i to kako *in vitro*, tako i u animalnim i kliničkim studijama, samostalno ili u kombinaciji sa drugim farmakološkim agensima.

Antioksidativna svojstva pokazana *in vitro* baziraju se na povećanju antioksidativne zaštite nakon primene ekstrakta aronije ili izolovanih biološki aktivnih supstanci, kao i na smanjenju nivoa reaktivnih vrsta kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) (Kedzierska i sar., 2012, Ryszawa i sar., 2006; Zielińska-Przyjemska i sar., 2007). *In vivo*, kada se pacovima eksperimentalno indukuje oksidativni stres hranom bogatom fruktozom i injekcijom streptozotocina, primena ekstrakta aronije dovodi do značajnog poboljšanja antioksidativnog statusa u jetri, plućima i bubrezima (Jurgoński i sar., 2008).

Kao antiinflamacijska svojstva aronije navode se protektivno dejstvo na kardiovaskularni sistem i na oštećenje tkiva, koji su pokazani u animalnim modelima. Ishrana pacova bogata holesterolom (1 – 4 %) i suplementirana ekstraktom aronije tokom 30 dana snižava nivo ukupnog holesterola u krvnoj plazmi, kao i LDL (engl. Low-Density Lipoprotein)-holesterola i triglicerida (Valcheva-Kuzmanova i sar., 2007a). U modelu oštećenja jetre dodatak soka od aronije ishrani pacova pre primene ugljen-tetrahlorida dovodi do smanjenja histopatoloških oštećenja, kao i infiltracije ćelija imunskog sistema (Valcheva-Kuzmanova i sar., 2004), dok primena soka od aronije pre hemijski indukovano oštećenja želudca kod pacova dovodi do smanjenja površine, broja i intenziteta lezija (Valcheva-Kuzmanova i sar., 2005). Pored toga, antidijabetogeno dejstvo ostvareno smanjenjem nivoa glukoze u krvi pokazano je, kako u dijabetesu indukovanom streptozotocinom kod pacova (Valcheva-Kuzmanova i sar., 2007b), tako i kod dijabetičnih pacijenata koji su konzumirali sok od aronije tokom tri meseca (Simeonov i sar., 2002).

Proizvodi od aronije imaju i antibakterijsko i antivirusno dejstvo. Direktno bakteriostatsko dejstvo ekstrakta i soka od aronije na *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Pseudomonas aeruginosa* pokazano je *in vitro* (Valcheva-Kuzmanova and Belcheva, 2006; Jurikova i sar., 2017). Sa druge strane, polifenolne komponente ploda aronije ispoljavaju efikasnost protiv različitih subtipova virusa influence (Park i sar., 2013).

Antitumorski efekat aronije takođe je zabeležen u literaturi. U poređenju sa groždem i borovnicom (Zhao i sar., 2004), kao i ljubičastom šargarepom, crnom zovom i rotkvicom (Jing i sar., 2008), ekstrakti aronije su najpotentniji inhibitori rasta HT29 ćelijske linije kancera kolona. Ekstrakt aronije inhibira rast ovih ćelija za više od 60 %, dok inhibicija rasta kontrolnih, netransformisanih ćelija kolona NCM460, iznosi manje od 10 % (Malik i sar., 2003). Za razliku od *in vitro* istraživanja, svega jedna *in vivo* studija pokazala je protektivno dejstvo ekstrakta aronije u borbi protiv tumora, i to u eksperimentalnom mišjem modelu kancera pluća izazvanog duvanskim dimom (Balansky i sar., 2012). U ovom modelu dugotrajna primena vodenog ekstrakta aronije sprečila je gubitak telesne mase izazvan primenom duvanskog dima, oštećenje genetičkog materijala cirkulišućih eritrocita, degeneraciju jetre i histopatološke promene na plućima.

Uprkos ovim raznim studijama, koje su najvećim delom urađene *in vitro*, nedovoljno literaturnih podataka zabeleženo je o uticaju aronije na imunski sistem, naročito *in vivo*. Antiinflamacijska svojstva aronije pokazana su u animalnim modelima kolitisa i dijabetesa, u kojima primena ekstrakta ploda aronije smanjuje ekspresiju i produkciju proinflamacijskih medijatora interferona (IFN)- γ i faktora nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor, TNF) (Badescu i sar., 2015; Pei i sar., 2019). Sa druge strane, osim supresije imunskog odgovora, pokazano je i stimulatorno dejstvo na imunski sistem nakon primene ekstrakata aronije. Tako, primena ekstrakta aronije fermentisanog od strane *Lactobacillus plantarium* kod miševa povećava migraciju neutrofila i fagocitozu, proliferaciju splenocita i povećanje zastupljenosti T limfocita, kao i dozno-zavisno povećanje određenih proinflamacijskih medijatora u krvnoj plazmi (Ali i sar., 2021). Nanokompleks aronije sa fukoidanom primenjen *in vitro* na RAW264.7 ćelijsku liniju makrofaga povećava produkciju proinflamacijskih medijatora, a primenjen *in vivo* na miševе kojima je indukovana imunosupresija takođe povećava koncentraciju proinflamacijskih citokina u serumu i slezini (Han i sar., 2021). Dodatno, studija koja je kombinovala primenu aronije sa pektinima iz jabuke kod pacijenata sa kancerom dojke u terapiji tokom postoperativne radijacije pokazala je značajno povećanje broja CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, kao i NK ćelija u krvi (Yaneva i sar, 2002).

Pokazana svojstva aronije ukazuju da ona može delovati na imunski sistem i proinflamacijski i antiinflamacijski, u zavisnosti od modela, te daju osnov za detaljnije ispitivanje mehanizama delovanja aronije u živom sistemu.

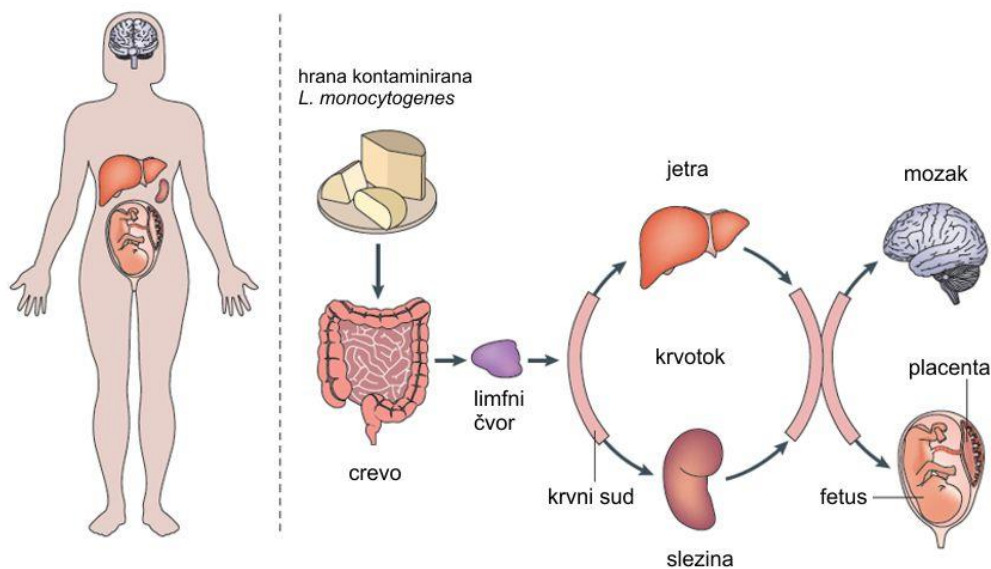
Veliki problem današnjice predstavljaju bakterijske infekcije, usled široke primene antibiotika i razvoja bakterijske rezistencije. Osim toga, do danas nije pronađena univerzalna terapija za lečenje listerioze, infekcije bakterijom *Listeria monocytogenes*, koja kod imunokompromitovanih osoba može izazvati ozbiljne komplikacije. Stoga, primena prirodnih proizvoda, bilo ekstrakata ili izolovanih jedinjenja predstavlja veliki potencijal u lečenju ovakvih infekcija, bilo samostalno ili u kombinaciji sa drugim terapeutima. Takođe, još uvek nije pronađena potpuno delotvorna terapija za maligna oboljenja i neprestano se radi na otkrivanju novih agenasa koji će stimulisati i poboljšati antitumorski odgovor domaćina. Upravo prirodni proizvodi kao što su neki alkaloidi (vinkristin, vinblastin, taksol) su od velikog značaja i u lečenju malignih oboljenja i sve je više studija koje se baziraju na ispitivanju i korišćenju novih biljnih produkata.

1.2. *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* obuhvata grupu fakultativno anaerobnih, Gram pozitivnih štapićastih bakterija, koje ne formiraju spore i nemaju kapsulu. Među do sada opisanih 20 vrsta (Leclercq i sar., 2019) nalaze se dve patogene vrste: *Listeria ivanovii*, karakteristična za preživare, i *Listeria monocytogenes*, patogen čoveka, ali i drugih kičmenjaka kao što su ptice i sisari (Barbuddhe i Chakraborty, 2009).

1.2.1. Etiologija i epidemiologija infekcije

Listeria monocytogenes je opšteprisutna u prirodi – ima je u vodi i na tlu, gde kolonizuje biljke i putem daljeg lanca ishrane, preko herbivora, vraća se u prirodu. Ova fakultativno anaerobna bakterija nakon unošenja kontaminirane hrane izaziva listeriozu, relativno retku bolest gastrointestinalnog trakta, koja se u 20 – 30 % slučajeva završava smrtnim ishodom (de Noordhout i sar., 2014). Kod zdravih osoba, kod kojih imunski sistem nesmetano funkcioniše, *L. monocytogenes* dovodi do akutnog, samoograničavajućeg gastroenteritisa praćenog groznicom. Simptomi se javljaju 24 h nakon unošenja velike količine bakterije i bolest traje svega oko dva dana (Ooi i Lorber, 2005). Međutim, pacijenti kod kojih se ustanovi listerioza su ili izuzetno stari ili izuzetno mladi, ili imaju dijagnostikovan malignitet, dijabetes, cirozu ili neko drugo oboljenje koje narušava funkciju stečenog imuniteta (Pagliano i sar., 2017). Kod odraslih osoba rani simptomi obuhvataju dijareju, groznicu, kao i grčeve mišića i creva, sa mogućom pojavom meningitisa ili infekcije različitih organa, u zavisnosti od funkcionalnosti imunskog sistema (Temple i Nahata, 2000). Trudnice ispoljavaju simptome slične gripu, kod odojčadi može doći do meningitisa, dok kod perinatalne infekcije stepen mortaliteta iznosi čak 50 % (Madjunkov i sar., 2017). Kao što je prikazano na slici 2, *L. monocytogenes* može proći crevnu, krvno-moždanu i fetoplacentalnu barijeru i tako inficirati mozak ili matericu dovodeći do ozbiljnih infekcija koje mogu ugroziti život: meningitisa, encefalitisa ili pobačaja (Buchanan i sar., 2017).



Slika 2. Širenje *L. monocytogenes* unutar domaćina. Kod osoba kod kojih imunski sistem ne funkcioniše adekvatno, unošenjem kontaminirane hrane *L. monocytogenes* dospeva u organizam. Prolaskom crevne barijere, ova bakterija limfotokom i krvotokom dospeva do jetre i slezine, gde se umnožava i cirkulacijom dospeva do drugih organa. Osim što prolazi crevnu barijeru, *L. monocytogenes* ima sposobnost da prođe i krvno-moždanu i fetoplacentalnu barijeru dovodeći do ozbiljnih poledica. Prilagođeno od Radoshevich i Cossart (2018).

L. monocytogenes može dospeti u pogone u kojima se prerađuje hrana, gde može dugo preživljavati uprkos neoptimalnim uslovima sredine u pogledu niske temperature i pH vrednosti, visoke koncentracije soli, kao i korišćenja sredstava za dezinfekciju (Moorhead i Dykes, 2004; Zhang i sar., 2011). Kako usled visokih temperatura pasterizacije dolazi do inaktivacije bakterije, glavni izvor infekcije predstavlja sirova hrana koja podleže minimalnom procesu obrade, kao što su povrće, meki sirevi, paštete, viršle ili mlečni proizvodi (Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007). Stoga u slabo- i srednje-razvijenim zemljama, gde ne postoji strog mikrobiološki nadzor proizvodnje hrane i gde postoji procentualno veliki broj osoba sa narušenim imunskim sistemom usled visoke prevalencije infekcije HIV virusom, *L. monocytogenes* predstavlja glavnog patogena poreklom iz hrane (Lecuit, 2020). Primer toga je epidemija *L. monocytogenes*, koja se desila 2017. godine u Južnoj Africi, usled kontaminacije velikog pogona za proizvodnju mesnih prerađevina. Potvrđeno je 937 slučajeva listerioze, od čega 193 (27 %) smrtnih ishoda (Thomas i sar., 2020). Sa druge strane, u državama SAD-a i Evrope u kojima su primenjeni programi nadzora hrane i epidemiologije *L. monocytogenes* incidenca listerioze iznosi svega 2 – 5 slučajeva na milion stanovnika godišnje (ECDC, 2018; Pohl i sar., 2019).

Zahvaljujući visokoj sposobnosti adaptacije, sposobnosti da prođe različite barijere domaćina i jedinstvenog unutarćelijskog načina života, *L. monocytogenes* je jedna od vodećih modela za studiranje imunskog odgovora na unutarćelijske bakterije, interakcija patogen-domaćin, a takođe i interakcija sa mikrobiotom creva (Radoshevich i Cossart, 2018).

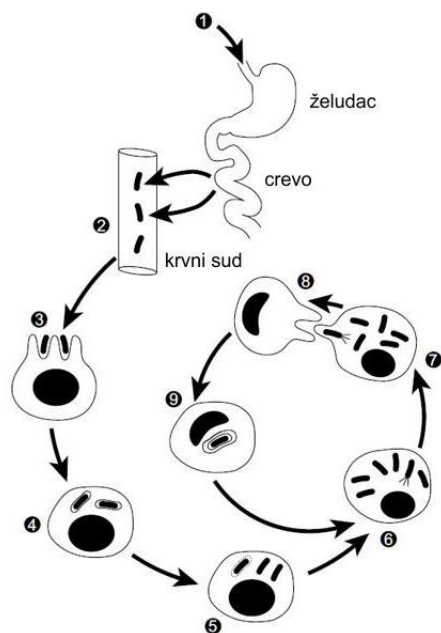
1.2.2. Kolonizacija domaćina

Zajedno sa kontaminiranom hranom, *L. monocytogenes* dospeva u gastrointestinalni trakt, gde najpre u mukusnom sloju produkuje faktore virulencije, koji omogućavaju invaziju ćelija epitela. Stoga se u početnom stadijumu infekcije ova bakterija uočava u epitelnim ćelijama na apikalnom delu vilusa, koje su zadužene za apsorpciju, dok se u kasnijoj fazi uočavaju u makrofagima strome vilusa (Ráczi i sar., 1972), sugerišući da se prolaskom epitelne barijere creva omogućava širenje *L. monocytogenes* u organizmu. Detaljnije, pokazano je da ova bakterija prodire u domaćina preko M ćelija (engl. Microfold cells) iz kojih dospevaju u Pejerove ploče, koje su pozicionirane ispod ovih ćelija (Jensen i sar., 1998). Potom, posredstvom dendritskih ćelija, *L. monocytogenes* dospeva u mezenterični limfni čvor (MLČ). Ove ćelije su idealni prenosioci infekcije, budući da one nisu mesto aktivne replikacije bakterije (Pron i sar., 2001). Krvotokom *L. monocytogenes* dospeva u ciljna tkiva, jetru i slezinu (Cossart, 2011). Najveći broj se akumulira u jetri, gde biva fagocitovan i eliminisan od strane rezidentnih makrofaga, Kupferovih ćelija. Međutim, bakterije koje su preživele počinju masovno da se umnožavaju (Vázquez-Boland i sar., 2001) i, ukoliko imunski odgovor nije dovoljno efikasan u kontroli infekcije na nivou jetre, prekomerno umnožavanje *L. monocytogenes* može rezultovati oslobađanjem ove bakterije u cirkulaciju, nakon čega sledi kolonizacija različitih organa (Vázquez-Boland i sar., 2001).

Premda najveći deo bakterija odlazi u jetru, procesi u slezini takođe su značajni za odbranu domaćina od *L. monocytogenes*. Iako je pokazano da rezidentni makrofagi i neutrofilni nisu toliko efikasni u eliminaciji ovog patogena (Conlan i North, 1994), što je potvrđeno u eksperimentu u kome su miševi kojima je odstranjena slezina bili otporniji na infekciju *L. monocytogenes* u odnosu na kontrolne miševе (Skamene i Chayasirisobhon, 1977), slezina je neophodna za formiranje pravilnog imunskog odgovora na *L. monocytogenes*. Naime, slezina obezbeđuje mikrosredinu neophodnu za prikazivanje antigena od strane antigen-prezentujućih ćelija (APĆ) i aktiviranje CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita specifičnih za antigene *L. monocytogenes* (Van den Eertwegh i sar., 1992)

L. monocytogenes je unutarćelijska bakterija. Kao što je prikazano na slici 3, aktivnošću toksina listeriolizina O (LLO), koji formira pore na membrani fagocitne vakuole, ova bakterija ima

spособnost da opstane unutar ćelija profesionalnih fagocita (neutrofila, makrofaga i dendritskih ćelija) (Gaillard i sar., 1987). Međutim, ono po čemu je ovaj patogen takođe specifičan jeste sposobnost da izazove svoju internalizaciju u nefagocitne ćelije, kao što su epitelne ćelije. Pomoću internalina A i internalina B, koji se vezuju za određene receptore na ćelijskoj membrani domaćina (E-kadherin i Met receptor), pokreće se endocitoza bakterije posredovana receptorima (Cossart i Helenius, 2014). U citoplazmi ćelije domaćina *L. monocytogenes* potom može da preživi i da se umnožava, kao i da dovede do promena u morfologiji ćelijskih organela, menjajući njihovu funkciju u cilju stimulanja infekcije, a tokom infekcije ova bakterija može upravljati i transkripcijom i indukovati epigenetičke modifikacije. Procesom koji uključuje polimerizaciju aktina *L. monocytogenes* se širi od ćelije do ćelije, izbegavajući ekstracelularnu sredinu u kojoj lako može biti eliminisana (Radoshevich i Cossart, 2018).



Slika 3. Patogeneza *L. monocytogenes*. Nakon unošenja u organizam (1), prolaženjem crevne barijere *L. monocytogenes* dospeva u cirkulaciju (2). Fagocitozom od strane makrofaga ili drugih fagocitnih ćelija (3) *L. monocytogenes* dospeva u fagocitnu vakuolu (4). Aktivnošću listeriolizina O (LLO) bakterija dospeva u citosol ćelije (5), gde preživljava i umnožava se, a zahvaljujući aktinskim filamentima omogućena je i pokretljivost *L. monocytogenes* (6). Usled aktivnosti bakterije, inficirana ćelija formira strukture nalik pseudopodijama (7), koje bivaju fagocitovane od strane susedne ćelije (8) u koju dospevaju okružene dvostrukom membranom (9), koju potom takođe liziraju i dospevaju u citosol, šireći se dalje među ćelijama. Prilagođeno od Posfay-Barbe i Wald (2009).

1.2.3. Imunski odgovor na *L. monocytogenes*

Ćelije urođene imunosti predstavljaju prvu liniju odbrane od *L. monocytogenes*. Ove ćelije se aktiviraju nekoliko minuta do nekoliko sati od ulaska patogena u organizam i pružaju zaštitu u ranom stadijumu infekcije. Osim što fagocituju i eliminišu mikroorganizme, ove ćelije proizvode proinflamacijske medijatore i aktiviraju ćelije stečene imunosti da dodatno, specifično deluju na patogen (D'Orazio, 2019). Ćelije urođene imunosti sposobne su za eliminisanje male količine *L. monocytogenes* i ograničavanje eksponencijalnog rasta ove bakterije, te su miševi koji nemaju sposobnost celularnog i humoralnog imunskog odgovora efikasni u borbi sa infekcijom u ranoj fazi. Međutim, u kasnijim fazama dolazi do velikog porasta broja jedinica formiranja kolonija (engl. Colony Forming Unit, CFU) bakterija i ovi miševi ne mogu da se izbore sa infekcijom (Bancroft i sar., 1986; Pamer, 2004), sugerišući značaj i neophodnost stečenog imunskog odgovora u borbi protiv ove bakterije, ali i neophodnost saradnje sa ćelijama urođenog imuniteta.

Kada *L. monocytogenes* dospe u laminu propriju creva najpre se susreće sa ćelijama urođene imunosti: monocitima, makrofagima i dendritskim ćelijama. Pomenute ćelije na svojoj površini poseduju receptore kojima prepoznaju obrasce patogena. Ovi receptori, koji prepoznaju konzervisane strukture mikroorganizama neophodne za njihovo preživljavanje, se nalaze na ćelijskoj membrani ili

unutar ćelije i ispoljavaju različitu ekspresiju u zavisnosti od tipa ćelije. Aktivacijom unutarćelijskih receptora nalik domenu oligomerizacije nukleotida (engl. Nucleotide Oligomerization Domain, NOD) pokreće se signalna kaskada koja uključuje nuklearni faktor kapa B (NF- κ B), regulatorne faktore interferona, aktivacioni protein 1 i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), čime se indukuje produkcija proinflamacijskih citokina, kao što su interleukun (IL)-1 β , IL-6, IL-12, TNF, kao i antimikrobnih peptida (Lavelle i sar., 2010).

Privučeni pomoću IL-6 i drugih medijatora, neutrofilu brzo dospevaju na mesto infekcije. Prepoznavanjem antigena *L. monocytogenes* oni fagocituju bakterije i produkuju ROS i NO kojima ih ubijaju. Osim ubijanja mikroorganizama koje su fagocitovali, neutrofilu oslobođanjem ekstracelularnih zamki mogu ubiti bakteriju koja se nalazi izvan ćelije (Rogers i Unanue, 1993; Segal, 2005). Dodatno, ove ćelije produkuju medijatore kojima privlače makrofage (Guleria i sar., 2001), koji takođe fagocituju bakterije i oslobađaju ROS i NO u cilju eliminacije patogena, sekretuju proinflamacijske citokine kojima privlače druge ćelije na mesto infekcije, ali i učestvuju u prikazivanju antigena T limfocitima i pokretanju adaptivnog imunskog odgovora, zajedno sa dendritskim ćelijama (Shaughnessy i Swanson, 2007). Makrofagi su stoga jedne od najvažnijih ćelija urođene imunosti za eliminaciju *L. monocytogenes* iz organizma, a upravo rezidentni makrofagi jetre, Kupferove ćelije, ubijaju najveći deo *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland i sar., 2001). Međutim, makrofagi predstavljaju i primarno mesto replikacije *L. monocytogenes*, jer se ova unutarćelijska bakterija odlikuje sposobnošću liziranja fagocitne vezikule i premeštanja u citoplazmu ćelije, gde se potom nesmetano umnožava i širi.

Koncept aktiviranih makrofaga, koji govori o sposobnosti ovih ćelija da razviju otpornost na *L. monocytogenes* i povećanu sposobnost da inhibiraju infekciju ovom bakterijom, objavljen je još 1962. godine (Mackaness, 1962). Kasnije je pokazano da je IFN- γ glavni citokin zadužen za aktivaciju makrofaga koja štiti miševu od lokalne i sistemske infekcije *L. monocytogenes* (Kiderlen i sar., 1984). Naime, inficirani, neaktivirani makrofagi produkuju IL-12, koji stimuliše urođenoubilačke ćelije (engl. Natural Killer cells, NK cells) i T limfocite da produkuju IFN- γ , koji povratno deluje na aktivaciju makrofaga i drugih ćelija na mestu infekcije (Tripp i sar., 1993; Unanue, 1997). Aktivirani makrofagi potom produkuju NO, pod delovanjem enzima inducibilne sintaze azot-monoksida (engl. inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) i ROS. NO je štetan za unutarćelijske patogene, a u kombinaciji sa superoksidom može nastati izuzetno reaktivni produkt peroksinitrit. Dakle, produkcija ROS i reaktivnih intermedijernih jedinjenja azota predstavlja glavni mehanizam ubijanja *L. monocytogenes* od strane makrofaga (MacMicking i sar., 1997). IFN- γ , osim što aktivira makrofage da ispolje svoja baktericidna svojstva, povećava ekspresiju kostimulatornih molekula i molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC), delujući tako i na aktivaciju T ćelija (D'Orazio, 2019). Miševi kojima je uklonjen gen za IFN- γ veoma su podložni listeriozi (Harty i Bevan, 1995), što potvrđuje značaj ovog molekula za eliminaciju *L. monocytogenes* iz organizma. Osim IFN- γ , produkcija TNF je takođe važna za primarnu odbranu od *L. monocytogenes* (Pamer, 2004), koji zajedno sa IFN- γ dovodi do aktivacije makrofaga, usmeravajući ih ka proinflamacijskom M1 fenotipu (Li i sar., 2017).

Ćelije stečene imunosti ključne za eliminaciju ove unutarćelijske bakterije su citotoksični CD8⁺ T limfociti (D'Orazio, 2019). Za razliku od CD4⁺ T limfocita, kojima samo APĆ mogu prikazati antigen u sklopu MHC molekula II klase, CD8⁺ T limfocitima antigen mogu prezentovati sve ćelije sa jedrom, u sklopu MHC molekula I klase (Zenewicz i Shen, 2007). Međutim, da bi došlo do aktivacije naivnih T limfocita, osim prikazivanja antigena u sklopu odgovarajućeg MHC molekula na APĆ T-ćelijskom receptoru na T limfocitu, neophodan je i kostimulatorni signal, kao što je prepoznavanje CD80/CD86 molekula na APĆ od strane CD28 molekula na T ćeliji. U skladu sa tim, BALB/c miševi koji nemaju CD28 pokazuju značajno slabiji CD8⁺ T ćelijski odgovor nakon inficiranja sa *L. monocytogenes*, bilo oralnim ili intravenskim putem (Mittrücker i sar., 2001). APĆ koje su se pokazale najefikasnijim u pokretanju T ćelijskog odgovora na *L. monocytogenes*, zahvaljujući svojoj

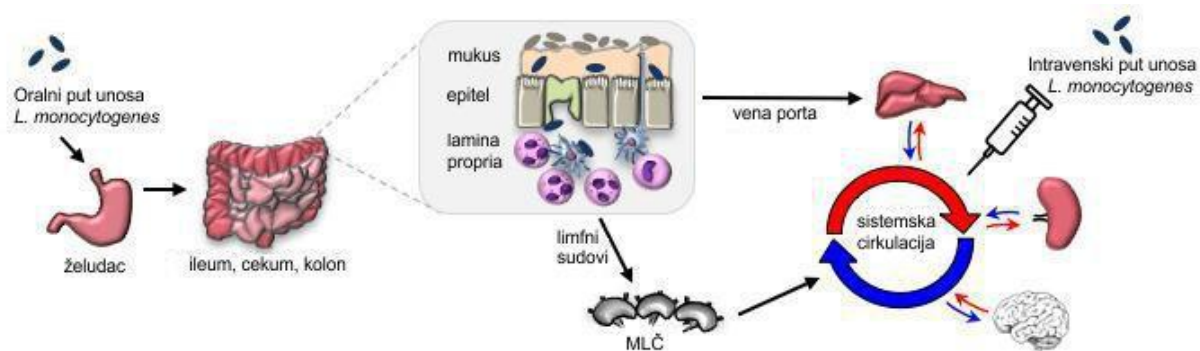
spособnosti da migriraju u oblasti u kojima se nalaze naivni T limfociti, kao što su bela pulpa slezine ili T ćelijska zona limfnog čvora, su dendritske ćelije (D'Orazio, 2019). Nakon prepoznavanja antigena u slezini ili drenirajućem limfnom čvoru, aktivirani CD8⁺ T limfociti migriraju na mesto infekcije. Svoje efektorske sposobnosti ove ćelije ostvaruju produkcijom IFN- γ i sledstvenom aktivacijom makrofaga, ili egzocitozom granula koje sadrže perforin, koji pravi pore na ćelijskoj membrani, kao i granzim i serin proteaze u cilju direktnog ubijanja zaražene ćelije, indukovanjem programirane ćelijske smrti zaražene ćelije (Harty i Badovinac, 2002). Nakon liziranja inficirane ćelije može doći do oslobađanja preostalih živih bakterija iz nje, koje potom mogu biti fagocitovane od strane neutrofila ili aktiviranih makrofaga, gde će finalno biti ubijene (D'Orazio, 2019). Kada je u pitanju produkcija IFN- γ , pokazano je da CD8⁺ T ćelije ekspimiraju IFN- γ već nekoliko sati nakon izlaganja antigenu, dok je obično broj CD8⁺ T limfocita koji produkuju TNF mali (Badovinac i Harty, 2000).

Uloga CD4⁺ T limfocita u infekciji *L. monocytogenes* znatno je manje ispitana. Pokazalo se da ove ćelije nisu ključne za eliminaciju *L. monocytogenes*, verovatno jer ova bakterija naseljava i replikuje se i u ćelijama koje ne ekspimiraju MHC molekul II klase (Serody i sar., 1996). Ipak, nakon oralne infekcije *L. monocytogenes*, u slezini i MLČ-u pronađeni su pomoćnički CD4⁺ T limfociti (engl. T helper, Th) specifični za LLO, koji su prevashodno produkovali citokine karakteristične za Th1 odgovor, kao što su IFN- γ , TNF i IL-12 (Romagnoli i sar., 2017).

1.2.4. Eksperimentalni modeli infekcije *L. monocytogenes*

Eksperimentalno, infekcija *L. monocytogenes* ispituje se pomoću životinjskih modela koji ubrajaju zečeve, pacove, morske prasiće, miševe, ali i pse, svinje i primat. Međutim, zbog velike dostupnosti miševa koji poseduju delecije specifičnih gena, kao i zbog brzog životnog ciklusa, upravo su ove životinje najbolji kandidati za ispitivanje mehanizama imunskog odgovora na *L. monocytogenes* (Hoelzer i sar., 2012). Ipak, i među miševima različiti sojevi se razlikuju u osetljivosti na infekciju. Tako, rezistentni C57BL/6 miševi tolerišu primenu i 100 puta veće doze *L. monocytogenes* od doze koja se primenjuje kod osetljivih sojeva, kao što su BALB/c i DBA/2 miševi (Mandel i Cheers, 1980; Czuprynski i sar., 2003).

L. monocytogenes predstavlja široko-korišćeni model za izučavanje imunskog odgovora na unutarćelijske bakterije, naročito delovanje citotoksičnih T limfocita. Jedan od razloga za to je prisustvo bakterije u slezini i jetri nekoliko minuta nakon što je intravenski injecirana miševima, gde ubrzo biva ingestirana od strane rezidentnih makrofaga (Mackanness, 1962; Conlan, 1996). Stoga, većina današnjih saznanja o listeriozi potiče iz studija na miševima korišćenjem upravo intravenskog modela infekcije. Međutim, ovaj model potpuno zaobilazi gastrointestinalni trakt, u kome vladaju surovi uslovi sredine i koji ova bakterija prolazi tokom prirodnog toka infekcije. Ipak, oralna infekcija miševa ne dovodi do ozbiljne sistemske bolesti (MacDonald i Carter, 1980). Ova činjenica ne iznenađuje, budući da *L. monocytogenes* mora proći nekoliko „uskih grla“ da bi dospela do ciljnih tkiva, jetre i slezine. Čak do 90% inokuluma bakterije ne preživi uslove u želucu ili se izbaci putem fecesa u roku od nekoliko sati (Bou Ghanem i sar., 2012). Sledeću poteškoću predstavlja mikrobiota creva, sa kojom je *L. monocytogenes* u kompeticiji ne bi li došla do epitela (Becattini i sar., 2017), a smatra se da svega jedna od 10⁶ bakterija dospe u laminu propriju (Pitts i D'Orazio, 2018). Da bi dospela u sistemska cirkulaciju, *L. monocytogenes* mora doći do MLČ-a i preživeti delovanje fagocitnih ćelija (Slika 4).

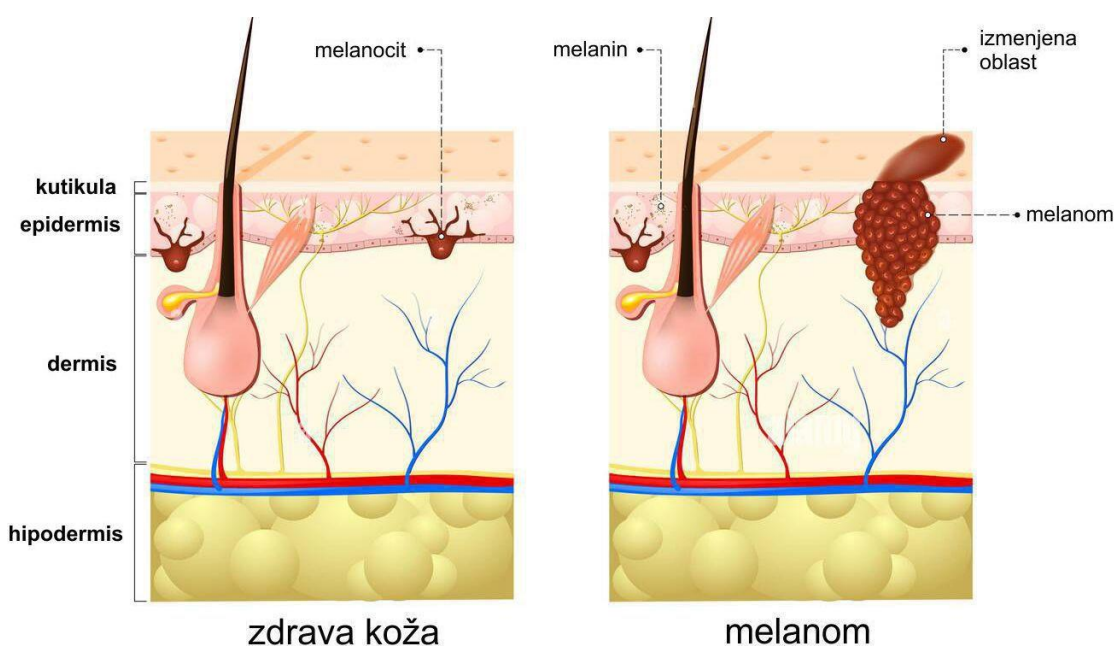


Slika 4. Putevi oralne i intravenske infekcije *L. monocytogenes* u eksperimentalnim životinjskim modelima. Prošavši crevnu barijeru *L. monocytogenes*, koja je dospela u organizam oralnim putem (levo), limfotokom, preko mezenteričnog limfnog čvora (MLČ), ili krvotokom dospeva u sistemska cirkulaciju, odakle može dospeti u različite organe, dok *L. monocytogenes* dospela u organizam intravenskim injeciranjem (desno) dospeva direktno u sistemska cirkulaciju, potpuno zaobilazeći gastrointestinalni trakt. Prilagođeno od Pitts i D'Orazio (2018).

Brojčani podaci takođe svedoče o osetljivosti korišćenih modela, prema kojima polovina letalne doze u intravenskom modelu iznosi $10^4 - 10^6$ CFU, zavisno od soja, dok u oralnom modelu infekcije *L. monocytogenes* primena čak $10^9 - 10^{11}$ CFU izaziva blagu kliničku sliku (Pitts i D'Orazio, 2018). Međutim, pokazano je da se osetljivost miševa na oralnu infekciju *L. monocytogenes* može povećati ako se istovremeno intratrahealno indukuje respiratorna koinfekcija (Bortell i sar., 2021). S obzirom na značajnost korišćenja oralnog modela infekcije *L. monocytogenes* zbog prirodnog puta infekcije ovom bakterijom, stvaranje genetički izmenjenih miševa koji bolje oslikavaju bolest ljudi (Disson i sar., 2009), kao i stvaranje sojeva *L. monocytogenes* adaptiranih da inficiraju miševе (Monk i sar., 2010) dovode do češće upotrebe oralnog puta inficiranja ovih životinja.

1.3. Melanom

Melanom predstavlja najsmrtonosniji rak kože, čiji je uzročnik nekontrolisano umnožavanje melanocita, ćelija koje proizvode pigment melanin (Slika 5; Tsatmali i sar., 2002). Melanociti su ćelije koje su normalno prisutne u bazalnom epidermisu kože i folikulima dlake, na mukoznim površinama, meningama i sudovnjači oka (Kanitakis, 2002). Zreo melanocit kože poseduje duge nastavke kojima se pruža između keratinocita, dosežući tako do čak 30 – 40 ćelija u cilju isporučivanja pigmenta (Tsatmali i sar., 2002). Naime, u odgovoru na oštećenje DNK keratinocita nastalo UV zračenjem, ove ćelije proizvode stimulišući hormon melanocita, koji se vezuje za receptor za melanokortin 1 na melanocitima, koji potom proizvode melanin. Ovaj pigment preuzimaju keratinociti, u kojima on apsorbuje UV zračenje, sprečavajući oštećenje DNK. Stoga se za melanocite kože može reći da predstavljaju odbrambeni sistem od oštećenja ćelija nastalog usled delovanja UV zračenja. Ono što je takođe važno pomenuti jeste da u normalnim uslovima stepen pigmentacije kože nije određen brojem melanocita, već nivoom njihove aktivnosti (Lin i Fisher, 2007).



Slika 5. Poprečni presek kože zdravog tkiva (levo) i tkiva zahvaćenog melanomom (desno). Nekontrolisanim umnožavanjem melanocita, ćelija koje proizvode pigment melanin, nastaje melanom, koji osim što se proteže kroz epidermis i dermis i doseže do krvnih sudova, ispoljava se i na površini kože. Preuzeto sa <https://www.alamy.com/melanoma-or-skin-cancer-this-rare-type-of-skin-cancer-originates-from-melanocytes-layers-of-the-human-skin-image389332439.html> i prilagođeno.

1.3.1. Etiologija i epidemiologija melanoma

Incidenca kancera kože je u porastu. Za razliku od onih koji ne obuhvataju melanom, čija je incidenca u poslednjih 20 godina povećana za više od 70 % (Mohan i Chang, 2014), incidenca melanoma u poslednje četiri decenije više nego dvostruko je povećana kod dece, adolescenata i mlađih adultnih osoba (Mitsis i sar., 2015). Tokom 2020. godine zabeleženo je više od 320.000 novih slučajeva melanoma u svetu, od čega 46,4 % u Evropi, dok petogodišnja prevalenca iznosi 14 slučajeva na 100.000 ljudi (Sung i sar., 2021).

Za razliku od drugih solidnih tumora, melanom uglavnom pogađa mlađu populaciju ili osobe srednjih godina, pri čemu u proseku pacijenti imaju svega 57 godina kada im se dijagnostikuje bolest. Incidenca se linearno povećava nakon 25. godine života sve do 50, kada opada, naročito kod žena. S tim u vezi, u mlađoj starosnoj dobi žene češće oboljevaju od muškaraca, ali nakon 55. godine života melanom češće pogađa muški pol (Rastrelli i sar., 2014).

Incidenca kutanog melanoma varira između različitih područja, kao i izloženosti UV zračenju. UV zračenje je zapravo najznačajniji sredinski faktor za nastanak melanoma, pri čemu povremeno intenzivno izlaganje sunčevim zracima predstavlja veći rizik od hroničnog, konstantnog izlaganja, koje je više povezano sa kancerom kože u koji ne spada melanom (Gandini i sar., 2005). Zabeleženi podaci govore da je 2012. godine čak 75,7 % slučajeva melanoma u svetu pripisano delovanju UV zračenja, pri čemu je ovaj broj u Australiji i Novom Zelandu dostizao 93,4 % kod žena i 97,4 % kod muškaraca (Arnold i sar., 2018; Olsen i sar., 2015).

U nastanku melanoma važnu ulogu imaju i faktori domaćina, u koje spadaju prisustvo urođenih ili stečenih melanocitnih mladeža, genetički faktori i istorija bolesti u porodici (Leonardi i sar., 2018). Interesantno, različiti fenotipovi kože spadaju u genetičku predispoziciju, budući da su nastali kao posledica polimorfizma gena receptora za melanokortin 1. Tako, nastanku melanoma su najpodložnije osobe čija je koža izrazito svetla, bez sposobnosti tamnjenja i koja uvek pocrveni usled izloženosti UV zračenju, dok su osobe tamno braon do crne kože, koja ne crveni već uvek tamni najmanje podložne razvoju melanoma. (Fitzpatrick, 1988). U faktore rizika spadaju i prisustvo pega na koži, kao i svetla boja očiju i kose (O'Neill i Scoggins, 2019). Glavni genetički faktori koji dovode do razvoja melanoma usled hroničnog izlaganja UV zračenju su geni za B-Raf proto-onkogen (*BRAF*), neurofibrinomin 1 i *NRAS*, dok je melanom nastao usled periodičnog izlaganja kože UV, koji ima niži stepen mutacija, obično povezan sa *BRAF*^{V600E} (Curtin i sar., 2005).

1.3.2. Imunski odgovor na melanom

Tokom nastanka melanoma tumorske ćelije interaguju sa ćelijama imunskog sistema u procesu nazvanom imunoeditovanje, koji se odvija u najviše tri faze (Dunn i sar., 2002). U fazi eliminacije tumorskih ćelija dolazi do aktivacije ćelija urođene i stečene imunosti, koje počinju da ispoljavaju svoja citotoksična svojstva u mikrosredini tumora (engl. Tumor Microenvironment, TME). Faza ravnoteže je druga i najduža faza u kojoj ćelije imunskog sistema konstantno suprimiraju tumor, ali često nisu sposobne da ga potpuno eliminišu. Konačno, tumor može potpuno izbeći imunski odgovor u trećoj fazi, usled čega dolazi do njegove progresije i metastaziranja (Dunn i sar., 2002; Bhatia i Kumar, 2011). Slično bakterijskoj infekciji, za uspešan antitumorski imunski odgovor neophodna je saradnja ćelija urođenog i stečenog imuniteta da bi se eliminisali premaligni i rani stadijumi melanoma, i da bi se obezbedila dugotrajna zaštita (Marcus i sar., 2014; Marzagalli i sar, 2019).

Transformisane ćelije, koje nastaju usled nepravilnog rada unutrašnjih mehanizama supresije tumora dovode do remodelovanja strome, pri čemu dolazi do oštećenja tkiva i oslobađanja signala opasnosti. Remodelovanje strome dešava se kao posledica angiogeneze i intenzivnog rasta tkiva, pri čemu može doći do oslobađanja proinflamacijskih medijatora i hemokina, koje mogu proizvoditi i same tumorske ćelije, privlačeći ćelije imunskog sistema na mesto nastanka tumora (Hanahan i Weinberg, 2011). Pri tome se najpre aktiviraju ćelije urođene imunosti: neutrofili, makrofagi, NK ćelije i dendritske ćelije (Passarelli i sar., 2017). Svoja direktna antitumorska svojstva neutrofili i makrofagi ostvaruju sposobnošću fagocitoze i produkcijom ROS, NO i IFN- γ (Fridlender i Albelda, 2012). Takođe, ove ćelije proizvode faktore kojima deluju na druge ćelije imunskog sistema. Tako, makrofagi stimulišu efektorska svojstva Th1 ćelija, koje povratno deluju na antitumorska svojstva makrofaga produkcijom IFN- γ (Marzagalli i sar, 2019).

Vezivanjem liganada eksprimiranih na tumorskim ćelijama za aktivacione receptore na NK ćelijama, kao što su NKG2D ili NKp46, a u odsustvu liganada za inhibitorne receptore na NK ćelijama, dolazi do direktnog ubijanja transformisanih ćelija. Ovo je naročito značajno za uspešan antitumorski imunski odgovor jer ćelije tumora poseduju mehanizme kojima izbegavaju imunski odgovor. Tako, prisustvo MHC molekula I klase na ćeliji domaćina, neophodno za prikazivanje antigena i aktivaciju naivnih CD8⁺ T limfocita, predstavlja ujedno i ligand za inhibitorni receptor na NK ćelijama i sprečava njihovu aktivaciju. Jedan od načina kojima tumorske ćelije izbegavaju imunski odgovor CD8⁺ T ćelija jeste odsustvo ekspresije MHC I. Međutim, kao posledica toga inhibitorni receptor na NK ćelijama nije aktiviran i ne dolazi do inhibicije signala sa aktivacionog receptora, što rezultuje aktivacijom i pokretanjem efektorskih svojstava NK ćelija (Paul i Lal, 2017). Produkcijom IFN- γ , TNF i drugih citokina i hemokina NK ćelije deluju na sazrevanje ili migraciju drugih ćelija imunskog sistema (Fauriat i sar., 2010), dok produkcijom perforina i granzima dovode do direktnog ubijanja tumorskih ćelija (Topham i Hewitt, 2009). Osim pomenutih markera NK ćelija koji su važni za efektorske funkcije ovih ćelija, tokom sazrevanja NK ćelija dolazi do povećane ekspresije molekula CD27, CD11b i KLRG-1. Stoga, prisustvo ili odsustvo ovih markera ukazuje na različite funkcionalne karakteristike NK ćelija (Chiossone i sar., 2009).

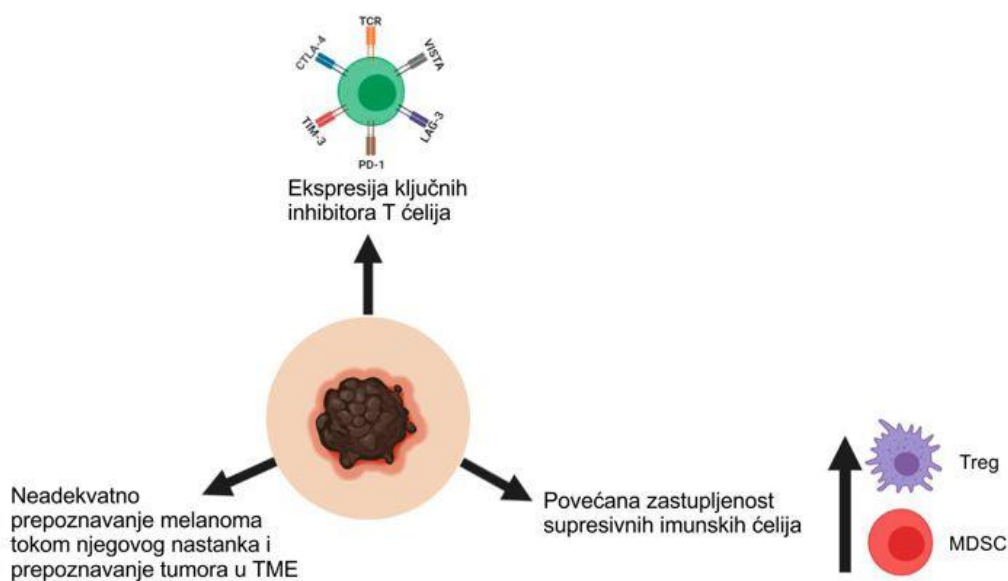
Pod uticajem efektorskih mehanizama NK ćelija i makrofaga dolazi do liziranja tumorskih ćelija i oslobađanja antigena, koje potom preuzimaju dendritske ćelije. Ove profesionalne APC migriraju do drenirajućih limfnih čvorova, gde dovode do aktivacije T ćelija prikazivanjem antigena i ekspresijom kostimulatornih molekula (Banchereau i sar., 2000). Antigen-specifične T ćelije potom odlaze u TME gde ispoljavaju svoja efektorska svojstva (Kim i sar., 2007). Kada su u pitanju CD4⁺ T limfociti, u TME dominantne su Th1 ćelije, koje produkuju IFN- γ , kao i IL-2, čime održavaju CD8⁺ T limfocite aktivnim. CD8⁺ T limfociti su naročito značajni za eliminaciju tumorskih ćelija jer poseduju svojstva direktnog ubijanja transformisanih ćelija. U odgovoru na tumor, aktivirani antigen-specifični CD8⁺ T limfociti u TME produkuju velike količine IFN- γ , čime mogu zaustaviti rast tumora i čak dovesti do ubijanja tumorskih ćelija mehanizmima zavisnim od IFN- γ , kao što su inhibicija ćelijskog ciklusa, apoptoza i indukovanje tumoricidnih efekata makrofaga (Dunn i sar., 2004). Osim toga, produkcijom perforina i granzima citotoksični T limfociti dovode do direktnog ubijanja transformisanih ćelija, pri čemu se oslobađaju dodatni antigeni, koji će preuzimanjem i prikazivanjem od strane dendritskih ćelija dovesti do formiranja i ekspanzije novih T limfocita specifičnih za melanom (Straten i sar., 1999). Iako se B limfociti mogu naći unutar melanoma i TME, kada je u pitanju antitumorski imunski odgovor fokus je na T limfocitima kao glavnim efektorskim ćelijama (Chiaruttini i sar., 2017).

Ukoliko imunski sistem efikasno eliminiše sve tumorske ćelije, proces imunoeditovanja može se završiti fazom eliminacije (Bhatia i Kumar, 2011). Međutim, u slučaju da su neke varijante tumorskih ćelija otporne, one preživljavaju i proces imunoeditovanja prelazi u narednu fazu, fazu ravnoteže. Ova faza je ključna jer može rezultovati ili konačnom eliminacijom tumora ili njegovom progresijom i potpunim suprimiranjem antitumorskog imunskog odgovora (Drake i sar., 2006). U fazi ravnoteže, koja kod ljudi može trajati i nekoliko godina, neprestano se eliminišu tumorske ćelije, pri čemu najvažniju ulogu ostvaruju T limfociti (Bhatia i Kumar, 2011).

1.3.3. Mehanizmi izbegavanja imunskog odgovora od strane tumora

Ćelije tumora prilagođavaju se odbrambenim mehanizmima domaćina delovanjem na različite biološke signalne puteve. Ove ćelije izbegavaju supresore rasta i indukovanje ćelijske smrti, uspešno proliferišu i replikuju se, postaju invazivne i metastaziraju. Osim toga, ćelije tumora razvijaju mehanizme kojima izbegavaju prepoznavanje i efektorske mehanizme ćelija imunskog sistema (Hanahan i Weinberg, 2011), kao što je prikazano na slici 6.

Tokom razvoja melanoma, dendritske ćelije preuzimaju antigene tumora i prikazuju ih naivnim T limfocitima, koji nakon aktivacije odlaze u TME i ispoljavaju svoja efektorska svojstva. Međutim, tokom progresije melanoma, dolazi do produkcije immunosupresivnih citokina od strane tumorskih ćelija. Ovi citokini narušavaju pravilno funkcionisanje dendritskih ćelija i prikazivanje antigena naivnim T limfocitima u limfnom čvoru dovodeći do smanjene aktivacije T ćelija. Ovo nepravilno prikazivanje antigena nastaje usled smanjene ekspresije MHC molekula i kostimulatornih molekula na APC (Stoitzner i sar., 2008; Mittal i Roche, 2015). Takođe, kao što je pomenuto, neke varijante melanoma sposobne su da dovedu do smanjene ekspresije glavnih komponenti MHC molekula I klase i na taj način izbegnu imunski odgovor CD8⁺ T limfocita (Kageshita i sar., 1999). Još jedan način izbegavanja efikasnog antitumorskog imunskog odgovora predstavlja netipična ekspresija MHC molekula II klase na ćelijama melanoma, koja dovodi do aktivacije CD4⁺ T limfocita i dominantne lokalne produkcije TNF, koji ne samo što ne utiče na preživljavanje i proliferaciju tumorskih ćelija, već dovodi do inhibicije imunskog odgovora CD8⁺ T limfocita posredstvom IFN-γ (Donia i sar., 2015).



Slika 6. Mehanizmi kojima melanom izbegava efikasan imunski odgovor. Kao što je opisano u tekstu, tumorske ćelije pod pritiskom imunskog odgovora proizvode medijatore kojima privlače immunosupresivne ćelije - regulatorne T limfocite (Treg) i supresorske ćelije mijeloidnog porekla (engl. Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC) u TME, menjaju ekspresiju molekula važnih za prikazivanje antigena i aktivaciju efektorskih ćelija imunskog sistema ili eksprimiraju inhibitore T ćelija, pokušavajući da izbegnu antitumorski imunski odgovor ili smanje njegov intenzitet. Na ovaj način faza eliminacije može preći u fazu ravnoteže u kojoj se selektuju otporne varijante tumorskih ćelija, koje, ukoliko dovoljno uspešno izbegavaju imunski odgovor, dovode do progresije tumora. Prilagođeno od Eddy i Chen (2020).

Fiziološka uloga regulatornih T limfocita (Treg) je sprečavanje prekomernog imunskog odgovora i sledstveno oštećenje tkiva (Vignali i sar., 2008). Produkcijom citokina, kao što su IL-10 i faktor transformacije rasta β (engl. Transforming Growth Factor-β, TGF-β), indukovanjem ćelijske smrti, metaboličkim narušavanjem funkcije ćelija, Treg vrše supresiju efektorskih ćelija imunskog sistema (Deng, 2018). Ovo svojstvo su iskoristile tumorske ćelije, koje produkcijom citokina i hemokina privlače Treg u TME. Kao posledica toga dolazi do supresije imunskog odgovora na melanom i nesmetane proliferacije i ekspanzije tumorskih ćelija. Pokazano je da je u perifernoj krvi, limfnim čvorovima i TME pacijenata sa melanomom povećano prisustvo Treg, kao i smanjena citolitička sposobnost ćelija imunskog sistema (Viguier i sar., 2004). Dodatno, sposobnost supresije

efektorskih T ćelija poseduju i supresorske ćelije mijeloidnog porekla (engl. Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC). Ove ćelije u TME narušavaju glavne metaboličke puteve zadužene za funkcionisanje T limfocita, što rezultuje apoptozom ovih ćelija (Gabrilovich i sar., 2009). MDSC na taj način omogućavaju progresiju tumora i diseminaciju tumorskih ćelija. Kod pacijenata obolelih od melanoma povećanje broja MDSC zabeleženo je u perifernoj krvi i TME i u korelaciji je sa lošom prognozom bolesti (Jordan i sar., 2013). Pokazana sposobnost tumorskih ćelija da mijeloidne ćelije iz kostne srži transformišu u MDSC sugerise da tumorske ćelije zaista deluju na MDSC u cilju izbegavanja imunskog odgovora (Eddy i Chen, 2020).

U fiziološkim uslovima delovanje supresivnih ćelija imunskog nije jedini vid zaštite organizma od prekomernog imunskog odgovora i razvoja autoimunosti. Ključni inhibicioni receptori T ćelija (Nishimura i sar., 2001; Parry i sar., 2005), od kojih su najviše istraženi antigen 4 koji je asociran sa citotoksičnim T limfocitima (engl. Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4, CTLA-4) i protein 1 programirane ćelijske smrti (engl. Programmed cell Death protein 1, PD-1), tzv. negativni regulatori imunskog odgovora, već su postali predmet istraživanja brojnih studija. Vezivanjem odgovarajućeg liganda za PD-1, koji je eksprimiran na T limfocitima, sprečava se dalja aktivacija ovih ćelija. Ovo je značajno npr. prilikom borbe sa patogenom, jer ćelije koje okružuju mesto infekcije na svojoj površini eksprimiraju ligand za PD-1, koji nakon vezivanja za PD-1 sprečava aktivaciju T ćelija i oštećenje sopstvenog tkiva (Chemnitz i sar., 2004; Blackburn i sar., 2009). Slično PD-1, prenos signala preko CTLA-4 dovodi do anergije T limfocita i njihove nesposobnosti da ispolje svoja efektorska svojstva. Naime, ovaj molekul je u kompeticiji sa CD28 za vezivanje za kostimulatorne molekule CD80/86 i ima važnu ulogu u sprečavanju autoimunskih reakcija (Sansom, 2000). Ova svojstva negativne regulacije T ćelija iskoristile su tumorske ćelije da spreče efektorske mehanizme T limfocita, najznačajnijih ćelija za uspešan antitumorski imunski odgovor. Pokazano je da signalna transdukcija preko PD-1 i CTLA-4 pokreće mehanizme unutar ćelija melanoma koji mogu biti odgovorni za proliferaciju ćelija, rast, preživljavanje, signale za metastaziranje, a pored toga obrazuju immunosupresivnu sredinu oko tumora (Contardi i sar., 2005; Clark i sar., 2016). Dodatno, u kutanom melanomu je pokazano da 62 % ćelija eksprimira PD-1 (Kaunitz i sar., 2017). Ova svojstva iskorišćena su u svrhu imunoterapije tumora i danas su u upotrebi monoklonska antitela specifična za CTLA-4 i PD-1 (Ribas i Wolchok, 2018). Međutim, ovi negativni regulatori nisu prisutni samo na efektorskim T ćelijama, već ih eksprimiraju i Treg. Ekspresija CTLA-4 na Treg je povećana u TME i u pozitivnoj je korelaciji sa lošom prognozom bolesti (Kwiecien i sar., 2017; Paulsen i sar., 2017).

Pomenuti mehanizmi aktiviraju se tokom faze ravnoteže, pri čemu se pod pritiskom imunskog odgovora selektuju otporne varijante tumorskih ćelija. Ukoliko je imunski odgovor efikasan, proces imunoeditovanja završava se fazom ravnoteže. Međutim, ukoliko prevladaju otporne varijante tumora, proces imunoeditovanja prelazi u poslednju, treću fazu u kojoj imunski sistem ne može da se izbori sa rastućim tumorom, rezultujući njegovim odmetanjem (Dunn i sar., 2004).

1.3.4. Eksperimentalni modeli melanoma

Da bi se razumela biologija nastanka i progresije melanoma, tumora koji ima tendenciju formiranja metastaza (Sandru i sar., 2014), i da bi se ispitali terapijski pristupi u lečenju koristi se kombinacija *in vitro* i *in vivo* modela. *In vitro* modeli obuhvataju dvodimenzionalnu (2D) i trodimenzionalnu (3D) ćelijsku kulturu ćelija melanoma, dok *in vivo* modeli obuhvataju različite animalne modele.

Konvencionalne 2D ćelijske kulture su pogodan model za ispitivanje različitih karakteristika ćelija melanoma, kao što su proliferacija, pokretljivost, citotoksičnost, invazivnost, ekspresija proteina, plastičnost signalnih puteva, molekularna i genetička karakterizacija, osetljivost i vreme delovanja lekova (Rebecca i sar., 2020). Ono što je prednost ovog modela, osim jednostavnosti i niske cene

gajenja ovih ćelija u plastičnim sudovima u kojima su izložene hranljivim materijama i kiseoniku, je da ove ćelijske linije predstavljaju čiste kulture ćelija, u kojima nisu prisutne druge ćelije. Ovo je značajno za ispitivanje delovanja nekog terapeutika direktno na tumorske ćelije, kao i uticaja drugih ćelija korišćenjem kokulture ili transvel sistema (Gregg, 2021). Za razliku od 2D modela, u kojima su tumorske ćelije izolovane, 3D modeli uključuju trodimenzionalnu orijentaciju ovih ćelija, u kojoj se uspostavlja dinamična interakcija sa vanćelijskim matriksom i drugim ćelijama, kao što su ćelije endotela, fibroblasti i ćelije imunskog sistema (Smalley i sar., 2008). Jedan od 3D modela, 3D rekonstrukt kože, izgrađen je od izolovanih populacija ćelija tako da one obrazuju slojeve kože: terminalno diferenciran epiderm sa keratinocitima i melanocitima, dermalni sloj sa fibroblastima okruženim kolagenom, kao i bazalnu membranu (Berking i Herlyn, 2001). Upotreba 3D modela od značaja je za preklinička i klinička ispitivanja, jer su ovi modeli manje kompleksni od *in vivo* modela, jeftiniji su i zahtevaju manje vremena. Dodatna prednost je redukcija korišćenja životinja u istraživanju, međutim, budući da delovanje nekih terapeutika zahteva metaboličku konverziju u organizmu ili ostvaruje sistemsko delovanje, a ne lokalno, upotreba animalnih modela je neizbežna (Beaumont i sar., 2013).

U *in vivo* istraživanjima melanoma, najčešće se koriste mišji modeli. Melanom može biti indukovano na više načina: transplantacijom ili injeciranjem tumora u singene, genetički identične miševе, injeciranjem humanih tumorskih ćelija u imunokompromitovane miševе, korišćenjem genetički izmenjenih miševa ili indukcijom pomoću UV zračenja (Gregg, 2021). Preklinička ispitivanja delovanja terapeutika često uključuju korišćenje humane ćelijske linije melanoma. Ove ćelije subkutano se injeciraju imunokompromitovanim miševima, miševima koji nemaju funkcionalan imunski sistem. Iako ovo omogućava kontrolisano ispitivanje humanih ćelija melanoma *in vivo*, budući da se kontrolisanim brojem ćelija i uslovima davanja može odrediti tok nastanka tumora, ovaj model ne uključuje delovanje imunskog sistema, koje je neizbežno za eliminaciju melanoma (Beaumont i sar., 2013). To se može prevazići korišćenjem singenog modela, pri čemu je najviše korišćena B16 ćelijska linija dobijena iz C57BL/6 miša nakon hemijski indukovanoг melanoma (Fidler i Nicolson, 1976). Da bi se indukovao solidni tumor, B16 (B16-F1) ćelije injeciraju se miševima subkutano i na mestu inokulacije dolazi do formiranja melanoma (Overwijk i Restifo, 2001). Sa druge strane, intravensko injeciranje B16-F10 ćelijske linije koristi se za ispitivanje metastaza, budući da ovakvim načinom primene ćelije odlaze u pluća, gde formiraju kolonije (Giavazzi i Garofalo, 2001). Pored ovih mišjih modela, koji su pogodni za ispitivanje imunskog odgovora na melanom i nisu zahtevni u pogledu cene i tehnologije, korišćenjem humanizovanih i genetički izmenjenih miševa mogu se dobiti dodatni, specifičniji rezultati koji se tiču nastanka i lečenja melanoma.

Efekat vodenog ekstrakta ploda aronije (VEPA) na imunski sistem u mišjim modelima infekcije L. monocytogenes i melanoma nije prethodno testiran. Na osnovu svega navedenog može se pretpostaviti da VEPA poseduje potencijal da moduliše imunski odgovor. U skladu sa time, u ovoj doktorskoj disertaciji je testiran uticaj VEPA na imunski sistem u mišjim modelima infekcije i melanoma, sa posebnom pažnjom na ćelije urođene i stečene imunosti od značaja za antibakterijski i antitumorski imunski odgovor.

2. Ciljevi

S obzirom da ekstrakt aronije pokazuje zaštitna svojstva u različitim stanjima i bolestima, kao i da su pokazana kako antiinflamacijska tako i proinflamacijska svojstva različitih ekstrakata aronije, osnovna hipoteza ove doktorske disertacije je da **vodeni ekstrakt ploda aronije ostvaruje imunomodulacijsko dejstvo i da pretretman miševa ovim ekstraktom stimuliše antibakterijski i antitumorski imunski odgovor**. Da bi se ova hipoteza ispitala postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Ispitati dejstvo VEPA na ćelije urođene i stečene imunosti *in vitro*:

- Određivanjem vijabilnosti dendritskih ćelija i produkcije proinflamacijskih medijatora
- Ispitivanjem produkcije proinflamacijskih medijatora iz makrofaga i određivanjem sposobnosti fagocitoze ovih ćelija
- Merenjem vijabilnosti splenocita, zastupljenosti CD4⁺, CD8⁺ T limfocita i B limfocita i produkcije proinflamacijskih citokina
- Određivanjem uticaja na diferencijaciju naivnih CD4⁺ T limfocita

2. Ispitati dejstvo VEPA na ćelije urođene i stečene imunosti *in vivo*:

- Određivanjem broja ćelija u limfnom tkivu creva (intraepitelnim limfocitima i Pejerovim pločama) nakon tretmana zdravih C57BL/6 miševa, kao i zastupljenosti ćelija urođene i stečene imunosti u ovim tkivima, ispitivanjem uticaja na morfologiju slojeva tankog creva i merenjem produkcije proinflamacijskih citokina u slezini

3. Ispitati dejstvo pretretmana VEPA na eliminaciju *L. monocytogenes* kod BALB/c miševa i odrediti ćelijske i molekulske mehanizme uočenih efekata:

- Praćenjem toka infekcije nakon administracije *L. monocytogenes* merenjem telesne mase i ispitivanjem prisustva bakterije u ciljnim tkivima (slezini i jetri)
- Određivanjem zastupljenosti različitih populacija ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu creva i u slezini
- Ispitivanjem ćelija Pejerovih ploča, MLC-a i slezine na prisustvo citotoksičnih medijatora
- Određivanjem sposobnosti fagocitoze i produkcije ROS mijeloidnih ćelija Pejerovih ploča i slezine, kao i ekspresije kostimulatornih molekula na APC-ama Pejerovih ploča, slezine i MLC-a
- Određivanjem ekspresije iRNK proinflamacijskih medijatora u slezini
- Ispitivanjem ekspresije iRNK za proinflamacijske medijatore i signalne puteve uključenih u njihovu ekspresiju nakon *in vitro* primene VEPA u ćelijskoj kulturi makrofaga poreklom iz BALB/c miša

4. Ispitati dejstvo pretretmana VEPA na razvoj melanoma kod C57BL/6 miševa i odrediti ćelijske i molekulske mehanizme uočenih efekata:

- Praćenjem razvoja bolesti i merenjem zapremine tumora
- Određivanjem zastupljenosti različitih populacija ćelija urođene i stečene imunosti unutar tumora i merenjem produkcije medijatora koji su od značaja za antitumorski imunski odgovor
- Ispitivanjem zastupljenosti različitih populacija ćelija imunskog sistema u MLC-u, prisustva citokina od značaja za imunski odgovor na melanom, kao i udela tkivno-specifičnih citotoksičnih T limfocita

- Merenjem produkcije proinflamacijskih citokina u slezini i serumu
- Određivanjem citotoksičnosti ćelija slezine poreklom iz kontrolnih ili pretretiranih inokuliranih miševa u kokulturi sa B16 ćelijama i određivanjem mehanizma citotoksičnosti neutralizacijom IFN- γ
- Ispitivanjem vijabilnosti i ćelijske smrti B16 ćelija nakon *in vitro* primene VEPA

3. Materijal i metode

3.1. Reagensi i rastvori

U izradi ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći reagensi i rastvori:

Medijum za uzgajanje ćelija RPMI (engl. Roswell Park Memorial Institute)-1640, serum fetusa govečeta (engl. Fetal Calf Serum – FCS; PAA Laboratories, Pašing, Austrija), goveđi albumin iz seruma (engl. Bovine Serum Albumine – BSA; Applichem, Darmstadt, Nemačka), gentamicin, penicilin, (Galenika, Beograd, Srbija), streptomycin (Biological Industries),

natrijum dihidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; Analytika, Prag, Češka), natrijum hlorid (NaCl ; ICN, Aurora, Ohajo, SAD), glicerol, natrijum hidroksid (NaOH), kalijum hlorid (KCl), kalijum-natrijum-tartarat, kalijum dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 ; LachNer, Neratovice, Češka), bromfenol plavo, natrijum nitrit (NaNO_2), dinatrijum hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), natrijum karbonat (Na_2CO_3 ; Carlo Erba, Milano, Italija), fosforna kiselina (H_3PO_4), bakar sulfat-5-hidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$), kalcijum hlorid (CaCl_2), paraformaldehid, metanol, etanol, izopropil-alkohol, ksilol, hlorovodonična kiselina (HCl), sirćetna kiselina (CH_3COOH ; svi dobavljeni od Zorka, Šabac, Srbija),

tripan plavo (BDSL, Velika Britanija), konkanavalin A (ConA, Pharmacia, Upsala, Švedska), lipopolisaharid (LPS, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF; Peprotech, Roki Hil, SAD), pufer za lizu eritrocita (eBioscience, San Dijego, SAD), tripsin, akutaza (ThermoFisher, Voltam, Masačusets, SAD), (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), rastvor kristal violeta (engl. Crystal Violet, CV), parafin (Novogen Diagnostik, Istanbul, Turska), Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija), eozin (Molar, Budapest, Mađarska), DPX, Triton X-100, α -mlečna kiselina, fenazin metosulfat, p-jodonitrotetrazolijum, β -nikotinamid adenin dinukleotid (svi od Sigma Aldrich),

puferi za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set), koktel za stimulaciju ćelija koji sadrži i inhibitore transportnih proteina i sastoji se od forbol miristat acetata, jonomicina, brefeldin A i monensina (Cell Stimulation Cocktail; eBioscience), dihidrorodamin 123 (DHR; Molecular Probes, Judžin, Oregon, SAD), rastvor fluorescentno obeleženih kuglica za fagocitozu (Sigma Aldrich), aneksin V-FITC (BD Pharmingen, San Dijego, Kalifornija, SAD), $10 \times$ pufer za vezivanje aneksina V (engl. Annexin V Binding Buffer, ABB; Biotium, Hayward, SAD), propidijum jodid (PI; Sigma Aldrich),

Tween-20 (Sigma Aldrich), supstrat za peroksidazu 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB; eBioscience), rastvor avidina konjugovanog sa peroksidazom iz rena (engl. Horse Radish Peroxidase, avidin-HRP), Perkol, rastvor za izolovanje ćelija po gustini (Histopaque-®1077; Sigma Aldrich), rastvor magnetnih kuglica obeleženih streptavidinom (ImagSAv kuglice; BD Biosciences, San Diego, SAD),

reagens za izolovanje RNK (TRI Reagent; Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD), koktel za inhibiciju proteaza (engl. Protease Inhibition Cocktail, Sigma Aldrich), hloroform (Merck, Darmstadt, Nemačka), β -merkaptioetanol, etilendiamin tetrasirćetna kiselina (engl. ethylenediamin tetra-acetic acid, EDTA), dimetil sulfoksid (Sigma-Aldrich), ditiotreitol (DTT), Tris (Fluka, Buh, Nemačka), amonijum persulfat, natrijum dodecil sulfat (SDS; Applichem); glicin, N, N, N', N'-tetrametiletlen diamin, akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka), proteinski marker poznatih molekulskih masa (PageRuler, Termo Fisher Scientific), ECL rastvor za detekciju (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija),

nasumični heksamerni prajmeri, komercijalni pufer za reverznu transkripciju, dezoksiribonukleotid-trifosfati, reverzna transkriptaza Moloni virusa mišje leukemije, inhibitor RNaze

(svi od Fermentas, Vilnius, Litvanija), komercijalna smeša za RT-PCR (SYBR Green PCR Master Mix), voda bez nukleaza (engl. RNase Free Water; Applied Biosystems, Varington, Velika Britanija).

Kao medijum za uzgajanje ćelija korišćen je RPMI-1640 sa 25 mM HEPES (engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) i 2 mM L-glutaminom (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Izrael), u koji su dodavani koktel antibiotika penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100 IU/mL), nistatina (10 U/ml), gentamicina (100 µg/ml) i 5 % FCS. FCS je pre dodavanja medijumu radi kultivacije ćelija inkubiran 30 minuta na 56 °C u cilju inaktivacije komponenti komplementa.

Za uzgajanje dendritskih ćelija korišćen je medijum za uzgajanje ćelija sa dodatkom 200 mM L-glutamina, 100 mM Na-piruvata i 20 % FCS. Za *in vitro* diferencijaciju T limfocita korišćen je medijum za uzgajanje ćelija sa dodatkom 0,02mM Na-piruvata, 5 µM β-merkaptetanola i 10 % FCS.

Za detektovanje mikroorganizama koji rastu korišćena je hranljiva podloga BHI (engl. Brain Heart Infusion).

Puferisani rastvor fosfatnih soli (engl. Phosphate Buffered Saline, PBS) u destilovanoj vodi (dH₂O) pravljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH = 7,4.

Pufer za magnetne kuglice pravljen je od PBS 0,5 % BSA i 2 mM EDTA.

Grisov reagens, koji se sastoji od 0,1 % rastvora N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1 % rastvora sulfanilamida u 5 % H₃PO₄ pomešanih u odnosu 1:1, koristio se za određivanje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura.

Rastvor PBS 0,25 % tripsin i 0,02 % EDTA koristio se za odlepljivanje adheriranih ćelija od podloge. PBS 0,1% rastvor tripan plavo je upotrebljavan za brojanje živih ćelija.

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 dH₂O) koji je neposredno pred upotrebu obogaćen koktelom za inhibiciju proteaza (1:20); 5 × PBS (400 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 500 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄ × 2 H₂O u dH₂O), 5 × pufer za elektroforezu (125 mM Tris, 0,5 % SDS, 1,25 M glicin u dH₂O), 4 × pufer za nalivanje na gel za elektroforezu (engl. Loading buffer, LB: 1 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % SDS, 0,2 M β-merkaptetanol, 0,004 % bromfenol plavo, 20 % glicerol), pufer za transfer na membranu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10 % metanol, 0,1 % SDS u dH₂O). Za pranje membrana korišćen je rastvor PBS 0,1% Tween-20 (PBSTw), nespecifično vezivanje antitela blokirano je sa PBSTw 5 % BSA, dok su antitela rastvarana u PBSTw 1 % BSA.

3.2. Biljni materijal

3.2.1. Prikupljanje biljnog materijala i priprema ekstrakta

Plodove aronije obezbedila je kompanija Conimex Trade d.o.o, Srbija. Bobice su sakupljane u četvrtoj godini kultivacije sa sertifikovanog organskog eksperimentalnog polja u selu Grabovci blizu Rume u avgustu 2017. godine. Bobice su u proseku bile prečnika 7,1 mm, dok je prosečna težina bila 1,18 g. Neposredno po sakupljanju, bobice su sušene 48 h na 40 °C u laboratorijskoj sušnici (Instrumentaria ST 01/02, Zagreb, Hrvatska) i samlevene pomoću laboratorijskog mlina na Institutu za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u Beogradu, sa sertifikovanim standardom kvaliteta (ISO 9001:2015 i HACCP).

Biljni materijal je ekstrahovan sa 50 % etanola na orbitalnom šejkeru uz mešanje na 170 rpm tokom 60 min, tako da odnos čvrste i tečne faze iznosi 1:20. Nakon ekstrakcije, etanol je isparen u vakuum uparivaču i dobijen je vodeni ekstrakt, koji je zamrznut na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon čega je liofilizovan (Beta 1–8 Freeze Dryer; Martin Christ GmbH, Osterode am Harc, Nemačka). Od 100 g bobica aronije dobijeno je 47,3 g liofilizovanog vodenog ekstrakta. VEPA nije sadržao žive bakterije (testirano na BHI medijumu). Endotoksin takođe nije detektovan (ispitano pomoću PYROGENT™-5000 Kinetic Turbidimetric LAL Assay; Lonza Netherlands B.V, Geleen, Holandija).

Detekcija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja vršena je visoko efikasnom tečnom hromatografijom, na HPLC aparatu (engl. High Performance Liquid Chromatography; Agilent 1200 RR, Valdbron, Nemačka), uz upotrebu DAD detektora, na reverzno-faznoj koloni Lichrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5 μm veličina pora, Agilent). Mobilnu fazu A činio je 0,1 % rastvor mravlje kiseline u vodi, a kao mobilna faza B je korišćen acetonitril. Razdvajanje antocijana je vršeno sledećim gradijentom: 1 % B 0-0,5 min; 1-7 % B 0,5-1 min; 7 % B 1-4 min; 7-10 % B 4-7,5 min; 10- 14 % B 7,5-11,5 min; 14-25 % B 11,5-15,5 min; 25-40 % B 15,5-18,5 min; 40-75 % B 18,5-22 min; 75 % B 22-25 min, sa protokom od 1 ml/min. Detekcija je vršena na 290, 350 i 520 nm. Sadržaj antocijana je određen na osnovu kalibracione krive, koja je konstruisana na osnovu standarda antocijana, cijanidin-3-O-galaktozida, cijanidin-3-O-glukozida i cijanidin-3-O-arabinozida. Rezultat je izražen kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, u mg po gramu suve materije (mg/g).

Sadržaj ukupnih proantocijanidina u uzorku određen je spektrofotometrijski, pomoću modifikovane metode p-DMACA (p-dimetilaminocinamaldehyd). 100 μg ekstrakta aronije pomešano je sa 80 μl p-DMACA reagensa, 2 ml metanola i kapljicom glicerola i absorbancija je nakon 7 min merena na 640 nm. Sadržaj proantocijanidina u uzorku izražen je u miligramima ekvivalenta katehina (engl. Catechin Equivalents, CE) po gramu ekstrakta (mg CE/g).

Sve analize su vršene u tri ponavljanja.

3.3. Priprema *L. monocytogenes* za inficiranje miševa

U izradi ove doktorske disertacije korišćena je *Listeria monocytogenes* ATCC19111. Bakterija je uzgajana na hranljivoj podlozi BHI na rotirajućem šejkeru uz mešanje na 180 rpm pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon 20 h bakterijska kultura je razblaživana $50\times$ i potom uzgajana do dostizanja sredine logaritamske faze rasta. Optička gustina bakterijske suspenzije određena je spektrofotometrijski i broj CFU *L. monocytogenes* određivan je na osnovu standardne krive rasta. Da bi se pripremio inokulum za infekciju miševa, pravljena su odgovarajuća razblaženja u sterilnom PBS rastvoru da bi se finalno dostigla koncentracija od 5.5×10^7 bakterijskih ćelija/ml. Provera broja CFU u inokulumu vršena je zasejavanjem na BHI agar.

3.4. Kulture ćelija

B16 ćelijska linija melanoma, poreklom iz C57BL/6 miša napravljena u American Type Culture Collection (Manasas, Virdžinija, SAD), uzgajana je u sterilnim uslovima na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu (IBISS). Ćelije su uzgajane u sterilnim plastičnim flašama (25 cm^3 ; Sarstedt, Numbreht, Nemačka) u 5ml medijuma za kultivaciju ćelija u inkubatoru, pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi zasićenoj vodenom parom i pri koncentraciji CO_2 od 5 %. Na svaka tri dana medijum za kultivaciju je menjan, a po dostizanju 80 % konfluentnosti ćelije su presađivane u nove sterilne

plastične flaše ili su korišćene u eksperimentima. Čelije su odlepljivane od podloge postupkom tripsinizacije. Medijum u kome su ćelije rasle je prosipan, a plastična flaša prana pomoću 5 ml PBS. Nakon dodavanja 500 µl rastvora PBS 0,25 % tripsin i 0,02 % EDTA i inkubacije tokom 3 min na temperaturi od 37 °C, odlepljenim ćelijama je dodavan medijum za kultivaciju, čime je prekidan proces tripsinizacije. Čelijska suspenzija je centrifugirana tokom 3 min na 1000 rpm, talog ćelija je resuspendovan u 1 ml medijuma, određivan je broj ćelija i one su korišćene u daljem eksperimentalnom radu.

3.5. Eksperimentalne životinje

U izradi ove doktorske disertacije korišćeni su miševi starosti 2 – 3 meseca i to sledećih sojeva: mužjaci BALB/c i C57BL/6 sojeva i ženke C57BL/6 soja. Sve životinje su uzgajane i čuvane u uzgajalištu u IBISS u standardnim uslovima, bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su urađeni u skladu sa direktivom 2010/63/EU i odobreni od strane Etičkog komiteta IBISS (01-2420 od 23.11.2018. godine, 01-539 od 28.02.2019. godine i 01-1036 od 06.05.2019. godine) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Uprave za veterinu (broj 323-07-01819/2020-05 i 323-07-07965/2020-05).

3.5.1. Tretman miševa vodenim ekstraktom ploda aronije

U cilju ispitivanja delovanja VEPA na ćelije imunskog sistema *in vivo*, zdravi 8 – 12 nedelja stari mužjaci soja C57BL/6 tretirani su VEPA. Miševima je tokom sedam dana oralnom gavažom davano 50 mg/kg telesne mase VEPA rastvorene u 100 µl česmenske vode, dok je kontrolna grupa primala istu količinu česmenske vode. *Ex vivo* analiza je rađena desetog dana.

U cilju ispitivanja delovanja pretretmana VEPA na eliminaciju infekcije *L. monocytogenes*, mužjaci BALB/c soja miševa starosti 8 – 12 nedelja tretirani su tokom sedam dana VEPA, na isti način kao što je opisano, dok je kontrolna grupa primala česmensku vodu. Nakon sedam dana obe grupe miševa su oralnom gavažom primile 5×10^6 CFU *L. monocytogenes* u 100 µl PBS, a *ex vivo* analiza rađena je nakon 48 h, osim u eksperimentu praćenja toka infekcije. Dodatno, u cilju ispitivanja delovanja VEPA na imunski sistem zdravih BALB/c miševa, miševi starosti 8 – 12 nedelja tretirani su tokom sedam dana VEPA, na isti način kao što je opisano, dok je kontrolna grupa primala česmensku vodu. Desetog dana rađena je *ex vivo* analiza.

U cilju ispitivanja delovanja pretretmana VEPA na razvoj melanoma, zdrave C57BL/6 ženke starosti 8 – 12 nedelja tretirane su VEPA na isti način kao u prethodim eksperimentima. Kontrolna grupa primala je česmensku vodu. Nakon sedam dana, obema grupa miševa je subkutano ubrizgano $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija melanoma resuspendovanih u PBS, u donji desni deo leđa. Tretman VEPA nastavljen je do kraja eksperimenta i *ex vivo* analiza je rađena 13. dana od administracije B16 ćelija, osim u eksperimentu praćenja razvoja bolesti. Kada su postali palpabilni, tumori su svakodnevno mereni u dve dimenzije i zapremina tumora je računata na sledeći način: dužina \times širina² \times 0,52.

3.6. Metode izolovanja ćelija

3.6.1. Izolovanje ćelija limfnih čvorova

Mezenterični limfni čvor miša potiskivan je kroz sterilnu najlonsku mrežicu promera 70 µm u 3 ml PBS 3 % FCS. Ćelijska suspenzija je centrifugirana na 550 g tokom 5 min i potom je ćelijski talog resuspendovan u 1 ml PBS 3 % FCS. Ćelije su brojane i fenotipski okarakterisane pomoću protočnog citofluorimetra.

3.6.2. Izolovanje splenocita

Ćelijska suspenzija splenocita dobijena je potiskivanjem slezine kroz sterilnu najlonsku mrežicu promera 70 µm u 5 ml PBS 3% FCS. Nakon centrifugiranja (550 g, 5 min), na talog ćelija sipano je 2 ml pufera za lizu eritrocita u cilju odstranjivanja ovih ćelija. Nakon 5 min na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje reakcija je prekinuta dodavanjem 10 ml PBS 3% FCS i nakon centrifugiranja (550 g, 5 min) ćelije su brojane i korišćene za uspostavljanja ćelijske kulture ili su analizirane pomoću protočnog citofluorimetra.

3.6.3. Izolovanje ćelija Pejerovih ploča

Pejerove ploče odsecane su makazama iz tankog creva. Suspenzija ćelija dobijena je potiskivanjem Pejerovih ploča kroz sterilnu najlonsku mrežicu promera 70 µm u 3 ml PBS. Nakon centrifugiranja tokom 5 min na 550 g ćelije brojane i korišćene za fenotipizaciju na protočnom citofluorimetru.

3.6.4. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka

5 ml hladnog PBS ubrizgavano je u peritonealnu šupljinu miša, i potom pipetom izvlačeno u epruvetu. Nakon centrifugiranja na 550 g tokom 5 minuta ćelije su resuspendovane u RPMI-1640 5% FCS i prebrojane. 1×10^5 ćelija/bunaru postavljeno je u ploču sa 24 bunara ravnog dna (Sarstedt). Nakon 2 sata inkubacije na 37 °C bunari su ispirani sa PBS u cilju odstranjivanja neadherentnih ćelija. Peritonealne ćelije koje su adherirale za dno bunarića odlepljivane su u mlazovima hladnog PBS, centrifugirane (500 g, 5 min), brojane i analizirane pomoću protočnog citofluorimetra.

3.6.5. Izolovanje intraepitelnih ćelija iz tankog creva

Tanko crevo je u Petri šolji sa PBS pažljivo čišćeno od masnog tkiva. Pejerove ploče su odbačene, sadržaj creva je istisnut, crevo je uzdužno presečeno i potom skraćivano na delove dužine oko 3 cm. U cilju odstranjivanja mukusa uzorci su nakon pranja pomoću hladnog RPMI-1640 inkubirani na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta u 1mM DTT. Nakon centrifugiranja (1500 rpm, 5 min), talog je rastvoren u RPMI-1640 5 % FCS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT i mešan tokom sat vremena na temperaturi od 37 °C na orbitalnom šejkeru na 140 rpm. Uzorci su propuštani kroz konusnu najlonsku mrežicu promera 70 µm a potom i kroz najlonsku mrežicu promera 40 µm. Nakon centrifugiranja (1500 rpm, 5 min) talog ćelija je resuspendovan u 3 ml 40% Perkola i nalivan na 2,5 ml

80 % Perkola pri čemu se formirao koncentracijski gradijent Perkola. Izotonične koncentracije Perkola pripremane su od štoka koji je pravljen mešanjem Perkola i $10 \times$ PBS u odnosu 9:1. Nakon centrifugiranja na 1500 rpm tokom 20 min, na granici dva sloja uočavao se beli prsten intraepitelnih limfocita, koji je pažljivo sakupljan. Od ostatka Perkola ćelije su prane dva puta sa PBS, nakon čega su resuspendovane u RPMI-1640 5 % FCS, brojane i okarakterisane pomoću protočnog citofluorimetra.

3.6.6. Izolovanje tumor-infiltrirajućih limfocita

Nakon izolovanja tumora iz miševa, tumor je očišćen od okolnog tkiva i nakon potiskivanja kroz konusnu najlonsku mrežicu promera $70 \mu\text{m}$ u 5 ml PBS dobijena je ćelijska suspenzija, koja je dodatno propuštena kroz najlonsku mrežicu promera $40 \mu\text{m}$. Talog ćelija resuspendovan je u 3 ml RPMI 5 % FCS i pažljivo naliven na gradijent gustine, pri čemu su se formirala dva sloja. Nakon centrifugiranja (550 g, 20 min) uočavao se beličast prsten limfocita na prelazu između dva sloja, koji je pažljivo izvlačen pipetom. Nakon dva pranja sa 5 ml PBS, tumor-infiltrirajući limfociti resuspendovani su u 1 ml RPMI 5 % FCS i brojani. Ćelije su dalje pripremane za fenotipsku karakterizaciju na protočnom citofluorimetru.

3.7. Određivanje broja živih ćelija

Za detekciju živih ćelija i određivanje njihovog broja korišćen je 0,1 % rastvor boje tripan plavo u PBS. Kako boja ulazi u ćelije koje imaju narušenu ćelijsku membranu, žive ćelije ostaju nebojene i na osnovu toga se može dobiti broj živih ćelija, kao i ukupni broj ćelija. Ćelijska suspenzija mešana je sa bojom tripan plavo u odnosu 1:10 nakon čega su ćelije brojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Türker-Bürku. Broj živih ćelija po mililitru suspenzije računat je na sledeći način: broj živih ćelija / broj polja $\times 2,5 \times 10^6$. U zavisnosti od eksperimentalnog rada, uziman je broj ćelija potreban za datu metodu.

3.8. Određivanje broja CFU *L. Monocytogenes* u tkivima inficiranih miševa

Jetra i slezina odstranjene iz inficiranih miševa su homogenizovane u 2 ml sterilnog PBS protiskivanjem kroz sterilne konusne najlonske mrežice promera $70 \mu\text{m}$. Napravljena su dvostruka razblaženja i naneta na BHI agar u triplikatima. Nakon inkubacije tokom 24 h na temperaturi od 37°C , određivan je broj CFU po gramu tkiva.

3.9. *In vitro* diferencijacija ćelija

3.9.1. Diferencijacija dendritskih ćelija *in vitro*

Dendritske ćelije su dobijene od progenitorskih ćelija kostne srži C57BL/6 miša. Butna kost presečena na oba kraja ispirana je pod mlazom RPMI 10% FCS. Isprane ćelije kostne srži su centrifugirane na 500 g tokom 5 min, a eritrociti su odstranjeni pomoću pufera za lizu eritrocita, kao što je prethodno opisano. Talog ćelija je resuspendovan u medijumu za dendritske ćelije i ćelije su brojane. 1×10^6 ćelija/ml postavljeno je u ploču sa 24 bunara i dendritske ćelije su propagirane tokom 8 dana uz konstantno prisustvo 20 ng/ml GM-CSF. Svakog drugog dana menjana je polovina

medijuma (500 μ l medijuma je odlivano i dodavano je 500 μ l svežeg medijuma koji je sadržao GM-CSF). Nakon četiri dana od postavljanja ćelijske kulture, polovina ćelija prebacivana je u nove bunare, a odvađeni medijum nadoknađen je dodavanjem novog. Dendritske ćelije su osmog dana skidane iz ploče. 200 μ l enzima akutaze dodavano je u svaki bunarić i nakon 2 min na temperaturi od 37 °C reakcija je prekinuta dodavanjem medijuma za dendritske ćelije. Ćelije su prebacivane u epruvete, centrifugirane (500 g, 5 min) i brojane. 5×10^5 dendritskih ćelija po bunaru postavljano je u ploču sa 96 bunara u prisustvu ili odsustvu rastućih koncentracija VEPA (6 – 50 μ g/ml). Nakon 48 h sakupljeni su supernatanti, dok su ćelije analizirane pomoću protočnog citofluorimetra.

3.9.2. Prečišćavanje naivnih T limfocita magnetnom separacijom i *in vitro* diferencijacija ka Th1, Th17 i Treg subpopulacijama

Ćelije slezine dobijene su iz zdravog C57BL/6 miša na prethodno opisan način. 80×10^6 ćelija resuspendovano je u 800 μ l PBS 3 % FCS u tubama od 2 ml (Sarstedt). Dodato je biotinom obeleženo anti-CD25 antitelo (1:1000, eBioscience) i uzorci su inkubirani 20 min na temperaturi od 4 °C, uz povremeno mućkanje. Nakon dva ispiranja (centrifuga na 550 g, 3 min) sa 1 ml PBS i jednog sa 1 ml hladnog pufera za magnetne kuglice, ćelije su resuspendovane u 800 μ l hladnog pufera za magnetne kuglice. Dodavane su magnetne kuglice obeležene streptavidinom (1:20, eBioscience) i uzorci su inkubirani tokom 30 minuta na temperaturi od 4 °C uz povremeno mućkanje. Uzorci su potom izlagani delovanju magnetnog polja tri puta po 8 minuta (BD IMag™ Cell Separation Magnet). Kako su se ćelije vezane za magnetne kuglice (CD25⁺ ćelije) pod uticajem magnetnog polja lepile za zidove tuba, izvlačenjem ćelijske suspenzije u magnetnom polju dobijena je frakcija CD25⁻ ćelija, dok su CD25⁺ ćelije ostale zalepljene za zidove tuba. Nakon pranja sa 1 ml pufera za magnetne kuglice i jednom sa 1 ml u PBS, CD25⁻ ćelije su resuspendovane u 800 μ l PBS 3% FCS, dodato je anti-CD4 antitelo obeleženo biotinom (1:60, eBioscience) i uzorci su inkubirani 20 min na temperaturi od 4 °C uz povremeno mućkanje. Nakon pranja dva puta sa 1 ml PBS i jednom sa 1 ml hladnog pufera za magnetne kuglice, ćelije su resuspendovane u 800 μ l hladnog pufera za magnetne kuglice. Dodate su magnetne kuglice obeležene streptavidinom i uzorci su inkubirani 30 minuta na temperaturi od 4 °C uz povremeno mućkanje. Uzorci su izlagani delovanju magnetnog polja tokom 3×8 minuta. Ovog puta ćelijska suspenzija je odbacivana, a ćelije zalepljene za zidove tuba (CD4⁺ ćelije) resuspendovane su u puferu za magnetne kuglice. Nakon pranja sa 1 ml pufera za magnetne kuglice i jednom sa 1 ml PBS, CD4⁺CD25⁻ ćelije su resuspendovane u 1 ml PBS 3% FCS i potom su brojane.

Ovako prečišćeni naivni T limfociti resuspendovani su u medijumu za *in vitro* diferencijaciju T limfocita. Ploča sa 96 bunara U-dna (Sarstedt) najpre je obložena anti-CD3 antitelom (1 μ g/ml; eBioscience) rastvorenim u PBS, tokom 2 h na 37 °C. Potom je postavljeno 5×10^5 ćelija/bunaru i ćelije su stimulisane solubilnim anti-CD28 antitelom (1 μ g/ml; eBioscience).

Za diferencijaciju ka Th1 fenotipu ćelije su dodatno stimulisane pomoću IL-12 (20 ng/ml, R&D Systems) i anti-IL-4 antitelom (10 ng/ml; eBioscience). Za diferencijaciju ka Th17 fenotipu ćelije su stimulisane pomoću TGF- β (10 ng/ml) i IL- 6 (10 ng/ml; oba od R&D Systems), dok su za diferencijaciju ka regulatornim T limfocitima (Treg) kao stimulansi korišćeni TGF- β (2 ng/ml) i IL- 2 (10 ng/ml; R&D Systems). VEPA je dodat 24 h nakon postavljanja ćelijske kulture i 72 h kasnije prisustvo podtipova T limfocita analizirano je na protočnom citofluorimetru.

3.10. Testovi za određivanje vijabilnosti i funkcija ćelija imunskog sistema

3.10.1. Određivanje vijabilnosti ćelija MTT testom

MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se meri metabolička aktivnost ćelija i koja se zasniva na stvaranju formazana, jedinjenja ljubičaste boje, usled redukcije tetrazolijumove soli, MTT (3-(4,5-dimethyl-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid) pomoću mitohondrijskih oksidoreduktaza. Uzorci ćelijskih kultura prebacivani su u tube od 1,5 ml (Sarstedt) i centrifugirani (550 g, 5 min). Supernatanti su odlivani, a na talog ćelija je dodavano 200 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml) u medijumu za uzgajanje ćelija. Nakon pola sata do sat vremena inkubacije na 37 °C uzorci su centrifugirani (550 g, 5 min) a talog ćelija je resuspendovan u 200 µl dimetil sulfoksida. U ploču sa 96 bunara uzorci su razlivani u triplikatima, po 50 µl i apsorbancija je merena pomoću spektrofotometra (LKB 5060-006, LKB Instruments, Beč, Austrija) na 540 nm, dok je korekcija nečistoća rađena na 670 nm. Vijabilnost ćelija je izražena kao A_{540} .

3.10.2. Određivanje vijabilnosti ćelija kristal violet testom

Vijabilnost adherentnih ćelija može se odrediti i kristal violet (CV) testom. CV je bazna boja koja boji negativno naelektrisane proteine, polisaharide i nukleinske kiseline u ćeliji, tako da količina vezane boje oslikava broj ćelija u kulturi. Iz ploče sa 96 bunara u kojoj su gajene ćelije odlivani su supernatanti a u bunare je dodavano po 50 µl 4 % paraformaldehida da bi se ćelije fiksirale za dno. Nakon 10 minuta paraformaldehyd je odliven, a ploča je ostavljena na sobnoj temperaturi da se osuši. U bunare je sipan 0,1 % rastvor CV u PBS (50 µl/bunaru) i nakon 15 min na sobnoj temperaturi ploča je dobro isprana pod mlazom hladne vode. U osušene bunare sipano je po 50 µl 33 % rastvora sirćetne kiseline radi rastvaranja vezane boje, a intenzitet boje određen je merenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra (LKB 5060-006) na 540 nm, dok je korekcija nečistoća rađena na 670 nm.

3.10.3. Određivanje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura Griess reakcijom

Koncentracija nitrita u supernatantima ćelijskih kultura je indikator oslobađanja NO iz ćelija i može se odrediti Griess reakcijom, baziranim na reakciji diazotizacije. U ploči sa 96 bunara ravnog dna 50 µl supernatanta ćelijskih kultura pomešano je sa 50 µl Griess reagensa (0,1 % rastvor N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1 % rastvor sulfanilamida u 5 % H_3PO_4) i nakon 10 minuta inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi intenzitet boje detektovan je pomoću spektrofotometra (LKB 5060-006), merenjem apsorbancije na 540 nm i 670 nm. Koncentracija nitrita računata je na osnovu standardne krive dobijene određivanjem apsorbancija za poznate koncentracije $NaNO_2$.

3.10.4. Određivanje produkcije citokina ELISA metodom

Supernatanti ćelijskih kultura testirani su na produkciju citokina sendvič ELISA testom u mikrotitar pločama MaxiSorp sa 96 bunara (Nunc, Roskilde, Danska). Korišćeni su komercijalni parovi antitela navedeni u tabeli 1. U bunare je sipano po 50 µl rastvora vezujućeg antitela u PBS i inkubacija je trajala tokom noći na 4 °C ili na sobnoj temperaturi, u zavisnosti od preporuke proizvođača. U cilju uklanjanja nevezanog antitela, bunari su ispirani tri puta sa PBS 0,05 % Tween-20 (PBST; 200 µl/bunaru) a potom je blokiranje nespecifičnog vezivanja vršeno rastvorom PBS 10 % FCS ili PBS 1 % BSA (prema preporuci proizvođača, a u zavisnosti od korišćenog seta antitela) u

zapremeni od 100 μ l/bunaru tokom sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon tri pranja sa PBST u ploču su u duplikatu nalivani uzorci (50 μ l/bunaru), kao i set razblaženja rekombinantnog citokina čija se koncentracija određuje, u cilju formiranja standardne krive. Inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi i nakon tri pranja sa PBST uzorci su inkubirani sa adekvatnim detektujućim antitelom, za koje je vezan biotin (50 μ l/bunaru) tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Ploča je prana tri puta sa PBST i dodat je rastvor avidin-HRP (50 μ l/bunaru). Detektujuće antitelo i avidin-HRP rastvarani su u rastvoru za blokiranje. Posle 30 min inkubacije i tri pranja sa PBST u ploču je nalivan TMB, supstrat za peroksidazu (50 μ l/bunaru). Po razvijanju boje reakcija je prekidana sa 50 μ l 1M HCl a apsorbancija je merena na spektrofotometru (LKB 5060-006) na 450 nm, sa korekcijom nečistoća na 670 nm. Koncentracija citokina u uzorku, određivana na osnovu standardne krive formirane na osnovu poznate koncentracije ispitivanog citokina u standardima, izražena je u ng/ml.

Tabela 1. Parovi antitela korišćeni ELISA metodom.

Citokin	Koncentracija vezujućeg antitela	Koncentracija detektujućeg antitela	Proizvođač
TNF	1:1000	1:1000	eBioscience
IL-1 β	1:250	1:250	eBioscience
IL-17A	1:1000	1:1000	eBioscience
IFN- γ	1:750	1:750	eBioscience
IL-12	1:250	1:250	eBioscience
TGF- β	1:120	1:60	R&D Systems
IL-6	1:500	1:500	Abcam

3.10.5. Oslobađanje laktat dehidrogenaze (LDH) – test citotoksičnosti

LDH test je test ćelijske citotoksičnosti. Nakon liziranja ćelija, LDH se oslobađa iz oštećenih ćelija i može se detektovati u supernatantu ćelijske kulture. U ploču sa 96 bunara ravnog dna sađeno je 4×10^3 B16 ćelija po bunaru. Ćelije slezine, dobijene na već opisan način, poreklom iz životinja kojima je indukovan tumor (netretiranih i pretretiranih sa VEPA) dodavane su bunarima sa B16 ćelijama u odnosu 20:1 ili 10:1. Nakon inkubacije u trajanju od 48 h, u supernatantima je rađen LDH test, prema instrukcijama proizvođača. Kao pozitivna kontrola uziman je supernatant B16 ćelija tretiranih sa Triton X-100, dok su kao negativna kontrola uzimani supernatanti netretiranih B16 ćelija. Absorbancija je merena na spektrofotometru (LKB 5060-006) na 492 nm, sa korekcijom nečistoća na 592 nm a procenat nekrotičnih ćelija određen je prema formuli:

$$(A_{B16+splenociti} - A_{B16}) / (A_{B16+Triton X-100} - A_{B16}) \times 100$$

Na ovaj način dobijen je procenat nekrotičnih ćelija, koji je predstavljen kao mera citotoksičnosti efektorskih ćelija.

3.11. Histološka analiza

3.11.1. Priprema histoloških preparata u parafinu

U cilju ispitivanja uticaja VEPA na imunski sistem zdravih miševa, iz miševa tretiranih VEPA i kontrolnih miševa tretiranih vodom uzimani su uzorci tankog creva dužine oko 1 cm i neposredno po vađenju iz životinja stavljeni u rastvor 10 % formalina u kome su ostavljani 48 h, nakon čega su prevođeni u parafin. Najpre je rađena dehidracija tkiva, tako što je tkivo izloženo rastućim koncentracijama etanola, počevši od 30 %, 50 % i 70 % etanola (u svakom 2×30 min). Potom je tkivo prebacivano u 96 % i apsolutni etanol, u kojima je inkubirano 2×1 h. Parafinizacija tkiva je započeta prebacivanjem tkiva u ksilol (2×3 min), nakon čega je inkubirano u prethodno otopljenom parafinu 1 h na 56 °C. U drugom parafinu uzorci su ostavljani preko noći i konačno kalupljeni u trećem parafinu, u kome su čuvani na sobnoj temperaturi do dalje obrade. Tkiva su sečena na Leica RM2265 mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Veclar, Nemačka), a isecci debljine 5 μ m stavljeni su na predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, Braunšvajg, Nemačka).

3.11.2. Bojenje tkivnih preseka hematoksilinom i eozinom

Neposredno pred bojenje dobijenih tkivnih preseka vršena je deparafinizacija potapanjem predmetnih stakala u ksilol 2×3 min, a potom i rehidracija potapanjem u rastvore etanola, počevši od apsolutnog, 96 % i na kraju 70 % (svaki po 5 min), nakon čega su uzorci potapani u destilovanu vodu. Bojenje ćelijskih jedara vršeno je potapanjem tkiva u Majerov hematoksilin tokom 8 minuta. Nakon ispiranja destilovanom vodom, bojenje eozinom trajalo je 3 minuta, u cilju bojenja citoplazme ćelija. Nakon ispiranja destilovanom vodom, predmetna stakla pokrivana su pokrovnim staklima uz korišćenje DPX. Preseci su posmatrani i fotografisani digitalnom kamerom Leica DFC295 (Leica, Heerbrugg, Švajcarska) povezanom sa svetlosnim mikroskopom Leica DM4000 B LED (Leica, Veclar, Nemačka). Svi elementi tankog creva mereni su pomoću softvera Fiji, pri uvećanju $\times 200$.

3.12. Analiza ćelija metodom protočne citofluorimetrije

Metoda protočne citofluorimetrije omogućava brzo i precizno određivanje fluorescentnih signala poreklom od individualnih ćelija. Ova metoda zasniva se na korišćenju fluorescentnih boja kojima se obeležavaju antitela specifična za različite površinske ili unutarćelijske molekule, ćelijske markere. Kako se fluorofora eksituje svetlošću određene talasne dužine a emisija fluorofore se čita na emisionoj talasnoj dužini, moguća je primena različitih fluorofora u istom uzorku. Intenzitet fluorescencije obeleženih uzoraka korišćenih u izradi ove doktorske disertacije detektovan je pomoću protočnog citofluorimetra Partec CyFlow Space i analiziran FlowMax softverom (Partec, Gerlic, Nemačka) ili BD FACSCalibur i BD FACSAria III protočnim citofluorimetrima (BD Biosciences) i analiziran FlowMax ili FlowJo (Treestar, Ešlend, Oregon, SAD) softverom. Fluorescentne boje vezane za anti-mišja antitela korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji date su u tabeli 2.

Tabela 2. Fluorescentne boje sa odgovarajućim ekscitacionim i emisionim maksimumima korišćene za potrebe protočne citofluorimetrije. FITC – fluorescein izotiocijanat, PE – fikoeritrin, Cy – cijanin, APC – alofikocijanin, DHR – dihidrorodamin 123, PI – propidijum jodid

Fluorescentna boja	Ekscitacioni maksimum (nm)	Emisioni maksimum (nm)
FITC	495	520
Alexa Fluor 488™	500	520
PE	565	575
PE-Cy5	565	670
PE-Cy5.5	565	670
PerCP-Cy5.5	482	690
PE-Cy7	565	770
APC	650	660
DHR	500	536
PI	536	617

3.12.1. Imunofluorescentno bojenje površinskih molekula

Nakon izolacije, 1×10^6 vijabilnih ćelija prebacivano je u plastične epruvete za protočnu citofluorimetriju. Antitela su rastvarana u PBS 1 % BSA (100 μ l po uzorku, u koncentraciji prema preporuci proizvođača) i uzorci su inkubirani tokom 45 min u mraku, na temperaturi od 4 °C. Nakon ispiranja sa 1 ml PBS 1 % BSA (centrifugiranje na 700 g, 3 min) i ispiranja sa PBS, ćelije su resuspendovane u 1 ml PBS i detektovane na protočnom citofluorimetru. Dodatno, korišćena je negativna kontrola, u kojoj su ćelije inkubirane bez dodatog antitela. Antitela su rastvarana prema preporuci proizvođača, a u tabeli 3 su navedena korišćena anti-mišja antitela.

Tabela 3. Fluorescentno obeležena antitela korišćena za potrebe protočne citofluorimetrije.

Anti-mišje antitelo	Fluorescentni konjugat	Izotipska kontrola	Proizvođač
CD4	FITC PerCP-Cy5.5	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
CD8	PE PerCP-Cy5.5	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
CD3	PE	IgG iz hrčka	eBioscience
CD25	PE PerCP-Cy5.5	IgG1 λ lanac iz pacova	eBioscience
B220	FITC	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
CD11c	FITC	IgG iz hrčka	eBioscience

	PE PE-Cy5.5		
CD11b	FITC	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
F4/80	FITC	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
Ly-6G/Ly-6C	PE-Cy5.5	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
CD40	PE PE-Cy5	IgM iz hrčka	eBioscience
CD206	PE	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
CD86	PE-Cy5.5	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
MHCII	FITC	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
NK1.1	FITC PE-Cy7	IgG2a κ lanac iz miša	eBioscience
CD49b	FITC	IgM κ lanac iz pacova	eBioscience
KLRG-1	PE-eFluor® 610	IgG iz sirijskog hrčka	eBioscience
PD-1	FITC	IgG iz hrčka	eBioscience
CTLA-4	PE	IgG iz hrčka	eBioscience
Ly49c	FITC	IgG2a κ lanac iz miša	eBioscience
CD27	PE	IgG iz hrčka	eBioscience
CCR5	AlexaFluor® 488	IgG iz hrčka	BioLegend
CCR9	FITC	IgG2a lanac iz miša	eBioscience

3.12.2. Imunofluorescentno bojenje unutarćelijskih molekula

Za unutarćelijsko bojenje takođe je korišćeno 1×10^6 vijabilnih ćelija. Ćelije su najpre stimulisane koktelom za stimulaciju ćelija koji sadrži i inhibitore transportnih proteina (Cell Stimulation Cocktail; 1:500 u RPMI-1640 5% FCS) tokom 4 h na 37 °C. Nakon centrifugiranja u PBS 1 % BSA (700 g, 3 min) ćelije su bojene antitelima specifičnim za površinske molekule, kao što je prethodno opisano. Nakon ispiranja sa 1 ml PBS 1% BSA i ispiranja sa 1 ml PBS, ćelije su resuspendovane u 400 µl 4 % paraformaldehidu i inkubirane tokom 15 min na sobnoj temperaturi u mraku, radi fiksacije. Nakon centrifugiranja (900 g, 3 min) i ispiranja sa 1 ml PBS, uzorci su resuspendovani u 1 ml PBS i ostavljeni preko noći na 4 °C, u mraku. Sutradan, nakon centrifugiranja, uzorci su resuspendovani u 400 µl pufera za permeabilizaciju ćelija (Permeabilization buffer, PB) i inkubirani tokom 15 minuta na 4 °C u mraku. Nakon centrifugiranja sledilo je unutarćelijsko bojenje u 100 µl PB po uzorku (45 min, 4 °C, u mraku). Ćelije su nakon toga ispirane sa 1 ml PB, potom sa 1 ml PBS i finalno resuspendovane u 1 ml PBS radi analize na protočnom citofluorimetru. U tabeli 4 navedena su anti-mišja antitela, koja su korišćena u koncentraciji prema preporuci proizvođača.

Tabela 4. Fluorescentno obeležena antitela korišćena za potrebe protočne citofluorimetrije.

Anti-mišje antitelo	Fluorescentni konjugat	Izotipska kontrola	Proizvođač
IFN- γ	FITC PE PerCP-Cy5.5	IgG1 κ lanac iz pacova	eBioscience
Granzim B	FITC	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
TNF	PE	IgG1 κ lanac iz pacova	eBioscience
IL-17	PerCP-Cy5.5 PE	IgG2a κ lanac iz pacova IgG1 κ lanac iz pacova	eBioscience BD Biosciences

Za detekciju transkripcionih faktora nakon površinskog bojenja 1×10^6 vijabilnih ćelija, ćelije su resuspendovane u 100 μ l pufera za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija (Fix/Perm buffer) i ostavljene tokom noći na 4 °C u mraku. Sutradan, u uzorke je dodato 1 ml PB i nakon centrifugiranja (800 g, 3 min), bojenje fluorescentno obeleženim antitelima specifičnim za transkripcione faktore vršeno je u 100 μ l PB po uzorku (45 min, 4 °C, u mraku). Nakon ispiranja sa 1 ml PB, potom sa 1 ml PBS, ćelije su finalno resuspendovane u 1 ml PBS radi analize na protočnom citofluorimetru, a korišćena antitela su navedena u tabeli 5.

Tabela 5. Fluorescentno obeležena antitela korišćena za potrebe protočne citofluorimetrije.

Anti-mišje antitelo	Fluorescentni konjugat	Izotipska kontrola	Proizvođač
FoxP3	PE APC	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
Perforin	PE	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience

3.12.3. Detekcija fagocitoze

Detekcija fagocitoze rađena je u *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima. *In vitro* su ispitivane ćelije peritonealnog ispirka, koje su inkubirane tokom 24 h u prisustvu ili odsustvu stimulatora LPS (100 ng/ml) i IFN- γ (10 ng/ml) i u prisustvu ili odsustvu VEPA (25 μ g/ml). Ćelije su najpre postavljene u ploču sa 24 bunara u koncentraciji 1×10^5 ćelija/bunaru i nakon 1 h inkubacije na 37 °C neadherentne ćelije su eliminisane pranjem dva puta sa 1 ml PBS. Potom su ćelije stimulirane i tretirane VEPA tokom 24 h. Lateks kuglice (amin-modifikovane polistiren kuglice veličine oko 1 μ m) obeležene fikoeritrinom preopsonizovane su u PBS 50 % FCS. Nakon odlivanja supernatanta, ćelije iz kulture su inkubirane sa 500 μ l rastvora kuglica (10 kuglica po ćeliji) tokom 1 h na 37 °C. Rastvor je odlivan, ćelije su ispirane dva puta sa po 1 ml PBS i, u cilju gašenja fluorescence koja potiče od kuglica vezanih za samu površinu ćelija, u bunare je sipano po 300 μ l duplo razblaženog radnog rastvora tripan plavog tokom 2 min. Ovaj rastvor je potom odlivan, bunari su prani dva puta sa po 1 ml PBS, ćelije su skidane sa podloge, centrifugirane (550 g, 3 min) i finalno resuspendovane u 1 ml PBS radi detekcije fagocitoze pomoću protočnog citofluorimetra. Detektovan je procenat ćelija koje su

fagocitovale, a kao mera fagocitne aktivnosti uziman je prosečni intenzitet fluorescence (engl. Mean Fluorescence Intensity, MFI).

Ex vivo, ćelije slezine i Pejerovih ploča zasejavane su u ploču sa 24 bunara u koncentraciji 1×10^5 ćelija/bunaru. Nakon 1 h inkubacije na 37 °C dodato je 500 µl rastvora preopsonizovanih kuglica (10 kuglica po ćeliji). Dalji protokol bio je isti kao u *in vitro* sistemu.

3.12.4. Detekcija ćelijske smrti

Uticaj VEPA na apozozu B16 ćelija melanoma određivan je pomoću protočnog citofluorimetra korišćenjem fluorescentno obeleženog aneksina V i PI. Aneksin V je protein koji se vezuje za fosfatidil serin, koji je kod ćelija koje ulaze u proces apoptoze eksprimiran na spoljašnjoj membrani, dok je PI fluorescentna boja koja ulazi samo u ćelije koje imaju narušenu propustljivost ćelijske membrane. B16 ćelije melanoma zasejavane su u ploču sa 6 bunara u koncentraciji $2,5 \times 10^5$ ćelija/bunaru. Nakon 24 h inkubacije na 37 °C supernatanti su odlivani a VEPA je dodat u koncentracijama od 200 i 400 µl/bunaru, dok je u pojedinim bunarima izostao tretman, radi negativne kontrole. Tretman je trajao 24 h, nakon čega su uzorci prebacivani u plastične epruvete za protočnu citofluorimetriju i centrifugirani (750 g, 3 min). Aneksin V-FITC (1 mg/ml) i PI (1 mg/ml) rastvarani su u 100 µl ABB. Bojenje je trajalo 15 min na sobnoj temperaturi (u mraku), reakcija je prekinuta dodavanjem 900 µl ABB/uzorku, nakon čega su ćelije analizirane na protočnom citofluorimetru. Rano apoptotične ćelije detektovane su kao Aneksin V⁺, dok su nekrotične ćelije detektovane kao PI⁺ ćelije.

3.12.6. Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika

DHR (dihidrorodamin 123) je nepolarno jedinjenje koje lako ulazi u ćelije, gde nakon reakcije sa ROS postaje fluorescentno. Neposredno nakon izolovanja, $0,5 \times 10^6$ ćelija slezine i Pejerovih ploča je inkubirano sa 5 µM DHR rastvorenim u 100 µl RPMI-1640 5 % FCS tokom 20 min na 37 °C. Nakon centrifugiranja u 1 ml PBS (550 g, 3 min), ćelije su finalno resuspendovane u 1 ml PBS i analizirane pomoću protočnog citofluorimetra. Detektovan je procenat ćelija koje proizvode ROS, a kao mera unutarćelijskog oslobađanja ROS uziman je MFI.

3.13. Imunoblot

3.13.1. Izolacija proteina

U 5×10^6 ćelija dobijenih *ex vivo* naliveno je 400 µl TriReagent i uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe. Radi izolacije proteina, uzorci su odmrznuti i u svaki je naliveno 80 µl hladnog hloroforma. Nakon centrifugiranja na 12.000 g tokom 20 min na 4 °C, iz donjeg sloja uzimana je frakcija proteina na koju je nalivan hladan aceton u odnosu 3:1, radi precipitacije proteina. Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi tokom 10 min i uzorci su centrifugirani (12.000 g, 10 min, 4 °C). Talog, u kome se nalaze proteini je resuspendovan u 1 ml rastvora 96 % etanola sa 2,5 % glicerola i 0,3 M guanidin hidrohlorida i uzorci su sonifikovani dva puta po 10 s. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, sledila su tri ispiranja u 1 ml rastvora 95% etanola sa 2,5 % glicerola i 0,3 M guanidin hidrohlorida (centrifugiranje na 8.000 g, 5 min, 4 °C) i talog je resuspendovan u 1 ml rastvora za finalno ispiranje, 95% etanol sa 2,5% glicerola. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi i centrifugiranja (8.000 g, 5 min, 4 °C) talog je sušen i resuspendovan u 100 µl pufera za liziranje ćelija

u koji je prethodno dodato 5 μ l koktela za inhibiciju proteaza. Uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe.

3.13.2. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu, transfer proteina na membranu i vizuelizacija proteinskih traka

Radi detekcije proteina, uzorci su mešani sa puferom za nalivanje na gel za elektroforezu u odnosu 3:1, kuvani tokom 5 min na 95 °C i nanošeni na 12 % SDS-poliakrilamidni gel, odnosno u bunariće u gelu koji su prethodno napravljeni utiskivanjem kalupa. Uzorci su nalivani u zapremini od 20 μ l/bunaru, a nanet je i proteinski marker poznatih molekulskih masa (PageRuler). U sistem za elektroforezu (Biometra) nalivan je 1 \times pufer za elektroforezu (razblaženje 5 \times pufera za elektroforezu u dH₂O) i proteini su razdvajani pri jačini struje od 25 mA. Nakon elektroforeze sledio je transfer proteina sa gela na polivinildifluoridnu membranu korišćenjem polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka), pri jačini struje od 5 mA/cm². Nakon transfera na membranu vršeno je blokiranje nespecifičnog vezivanja u rastvoru PBSTw 5% BSA tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Membrana je potom tokom noći inkubirana u rastvoru primarnog antitela rastvorenom u PBSTw 1 % BSA na 4 °C. Sledećeg dana, nakon pranja sa PBSTw 5 \times 5 min, rastvor sekundarnog antitela konjugovanog sa HRP u PBSTw 1 % BSA je naliven preko membrane i inkubiran tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Membrana je ispirana sa PBSTw 5 \times 5 min i vezana antitela su detektovana hemiluminiscencijom, korišćenjem ECL reagensa. Signal je detektovan na rendgenskom filmu (Kodak, Ročester, Njujork, SAD), film je skeniran i količina proteina od interesa u uzorcima merena je pomoću programa Fiji, verzije ImageJ softvera, i izražena u odnosu na nefosforilisanu formu proteina ili β -aktin.

Korišćena su sledeća antitela:

Tabela 6. Antitela korišćena za potrebe imunoblot metode.

Primarno anti-mišje antitelo	Poreklo	Koncentracija	Proizvođač	Sekundarno antitelo	Koncentracija	Proizvođač
fosfo- I κ B	Kunić	1:1000	Sigma-Aldrich	specifično za IgG kunića	1:5000	Invitrogen
I κ B	Kunić	1:1000	Sigma-Aldrich	specifično za IgG kunića	1:5000	Invitrogen
Notch1	Kunić	1:300	Sigma-Aldrich	specifično za IgG kunića	1:5000	Invitrogen
β -aktin	Miš	1:1000	Sigma-Aldrich	specifično za IgG miša	1:5000	Invitrogen

3.14. Metoda reakcije lančanog umnožavanja

3.14.1. Izolacija celokupne RNK

U 5×10^6 ćelija dobijenih *ex vivo* naliveno je 400 μ l TriReagent i uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe. Radi izolacije RNK, uzorci su odmrznuti i u svaki je naliveno 80 μ l hladnog hloroforma. Nakon centrifugiranja na 12.000 g tokom 20 min na 4 °C, iz uzoraka je uzimano po 200 μ l vodene faze (RNK frakcija) na koju je nalivano 250 μ l hladnog izopropanola. Uzorci su inkubirani na temperaturi od -20 °C tokom 30 min i potom centrifugirani (12.000 g, 20 min, 4 °C). Supernatanti su odlivani i uzorci su ispirani tri puta sa po 1 ml 70 % etanola (centrifugiranje na 12.000 g, 5 min, 4 °C). Talozi su potom sušeni na sobnoj temperaturi i resuspendovani u 20 μ l vode bez nukleaza (engl. RNase Free Water). Koncentracija RNK u uzorcima merena je spektrofotometrijski (GeneQuant Pro, Ameršam, Bakingemašajr, Velika Britanija), na osnovu čega je određivana količina (μ g) RNK u uzorcima.

3.14.2. Reakcija reverzne transkripcije

Nakon izolovanja RNK, sledila je sinteza komplementarnog DNK lanca pomoću enzima reverzne transkriptaze. Za reakciju reverzne transkripcije (RT) uziman je 1 μ g RNK/uzorku, u zapremini od 11,5 μ l i dodavan je po 1 μ l nasumičnih heksamernih prajmera. Nakon 5 min inkubacije na 70 °C u cilju vezivanja prajmera za RNK, reakcija je prekinuta prebacivanjem uzoraka na led. U uzorke je dodavano po 7,5 μ l rastvora koji je sadržao po 4 μ l pufera za reverznu transkripciju, po 2 μ l pomešanih dezoksiribonukleotid-trifosfata (10 mM), po 0,5 μ l inhibitora RNaze (Ribolock) i po 1 μ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije, tako da je finalna zapremina svakog uzorka iznosila 20 μ l. Uzorci su inkubirani na 25 °C tokom 15 min, a nakon toga na 42 °C tokom 1 h. Reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70 °C tokom 10 min i 95 °C tokom 3 min, radi inaktivacije enzima i razdvajanja sintetisanog lanca DNK. Uzorci su do dalje upotrebe čuvani na temperaturi od -20 °C.

3.14.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR)

Za analizu relativne promene transkripcije iRNK gena od interesa korišćena je reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). U ploču sa 96 bunara adaptiranu za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical; Applied Biosystems) najpre je sipano po 8 μ l rastvora koji je sadržao po 5 μ l reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix, koja u sebi sadrži fluorescentnu boju SYBR Green, enzim DNK polimerazu (AmpliTaq Gold) i dezoksiribonukleotid-trifosfate, po 1 μ l specifičnih prajmera za gen od interesa ili referentni gen, za koji je uziman β -aktin (finalne koncentracije 500 nM) i po 2 μ l vode bez nukleaza. U bunariće je potom nalivano po 2 μ l odgovarajućeg uzorka komplementarnog DNK lanca da bi finalna zapremina svakog bunarića iznosila 10 μ l. Uzorci su nalivani u duplikatima. Ploča je pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), centrifugirana tokom 2 min na 500 g i prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000; Applied Biosystems). Amplifikacija je vršena pod sledećim uslovima: 95 °C tokom 10 min, a potom 40 ciklusa na 95 °C tokom 15 s i na 60 °C tokom 1 min. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je softverski program 7000 System. Nivo ekspresije ispitivanog gena računat je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanu u istom uzorku prema formuli: 2^{-dCt} , gde dCt predstavlja razliku između Ct vrednosti gena od interesa i referentnog gena. U

tabeli 7 nabrojane su sekvence prajmera korišćene u RT-PCR reakciji (dobavljene od Integrated DNA Technologies, Koralvil, SAD).

Tabela 7. Parovi prajmera korišćeni za potrebe RT-PCR metode.

Gen	Parovi prajmera	Pristupni broj u bazi podataka
<i>iNOS</i>	F 5'-CTG CAG CAC TTG GAT CAG GA-3' R 5'-GCC AGA AAC TTC GGA AGG GA-3'	NM_001313922.1
<i>TNF</i>	F 5'-CCA CGT CGT AGC AAA CCA C-3' R 5'-TGG GTG AGG AGC ACG TAG T-3'	NM_013693.3
<i>IL-1β</i>	F 5'-GCT GAA AGC TCT CCA CCT CAA-3' R 5'-TGT CGT TGC TTG GTT CTC CTT G-3'	NM_008361.4
<i>IL-6</i>	F 5'-TTG CCT TCT TGG GAC TGA TGC T-3' R 5'-GTA TCT CTC TGA AGG ACT CTG G-3'	NM_031168.2
<i>β-aktin</i>	F 5'-GAC CTG ACA GAC TAC C-3' R 5'-GGC ATA GAG GTC TTT ACG G-3'	NM_007393.2

3.15. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD) dobijene u više nezavisnih eksperimenata. Analiza statističke značajnosti podataka utvrđivana je Studentovim t-testom, za određivanje značajnosti između eksperimentalnih grupa. Za analizu rezultata koji nemaju normalnu distribuciju korišćen je Mann-Whitney neparametarski test. Vrednost parametra p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom razlikom između eksperimentalnih grupa. Za statističku analizu korišćen je GraphPad Prism 8 softverski program (GraphPad Software, Inc., La Hoja, Kalifornija, SAD).

4. Rezultati

4.1. Određivanje sadržaja fenola u VEPA

Na hemijski sastav biljnih plodova mogu uticati različiti faktori, kao što su tip i sastav zemljišta ili klima podneblja na kome se biljka nalazi. Zbog toga je važno pre ispitivanja dobijenog ekstrakta u naučnom istraživanju odrediti njegov hemijski sastav. Takođe, sadržaj aktivnih sastojaka može značajno da varira i u ekstraktima dobijenim od plodova u zavisnosti od vrste i uslova ekstrakcije.

Sastav fenolnih jedinjenja VEPA korišćenog u izradi ove doktorske disertacije određen je metodom HPLC i rezultati su prikazani u tabeli 8. Među antocijanima, dominantno jedinjenje je bio cijanidin-3-galaktozid dok je kvercetin-3-galaktozid bio dominantno flavonoidno jedinjenje. Tečnom hromatografijom je detektovana i značajna količina hlorogene kiseline. Vizuelnom inspekcijom rastvora ekstrakta nakon 24 h inkubacije na 37 °C, utvrđeno je odsustvo živih bakterija, a LAL testom je dokazano odsustvo endotoksina.

S obzirom na pokazani sastav fenolnih jedinjenja, kao i odsustvo kontaminacije VEPA živim bakterijama ili endotoksinom, utvrđeno je da je VEPA pogodan za ispitivanje ciljeva ove doktorske disertacije.

Tabela 8. Sastav fenolnih jedinjenja VEPA.

Grupa fenolnih jedinjenja		Koncentracija
Antocijani	cijanidin-3-galaktozid	0,34 mg/g
	cijanidin-3-arabinozid	0,16 mg/g
	cijanidin-3-glukozid	0,06 mg/g
Flavonoidi	kvercetin-3-galaktozid	0,31 mg/g
	kvercetin-3-rutinozid	0,28 mg/g
	kvercetin-3-glukozid	0,15 mg/g
Fenolne kiseline	hlorogena kiselina	3,53 mg/g
Proantocijanidini	ukupni sadržaj	36,5 CE/g

4.2. Efekat primene VEPA na ćelije imunskog sistema C57BL/6 miša *in vitro*

4.2.1. Uticaj primene VEPA na ćelije urođene imunosti *in vitro*

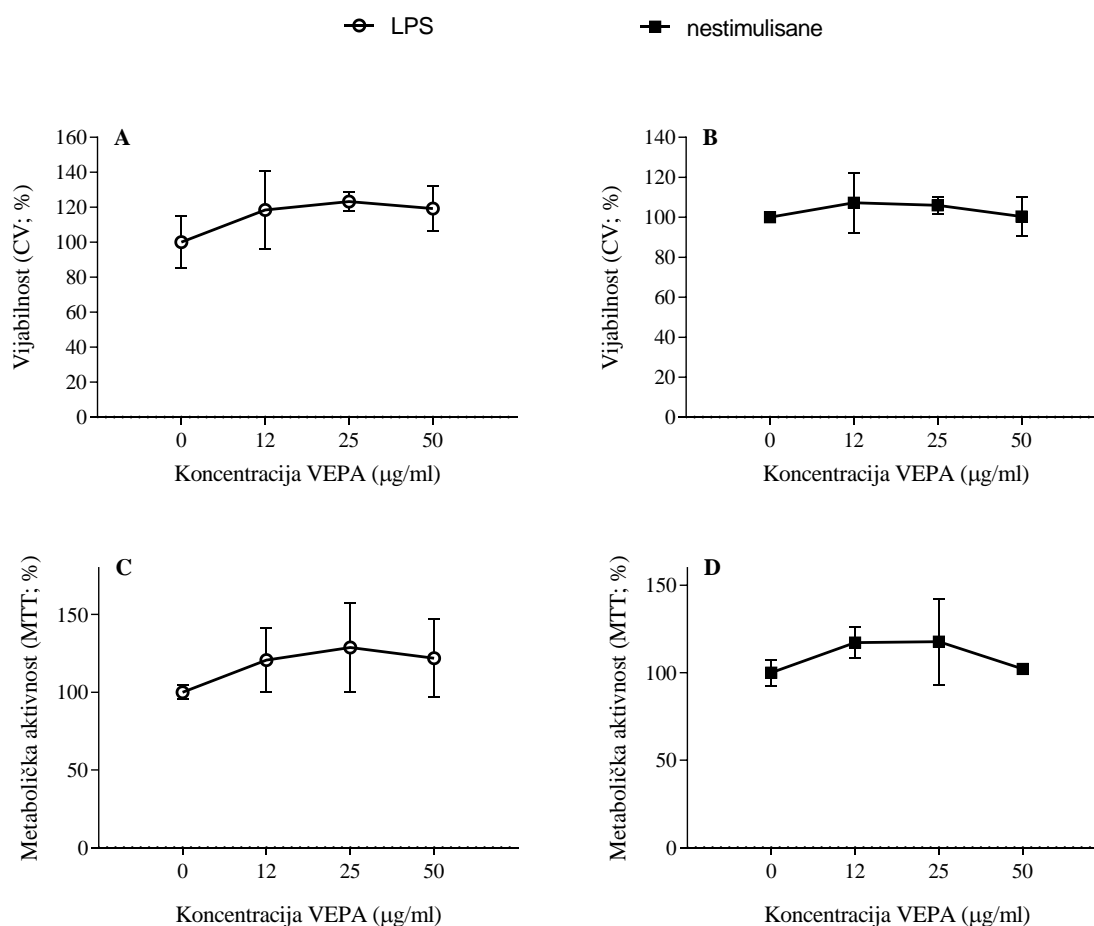
Ćelije urođene imunosti predstavljaju prvu liniju odbrane od patogena, a osim toga neophodne su i za eliminaciju transformisanih ćelija i efikasan antitumorski imunski odgovor. Ove ćelije sposobne su da direktno ubiju mikroorganizam ili transformisanu ćeliju, da produkuju faktore kojima regrutuju druge ćelije imunskog sistema na mesto inflamacije, kao i da učestvuju u aktivaciji naivnih T limfocita

i otpočinjanju stečenog imunskog odgovora. Uticaj VEPA ispitan je stoga najpre na ćelije urođene imunosti, dendritske ćelije i makrofage.

4.2.1.1. Uticaj VEPA na dendritske ćelije

Dendritske ćelije, kao profesionalne APC, nakon preuzimanja i obrade antigena migriraju u drenirajuće limfne čvorove gde sreću naivne T limfocite. Prikazivanjem antigena u sklopu MHC molekula uz prisustvo kostimulatornih molekula dolazi do aktivacije naivnih T limfocita i ekspanzije ovih ćelija specifičnih za dati antigen. Međutim, osim prikazivanja antigena, aktivirane dendritske ćelije se odlikuju i produkcijom proinflamacijskih medijatora kojima mogu uticati na usmeravanje toka imunskog odgovora.

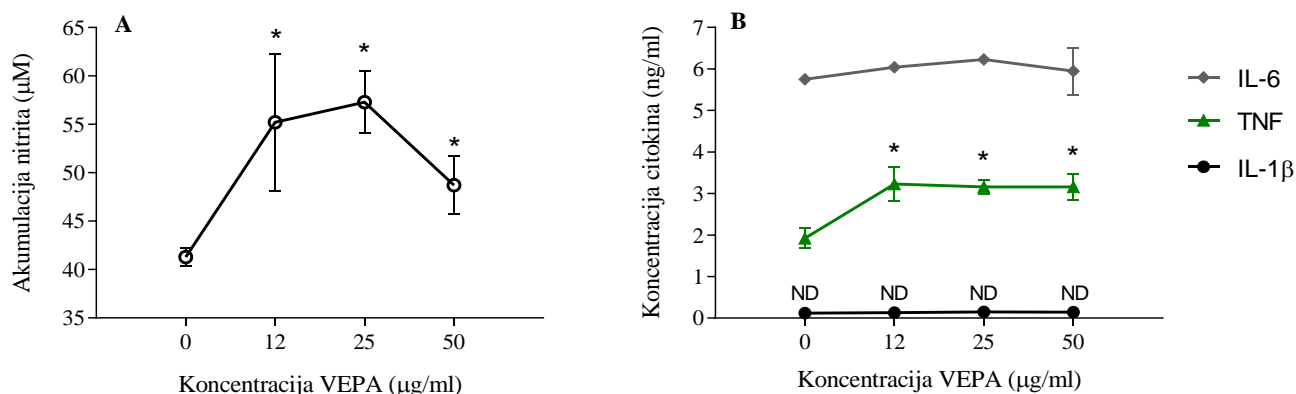
U cilju određivanja dejstva primene VEPA na dendritske ćelije najpre je određena vijabilnost ovih ćelija nakon primene VEPA tokom 48 h. I CV (Grafik 1A,B) i MTT (Grafik 1C,D) testovi pokazali su da VEPA ne utiče na vijabilnost dendritskih ćelija pri svim ispitanim koncentracijama VEPA, bilo da su ćelije stimulisane pomoću LPS-a u cilju aktivacije (Grafik 1A,C) ili nestimulisane (Grafik 1B,D).



Grafik 1. Uticaj VEPA na vijabilnost dendritskih ćelija. Dendritske ćelije, dobijene iz butne kosti C57BL/6 miša, stimulirane sa 100 ng/ml LPS ili nestimulirane, gajene su u prisustvu rastućih koncentracija VEPA (12, 25 i 50 µg/ml) ili u odsustvu VEPA u trajanju od 48 h. Vijabilnost ćelija određena je CV (A,B) i MTT (C,D) testom i izražena je kao $SV \pm SD$.

Dodatno, u supernatantima ćelijske kulture merena je akumulacija nitrita Griess reakcijom, dok je produkcija proinflamacijskih citokina IL-6, TNF i IL-1 β merena ELISA testom.

Rezultati su pokazali da VEPA povećava akumulaciju nitrita u svim ispitanim koncentracijama (Grafik 2A), kao i produkciju proinflamacijskog citokina TNF (Grafik 2B) iz dendritskih ćelija. Produkcija IL-6 ostala je nepromenjena nakon primene VEPA, dok je produkcija IL-1 β bila nedetektabilna (Grafik 2B).



Grafik 2. Uticaj primene VEPA na akumulaciju nitrita i proinflamacijskih citokina u supernatantima ćelijske kulture dendritskih ćelija. Dendritske ćelije dobijene iz butne kosti C57BL/6 miša, stimulisane sa LPS (100 ng/ml), gajene su u prisustvu rastućih koncentracija VEPA (12, 25 i 50 µg/ml) ili u odsustvu VEPA u trajanju od 48 h. Koncentracija nitrita u supernatantima određena je Griess testom (A), dok je koncentracija IL-6, TNF i IL-1 β određena ELISA metodom (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum). ND – nedetektabilna koncentracija.

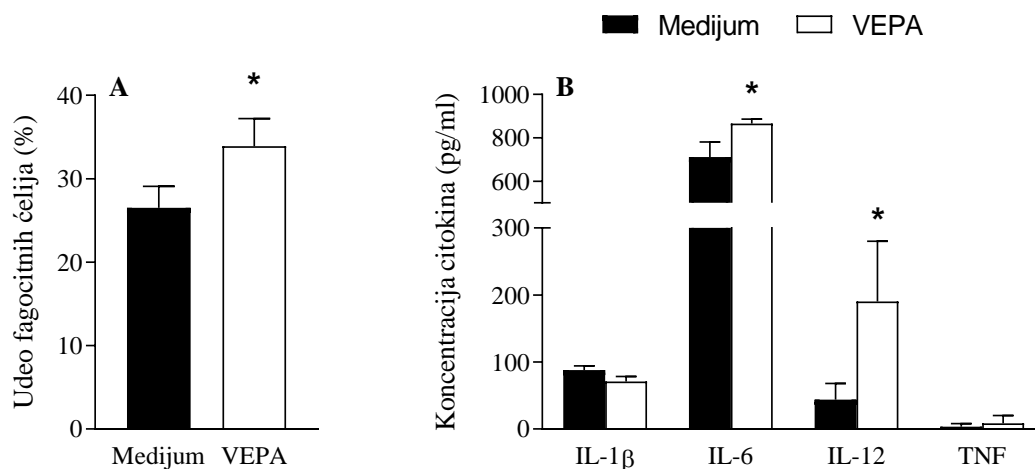
Ovakvi rezultati ukazuju na to da VEPA deluje na dendritske ćelije da ispolje svoja proinflamacijska svojstva povećanjem produkcije NO i proinflamacijskog TNF, pritom ne narušavajući preživljavanje ovih ćelija.

4.2.1.2. Uticaj VEPA na makrofage

Makrofagi su fagocitne ćelije urođene imunosti koje nakon preuzimanja patogena proizvode faktore kojima dovode do njegovog ubijanja i proizvode proinflamacijske citokine kojima utiču na aktivaciju drugih ćelija urođene i stečene imunosti. Iz peritonealnog ispirka miša može se na jednostavan način dobiti mnoštvo naivnih makrofaga i stoga su ove ćelije često korišćene u *in vitro* istraživanjima.

S obzirom da primena VEPA nije uticala na vijabilnost makrofaga (podaci nisu grafički prikazani), u cilju određivanja dejstva primene VEPA na makrofage, ispitana je sposobnost ovih ćelija da vrše fagocitozu. Na osnovu prethodnih rezultata određena je doza VEPA od 25 µg/ml i ona je primenjivana u narednim eksperimentima. Nakon inkubacije u trajanju od 48 h fagocitne ćelije su detektovane metodom protočne citofluorimetrije. Dodatno, u supernatantima ćelijske kulture makrofaga određena je i produkcija proinflamacijskih citokina ELISA metodom.

Rezultati su pokazali da u kulturi peritonealnih makrofaga primena VEPA povećava udeo ćelija koje vrše fagocitozu (Grafik 3A), a povećava i produkciju proinflamacijskih citokina IL-6 i IL-12 (Grafik 3B). Efekat na produkciju IL-1 β i TNF je izostao.



Grafik 3. Uticaj VEPA na fagocitnu sposobnost peritonealnih makrofaga i njihovu produkciju proinflamacijskih citokina. Makrofagi dobijeni iz peritonealnog ispirka C57BL/6 miša stimulisani su pomoću LPS (100 ng/ml) i gajeni u prisustvu VEPA (25 μ g/ml) ili u njegovom odsustvu (medijum). Udeo ćelija koje su fagocitovale lateks kuglice (A) određen je metodom protočne citofluorimetrije nakon 48 h, dok je koncentracija IL-1 β , IL-6, IL-12 i TNF u supernatantima ćelijske kulture određena ELISA metodom (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum).

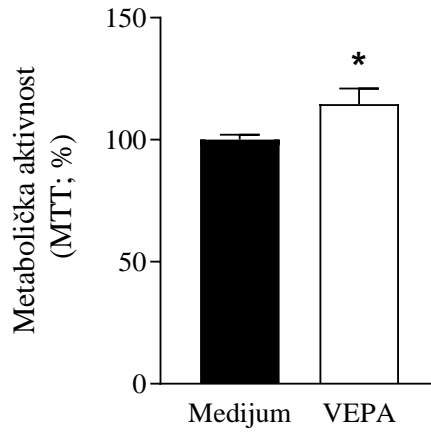
Ovakvi rezultati ukazuju na to da VEPA utiče na funkcionalnost makrofaga tako što povećava njihovu sposobnost fagocitoze. Takođe, VEPA deluje na makrofage da ispolje svoja efektorska svojstva povećanjem produkcije proinflamacijskih citokina IL-6 i IL-12.

4.2.2. Uticaj primene VEPA na ćelije adaptivne imunosti *in vitro*

Za razliku od ćelija urođene imunosti koje pružaju brz, nespecifičan odgovor na patogen, ćelije stečene imunosti aktiviraju se kasnije, ali pružaju visokospecifičan odgovor neophodan za eliminaciju patogena ili sopstvenih transformisanih ćelija. Faktori koje proizvode efektni CD4⁺ i CD8⁺ T limfociti, kao i antitela koje proizvode B limfociti efikasno se bore protiv vanćelijskih i unutarćelijskih patogena, zaraženih ili transformisanih ćelija, dok su kao regulatori imunskog odgovora prisutni regulatorni limfociti, kao što su Treg.

U cilju ispitivanja uticaja VEPA na ćelije adaptivne imunosti *in vitro* nakon 48 h primene VEPA na ćelije slezine analizirana je vijabilnost ovih ćelija MTT metodom. U cilju aktivacije, ćelije su stimulisane sa ConA.

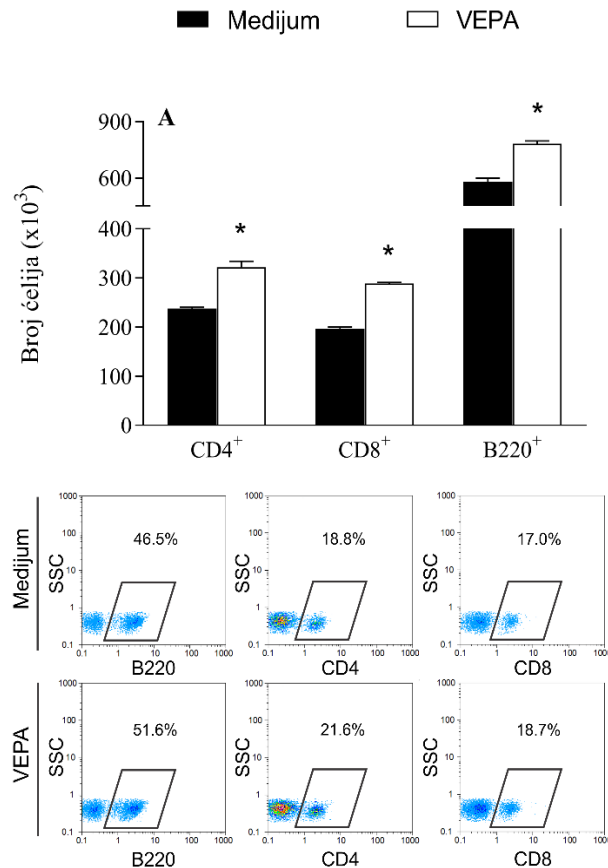
Rezultati su pokazali da u ćelijskoj kulturi splenocita VEPA povećava vijabilnost ovih ćelija (Grafik 4).

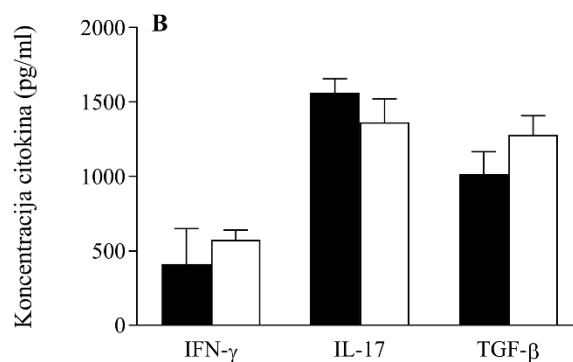


Grafik 4. Uticaj primene VEPA na vijabilnost splenocita. Ćelije dobijene iz slezine C57BL/6 miša stimulisane su sa ConA (1 $\mu\text{g/ml}$) i gajene u prisustvu (25 $\mu\text{g/ml}$) ili odsustvu VEPA tokom 48 h, nakon čega je MTT testom određena vijabilnost ćelija. Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum).

Zastupljenost CD4^+ , CD8^+ T limfocita, kao i B limfocita među ćelijama slezine nakon primene VEPA određena je pomoću protočnog citofluorimetra, dok je produkcija proinflamacijskih citokina $\text{IFN-}\gamma$ i IL-17 , kao i antiinflamacijskog citokina $\text{TGF-}\beta$ određena ELISA metodom.

Rezultati su pokazali da VEPA značajno povećava broj T limfocita u ćelijskoj kulturi splenocita, pri čemu povećava zastupljenost i CD4^+ i CD8^+ T limfocita. Osim toga, nakon primene VEPA zabeležen je i porast broja B limfocita (Slika 7A). Međutim, produkcija citokina ostala je nepromenjena nakon primene VEPA (Slika 7B).

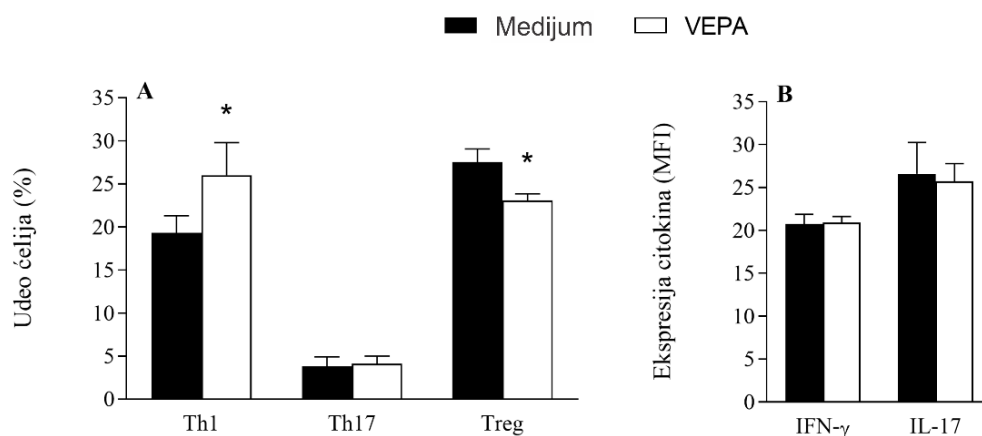


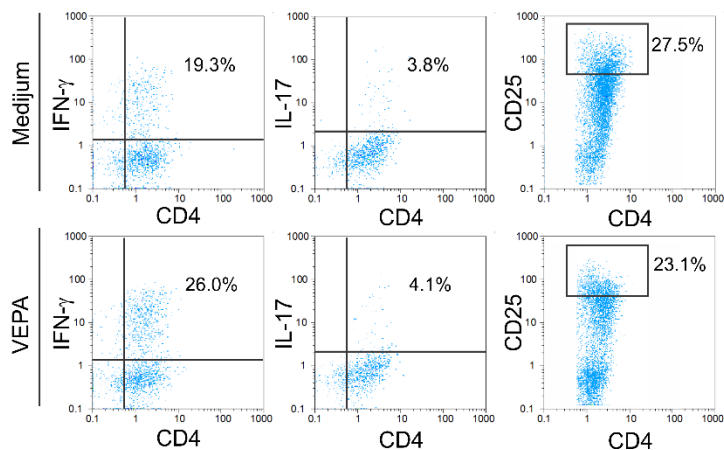


Slika 7. Uticaj VEPA na apsolutni broj T i B limfocita u ćelijskoj kulturi splenocita i na produkciju citokina iz ovih ćelija. Ćelije dobijene iz slezine C57BL/6 miša gajene su u prisustvu (25 μ g/ml) ili odsustvu VEPA (medijum) u trajanju od 24 h . Metodom protočne citofluorimetrije analizirane CD4⁺, CD8⁺ i B220⁺ ćelije (A), sa reprezentativnim dot plotovima prikazanim sa donje strane grafika. U supernatantima ćelijske kulture ELISA metodom određena je koncentracija IFN- γ , IL-17 i TGF- β (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum).

S obzirom da su pokazani rezultati dobijeni primenom VEPA na ukupnu populaciju ćelija slezine, dalje je ispitan uticaj VEPA na diferencijaciju naivnih T limfocita, prečišćenih iz ukupne populacije splenocita i gajenih u prisustvu faktora koji usmeravaju diferencijaciju ka Th1, Th17 ili Treg fenotipu. Nakon 24 h, ćelije su izložene 25 μ g/ml VEPA i 72 h kasnije analizirane pomoću protočnog citofluorimetra. Osim udela određenih subpopulacija Th ćelija posmatran je i nivo ekspresije proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17.

Rezultati su pokazali da primena VEPA značajno povećava diferencijaciju naivnih T limfocita u Th1 subpopulaciju, što je praćeno smanjenjem diferencijacije u Treg. Udeo ćelija koje su se diferencirale u Th17 subpopulaciju ostao je nepromenjen u odnosu na kontrolnu grupu nakon primene VEPA (Slika 8A). Međutim, VEPA ne ostvaruje dejstvo na ekspresiju citokina IFN- γ unutar Th1 subpopulacije, kao ni IL-17 unutar Th17 subpopulacije (Slika 8B).





Slika 8. Uticaj VEPA na diferencijaciju naivnih CD4⁺ T limfocita i ekspresiju odgovarajućih citokina. Naivne CD4⁺ CD25⁻ ćelije dobijene iz slezine C57BL/6 miša stimulisane sa anti-CD3 (1 μ g/ml) i anti-CD28 (1 μ g/ml) antitelima i faktorima koji stimulišu Th1 (IL-12 i anti-IL-4 antitelo), Th17 (IL-6 i TGF- β) ili Treg (IL-2 i TGF- β) diferencijaciju. Nakon 24 h ćelije su izložene 25 μ g/ml VEPA i 72 h kasnije udeo Th1 (IFN- γ ⁺), Th17 (IL-17⁺) i Treg (CD25^{visoko+} FoxP3⁺) ćelija analiziran je pomoću protočnog citofluorimetra (A). Reprezentativni dot plotovi prikazani su u donjem delu slike. Istom metodom određena je ekspresija IFN- γ u okviru Th1 subpopulacije i IL-17 u okviru Th17 subpopulacije, izražena kroz MFI (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum).

Ovi rezultati ukazuju na to da VEPA ostvaruje efekat na ćelije adaptivne imunosti, tako što povećava broj T i B limfocita u ćelijskoj kulturi splenocita. Dodatno, VEPA utiče na diferencijaciju naivnih T limfocita, pospešujući Th1 diferencijaciju, a suprimirajući diferencijaciju u Treg. Zajedno sa prethodnim rezultatima, ovi rezultati ukazuju da VEPA deluje na ćelije imunskog sistema, kako ćelije urođene imunosti tako i stečene, da deluju proinflamacijski.

4.3. Efekat primene VEPA na ćelije imunskog sistema *in vivo*

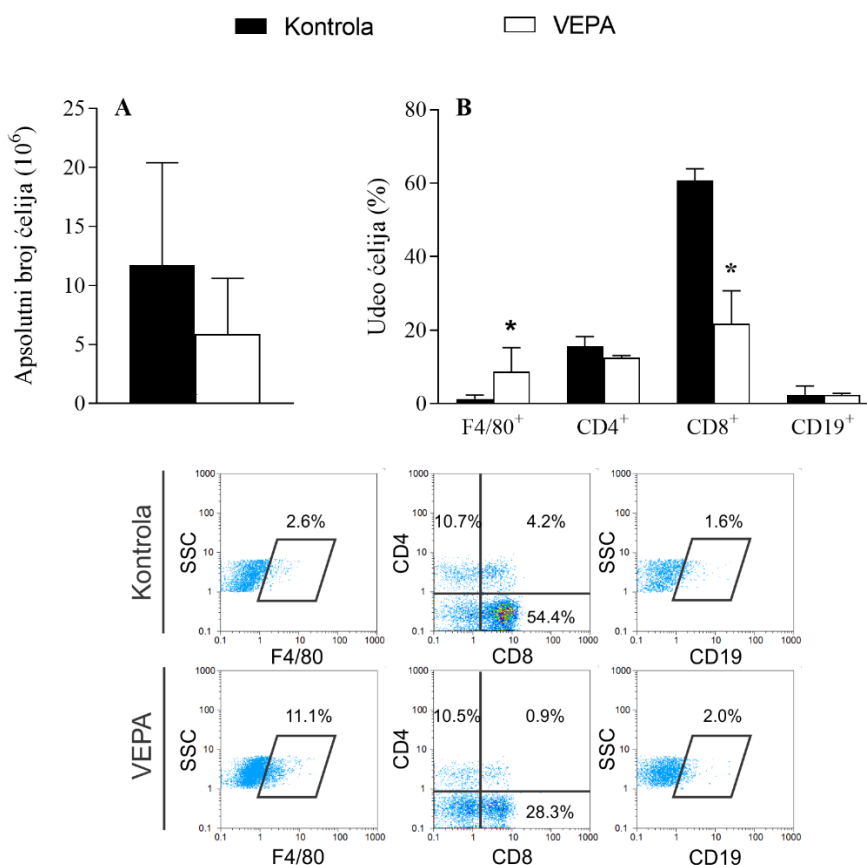
Da bi se utvrdilo da li VEPA pokazane *in vitro* rezultate ostvaruje i *in vivo*, delujući na imunski sistem miša, urađen je set eksperimenata u kojima je VEPA davan C57BL/6 miševima oralnom gavažom. Na osnovu literaturnih podataka određena je doza VEPA od 50 mg/kg telesne mase, koja je C57BL/6 miševima davana tokom sedam dana, dok je kontrolna grupa primala istu zapreminu vode. *Ex vivo* analiza rađena je desetog dana od početka eksperimenta. S obzirom da je VEPA davan miševima oralnom gavažom, najpre su analizirane ćelije imunskog sistema limfnog tkiva creva – intraepitelni limfociti i ćelije Pejerovih ploča, kao lokalno mesto delovanja VEPA, a analizirana je i morfologija tankog creva nakog tretmana VEPA. Dodatno, da bi se ispitalo da li VEPA ostvaruje sistemske efekte, analizirane su ćelije imunskog sistema u slezini.

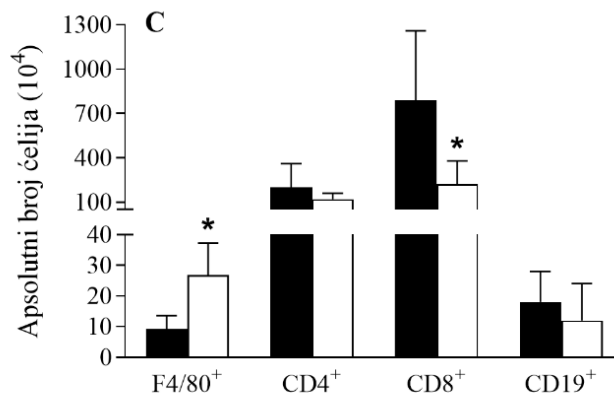
4.3.1. Uticaj tretmana VEPA na ćelije imunskog u limfnom tkivu creva C57BL/6 miševa

4.3.1.1. Uticaj tretmana VEPA na intraepitelne limfocite

Iako su među njima zastupljene i druge ćelije imunskog sistema, većinu intraepitelnih ćelija imunskog sistema predstavljaju limfociti i stoga se ove ćelije uopšteno nazivaju intraepitelni limfociti (Olivares-Villagómez i Van Kaer, 2018). Da bi se utvrdio uticaj oralne primene VEPA na imunski sistem miša najpre je određen apsolutni broj ovih ćelija, kao i udeo i apsolutni broj makrofaga i T i B limfocita pomoću protočnog citofluorimetra.

Rezultati su pokazali da tretman VEPA ne dovodi do značajne promene apsolutnog broja intraepitelnih limfocita u tankom crevu miša (Slika 9A). Međutim, kada su u pitanju određene populacije ćelija imunskog sistema unutar intraepitelnih limfocita, tretman VEPA ostvario je uticaj na njihovu distribuciju. Zabeležen je povećan udeo i apsolutni broj makrofaga, dok je udeo i apsolutni broj CD8⁺ T limfocita značajno smanjen (Slika 9B,C). Uticaj na CD4⁺ T limfocite i B limfocite nije primećen, ni kada je u pitanju udeo ni kada je u pitanju apsolutni broj ovih ćelija (Slika 9B,C).





Slika 9. Uticaj oralnog tretmana VEPA na intraepitelne limfocite tankog creva. Zdravi C57BL/6 miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je kontrolna grupa primala vodu. Desetog dana rađena je *ex vivo* analiza i intraepitelni limfociti, dobijeni iz tankog creva, analizirani su pomoću protočnog citofluorimetra. Određen je apsolutni broj ovih ćelija (A), udeo F4/80⁺ makrofaga, CD4⁺ T limfocita, CD8⁺ T limfocita i CD19⁺ B limfocita (B), sa reprezentativnim dot plotovima prikazanim sa donje strane, i apsolutni broj F4/80⁺ makrofaga, CD4⁺ T limfocita, CD8⁺ T limfocita, i CD19⁺ B limfocita (C). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu.

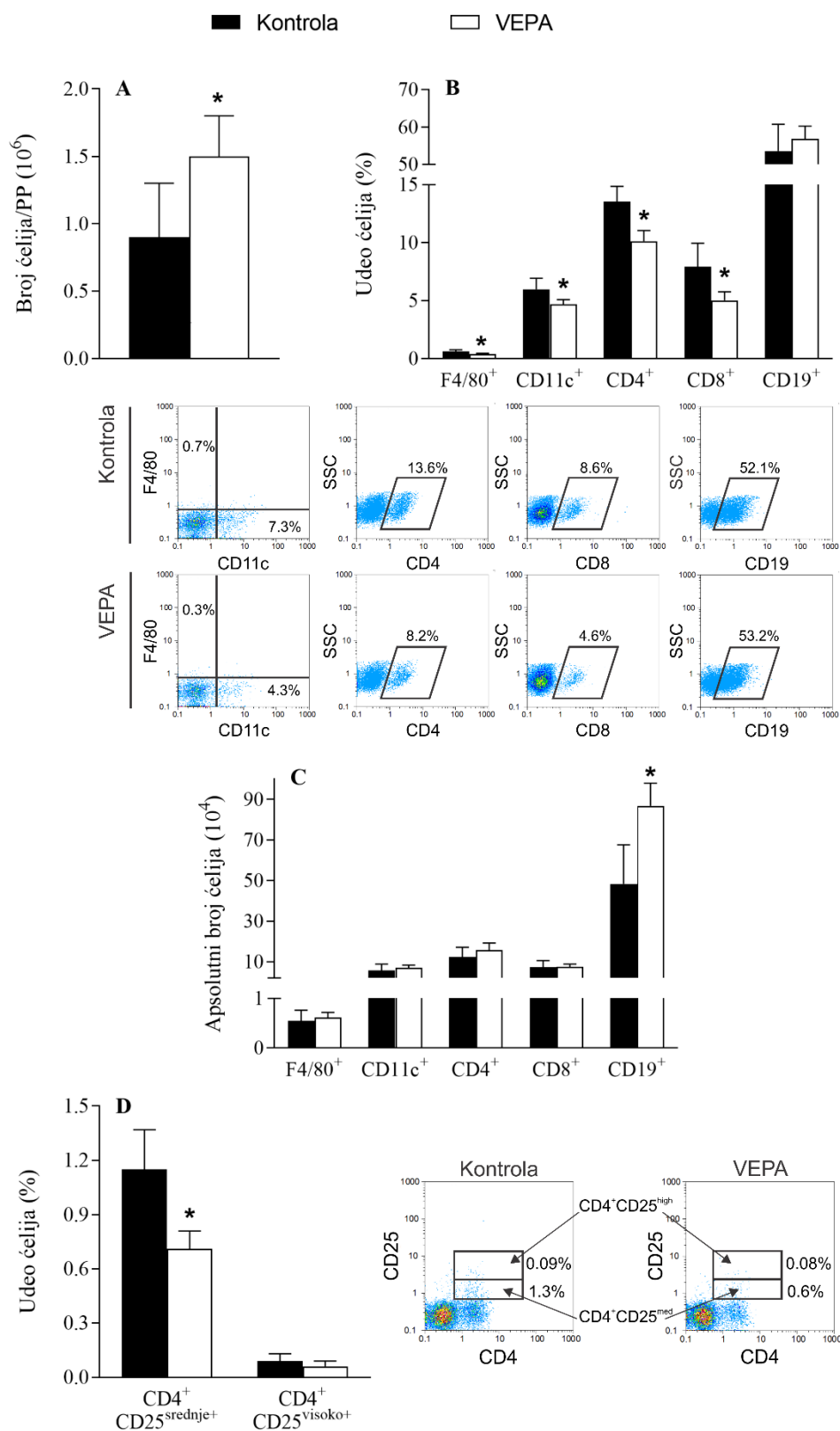
Ovi rezultati ukazuju na to da oralna primena VEPA menja zastupljenost ćelija imunskog sistema unutar intraepitelnih limfocita tankog creva miša, pri tome i ćelija urođene (makrofagi) i ćelija stečene imunosti (citotoksični T limfociti).

4.3.1.2. Uticaj tretmana VEPA na ćelije Pejerovih ploča

Pejerove ploče, izolovane nakupine limfoidnih folikula duž creva, osim u odbrani od patogena važne su i za prikazivanje antigena naivnim T limfocitima, koji nakon aktivacije napuštaju ovo tkivo i odlaze na mesto inflamacije (Jung i sar., 2010).

Da bi se utvrdio dalji uticaj oralne primene VEPA na ćelije imunskog sistema u limfnom tkivu creva, određeni su broj i zastupljenost ćelija urođene i stečene imunosti u Pejerovim pločama, kao i udeo aktiviranih i regulatornih ćelija unutar CD4⁺ T limfocita metodom protočne citofluorimetrije.

Rezultati su pokazali da, iako oralna primena VEPA dovodi do statistički značajnog porasta broja ćelija po Pejerovoj ploči (Slika 10A), udeo makrofaga, dendritskih ćelija, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita značajno je smanjen (Slika 10B). Međutim, s obzirom na ukupno povećanje broja ćelija u Pejerovim pločama, apsolutni broj ovih ćelija nije se značajno razlikovao u odnosu na netretiranu grupu miševa, osim kada su u pitanju B limfociti, čiji je apsolutni broj značajno povećan nakon tretmana VEPA (Slika 10C). Dodatno, tretman VEPA značajno je smanjio udeo aktiviranih CD4⁺ T ćelija u Pejerovim pločama, dok je efekat na udeo Treg izostao (Slika 10D).



Slika 10. Uticaj oralnog tretmana VEPA na distribuciju ćelija unutar Pejerovih ploča. Zdravi C57BL/6 miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je kontrolna grupa primala vodu. Desetog dana rađena je *ex vivo* analiza i ćelije Pejerovih ploča analizirane su pomoću protočnog citofluorimetra. Određen je broj ćelija po Pejerovoj ploči (A), udeo F4/80⁺ makrofaga, CD11c⁺ dendritskih ćelija, CD4⁺ T limfocita, CD8⁺ T limfocita i CD19⁺ B limfocita (B), sa reprezentativnim dot plotovima prikazanim sa donje strane, i određen je apsolutni broj ovih ćelija (C). Istom metodom određen je i udeo CD4⁺ CD25^{srednje+} aktiviranih limfocita i CD4⁺ CD25^{visoko+}

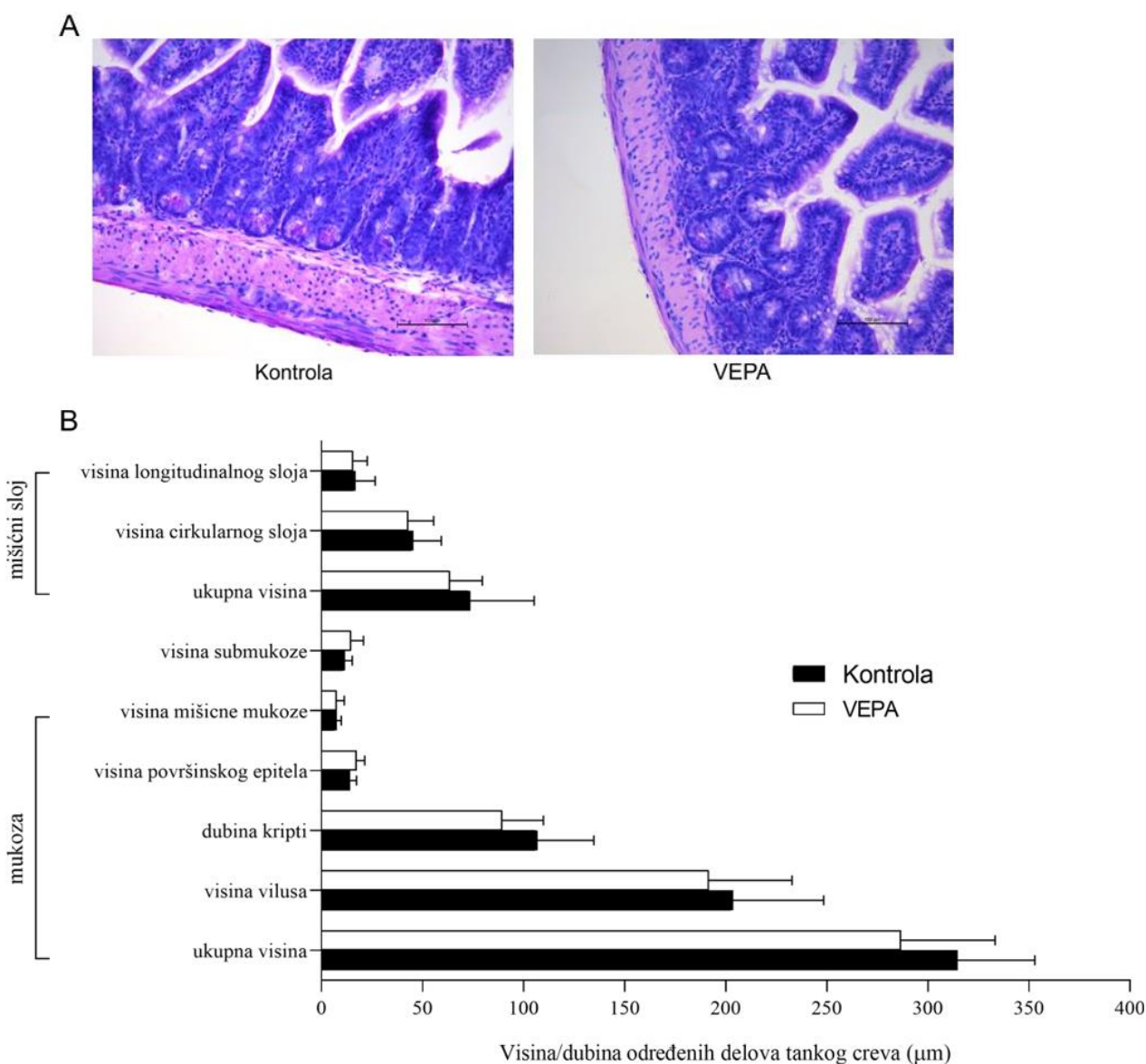
Treg (D). Reprezentativni dot plotovi su prikazani sa desne strane. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu.

Ovi rezultati ukazuju na to da VEPA povećava broj ćelija unutar Pejerovih ploča, među kojima dolazi do promene zastupljenosti ćelija urođenog i stečenog imuniteta, tj. do smanjenog udela makrofaga, dendritskih ćelija, pomoćničkih i citotoksičnih T limfocita.

4.3.1.3. Uticaj tretmana VEPA na morfologiju tankog creva

Pored ispitivanja zastupljenosti ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu tankog creva, ispitan je i uticaj oralnog tretmana VEPA na strukturu tankog creva. Posmatrana je morfologija unutrašnje površine tankog creva i merena je debljina slojeva tankog creva i elemenata ovih slojeva.

Rezultati su pokazali da tretman VEPA ne dovodi do narušavanja unutrašnje površine tankog creva (Slika 11A), niti utiče na debljinu glavnih slojeva zida tankog creva: mukoze, submukoze i mišićnog sloja. Takođe, tretman VEPA ne utiče na elemente mukoze (debljinu crevnih resica, dubinu Liberkinovih kripti, debljinu epitela i muskularis mukoze), kao ni na elemente mišićnog sloja (debljinu cirkularnog i longitudinalnog mišićnog sloja) (Slika 11B).



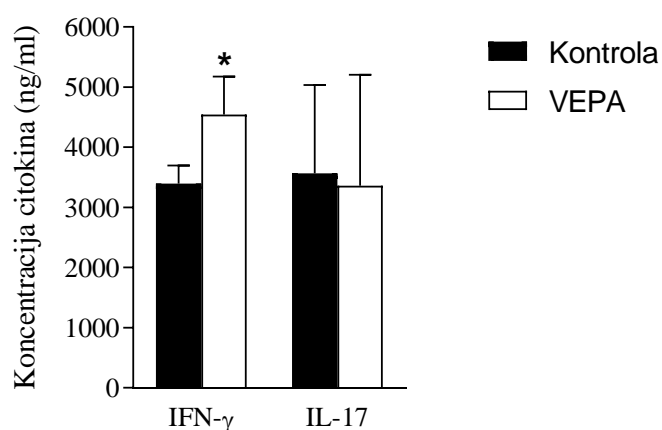
Slika 11. Uticaj oralnog tretmana VEPA na morfologiju slojeva tankog creva. Zdravi C57BL/6 miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je kontrolna grupa primala vodu. Desetog dana rađena je *ex vivo* analiza. Reprezentativne mikrografije morfologije tankog creva posmatrane na svetlosnom mikroskopu pri uvećanju $\times 200$ (A), mikrometrija određenih slojeva i podslojeva tankog creva određena pomoću Fiji softvera (B). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$.

Ovi rezultati ukazuju na to da oralni tretman miševa VEPA ne dovodi do narušavanja unutrašnje površine tankog creva, niti do morfo-anatomskih promena glavnih slojeva zida creva.

4.3.2. Uticaj tretmana VEPA na ćelije imunskog sistema u slezini C57BL/6 miševa

S obzirom da oralni tretman VEPA ostvaruje efekat na zastupljenost ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu creva, sledeći korak je bio ispitati da li VEPA ostvaruje efekat na imunski sistem i van lokalnog mesta delovanja. Stoga je u ćelijskoj kulturi splenocita određena produkcija proinflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17 ELISA metodom.

Rezultati su pokazali da tretman VEPA povećava produkciju IFN- γ iz ćelija slezine, dok efekat na produkciju IL-17 izostaje (Grafik 5).



Grafik 5. Uticaj oralnog tretmana VEPA na produkciju proinflamacijskih citokina u slezini. Zdravi C57BL/6 miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je kontrolna grupa primala vodu. Desetog dana rađena je *ex vivo* analiza i ćelije slezine su postavljene u ćelijsku kulturu. Nakon 24 h u supernatantima ćelijske kulture ELISA metodom je određena koncentracija IFN- γ i IL-17. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu.

Ovi rezultati ukazuju da oralni tretman miševa VEPA ostvaruje efekat na imunski sistem, ne samo lokalno, u limfnom tkivu creva, već i u slezini, usmeravajući ćelije imunskog sistema da ispolje svoja proinflamacijska svojstva.

*Rezultati dobijeni u prvom delu ove doktorske disertacije ukazuju da VEPA stimuliše proinflamacijski odgovor ćelija imunskog sistema, prvenstveno Th1 imunski odgovor. Ovi rezultati dali su osnov za dalje ispitivanje VEPA u modelima bolesti u kojima je proinflamacijski imunski odgovor protektivan, i stoga su, kao dalji ciljevi ove doktorske disertacije, ispitani dejstvo VEPA u mišjem modelu infekcije *L. monocytogenes* i dejstvo VEPA u mišjem modelu melanoma.*

4.4. Efekat primene VEPA na infekciju *L. monocytogenes*

L. monocytogenes predstavlja široko korišćeni model za ispitivanje delovanja imunskog sistema na unutarćelijske bakterije. Kako je pokazano da VEPA ostvaruje uticaj na ćelije imunskog sistema, bez štetnog delovanja na zid tankog creva, ovaj ekstrakt je pogodan za ispitivanje imunskog odgovora na bakterijsku infekciju, a takođe i neškodljiv za upotrebu pri dozi od 50 mg/kg telesne mase.

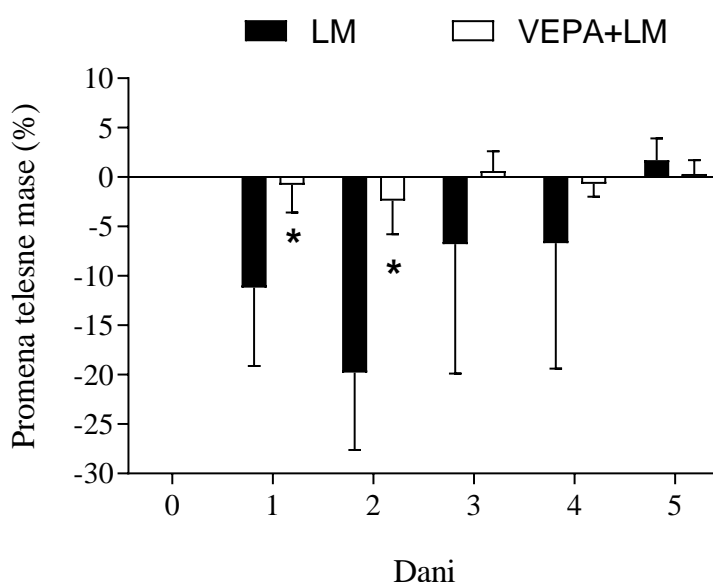
S obzirom na prirodni tok infekcije, u ispitivanju delovanja pretretmana VEPA na infekciju *L. monocytogenes* korišćen je oralni put inficiranja miševa. Pri tome, C57BL/6 soj miševa rezistentan je na infekciju *L. monocytogenes*, te je korišćen podložan, BALB/c soj.

Kao i u prethodnim *in vivo* eksperimentima, miševi su pretretirani VEPA u dozi od 50 mg/kg telesne mase oralnom gavažom tokom sedam dana, dok je kontrolna (netretirana) grupa primala istu zapreminu vode (100 μ l/mišu). Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes*, takođe oralnim putem i eksperimentalne grupe su predstavljene kao LM (netretirana inficirana grupa) i VEPA+LM (pretretirana inficirana grupa).

4.4.1. Uticaj pretretmana VEPA na eliminaciju infekcije *L. monocytogenes*

Najpre je tokom pet dana nakon inficiranja miševa merena njihova telesna masa, radi određivanja toka infekcije i praćenja opšteg stanja miševa.

Rezultati su pokazali da pretretman VEPA sprečava značajan gubitak telesne mase miševa nakon infekcije *L. monocytogenes* (Grafik 6). U kontrolnoj grupi gubitak telesne mase bio je najveći drugog dana nakon inficiranja miševa, te se može zaključiti da ova vremenska tačka predstavlja pik infekcije. Stoga, u narednim eksperimentima *ex vivo* analiza rađena je drugog dana nakon administracije *L. monocytogenes*.

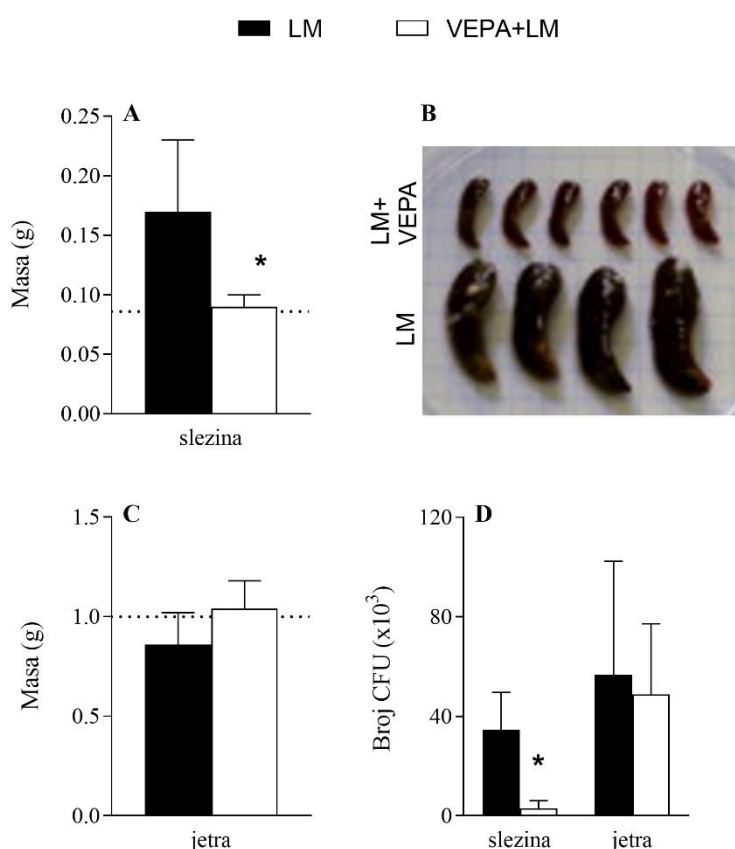


Grafik 6. Uticaj pretretmana VEPA na promenu telesne mase nakon infekcije *L. monocytogenes*. BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu, i osmog dana inficirani

sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes*, takođe oralnom gavažom. Telesna masa je praćena tokom pet dana i analiziran je procenat promene telesne mase. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu.

Kako nakon prolaska crevne barijere *L. monocytogenes* kolonizuje ciljne organe, jetru i slezinu, da bi se ispitaio uticaj VEPA na eliminaciju infekcije iz organizma izmerene su mase jetre i slezine, a dodatno je ispitano i prisustvo bakterije u ovim tkivima.

Rezultati su pokazali da pretretman VEPA sprećava znaćajno povećanje mase slezine izazvano inficiranjem *L. monocytogenes* (Slika 12A,B), dok masa jetre ostaje nepromenjena u odnosu na kontrolnu inficiranu grupu (Slika 12C). U poređenju sa slezinom netretiranih inficiranih miševa, u slezini pretretiranih inficiranih miševa naćeno je znaćajno manje CFU (Slika 12D), sugerišući da pretretman VEPA dovodi do brće eliminacije *L. monocytogenes* iz slezine. Sa druge strane, broj CFU u jetri nije se promenio usled pretretmana VEPA (Slika 12D), što je u skladu sa odsustvom dejstva VEPA na relativnu masu ovog tkiva.



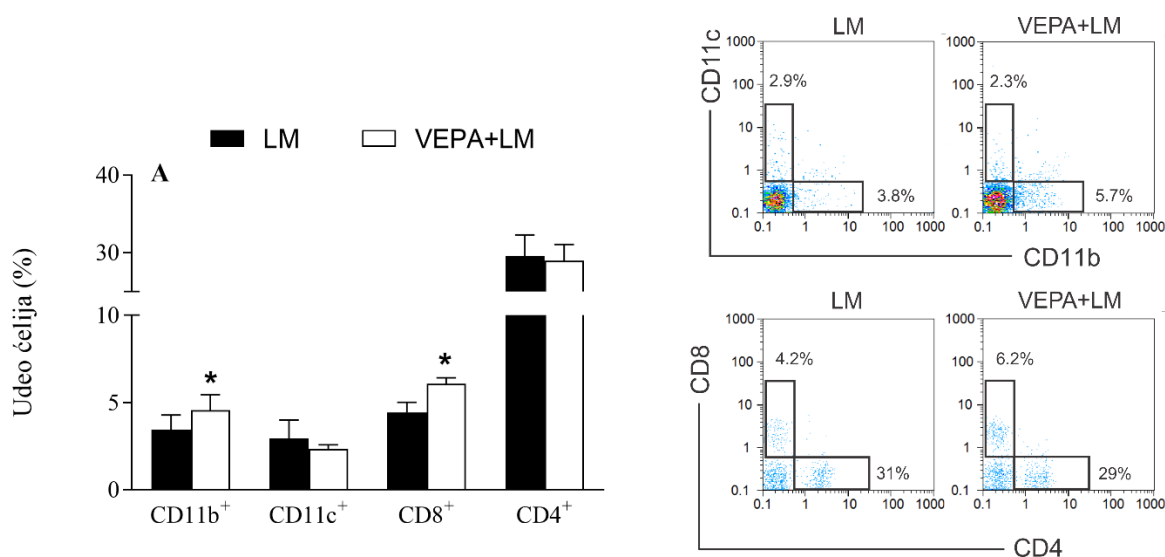
Slika 12. Uticaj pretretmana VEPA na masu slezine i jetre nakon infekcije *L. monocytogenes*, kao i na prisustvo bakterije u ovim tkivima. BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes*. *Ex vivo* analiza je raćena 48 h nakon infekcije. Odrećena je apsolutna masa slezine (A) i jetre (C), dok je prosesćna masa ovih tkiva kod intaktnih životinja prikazana isprekidanom linijom. (B) Slezine izolovane iz pretretiranih i netretiranih inficiranih miševa 48 h nakon administracije *L. monocytogenes*. Suspenzije ćelija slezine i jetre razblaćivane su metodom dvostrukih razblaćenja i inkubirane tokom 24 h na BHI agaru, nakon ćega je odrećen broj CFU (D). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički znaćajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu.

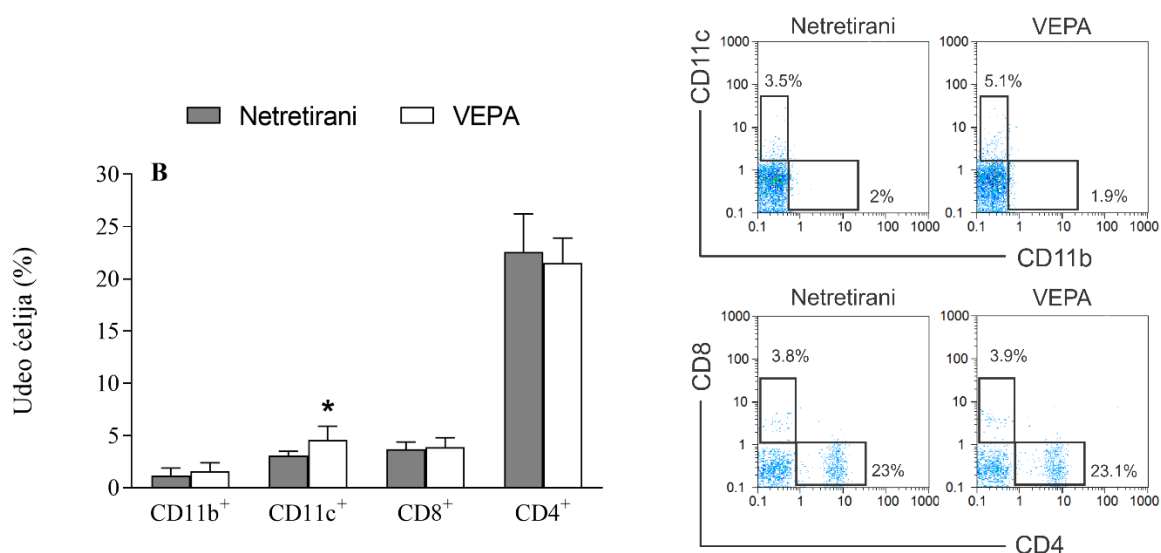
Zajedno sa prethodnim rezultatima koji su pokazali da pretretman VEPA sprečava značajan gubitak telesne mase nakon inficiranja miševa, ovi rezultati ukazuju da VEPA dovodi do brže eliminacije *L. monocytogenes* iz organizma.

4.4.2. Uticaj pretretmana VEPA na zastupljenost ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu creva

Da bi se ispitao uticaj pretretmana VEPA na udeo ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu creva u odgovoru na *L. monocytogenes*, u piku infekcije analizirana je zastupljenost različitih populacija ćelija imunskog sistema unutar Pejerovih ploča. Dodatno, s obzirom da su u eksperimentima korišćeni BALB/c miševi, na kojima nije prethodno ispitan uticaj VEPA, određena je zastupljenost ćelija imunskog sistema u Pejerovim pločama i u odsustvu infekcije. U tu svrhu zdravi BALB/c miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je kontrolna grupa primala istu zapreminu vode. Desetog dana je metodom protočne citofluorimetrije određen udeo različitih populacija ćelija imunskog sistema unutar Pejerovih ploča.

Rezultati su pokazali da pretretman VEPA značajno povećava udeo CD11b⁺ makrofaga i CD8⁺ T limfocita u ćelijama Pejerovih ploča nakon administracije *L. monocytogenes*, dok ne ostvaruje efekat na promenu udela CD11c⁺ dendritskih ćelija i CD4⁺ T limfocita (Slika 13A). S obzirom na to da ovaj efekat nije primećen u odsustvu infekcije, gde je tretman miševa VEPA povećao udeo samo CD11c⁺ dendritskih ćelija, koje su važne za aktivaciju antigen-specifičnih T limfocita (Slika 13B), pokazani rezultati ukazuju da pretretman VEPA dovodi do efikasnijeg odgovora na *L. monocytogenes* i na nivou Pejerovih ploča.





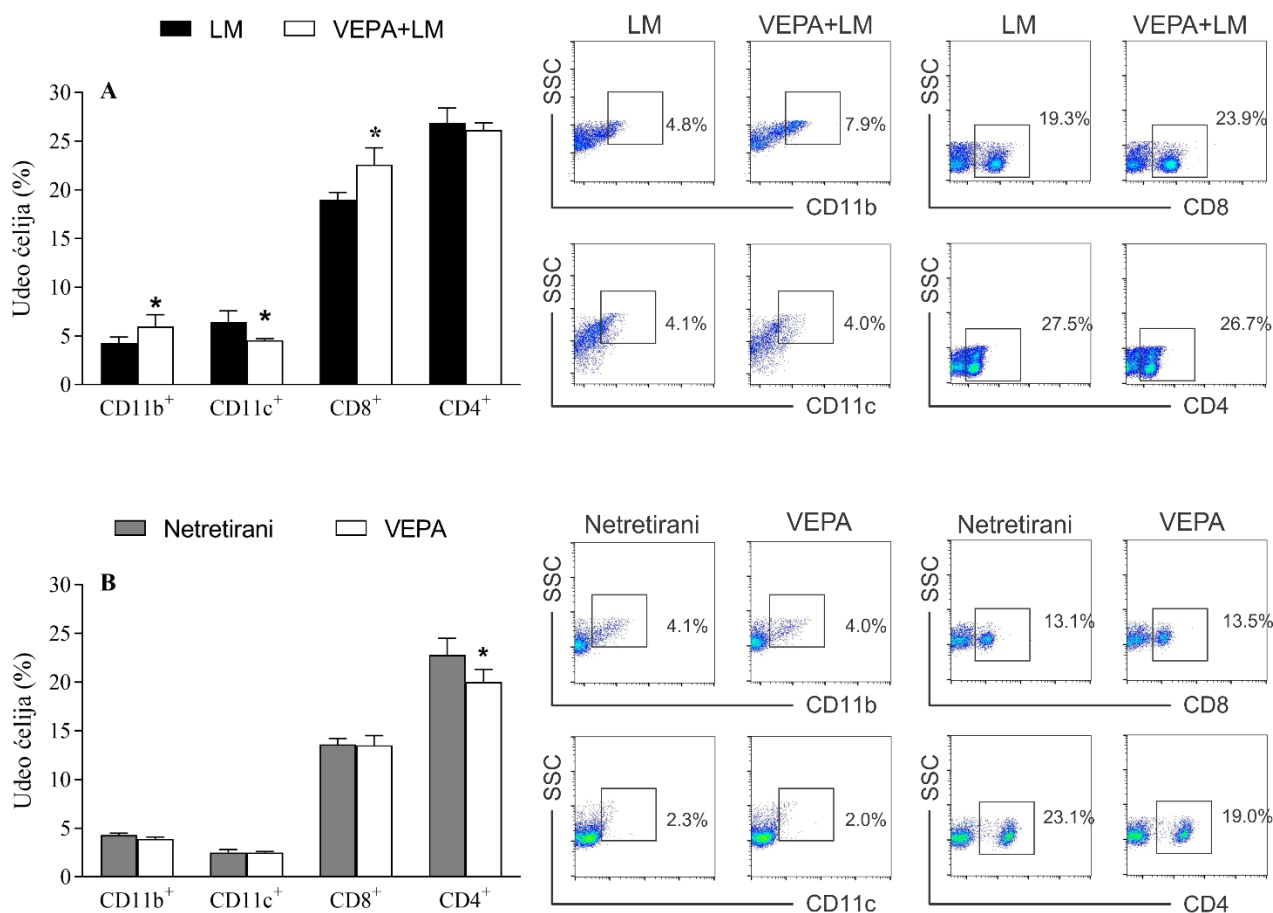
Slika 13. Uticaj VEPA na udeo ćelija imunskog sistema u Pejerovim pločama 48 h nakon infekcije *L. monocytogenes* ili u odsustvu infekcije kod BALB/c miševa. (A) BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes*. 48 h nakon infekcije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije u Pejerovim pločama određen je udeo CD11b⁺ makrofaga, CD11c⁺ dendritskih ćelija, CD8⁺ T limfocita i CD4⁺ T limfocita. (B) BALB/c miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Desetog dana je rađena *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije u Pejerovim pločama određen je udeo CD11b⁺ makrofaga, CD11c⁺ dendritskih ćelija, CD8⁺ T limfocita i CD4⁺ T limfocita. Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Reprezentativni dot plotovi prikazani su sa desne strane. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu/netretiranu grupu.

Ovi rezultati sugerišu da pretretman VEPA nakon inficiranja miševa sa *L. monocytogenes* ostvaruje efekat na distribuciju ćelija imunskog sistema na mestu inicijacije infekcije, u limfnom tkivu creva, povećavajući zastupljenost onih ćelija koje su od značaja za eliminaciju ove bakterije.

4.4.3. Uticaj pretretmana VEPA na zastupljenost ćelija imunskog sistema u slezini

S obzirom da je u piku infekcije pokazano smanjeno prisustvo *L. monocytogenes* u slezini pretretiranih inficiranih miševa, sledeći korak bio je ispitivanje uticaja pretretmana VEPA na udeo različitih populacija ćelija imunskog sistema u ovom tkivu nakon inficiranja miševa. Dodatno, i u ovom tkivu je ispitan uticaj VEPA na distribuciju ćelija imunskog sistema u odsustvu infekcije.

Rezultati su pokazali da i u slezini pretretman VEPA povećava udeo ćelija značajnih za antibakterijski imunski odgovor, CD11b⁺ makrofaga i CD8⁺ T limfocita nakon administracije *L. monocytogenes*, ali i smanjuje udeo dendritskih ćelija (Slika 14A). Iako udeo CD4⁺ T limfocita nije promenjen nakon infekcije (Slika 14A), tretman miševa VEPA u odsustvu infekcije smanjuje udeo ovih ćelija (Slika 14B). S obzirom da u odsustvu infekcije zastupljenost ostalih ispitivanih populacija ćelija imunskog sistema nije promenjena u odnosu na netretiranu grupu (Slika 14B), ovi rezultati ukazuju na sposobnost VEPA da stimuliše efikasniji imunski odgovor u slezini nakon administracije *L. monocytogenes*.



Slika 14. Uticaj pretretmana VEPA na udeo ćelija imunskog sistema u slezini 48 h nakon infekcije *L. monocytogenes* ili u odsustvu infekcije kod BALB/c miševa. (A) BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes*. 48 h nakon infekcije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije u slezini je određen udeo CD11b⁺ makrofaga, CD11c⁺ dendritskih ćelija, CD8⁺ T limfocita i CD4⁺ T limfocita. (B) BALB/c miševi tretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Desetog dana od početka eksperimenta metodom protočne citofluorimetrije u slezini je određen udeo CD11b⁺ makrofaga, CD11c⁺ dendritskih ćelija, CD8⁺ T limfocita i CD4⁺ T limfocita. Reprezentativni dot plotovi prikazani su sa desne strane. Rezultati su prikazani kao SV ± SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu/netretiranu grupu.

Ovi rezultati ukazuju da VEPA deluje na ćelije imunskog sistema, ne samo na mestu inicijacije infekcije, već i u ciljnom tkivu za kolonizaciju *L. monocytogenes*, da efikasnije reaguju na prisustvo ove bakterije. S obzirom da pretretman VEPA dovodi do povećanja zastupljenosti makrofaga i CD8⁺ T limfocita u slezini inficiranih miševa, ali ne i neinficiranih, može se zaključiti da pretretman VEPA priprema imunski sistem da efikasnije reaguje na *L. monocytogenes* i dovede do njene brže eliminacije iz organizma.

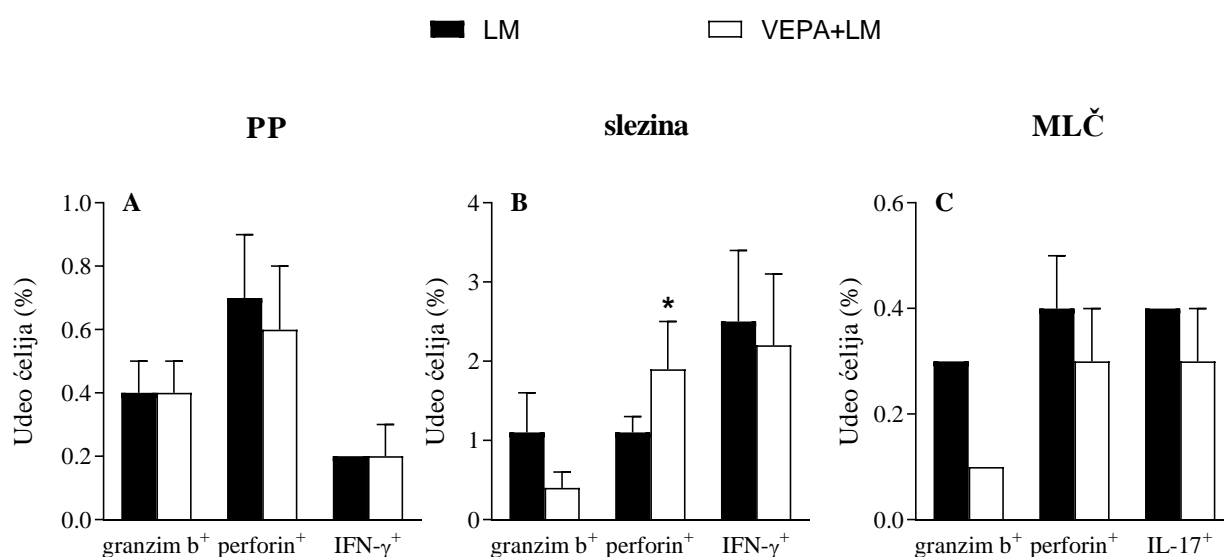
4.4.4. Uticaj pretretmana VEPA na produkciju citotoksičnih medijatora

Citotoksični T limfociti, zahvaljujući svojoj sposobnosti da proizvode perforin i granzim b kojima vrše liziranje zaražene ćelije, veoma su značajni za eliminaciju unutarćelijskih patogena, a

samim tim i *L. monocytogenes*. Ove ćelije, osim direktnog ubijanja ćelija, zajedno sa pomoćničkim T limfocitima produkuju i druge proinflamacijske medijatore kojima usmeravaju imunski odgovor i aktiviraju druge ćelije imunskog sistema da ispolje efektorska svojstva. NK ćelije takođe produkuju perforin i granzim b, međutim one su značajno manje zastupljene u tkivima kao što su slezina i limfni čvorovi (Hensel i sar., 2019).

S obzirom da su rezultati ove doktorske disertacije pokazali povećanje zastupljenosti makrofaga i CD8⁺ T limfocita u Pejerovim pločama i slezini, dalje istraživanje je usmereno ka određivanju mehanizama antibakterijskog imunskog odgovora. Ekspresija citotoksičnih medijatora, kao pokazatelja značaja citotoksičnih T limfocita u infekciji *L. monocytogenes* ispitana je metodom protočne citofluorimetrije unutar limfnog tkiva creva (u Pejerovim pločama i MLC-u) i slezine.

Rezultati su pokazali da pretretman VEPA povećava udeo ćelija koje eksprimiraju perforin u slezini nakon infekcije sa *L. monocytogenes*, međutim ne dovodi do promene udela ćelija koje eksprimiraju granzim b i IFN- γ u ovom tkivu (Grafik 7B). Na nivou creva, ni u Pejerovim pločama (Grafik 7A) ni u MLC-u (Grafik 7C) nije došlo do promene udela ćelija koje eksprimiraju granzim b, perforin i IFN- γ ili IL-17, sugerišući da su citotoksični T limfociti značajni za eliminaciju *L. monocytogenes* u slezini, ali da je imunski odgovor na *L. monocytogenes* na nivou creva verovatno posredovan drugim mehanizmima koji ne uključuju produkciju pomenutih medijatora iz CD8⁺ T limfocita.



Grafik 7. Uticaj pretretmana VEPA na produkciju citotoksičnih medijatora 48 h nakon infekcije *L. monocytogenes*. (A) BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes* i 48 h nakon infekcije rađena je *ex vivo* analiza. Metodom protočne citofluorimetrije u Pejerovim pločama (A) i slezini (B) određen je udeo granzim b⁺, perforin⁺ i IFN- γ ⁺ ćelija, dok je u MLC-u (C) određen udeo granzim b⁺, perforin⁺ i IL-17⁺ ćelija. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu. PP – Pejerove ploče, MLC – mezenterični limfni čvor

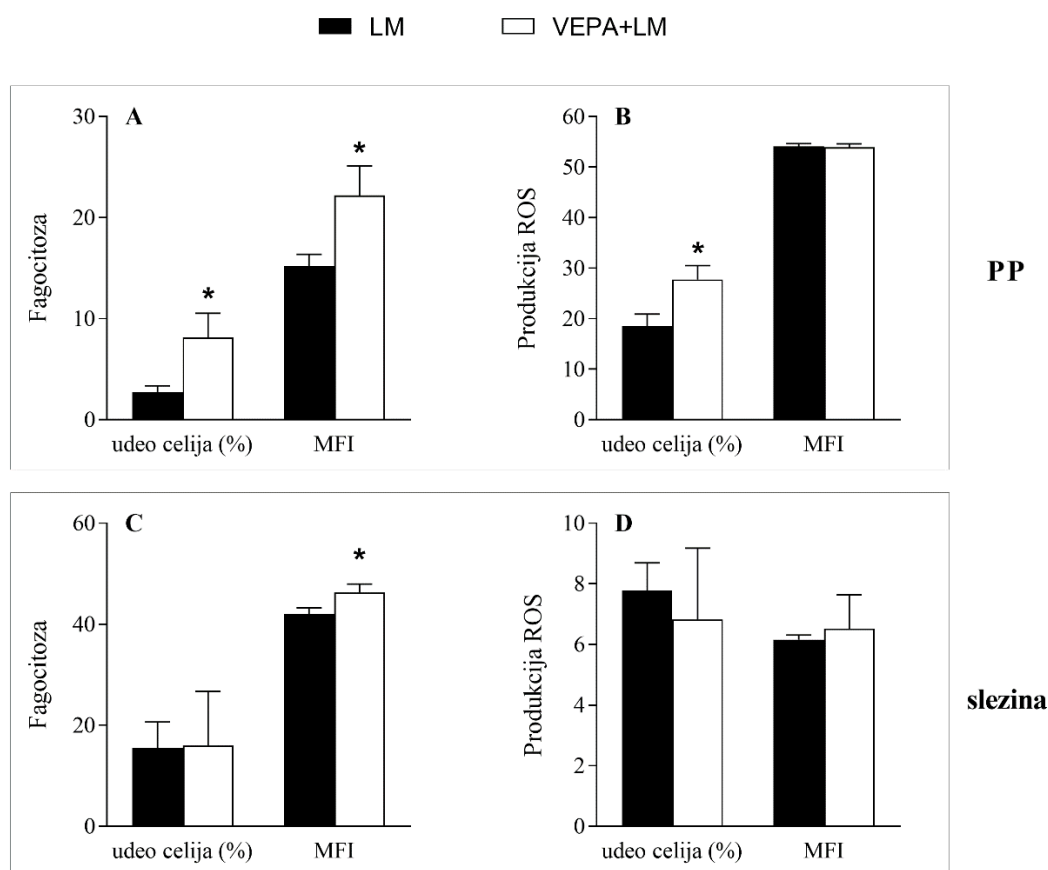
Ovi rezultati ukazuju da je u slezini, kao ciljnom tkivu za diseminaciju *L. monocytogenes*, povećana produkcija perforina usled pretretmana VEPA, efekorskog molekula koji se najvećim delom produkuje iz CD8⁺ T limfocita, značajna za eliminaciju bakterije iz slezine, što se odražava i na njenu eliminaciju iz organizma.

4.4.5. Mehanizam dejstva VEPA na mijeloidne ćelije

Ćelije urođene imunosti neophodne su za ranu odbranu od infekcije. Kao što je već rečeno, one su sposobne da fagocituju patogene, da produkuju ROS i NO u cilju njihovog ubijanja, da produkuju medijatore inflamacije kojima aktiviraju i privlače druge ćelije imunskog sistema na mesto infekcije, kao i da prikazuju antigene naivnim T limfocitima i da učestvuju u njihovoj aktivaciji.

Kako je pokazano da pretretman VEPA povećava udeo makrofaga u Pejerovim pločama i slezini miševa nakon infekcije *L. monocytogenes*, sledeći korak u cilju određivanja dejstva VEPA na eliminaciju ove bakterije bio je određivanje mehanizma dejstva VEPA na mijeloidne ćelije. Stoga je metodom protočne citofluorimetrije analizirana sposobnost ćelija Pejerovih ploča i slezine da vrše fagocitozu i da produkuju ROS.

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA povećava sposobnost ćelija Pejerovih ploča (Grafik 8A) i slezine (Grafik 8C) da vrše fagocitozu lateks kuglica nakon infekcije *L. monocytogenes*, izraženu kroz MFI. Dodatno, u Pejerovim pločama povećan je i udeo ćelija koje su izvršile fagocitozu, dok udeo ovih ćelija nije bio promenjen u slezini. Kada je u pitanju produkcija ROS, u Pejerovim pločama pretretiranih inficiranih životinja VEPA je povećao udeo ćelija koje produkuju ROS (DHR⁺ ćelije), bez uticaja na sposobnost njihove produkcije (Grafik 8B), dok je u slezini efekat na produkciju ROS potpuno izostao (Grafik 8D).

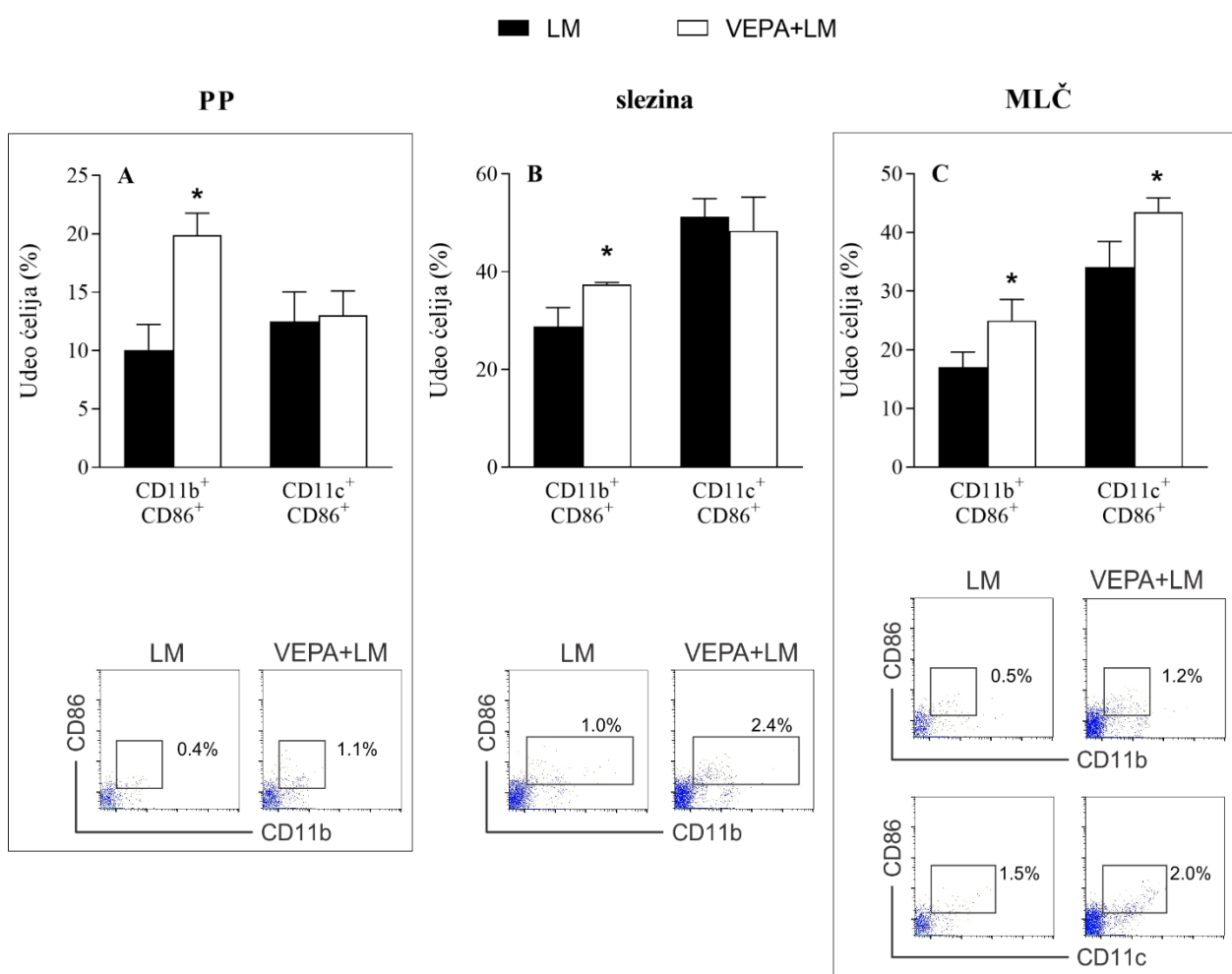


Grafik 8. Uticaj pretretmana VEPA na fagocitnu sposobnost i produkciju ROS ćelija Pejerovih ploča i slezine 48 h nakon infekcije *L. monocytogenes*. BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes* i 48 h nakon infekcije rađena je *ex vivo* analiza. Metodom protočne citofluorimetrije u Pejerovim pločama (A) i slezini (C) određen je udeo ćelija koje su fagocitovale lateks kuglice obeležene fikoeritriinom i njihov MFI. Udeo ćelija

koje produkuju ROS (DHR⁺ ćelije) i njihov MFI takođe je određen u Pejerovim pločama (B) i slezini (D). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu. PP – Pejerove ploče

Da bi se dalje ispitaio efekat pretretmana VEPA na imunski odgovor na *L. monocytogenes*, ispitan je udeo makrofaga i dendritskih ćelija koji ekspimiraju kostimulatorni molekul CD86 u Pejerovim pločama, slezini i MLC-u.

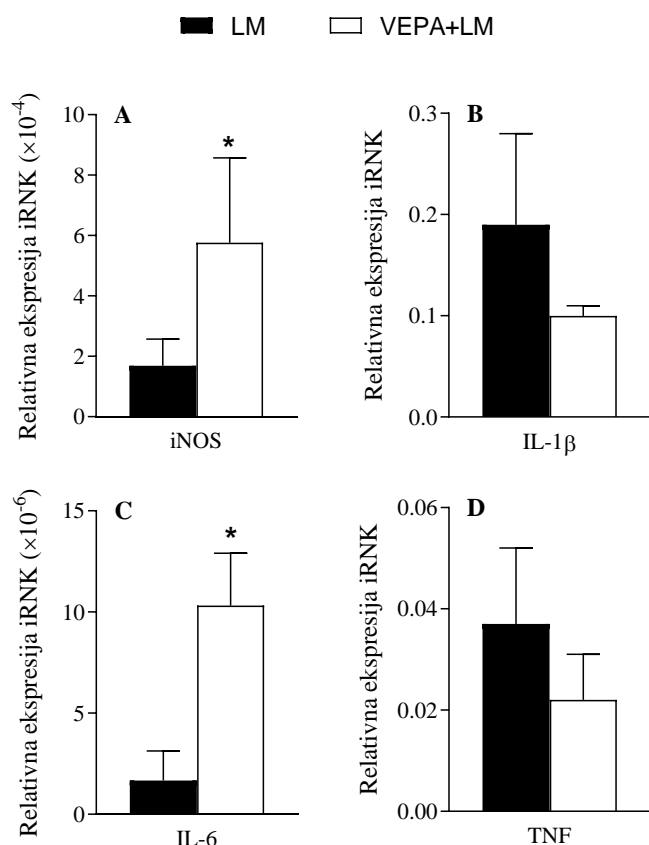
Rezultati su pokazali da pretretman VEPA dovodi do povećanja ekspresije CD86 na makrofagima u svim ispitivanim tkivima (Slika 15A-C) nakon infekcije sa *L. monocytogenes*. Osim toga, zabeleženo je i povećanje zastupljenosti CD86⁺ dendritskih ćelija u MLC-u (Slika 15C), dok se udeo ovih ćelija u Pejerovim pločama i slezini nije razlikovao u odnosu na netretiranu inficiranu grupu (Slika 15A,B).



Slika 15. Uticaj pretretmana VEPA na ekspresiju kostimulacionih molekula na makrofagima i dendritskim ćelijama 48 h nakon infekcije *L. monocytogenes*. BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes* i 48 h nakon infekcije rađena je *ex vivo* analiza. Metodom protočne citofluorimetrije je u Pejerovim pločama (A), slezini (B) i MLC-u (C) određen udeo CD11b⁺ CD86⁺ makrofaga i CD11c⁺ CD86⁺ dendritskih ćelija. Reprezentativni dot plotovi prikazani su u donjem delu slike. Rezultati su prikazani kao SV ± SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu. PP – Pejerove ploče, MLC – mezenterični limfni čvor

S obzirom da je slezina ciljno tkivo za kolonizaciju *L. monocytogenes*, dalje je u slezini metodom RT-PCR ispitana relativna ekspresija iRNK za proinflamacijske medijatore koji su značajni za odbranu od patogena.

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA dovodi do povećanja ekspresije iRNK za iNOS i IL-6 u slezini nakon infekcije *L. monocytogenes* (Grafik 9A,C), dok ne ostvaruje efekat na ekspresiju iRNK za IL-1 β i TNF (Grafik 9B,D).

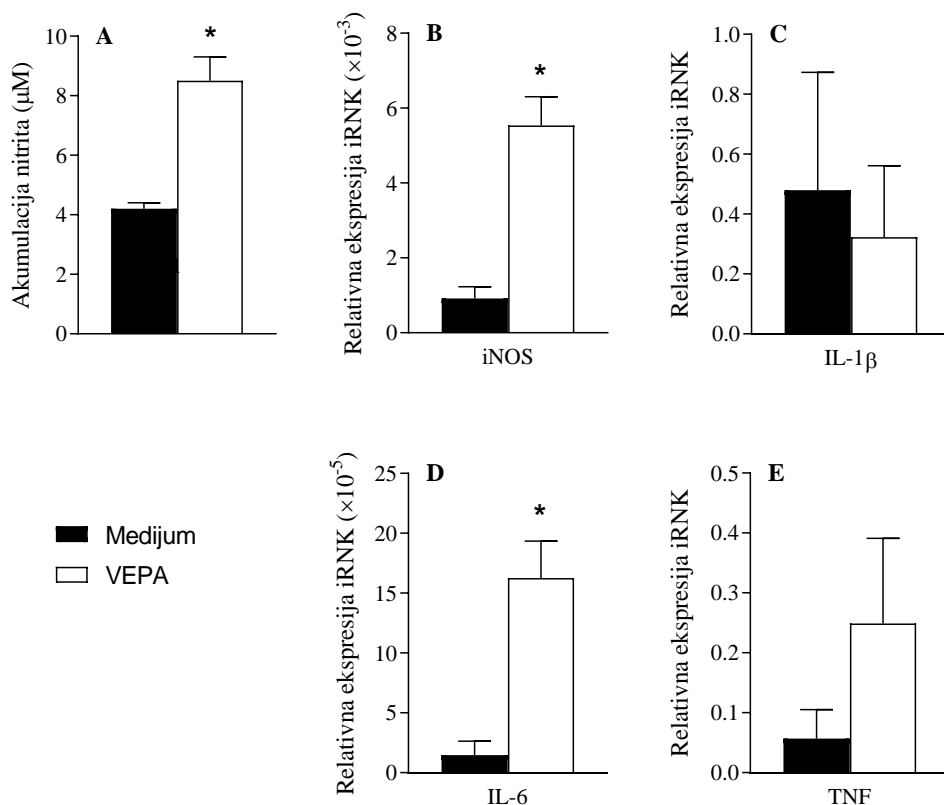


Grafik 9. Uticaj pretretmana VEPA na ekspresiju iRNK za proinflamacijske medijatore u slezini 48 h nakon infekcije *L. monocytogenes*. BALB/c miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana miševi su inficirani sa 5×10^6 CFU *L. monocytogenes* i 48 h nakon infekcije rađena je *ex vivo* analiza. Metodom RT-PCR u slezini je određena ekspresija iRNK za iNOS (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) i TNF (D). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inficiranu grupu.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da pretretman miševa VEPA stimuliše efektorska svojstva mijeloidnih ćelija na nivou limfnog tkiva creva i slezine nakon infekcije *L. monocytogenes*. Ove ćelije povećano su vršile fagocitozu, produkovale ROS i ekspimirale kostimulatorni molekul CD86. Dodatno, povećana ekspresija proinflamacijskih medijatora u slezini sugerise da VEPA deluje na mijeloidne ćelije da ostvaruju proinflamacijski odgovor, što doprinosi bržoj eliminaciji *L. monocytogenes* iz organizma.

Da bi se dodatno ispitalo kako VEPA deluje na mijeloidne ćelije u odsustvu infekcije, i da bi se potvrdili dobijeni rezultati da VEPA svoje antibakterijsko dejstvo ostvaruje posredstvom ćelija imunskog sistema, a ne direktnim ubijanjem *L. monocytogenes*, urađen je dodatni *in vitro* eksperiment u kome je testiran uticaj VEPA na makrofage dobijene iz peritonealnog ispirka BALB/c miša. Akumulacija nitrita u supernatantima ćelijske kulture merena je Griess reakcijom, dok je u ćelijama metodom RT-PCR određena ekspresija iRNK za proinflamacijske medijatore.

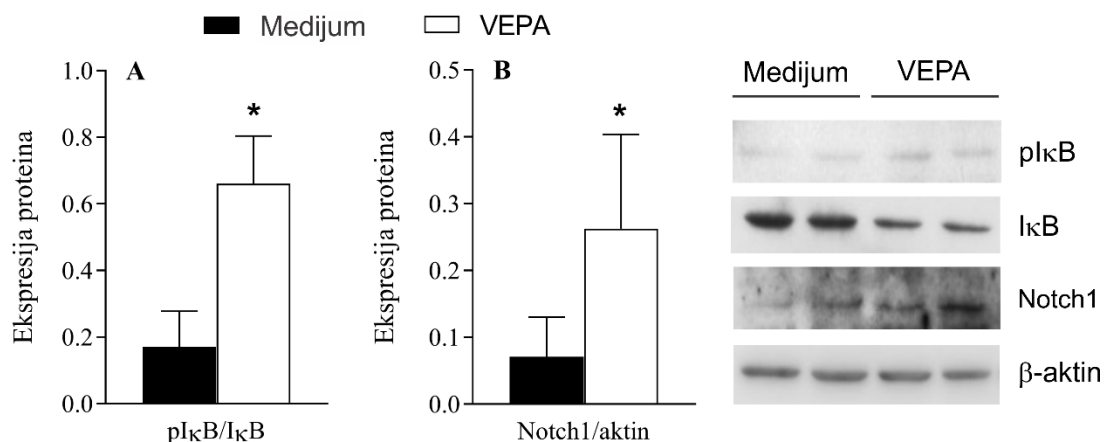
Rezultati su pokazali da primena VEPA značajno povećava akumulaciju nitrita u supernatantima ćelijske kulture makrofaga (Grafik 10A), kao i relativnu ekspresiju iRNK za iNOS (Grafik 10B) i IL-6 (Grafik 10D), dok ne ostvaruje efekat na ekspresiju iRNK za IL-1 β (Grafik 10C) i TNF (Grafik 10E).



Grafik 10. Uticaj primene VEPA na akumulaciju nitrita i ekspresiju iRNK za proinflamacijske medijatore u peritonealnim makrofagima. Peritonealni makrofagi dobijeni iz BALB/c miša gajeni su u prisustvu VEPA u koncentraciji od 25 $\mu\text{g/ml}$ ili odsustvu VEPA (medijum) tokom 24 h. Griess reakcijom određena je akumulacija nitrita u supernatantima ćelijske kulture (A), dok je u ćelijama metodom RT-PCR određena ekspresija iRNK za iNOS (B), IL-1 β (C), IL-6 (D) i TNF (E). Rezultati su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum).

Ekspresija proteina uključenih u ekspresiju IL-6 i iNOS određena je imunoblot metodom. Naime, kako aktivacija transkripcionog faktora NF- κB vodi ekspresiji iNOS i produkciji NO, ali i ekspresiji IL-6, na koju utiče samostalno ili u kombinaciji sa regulatorom transkripcije Notch1, ispitana je ekspresija upravo NF- κB i Notch1.

Rezultati su pokazali da primena VEPA na makrofage značajno povećava fosforilaciju I- κ B (Slika 16A), kao i ekspresiju Notch1 proteina (Slika 16B), sugerišući na značaj ovih molekula u aktivnosti i funkcionalnosti makrofaga, ćelijama od značaja za borbu protiv unutarćelijskih patogena.



Slika 16. Uticaj primene VEPA na ekspresiju proteina u peritonealnim makrofagima. Peritonealni makrofagi dobijeni iz BALB/c miša gajeni su u prisustvu VEPA u koncentraciji od 25 μ g/ml ili odsustvu VEPA (medijum) tokom 24 h. Metodom imunoblot je određena ekspresija p-I κ B/I κ B (A) i Notch1/aktin (B). Reprezentativne proteinske trake prikazane su sa desne strane. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (medijum).

Ovi rezultati sugerišu da primena VEPA i u ćelijskoj kulturi makrofaga stimuliše proinflamacijski imunski odgovor ovih ćelija aktivacijom NF- κ B, povećanom ekspresijom Notch1 i sledstvenom ekspresijom IL-6 i produkcijom NO. Ovi rezultati u skladu su sa *in vivo* rezultatima primene VEPA u modelu infekcije *L. monocytogenes* i sugerišu da je efikasniji antibakterijski odgovor na ovu bakteriju posledica delovanja VEPA na ćelije imunskog sistema da deluju proinflamacijski.

Rezultati dobijeni u drugom delu ove doktorske disertacije ukazuju na to da tretman VEPA pre infekcije L. monocytogenes dovodi do brže eliminacije bakterije iz organizma, delujući na povećanje udela CD8⁺ T limfocita i makrofaga u limfnom tkivu creva i slezini, ćelija značajnih za antibakterijski imunski odgovor. Pri tome, najznačajniji uticaj VEPA ostvaruje na makrofage, tako što povećava sposobnost fagocitoze i produkcije ROS, povećava ekspresiju kostimulatornih molekula, produkciju NO i proinflamacijskog citokina IL-6, dok je u slezini značajna i produkcija perforina, koji dovodi do direktnog ubijanja inficiranih ćelija. Takođe, pokazano je da VEPA pokazani antibakterijski efekat ostvaruje indirektno, delujući preko ćelija imunskog sistema.

4.5. Efekat primene VEPA na razvoj melanoma

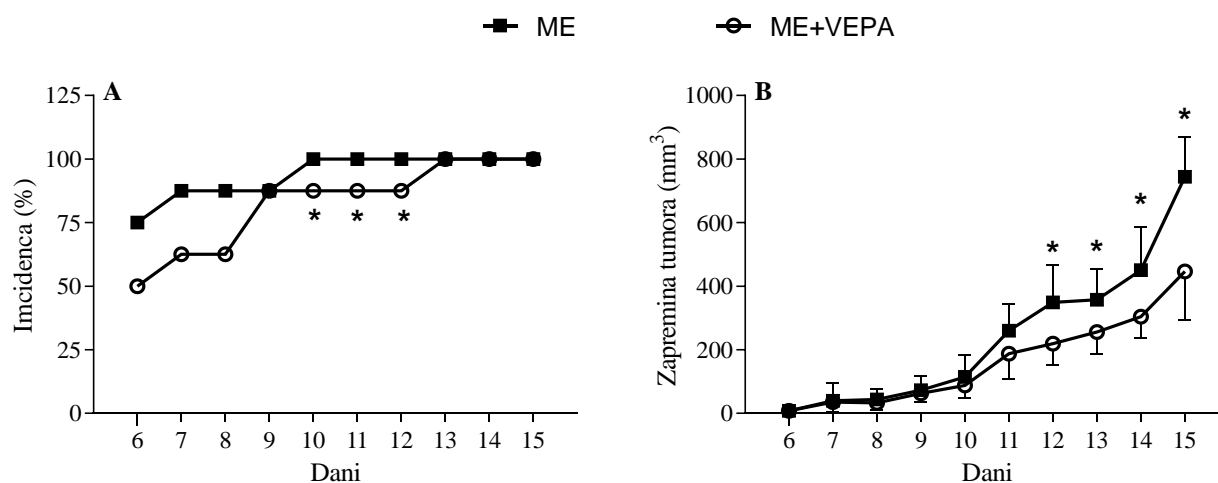
Dosadašnji rezultati pokazali su sposobnost VEPA da deluje na ćelije imunskog sistema da ostvare svoja proinflamacijska svojstva, što se pokazalo protektivno u mišjem modelu infekcije. S obzirom da melanom ima veliku sposobnost aktivacije i modulacije imunskog odgovora (Shankaran i sar., 2001), životinjski model ovog tumora pogodan je za ispitivanje antitumorskog imunskog odgovora i delovanja različitih terapeutika koji se zasnivaju na imunomodulaciji. Nalik bakterijskoj infekciji, eliminacija tumorskih ćelija takođe zahteva snažan proinflamacijski imunski odgovor i saradnju ćelija urođene i stečene imunosti.

U cilju određivanja efekta pretretmana VEPA na razvoj melanoma, C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, nakon čega je tumor indukovao subkutanom ubrizgavanjem B16 ćelija. Tretman VEPA nastavljen je do kraja eksperimenta, a eksperimentalne grupe su predstavljene kao ME (netretirana inokulisana grupa) i ME+VEPA (pretretirana inokulisana grupa).

4.5.1. Uticaj pretretmana VEPA na incidencu i razvoj melanoma

U cilju određivanja uticaja pretretmana VEPA na razvoj melanoma, tokom 15 dana praćena je pojava tumora, koji su detektovani metodom palpacije, a potom je merena i njihova zapremina.

Rezultati su pokazali da pretretman VEPA smanjuje incidencu melanoma između 10. i 13. dana nakon inokulacije (Grafik 11A). Međutim, iako su 13. dana nakon inokulacije svi miševi razvili melanom, pretretman miševa VEPA značajno je smanjio zapreminu tumora u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu, što se održalo do kraja eksperimenta (Grafik 11B).

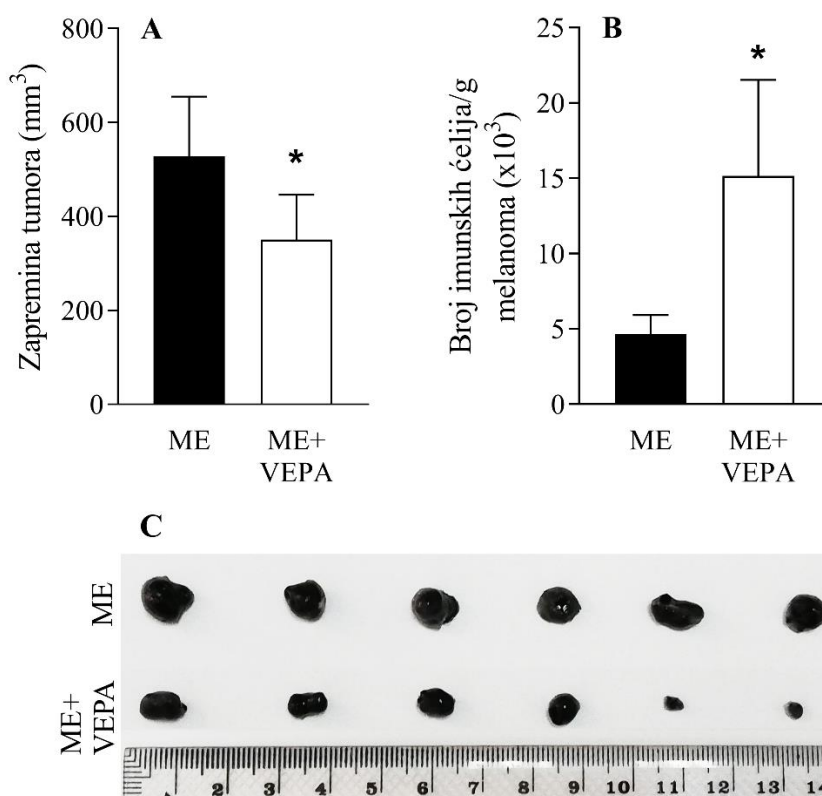


Grafik 11. Uticaj pretretmana VEPA na razvoj melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana je melanom indukovao subkutanom ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Tokom 15 dana praćena je incidencu pojave melanoma (A), kao i zapreminu tumora (B). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu.

S obzirom na tok razvoja melanoma, za *ex vivo* analizu izabran je 13. dan nakon inokulacije, dan kada su svi miševi u obe ispitivane grupe imali palpabilan tumor, ali je zapremina tumora usled pretretmana VEPA bila značajno manja u odnosu na netretiranu grupu. Svi naredni *ex vivo* eksperimenti rađeni su u toj vremenskoj tački.

Najpre su merene zapremina i masa izolovanih tumora i određen je broj ćelija imunskog sistema koje su infiltrirale u tumor, izažen kao broj ćelija imunskog sistema po gramu melanoma.

Rezultati su pokazali da pretretman VEPA, osim što smanjuje zapreminu tumora nakon inokulacije B16 ćelijama (Slika 17A,C), povećava i infiltraciju ćelija imunskog sistema u tumor (Slika 17B).



Slika 17. Uticaj pretretmana VEPA na zapreminu melanoma i infiltraciju ćelija imunskog sistema. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana je melanom indukovao subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i određena je zapremina tumora (A) i broj ćelija imunskog sistema po gramu melanoma (B). (C) Reprerzentativna slika izolovanih tumora. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisiranu grupu.

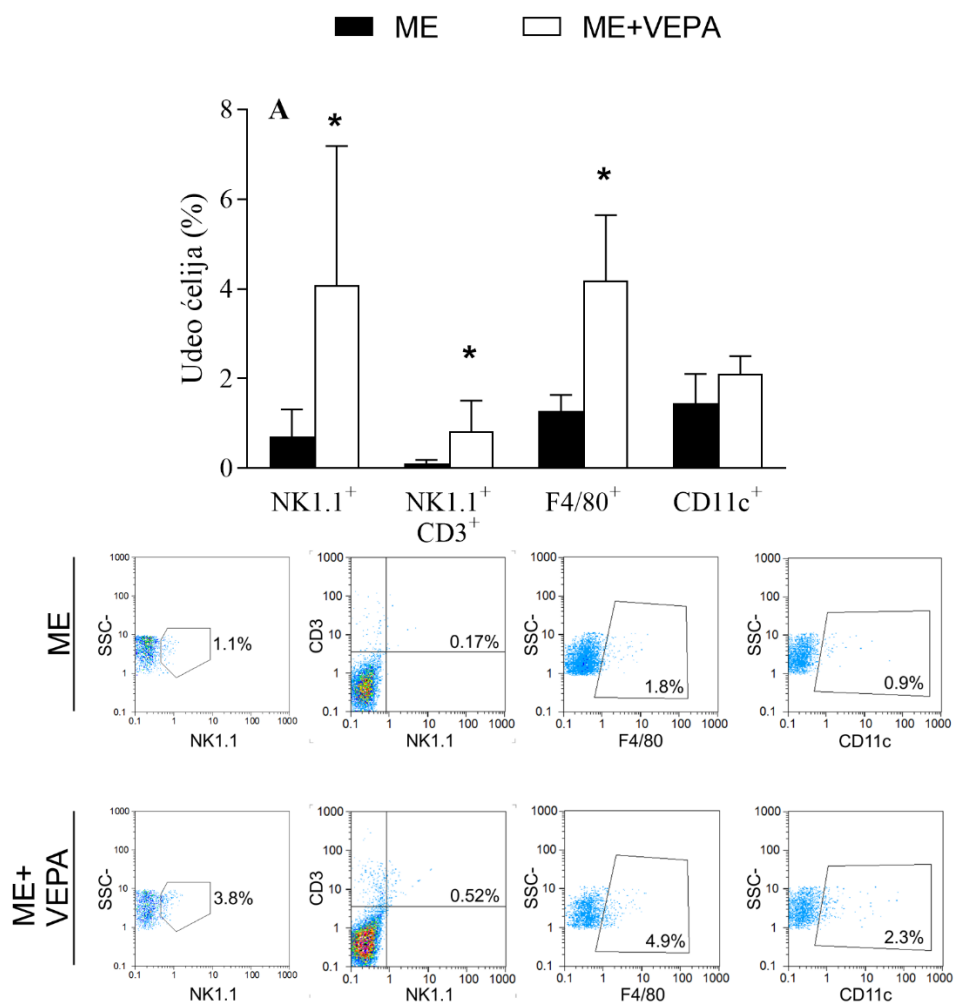
Ovi rezultati bi mogli ukazati da pretretman miševa VEPA povećanjem infiltracije ćelija imunskog sistema u TME dovodi do kasnije pojave melanoma i smanjenja njegove zapremine.

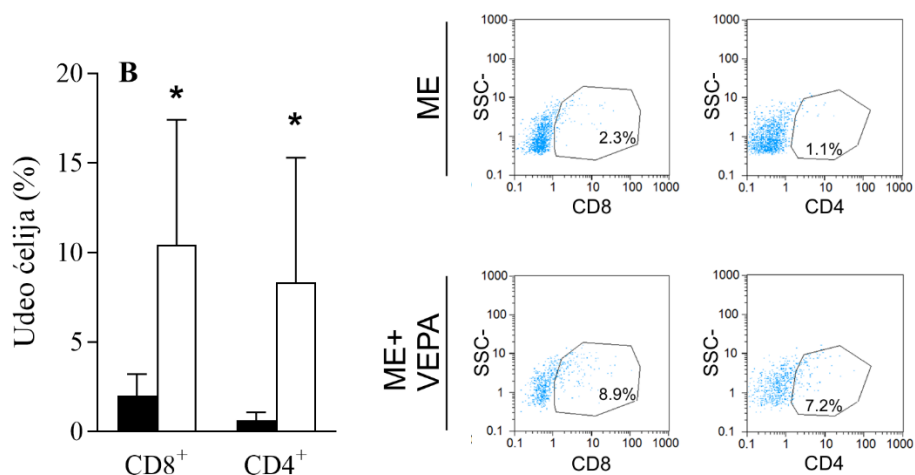
4.5.2. Uticaj pretretmana VEPA na imunski profil unutar tumora

Da bi se odredila zastupljenost različitih populacija ćelija urođenog i stečenog imunskog odgovora od značaja za antitumorski imunski odgovor, metodom protočne citofluorimetrije analizirani su limfociti koji infiltriraju tumor (engl. Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL). Pri tome, treba istaći

da TIL ne obuhvataju samo efektorske T limfocite, već i Treg, NK ćelije, dendritske ćelije i makrofage (Antohe i sad., 2019). Osim već opisane uloge ćelija urođene i stečene imunosti u antitumorskom imunskom odgovoru, subpopulacija NKT ćelija, koje nalikuju Th1 ćelijama, dodatno doprinosi eliminaciji transformisanih ćelija jer dovodi do brze stimulacije T ćelija specifičnih za antigene tumora, kao i efektorskih NK ćelija (Krijgsman i sar., 2018).

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA povećava zastupljenost određenih ćelija imunskog sistema unutar TIL nakon indukcije melanoma. Među ćelijama urođene imunosti pretretman VEPA povećava udeo NK, NKT ćelija i makrofaga, dok izostaje efekat na dendritske ćelije (Slika 18A). Kada su u pitanju T limfociti, VEPA utiče na povećanje i CD4⁺ i CD8⁺ T subpopulacije ovih ćelija (Slika 18B).

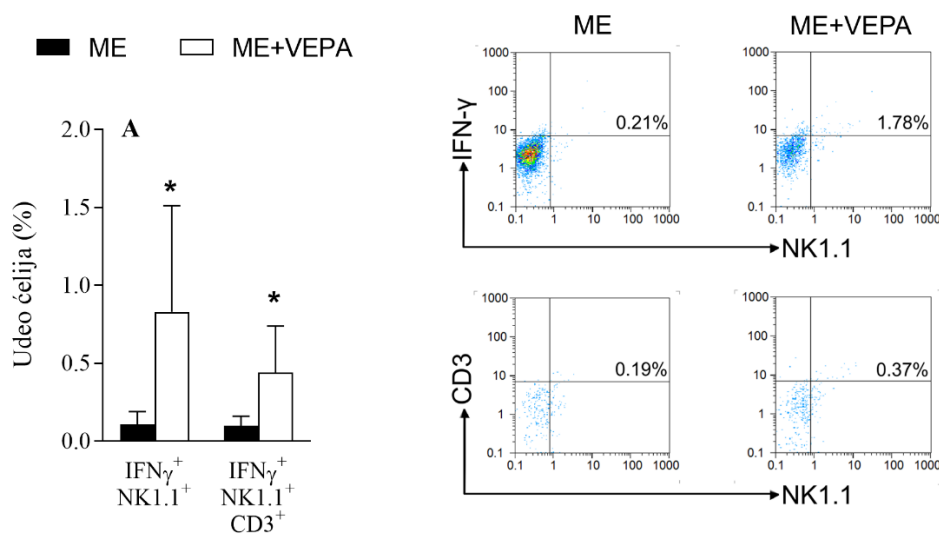


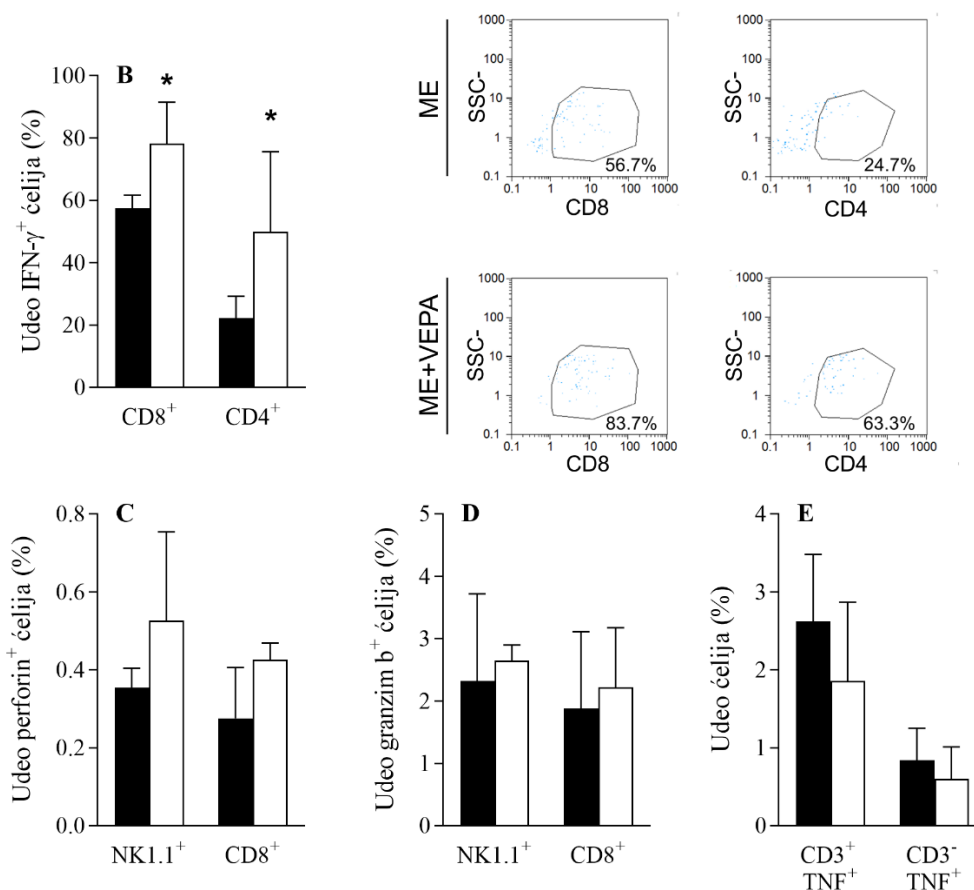


Slika 18. Uticaj pretretmana VEPA na distribuciju ćelija imunskog sistema unutar melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana je melanom indukovao subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije određen je udeo NK (NK1.1⁺) i NKT (NK1.1⁺CD3⁺) ćelija, makrofaga (F4/80⁺) i dendritskih ćelija (CD11c⁺) (A), sa reprezentativnim dot plotovima prikazanim sa donje strane grafika, kao i udeo CD8⁺ i CD4⁺ T limfocita (CD8⁺, odnosno CD4⁺ ćelije) unutar tumora (B), sa reprezentativnim dot plotovima prikazanim sa desne strane grafika. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu.

Da bi se ispitalo da li je povećana infiltracija ćelija imunskog sistema u tumor praćena efikasnijim antitumorskim odgovorom, ispitana su njihova efektorska svojstva određivanjem ekspresije proinflamacijskih medijatora u TME.

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA pre indukcije melanoma povećava udeo ćelija koje eksprimiraju IFN- γ , kako NK i NKT ćelija (Slika 19A), tako i CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita (Slika 19B), sugerišući na efikasniji imunski odgovor u TME usled pretretmana VEPA. Za razliku od IFN- γ , pretretman VEPA ne povećava udeo NK ćelija i T limfocita koji produkuju perforin (Slika 19C) i granzim b (Slika 19D), kao ni udeo ćelija koje produkuju TNF, bilo da su to limfociti (CD3⁺) ili nelimfocitne (CD3⁻) ćelije (Slika 19E), sugerišući da produkcija ovih proinflamacijskih medijatora nije mehanizam kojim VEPA ostvaruje dejstvo na ćelije imunskog sistema da deluju protiv melanoma.

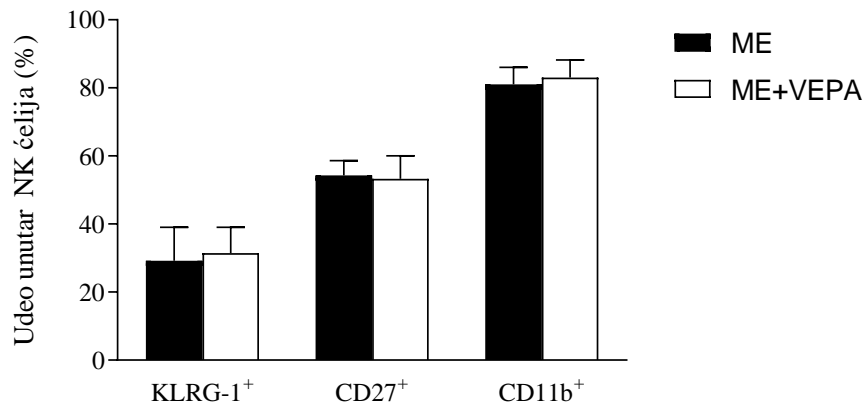




Slika 19. Uticaj pretretmana VEPA na udeo IFN- γ ⁺ i TNF⁺ ćelija unutar melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana melanom je indukovao subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije određen udeo IFN- γ ⁺ NK (IFN γ ⁺ NK1.1⁺) i IFN- γ ⁺ NKT (IFN- γ ⁺ NK1.1⁺ CD3⁺) ćelija (A), kao i udeo IFN- γ ⁺ ćelija unutar CD4⁺ i CD8⁺ ćelija (B) u TIL. Reprezentativni dot plotovi prikazani su sa desne strane. Određen je i udeo perforin⁺ (C) i granzim b⁺ (D) ćelija unutar NK1.1⁺ i CD8⁺ ćelija, kao i udeo TNF⁺ CD3⁺ i TNF⁺ CD3⁻ ćelija (E). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * p < 0,05 predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu.

NK ćelije su ćelije urođene imunosti koje imaju važnu ulogu u antitumorskom imunskom odgovoru, koje svoju ulogu ostvaruju nakon stimulacije aktivacionih receptora. Produkcijom IFN- γ ove ćelije pokreću mehanizme ubijanja transformisane ćelije, a utiču i na stimulaciju makrofaga. S obzirom na primećen efekat pretretmana VEPA na NK ćelije, dalje je ispitana ekspresija markera NK ćelija povezanih sa njihovom funkcijom. Metodom protočne citofluorimetrije određena je ekspresija KLRG-1, inhibitorynog receptora NK ćelija, CD27, markera aktivacije, i CD11b, adhezivnog receptora ovih ćelija.

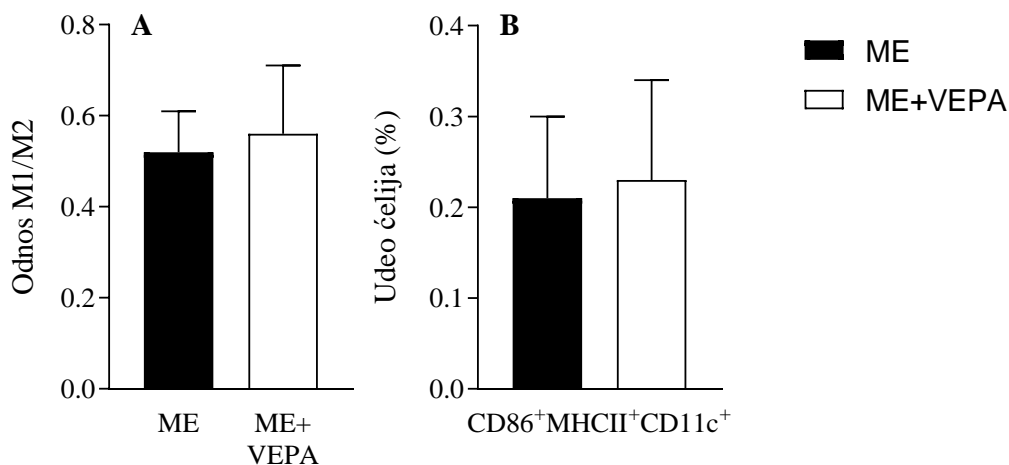
Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA pre indukcije melanoma ne utiče na ekspresiju posmatranih markera, KLRG-1, CD27, i CD11b, na NK ćelijama koje su infiltrisale tumor (Grafik 12), sugerišući da ovi markeri nisu uključeni u efektorski odgovor NK ćelija u TME koji je podstaknut pretretmanom VEPA.



Grafik 12. Uticaj pretretmana VEPA na ekspresiju markera NK ćelija unutar melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana melanom je indukovao subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije određen udeo KLRG-1⁺, CD27⁺ i CD11b⁺ ćelija unutar populacije NK ćelija. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$.

U daljem ispitivanju delovanja VEPA na razvoj melanoma određen je odnos M1 i M2 makrofaga unutar tumora. Takođe, određen je udeo antigen-prezentujućih dendritskih ćelija.

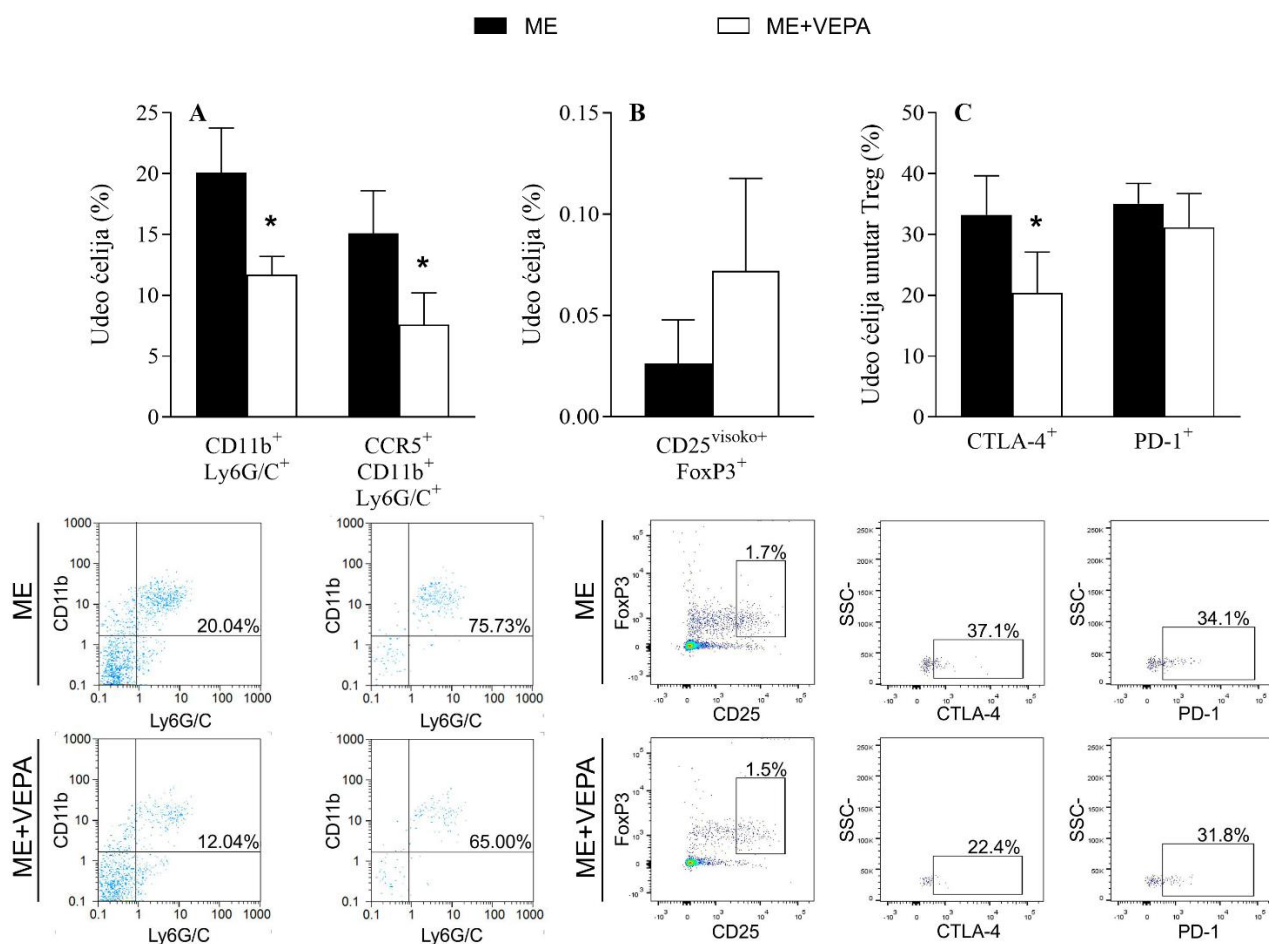
Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA ne menja značajno odnos proinflamacijskih i antiinflamacijskih makrofaga unutar tumora u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu (Grafik 13A), sugerišući da VEPA verovatno deluje na povećanje zastupljenosti obe subpopulacije ovih ćelija u TME. Osim što ne menja udeo dendritskih ćelija unutar melanoma, pretretman VEPA ne menja ni udeo antigen-prezentujućih dendritskih ćelija (Grafik 13B), sugerišući da TME verovatno nije glavno mesto prikazivanja antigena.



Grafik 13. Uticaj pretretmana VEPA na profil makrofaga i dendritskih ćelija unutar melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Melanom je indukovao osmog dana subkutanim ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije određen je odnos M1 (F4/80⁺ CD40⁺ ćelije) i M2 (F4/80⁺ CD206⁺ ćelije) makrofaga (A), kao i udeo antigen-prezentujućih dendritskih ćelija (CD86⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ ćelije) (B). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$.

Unutar tumora, osim ćelija koje deluju antitumorski, zastupljene su i supresorske populacije ćelija imunskog sistema, kao što su Treg i MDSC, koje suprimiraju efektorske ćelije imunskog sistema i na taj način promovišu rast tumora. Da bi se ispitaio uticaj VEPA i na ove ćelije nakon indukcije melanoma ispitana je njihova zastupljenost u TIL.

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA dovodi do smanjenja udela imunosupresivnih MDSC u TIL nakon indukcije melanoma. Pri tome, osim smanjenog udela ukupnih MDSC, smanjen je i udeo ovih ćelija koje eksprimiraju CCR5, koje se odlikuju izuzetnom imunosupresijom i tako promovišu rast tumora (Blattner i sar., 2018) (Slika 20A). Iako pretretman VEPA ne dovodi do promene udela Treg ćelija u TIL (Slika 20B), kao ni do promene udela Treg koje eksprimiraju PD-1, udeo Treg koje eksprimiraju CTLA-4 značajno je smanjen (Slika 20C). Kako je ekspresija ovog molekula na Treg u vezi sa progresijom tumora, ovo bi moglo ukazati da iako ukupna zastupljenost Treg u TME nije promenjena usled pretretmana VEPA, ove ćelije bi mogle biti manje efikasne u supresiji efektorskih ćelija imunskog sistema i samim tim ne bi doprinosile razvoju tumora.



Slika 20. Uticaj pretretmana VEPA na udeo imunosupresorskih ćelija unutar melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana melanom je indukovao subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije određen udeo MDSC (CD11b⁺ Ly6G/C⁺ ćelije) i CCR5⁺ MDSC (CCR5⁺ CD11b⁺ Ly6G/C⁺ ćelije) (A), udeo Treg (CD25^{visoko+} FoxP3⁺) ćelija (B), kao i udeo CTLA-4⁺ Treg (CD25^{visoko+} FoxP3⁺ CTLA-4⁺) i PD-1⁺ Treg (CD25^{visoko+} FoxP3⁺ PD-1⁺) (C) unutar melanoma. Reprezentativni dot plotovi prikazani su u donjem delu slike.

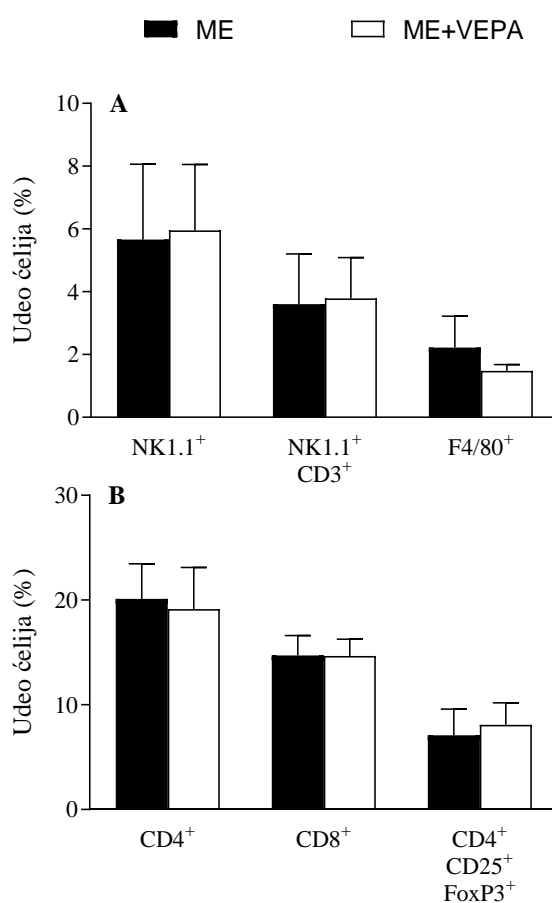
Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu.

Ovi rezultati ukazuju da pretretman VEPA stimuliše antitumorski imunski odgovor unutar tumora nakon njegove indukcije. Osim povećanja zastupljenosti ćelija koje su od značaja za antitumorski odgovor, produkcija $IFN-\gamma$ iz ovih ćelija je povećana, uz istovremeno smanjenje zastupljenosti ćelija imunskog sistema koje promovišu rast tumora.

4.5.3. Uticaj pretretmana VEPA na zastupljenost ćelija imunskog sistema unutar MLC-a

S obzirom na put administracije VEPA, dalje ispitivanje njegovog uticaja na razvoj melanoma usmereno je ka ispitivanju imunskog odgovora u MLC-u, kao delu limfnog tkiva creva. Metodom protočne citofluorimetrije analizirana je zastupljenost ćelija imunskog sistema od značaja za antitumorski imunski odgovor, čije je prisustvo povećano u TME, kao i zastupljenost Treg.

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA ne menja značajno udeo ćelija imunskog sistema u MLC-u nakon indukcije melanoma. Udeo ćelija urođene imunosti, NK, NKT ćelija i makrofaga (Grafik 14A), kao i ćelija stečene imunosti, $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita i Treg (Grafik 14B), u grupi pretretiranoj VEPA ostao je nepromenjen u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu.

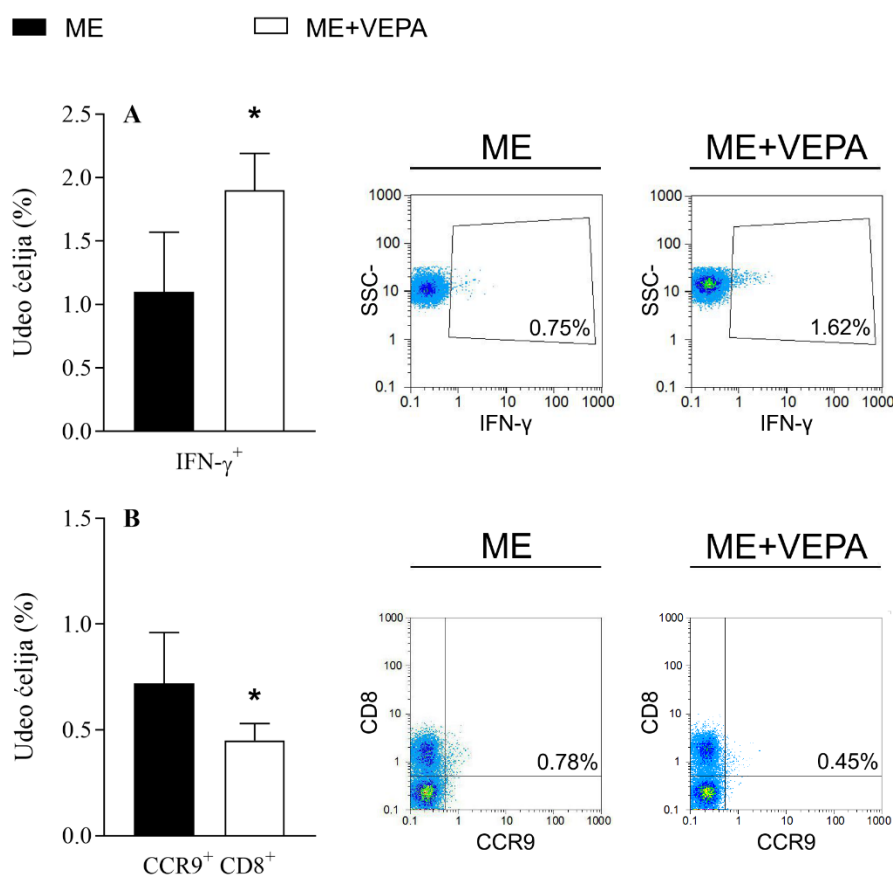


Grafik 14. Uticaj pretretmana VEPA na distribuciju ćelija imunskog sistema unutar MLC-a nakon indukcije melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa

primala vodu. Osmog dana melanom je indukovano subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije u MLČ-u je određen udeo NK (NK1.1⁺) i NKT (NK1.1⁺ CD3⁺) ćelija i makrofaga (F4/80⁺) (A), kao i udeo CD8⁺, CD4⁺ ćelija i Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD.

U ćelijama MLČ-a ispitana je i ekspresija IFN- γ , s obzirom na povećanu ekspresiju ovog proinflamacijskog citokina u TME usled delovanja VEPA. Dodatno, određivanjem ekspresije CCR9 na CD8⁺ T limfocitima ispitano je svojstvo ovih ćelija da migriraju, s obzirom da ćelije koje ekspresiraju CCR9 specifično naseljavaju crevo (Hammerschmidt i sar., 2008).

Rezultati su pokazali da pretretman miševa VEPA pre indukcije melanoma dovodi do povećanja udela ćelija koje proizvode IFN- γ u MLČ-u (Slika 21A), sugerišući na značaj ovog molekula u antitumorskom imunskom odgovoru usled primene VEPA. Dodatno, udeo CD8⁺ T ćelija koje ekspresiraju CCR9 unutar MLČ-a smanjen je u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu, sugerišući na smanjenu zastupljenost tkivno-specifičnih CD8⁺ T limfocita u limfnom tkivu creva usled delovanja VEPA i njihovu potencijalnu migraciju u TME (Slika 21B).



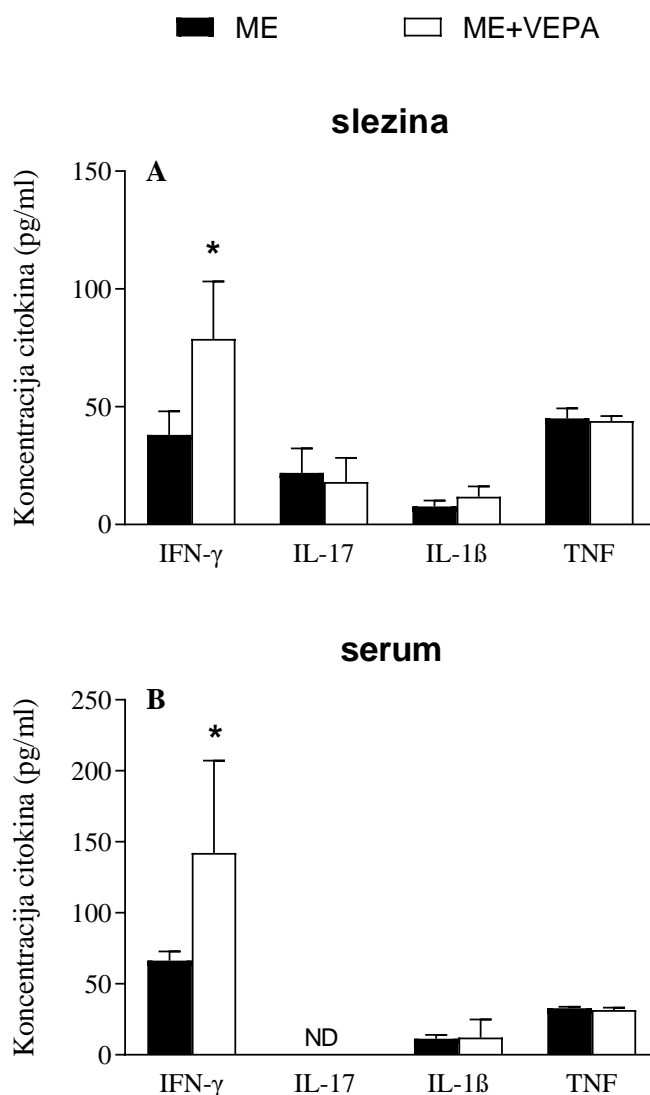
Slika 21. Uticaj pretretmana VEPA na antitumorski imunski odgovor u MLČ-u. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana melanom je indukovano subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i metodom protočne citofluorimetrije određen udeo IFN- γ ⁺ ćelija (A), kao i udeo CCR9⁺ CD8⁺ ćelija (B) unutar MLČ-a. Reprezentativni dot plotovi prikazani su sa desne strane. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu.

Ovi rezultati ukazuju da pretretman VEPA, iako ne menja zastupljenost ćelija urođene i stečene imunosti u MLC-u nakon indukcije tumora, ostvaruje izvesno antitumorsko dejstvo povećanjem produkcije IFN- γ i smanjenjem zastupljenosti tkivno-specifičnih citotoksičnih T limfocita.

4.5.4. Uticaj pretretmana VEPA na produkciju citokina u slezini i serumu

Dalje je u serumima i supernatantima ćelijske kulture splenocita poreklom iz netretiranih životinja ili životinja pretretiranih VEPA određena koncentracija proinflamacijskih citokina ELISA metodom, koja bi mogla oslikati sistemske efekte delovanja VEPA u tretmanu melanoma.

Dobijeni rezultati pokazali su isti trend u slezini (Grafik 15A) i serumu (Grafik 15B). Koncentracija IFN- γ nakon indukcije melanoma značajno je povećana usled pretretmana miševa VEPA, dok je efekat na koncentraciju IL-17, IL-1 β i TNF u serumu i njihovu produkciju u slezini izostao.



Grafik 15. Uticaj pretretmana VEPA na sistemska produkciju proinflamacijskih citokina nakon indukcije melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa

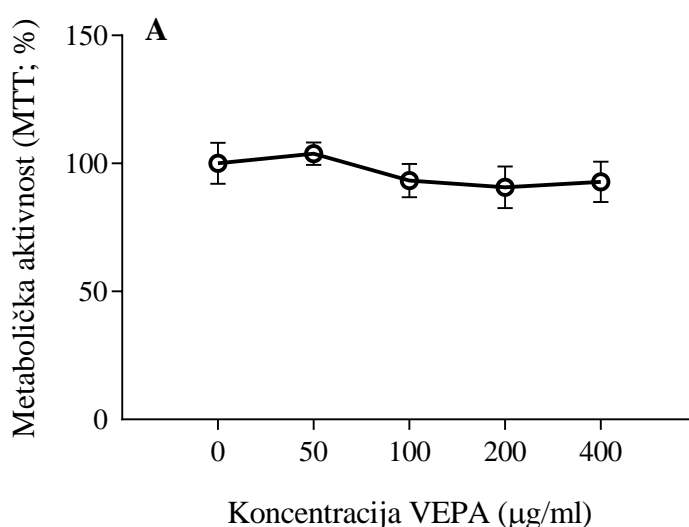
primala vodu. Osmog dana melanom je indukovano subkutano, ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i ELISA metodom određena je koncentracija IFN- γ , IL-17, IL-1 β i TNF u supernatantima 24 h ćelijske kulture splenocita (A) i u serumu (B). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokulisanu grupu. ND – nedetektibilna koncentracija.

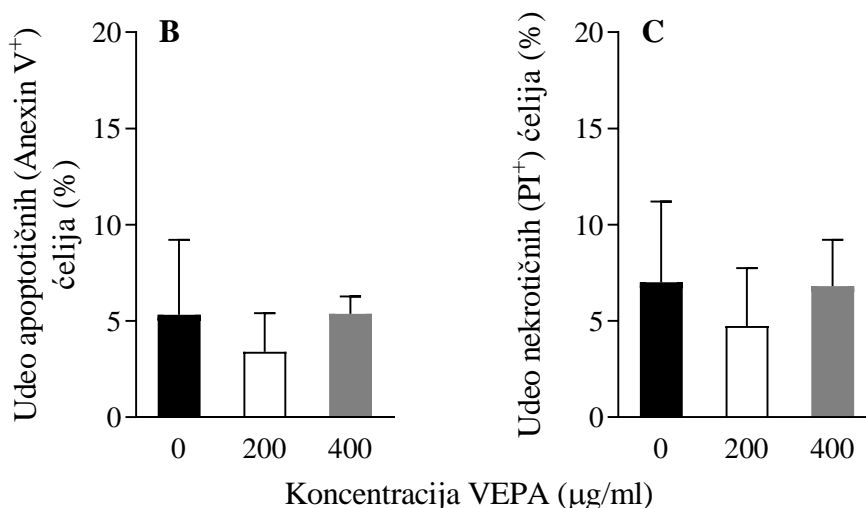
Ovi rezultati ukazuju da VEPA, osim na mestu inflamacije – mestu nastanka tumora i lokalnog mesta delovanja – limfnog tkiva creva, ostvaruje efekat i sistemski, povećavajući produkciju IFN- γ u slezini, kao i koncentraciju ovog citokina u serumu. Moglo bi se zaključiti da VEPA na sistemskom nivou deluje u cilju stimulacije antitumorskog imunskog odgovora.

4.5.5. Uticaj VEPA na B16 ćelije melanoma

Osim delovanja na imunski sistem, VEPA bi mogla ostvariti direktno dejstvo na tumorske ćelije. Stoga, B16 ćelije su gajene u prisustvu VEPA, nakon čega je određena vijabilnost B16 ćelija MTT testom, a udeo apoptotičnih i nekrotičnih ćelija određen je metodom protočne citofluorimetrije.

Rezultati su pokazali da primena VEPA ne ostvaruje efekat na vijabilnost B16 ćelija (Grafik 16A), niti dovodi do apoptoze i nekroze ovih ćelija (Grafik 16B,C), što ukazuje da VEPA ne ostvaruje direktan efekat na tumorske ćelije.

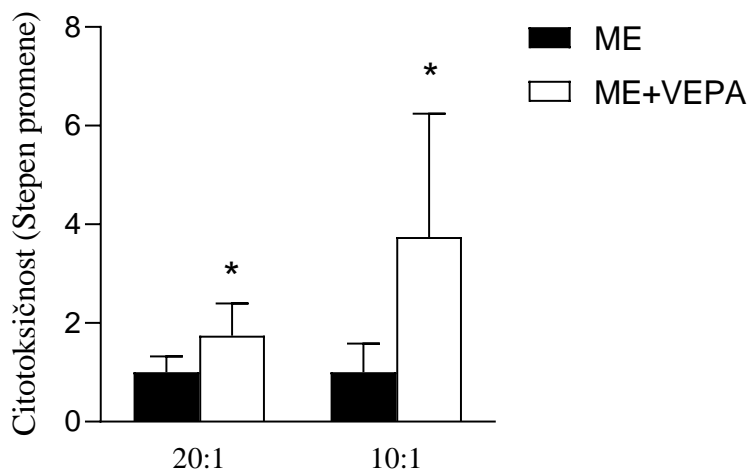




Grafik 16. Uticaj primene VEPA na B16 ćelije melanoma. B16 ćelije gajene su u prisustvu rastućih koncentracija VEPA (50 – 400 µg/ml) ili u odsustvu VEPA u trajanju od 24 h, nakon čega je MTT testom određena vijabilnost ćelija (A), dok su za određivanje udela apoptotičnih ili nekrotičnih ćelija primenjene doze VEPA od 200 i 400 µg/ml. Ćelije su izložene delovanju VEPA ili gajene u odsustvu VEPA tokom 24 h, nakon čega je metodom protočne citofluorimetrije određen udeo aneksin V⁺ apoptotičnih (B) i PI⁺ nekrotičnih (C) ćelija. Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

Dodatno, da bi se potvrdio mehanizam delovanja VEPA, ispitana je citotoksičnost ćelija slezine dobijenih iz VEPA pretretiranih ili netretiranih inokulisanih miševa prema B16 ćelijama. Ove ćelije gajene su u kokulturi, nakon čega je LDH testom određena citotoksičnost efektorskih ćelija slezine.

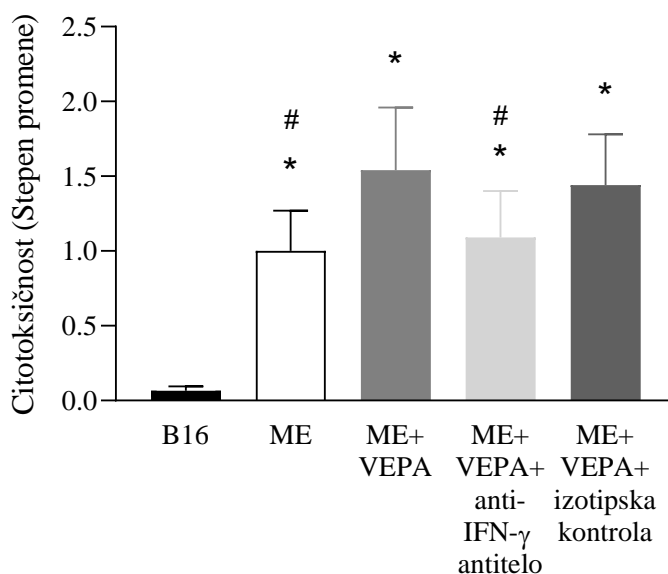
Rezultati su pokazali da pretretman VEPA povećava citotoksičnost ćelija slezine nakon indukcije melanoma. U kokulturi sa B16 ćelijama splenociti poreklom iz životinja pretretiranih VEPA pokazali su veću citotoksičnost u obe primenjene koncentracije, 10:1 i 20:1 (Grafik 17), u poređenju sa splenocitima poreklom iz netretiranih inokulisanih miševa, sugerišući da pretretman VEPA deluje na imunski sistem miša da efikasnije odgovori na melanom.



Grafik 17. Uticaj pretretmana VEPA na citotoksičnost splenocita u kokulturi sa B16 ćelijama melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana melanom je indukovao subkutanom ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i ćelije slezine postavljene su u kokulturu sa B16 ćelijama melanoma u odnosu 20:1 i 10:1. Nakon 48 h urađen je LDH test i određena je citotoksičnost splenocita poreklom iz pretretiranih inokuliranih (ME+VEPA) miševa i splenocita poreklom iz netretiranih inokuliranih (ME) miševa. Rezultati su normirani i iskazani kao stepen promene u odnosu na netretiranu inokuliranu grupu kojoj je dodeljena vrednost 1 i prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na netretiranu inokuliranu grupu.

Konačno, da bi se utvrdilo da li je produkcija IFN- γ glavni mehanizam dejstva VEPA, ponovljen je eksperiment citotoksičnosti ćelija slezine dobijenih iz VEPA pretretiranih ili netretiranih inokuliranih miševa prema B16 ćelijama, s tim što je dodatno primenjeno anti-IFN- γ antitelo u cilju neutralizacije IFN- γ .

Rezultati su pokazali da je usled primene neutrališućeg antitela na IFN- γ citotoksičnost splenocita poreklom iz VEPA pretretiranih životinja smanjena na nivo citotoksičnosti splenocita poreklom iz netretiranih inokuliranih životinja (Grafik 18). Ovi rezultati sugerišu da pretretman VEPA zaista pospešuje antitumorska svojstva ćelija slezine preko produkcije IFN- γ . Na validnost ovog rezultata ukazuje i primena kontrolnog antitela, koje nije dovelo do smanjenja citotoksičnosti ovih ćelija (Grafik 18).



Grafik 18. Uticaj pretretmana VEPA na citotoksičnost splenocita posredstvom IFN- γ u kokulturi sa B16 ćelijama melanoma. C57BL/6 miševi pretretirani su VEPA tokom sedam dana, dok je netretirana grupa primala vodu. Osmog dana melanom je indukovao subkutanom ubrizgavanjem $2,5 \times 10^5$ B16 ćelija i tretman je nastavljen do kraja eksperimenta. Trinaestog dana od inokulacije rađena je *ex vivo* analiza i ćelije slezine poreklom iz netretiranih inokuliranih (ME) i VEPA pretretiranih inokuliranih (ME+VEPA) životinja postavljene su u kokulturu sa B16 ćelijama melanoma u odnosu 20:1 u trajanju od 48 h. Kao negativna kontrola analizirani su supernatanti samih B16 ćelija. Dodatno, kokultura je gajena u prisustvu anti-IFN- γ antitela (ME+VEPA+anti-IFN- γ) ili izotipske kontrole (ME+VEPA+izotipska kontrola). Nakon 48 h urađen je LDH test i određena je citotoksičnost splenocita. Rezultati su normirani i iskazani kao stepen promene u odnosu na netretiranu inokuliranu grupu kojoj je dodeljena vrednost 1 i prikazani kao $SV \pm SD$. * $p < 0,05$ predstavlja

statistički značajnu promenu u odnosu B16 grupu. # $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu promenu u odnosu na ME+VEPA grupu.

Ovi rezultati pokazuju da VEPA ne deluje direktno na ćelije melanoma indukujući njihovu smrt, već deluje antitumorski posredstvom ćelija imunskog sistema. Usled pretretmana VEPA ćelije urođene i stečene imunosti produkuju IFN- γ i mehanizmima zavisnim od ovog citokina suprimiraju razvoj melanoma.

Rezultati dobijeni u trećem delu ove doktorske disertacije ukazuju na to da pretretman miševa VEPA pre indukcije melanoma i nastavak tretmana do kraja eksperimenta usporava nastanak tumora i smanjuje njegovu veličinu. VEPA deluje na ćelije imunskog sistema da migriraju u tumorsko mikrookruženje i produkuju IFN- γ , ali povećava produkciju ovog proinflamacijskog citokina i u limfnom tkivu creva i u slezini, dok je povećana koncentracija IFN- γ primećena i u serumu. Istovremeno, VEPA smanjuje imunosupresivne sposobnosti MDSC i Treg ćelija u TME. S obzirom da ne dovodi direktno do smrti B16 ćelija, VEPA svoje dejstvo ostvaruje isključivo imunomodulacijom i stimulacijom produkcije IFN- γ .

Objedinjeni rezultati ukazuju na to da VEPA deluje na imunski sistem tako da nakon infekcije ili pojave transformisanih ćelija pospeši proinflamacijski imunski odgovor. Obzirom da ne narušava opšte stanje zdravih miševa, VEPA je u dozi od 50 mg/kg telesne mase neškodljiv za upotrebu na ovim životinjama.

5. Diskusija

Dobijeni rezultati su pokazali da VEPA ispitivan u ovoj doktorskoj disertaciji poseduje imunomodulacijska svojstva. Primenjen *in vitro* i *in vivo*, VEPA je doveo do stimulacije ćelija imunskog sistema, što je rezultovalo bržom eliminacijom *L. monocytogenes* u mišjem modelu infekcije i do odložene pojave tumora i suprimiranja njegove progresije u mišjem modelu melanoma.

Polifenoli su najzastupljenije komponente ploda aronije. Oni predstavljaju veliku grupu bioaktivnih jedinjenja koja se nalaze u biljkama, koji su dalje klasifikovani u flavone, flavonole, antocijane, proantocijanidine, fenolne kiseline i druge. Glavnim mehanizmom dejstva polifenola smatrana je njihova direktna antioksidativna sposobnost, pri čemu antocijani naročito doprinose ovim svojstvima, što je pokazano ne samo kada je u pitanju aronija, već i drugo bobičavo voće – borovnice, brusnice i kupine (Joseph i sar., 2014). Takođe, zabeležena je velika antiinflamacijska aktivnost cijanidina i njihovih glukozida (Wang i sar., 1999; Jung i sar., 2014).

VEPA korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji ispoljio je imunomodulacijska dejstva, koja bi se mogla pripisati delovanju fenolnih jedinjenja. Naime, kao izolovana jedinjenja, polifenoli predstavljaju potentne modulatore imunskog odgovora. Oni utiču na regulaciju imunskog odgovora delovanjem na populacije ćelija imunskog sistema i modulišu produkciju proinflamacijskih citokina i njihovu gensku ekspresiju (Yahfoufi i sar., 2018). Mnoštvo studija govori o antiinflamacijskim efektima polifenola, koji se zasnivaju na inhibiciji proinflamacijskih citokina, enzima uključenih u inflamaciju, transkripcionih faktora i na redukciji diferencijacije Th1 i Th17 limfocita (Capiralla i sar., 2012; Siddiqui i sar., 2006; Gupta i sar., 2011; Wang i sar., 2013). Sa druge strane, pokazano je da polifenoli mogu i stimulisati imunski sistem. Oralna primena polifenola ekstrahovanih iz *Phoenix dactylifera L.* dovela je do povećane zastupljenosti dendritskih ćelija, makrofaga, NK ćelija i Th1 limfocita u Pejerovim pločama i slezini C3H/HeN miševa (Karasawa i sar., 2011), a primena polifenola iz cveta *Cassia auriculata* stimulisala je proliferaciju splenocita, kao i povećanje zastupljenosti T i B limfocita u modelu starenja kod pacova (John i sar., 2011).

Međutim, što se tiče efekata u pogledu neutralizacije slobodnih radikala, rezultati *in vitro* studija više se ne smatraju relevantnim za *in vivo* sisteme zbog toga što u većini tkiva polifenoli ne dostižu dovoljnu koncentraciju da bi se postigli značajni efekti (Fraga i sar., 2019). Takođe, antocijani aronije osetljivi su na alkalnu pankreasnu digestiju, što značajno utiče na njihovu biološku dostupnost i pokazano je da se rezultati *in vitro* i *in vivo* studija značajno razlikuju (Bermúdez-Soto i sar., 2007). U pacovskom modelu pokazano je da je apsorpcija antocijana niska u tankom crevu i želudcu, i to bi moglo biti objašnjeno transformacijom, metilacijom ili konjugacijom ovih jedinjenja sa glukuronskom kiselinom (Jurikova i sar., 2017; Talavéra i sar., 2004). Takođe je pokazano da na hemijsku stabilnost, apsorpciju i metabolizam antocijana utiču i aglikoni i molekuli šećera (Wu i sar., 2005). Međutim, osim antioksidativnih, otkriveni su i drugi mogući biohemijski i molekularni mehanizmi njihovog delovanja, uključujući unutarćelijske signalne puteve, kao što je regulacija sinteze transkripcionih faktora ili modulacija sinteze medijatora inflamacije, uključujući TNF, IL-1 β i IL-6 (Kim i sar., 2014). Ipak, studija u kojoj je određivana antioksidativna i antiinflamacijska aktivnost antocijana iz ploda aronije korišćenjem frakcije bogate antocijanima pokazala je snažniju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa resveratrolom. Međutim, iako je resveratrol doveo do povećane produkcije TNF i smanjene produkcije IL-10 iz stimuliranih humanih monocita, frakcija bogata antocijanima iz aronije pokazala je samo blag efekat na smanjenje produkcije IL-10, što sugerise da antocijani ne poseduju značajna imunomodulacijska svojstva (Xu i Mojsoska, 2013). Ovo bi moglo ukazati na to da za pokazana imunomodulacijska svojstva aronije nisu odgovorni antocijani, već druge biološki aktivne komponente koje se nalaze u sastavu njenog ploda.

Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja VEPA ispitanog u ovoj doktorskoj disertaciji u skladu je sa literaturnim podacima (Kulling i Rawel, 2008), ali sadržaj pojedinačnih antocijana u VEPA je niži u odnosu na sadržaj ovih jedinjenja u ekstraktima koji su ispitani u literaturi (30-80 mg ukupnih antocijana/g ekstrakta) i ukupni sadržaj antocijana izražen HPLC metodom iznosi svega 0,56 mg/g

ekstrakta. Iako je poznato da su antocijani izuzetno biološki aktivni, manji udeo antocijana u VEPA ide u prilog hipotezi da antocijani nisu jedina jedinjenja koja doprinose uočenim svojstvima ekstrakta. Sadržaj proantocijana, flavona i fenolnih kiselina je u skladu sa drugim ispitivanim ekstraktima (Kulling i Rawel, 2008), te bi se moglo pretpostaviti da su ove fenolne komponente takođe potakle proinflamacijski imunski odgovor, koji se kao takav pokazao protektivan u mišjim modelima infekcije i melanoma. Takođe, bitno je naglasiti da je često za biološku aktivnost različitih ekstrakata pokazano da je od značaja i sinergističko delovanje različitih grupa jedinjenja (Vaou i sar., 2022).

Različiti ekstrakti aronije ispitani su u životinjskim modelima različitih inflamatornih stanja, pri čemu opseg primenjenih doza iznosi od 10 do 2680 mg/kg telesne mase (Kang i sar., 2017; Valcheva-Kuzmanova i sar., 2018). Sve ispitane doze pokazale su povoljne efekte. Kada je u pitanju VEPA korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji, ispitana je potencijalna kontaminacija ekstrakta živim bakterijama ili endotoksinom i isključena kao uzrok aktivacije ćelija imunskog sistema. Stoga bi pokazani efekti ovog ekstrakta i delovanje različito od nekih rezultata zabeleženih u literaturi mogli biti pripisani proceduri ekstrakcije ili sadržaju nefenolnih komponenti VEPA. Naime, iako je ukupni sastav polifenola u skladu sa literaturnim podacima, sadržaj organskih kiselina, šećera, dijetetskih vlakana, minerala, vitamina i proteina mogao bi se razlikovati i uticati na biološku aktivnost ekstrakta, kao i njihov međusobni odnos.

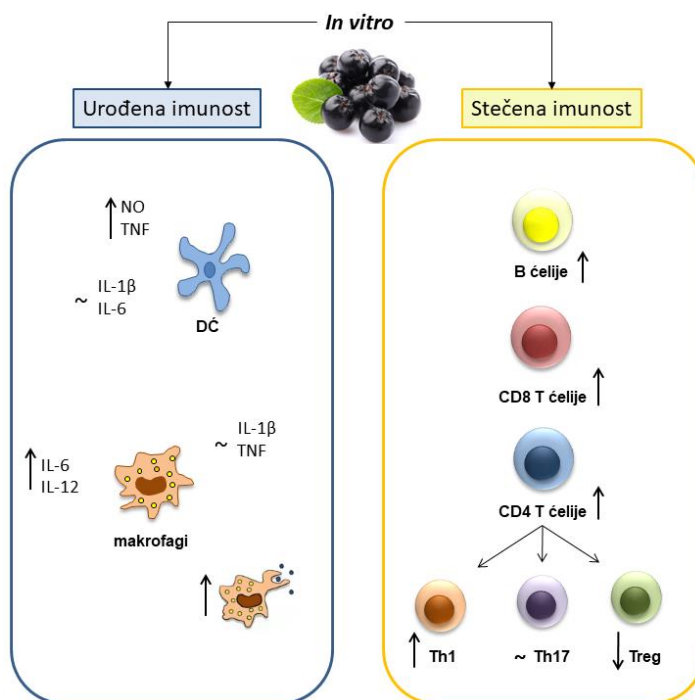
Osim VEPA, i drugi biljni ekstrakti ispoljili su proinflamacijsko dejstvo. Slično pokazanim efektima VEPA, vodeni ekstrakt ličija stimulisao je proinflamacijske medijatore IL-1 β , iNOS i ciklooksigenazu-2 u RAW264.7 ćelijskoj liniji makrofaga (Wang i sar., 2016). Za ovakve efekte zaslužni su specifični proteini identifikovani u ličiju. U skladu sa tim, proteini bi mogli biti zaslužni za efekte VEPA pokazane u ovoj doktorskoj disertaciji. Takođe, pektini dobijeni iz citrusa mogu povećati produkciju IL-17, IFN- γ i TNF iz mišjih splenocita nakon unosa ovih pektina kroz pijaću vodu tokom 21 dana (Merheb i sar., 2019). Pektini su takođe visoko zastupljeni u ekstraktima aronije, u kojima je sadržaj pektina sličan onom u jabukama i kruškama, za koje je poznat visok sadržaj ovog jedinjenja (Nawirska i Kwaśniewska, 2005). Stoga, proinflamacijska priroda VEPA mogla bi biti povezana i sa delovanjem pektina koji su prisutni u ekstraktu.

Studije koje su ispitivale uticaj aronije na imunski sistem uglavnom su pokazale efekat na produkciju proinflamacijskih medijatora, bez ispitivanja delovanja na zastupljenost populacija ćelija imunskog sistema ili njihovih efektorskih funkcija. Ove studije ukazuju na antiinflamacijska svojstva aronije. Tako, ekstrakt ploda aronije primenjen u dozi od 10 ili 100 mg/kg telesne mase poboljšao je kliničku sliku u ulceroznom kolitisu indukovanom dekstran natrijum sulfatom kod BALB/c miševa i uticao je na smanjenje proinflamacijskih medijatora NO, IL-6 i TNF u makrofagima stimulisanim sa LPS (Kang i sar., 2017). U mišjem modelu kolitisa izazvanog transferom T ćelija, suplementacija hrane prahom aronije tokom pet nedelja inhibirala je inflamaciju u crevu delujući na smanjenje odnosa težine i dužine kolona, kao i smanjenje ekspresije TNF i IFN- γ . Osim toga, primena aronije smanjila je inflamaciju i na sistemskom nivou (Pei i sar., 2019). Studija na dijabetičnim Wistar pacovima koja se bavila uporednom analizom polifenolnog ekstrakta aronije i crne zove pokazala je da primena aronije kod dijabetičnih pacova smanjuje koncentraciju TNF i IFN- γ u serumu u odnosu na nedijabetične pacove tretirane aronijom. Međutim, u obe grupe pacova došlo je do dozno-zavisnog porasta koncentracije ovih proinflamacijskih citokina u serumu (Badescu i sar., 2015).

Sa druge strane, studije koje su se detaljnije bavile imunomodulacijskim svojstvima crne aronije pokazale su i stimulatívni efekat na ćelije i medijatore imunskog sistema. Tako, primena ekstrakta aronije fermentisanog od strane *Lactobacillus plantarium* na BALB/c miševu tokom 21 dana u dozama od 125, 250 i 500 mg/kg telesne mase povećala je migraciju neutrofila i fagocitozu, kao i proliferaciju splenocita, a takođe i zastupljenost CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u slezini. Takođe, u ovoj studiji uočeno je dozno-zavisno povećanje koncentracije IFN- γ , IL-2 i IL-4 u krvnoj plazmi, dok je koncentracija TNF i IL-6 bila smanjena (Ali i sar., 2021). Nanokompleks aronije sa fukoidanom

primenjen na RAW264.7 ćelijsku liniju makrofaga povećao je produkciju IL-2, IL-6, TNF i NO, a primenjen *in vivo*, na BALB/c miševе kojima je ciklofosfamidom indukovana imunosupresija, povećao je koncentraciju IL-2, IL-6, TNF, IL-10, IL-12 i IFN- γ u serumu i slezini ovih miševa (Han i sar., 2021). Osim stimulacije imunskog sistema u životinjskim modelima, studija koja je kombinovala primenu aronije sa pektinima iz jabuke kod pacijenata sa kancerom dojke u terapiji tokom postoperativne radijacije pokazala je značajno povećanje broja CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, kao i NK ćelija (Yaneva i sar., 2002). Takođe, primena soka od aronije kod osoba sa rizikom od kardiovaskularnih oboljenja dovela je do povećanja ekspresije iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi za proinflamacijske medijatore kao što su TNF, IL-1 β i IL-8, rezultujući proinflamacijskim miljeom, koji nije pogodan u ovakvim stanjima (Stojković i sar., 2020).

U ispitivanju ciljeva ove doktorske disertacije, VEPA primenjen na ćelije urođene imunosti, dendritske ćelije, doveo je do povećanja produkcije NO, proinflamacijskog medijatora koji je važan za eliminaciju patogena (Fonseca i sar., 2003), pri tome ne smanjujući preživljavanje ovih ćelija. Iako neki gore navedeni literaturni podaci pokazuju drugačije, ovi rezultati su u skladu sa studijom koju su u radili Han i saradnici, koja je pokazala povećanu produkciju NO iz makrofaga *in vitro* nakon primene nanokompleksa u kome se nalaze ekstrakt aronije i fukoidan (Han i sar., 2021). U skladu sa zabeleženom povećanom produkcijom NO, dendritske ćelije i makrofagi nakon primene VEPA povećano su proizveli proinflamacijske citokine TNF, odnosno IL-6 i IL-12. Dodatno, kako je za eliminaciju mikroorganizama, kao i za prikazivanje antigena i sledstvenu aktivaciju naivnih T limfocita neophodan proces fagocitoze (Guerriero, 2019), povećana fagocitna sposobnost makrofaga nakon primene VEPA sugerise da VEPA stimuliše efektorska svojstva ovih ćelija.



Slika 22. *In vitro* delovanje VEPA na ćelije urođene i stečene imunosti pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji.

Osim na ćelije urođene imunosti, VEPA je ostvario uticaj i na ćelije stečenog imuniteta *in vitro*. Primena VEPA dovela je do povećanja udela B i T limfocita, pri čemu i CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita. Iako produkcija citokina IFN- γ , IL-17 i TGF- β karakterističnih za Th1, Th17, odnosno Treg ćelije nije bila promenjena usled primene VEPA, ovaj ekstrakt primenjen na naivne T limfocite stimulisao je Th1 diferencijaciju, dok je suprimirao diferencijaciju naivnih CD4⁺ T limfocita u Treg. S

obzirom da je Th1 diferencijacija proces zavisan od IL-12 (Zhang i sar., 2014), ovo bi se moglo povezati sa tim da je primena VEPA dovela do povećane produkcije IL-12 iz makrofaga i da VEPA upravo preko IL-12 stimuliše Th1 diferencijaciju. Osim toga, inhibicija Treg diferencijacije takođe bi mogla biti razlog stimulacije Th1 diferencijacije. Međutim, iako usled primene VEPA makrofagi povećano proizvode i IL-6, citokin koji promovira Th17 diferencijaciju, diferencijacija naivnih T limfocita u Th17 subpopulaciju nije promenjena usled primene VEPA. Razlog može biti u tome što ove ćelije zahtevaju prisustvo i TGF- β (Korn i sar., 2009), čija je koncentracija u supernatantima splenocita ostala nepromenjena nakon primene VEPA. Pokazani efekti *in vitro* primene VEPA na ćelije urođene i stečene imunosti prikazani su na slici 22.

In vivo, oralna primena VEPA takođe je ostvarila dejstvo na ćelije imunskog sistema miša. Kada je u pitanju limfno tkivo creva, tretman miševa VEPA povećao je broj ćelija unutar Pejerovih ploča, u kojima je došlo do promene zastupljenosti različitih populacija ćelija imunskog sistema. Međutim, obzirom da su B limfociti najzastupljenije ćelije Pejerovih ploča, čineći više od polovine ćelija imunskog sistema u ovom tkivu (Jung i sar., 2010), primena VEPA značajno je povećala apsolutni broj jedino B limfocita. Pokazano povećanje broja ćelija u Pejerovim pločama moglo se odigrati ili delovanjem VEPA na *in situ* proliferaciju ćelija ili na migraciju ćelija iz drugih tkiva, što nije dalje ispitivano u ovoj doktorskoj disertaciji. Tretman miševa VEPA nije promenio apsolutni broj intraepitelnih limfocita, ali je promenio zastupljenost makrofaga i citotoksičnih T limfocita, i kada je u pitanju udeo i kada je u pitanju apsolutni broj ovih ćelija. Dok je zastupljenost makrofaga unutar intraepitelnih limfocita povećana usled tretmana VEPA, zastupljenost CD8⁺ T limfocita je smanjena. Osim toga, smanjen je i udeo efektorskih T limfocita, CD4⁺ CD25^{srednje+} ćelija. Ovo bi moglo ukazati da unutar intraepitelnih limfocita VEPA dovodi do stimulacije ćelija urođene imunosti, ali da u odsustvu stimulusa na koji treba pokrenuti imunski odgovor ne dolazi do aktivacije ćelija stečene imunosti. U prilog tome idu rezultati dobijeni u mišjim modelima infekcije i melanoma, u kojima primena VEPA, osim povećanja zastupljenosti makrofaga, dovodi i do povećanja zastupljenosti efektorskih ćelija stečene imunosti značajnih za eliminaciju *L. monocytogenes*, odnosno melanoma. Dodatno, iako menja zastupljenost ćelija imunskog sistema u limfnom tkivu creva, tretman VEPA oralnom gavažom ne dovodi do oštećenja zida tankog creva, niti dovodi do morfoloških promena mukoze, submukoze i mišićnog sloja, što ukazuje na odsustvo toksičnosti primenjene koncentracije VEPA *in vivo*.

Osim lokalnog mesta delovanja VEPA, ispitan je i efekat koji ovaj ekstrakt ostvaruje na nivou slezine, koji bi mogao odraziti uticaj VEPA na sistemski imunski odgovor. U supernatantima ćelijske kulture splenocita tretiranih životinja pokazano je da VEPA pospešuje produkciju proinflamacijskog citokina IFN- γ , dok ne ostvaruje uticaj na produkciju IL-17, što je u skladu sa rezultatima dobijenim *in vitro*, gde je pokazano da VEPA stimuliše diferencijaciju Th1 subpopulacije T limfocita, koje proizvode upravo IFN- γ u cilju ostvarivanja svojih efektorskih svojstava.

Ovi rezultati pokazali su da oralna primena VEPA u dozi od 50 mg/kg telesne mase neškodljiva za upotrebu jer ne narušava opšte stanje miševa, ne dovodi do smrtnih ishoda, niti dovodi do oštećenja zida creva. S obzirom da *in vitro* primena VEPA deluje na ćelije imunskog sistema i pospešuje oslobađanje proinflamacijskih medijatora, što je potvrđeno i u *in vivo* uslovima nakon oralnog tretmana miševa, moglo bi se zaključiti da VEPA ima proinflamacijsko dejstvo.

Generalno, proinflamacijsko dejstvo različitih prirodnih i sintetskih jedinjenja ili smeše jedinjenja korisno je za modulaciju imunskog odgovora tokom infekcija i kancera. S obzirom na sve češću pojavu rezistencije na antibiotike, biljni produkti ostvaruju veliki potencijal na polju lečenja bakterijskih infekcija, naročito unutarćelijskim patogenima, kako zbog svoje dostupnosti, niske cene i netoksičnosti, tako i zbog svojih bioaktivnih komponenti koje mogu samostalno ili u kombinaciji sa drugim terapeutima ostvariti baktericidno dejstvo.

Hipoteza o protektivnom efektu VEPA u mišjem modelu infekcije *L. monocytogenes*, unutarćelijske bakterije za čiju je eliminaciju neophodan jak proinflamacijski odgovor (Pamer, 2004), pokazala se tačnom. Primena VEPA sedam dana pre inficiranja miševa dovela je do brže eliminacije bakterije iz organizma. Pretretman VEPA, osim što je doveo do značajno manjeg gubitka telesne mase usled infekcije *L. monocytogenes*, sprečio je i uvećanje slezine, kao i prisustvo bakterije u ovom tkivu.

L. monocytogenes uneta oralnim putem dospeva u mukozu creva direktno, preko enterocita, ili indirektno, putem Pejerovih ploča, nakon čega sistemski dospeva do slezine, jetre i mozga (Schuppler i Loessner, 2010; Pitts i D'Orazio, 2018). Drugog dana nakon administracije *L. monocytogenes*, u piku infekcije, pretretman VEPA povećao je zastupljenost CD11b⁺ makrofaga i CD8⁺ T ćelija i na mestu inicijacije infekcije – u Pejerovim pločama, kao i u ciljnom organu, slezini. Ovo je naročito važno jer smanjeno prisustvo *L. monocytogenes* u slezini može biti posledica efikasnijeg imunskog odgovora na bakteriju u ovom tkivu i/ili u limfnom tkivu creva i samim tim manjeg broja bakterija koje su prošle crevnu barijeru. Pri tome, najznačajnije ćelije za eliminaciju unutarćelijskih bakterija su makrofagi, zahvaljujući svojstvu fagocitoze i produkcije ROS i NO, koji učestvuju u ubijanju bakterije, kao i citotoksični CD8⁺ T limfociti, koji produkcijom perforina i granzima b direktno ubijaju zaražene ćelije (Pamer, 2004). S obzirom da je tretman VEPA u odsustvu infekcije doveo do promene zastupljenosti samo dendritskih ćelija u Pejerovim pločama i CD4⁺ T limfocita u slezini, ćelija koje nisu neophodne za eliminaciju *L. monocytogenes* ali su važne za aktivaciju efektorskih ćelija, može se zaključiti da je pokazana brža eliminacija *L. monocytogenes* kod miševa pretretiranih VEPA najverovatnije rezultat promena u imunskom sistemu koje su se desile pre infekcije i sledstvene brže aktivacije ćelija značajnih za antibakterijski imunski odgovor nakon infekcije. Dodatno, izostanak tretmana jedan dan pre inficiranja miševa isključio je direktan antibakterijski efekat VEPA.

Najuočljivija promena u piku infekcije nastala je u imunskom sistemu creva, gde je pretretman VEPA, osim što je povećao udeo CD11b⁺ makrofaga, povećao i fagocitnu sposobnost mijeloidnih ćelija, što je u skladu sa pokazanim *in vitro* rezultatima koji su takođe pokazali povećanu fagocitnu sposobnost makrofaga usled primene VEPA. Sličan efekat opisan je u studiji u kojoj proteinska frakcija dobijena iz belog luka povećava citotoksičnost makrofaga i njihovu fagocitnu sposobnost *in vitro* i aktivira makrofage da stimulišu proliferaciju limfocita (Hirao i sar., 1987). Vodeni ekstrakt *Aralia cordata*, biljke koja se se u azijskoj tradicionalnoj medicini koristi kao antiinflamacijski lek, primenjen na makrofage dobijene iz kostne srži doveo je do dozno-zavisne aktivacije ovih ćelija, povećane produkcije NO i proinflamacijskih citokina, kao i do brže eliminacije *L. monocytogenes in vivo* pospešivanjem antibakterijskog imunskog odgovora. Imunomodulacijska svojstva ovog ekstrakta uključuju TLR/MyD88 i NF-κB/MAPK signalne puteve (Seo i sar., 2016). Tretman VEPA pre inficiranja miševa, osim povećane fagocitne sposobnosti mijeloidnih ćelija Pejerovih ploča, doveo je i do povećane produkcije ROS iz ovih ćelija. Takođe, pokazano je da je primena kvercetina, jedne od aktivnih komponenti flavonoida, u mišjem modelu leukemije dovela do povećane fagocitne sposobnosti peritonealnih makrofaga (Yu i sar., 2010). S obzirom da su flavonoidi visoko zastupljeni u VEPA, ova jedinjenja bi mogla biti odgovorna za stimulaciju fagocitoze koja je usled primene VEPA primećena u ćelijama Pejerovih ploča nakon inficiranja miševa *L. monocytogenes*, ali i *in vitro*.

Nakon oralne primene *L. monocytogenes*, u MLC-u dolazi do prikazivanja antigena naivnim CD8⁺ T limfocitima, prvenstveno od strane dendritskih ćelija (Qiu i sar., 2018). Kao što je već pominjano, mijeloidne ćelije fagocituju patogene i potom povećavaju ekspresiju kostimulatornih molekula CD80, CD86 ili CD40, koji posreduju u aktivaciji ćelija adaptivnog imuniteta (D'Orazio, 2019). S tim u vezi, u MLC-u inficiranih miševa usled administracije VEPA došlo je do povećane zastupljenosti CD11c⁺ CD86⁺ ćelija, koje bi se mogle pripisati dendritskim ćelijama koje ekspimiraju CD86, ali i CD11b⁺ CD86⁺ ćelija, koje bi se mogle pripisati makrofagima koji ekspimiraju CD86. Ovo bi moglo ukazati da VEPA stimuliše svojstva APC da aktiviraju naivne T limfocite.

Prisustvo dendritskih ćelija u slezini drugog dana nakon inokulacije *L. monocytogenes* bilo je smanjeno u grupi pretretiranoj VEPA, što bi moglo ukazati da slezina, ciljani organ za diseminaciju ove bakterije ne predstavlja primarno mesto u kome dolazi do prikazivanja antigena i aktivacije efektorskih T ćelija. Međutim, povećana zastupljenost makrofaga u slezini praćena je povećanom zastupljenošću CD86⁺ makrofaga u ovom tkivu, što ukazuje da VEPA, osim što pospešuje efektorska svojstva ovih ćelija da eliminišu bakteriju, ipak stimuliše i svojstva koja učestvuju u aktivaciji ćelija adaptivne imunosti. Nalik dešavanjima u slezini, i na mestu inicijacije infekcije, u Pejerovim pločama, VEPA je povećao zastupljenost CD86⁺ makrofaga, dok je efekat na zastupljenost CD86⁺ dendritskih ćelija izostao.

Osim povećane zastupljenosti makrofaga koji ekspimiraju ovaj kostimularorni molekul, usled pretretmana VEPA, među ćelijama slezine povećana je i ekspresija iRNK za IL-6, citokin koji je važan za eliminaciju *L. monocytogenes* od strane mijeloidnih ćelija (Lücke i sar., 2018), ali i za aktivaciju ćelija adaptivne imunosti i ispoljavanje efektorskih svojstava CD8⁺ T limfocita (Böttcher i sar., 2014). Dodatno, pretretman VEPA povećao je i ekspresiju iRNK za iNOS u splenocitima. Slični rezultati dobijeni su *in vitro*, na peritonealnim makrofagima, u kojima je primena VEPA povećala ekspresiju iNOS i IL-6, kao i produkciju NO. Ovi rezultati, iako u suprotnosti sa literaturnim podacima do kojih su došli Yahfoufi i sar. (2018), koji svedoče o uticaju aronije na smanjenje produkcije NO, u skladu su sa pokazanim delovanjem VEPA *in vitro* i *in vivo*.

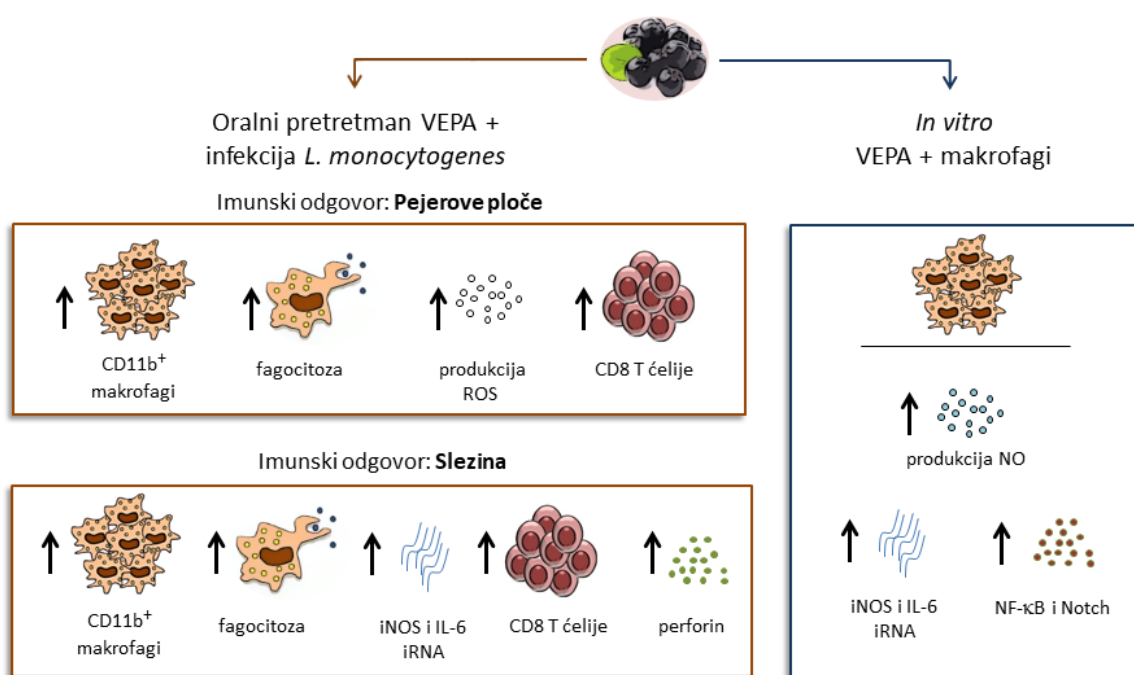
Međutim, postoje i studije koje su pokazale stimulatorne efekte aronije na produkciju NO, kako primene etanolne frakcije aronije na endotelne ćelije *in vitro* (Varela i sar., 2016), tako i soka od aronije *in vivo* (Kim i sar., 2013). Takođe, osim ekstrakata aronije i drugi ekstrakti su pokazali stimulatorni efekat na aktivaciju makrofaga i produkciju NO. Tako, vodeni ekstrakt *Herba pogostemonis* povećava ekspresiju iRNK za iNOS u makrofagima i menja njihovu morfologiju štiteći miševе od oštećenja jetre izazvane infekcijom *Salmonella typhimurium* i smrti (Kim i sar., 2012). Ekstrakt *Echinacea purpurea* aktivira urođeni imunski odgovor, stimulišući produkciju IL-6, TNF, IL-12 i NO iz makrofaga *in vitro* (Sullivan i sar., 2008). Određeni flavonoidi, kao što su proantocijanidini mogu umereno povećati nivo NO u makrofagima (Kolodziej i sar., 2001), kao i u endotelnim ćelijama (Furuuchi i sar., 2018). U radu López-López i sar. (2004), detaljnije su ispitani efekti kvercetina na NO i pokazano je da oni imaju sposobnost povećanja produkcije NO, kao i da ostvaruju dugotrajniji efekat NO jer dovode do supresije enzima koji učestvuju u stvaranju ROS i vrše redukciju superoksida i peroksinitrita, koji neutralizuju NO. Međutim, povećana produkcija ROS nakon primene VEPA nije mehanizam povećanja NO. Rezultati su pokazali da VEPA deluje na signalne puteve koji vode nastanku NO, kao što je povećana aktivacija transkripcionog faktora NF-κB i sledstvena stimulacija ekspresije iRNK za iNOS.

Osim povećane ekspresije proteina pI-κB/I-κB, VEPA je povećao ekspresiju i Notch1. Na osnovu toga bi se moglo se zaključiti da stimulatorni efekat na makrofage VEPA verovatno ostvaruje upravo aktivacijom transkripcionog faktora NF-κB i regulatora transkripcije Notch1. Naime, IL-6 može biti regulisan kanonskim NF-κB signalnim putem (Kishimoto, 1989) samostalno ili u kombinaciji sa Notch1, proteinom koji omogućava deaktivaciju specifičnih represora RNK transkripcije (Wongchana i Palaga, 2012). Stoga, povećanje ekspresije NF-κB i Notch1 u makrofagima nakon primene VEPA najverovatnije je odgovorno za povećanu ekspresiju iRNK za IL-6. Dodatno, povećana ekspresija CD86 mogla bi biti odgovorna za povećanu ekspresiju IL-6, jer je pokazano da unakrsno vezivanje CD80/CD86 stimuliše IL-6 u dendritskim ćelijama preko NF-κB i Notch1 (Koorella i sar., 2014).

Povećanje ekspresije CD86 u limfnom tkivu creva i u slezini nakon infekcije *L. monocytogenes* kod miševa pretretiranih VEPA praćeno je povećanjem zastupljenosti populacije CD8⁺ T limfocita. Kada su u pitanju efektorska svojstva ovih ćelija, prisustvo ćelija koje ekspimiraju perforin i koje učestvuju u direktnom ubijanju bakterija (Podack i Munson, 2016) je bilo povećano u slezini životinja

pretretiranih VEPA, dok je udeo ćelija koje proizvode druge proinlamijske medijatore (IFN- γ , granzim b) ostao nepromenjen. Unutar limfnog tkiva creva (Pejerove ploče, MLC), udeo ćelija koje proizvode perforin, granzim b i IFN- γ ili IL-17 nije promenjen usled pretretmana VEPA. Ovo sugeriše da povećanje udela CD8⁺ T limfocita utiče na efikasniju eliminaciju *L. monocytogenes* iz slezine, a samim tim i iz organizma. Slično ovome, primena ekstrakta belog luka nije dovela do promene zastupljenosti makrofaga, dendritskih ćelija, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita tokom eliminacije *Mycobacterium tuberculosis* (Dwivedi i sar., 2019). Međutim, primena ovog ekstrakta stimulisala je zastupljenost ćelija koje proizvode IFN- γ .

Ovi rezultati, prikazani na slici 23, mogli bi ukazati da VEPA deluje na bržu eliminaciju *L. monocytogenes* iz organizma, prvenstveno delujući na makrofage da ispolje svoja efektorska svojstva na mestu inicijacije infekcije i u ciljnom organu za diseminaciju ove bakterije. Dodatno, u slezini dolazi do povećane produkcije perforina, koji direktnim ubijanjem zaraženih ćelija pospešuje imunski odgovor na *L. monocytogenes*.



Slika 23. Delovanje oralnog pretretmana VEPA na ćelije imunskog sistema miša važnih za eliminaciju infekcije *L. monocytogenes* pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji.

Hipoteza da će VEPA delovati protektivno i u modelu kancera pokazala se tačnom, jer je u mišjem modelu melanoma, tumora za čiju je eliminaciju takođe neophodan jak proinlamijski imunski odgovor, VEPA ostvario značajan efekat.

Poslednjih godina, zbog slabog odgovora na konvencionalnu terapiju, terapija kancera fokusirana je na imunski sistem domaćina i ulažu se veliki naponi da se izazove efikasan antitumorski imunski odgovor. Takođe, konvencionalna terapija, kao što je hemoterapija, uništava tumorske ćelije koje se brzo umnožavaju, ali dovodi do oštećenja i drugih ćelija u organizmu, dok imunoterapija pruža mogućnost ciljanog ubijanja transformisanih ćelija (Singh i Salama, 2016). U tom pogledu, obećavajuću strategiju predstavljaju monoklonska antitela na negativne regulatore CTLA-4 i PD-1 i humana IgG4 monoklonska antitela specifična za PD-1, pembrolizumab i nivolumab, predstavljaju

prve terapeutike koji deluju na PD-1 i koje je odobrila Svetska zdravstvena organizacija u lečenju melanoma koji ne reaguje na terapiju i na melnom koji nije moguće odstraniti hirurškim putem (Carlino i sar., 2021). Međutim, iako inhibicija negativnih regulatora predstavlja efikasnu antitumorsku terapiju, ona ispoljava i neželjena dejstva zbog neadekvatne kontrole efektorskih imunskih mehanizama. Tako, smanjenje broja naivnih T ćelija sa jedne strane praćeno je nakupljanjem visoko reaktivnih memorijskih T ćelija u perifernim organima, koje izazivaju inflamaciju i oštećenje tkiva (Fritz i Leonardo, 2019). Anti-CTLA-4 terapija najviše pogađa gastrointestinalni trakt i mozak, dok anti-PD-1 terapija nosi rizik od oštećenja jetre, hipotireoidizma i upale pluća (Kumar i sar., 2017). Stoga, upotreba prirodnih proizvoda, kao što su biljni ekstrakti koji deluju stimulatorno na imunski sistem predstavljaju potencijal u lečenju tumora i u modelu melanoma različiti produkti biljaka ili gljiva pokazali su obećavajuće rezultate. Tako, ekstrakt opne crvenog pasulja pokazao je snažan odgovor na melanom *in vitro* indukcijom apoptoze i vakuolizacije u B16-F10 ćelijama (Nie i sar., 2021), dok je ekstrakt crne kleke (*Juniperus indica* Bertol.) inhibirao rast i proliferaciju ovih ćelija (Huang i sar., 2021). Dodatno, ekstrakt kivija ispoljio je antiproliferativna i proapoptotska svojstva na CRL-11147 humanim ćelijama melanoma (Kou i sar., 2021). Međutim, VEPA ispitan u ovoj doktorskoj disertaciji nije ostvario direktan štetan uticaj na B16 ćelije melanoma *in vitro*, sudeći prema vijabilnosti ovih ćelija nakon primene VEPA, kao i nepromenjenom udelu apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u odnosu na netretirane ćelije. Uzimajući u obzir prethodne rezultate, može se zaključiti da VEPA ostvaruje imunomodulacijsko dejstvo, i da pokazano antitumorsko dejstvo ostvaruje delovanjem na ćelije imunskog sistema da deluju protiv melanoma.

Osim u *in vitro* uslovima, pokazano je da ekstrakti biljaka deluju protiv melanoma *in vivo*, u mišjim modelima. Ekstrakt heksana iz korena *Lithospermum erythrorhizon*, biljke koja se koristi u azijskoj tradicionalnoj medicini značajno je smanjio veličinu i težinu tumora i povećao broj nekrotičnih ćelija u tumoru kod C57BL/6 miševa. Ovaj ekstrakt je i *in vitro* ispoljio antitumorsko dejstvo, indukcijom apoptoze u ćelijama melanoma (Rajasekar i sar., 2012). Slične rezultate dali su i ekstrakti drugih biljaka, kao što su *Alocasia cucullata*, *Bryonia dioica* i *Spondias cytherea*, čiji se efekti baziraju na direktnom negativnom uticaju na ćelije melanoma i pokazani su i u *in vivo* i u *in vitro* studijama (Fang i sar., 2018; Ben Abdessamad i sar., 2020; Yolande i sar., 2018).

Za razliku od većine studija, koje pokazuju direktan negativan uticaj ekstrakata biljaka ili njihovih izolovanih komponenti na ćelije melanoma, studije koje pokazuju antitumorski efekat delovanjem preko modulacije imunskog odgovora značajno su ređe. Za vodeni ekstrakt biljke *Daphne gnidium* pokazano je da stimuliše citotoksičnu aktivnost NK ćelija i CD8⁺ T limfocita, kao i lizosomalnu aktivnost makrofaga kod miševa sa melanomom (Chaabane i sar., 2016). Slično, ekstrakt *Limoniastrum guyonianum* ispoljio je jak antitumorski odgovor, ne samo inhibicijom rasta tumora i povećanom apoptozom tumorskih ćelija, već i povećanom proliferacijom splenocita i pojačanom aktivnošću NK ćelija i CD8⁺ T limfocita (Krifa i sar., 2014), dok su nanočestice poreklom od *Panax ginseng* C.A. Mey suprimirale rast melanoma promovišući promenu polarizacije makrofaga od M2 ka M1 fenotipu (Cao i sar., 2019).

U ovoj studiji, pretretman VEPA odložio je pojavu tumora i usporio njegovu progresiju, koja se odrazila u smanjenoj zapremini tumora. Osim toga, primećena je i povećana infiltracija ćelija imunskog sistema u tumor, ukazujući da se fokus imunskog odgovora nalazi u samom TME. Poznato je da je za efikasan antitumorski imunski odgovor neophodna kooperacija ćelija urođene i stečene imunosti (Marzagalli i sar., 2019). U skladu sa tim, pretretman VEPA povećao je udeo makrofaga, NK i NKT ćelija unutar tumora – ćelija urođene imunosti, kao i CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita – ćelija stečene imunosti.

Sudeći po studiji koja je identifikovala proantocijanide iz semena grožđa kao glavne medijatore stimulacije imunskog sistema tokom antitumorskog imunskog odgovora posredstvom povećane produkcije TNF iz ćelija imunskog sistema (Tong i sar., 2011), moglo bi se pretpostaviti da su upravo

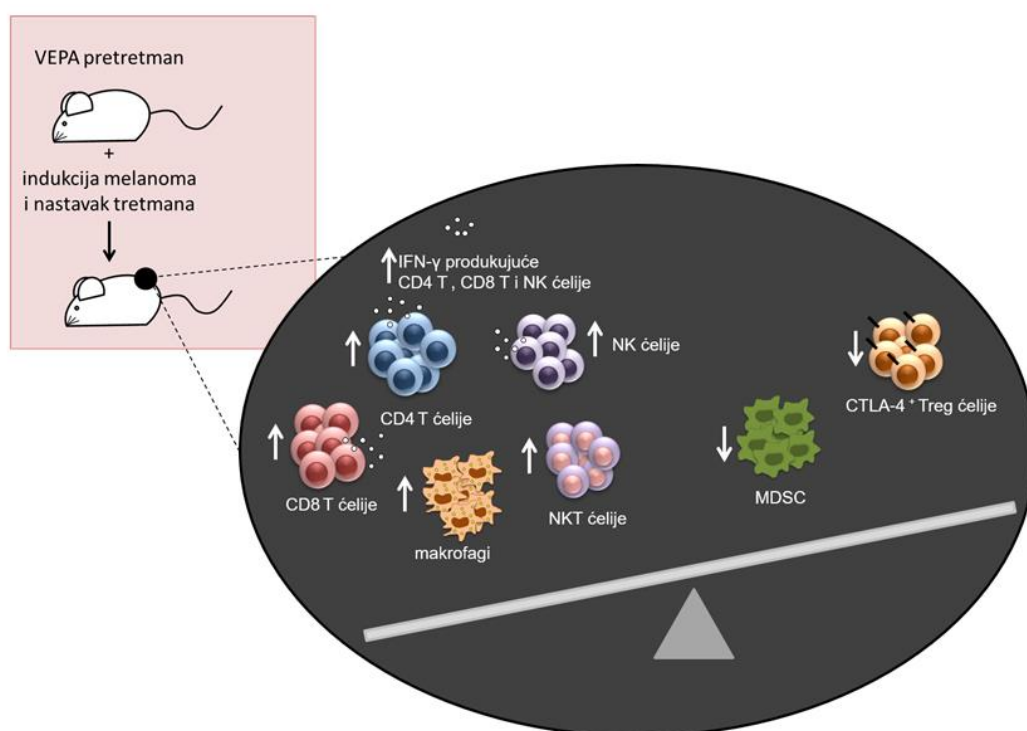
proantocijanidini, koji su visoko zastupljeni u VEPA, odgovorni za dobijeni efekat potenciranja proinflamacijskog odgovora. Međutim, suprotno ovoj studiji, pretretman VEPA nije promenio udeo ćelija koje eksprimiraju TNF u TME. Osim TNF, drugi proinflamacijski medijatori mogli bi biti odgovorni za pokazana svojstva VEPA. U odgovoru na tumor CD8⁺ T limfociti i NK ćelije dovode do direktnog liziranja transformisanih ćelija produkcijom perforina (Osińska i sar., 2014) i granzima b (Hoves i sar., 2012). Međutim, udeo ćelija koje proizvode ove medijatore u TME nije se promenio usled pretretmana VEPA. Konačno, s obzirom da je produkcija IFN- γ veoma važna u odgovoru na tumor, i da su prethodni rezultati pokazali da VEPA stimuliše Th1 imunski odgovor i produkciju IFN- γ , pretretman VEPA pre indukcije melanoma i nastavak tretmana povećao je udeo IFN- γ ⁺ NK ćelija, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u TME, ukazujući da VEPA stimuliše efektorske funkcije ovih ćelija, koje se ogledaju u produkciji IFN- γ .

IFN- γ je proinflamacijski citokin koga proizvode makrofagi, aktivirani CD8⁺ T limfociti, NK ćelije i Th1 pomoćnički T limfociti. Tokom inflamacije on ima ulogu hemoatraktanta, privlačeći neutrofile i T ćelije na mesto inflamacije, a takođe utiče i na ubijanje transformisanih ili inficiranih ćelija od strane citotoksičnih T limfocita povećanjem ekspresije MHC molekula I klase na ciljnoj ćeliji (Bhat i sar., 2017). Takođe, pokazano je da u odsustvu perforina IFN- γ povećava sposobnost CD8⁺ T limfocita da ubiju ciljnu ćeliju posredstvom Fas/Fas liganda (McKenzie i sar., 2006). U mišjem modelu tumora oka pokazano je da je odbacivanje ovog tumora zavisno od IFN- γ i citotoksičnih T limfocita. Subkutana indukcija tumora koja je prethodila intraokularnoj indukciji tumora sprečila je razvoj tumora oka kod kontrolnih životinja, dok se kod miševa kojima je deletiran gen za IFN- γ tumor oka razvio, uprkos migraciji CD8⁺ T limfocita specifičnih za antigene tumora u oko. Međutim, citotoksični T limfociti poreklom iz kontrolnog miša koji su adoptivnim transferom preneti u miša koji ne proizvodi IFN- γ doveli su do odbacivanja tumora oka, sugerišući na neophodnost IFN- γ za efikasan CD8⁺ T ćelijski odgovor na tumor (Ligocki i sar., 2016). Osim što utiče na CD8⁺ T ćelije da ispolje svoja efektorska svojstva, IFN- γ se proizvodi iz ovih ćelija i on ima važnu ulogu u antitumorskom imunskom odgovoru. Pokazano je da u kulturi ćelijskih linija karcinoma pluća A549 i H460 aktivacijom JAK-STAT1 kaspaznog signalnog puta IFN- γ dovodi do apoptoze ovih ćelija (Song i sar., 2019). U mišjem modelu melanoma takođe je pokazano da IFN- γ zajedno sa IRF3 i ISG54 učestvuje u kontroli tumorskih ćelija tokom antitumorskog imunskog odgovora (Guinn i sar., 2017). Iako prva klinička ispitivanja upotrebe rekombinantnog IFN- γ u lečenju kancera nisu pružila obećavajuće rezultate (Zaidi, 2019) i iako postoje literaturni podaci o efektima ovog citokina na promovisanje rasta tumora (Mojic i sar., 2018), rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da VEPA imunomodulacijom stimuliše antitumorski imunski odgovor i produkciju IFN- γ , koja deluje inhibitory na razvoj i rast melanoma. Ovo sugerise da neželjena dejstva koja proizilaze iz direktne upotrebe rekombinantnog IFN- γ možda mogu biti izbegnuta upotrebom prirodnih proizvoda koji podstiču njegovu produkciju delovanjem na ćelije imunskog sistema da efikasnije odgovore na tumor.

Dodatno, pretretman VEPA je doveo do povećane koncentracije IFN- γ u supernatantima ćelijske kulture splenocita i u serumu, što bi moglo oslikati sistemski imunski odgovor na primenu VEPA, koji nije uticao na produkciju drugih proinflamacijskih citokina. Takođe, ovo sugerise da je glavni efekat delovanja VEPA na imunski sistem u mišjem modelu melanoma produkcija IFN- γ . Ovo je potvrđeno eksperimentom u kome je pokazano da ćelije slezine poreklom iz životinja pretretiranih VEPA ostvaruju veću citotoksičnost prema B16 ćelijama u odnosu na ćelije iz kontrolnih životinja kojima je indukovan melanom. Dodatno, primena neutrališućeg anti-IFN- γ antitela dovela je do izostanka ovog efekta, pri čemu je citotoksičnost ćelija poreklom iz VEPA pretretiranih životinja ostala na nivou ćelija poreklom iz kontrolne grupe.

Osim povećanja zastupljenosti efektorskih ćelija, pretretman VEPA smanjio je zastupljenost MDSC u TME, kao i CCR5⁺ MDSC. Ovo je naročito važno jer su CCR5⁺ MDSC izuzetno potentne imunosupresivne ćelije, za koje je pokazano da se akumuliraju u lezijama melanoma i da je njihovo prisustvo u vezi sa progresijom tumora (Blattner i sar., 2018). Osim toga, iako VEPA nije doveo do

promene udela Treg unutar tumora, udeo Treg koje eksprimiraju CTLA-4 bio je smanjen. Naime, povećana ekspresija ovog negativnog regulatora imunskog odgovora na Treg u pozitivnoj je korelaciji sa progresijom tumora. Tako, u kanceru pluća pronađeno je značajno više Treg koje eksprimiraju CTLA-4 u bronhoalveolarnoj tečnosti nego u bronhoalveolarnoj tečnosti ili perifernoj krvi zdravih osoba (Kwiecien i sar., 2017). Takođe, Treg koje eksprimiraju CTLA-4 na svojoj površini povećano su zastupljene u tkivima tumora glave i vrata i u vezi su sa jakim supresivnim funkcijama Treg (Matoba i sar., 2019). S tim u vezi, moglo bi se reći da VEPA smanjenjem udela Treg koje eksprimiraju CTLA-4 unutar tumora smanjuje supresivna svojstva ovih ćelija, čime se, pored ostalog, ostvaruje efektivniji antitumorski imunski odgovor. Slično rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazano je da lipozomi koji sadrže hlorogenu kiselinu pokazuju snažan antitumorski odgovor stimulišući infiltraciju $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita i inhibirajući MDSC (Zhang i sar., 2021), što bi moglo ukazati da i hlorogena kiselina, jedna od najzastupljenijih komponenti VEPA, može doprineti pokazanim imunomodulacijskim i antitumorskim svojstvima VEPA. Na slici 24 prikazani su efekti pretretmana VEPA na antitumorski imunski odgovor unutar melanoma.



Slika 24. Delovanje oralnog pretretmana VEPA na ćelije imunskog sistema miša u TME nakon indukcije melanoma pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji.

Oralna primena supstanci može uticati na sastav mikrobiote u gastrointestinalnom traktu, na imunski sistem creva, kao i na njihov međusobni uticaj (Buchta Rosean i Rutkowski, 2017). S obzirom da ciljevi ove doktorske disertacije ne uključuju ispitivanje delovanja VEPA na mikrobiotu creva, ispitani su efekti oralne primene VEPA na imunski sistem creva određivanjem sastava ćelija imunskog sistema u MLČ-u. Iako nije ostvario uticaj na zastupljenost različitih populacija ćelija imunskog sistema u MLČ-u, VEPA je povećao zastupljenost $IFN-\gamma^+$ ćelija i smanjio zastupljenost $CCR9^+$ $CD8^+$ T ćelija. Kako je $CCR9$ receptor karakteristično eksprimiran u crevu (Hammerschmidt i sar., 2008), odsustvo ćelija koje eksprimiraju ovaj marker može sugerisati na njihovu migraciju u TME, gde je svakako pokazana povećana zastupljenost $CD8^+$ T ćelija nakon pretretmana VEPA. Ovi rezultati ukazuju da VEPA ostvaruje efekte značajne za antitumorski imunski odgovor i u limfnom

čvoru koji drenira crevo, iako ovo tkivo nije glavno mesto delovanja VEPA u eksperimentalnom modelu melanoma.

Na osnovu rezultata dobijenih u mišjem modelu melanoma može se zaključiti da VEPA poseduje svojstva značajna za antitumorski imunski odgovor, koja ostvaruje povećanjem zastupljenosti efektorskih ćelija u TME i produkcijom IFN- γ , ne samo u TME, već i u limfnom tkivu creva, u slezini i serumu. Ovi efekti su dodatno pojačani inhibicijom MDSC i CTLA-4⁺ Treg u TME, ćelija koje podržavaju rast tumora. Ovakva funkcionalna aktivacija imunskog sistema od strane VEPA može biti obećavajuća strategija za tretman melanoma samostalno ili u kombinaciji sa drugim poznatim citostaticima ili drugim lekovima.

Svi zajedno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na imunomodulacijska svojstva VEPA i potencijalnu primenu u lečenju stanja koja zahtevaju proinflamacijski imunski odgovor, samostalno ili kao dopunska terapija.

6. Zaključci

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata, iz ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. VEPA deluje na ćelije urođene i stečene imunosti da ostvare svoj proinflamacijski potencijal *in vitro*:

- Povećanjem produkcije proinflamacijskih medijatora iz dendritskih ćelija i makrofaga, kao i povećanjem sposobnosti makrofaga da vrše fagocitozu
- Povećanjem udela CD4⁺, CD8⁺ T limfocita i B limfocita u ćelijskoj kulturi splenocita
- Stimulisanjem diferencijacije naivnih CD4⁺ T limfocita ka Th1 fenotipu i supresijom diferencijacije Treg

2. VEPA ostvaruje efekat na ćelije urođene i stečene imunosti *in vivo*:

- Promenom zastupljenosti ćelija urođene i stečene imunosti unutar intraepitelnih limfocita i Pejerovih ploča, kao i povećanjem produkcije proinflamacijskog citokina IFN- γ u slezini nakon tretmana zdravih C57BL/6 miševa

3. Pretretman VEPA pospešuje eliminaciju *L. monocytogenes*:

- Povećanjem zastupljenosti makrofaga i citotoksičnih T limfocita u Pejerovim pločama i slezini
- Povećanom ekspresijom citotoksičnog medijatora u ćelijama slezine
- Stimulisanjem fagocitoze u Pejerovim pločama i slezini, kao i povećanoj produkciji ROS u Pejerovim pločama, povećanjem ekspresije kostimulatornog molekula na APC-ama u Pejerovim pločama, MLČ-u i slezini i povećanjem ekspresije iRNK za proinflamacijske medijatore u slezini
- *In vitro* povećanoj ekspresiji iRNK za proinflamacijske medijatore u makrofagima, kao i povećanoj ekspresiji proteina uključenih u signalne puteve ovih proinflamacijskih medijatora

4. Pretretman VEPA suprimira razvoj melanoma:

- Povećanjem zastupljenosti ćelija imunskog sistema unutar tumora, i to i ćelija urođene i stečene imunosti, koje su od značaja za antitumorski imunski odgovor sa istovremenim smanjenjem zastupljenosti ćelija imunskog sistema koje promovišu rast tumora
- Povećanjem produkcije IFN- γ od strane NK ćelija, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita
- Povećanjem produkcije IFN- γ u MLČ-u i slezini i povećanjem koncentracije ovog proinflamacijskog citokina u serumu
- Smanjenjem zastupljenosti tkivno-specifičnih citotoksičnih T limfocita u MLČ-u
- Povećanjem citotoksičnosti splenocita delovanjem preko IFN- γ
- Nezavisno od direktnog citotoksičnog uticaja na B16 ćelije

Na osnovu iznetih konkretnih zaključaka može se izvesti opšti zaključak da pretretman VEPA deluje na ćelije imunskog sistema da efikasnije odreaguju na unutarćelijske bakterije, što je pokazano u mišjem modelu infekcije *L. monocytogenes*, ili protiv transformisanih ćelija, što je pokazano u

mišjem modelu melanoma. U odsustvu dodatnog stimulusa koji bi uticao na imunski odgovor, odnosno primenom VEPA na intaktne životinje, dolazi do lokalne promene distribucije ćelija imunskog sistema i sistemske produkcije proinflamacijskih medijatora. Pokazane efekte VEPA ostvaruje isključivo imunomodulacijom, budući da samostalno ne dovodi do ubijanja B16 ćelija melanoma.

7. Literatura

- Ali MS, Lee EB, Lee SJ, Lee SP, Boby N, Suk K, Birhanu BT, Park SC. Aronia melanocarpa Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum* EJ2014 Modulates Immune Response in Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Aug 11;10(8):1276. doi: 10.3390/antiox10081276.
- Antohe M, Nedelcu RI, Nichita L, Popp CG, Cioplea M, Brinzea A, Hodoroagea A, Calinescu A, Balaban M, Ion DA, Diaconu C, Bleotu C, Pirici D, Zurac SA, Turcu G. Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution. *Oncol Lett*. 2019 May;17(5):4155- 4161. doi: 10.3892/ol.2019.9940.
- Arnold M, de Vries E, Whiteman DC, Jemal A, Bray F, Parkin DM, Soerjomataram I. Global burden of cutaneous melanoma attributable to ultraviolet radiation in 2012. *Int J Cancer*. 2018 Sep 15;143(6):1305-1314. doi: 10.1002/ijc.31527.
- Badescu M, Badulescu O, Badescu L, Ciocoiu M. Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. *Pharm Biol*. 2015 Apr;53(4):533-9. doi: 10.3109/13880209.2014.931441.
- Badovinac VP, Harty JT. Intracellular staining for TNF and IFN-gamma detects different frequencies of antigen-specific CD8(+) T cells. *J Immunol Methods*. 2000 Apr 21;238(1- 2):107-17. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00153-8.
- Balansky R, Ganchev G, Iltcheva M, Kratchanova M, Denev P, Kratchanov C, Polasa K, D'Agostini F, Steele VE, De Flora S. Inhibition of lung tumor development by berry extracts in mice exposed to cigarette smoke. *Int J Cancer*. 2012 Nov 1;131(9):1991-7. doi: 10.1002/ijc.27486.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Bancroft GJ, Bosma MJ, Bosma GC, Unanue ER. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell- independent mechanism. *J Immunol*. 1986 Jul 1;137(1):4-9.
- Barbuddhe SB, Chakraborty T. *Listeria* as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;337:173-95. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6_6.
- Beaumont KA, Mohana-Kumaran N, Haass NK. Modeling Melanoma In Vitro and In Vivo. *Healthcare (Basel)*. 2013 Dec 23;2(1):27-46. doi: 10.3390/healthcare2010027.
- Becattini S, Littmann ER, Carter RA, Kim SG, Morjaria SM, Ling L, Gyaltsen Y, Fontana E, Taur Y, Leiner IM, Pamer EG. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med*. 2017 Jul 3;214(7):1973-1989. doi: 10.1084/jem.20170495.
- Ben Abdessamad I, Bouhleb I, Chekir-Ghedira L, Krifa M. Antitumor Effect of *Bryonia dioica* Methanol Extract: In Vitro and In Vivo Study. *Nutr Cancer*. 2020;72(5):747-756. doi: 10.1080/01635581.2019.1654528.
- Berking C, Herlyn M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol Histopathol*. 2001 Apr;16(2):669-74. doi: 10.14670/HH-16.669.
- Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT: Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*), subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem* 2007;102:865–874. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.025.

- Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 2017 Jun 1;8(6):e2836. doi: 10.1038/cddis.2017.67.
- Bhatia A, Kumar Y. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. *Cancer Microenviron.* 2011 Aug;4(2):209-17. doi: 10.1007/s12307-011-0065-8.
- Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009 Jan;10(1):29-37. doi: 10.1038/ni.1679.
- Blattner C, Fleming V, Weber R, Himmelhan B, Altevogt P, Gebhardt C, Schulze TJ, Razon H, Hawila E, Wildbaum G, Utikal J, Karin N, Umansky V. CCR5⁺ Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Enriched and Activated in Melanoma Lesions. *Cancer Res.* 2018 Jan 1;78(1):157-167. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0348.
- Bortell N, Aguilera ER, Lenz LL. Pulmonary insults exacerbate susceptibility to oral *Listeria monocytogenes* infection through the production of IL-10 by NK cells. *PLoS Pathog.* 2021 Apr 20;17(4):e1009531. doi: 10.1371/journal.ppat.1009531.
- Böttcher JP, Schanz O, Garbers C, Zaremba A, Hegenbarth S, Kurts C, Beyer M, Schultze JL, Kastenmüller W, Rose-John S, Knolle PA. IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8⁺ T cell function. *Cell Rep.* 2014 Sep 11;8(5):1318-27. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.008.
- Bou Ghanem EN, Jones GS, Myers-Morales T, Patil PD, Hidayatullah AN, D'Orazio SE. InA promotes dissemination of *Listeria monocytogenes* to the mesenteric lymph nodes during food borne infection of mice. *PLoS Pathog.* 2012;8(11):e1003015. doi: 10.1371/journal.ppat.1003015.
- Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, doseresponse, ecology, and risk assessments. *Food Control.* 2017; 75, 1–13. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
- Buchta Rosean CM, Rutkowski MR. The influence of the commensal microbiota on distal tumor-promoting inflammation. *Semin Immunol.* 2017 Aug;32:62-73. doi: 10.1016/j.smim.2017.06.002.
- Cao M, Yan H, Han X, Weng L, Wei Q, Sun X, Lu W, Wei Q, Ye J, Cai X, Hu C, Yin X, Cao P. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth. *J Immunother Cancer.* 2019 Nov 27;7(1):326. doi: 10.1186/s40425-019-0817-4.
- Capiralla H, Vingtdoux V, Venkatesh J, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Identification of potent small-molecule inhibitors of STAT3 with anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages. *FEBS J.* 2012 Oct;279(20):3791-9. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08739.x.
- Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet.* 2021 Sep 11;398(10304):1002-1014. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01206-X.
- Chaabane F, Mustapha N, Mokdad-Bzeouich I, Sassi A, Kilani-Jaziri S, Dijoux Franca MG, Michalet S, Fathallah M, Krifa M, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. In vitro and in vivo anti-melanoma effects of *Daphne gnidium* aqueous extract via activation of the immune system. *Tumour Biol.* 2016 May;37(5):6511-7. doi: 10.1007/s13277-015-4492-x.

- Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. 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 Jul 15;173(2):945-54. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945.
- Chiaruttini G, Mele S, Opzoomer J, Crescioli S, Ilieva KM, Lacy KE, Karagiannis SN. B cells and the humoral response in melanoma: The overlooked players of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2017 Mar 3;6(4):e1294296. doi: 10.1080/2162402X.2017.1294296.
- Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood.* 2009 May 28;113(22):5488-96. doi: 10.1182/blood-2008-10-187179.
- Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, Pandeswara S, Lao S, Yuan B, Drerup JM, Padron A, Conejo-Garcia J, Murthy K, Liu Y, Turk MJ, Thedieck K, Hurez V, Li R, Vadlamudi R, Curiel TJ. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth, Pathogenesis, and Autophagy in Ovarian Cancer and Melanoma. *Cancer Res.* 2016 Dec 1;76(23):6964-6974. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0258. Erratum in: *Cancer Res.* 2017 May 15;77(10):2770.
- Conlan JW, North RJ. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med.* 1994 Jan 1;179(1):259-68. doi: 10.1084/jem.179.1.259.
- Conlan JW. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J Med Microbiol.* 1996 Apr;44(4):295-302. doi: 10.1099/00222615-44-4-295.
- Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, Kato T, Lucarelli E, Donati D, Polito L, Bolognesi A, Ricci F, Salvi S, Gargaglione V, Mantero S, Alberghini M, Ferrara GB, Pistillo MP. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer.* 2005 Nov 20;117(4):538-50. doi: 10.1002/ijc.21155.
- Cossart P, Helenius A. Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Aug 1;6(8):a016972. doi: 10.1101/cshperspect.a016972.
- Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19484-91. doi: 10.1073/pnas.1112371108. Epub 2011 Nov 23.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005 Nov 17;353(20):2135-47. doi: 10.1056/NEJMoa050092.
- Czuprynski CJ, Faith NG, Steinberg H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect Immun.* 2003 Feb;71(2):682-9. doi: 10.1128/IAI.71.2.682-689.2003.
- D'Alessandro LG, Dimitrov K, Vauchel P, Nikov I. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chem Eng Res. Des.* 2014; 92:1818–1826.
- de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014 Nov;14(11):1073-1082. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70870-9.

- Deng G. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am J Clin Exp Immunol*. 2018 Oct 5;7(5):81-87.
- Disson O, Nikitas G, Grayo S, Dussurget O, Cossart P, Lecuit M. Modeling human listeriosis in natural and genetically engineered animals. *Nat Protoc*. 2009;4(6):799-810. doi: 10.1038/nprot.2009.66.
- Domarew CA, Holt RR, Snitkoff GG. A study of Russian phytotherapy and commonly used herbal remedies. *J Herb Pharmacother*. 2002;2(4):31-48.
- Donia M, Andersen R, Kjeldsen JW, Fagone P, Munir S, Nicoletti F, Andersen MH, Thor Straten P, Svane IM. Aberrant Expression of MHC Class II in Melanoma Attracts Inflammatory Tumor-Specific CD4+ T- Cells, Which Dampen CD8+ T-cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res*. 2015 Sep 15;75(18):3747-59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2956.
- D'Orazio SEF. Innate and Adaptive Immune Responses during *Listeria monocytogenes* Infection. *Microbiol Spectr*. 2019 May;7(3). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0065-2019.
- Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51-81. doi: 10.1016/S0065-2776(06)90002-9.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8. doi: 10.1038/ni1102-991.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- Dwivedi VP, Bhattacharya D, Singh M, Bhaskar A, Kumar S, Fatima S, Sobia P, Kaer LV, Das G. Allicin enhances antimicrobial activity of macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Ethnopharmacol*. 2019 Oct 28;243:111634. doi: 10.1016/j.jep.2018.12.008.
- Eddy K, Chen S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 26;21(23):8984. doi: 10.3390/ijms21238984.
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Listeria*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. 2018; Stockholm: ECDC.
- Fang M, Zhu D, Luo C, Li C, Zhu C, Ou J, Li H, Zhou Y, Huo C, Liu W, Peng J, Peng Q, Mo Z. In vitro and in vivo anti-malignant melanoma activity of *Alocasia cucullata* via modulation of the phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *J Ethnopharmacol*. 2018 Mar 1;213:359-365. doi: 10.1016/j.jep.2017.11.025.
- Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010 Mar 18;115(11):2167-76. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.
- Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst*. 1976 Nov;57(5):1199-202. doi: 10.1093/jnci/57.5.1199.
- Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71. doi: 10.1001/archderm.124.6.869.

- Fonseca SG, Romão PR, Figueiredo F, Morais RH, Lima HC, Ferreira SH, Cunha FQ. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2003 Aug;33(8):2297-306. doi: 10.1002/eji.200320335.
- Fraga CG , Croft KD , Kennedy DO , Tomás-Barberán FA . The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*. 2019 Feb 20;10(2):514-528. doi: 10.1039/c8fo01997e.
- Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 2012 May;33(5):949-55. doi: 10.1093/carcin/bgs123.
- Fritz JM, Lenardo MJ. Development of immune checkpoint therapy for cancer. *J Exp Med*. 2019 Jun 3;216(6):1244-1254. doi: 10.1084/jem.20182395.
- Furuuchi R, Shimizu I, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, Katsuumi G, Wakasugi T, Nakao M, Minamino T. Boysenberry polyphenol inhibits endothelial dysfunction and improves vascular health. *PLoS One*. 2018 Aug 14;13(8):e0202051. doi: 10.1371/journal.pone.0202051.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):162-74. doi: 10.1038/nri2506.
- Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun*. 1987 Nov;55(11):2822-9. doi: 10.1128/iai.55.11.2822-2829.1987.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005 Sep;41(14):2040-59. doi: 10.1016/j.ejca.2005.03.034.
- Gazdik Z, Reznicek V, Adam V, Zitka O, Jurikova T, Krska B, Matuskovic J, Plsek J, Saloun J, Horna A, Kizek R. Use of liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of antioxidants in less common fruits. *Molecules*. 2008 Nov 14;13(11):2823-36. doi: 10.3390/molecules131102823.
- Giavazzi R, Garofalo A. Syngeneic murine metastasis models : b16 melanoma. *Methods Mol Med*. 2001;58:223-9. doi: 10.1385/1-59259-137-X:223.
- Gregg RK. Model Systems for the Study of Malignant Melanoma. *Methods Mol Biol*. 2021;2265:1-21. doi: 10.1007/978-1-0716-1205-7_1.
- Guerriero JL. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;342:73-93. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.07.001.
- Guinn Z, Brown DM, Petro TM. Activation of IRF3 contributes to IFN- γ and ISG54 expression during the immune responses to B16F10 tumor growth. *Int Immunopharmacol*. 2017 Sep;50:121-129. doi: 10.1016/j.intimp.2017.06.016.
- Guleria I, Pollard JW. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1795-807. doi: 10.1128/IAI.69.3.1795-1807.2001.

- Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep*. 2011 Nov;28(12):1937-55. doi: 10.1039/c1np00051a. Epub 2011 Oct 6.
- Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, Wahl B, Kremmer E, Förster R, Pabst O. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med*. 2008 Oct 27;205(11):2483-90. doi: 10.1084/jem.20080039.
- Han NR, Kim HJ, Lee JS, Kim HY, Moon PD, Kim HM, Jeong HJ. The immune-enhancing effect of anthocyanin-fucoidan nanocomplex in RAW264.7 macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *J Food Biochem*. 2021 Apr;45(4):e13631. doi: 10.1111/jfbc.13631.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harty JT, Badovinac VP. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol*. 2002 Jun;14(3):360-5. doi: 10.1016/s0952-7915(02)00333-3.
- Harty JT, Bevan MJ. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity*. 1995 Jul;3(1):109-17. doi: 10.1016/1074-7613(95)90163-9.
- Hensel JA, Khattar V, Ashton R, Ponnazhagan S. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. *Lab Invest*. 2019 Jan;99(1):93-106. doi: 10.1038/s41374-018-0137-1.
- Hirao Y, Sumioka I, Jakagami S, Yamamoto M, Hatono S, Yoshida S, Fuwa T, Nakagawa S. Activation of immunoresponder cells by the protein fraction from aged garlic extract. *Phytother Res*. 1987; 1:161–164. doi: 10.1002/ptr.2650010406
- Hoelzer K, Pouillot R, Dennis S. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet Res*. 2012 Mar 14;43(1):18. doi: 10.1186/1297-9716-43-18.
- Hoves S, Sutton VR, Trapani JA. A novel role for granzymes in anti-tumor immunity. *Oncoimmunology*. 2012 Mar 1;1(2):219-221. doi: 10.4161/onci.1.2.18102.
- Huang XF, Gao HW, Lee SC, Chang KF, Tang LT, Tsai NM. *Juniperus indica* Bertol. extract synergized with cisplatin against melanoma cells via the suppression of AKT/mTOR and MAPK signaling and induction of cell apoptosis. *Int J Med Sci*. 2021 Jan 1;18(1):157-168. doi: 10.7150/ijms.49423.
- Jakobek L, Drenjančević M, Jukić V, Šeruga M. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Sci Hortic*. 2012; 147: 56–63.
- Jakobek L, Šeruga M, Medvidović-Kosanović M, Novak I. Antioxidant Activity and Polyphenols of *Aronia* in Comparison to other Berry Species. *Agric Consp Sci*. 2007;72(4):301-306.
- Jensen VB, Harty JT, Jones BD. Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect Immun*. 1998 Aug;66(8):3758-66. doi: 10.1128/IAI.66.8.3758-3766.1998.

- Jing P, Bomser JA, Schwartz SJ, He J, Magnuson BA, Giusti MM. Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *J Agric Food Chem*. 2008 Oct 22;56(20):9391-8. doi: 10.1021/jf8005917.
- John CM, Sandrasaigaran P, Tong CK, Adam A, Ramasamy R. Immunomodulatory activity of polyphenols derived from *Cassia auriculata* flowers in aged rats. *Cell Immunol*. 2011;271(2):474-9. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.08.017.
- Jordan KR, Amaria RN, Ramirez O, Callihan EB, Gao D, Borakove M, Manthey E, Borges VF, McCarter MD. Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Nov;62(11):1711-22. doi: 10.1007/s00262-013-1475-x.
- Joseph SV, Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. Berries: anti-inflammatory effects in humans. *J Agric Food Chem*. 2014 May 7;62(18):3886-903. doi: 10.1021/jf4044056.
- Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam*. 2010 Sep 19;2010:823710. doi: 10.4061/2010/823710.
- Jung H, Kwak HK, Hwang KT. Antioxidant and antiinflammatory activities of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside in hydrogen peroxide and lipopolysaccharide-treated RAW264.7. *Food Sci Biotechnol*. 2014; 23: 2053–2062. doi: 10.1007/s10068-014-0279-x.
- Jurendić T, Ščetar M. Aronia melanocarpa Products and By-Products for Health and Nutrition: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jun 29;10(7):1052. doi: 10.3390/antiox10071052.
- Jurgoński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z. Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Foods Hum Nutr*. 2008 Dec;63(4):176-82. doi: 10.1007/s11130-008-0087-7.
- Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*. 2017 Jun 7;22(6):944. doi: 10.3390/molecules22060944.
- Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Down-regulation of HLA class I antigen - processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol*. 1999 Mar;154(3):745-54. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65321-7.
- Kang SH, Jeon YD, Moon KH, Lee JH, Kim DG, Kim W, Myung H, Kim JS, Kim HJ, Bang KS, Jin JS. Aronia Berry Extract Ameliorates the Severity of Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *J Med Food*. 2017 Jul;20(7):667-675. doi: 10.1089/jmf.2016.3822.
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1.
- Karasawa K, Uzuhashi Y, Hirota M, Otani H. A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) stimulates the cellular immune system in mice. *J Agric Food Chem*. 2011 Oct 26;59(20):11287-93. doi: 10.1021/jf2029225.
- Kaunitz GJ, Cottrell TR, Lilo M, Muthappan V, Esandrio J, Berry S, Xu H, Ogurtsova A, Anders RA, Fischer AH, Kraft S, Gerstenblith MR, Thompson CL, Honda K, Cuda JD, Eberhart CG, Handa JT, Lipson EJ, Taube JM. Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles. *Lab Invest*. 2017 Sep;97(9):1063-1071. doi: 10.1038/labinvest.2017.64.

- Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemski P, Piekarski J, Jeziorski A. Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy. *Fitoterapia*. 2012 Mar;83(2):310-7. doi: 10.1016/j.fitote.2011.11.007.
- Kiderlen AF, Kaufmann SH, Lohmann-Matthes ML. Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon. *Eur J Immunol*. 1984 Oct;14(10):964-7. doi: 10.1002/eji.1830141019.
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol*. 2014 Jan 10;2:187-95. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.022.
- Kim JH, Auger C, Kurita I, Anselm E, Rivoarilala LO, Lee HJ, Lee KW, Schini-Kerth VB. Aronia melanocarpa juice, a rich source of polyphenols, induces endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries via the redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*. 2013 Nov 30;35:54-64. doi: 10.1016/j.niox.2013.08.002.
- Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007 May;121(1):1-14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.
- Kim SP, Moon E, Nam SH, Friedman M. Composition of Herba Pogostemonis water extract and protection of infected mice against *Salmonella Typhimurium*-induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells. *J Agric Food Chem*. 2012 Dec 12;60(49):12122-30. doi: 10.1021/jf304466t.
- Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989 Jul;74(1):1-10.
- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food*. 2010 Apr;13(2):255-69. doi: 10.1089/jmf.2009.0062
- Kolesnikov MP, Gins VK. Phenolic Substances in Medicinal Plants. *Appl Biochem Microbiol*. 2001;37, 392–399. <https://doi.org/10.1023/A:1010254105360>.
- Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY. Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biol Pharm Bull*. 2001 Sep;24(9):1016-21. doi: 10.1248/bpb.24.1016.
- Koorella C, Nair JR, Murray ME, Carlson LM, Watkins SK, Lee KP. Novel regulation of CD80/CD86-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling by NOTCH1 protein in interleukin-6 and indoleamine 2,3-dioxygenase production by dendritic cells. *J Biol Chem*. 2014 Mar 14;289(11):7747-62. doi: 10.1074/jbc.M113.519686.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- Kou L, Zhu Z, Redington C, Bai Q, Wakefield M, Lequio M, Fang Y. Potential use of kiwifruit extract for treatment of melanoma. *Med Oncol*. 2021 Feb 14;38(3):25. doi: 10.1007/s12032021-01465-2.
- Krifa M, Skandrani I, Pizzi A, Nasr N, Ghedira Z, Mustapha N, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. An aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall induces anti-tumor effects in melanoma-

injected mice via modulation of the immune response. *Food Chem Toxicol.* 2014 Jul;69:76-85. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.033.

Krijgsman D, Hokland M, Kuppen PJK. The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach. *Front Immunol.* 2018 Feb 27;9:367. doi: 10.3389/fimmu.2018.00367.

Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* 2008 Oct;74(13):1625-34. doi: 10.1055/s-0028-1088306.

Kumar V, Chaudhary N, Garg M, Floudas CS, Soni P, Chandra AB. Current Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) Induced by Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front Pharmacol.* 2017 Feb 8;8:49. doi: 10.3389/fphar.2017.00049. Erratum in: *Front Pharmacol.* 2017 May 31;8:311.

Kwiecien I, Stelmaszczyk-Emmel A, Polubiec-Kownacka M, Dziedzic D, Domagala-Kulawik J. Elevated regulatory T cells, surface and intracellular CTLA-4 expression and interleukin-17 in the lung cancer microenvironment in humans. *Cancer Immunol Immunother.* 2017 Feb;66(2):161-170. doi: 10.1007/s00262-016-1930-6.

Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LA, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2010 Jan;3(1):17-28. doi: 10.1038/mi.2009.124.

Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019 Jan;69(1):74-81. doi: 10.1099/ijsem.0.003097.

Lecuit M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. *Cell Microbiol.* 2020 Apr;22(4):e13186. doi: 10.1111/cmi.13186.

Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, McCubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018 Apr;52(4):1071-1080. doi: 10.3892/ijo.2018.4287.

Li X, Lyons AB, Woods GM, Körner H. The absence of TNF permits myeloid Arginase 1 expression in experimental *L. monocytogenes* infection. *Immunobiology.* 2017 Aug;222(8-9):913-917. doi: 10.1016/j.imbio.2017.05.012.

Ligocki AJ, Brown JR, Niederkorn JY. Role of interferon- γ and cytotoxic T lymphocytes in intraocular tumor rejection. *J Leukoc Biol.* 2016 May;99(5):735-47. doi: 10.1189/jlb.3A0315-093RRR.

Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):843-50. doi: 10.1038/nature05660.

López-López G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 2004 Apr;65(4):851-9. doi: 10.1124/mol.65.4.851.

Lücke K, Yan I, Krohn S, Volmari A, Klinge S, Schmid J, Schumacher V, Steinmetz OM, Rose-John S, Mittrücker HW. Control of *Listeria monocytogenes* infection requires classical IL-6 signaling in myeloid cells. *PLoS One.* 2018 Aug 31;13(8):e0203395. doi: 10.1371/journal.pone.0203395.

- MacDonald TT, Carter PB. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect Immun.* 1980 May;28(2):516-23. doi: 10.1128/iai.28.2.516-523.1980.
- Mackanness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med.* 1962 Sep 1;116(3):381-406. doi: 10.1084/jem.116.3.381.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
- Madjunkov M, Chaudhry S, Ito S. Listeriosis during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Aug;296(2):143-152. doi: 10.1007/s00404-017-4401-1. Epub 2017 May 23.
- Malik M, Zhao C, Schoene N, Guisti MM, Moyer MP, Magnuson BA. Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer.* 2003;46(2):186-96. doi: 10.1207/S15327914NC4602_12.
- Mandel TE, Cheers C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect Immun.* 1980 Dec;30(3):851-61. doi: 10.1128/iai.30.3.851-861.1980.
- Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N, Raulat DH. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91-128. doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00003-1.
- Marzagalli M, Ebelt ND, Manuel ER. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2019 Dec;59:236-250. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.002.
- Matoba T, Imai M, Ohkura N, Kawakita D, Ijichi K, Toyama T, Morita A, Murakami S, Sakaguchi S, Yamazaki S. Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2019 Jun 1;144(11):2811-2822. doi: 10.1002/ijc.32024. Erratum in: *Int J Cancer.* 2020 Jun 1;146(11):E7.
- McKenzie MD, Dudek NL, Mariana L, Chong MM, Trapani JA, Kay TW, Thomas HE. Perforin and Fas induced by IFN γ and TNF α mediate beta cell death by OT-I CTL. *Int Immunol.* 2006 Jun;18(6):837-46. doi: 10.1093/intimm/dx1020.
- Merheb R, Abdel-Massih RM, Karam MC. Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. *Int J Biol Macromol.* 2019 Jan;121:1-5. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.189.
- Mitsis DK, Groman A, Beupin LM, Salerno KE, Francescutti VA, Skitzki J, Kane J, Khushalani NI. Trends in demographics, incidence, and survival in children, adolescents and young adults (AYA) with melanoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) population-based analysis. *J Clin Oncol.* 2015; 33: 9058-9058.
- Mittal SK, Roche PA. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol.* 2015 Jun;34:22-7. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.009.
- Mittrücker HW, Kursar M, Köhler A, Hurwitz R, Kaufmann SH. Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):5620-7. doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5620.

- Mohan SV, Chang AL. Advanced Basal Cell Carcinoma: Epidemiology and Therapeutic Innovations. *Curr Dermatol Rep*. 2014 Feb 9;3(1):40-45. doi: 10.1007/s13671-014-0069-y.
- Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 28;19(1):89. doi: 10.3390/ijms19010089.
- Monk IR, Casey PG, Hill C, Gahan CG. Directed evolution and targeted mutagenesis to murinize *Listeria monocytogenes* internalin A for enhanced infectivity in the murine oral infection model. *BMC Microbiol*. 2010 Dec 13;10:318. doi: 10.1186/1471-2180-10-318.
- Moorhead SM, Dykes GA. Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *Int J Food Microbiol*. 2004 Feb 15;91(1):63-72. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00332-5.
- Nawirska A, Kwaśniewska M. Dietary fibre fractions from fruit processing waste. *Food Chem*. 2005; 91: 221–225. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.10.005.
- Nie J, Qin X, Li Z. Revealing the anti-melanoma mechanism of n-BuOH fraction from the red kidney bean coat extract based on network pharmacology and transcriptomic approach. *Food Res Int*. 2021 Feb;140:109880. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109880.
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001 Jan 12;291(5502):319-22. doi: 10.1126/science.291.5502.319.
- Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol*. 2018 Apr;39(4):264-275. doi: 10.1016/j.it.2017.11.003.
- Olsen CM, Wilson LF, Green AC, Bain CJ, Fritschi L, Neale RE, Whiteman DC. Cancers in Australia attributable to exposure to solar ultraviolet radiation and prevented by regular sunscreen use. *Aust N Z J Public Health*. 2015 Oct;39(5):471-6. doi: 10.1111/1753-6405.12470.
- O'Neill CH, Scoggins CR. Melanoma. *J Surg Oncol*. 2019 Oct;120(5):873-881. doi: 10.1002/jso.25604.
- Ooi ST, Lorber B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis*. 2005 May 1;40(9):1327-32. doi: 10.1086/429324.
- Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(1):109-15. doi: 10.5114/ceji.2014.42135.
- Oszmiański J, Wojdyło A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*. 2005;221: 809–813. doi: 10.1007/s00217-005-0002-5.
- Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 20:Unit 20.1. doi: 10.1002/0471142735.im2001s39.
- Pagliano P, Arslan F, Ascione T. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: meningitis and bacteraemia. *Infez Med*. 2017 Sep 1;25(3):210-216.
- Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):812-23. doi: 10.1038/nri1461.

- Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, Heo J, Kim D, Han SZ, Park MS. Aronia melanocarpa and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 11;440(1):14-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.090.
- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9543-53. doi: 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005.
- Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*. 2017 Oct 31;8(62):106132-106142. doi: 10.18632/oncotarget.22190.
- Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017 Sep 13;8:1124. doi: 10.3389/fimmu.2017.01124.
- Paulsen EE, Kilvaer TK, Rakaee M, Richardsen E, Hald SM, Andersen S, Busund LT, Bremnes RM, Donnem T. CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 Nov;66(11):1449-1461. doi: 10.1007/s00262-017-2039-2.
- Pei R, Liu J, Martin DA, Valdez JC, Jeffery J, Barrett-Wilt GA, Liu Z, Bolling BW. Aronia Berry Supplementation Mitigates Inflammation in T Cell Transfer-Induced Colitis by Decreasing Oxidative Stress. *Nutrients*. 2019 Jun 12;11(6):1316. doi: 10.3390/nu11061316.
- Pitts MG, D'Orazio SEF. A Comparison of Oral and Intravenous Mouse Models of Listeriosis. *Pathogens*. 2018 Jan 20;7(1):13. doi: 10.3390/pathogens7010013.
- Podack ER, Munson GP. Killing of Microbes and Cancer by the Immune System with Three Mammalian Pore-Forming Killer Proteins. *Front Immunol*. 2016 Nov 3;7:464. doi: 10.3389/fimmu.2016.00464.
- Pohl AM, Pouillot R, Bazaco MC, Wolpert BJ, Healy JM, Bruce BB, Laughlin ME, Hunter JC, Dunn JR, Hurd S, Rowlands JV, Saupe A, Vugia DJ, Van Doren JM. Differences Among Incidence Rates of Invasive Listeriosis in the U.S. FoodNet Population by Age, Sex, Race/Ethnicity, and Pregnancy Status, 2008-2016. *Foodborne Pathog Dis*. 2019 Apr;16(4):290-297. doi: 10.1089/fpd.2018.2548.
- Posfay-Barbe KM, Wald ER. Listeriosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009 Aug;14(4):228-33. doi: 10.1016/j.siny.2009.01.006. Epub 2009 Feb 23.
- Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Berche P, Milon G, Geissmann F, Gaillard JL. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol*. 2001 May;3(5):331-40. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00120.x.
- Qiu Z, Khairallah C, Sheridan BS. *Listeria Monocytogenes*: A Model Pathogen Continues to Refine Our Knowledge of the CD8 T Cell Response. *Pathogens*. 2018 Jun 16;7(2):55. doi: 10.3390/pathogens7020055.
- RÁCZ P, Tenner K, MÉRÖ E. Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Lab Invest*. 1972 Jun;26(6):694-700.

- Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan;16(1):32-46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.
- Rajasekar S, Park DJ, Park C, Park S, Park YH, Kim ST, Choi YH, Choi YW. In vitro and in vivo anticancer effects of *Lithospermum erythrorhizon* extract on B16F10 murine melanoma. *J Ethnopharmacol*. 2012 Nov 21;144(2):335-45. doi: 10.1016/j.jep.2012.09.017.
- Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014 Nov-Dec;28(6):1005-11.
- Rebecca VW, Somasundaram R, Herlyn M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nat Commun*. 2020 Jun 5;11(1):2858. doi: 10.1038/s41467-020-15546-9.
- Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018 Mar 23;359(6382):1350-1355. doi: 10.1126/science.aar4060.
- Rogers HW, Unanue ER. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun*. 1993 Dec;61(12):5090-6. doi: 10.1128/iai.61.12.5090-5096.1993.
- Romagnoli PA, Fu HH, Qiu Z, Khairallah C, Pham QM, Puddington L, Khanna KM, Lefrançois L, Sheridan BS. Differentiation of distinct long-lived memory CD4 T cells in intestinal tissues after oral *Listeria monocytogenes* infection. *Mucosal Immunol*. 2017 Mar;10(2):520-530. doi: 10.1038/mi.2016.66.
- Ryszawa N, Kawczyńska-Drózd A, Pryjma J, Czesnikiewicz-Guzik M, Adamek-Guzik T, Naruszewicz M, Korbut R, Guzik TJ. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Dec;57(4):611-26.
- Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life*. 2014 Oct-Dec;7(4):572-6.
- Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*. 2000 Oct;101(2):169-77. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.
- Schuppler M, Loessner MJ. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *Int J Inflam*. 2010 Jul 14;2010:704321. doi: 10.4061/2010/704321.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- Seo DW, Cho YI, Gu S, Kim DH, Park JH, Yi YJ, Lee SM. A hot water extract of *Aralia cordata* activates bone marrow-derived macrophages via a myeloid differentiation protein 88-dependent pathway and protects mice from bacterial infection. *Microbiol Immunol*. 2016 May;60(5):343-55. doi: 10.1111/1348-0421.12376.
- Serody JS, Poston RM, Weinstock D, Kurlander RJ, Frelinger JA. CD4+ cytolytic effectors are inefficient in the clearance of *Listeria monocytogenes*. *Immunology*. 1996 Aug;88(4):544-50. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-698.x.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107-11. doi: 10.1038/35074122.

- Shaughnessy LM, Swanson JA. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:2683-92. doi: 10.2741/2364.
- Siddiqui AM, Cui X, Wu R, Dong W, Zhou M, Hu M, Simms HH, Wang P. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Crit Care Med.* 2006 Jul;34(7):1874-82. doi: 10.1097/01.CCM.0000221921.71300.BF.
- Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv).* 2002;44(3):20-3.
- Singh BP, Salama AK. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. *Cancers (Basel).* 2016 Jan 15;8(1):17. doi: 10.3390/cancers8010017.
- Skamene E, Chayasirisobhon W. Enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* in splenectomized mice. *Immunology.* 1977 Dec;33(6):851-8.
- Smalley KS, Lioni M, Noma K, Haass NK, Herlyn M. In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2008 Jan;3(1):1-10. doi: 10.1517/17460441.3.1.1.
- Song M, Ping Y, Zhang K, Yang L, Li F, Zhang C, Cheng S, Yue D, Maimela NR, Qu J, Liu S, Sun T, Li Z, Xia J, Zhang B, Wang L, Zhang Y. Low-Dose IFN γ Induces Tumor Cell Stemness in Tumor Microenvironment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 2019 Jul 15;79(14):3737-3748. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0596.
- Stoitzner P, Green LK, Jung JY, Price KM, Atarea H, Kivell B, Ronchese F. Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Nov;57(11):1665-73. doi: 10.1007/s00262-008-0487-4.
- Stojković L, Jovanović I, Zivković M, Zec M, Djurić T, Zivotić I, Kuveljić J, Kolaković A, Kolić I, Djordjević A, Glibetić M, Alavantić D, Stanković A. The Effects of *Aronia melanocarpa* Juice Consumption on the mRNA Expression Profile in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Subjects at Cardiovascular Risk. *Nutrients.* 2020 May 20;12(5):1484. doi: 10.3390/nu12051484.
- Straten P, Guldberg P, Grønbaek K, Hansen MR, Kirkin AF, Seremet T, Zeuthen J, Becker JC. In situ T cell responses against melanoma comprise high numbers of locally expanded T cell clonotypes. *J Immunol.* 1999 Jul 1;163(1):443-7.
- Sullivan AM, Laba JG, Moore JA, Lee TD. Echinacea-induced macrophage activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008;30(3):553-74. doi: 10.1080/08923970802135534.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 2007 Aug;9(10):1236-43. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.011.
- Taheri R, Connolly BA, Brand MH, Bolling BW. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins,

- flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem.* 2013 Sep 11;61(36):8581-8. doi: 10.1021/jf402449q.
- Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison JL, Rémésy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J Nutr.* 2004 Sep;134(9):2275-9. doi: 10.1093/jn/134.9.2275.
- Tanaka T, Tanaka A. Chemical components and characteristics of black chokeberry. *J Jpn Soc Food. Sci Technol.* 2001; 48: 606–10.
- Temple ME, Nahata MC. Treatment of listeriosis. *Ann Pharmacother.* 2000 May;34(5):656-61. doi: 10.1345/aph.19315.
- Thomas J, Govender N, McCarthy KM, Erasmus LK, Doyle TJ, Allam M, Ismail A, Ramalwa N, Sekwadi P, Ntshoe G, Shonhiwa A, Essel V, Tau N, Smouse S, Ngomane HM, Disenyeng B, Page NA, Govender NP, Duse AG, Stewart R, Thomas T, Mahoney D, Tourdjman M, Disson O, Thouvenot P, Maury MM, Leclercq A, Lecuit M, Smith AM, Blumberg LH. Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. *N Engl J Med.* 2020 Feb 13;382(7):632-643. doi: 10.1056/NEJMoa1907462.
- Tolić MT, Krbavčić IP, Vujević P, Milinović B, Jurčević IL, Vahčić N. Effects of Weather Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Juice of Chokeberries (*Aronia Melanocarpa* L.). *Pol J Food Nutr Sci.* 2017; 67: 67–74. doi: 10.1515/pjfn-2016-0009.
- Tong H, Song X, Sun X, Sun G, Du F. Immunomodulatory and antitumor activities of grape seed proanthocyanidins. *J Agric Food Chem.* 2011 Nov 9;59(21):11543-7. doi: 10.1021/jf203170k.
- Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology.* 2009 Sep;128(1):7-15. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x.
- Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3725-9. doi: 10.1073/pnas.90.8.3725.
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem.* 2002 Feb;50(2):125-33. doi: 10.1177/002215540205000201.
- Unanue ER. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of Listeria resistance. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):35-43. doi: 10.1016/s0952-7915(97)80156-2.
- Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2004 Dec;56(3):195-201. doi: 10.1016/j.etp.2004.04.012.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov A, Kuzmanova V, Tzaneva M. *Aronia melanocarpa* fruit juice ameliorates the symptoms of inflammatory bowel disease in TNBS-induced colitis in rats. *Food Chem Toxicol.* 2018 Mar;113:33-39. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.011.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P, Belcheva A. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Hum Nutr.* 2007a Mar;62(1):19-24. doi: 10.1007/s11130-006-0036-2.

- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Aronia melanocarpa fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007b Mar;29(2):101-5. doi: 10.1358/mf.2007.29.2.1075349.
- Valcheva-Kuzmanova S, Marazova K, Krasnaliev I, Galunska B, Borisova P, Belcheva A. Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2005 Apr;56(6):385-92. doi: 10.1016/j.etp.2005.01.001.
- Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A. Current knowledge of Aronia melanocarpa as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)*. 2006;48(2):11-7.
- Van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Claassen E. Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol*. 1992;11(6):337-80.
- Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou CC, Tsakris Z, Rozos G, Tsigalou C, Bezirtzoglou E. Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jul 28;11(8):1014. doi: 10.3390/antibiotics11081014.
- Varela CE, Fromentin E, Roller M, Villarreal F, Ramirez-Sanchez I. Effects of a natural extract of Aronia Melanocarpa berry on endothelial cell nitric oxide production. *J Food Biochem*. 2016 Aug;40(4):404-410. doi: 10.1111/jfbc.12226.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jul;14(3):584-640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523-32. doi: 10.1038/nri2343.
- Viguiet M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):1444-53. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1444.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod*. 1999 Feb;62(2):294-6. doi: 10.1021/np980501m. Erratum in: *J Nat Prod* 1999 May;62(5):802.
- Wang J, Pae M, Meydani SN, Wu D. Green tea epigallocatechin-3-gallate modulates differentiation of naïve CD4⁺ T cells into specific lineage effector cells. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Apr;91(4):485-95. doi: 10.1007/s00109-012-0964-2.
- Wang X, Hu X, Yan H, Ma Z, Deng X. Pro-inflammatory effects of a litchi protein extract in murine RAW264.7 macrophages. *Hortic Res*. 2016 May 4;3:16017. doi: 10.1038/hortres.2016.17. Erratum in: *Hortic Res*. 2017 Oct 25;4:17059.
- Wilkes K, Howard LR, Brownmiller C, Prior RL. Changes in chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) polyphenols during juice processing and storage. *J Agric Food Chem*. 2014 May 7;62(18):4018-25. doi: 10.1021/jf404281n.
- Wongchana W, Palaga T. Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell Mol Immunol*. 2012 Mar;9(2):155-62. doi: 10.1038/cmi.2011.36.

- Wu X, Pittman HE 3rd, McKay S, Prior RL. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *J Nutr.* 2005 Oct;135(10):2417-24. doi: 10.1093/jn/135.10.2417.
- Xu J, Mojsoska B. The immunomodulation effect of Aronia extract lacks association with its antioxidant anthocyanins. *J Med Food.* 2013 Apr;16(4):334-42. doi: 10.1089/jmf.2012.0151.
- Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients.* 2018 Nov 2;10(11):1618. doi: 10.3390/nu10111618.
- Yaneva MP, Botushanova AD, Grigorov LA, Kokov JL, Todorova EP, Krachanova MG. Evaluation of the immunomodulatory activity of Aronia in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy. *Folia Med (Plovdiv).* 2002;44(1-2):22-5.
- Yolande FN, Sayantan B, Paramita G, Deblina S, Simplicite MR, Christopher TB, Nabendu M. Cytotoxic Effect of Spondias cytherea Fruit Extract in Murine Melanoma Model In Vivo and in Vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2018;37(3):231-240. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026697.
- Yong LH. Effect of Storage Conditions on the Stability of the Extracts from Aronia melanocarpa Elliot. *Res J Biotechnol.* 2016; 11: 38–45.
- Yu CS, Lai KC, Yang JS, Chiang JH, Lu CC, Wu CL, Lin JP, Liao CL, Tang NY, Wood WG, Chung JG. Quercetin inhibited murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promoted immune response. *Phytother Res.* 2010 Feb;24(2):163-8. doi: 10.1002/ptr.2841.
- Zaidi MR. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 2019 Jan;39(1):30-38. doi: 10.1089/jir.2018.0087.
- Zeković Z, Pavlič B, Ramić M, Vladić J, Cvejic A, Vidović S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Aronia melanocarpa by-product from filter-tea factory. *Ann Fac Eng Hunedoara-Int J Eng.* 2014; 12: 185–188.
- Zenewicz LA, Shen H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect.* 2007 Aug;9(10):1208-15. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.008.
- Zhang Q, Feng Y, Deng L, Feng F, Wang L, Zhou Q, Luo Q. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. *Int J Food Microbiol.* 2011 Jan 31;145(1):238-43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.028. Epub 2011 Jan 8.
- Zhang Y, Yang Y, Ye J, Gao Y, Liao H, Zhou J, Feng Y, Liu D, Meng Y, Chen X, Gao L, Liu Y. Construction of chlorogenic acid-containing liposomes with prolonged antitumor immunity based on T cell regulation. *Sci China Life Sci.* 2021 Jul;64(7):1097-1115. doi: 10.1007/s11427-020-1739-6.
- Zhang Y, Zhang Y, Gu W, Sun B. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:15-44. doi: 10.1007/978-94-017-9487-9_2. Erratum in: *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:E1-2.
- Zhao C, Giusti MM, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem.* 2004 Oct 6;52(20):6122-8. doi: 10.1021/jf049517a.

Zielińska-Przyjemska M, Olejnik A, Dobrowolska-Zachwieja A, Grajek W: Effects of Aronia melanocarpa polyphenols on oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils from obese and non-obese individuals. *Acta Sci Pol* 2007;6:75–87.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dragica Mićanović (devojačko Gajić) je rođena 21. aprila 1994. godine u Pančevu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Školske 2012/13. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Biologija. Osnovne akademske studije završila je 2016. godine sa prosečnom ocenom 8,65. Iste godine upisala je master akademske studije na smeru Imunobiologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. 2017. godine završila je master studije, sa prosečnom ocenom 9,76. Eksperimentalni deo master rada pod nazivom „Izolovanje i karakterizacija makrofaga i T limfocita iz visceralnog masnog tkiva MIF-KO miševa“, pod mentorstvom dr Tamare Saksida uradila je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i odbranila sa ocenom 10. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu upisala je školske 2017/18. godine i položila je sve ispite predviđene programom, sa prosečnom ocenom 9,73.

Dragica je u julu 2018. godine izabrana u zvanje istraživač pripravnik i iste godine je kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja uključena u projekat „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (OI173013) pod rukovodstvom dr Danijele Maksimović-Ivanić. U novembru 2019. godine zaposlena je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, u okviru istog projekta, a od januara 2020. godine u okviru aktivnosti ugovora br. 451-03-68/2020-14/200007, takođe finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač saradnik stekla je u novembru 2020. godine. Kao učesnik programa „Saradnja srpske nauke sa dijasporom – vaučeri za razmenu znanja“, finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, u okviru projekta „Treatment of type 1 diabetes with mesenchymal stem cells isolated from hair follicles“ (T1DmCell) u periodu jun-jul 2021. godine boravila je u Lajpcigu, Nemačka, gde je stekla značajna znanja i iskustva.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za molekularnu biologiju, a putem ovih i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Dragica Gajić je koautor na 12 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima. Ima 8 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 12 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su tri rada, objavljena u časopisima M21 kategorije. Kao predavač učestvovala je u promociji imunoterapije u Srbiji, kampanji nagrađenoj od strane Internacionalne unije imunoloških društava (IUIS) 2016. godine, kao i u organizaciji i realizaciji dvodnevne radionice u okviru projekta T1DmCell za 20 učesnika, među kojima najviše studenata.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Драгица Мићановић

Број индекса Б3016/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишјим моделима инфекције и меланома“

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгица Мићановић

Број индекса Б3016/2017

Студијски програм Биологија-Имунобиологија

Наслов рада „Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишјим моделима инфекције и меланома“

Ментор др Тамара Саксида, др Биљана Божић Недељковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

„Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишјим моделима инфекције и меланома“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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.

