

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica D. Vujičić

**Uticaj vodenog, metanolnog i etil-acetatnog  
ekstrakta grčkog origana *Origanum vulgare*  
ssp. *hirtum* na dijabetes tip 1 indukovan  
višestrukim malim dozama streptozotocina  
kod C57BL/6 miševa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica D. Vujičić

**Effect of aqueous, methanolic and ethyl  
acetate extract of *Origanum vulgare* ssp.  
*hirtum* on type 1 diabetes induced by multiple  
low doses of streptozotocin in C57BL/6 mice**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**Mentori:**

**dr Ivana Stojanović**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

**dr Milena Kataranovski**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Komisija:**

**dr Ivana Stojanović**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

**dr Milena Kataranovski**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Dragana Dekanski**, viši naučni saradnik

„Galenika a.d.”, Beograd

**dr Andreas Cakos**, docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Janjini, Grčka

**dr Biljana Božić**, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (br. 173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

**Hvala,**

**dr Ivani Stojanović,** mojoj mentorki, na ukazanom poverenju, na pokazanom razumevanju, beskrajnom strpljenju i nesebičnom deljenju iskustva, ogromnog znanja i stručnosti na putu naučnog sazrevanja. Hvala na stabilnom osloncu, podršci i pomoći za sva pitanja, nedoumice i poteškoće koje su pratile izradu ove doktorske disertacije. Svojim mentorstvom učinila je da naizgled nesavladive prepreke postanu premostive, da ciljevi postanu dostižni, a svaki sledeći veći i bolji. Naročito hvala na prijateljstvu i van naučnih okvira.

**dr Mileni Kataranovski,** na stručnom vođenju kroz teorijski deo doktorskih studija, sa uvek novim i svežim informacijama iz sveta imunologije, na predusretljivosti i velikom zalaganju, kao i na korisnim sugestijama tokom konačne izrade ove doktorske disertacije. Hvala na dostupnosti i spremnosti da odgovori na sva pitanja i potakne mnoge razgovore, bilo naučnog, bilo kinematografskog karaktera.

**dr Dragani Dekanski,** na ukazanom vremenu, poverenju, ažurnosti i stručnim i konstruktivnim sugestijama koje su veoma doprinele kvalitetu ove disertacije.

**dr Biljani Božić,** na predusretljivosti, vremenu i korisnim sugestijama prilikom izrade ove disertacije.

**dr Andreasu Cakosu,** na uspešnoj saradnji.

**dr Stanislavi Stošić-Grujičić,** na pružanju prilike da postanem deo tima imunologa kojim rukovodi, na upoznavanju sa naučnoistraživačkim radom, na tome što mi je prenela delić svog nepreglednog znanja, na neodoljivom entuzijazmu i profesionalizmu u radu. Hvala što me je uvek podsticala da idem napred, borim se i usavršavam, a sve u toplom i prijateljskom maniru.

**dr Ivani Nikolić** dugujem veliku zahvalnost za početno vođenje kroz eksperimentalni rad, za strpljenje, kolegijalnost i nesebičnu pomoć, kao i za sve one duge i iscrpljujuće radne večeri koje smo provele zajedno u dobroj atmosferi. Hvala na optimizmu, podršci i prijateljstvu.

**dr Tamari Saksidi**, na lepoj saradnji, strpljenju i pomoći tokom svih faza izrade ove disertacije, kao i na stručnoj i moralnoj podršci.

**Jeleni Demenesku**, na smehu, konstantnoj veri i podršci, pomoći i razumevanju još od prvih dana mog angažovanja na institutu. Najviše hvala na iskrenom i dubokom prijateljstvu koje je ulepšalo moj svet i van granica instituta.

Mojim kolegama Sanji, Neli, Đorđu, Miri, Milji, Filipu, Jani, Mariji, Mirni, Tamari, Dijani, Bojanu, Suzani, Nedi i Vesni na dobroj energiji, kolegijalnosti, podršci, pomoći i drugarskoj atmosferi bez kojih bi moj istraživački rad bio mnogo teži.

Ivani, Sandri, Marini i Dini, na divnoj saradnji i druženju u labu 66.

*Hvala mojoj porodici, na ljubavi, podršci, veri u mene i moje sposobnosti. Najveću zahvalnost dugujem mojoj Danijeli, koja mi je nesebičnom ljubavlju, verom, podrškom i razumevanjem dala hrabrost, snagu i samopouzdanje za sve moje podvige. Bez tebe ništa ne bi bilo moguće.*

**Uticaj vodenog, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta grčkog origana *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* na dijabetes tip 1 indukovani višestrukim malim dozama streptozotocina kod C57BL/6 miševa**

**Sažetak**

Dijabetes tip 1 (DT1) je autoimunska bolest koja nastaje kao rezultat uništavanja insulin-producirajućih beta ćelija pankreasa od strane inflamacijskih medijatora. Uništavanje beta ćelija pankreasa dovodi do smanjene sekrecije insulina i posledične hiperglikemije. Glavna odlika DT1 je insulitis- infiltracija ćelija imunskog sistema u pankreasna ostrvca. Prve ćelije koje infiltriraju pankreasna ostrvca su makrofagi. Smatra se da inflamacijski M1 makrofagi doprinose patogenezi DT1, dok anti-inflamacijski M2 makrofagi imaju protektivnu ulogu. Makrofagi aktiviraju autoreaktivne T limfocite- smatra se da su CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfociti najvažnije efektorske ćelije u patogenezi DT1. U zavisnosti od citokina koje sekretuju ćelije imunskog sistema nastaju različite subpopulacije pomoćničkih T limfocita (Th) koje usmeravaju imunski odgovor u DT1 ka destruktivnom (Th1 i Th17) ili protektivnom (Th2 i Treg) odgovoru. Različiti efektorski mehanizmi ćelija imunskog sistema dovode do stvaranja inflamacijskog miljea u pankreasnim ostrvcima koji dovodi do apoptoze beta ćelija pankreasa i razvoja DT1. Terapija DT1 podrazumeva doživotno unošenje insulina. Kako ovo sa sobom nosi potencijal kratkoročnih i dugoročnih komplikacija, ulažu se veliki napor u pronalaženje novih, efikasnih terapija u lečenju DT1. Jedan od potencijalnih pristupa u lečenju DT1 je korišćenje biljaka i njihovih ekstrakata koji se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini. Napredak istraživanja u ovoj oblasti doveo je do saznanja da različiti biofenoli koji ulaze u sastav biljaka mogu ostvariti povoljna dejstva na patogenezu različitih oboljenja, što stavlja biljke i njihove ekstrakte u fokus naučnih studija. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (grčki origano) je biljka bogata fenolskim i estarskim jedinjenjima i koja se u tradicionalnoj medicini koristi kao antiseptik, kao i u lečenju stomačnih i respiratornih jedinjenja. Glavna do sada pokazana dejstva origana su anti-bakterijsko i antioksidantno, a pokazano je i anti-hiperglikemijsko dejstvo origana u modelu toksičnog DT1, što čini origano potencijalnim kandidatom za terapiju DT1.

U ovoj studiji je po prvi put ispitivano dejstvo različitih ekstrakata origana (metanolni, vodeni i etil-acetatni) na razvoj DT1 izazvanog višestrukim malim dozama streptozotocina (VMDS) kod miševa C57BL/6. Ispitivani su ćelijski i molekularni mehanizmi dejstva ekstrakata origana na ćelije imunskog sistema i beta ćelije pankreasa *in vitro* i *in vivo*. Takođe su vršena *in vitro* i *in vivo* ispitivanja najobilnijih jedinjenja u sastavu ekstrakata origana kako bi se otkrio mogući aktivni princip ekstrakata origana.

*In vitro* ispitivanja su pokazala da su ekstrakti, primenjeni u koncentracijama koje nisu bile citotoksične, promenili imunski odgovor makrofaga poreklom iz peritonealne tečnosti i limfocita izolovanih iz cervikalnih limfnih čvorova. Vodeni i etil-acetatni ekstrakti origana su smanjili inflamacijski potencijal makrofaga putem smanjene sekrecije azot monoksida (NO) (vodeni ekstrakt origana) i smanjene sekrecije inflamacijskog citokina IL-1 $\beta$  (vodeni i etil-acetatni ekstrakt origana), dok je metanolni ekstrakt origana smanjio sekreciju NO makrofaga, a povećao sekreciju citokina IL-1 $\beta$  i TNF. Metanolni i etil-acetatni ekstrakti origana su smanjili i inflamacijski kapacitet limfocita putem smanjene sekrecije citokina IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-17 (metanolni) i IFN- $\gamma$  i IL-17 (etil-acetatni).

Osim efekta na imunske ćelije, ekstrakti origana su ispoljili i citoprotektivno dejstvo na beta ćelije pankreasa *in vitro*. Naime, metanolni i vodeni ekstrakti origana su sprečili smrt beta ćelija pankreasa indukovanu citotoksičnim citokinima, dok je etil-acetatni ekstrakt origana ovaj efekat ispoljio u najnižim primenjenim koncentracijama. Metanolni ekstrakt origana je sprečio apoptozu beta ćelija indukovanu citokinima smanjenjem aktivnosti kaspaze 3.

*In vivo* ispitivanja na animalnom modelu kod koga je DT1 indukovano VMDS pokazala su da je profilaktički tretman sa metanolnim i etil-acetatnim, ali ne i vodenim ekstraktom origana, sprečio nastanak DT1 kod miševa soja C57BL/6. Ovo je bilo podržano i očuvanjem broja i funkcije pankreasnih ostrvaca na fiziološkom nivou- metanolni i etil-acetatni ekstrakti origana su sprečili infiltraciju ćelija imunskog sistema u pankreasna ostrvca, a metanolni ekstrakt origana je inhibirao i produkciju pro- oksidativnih medijatora i održao koncentraciju insulina na fiziološkom nivou. Terapijski



treman sa metanolnim ekstraktom origana doveo je do prolaznog smanjenja incidence DT1 kod miševa.

*Ex vivo* ispitivanja mehanizma dejstva ekstrakata origana na DT1 pokazala su da je metanolni ekstrakt origana sprečio nastanak DT1 direktnim dejstvom na Th17 ćelije i pomeranjem balansa od destruktivnog Th1/Th17 imunskog odgovora ka protektivnom Th2/Treg imunskom odgovoru. Sa druge strane, etil-acetatni ekstrakt origana je antidijabetogeno dejstvo ostvario umirivanjem inflamacijskog M1/Th1/Th17 imunskog odgovora, kao i pomeranjem funkcionalnog fenotipa makrofaga ka antiinflamacijskom M2 fenotipu.

Ruzmarinska i salvijanolična kiselina, kao i karvakrol su supstance koje su najzastupljenije u metanolnom i etil-acetatnom ekstraktu origana. U ovoj studiji je pokazano da, uprkos ispoljavanju imunomodulatornog dejstva *in vitro*, nijedna od ovih supstanci nije uspjela da spreči nastanak DT1 u VMDS animalnom modelu ove bolesti. Određivanje jednog ili više aktivnih principa metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana moglo bi biti predmet budućih istraživanja.

Rezultati ove disertacije ukazuju na to da primena metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana može biti pogodna u potencijalnom tretmanu DT1, kako u preventivnim tako i u kombinovanim terapijskim strategijama lečenja DT1.

**Ključne reči:** dijabetes tip 1, grčki origano, streptozotocin, diferencijacija pomoćničkih T ćelija, citokini, apoptoza beta ćelija

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunobiologija

**UDK broj:** [582.929.4: 616.379- 008.64]: 636.028 (043.3)

**Effect of aqueous, methanolic and ethyl acetate extract of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* on type 1 diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in C57BL/6 mice**

**Abstract**

Type 1 diabetes (T1D) is autoimmune disorder which develops as a consequence of destruction of insulin-producing pancreatic beta cells which is induced by pro-inflammatory mediators. Beta cell destruction leads to impaired insulin production and loss of glucose homeostasis. The hallmark of T1D is formation of insulitis- immune cells infiltration in pancreatic islets. Macrophages are the first cells that infiltrate pancreatic islets. It is considered that proinflammatory M1 macrophages contribute to T1D pathogenesis, while antiinflammatory M2 macrophages play a protective roll in T1D development. Macrophages can activate autoreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes that are considered to be key players in T1D pathogenesis. Cytokines produced by immune cells lead to differentiation of specific T helper cells (Th) subsets, that can be destructive (Th1 and Th17) or protective (Th2 i Treg) in T1D development. Immune cells, by vast effector mechanisms, lead to formation of inflammatory milieu around pancreatic islets which ultimately stimulates beta cell apoptosis. Treatment for T1D includes lifetime intake of insulin which can potentially cause a number of short- and long term complications. This is why scientists invest significant efforts in developing new therapeutic approaches for T1D treatment. Plants and their extracts are promising candidates for treatment of T1D, due to their rich content of phenolic compounds which are proven to be beneficial for human health. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Greek oregano) is native plant rich in phenolic and ester compounds. It is used in traditional medicine as antiseptic, as well as in the treatment of respiratory and stomach ailments. Main known activities of oregano are antibacterial and antioxidant. Also, recently is reported anti-hyperglycaemic activity of oregano in the model of toxic diabetes. These facts make oregano a promising candidate for the treatment of T1D.

This study for the first time investigates the effect of different oregano extracts (methanolic, aqueous and ethyl acetate) on multiple low doses streptozotocin (MLDS)-induced T1D in C57BL/6 mice. Also, cellular and molecular mechanisms of oregano extracts action on immune cells (macrophages and lymphocytes) and pancreatic beta cells were investigated both *in vitro* and *in vivo*. Additionally, the effects of specific predominant substances found in oregano extracts on T1D pathogenesis were explored.

Oregano extracts, in non-cytotoxic concentrations, showed immunomodulatory effects *in vitro*. Aqueous and ethyl acetate oregano extracts decreased inflammatory macrophage potential by reducing secretion of nitric oxide (NO) (aqueous oregano extract) and proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  (aqueous and ethyl acetate oregano extracts). On the other hand, methanolic oregano extract decreased secretion of NO, while increasing secretion of IL-1 $\beta$  and TNF. Also, methanolic and ethyl acetate oregano extracts reduced *in vitro* lymphocyte secretion of cytokines IL-2 (methanolic oregano extract), IFN- $\gamma$  and IL-17 (methanolic and ethyl acetate oregano extracts).

Besides the effect on immune cells *in vitro*, oregano extracts exhibited cytoprotective effects on pancreatic beta cells *in vitro*, protecting them from death induced by cytotoxic cytokines. MEO inhibited beta cell apoptosis by reducing activity of caspase 3.

Prophylactic treatment with methanolic and ethyl acetate, but not aqueous oregano extract, reduced incidence of MLDS induced T1D in C57BL/6 mice. This was accompanied by preservation of beta cell number and function- methanolic and ethyl acetate oregano extracts inhibited infiltration of immune cells in pancreatic islets, while methanolic oregano extract also augmented production of oxidative mediators and kept insulin levels in the physiological range. Therapeutic treatment of T1D with methanolic oregano extract showed only transient effects.

Detailed investigation of oregano extracts mechanisms of action showed that methanolic oregano extract ameliorated T1D by direct effect on Th17 cells and by shifting the balance from proinflammatory Th1/Th17 immune response towards protective Th2/Treg immune response. Ethyl acetate oregano extract, on the other hand,

inhibited T1D by attenuating inflammatory M1/Th1/Th17 immune response, and by shifting macrophages towards protective M2 functional phenotype.

Rosmarinic and salvianolic acid, as well as carvacrol, are most prevalent substances in methanolic and ethyl acetate oregano extracts. Although they showed immunomodulatory effects *in vitro*, they failed to protect mice from T1D development *in vivo*. Determination of one or more active principles of methanolic and ethyl acetate oregano extracts could be the subject of future studies.

Results of this dissertation implicate methanolic and ethyl-acetate oregano extracts as new potential candidates in the treatment of T1D, both in the preventive or combined therapeutic strategies.

**Key words:** type 1 diabetes, Greek oregano, streptozotocin, Th cell differentiation, cytokines, beta cells apoptosis

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Immunobiology

**UDK number:** [582.929.4: 616.379- 008.64]: 636.028 (043.3)

### **Lista skraćenica:**

BB –eng. BioBreeding

BSA - goveđi albumin iz seruma (engl. Bovine Serum Albumine)

CD –eng. Cluster of differentiation

ConA – konkanavalin A (eng. Concanavalin A)

DEPC – dietilpirokarbonat

DMEM – eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DT1 – dijabetes tip 1

DTT – ditionitritol

EDTA – etilendiamin tetrasirćetna kiselina

ELISA – eng. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FACS – protočna citofluorimetrija (eng. Fluorescence Activated Cell Sorting)

FCBS – rastvor za protočnu citofluorimetriju (eng. Flow Cytometry Staining Buffer)

FCS – serum fetusa govečeta (eng. Fetal Calf Serum)

FITC – fluorescein izotiocijanat (eng. Fluorescein Isothiocyanate)

FoxP3 – eng. Forkhead Box P3

GAD65 – dekarboksilaza glutaminske kiseline 65 (eng. Glutamic Acid Decarboxylase)

GATA-3 – eng. GATA Binding Protein 3

GLUT2 – transporter za glukozu 2 (eng. Glucose Transporter 2)

GM-CSF – faktor stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (eng. Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor)

HBSS – Henksov rastvor (eng. Hank's Balanced Salt Solution)

HLA – humani leukocitni antigen (eng. Human Leukocyte Antigen)

HRP – peroksidaza poreklom iz rena (eng. Horse Radish Peroxidase)

IA-2 – antigen ostrvaca 2 (eng. Islet Antigen 2)

IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IL – interleukin

LPS – lipopolisaharid

MAPK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza (eng. Mitogen-Activated Protein Kinase)

MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (eng. Major Histocompatibility Complex)

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

NF $\kappa$ B – nukleusni faktor  $\kappa$ B

NK – eng. Natural Killer

NO – azot monoksid

NOD – eng. Nonobese Diabetic

PB – rastvor za permeabilizaciju ćelija (eng. Permeabilization Buffer)

PBS – eng. Phosphate Buffered Saline

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (eng. Polymerase Chain Reaction)

PE – fikoeritrin (eng. Phycoerythrin)

PE-Cy5 – fikoeritrin cijanin 5 (eng. Phycoerythrin -Cyanine 5)

PMA – eng. Phorbol Myristate Acetate

PMĆ – mononuklearni pankreasni infiltrati

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

RINm5F – ćelije insulinoma poreklom iz pacova (eng. Rat Insulinoma)

RNK – ribonukleinska kiselina

RNS – reaktivne vrste azota (eng. Reactive Nitrogen Species)

ROR $\gamma$ T – eng. RAR-related orphan receptor  $\gamma$

ROS – reaktivne vrste kiseonika (eng. Reactive Oxygene Species)

RPMI – eng. Roswell Park Memorial Institute

SL – mononuklearne ćelije slezine

STAT 3 – prenosnik signala i aktivator transkripcije (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription)

T-bet – eng. T-box Transcription Factor TBX21

TGF- $\beta$  – transformišući faktor rasta  $\beta$

Th – pomoćnički T limfociti (eng. T helper)

TMB – trimetilbenzidin

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

Treg – regulatorne T ćelije

VMDS – višestruke male doze streptozotocina

## Sadržaj:

<b>1. Uvod</b> .....	19
1.1. Dijabetes tip 1 .....	1
1.2. Etiologija i patogeneza DT1.....	2
1.2.1. Genetska osnova DT1 .....	3
1.2.2. Uticaj spoljašnjih faktora na razvoj autoimunskog dijabetesa.....	4
1.2.3. Autoantitela .....	6
1.2.4. Patogeneza DT1 .....	7
1.3. Eksperimentalni modeli bolesti.....	9
1.3.1. Model DT1 indukovani višestrukim malim dozama streptozotocina .....	10
1.4. Terapija DT1 - dokle smo stigli? .....	11
1.4.1. Imunosupresivne terapije DT1 .....	11
1.4.2. Pro-regenerativna terapija DT1 .....	12
1.5. Biofenoli kao pristup lečenju DT1 .....	12
1.6. <i>Origanum vulgare</i> L. <i>ssp. hirtum</i> (grčki origano).....	16
<b>2. Ciljevi</b> .....	18
<b>3. Materijali i metode</b> .....	20
3.1. Reagensi i rastvori.....	21
3.2. Priprema ekstrakata origana.....	22
3.3. Dizajn eksperimenata .....	23
3.3.1. Eksperimentalne životinje.....	23
3.3.2. <i>In vitro</i> eksperimenti .....	23
3.3.3. <i>In vivo</i> eksperimenti .....	24
3.3.4. <i>Ex vivo</i> eksperimenti .....	26
3.4. Izolovanje ćelija i tkiva .....	27
3.4.1. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka .....	27



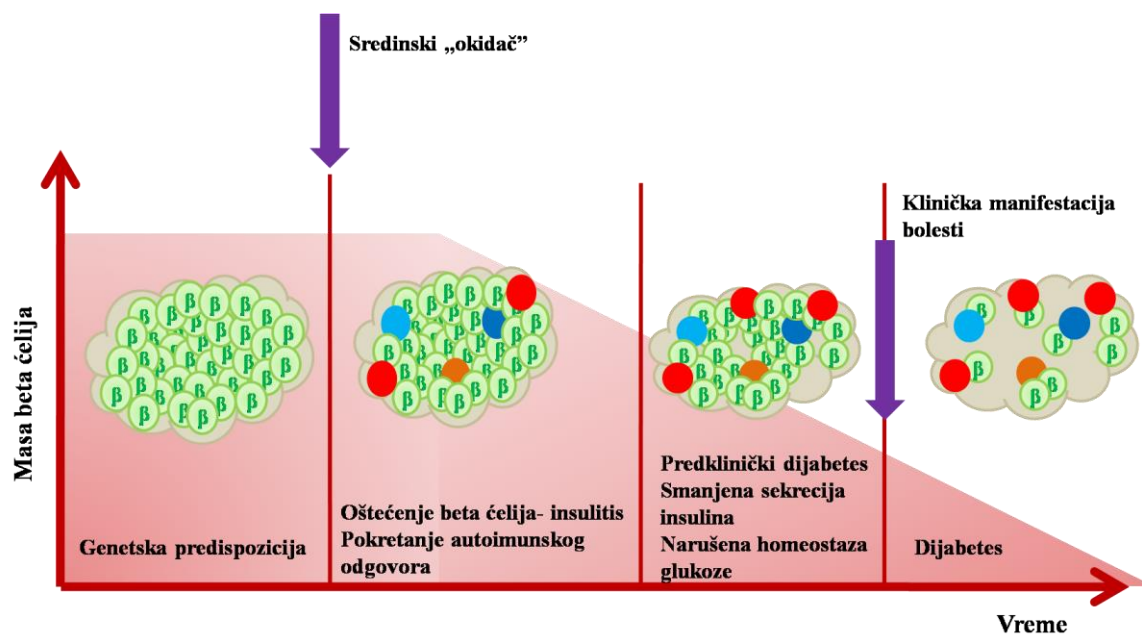
3.4.2. Izolovanje ćelija slezine, cervikalnih i pankreasnih limfnih čvorova .....	27
3.4.3. Izolovanje mononuklearnih pankreasnih infiltrata.....	28
3.4.4. Izolovanje pankreasnih ostrvaca .....	28
3.5. Određivanje broja živih ćelija metodom tripan plavo bojenja .....	29
3.6. Određivanje broja leukocita .....	29
3.7. Određivanje broja eritrocita .....	29
3.8. MTT test za određivanje preživljavanja i proliferativnog kapaciteta .....	30
3.9. Tripsinizacija ćelija .....	30
3.10. Test merenja apoptoze.....	31
3.11. Fluorimetrijski test za detekciju aktivnosti kaspaze-3 .....	31
3.12. Merenje akumulacije nitrita Grisovom reakcijom .....	32
3.13. Merenje sekrecije proteina ELISA testom .....	32
3.14. Metoda protočne citofluorimetrije .....	33
3.14.1. Detekcija površinskih markera ćelija .....	34
3.14.2. Detekcija unutarćelijskih citokina.....	35
3.14.3. Detekcija Treg ćelija .....	36
3.14.4. Detekcija transkripcionih faktora.....	36
3.15. Priprema uzoraka za izolovanje RNK i proteina.....	37
3.16. Izolovanje proteina i određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju .....	37
3.17. Imunoblot analiza za određivanje količine proteina .....	38
3.18. Izolovanje RNK .....	39
3.19. Reakcija reverzne transkripcije .....	39
3.20. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu .....	40
3.21. Priprema histoloških preparata u parafinu .....	41
3.22. Imunohistohemijsko bojenje .....	42
3.23. Određivanje metaboličkih parametra .....	42

3.24. Statistička obrada podataka.....	43
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>44</b>
4.1. Dejstvo metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta na ćelije imunskog sistema i beta ćelije pankreasa <i>in vitro</i> .....	45
4.1.1. <i>In vitro</i> efekat metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na ćelije peritoneuma.....	45
4.1.2. Dejstvo ekstrakata origana na limfocite <i>in vitro</i> .....	49
4.1.3. <i>In vitro</i> efekat ekstrakata origana na beta ćelije pankreasa.....	51
4.2. Uticaj metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na kliničke parametre DT1 .....	54
4.2.1. <i>In vivo</i> efekat metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na razvoj DT1 .....	54
4.2.2. Dejstvo ekstrakata origana na morfologiju pankreasnih ostrvaca.....	59
4.2.3. Efekat metanolnog ekstrakta origana na funkciju pankreasnih ostrvaca .....	61
4.3. Ispitivanje ćelijskih i molekulskih mehanizama dejstva metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na DT1 .....	62
4.3.1. Efekat metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na makrofage <i>ex vivo</i> .....	63
4.3.2. Dejstvo metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na diferencijaciju T limfocita .....	67
4.3.3. Molekulski mehanizmi dejstva metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na diferencijaciju Th limfocita.....	74
4.4. <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> uticaj pojedinačnih supstanci koje se nalaze u sastavu ekstrakata origana.....	79
4.4.1. Uticaj ruzmarinske kiseline na ćelije imunskog sistema i razvoj DT1 .....	79
4.4.2. Efekat salvijanolične kiseline na ćelije imunskog sistema i razvoj DT1 .....	81
4.4.3. <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> uticaj karvakrola na ćelije imunskog sistema i razvoj DT1 .....	85
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>89</b>
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>101</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>103</b>

# **1. Uvod**

## 1.1. Dijabetes tip 1

Dijabetes tip 1 (DT1) ili juvenilni, autoimunski dijabetes je organ specifično, autoimunsko oboljenje sa izraženom inflamacijskom komponentom, a koje nastaje uništavanjem beta ćelija koje proizvode insulin u okviru Langerhansovih ostrvaca pankreasa (Anderson i sar, 2005). Beta ćelije pankreasa ponašaju se kao fini senzori glukoze u krvi čiju koncentraciju održavaju na fiziološkom nivou oslobađanjem insulina. Insulin stimuliše ćelije organizma da preuzmu glukozu koju koriste kao energiju, a višak glukoze se pod dejstvom insulina skladišti u jetri, mišićima i masnom tkivu. Uništavanje beta ćelija pankreasa dovodi do nedostatka insulina u organizmu što za posledicu ima gubitak kontrole nad nivoom glukoze u krvi. Ovo vodi patološkim stanjima koja najviše pogađaju ciljna tkiva insulina (jetra, mišići, bubrezi) i mogu dovesti do akutnih komplikacija (poput ketoacidoze) (Vauzelle-Kervroedan i sar, 1999) ili hroničnih komplikacija (oboljenja srca i krvnih sudova, bubrega, oka, dijabetesne neuropatije) (Maahs i sar, 2006; Steffes i sar, 2003). Kliničkoj manifestaciji bolesti kod ljudi prethodi progresivna infiltracija mononuklearnih ćelija u pankreasna ostrvca (insulitis) (Slika 1). U ovoj fazi nema kliničkih znakova bolesti (ukupna masa beta ćelija je još uvek dovoljna za održavanje koncentracije insulina na fiziološkom nivou) i može se održati relativno dugo pre masovne destrukcije beta ćelija pankreasa (Makino i sar, 1980). DT1 se dijagnostikuje kada je oko 80 % mase beta ćelija uništeno (Slika 1) i tada je pacijentima neophodan egzogeni unos insulina kako bi preživeli (Anderson i sar, 2005).



**Slika 1. Patogeneza autoimunskog dijabetesa.** Kombinacija genetskih i sredinskih faktora dovodi do pokretanja autoimunskog odgovora. Ćelije imunskog sistema infiltriraju pankreasna ostrvca (insulitis) i efektorskim mehanizmima uništavaju beta ćelije. Smanjenje mase beta ćelija dovodi do postepenog narušavanja homeostaze glukoze. Bolest se manifestuje kada je više od 80% mase beta ćelija uništeno.

Autoimunski dijabetes se najčešće javlja kod dece i adolescenata, mada se može razviti i kasnije u životu (Lorenzen i sar, 1994). DT1 je najčešći metabolički i endokrini poremećaj kod dece. Incidenca dijabetesa raste svake godine, najviše među decom mlađom od 15 godina, a najčešće oboljevaju deca iz razvijenih, zapadnih zemalja. Atlas dijabetesa za 2015. godinu koji izdaje Internacionalna Federacija za Dijabetes (IDF DIABETES ATLAS, 2015) navodi da u svetu ima oko 40 miliona ljudi obolelih od autoimunskog dijabetesa, a procenjuje se da će do 2040. godine ta brojka porasti na 60 miliona. Takođe je porasla i incidenca autoimunskog dijabetesa, koja je sada oko 3%. U Srbiji je u 2015. godini na 100 hiljada dece mlađe od 15 godina bilo 10-25 obolelih od autoimunskog dijabetesa, što smešta našu zemlju u grupu zemalja sa visokim rizikom za DT1 (IDF DIABETES ATLAS, 2015).

## 1.2. Etiologija i patogeneza DT1

Uprkos obimnim istraživanjima, uzrok nastanka DT1 još nije poznat. Ono što se sigurno zna je da za nastanak DT1 nije odgovoran pojedinačni uzrok, već da

patogeneza uključuje međusoban uticaj više faktora - genetskih, epigenetskih i sredinskih (Hakonarson i sar, 2011). Uopšteno govoreći, autoimunost nastaje kao posledica gubitka tolerancije na sopstvene antigene. U kontekstu DT1, gubitak tolerancije na sopstvene antigene uzrokovan je defektima u mehanizmu centralne tolerancije koja služi za eliminaciju potencijalno autoreaktivnih limfocita u timusu, kao i defekta u mehanizmu periferne tolerancije koja kontroliše autoreaktivne limfocite koji su izbegli eliminaciju u timusu (Jeker i sar, 2012).

### **1.2.1. Genetska osnova DT1**

U opštoj populaciji rizik od nastanka DT1 je 0,4%. Sa druge strane, jednojajčani blizanci imaju rizik za razvoj DT1 veći od 50% ako je jedan od njih već oboleo. Takođe, rizik za razvoj DT1 među braćom i sestrama već obolelih je 6% (Steck i sar, 2011). Ovi podaci ukazuju na jasnu genetsku komponentu u razvoju DT1. Do sada otkriveni genski lokusi koji su povezani sa povećanjem rizika od oboljevanja od DT1 idu u prilog teoriji da je sama bolest posredovana imunskim sistemom. Rizik oboljevanja od DT1 se u najvećoj meri odnosi na nasleđivanje određenih haplotipova humanog leukocitnog antigena (HLA) druge klase, molekula koji imaju ulogu u prezentaciji antigena ćelijama imunskog sistema i određivanja specifičnosti T limfocita (Steck i sar, 2011). Najveći rizik povezan je sa nasleđivanjem alela HLA-DR i HLA-DQ grupe (Erlich i sar, 2008). U toj grupi, aleli DR3-DQ2 i DR4-DQ8 su povezani sa najvećim rizikom od oboljevanja, sa odnosom verovatnoće od skoro 7 (Todd i sar, 2007). Treba naglasiti da su određeni HLA aleli povezani sa izrazito malim šansama za oboljevanje od DT1, tako da HLA kompleks možda ima važniju ulogu u zaštiti nego u predispoziciji za oboljevanje od DT1.

Drugi regioni koji pokazuju slabiju, ali značajnu povezanost sa razvojem DT1 uključuju gene za insulin, IL-2 receptor  $\alpha$ , antigen 4 citotoksičnih T limfocita (CTLA4), Th1 transkripcioni faktor STAT-4, protein tirozin fosfatazu (Barrett i sar, 2009). Svi ovi geni su primarno eksprimirani u imunskim ćelijama. Pored jasne veze gena povezanih sa imunskim sistemom i DT1, sve je više dokaza koji upućuju na značaj gena koji se eksprimiraju specifično u beta ćelijama u predispoziciji ka razvijanju DT1. Nedavna studija je pokazala da je više od 50% od do sada identifikovanih gena

povezanih sa povećanim rizikom za razvoj DT1 eksprimirano u humanim pankreasnim ostrvcima. Iz ove grupe najvažnije je pomenuti *IFIH1/MDA5* gene čija je ekspresija povezana sa odgovorom beta ćelija pankreasa na virusnu dvolančanu RNK, kao i *PTPN2* gen koji ima ulogu u apoptozi beta ćelija pankreasa izazvanu interferonom gama (IFN- $\gamma$ ). Činjenica da je ekspresija ovih gena regulisana inflamacijskim stimulusima ukazuje na mogućnost da beta ćelije doprinose sopstvenoj destrukciji putem dijaloga sa imunskim sistemom (Eizirik i sar, 2012).

### **1.2.2. Uticaj spoljašnjih faktora na razvoj autoimunskog dijabetesa**

Podatak da od DT1 oboli 85% ljudi koji nemaju prethodnu istoriju DT1 u porodici ukazuje na značaj sredinskih faktora u patogenezi bolesti (Giancchetti i sar, 2015). Do sada je identifikovano nekoliko sredinskih faktora koji potencijalno mogu dovesti do nastanka DT1. Jedno od mogućih objašnjenja uključuje virusnu infekciju kao ključni događaj u započinjanju DT1. Istraživanja na animalnom modelu DT1 pokazuju da kada beta ćelije pankreasa imaju povećanu ekspresiju MHC I molekula i IFN- $\alpha$  dolazi do bržeg razvoja DT1 (Von Herrath i sar, 2009). MHC I je zaslužan za ubijanje ciljnih ćelija posredovano CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Povećana ekspresija MHC I i IFN- $\alpha$  se inače javljaju kao posledica ili trag virusne infekcije ćelija. U pankreasnim ostrvcima predijabetičnih individua takođe je potvrđena povećana ekspresija MHC I i IFN- $\gamma$  iako ona ne pokazuju nikakve znake imunske infiltracije (Dotta i sar, 2007). U tom kontekstu može se pretpostaviti da perzistentna virusna infekcija može dovesti do pokretanja autoimunskog procesa u DT1, i to tako što čini beta ćelije pankreasa vidljivijim ćelijama imunskog sistema (Von Herrath, 2009). Međutim, patogen uzročnik bolesti još uvek nije identifikovan, mada ima nekoliko kandidata među virusima kao što su rubela virus, enterovirus, koksaki B4 virus (Craig i sar, 2013; Menser i sar, 1978; Von Herrath, 2009).

Higijenska hipoteza predlaže odsustvo infekcija u ranoj životnoj dobi kao mogući faktor rizika, što je čest slučaj u razvijenim zemljama. Odsustvo infekcija otežava "učenje" imunskog sistema o pravilnim odgovorima na strane i sopstvene antigene. I zaista, geografska distribucija autoimunskih bolesti obrnuto je proporcionalna „teretu“ parazitskih infekcija. Takođe, rad na eksperimentalnim modelima DT1 je pokazao da

parazitska infekcija, kao i produkti parazita mogu zaštititi miševе od razvoja DT1 (Zaccone i sar, 2011).

Novija istraživanja stavljaju crevnu mikrobiotu kao centralni faktor u pravilnom sazrevanju imunskog sistema. U tom kontekstu, promene crevne mikrobiote bi uticale na rizik od razvoja DT1. NOD miševi kojima u crevnoj flori nedostaje segmentirana filamentozna bakterija nose veći rizik za oboljevanje od DT1 (Kriegel i sar, 2011). Sa druge strane, izlaganje NOD miševa određenim bakterijama smanjuje rizik od nastanka DT1 (Wen i sar, 2008). Skorašnje studije rađene na ljudima su pokazale da je sastav mikrobiota kod dece obolele od DT1 značajno drugačiji od kontrolne grupe (Murri i sar, 2013).

Drugi sredinski faktori uključuju klimu i ishranu. DT1 se češće javlja u severnim klimatskim oblastima, naročito u periodima kada je Sunčeve svetlosti manje. To je dovelo do pretpostavke da količina vitamina D može uticati na razvoj DT1. Pokazano je da iako količina vitamina D kod dece obolele od DT1 varira sezonski i nalazi se pod istom genetskom kontrolom kao i kod zdrave dece, u slučaju dece obolele od DT1 koncentracija vitamina D u cirkulaciji je niža nego kod zdravih osoba (Cooper i sar, 2011). Sa druge strane, Sardinija i Australija, oblasti sa velikom količinom sunčeve svetlosti, imaju veliki rizik za razvoj DT1, što ne ide u prilog opažanjima vezanim za vitamin D. Moguće objašnjenje su genetički polimorfizmi u metabolizmu vitamina D među različitim populacijama (Cooper i sar, 2011).

Kao faktor rizika za nastanak DT1 spominje se i specifična ishrana. Određeni sastojci hrane, poput goveđeg serum albumina (BSA), beta kazeina i glutena su implicirani kao faktori koji uzrokuju DT1. Beta kazein i BSA najverovatnije deluju preko stvaranja T limfocita koji specifično napadaju beta ćelijski glukozni transporter GLUT-2 (Pozzilli i sar, 1998). Nerastvoreni gluten prouzrokuje subkliničku inflamaciju crevne flore, što povećava proliferaciju gluten specifičnih memorijskih T limfocita (Anderson i sar, 2005).

I funkcionalno stanje samih beta ćelija ima ulogu u patogenezi DT1. Naime, unos hrane bogate šećerima povećava potrebe organizma za insulinom, što dovodi do povećane produkcije insulina od strane beta ćelija. Ovo opterećenje se prevashodno ogleda u



stresu endoplazmatskog retikuluma što može dovesti do abnormalne sinteze i procesovanja proteina. Ovakvi oslobođeni proteini mogu predstavljati antigene beta ćelija i neoantigene koji iniciraju autoimunost (Evans-Molina i sar, 2013; Arvan i sar, 2012).

Tokom neonatalnog razvića dolazi do talasa apoptoze beta ćelija kao normalnog procesa remodelovanja tkiva. Velika stopa umiranja ćelija tokom ovog procesa može dovesti do oslobađanja i prezentacije autoantigena imunskom sistemu što kod osoba sa predispozicijom za DT1 može rezultovati u aktivaciji autoreaktivnih T limfocita (Jacqueline i sar, 2000). Glavni antigeni kandidati su insulin (ili proinsulin), izoforma dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD65), insulin autoantigen 2, cink transporter 8, protein toplotnog stresa (HSP 60) i kao takvi, oni su marker T-ćelijama posredovane destrukcije beta ćelija (Nokoff i sar, 2013; Wenzlau i sar, 2007).

### **1.2.3. Autoantitela**

Otkriće autoantitela specifičnih za antigene beta ćelija pankreasa bilo je ključno u utvrđivanju autoimunskog karaktera DT1 (Bottazzo i sar, 1974). Danas su autoantitela na pankreasna ostrvca glavni markeri za utvrđivanje autoimunske komponente DT1, i njihovo potvrđivanje se koristi u dijagnostici, prognozi razvoja DT1, prognozi oštećenja pankreasa ili uspešnosti transplantacije pankreasa, kao i u istraživačkom radu (Winter i sar, 2013; Bonifacio i sar, 2015; Mujtaba i sar, 2015; Piemonti i sar, 2013; Knip i sar, 2014). Tokom godina, mnogi autoantigeni pankreasnih ostrvaca su proglašavani kao izazivači nastanka autoantitela tokom razvoja DT1. Nisu svi izdržali test vremena. Trenutno se smatra da postoje 4 potvrđena autoantigena za autoantitela na pankreasna ostrvca: insulin (Palmer i sar, 1983), dekarboksilaza 2 glutaminske kiseline (GAD65) (Baekkeskov i sar, 1990), protein nalik tirozin fosfatazi (IA-2) (Rabin i sar, 1992), cink transporter 8 (ZnT8) (Wenzlau i sar, 2007). Zajedničko za ove proteine je da su deo sekretorne mašinerije beta ćelija pankreasa.

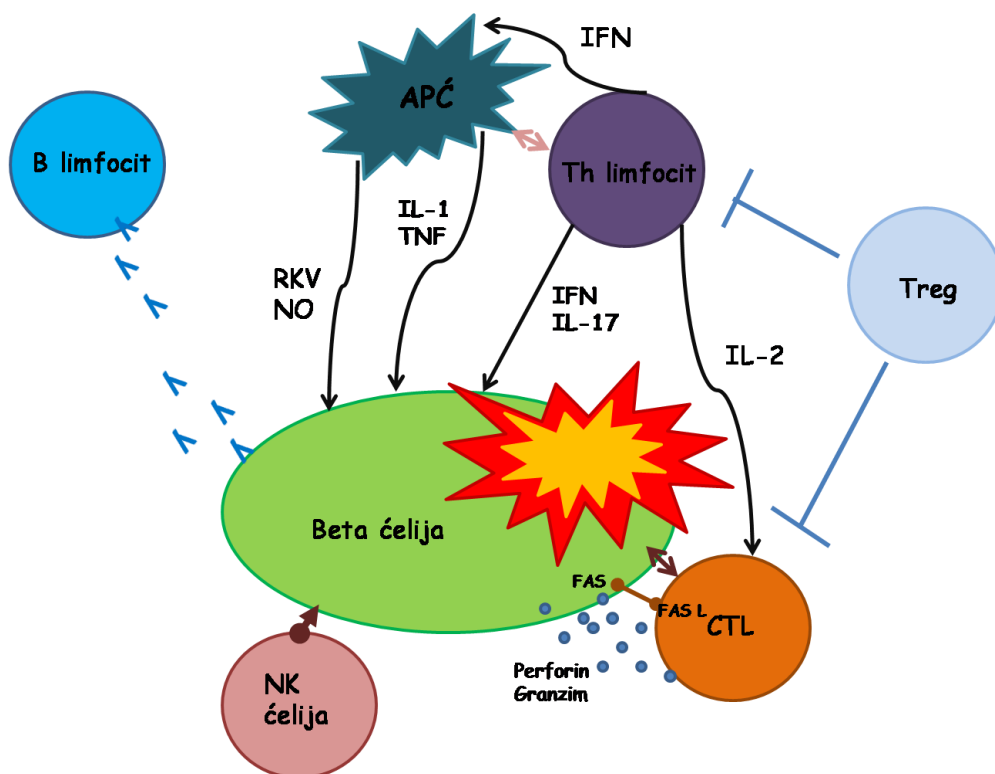
#### 1.2.4. Patogeneza DT1

Da bi se DT1 razvio, kako kod eksperimentalnih životinja tako i kod ljudi, neophodno je pobuđivanje imunskog sistema na antigene beta ćelija. Dalje, imunski odgovor treba da razvije snažne inflamacijske karakteristike i konačno, regulatorna kontrola autoimunskog procesa mora biti neefikasna što omogućava hronični inflamacijski proces čiji je krajnji efekat destrukcija beta ćelija.

Istraživanja na NOD miševima su pokazala da se DT1 razvija kao posledica narušavanja imunske regulacije što dovodi do ekspanzije autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita (Slika 2) (Di Lorenzo i sar, 2005; Burton i sar, 2008; Han i sar, 2005), B limfocita koji produkuju autoantitela (Greeley i sar, 2002) i aktivacije urođenog imunskog odgovora što za krajnju posledicu ima uništenje insulin-produkujućih beta ćelija (Zipris i sar, 2007; Devendra i sar, 2005). Iako je prisustvo antigen specifičnih autoantitela jedan od prvih dijagnostičkih markera koji se koristi kako bi se procenio rizik od razvoja DT1, sama autoantitela specifična za ostrvca nisu dovoljna da DT1 uzme maha. Velika količina podataka dobijenih u studijama na miševima i ljudima pokazala je da ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji bolesti imaju autoreaktivni T limfociti. Prve ćelije koje infiltriraju pankreas NOD miševa su dendritske ćelije i makrofagi. Istovremeno, ili neposredno nakon toga, potencijalno patogeni T limfociti se mogu naći oko pankreasnih ostrvaca (peri-insulitis) (Anderson i sar, 2005). Pretpostavlja se da su ove T ćelije aktivirane u pankreasnim drenirajućim limfnim čvorovima kao rezultat prezentacije antigena beta ćelija (Turley i sar, 2003).

Molekularni događaji koji iniciraju gubitak tolerancije su još uvek nerazjašnjeni. Dalja oštećenja pankreasnih ostrvaca vode do oslobađanja još većeg broja autoantigena što dovodi do širenja epitopa, kao i povećanog broja kompleksnih mononuklearnih ćelijskih infiltrata koji su prisutni u vreme početka bolesti. CD4<sup>+</sup> T limfociti aktiviraju efektorske mehanizme makrofaga i oni ubijaju beta ćelije produkcijom citokina (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), azot monoksida (NO) i reaktivnih kiseoničnih vrsta (Slika 2). Sami CD4<sup>+</sup> T limfociti se mogu diferencirati u više efektorskih populacija u zavisnosti od specifičnih uslova mikrosredine u kojima se nalaze (Geginat i sar, 2014). U kontekstu DT1, Th1

ćelije koje proizvode IFN- $\gamma$  i Th17 limfociti koji proizvode IL-17 imaju ulogu u progresiji bolesti, dok Th2 ćelije koje proizvode IL-4 i regulatorni T limfociti (Treg) imaju protektivnu ulogu u patogenezi DT1 (Walker i sar, 2016). Pomoćnički T limfociti (Th) također mogu aktivirati B limfocite specifične za autoantigene pankreasnih ostrvaca koji se nakon aktivacije diferenciraju u plazma ćelije koje proizvode autoantitela. Antitela se vežu za beta ćelije i posreduju u ubijanju putem komplementa (Slika 2), a mogu se vezati i za Fc receptore makrofaga. Aktivirane B ćelije mogu obavljati i funkciju antigen prezentujućih ćelija. Interakcija sa CD4<sup>+</sup> T limfocitima i prisustvo inflamacijskih citokina omogućava dendritskim ćelijama unakrsnu prezentaciju autoantigena autoreaktivnim CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Citotoksični CD8<sup>+</sup> T limfociti ubijaju beta ćelije oslobađanjem citotoksičnih granula koje sadrže granzime i perforine, kao i putem Fas-FasL interakcija (Slika 2). Ovi imunski mehanizmi mogu biti inhibirani podgrupama regulatornih ćelija kao što su IL-4 proizvodeće urođenoučivačke T ćelije (NKT) i FoxP3<sup>+</sup> Treg ćelije (Slika 2).



**Slika 2. Ćelije imunskog sistema u patogenezi DT1.** Ćelije urođene i adaptivne imunosti različitim efektorskim mehanizmima dovode do smrti beta ćelija pankreasa.

Autoreaktivne CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelije nađene su i kod NOD miševa i u serumu pacijenata obolelih od DT1. U mnogim slučajevima je pokazano da ove T ćelije prepoznaju autoantigene slične onima koje prepoznaju autoantitela (poput insulina, GAD65, cink transportera 8), ali i neke druge poput hromogranina A (Burton i sar, 2008). Zapravo, autoreaktivne T ćelije mogu biti primećene veoma rano kod NOD miševa, i često su nađene u krvi osoba podložnih DT1 mnogo pre početka same bolesti.

### **1.3. Eksperimentalni modeli bolesti**

Uzevši u obzir činjenicu da je jako teško doći do humanih uzoraka pankreasa jasan je izuzetan značaj upotrebe animalnih modela autoimunskog dijabetesa u istraživanju ove bolesti. Postoji dosta različitih animalnih modela autoimunskog dijabetesa. U zavisnosti od toga kako nastaje DT1 razlikujemo spontane, indukovane i transgene modele.

Istorijski gledano, dva glavna spontana modela autoimunskog dijabetesa su NOD (eng. Non Obese Diabetic) miš i BB (eng. Bio Breeding) pacov koji su razvijeni 70-ih godina prošlog veka (Makino i sar, 1980; Nakhooda i sar, 1977). NOD miševi su preuzeli primat kao animalni model spontanog DT1 u odnosu na BB pacove, verovatno zbog mogućnosti ukrštanja sa genetički modifikovanim sojevima miševa, direktne manipulacije genetskog materijala i generalno jeftinijih uslova održavanja u odnosu na kolonije pacova. DT1 se kod NOD miševa razvija između 18-30 nedelje starosti, i češći je kod ženki u odnosu na mužjake (Pozzilli i sar, 1993; Hanafusa i sar, 1994). Razvoj DT1 zavisi od spoljašnjih uslova u kojima ne sme biti određenih patogena (eng. SPF-Specific Patogen Free). Ako se ovi uslovi ne ispune, incidenca DT1 značajno opada. NOD miševi su bili jako važna alatka u razumevanju genetike i patogeneze DT1 (Jayasimhan i sar, 2014), najviše zbog činjenice da je otkriven određen broj gena koji je povezan sa DT1 i kod NOD miševa i kod ljudi (Burren i sar, 2011; Driver i sar, 2012; Driver i sar, 2011), kao na primer MHC kompleks koji je najvažniji faktor u predviđanju verovatnoće oboljevanja od DT1 (Driver i sar, 2012).

Hemijski indukovani modeli dijabetesa najčešće se koriste kod istraživanja koja za cilj imaju promenu toka bolesti ili njeno izlječenje. Hiperglikemija se može indukovati

streptozotocinom ili aloksanom koji specifično ubijaju beta ćelije pankreasa (King i sar, 2015).

Razni transgeni modeli najčešće nastaju genetičkom manipulacijom na NOD miševima i pogodni su za ispitivanje uloge specifičnih ćelijskih populacija ili signalnih puteva u patogenezi DT1.

Prilikom odabira animalnog modela uvek treba imati u vidu samo eksperimentalno pitanje koje se postavlja, kako bi odabrani model bio najpogodniji za dobijanje validnog odgovora.

### **1.3.1. Model DT1 indukovani višestrukim malim dozama streptozotocina**

Streptozotocin (STZ), [2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrozoureido)-D-glukopiranoza)], je prirodni antibiotik širokog spektra, sa onkogenim i dijabetogenim osobinama (Herr i sar, 1959; Evans i sar, 1965; Rakićen i sar, 1968; Rakićen i sar, 1963). STZ specifično uništava beta ćelije pankreasa u koje ulazi vezivanjem za GLUT-2 transporter na površini ovih ćelija (Szkudelski i sar, 2001). STZ dovodi do alkilacije DNK što aktivira PARP (eng. Poly (ADP-ribose) polymerase) protein koji je uključen u popravku oštećenja na DNK i smanjuje količinu NAD<sup>+</sup> (eng. Nicotinamide Adenine Dinucleotide) koenzima u beta ćelijama pankreasa, što na kraju dovodi do smanjene količine ATP i inhibicije sekrecije insulina (Sandler i sar, 1983). Takođe, STZ je i izvor reaktivnih vrsta kiseonika i azota koji dodatno oštećuju DNK.

Autoimunski dijabetes može se izazvati primenom (intraperitonealnom ili venskom) višestrukih malih doza streptozotocina (VMDS, 20-40 mg/kg telesne mase) pet dana za redom, kod miševa ili pacova sklonih razvoju ove bolesti. Ovo dovodi do postepenog oštećenja beta ćelija pankreasa, oslobađanja autoantigena i razvoja insulitisa gde inflamacijski citokini uništavaju beta ćelije pankreasa (Lukic i sar, 1998). Prednost ovog modela je u lakom i brzom izazivanju bolesti, sinhronizovanom razvoju hiperglikemija kod životinja, i naročito je koristan u istraživanju preventivnih strategija DT1 (Citro i sar, 2015; Flodstrom i sar, 1999).

#### **1.4. Terapija DT1 - dokle smo stigli?**

Iako DT1 može da se kontroliše uzimanjem insulina, osobe obolele od ove bolesti susreću se sa mnogim poteškoćama. Finansijski troškovi koji prate doživotno uzimanje insulina su veliki, smrtnost među pacijentima je povećana zbog razvijanja ozbiljnih komplikacija same bolesti, a životni vek tih osoba je smanjen. Imajući u vidu ovaj kontekst, intenzivni naponi naučnoistraživačke zajednice ka pronalaženju uspešnih terapija u lečenju ili prevenciji DT1 nisu iznenađujući. Same terapije DT1 se mogu podeliti na imunosupresivne i pro-regenerativne.

##### **1.4.1. Imunosupresivne terapije DT1**

Prvi pokušaji terapije DT1 imali su kao pristup opštu imunosupresiju, pa je tako korišćen ciklosporin, unutarćelijski inhibitor T ćelija. Osim što povlačenje DT1 nije bilo trajno (trajalo je dok se uzimao lek), ciklosporin je izazvao i jako veliki broj neželjenih posledica. Zato se fokus istraživanja pomerio od opšte ka specifičnoj imunosupresiji i imunomodulaciji DT1. Specifična imunosupresija može se ostvariti upotrebom antigen specifičnih terapija, monoklonskih antitela, fuzionisanih proteina.

Antigen specifična imunoterapija (ASI) dizajnirana je sa ciljem da izazove anergiju (neosetljivost na specifični antigen) kod pacijenata sa DT1, polazeći od činjenice da isti antigen može pod različitim uslovima izazvati i aktivni imunski odgovor i anergiju (Peakman i sar, 2001). Primeri ASI terapije DT1 su davanje GAD65, proteina toplotnog šoka 70 (hsp70) i insulinskih peptida (Luo i sar, 2010; Prasad i sar, 2012). Ove terapije su pokazale određen uspeh u usporavanju imunskog odgovora u animalnim modelima DT1, ali još uvek treba da se potvrde u kliničkim studijama.

Monoklonska antitela koja se koriste u tretmanu DT1 se ponašaju kao aktivni supresori B i T limfocita, međutim ona nisu specifična za DT1 već se koriste i za lečenje drugih oboljenja (Woodle i sar, 1999; Utset i sar, 2002). Primeri su Teplizumab (anti CD3 antitelo) (Sherry i sar, 2011), Rituximab (anti CD20 antitelo) (Pescovitz i sar, 2006), Canakinumab (anti IL-1 antitelo) (Dinarelli i sar, 2012). U istraživanjima je najdalje otišao Rituximab koji je u fazi III kliničkih ispitivanja.

Fuzionisani proteini su sastavljeni od konstantnog Fc domena imunoglobulina za koji je vezan drugi protein koji može imati funkciju liganda, antigena ili vezujućeg proteina (Czajkowsky i sar, 2012; Yu i sar, 2015). Primer fuzionisanog proteina u DT1 je Alefacept koji blokira kostimulaciju T ćelija i indukuje depleciju T ćelija i koji je stigao do faze II kliničkih ispitivanja za tretman DT1 (Rigby i sar, 2013).

#### **1.4.2. Pro-regenerativna terapija DT1**

Pro-regenerativni tretmani DT1 imaju za cilj da povećaju ukupnu masu beta ćelija, bilo zamenom oštećenih beta ćelija ili podsticanjem njihove deobe.

Transplantacija pankreasa uspešno se obavlja već 2 decenije (Skyler i sar, 2011). Međutim, problemi sa ovim pristupom su mnogobrojni, a uključuju ograničenu dostupnost tkiva za doniranje, mogućnost odbacivanja organa, kao i dalje prisutnu autoimunost u organizmu koja dovodi do destrukcije beta ćelija u transplantiranom organu.

Druge metode uključuju stvaranje beta ćelija iz stem ćelija (Kroon i sar, 2008), reprogamiranje postojećih adultnih diferenciranih ćelija u beta ćelije (za sada samo na životinjama) (Thorel i sar, 2010; Martin-Pagola i sar, 2008; Zhou i sar, 2008), stimulaciju regeneracije beta ćelija *in vivo* korišćenjem molekula poput glukagon peptida 1 (Suarez-Pinzon i sar, 2008) i peptida 1 povezanog sa neogenezom ostrvaca (Levetan i sar, 2008). Većina pro-regenerativnih tretmana DT1 je još uvek na nivou animalnih studija. Pro-regenerativni pristup u tretmanu DT1 je obećavajući, ali je neophodno potvrditi rezultate dosadašnjih istraživanja kroz humane studije.

#### **1.5. Biofenoli kao pristup lečenju DT1**

Uprkos rastućem znanju o etiologiji DT1, dosadašnje terapije ove bolesti uglavnom deluju obećavajuće na animalnim modelima, ali se nisu pokazale uspešnim u tretmanu ljudi. Zato je neophodno razmišljati o novim strategijama u dizajnu uspešnih terapija za lečenje DT1. Jedan od potencijalnih pristupa je upotreba biljaka korišćenih u tradicionalnoj medicini (fitoterapija) kao vid alternativne ili dodatak već postojećim

terapijama DT1. Obimna istraživanja su pokazala vezu između unosa biofenola poreklom iz biljaka putem ishrane i zaštite od hroničnih oboljenja (Del Rio i sar, 2013).

Šta su biofenoli? Biofenoli su strukturno raznovrsna grupa jedinjenja koja se nalazi u biljkama i imaju ulogu sekundarnih metabolita. Poseduju različite funkcije poput zaštite od herbivora i infekcija mikroorganizmima, privlačenja životinja koje raznose polen ili seme, zaštitu od UV zračenja, ili funkciju signalnih molekula (Crozier i sar, 2006; Jaganath i sar, 2009).

Strukturno su vrlo raznoliki, ali se može reći da fenolna jedinjenja imaju barem jedan aromatični prsten u svojoj strukturi za koji je vezana barem jedna hidroksilna grupa (Del Rio i sar, 2013). Najšira podela je na flavonoide i neflavonoide, dok se biofenoli u prerađenoj hrani i piću (crni čaj, crveno vino, kakao, kafa) nazivaju izvedeni polifenoli (Crozier i sar, 2006). Flavonoidi su grupa biofenola koja je do sada najviše ispitivana. Glavne podklase ove grupe jedinjenja su izoflavoni, flavonoli, flavoni, antocijanidini, flavanoni, flavan-3-oli (Tabela 1).



**Tabela 1.** Biofenoli - podela, pokazana dejstva, ispitivana oboljenja.

<b>Grupa jedinjenja</b>	<b>Predstavnici</b>	<b>Pokazana dejstva</b>	<b>Oboljenja</b>
<b>Flavonoidi</b>			
- <b>Izoflavoni</b>	Genistein	Antioksidant, antihelmit, fitoestrogen	Arterioskleroza <sup>1</sup> , kancer <sup>2</sup>
- <b>Flavonoli</b>	Kvercetin	Antioksidant, inhibitor protein kinaze	Kardiovaskularna oboljenja <sup>3</sup> , kancer <sup>4</sup>
- <b>Flavoni</b>	Apigenin	Indukuje autofagiju, antiapoptotski	Alchajmerova bolest <sup>5</sup> , kancer <sup>6</sup>
- <b>Antocijanidini</b>	Cijanidin	Antioksidant	Kardiovaskularna oboljenja <sup>7</sup> , kancer <sup>8</sup> , dijabetes <sup>9</sup>
- <b>Flavanoni</b>	Naringenin	Antioksidant	Kancer <sup>10</sup> , hepatitis C <sup>11</sup>
- <b>Flavan-3-ol</b>	Katehin	Vazodilatacija	Kardiovaskularna oboljenja <sup>12</sup> , hemolitička anemija <sup>13</sup>
<b>Neflavonoidi</b>			
	Kafeinska kiselina	Antioksidant	Kancer <sup>14</sup>
	Rezveratrol	Antioksidant, antibakterijsko dejstvo	Kardiovaskularna oboljenja <sup>15</sup> , kancer <sup>16</sup>

Biofenoli su postali izuzetno važan predmet istraživanja naučne zajednice kada je otkriveno da su barem delimično odgovorni za povoljne efekte ishrane bogate voćem i povrćem. Oni nisu, poput vitamina, neophodni za dobrobit organizma u kratkoročnom vremenskom okviru. Međutim, brojna istraživanja pokazuju da umereni, dugoročni unos biofenola ima pozitivne efekte na incidencu kancera i hroničnih oboljenja poput

<sup>1</sup> de Lemos, 2001;<sup>2</sup> Wang i sar, 2008;<sup>3</sup> Gormaz i sar, 2015;<sup>4</sup> Gibellini i sar, 2011;<sup>5</sup> Venigalla i sar, 2015;<sup>6</sup> Shukla i Gupta, 2010;<sup>7</sup> Wallace, 2011;<sup>8</sup> Sorrenti i sar, 2015;<sup>9</sup> Gharib i sar, 2013;<sup>10</sup> Guerreiro i sar, 2007;<sup>11</sup> Goldwasser i sar, 2011;<sup>12</sup> Velayutham i sar, 2008;<sup>13</sup> Martinez i sar, 2013;<sup>14</sup> Ulasli i sar, 2013;<sup>15</sup> Diaz-Gerevini i sar, 2016.

hroničnog kardiovaskularnog oboljenja, poremećene kognitivne funkcije, dijabetesa tip 2 (Spencer i sar, 2012) (Tabela 1).

Antioksidativna i antibakterijska svojstva biofenola su dobro dokumentovana (Tabela 1), međutim, skorašnja istraživanja pokazuju da mehanizmi dejstva biofenola prevazilaze modulaciju oksidativnog stresa (Augustin i sar, 2005). Izgleda da ovi mehanizmi uključuju interakciju sa ćelijskim signalnim putevima i povezanom mašinerijom koja održava ćelije i u zdravim i u patološkim stanjima (Vauzour i sar, 2010).

Brojna istraživanja su potvrdila imunomodulatorno dejstvo biofenola. Najviše je proučavano anti-inflamacijsko dejstvo biofenola na makrofage koje se ostvaruje inhibicijom ključnih regulatora inflamacijskog odgovora, poput blokade COX-2 (eng. cyclooxygenase-2), TNF, IL-1 $\beta$  (González i sar, 2011). Takođe je pokazano dejstvo biofenola na pomoćničke T limfocite, NK ćelije i dendritske ćelije (Karasawa i sar, 2011). Uočena dejstva biofenola na ćelije imunskog sistema ostvaruju se različitim mehanizmima, poput efekta na sekreciju citokina, ekspresiju transkripcionih faktora ili uticaja na signalne puteve (Byun i sar, 2013).

Ideja o upotrebi biljaka u lečenju DT1 potpuno je opravdana, s obzirom na to da prethodna istraživanja pokazuju da je suvi ekstrakt lista masline sprečio pojavu DT1 u tri različita modela ove bolesti: DT1 indukovano uz pomoć VMDS kod C57BL/6 i CBA/H miševa, kao i DT1 kod NOD miševa čija patogeneza je ubrzana ciklofosamidom (Cvjetičanin i sar, 2010). Anti-dijabetogeno dejstvo takođe je pokazao i ekstrakt biljke *Ginko Biloba* u modelu DT1 koji je izazvan jednom velikom dozom streptozotocina (Rhee i sar, 2015).

Imajući u vidu činjenice da je unos biofenola putem ishrane tokom života veliki, da su dostupni širokoj populaciji, da je pokazana njihova povezanost sa kancerom i nekim hroničnim oboljenjima, da mogu uticati na signalne puteve ćelija i tako delovati kao sekundarni metaboliti, jako je važno detaljno ispitati njihove mehanizme dejstva u različitim oboljenjima, naročito u *in vivo* modelima, s obzirom da je njihov potencijalni značaj kao tretman ili deo tretmana različitih oboljenja ogroman.

### 1.6. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (grčki origano)

*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Slika 3) je biljka tradicionalno rasprostranjena u toplim krajevima zapadne i jugozapadne Evroazije i Mediterana. Čuveni Hipokrat je koristio origano u lečenju stomačnih i respiratornih oboljenja i kao antiseptik. U tradicionalnoj medicini origano se koristio i u lečenju dijabetesa (Eddouks i sar, 2002). Najvažnija do sada potvrđena dejstva origana su anti-bakterijsko (Burt i sar, 2003), antioksidativno (Nakatani i sar, 2003), kao i uloga u sprečavanju koagulacije krvi (Goun i sar, 2002).



Slika 3. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*. Preuzeto sa web adrese:

[http://www.wikiwand.com/es/Origanum\\_vulgare](http://www.wikiwand.com/es/Origanum_vulgare)

Ključni korak u analizi lekovitog bilja je ekstrakcija, zato što je neophodno izolovati željene komponente biljke za dalju separaciju i karakterizaciju (Sasidharan i sar, 2011). U zavisnosti od vrste željenih komponenta biljke, primeniće se različiti tipovi ekstrakcije. Tako se za dobijanje hidrofilnih susptanci koriste polarni rastvarači poput metanola, etanola ili etil-acetata, a za ekstrakciju lipofilnih komponenti biljke koristi se dihlormetan.

U kontekstu uloge ekstrakata origana u patogenezi različitih oboljenja do sada je ispitivana uloga vodenog ekstrakta origana u tretmanu ne-imunskog, toksičnog dijabetesa indukovanog jednom velikom dozom streptozotocina kod pacova, gde je

pokazan anti-hiperglikemijski efekat vodenog ekstrakta origana (Lemhadri i sar, 2004). Smatra se da su za ova dejstva zaslužna fenolska i estarska jedinjenja koja su obilno zastupljena u origanu. Origano je bogat karvakrolom, timolom, ruzmarinskom i salvijanoličnom kiselinom, koji su zastupljeni u različitim odnosima u odnosu na način ekstrakcije (Vujicic i sar, 2015; Vujicic i sar, 2016). Prethodna istraživanja pokazuju anti-hiperglikemijsko dejstvo kombinacije karvakrola i roziglitazona u modelu dijabetesa tip 2 kod C57BL/6 miševa (Ezhumalai i sar, 2014), kao i antidijabetogeni efekat salvijanolične kiseline na DT1 izazvan aloksanom kod miševa (Qiang i sar, 2015). Ove godine objavljeno je istraživanje koje pokazuje antihiperglikemijsko dejstvo ruzmarinske kiseline u modelu DT1 izazvanog jednom toksičnom dozom streptozotocina kod pacova (Runtuwene i sar, 2016).

Neophodnost pronalaženja alternativnih tretmana DT1 rađa se iz neuspeha postojećih terapija. Činjenica da farmakološka modulacija DT1 može pružiti uvid i u samu patogenezu bolesti skopčana sa dosadašnjim saznanjima o pozitivnim efektima origana dovela je do potrebe da se ispituju do sada neutvrđena potencijalna dejstva različitih ekstrakata origana i mehanizmi tog dejstva na modulaciju imunskog odgovora u autoimunskom dijabetesu.

## **2. Ciljevi**

Biljke i njihovi ekstrakti su potencijalni kandidati za tretman DT1 s obzirom na to da je DT1 hronično inflamacijsko oboljenje, i da su različiti ekstrakti grčkog origana bogati anti-inflamacijskim supstancama. U zavisnosti od načina ekstrakcije neke biljke može se dobiti različiti sastav ekstrakata koji samim tim može ispoljavati drugačija dejstva. S obzirom na navedeno, kao osnovni cilj ovog istraživanja postavljeno je **ispitivanje uloge metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana u regulaciji autoimunosti usmerene na beta ćelije pankreasa, definisanje njihovih ćelijskih i molekulskih meta, određivanje mehanizama njihovog dejstva i izolovanja aktivnih principa navedenih ekstrakata.**

Kako bi se došlo do navedenog opšteg cilja, postavljeni su specifični ciljevi, i to:

- 1. U *in vitro* uslovima ispitati dejstvo metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na preživljavanje i efektorsku funkciju makrofaga iz peritonealne tečnosti i limfocita iz cervikalnih limfnih čvorova izolovanih iz miševa visokosrodnog soja C57BL/6.**
- 2. Odrediti dejstvo metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na vijabilitet beta ćelija pankreasa.**
- 3. Ispitati dejstvo ekstrakata origana na razvoj DT1 izazvanog davanjem VMDS miševima visokosrodnog soja C57BL/6.**
- 4. Utvrditi *ex vivo* ćelijske i molekulske mehanizme farmakološke modulacije DT1 primenom ekstrakata origana.**
- 5. Odrediti jedan ili više aktivnih principa iz onih ekstrakata origana koji su pokazali povoljno dejstvo na razvoj DT1 izazvan VMDS kod visokosrodnih C57BL/6 miševa.**

# **3. Materijali i metode**

### 3.1. Reagensi i rastvori

U izvođenju eksperimenata korišćeni su sledeći reagensi: medijum za uzgajanje ćelija RPMI (eng. Roswell Park Memorial Institute)-1640 (sa 25mM-HEPES i 2mM-L glutaminom), Henksov rastvor (HBSS, eng. Hank's Balanced Salt Solution), serum fetusa govečeta (FCS, eng. Fetal Calf Serum) (PAA Laboratories, Pašing, Austrija); gentamicin, penicilin, (Galenika, Beograd, Srbija); nistatin (Hemofarm, Vršac, Srbija); Folin-Ciocalteu-ov reagens (Mol, Beograd, Srbija); kolagenaza V, (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), tripsin, propidijum jodid, fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), aprotinin, etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA), dimetil sulfoksid (DMSO), ditiotritol (DTT), ExtrAvidin®-peroksidaza, Triton X-100, Tween-20, bromfenol plavo, rastvor za izolovanje ćelija po gustini (Histopaque-®1077) (Sigma, Sent Luis, SAD); natrijum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), dinatrijum hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), natrijum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Merck, Darmštadt, Nemačka); kalijumnatrijum tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); natrijum dihidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; Analytika, Prag, Češka); natrijum hlorid ( $\text{NaCl}$ ; ICN, Aurora, Ohajo, SAD); glicerol, kalijum hlorid ( $\text{KCl}$ ), kalijum dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (LachNer, Neratovice, Češka); vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), metanol, etanol (Zorka, Šabac, Srbija); konkanavalin A (Con A, Pharmacia, Upsala, Švedska); tripan plavo, goveđi albumin iz seruma (BSA eng. Bovine Serum Albumine), Tris (Fluka, Buh, Nemačka); dezoksiribonukleotid-trifosfati (dNTP), nasumični heksamerni prajmeri, komercijalni pufer za reverznu transkripciju, reverzna transkriptaza Moloni virusa mišje leukemije, inhibitor RNaze (Fermentas, Vilnius, Litvanija); prajmeri za gene od interesa koji su navedeni u tabeli 2 (Metabion, Martinsrid, Nemačka); prajmeri za  $\beta$ -aktin gen (Integrated DNA Technologies, Koralvil, SAD); komercijalna smeša za Real-Time PCR- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Varington, Velika Britanija); amonijum persulfat (APS),  $\beta$ -merkaptioetanol, natrijum dodecil sulfat (SDS) (Applichem, Darmštadt, Nemačka); paraformaldehid (PFA), glicin, N, N, N', N'-tetrametiletlen diamin (TEMED), akrilamid /bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka); ECL sistem za detekciju (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija); Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija); glicergel (Dako, Glostrup, Danska); diaminobenzidin (DAB) (R&D Systems,



Mineapolis, Minesota, SAD); aneksin V-FITC (BD Pharmingen, San Dijego, SAD).  
Fitohemikalije: ruzmarinska kiselina i salvijanolična kiselina- Fluka (Buh, Nemačka),  
karvakrol- Sigma (Sent Luis, Merilend, SAD).

Za uzgajanje svih ćelija korišćen je RPMI-1640 medijum, sa dodatkom antibiotika penicilina (100 IU/ml) i gentamicina (100 µg/ml), antimikotika nistatina (10 U/ml), 5 µM β-merkaptotetanol i 5% FCS, u daljem tekstu označeni kao medijumi za kultivisanje. FCS je inkubiran 30 min na 56°C kako bi se inaktivirale komponente komplekta, a onda je dodavan u medijum u cilju kultivacije ćelija. PBS (eng. Phosphate Buffered Saline) rastvor u vodi pravljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4.

### **3.2. Priprema ekstrakata origana**

*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (grčki origano) je komercijalno nabavljen (broj vaučera UOI100912, koji je Univerzitet u Janjini dobio od biološkog kultivatora (Marija Komini) iz Epirske regije u Grčkoj (biološka kultivacija).

Osušeni biljni materijal je pulverizacijom pretvoren u praškastu supstancu, a ekstrakcija je obavljena u Sokslet (eng. Soxhlet) aparatu u trajanju od 12 h ili 6 h.

Da bi pripremili metanolni ekstrakt origana, 5 g praškastog origana sekvencijalno je ekstrahovano u po 200 ml četiri rastvarača postepeno rastuće polarizacije (heksan, etil-acetat, dihlormetan, metanol). Metanolni ekstrakt je zatim osušen u rotirajućem isparavaču i držan je u zapečaćenim bocama bez kiseonika.

Vodeni ekstrakt origana pripremljen je tako što je 5 g praškastog origana sipano u 100 ml ključale destilovane vode u kojoj je stajao jedan čas, a zatim je tečnost profiltrirana. Voda je uklonjena metodom sušenja zamrzavanjem.

Etil-acetatni ekstrakt origana pripremljen je tako što je 5 g praškastog origana rastvoreno u po 200 ml dva rastvarača postepeno rastuće polarizacije (heksan i etil-acetat). Etil-acetatni ekstrakt je zatim osušen u rotirajućem isparivaču i stavljen u zapečaćene boce bez kiseonika.

### **3.3. Dizajn eksperimenata**

#### **3.3.1. Eksperimentalne životinje**

U svrhe ovog istraživanja korišćeni su mužjaci miševa soja C57BL/6, uzrasta od 8-12 nedelja. Životinje su uzgajane i čuvane u uzgajalištu Instituta za Biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu. Miševi su čuvani u standardnim uslovima sa neograničenim pristupom hrani i vodi.

Briga i rukovanje životinjama odvijala se u skladu sa institutskim i nacionalnim vodičima, a sve eksperimentalne procedure koje su uključivale životinje bile su odobrene od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja 2-27/10-01-189), a u skladu sa Direktivom Evropske Unije (2010/63/EU).

#### **3.3.2. *In vitro* eksperimenti**

*In vitro* eksperimenti izvršeni su na ćelijama izolovanih iz miševa soja C57BL/6 ili na ćelijama koje su pandan beta ćelijama pankreasa (ćelije insulinoma poreklom od pacova, RINm5F). Ćelije izolovane iz miševa su ćelije cervikalnog limfnog čvora (CLČ) koje su stimulisane konkanavalinom A (ConA, eng. Concanavaline A), ćelije peritonealnog ispirka stimulisane lipopolisaharidom (LPS), pankreasna ostrvca stimulisana koktelom citokina koji podražava inflamatorne uslove sredine (TNF + IFN- $\gamma$  + IL-1 $\beta$ ). Sve ćelijske kulture gajene su u inkubatoru sa vlažnom atmosferom, pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5% i na temperaturi od 37°C (u daljem tekstu inkubacija).

Ćelije cervikalnog limfnog čvora ( $5 \times 10^6$  ćelija po uzorku) inkubirane su 48 h u prisustvu ConA i prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija metanolnog, vodenog ili etil-acetatnog ekstrakta origana za merenje preživljavanja, a supernatanti ćelijskih kultura korišćeni su za određivanje koncentracije citokina ELISA metodom.

Ćelije peritonealnog ispirka ( $1 \times 10^6$  ćelija po uzorku) inkubirane su 24 h u prisustvu lipopolisaharida (LPS) (metanolni i vodeni ekstrakt origana) ili LPS + IFN- $\gamma$  (etil-

acetatni ekstrakt origana) i različitih koncentracija metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana. Nakon inkubacije od 24 h određeno je ćelijsko preživljavanje, a iz supernatanta je merena koncentracija citokina kao i produkcija NO.

RINm5F ćelije su gajene u sterilnim plastičnim flašama (25 cm<sup>3</sup>) (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka) u 5 ml medijuma za kultivaciju koji je menjan na svaka tri dana. Ćelije su po dostizanju konfluentnosti (rast od 80 %) presađivane u nove sterilne plastične flaše ili su korišćene u eksperimentima.

U ploče sa 96 mesta (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka) sađeno je 10<sup>4</sup> RINm5F ćelija po bunariću u 200 µl medijuma, u prisustvu rekombinantnih mišijih ili pacovskih citokina TNF + IFN-γ + IL-1β (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, SAD) (10 ng/ml svaki) sa ili bez metanolnog (25-200 µg/ml) ili vodenog ekstrakta origana (serija dvostrukih razblaženja, početna koncentracija 200 µg/ml). Nakon inkubacije od 48 h određivano je preživljavanje ćelija.

Pankreasna ostrvca (n=30 po uzorku) inkubirana su 48 h u odsustvu (kontrola) ili prisustvu citotoksične kombinacije citokina (TNF + IFN-γ + IL-1β, 10 ng/ml svaki). Ostrvca su tretirana različitim koncentracijama metanolnog ekstrakta origana (25-100 µg/ml). Apoptoza je detektovana metodom histon ELISA, a koncentracija proapoptotske kaspaze 3 komercijalnim kaspaza 3 fluorimetrijskim testom (Biotium, Frimont, Nebraska, SAD).

### **3.3.3. *In vivo* eksperimenti**

Kao animalni model DT1 izabran je streptozotocinski mišiji model dijabetesa kod koga inflamatorne promene na pankreasu nalikuju stanju kod ljudi.

DT1 indukovani su intraperitonealnim davanjem višestrukih malih doza streptozotocina (VMDS), u dozi od 40 mg/kg telesne mase, u trajanju od 5 dana.

Streptozotocin je, zbog ograničene vremenske stabilnosti, rastvaran neposredno pred davanje u hladnom 0.1 M natrijum-citratnom puferu (pH= 4.5). Prvi dan davanja streptozotocina definisan je kao Dan 1.

Svaka grupa je sadržala od 7 do 10 miševa. Grupe su bile sledeće:

Tretirane grupe:

1. Prva grupa životinja primala je VMDS + metanolni ekstrakt origana u profilaktičkom režimu- prvi tretman poklapao se sa prvom injekcijom STZ. Metanolni ekstrakt origana primenjen je u dozi od 5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u trajanju od 10 dana.
2. Druga grupa životinja primala je VMDS + metanolni ekstrakt origana u terapijskom režimu- prvi tretman sa primenjen je jedan dan nakon poslednje injekcije STZ. Metanolni ekstrakt origana primenjen je u dozi od 5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u trajanju od 10 dana.
3. Treća grupa životinja primala je VMDS + vodeni ekstrakt origana u profilaktičkom režimu, u dozi od 5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u trajanju od 10 dana.
4. Četvrta grupa životinja primala je VMDS + etil-acetatni ekstrakt origana u profilaktičkom režimu, u dozi od 2,5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u trajanju od 10 dana.
5. Peta grupa životinja primala je VMDS + ruzmarinsku kiselinu u profilaktičkom režimu, intraperitonealno, u dozi od 2,5 mg/kg po danu, u trajanju od 10 dana.
6. Šesta grupa životinja primala je VMDS + salvijanoličnu kiselinu u profilaktičkom režimu, u dozi od 2,5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u trajanju od deset dana.
7. Sedma grupa životinja primala je VMDS + karvakrol u profilaktičkom režimu, u dozi od 50 mg/kg karvakrola davanog *per os*, svakog drugog dana počevši od 7 dana pre prve injekcije STZ, a završivši se 1 dan nakon poslednje injekcije STZ.

Štokovi metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana rastvarani su u dimetil sulfoksidu (DMSO), a pre davanja razblaživani su u PBS-u. Karvakrol je rastvaran u maslinovom ulju. Ostale supstance rastvarane su u PBS-u.

Kontrolne grupe:

1. Prva grupa životinja primala je VMDS + PBS + DMSO (kontrolna grupa za životinje tretirane metanolnim i etil-acetatnim ekstraktom origana).

2. Druga grupa životinja primala je VMDS + PBS (kontrolna grupa za životinje tretirane vodenim ekstraktom origana, ružmarinskom kiselinom, salvijanoličnom kiselinom).
3. Treća grupa životinja primala je VMDS + maslinovo ulje (kontrolna grupa za životinje tretirane karvakrolom).
4. Četvrta grupa životinja primala je DMSO od 6. dana od prve injekcije STZ (kontrola za životinje tretirane metanolnim ekstraktom origana u terapijskom režimu).

Osnovni klinički parametri bolesti određivani su merenjem koncentracije glukoze u krvi izolovane iz repne vene pomoću ručnog glukometra (GlucoSure glucometer, Apex Biotechnology Group, Hsinšu, Tajvan) kao i merenjem telesne mase. Merenja su vršena u sedmodnevnim intervalima. Hiperglikemija je definisana kao vrednost glukoze  $\geq 11$  mmol/l, dok je promena telesne mase (%) izražena u odnosu na početnu vrednost telesne mase izmerenu nultog dana eksperimenta.

Dodatno, metanolni i etil-acetatni ekstrakt su davani zdravim životinjama u trajanju od 10 dana i u dozama primenjenim u *in vivo* eksperimentima, da bi se, 14-og dana od početka eksperimenta, procenili metabolički i imunološki parametri. Kontrolne grupe miševa primale su PBS + rastvarač (DMSO).

Životinje su praćene u trajanju od šest nedelja, nakon čega su žrtvovane. Izolovani su pankreasi za histološka, histochemijska i imunohistochemijska bojenja, kao i krv za određivanje koncentracije insulina u serumu ELISA testom.

#### **3.3.4. *Ex vivo* eksperimenti**

*Ex vivo* analize izvršene su 14-og dana od prve injekcije STZ. Životinjama je izolovan serum iz koga je određivana koncentracija insulina.

Fenotip ćelija izolovanih iz peritonealnog ispirka, slezine, pankreasnih limfnih čvorova i mononuklearnih pankreasnih infiltrata ( $0.1 \times 10^6$  ćelija po uzorku) analiziran je na protočnom citofluorimetru određivanjem površinskih i unutarćelijskih markera. Izolovane ćelije peritonealnog ispirka ( $1 \times 10^6$  ćelija po uzorku), slezine ( $5 \times 10^6$  ćelija po uzorku) i pankreasnog limfnog čvora ( $3 \times 10^6$  ćelija po uzorku) sađene su u ploče sa

po 24 bunarića i inkubirane su 24h u prisustvu LPS (5 ng/ml, peritonealni ispirak) ili 48h u prisustvu ConA (1 µg/ml, slezina i pankreasni limfni čvor). Nakon inkubacije pokupljeni su supernatanti u kojima je određivana koncentracija citokina kao i oslobođenog NO.

Iz ćelija slezine ( $5 \times 10^6$  ćelija po uzorku) izolovana je iRNK za određivanje ekspresije gena za *β-aktin*, *IL-17*, *RORγT*, *IL-4*, metodom RT-PCR (reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu), kao i proteini, za određivanje koncentracije fosforilisane forme p38, fosforilisane i ukupne forme signalnog transducera i aktivatora transkripcije 3 (pSTAT3 i STAT3) i β-aktina, imunoblot metodom.

### **3.4. Izolovanje ćelija i tkiva**

#### **3.4.1. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka**

Eksperimentalnim životinjama je nakon žrtvovanja ubrizgano 7 ml hladnog PBS-a intraperitonealno. Zatim im je otvorena trbušna duplja iz koje je pipetom sakupljen peritonealni ispirak. Ispirak je centrifugiran 5 min pri brzini od 500g, nakon čega su ćelije u talogu resuspendovane u medijumu za kultivisanje, prebrojane i korišćene dalje za eksperimente.

#### **3.4.2. Izolovanje ćelija slezine, cervikalnih i pankreasnih limfnih čvorova**

Nakon žrtvovanja, životinjama su sterilnim priborom izolovani slezina, pankreasni i cervikalni limfni čvor. Da bi dobili jednoćelijsku suspenziju, organi su nežno protiskivani kroz najlonsku mrežicu u Petri šoljama u kojima se nalazio medijum za kultivisanje, nakon čega su centrifugirani (5 min, 500g). U slučaju slezine uklonjeni su eritrociti puferom za lizu (eBioscience, San Dijego, Kalifornija, USA) i ćelije su ponovo centrifugirane. Nakon toga, ćelije su resuspendovane u medijumu za kultivisanje i dalje korišćene u eksperimentima.

### **3.4.3. Izolovanje mononuklearnih pankreasnih infiltrata**

Kako bi izolovali mononuklearne ćelije koje infiltriraju pankreas, žrtvovanim životinjama sterilnim priborom uklonjen je pankreas i smešten u sterilne Petri šolje sa HBSS i 10% FCS. Zatim je tkivo pankreasa usitnjeno na komadiće (0.5-1 mm) mehaničkim putem i oprano centrifugiranjem (250g, 10 min). Talog je resuspendovan u rastvoru HBSS 10% FCS u koji je dodata kolagenaza V za enzimsku razgradnju tkiva (2 mg/ml, 10 ml rastvora za jedan pankreas). Zatim su uzorci mućkani 15 min na 37°C u vodenom kupatilu, a nakon toga i na sobnoj temperaturi 20 s. Nakon toga, suspenzija je naslojena na rastvor za izolovanje ćelija po gustini (Histopaque-®1077, Sigma, Sent Luis, SAD) u odnosu 1:1 i centrifugirana (700g, 20 min, bez ubrzanja i kočenja). Nakon centrifugiranja, na granici dva sloja bio je jasno uočljiv prsten mononuklearnih ćelija. Prsten je pažljivo sakupljen pipetiranjem, prebačen u nove epruvete i dva puta centrifugiran u medijumu za kultivisanje na 650g i 600g, respektivno, po 5 min. Nakon toga, talog ćelija resuspendovan je u medijumu za kultivisanje, ćelije su brojane i korišćene u daljim eksperimentima.

### **3.4.4. Izolovanje pankreasnih ostrvaca**

Nakon žrtvovanja, životinjama je sterilnim priborom izvađen pankreas i stavljen u Petri šolje sa HBSS rastvorom. Potom je pankreas iseckan na manje delove (3-4 mm) i prebačen u epruvete sa rastvorom HBSS i kolagenazom V za enzimsku digestiju (1 mg/ml, 3 ml rastvora za jedan pankreas). Rastvor je mućkan 15 min na 37°C u vodenom kupatilu, nakon čega je digestija tkiva kolagenazom prekidana dodavanjem hladnog HBSS. Nakon taloženja tkiva na ledu i ispiranja HBSS rastvorom, odlivan je višak rastvora, a pankreasna ostrvca prikupljana su ručno, biranjem pomoću automatske pipete sa sterilnim nastavkom. Rastvor HBSS sa tkivom posmatran je pod svetlosnim mikroskopom i pankreasna ostrvca prebacivana su pipetom u Petri šolju sa medijumom za kultivisanje. Izolovana pankreasna ostrvca inkubirana su preko noći i korišćena u daljim eksperimentima.

### **3.5. Određivanje broja živih ćelija metodom tripan plavo bojenja**

Za određivanje ukupnog broja ćelija i relativnog broja živih ćelija korišćen je 0,1% rastvor boje tripan plavo rastvoren u PBS-u. Tripan plavo je boja za koju je karakteristično da ulazi u mrtve ćelije kroz oštećenja na njihovoj membrani, pa se na taj način posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom mogu razlikovati mrtve, plavo obojene, od živih, neobojenih ćelija. Data suspenzija ćelija mešana je sa rastvorom tripan plave boje u odnosu 1:1 ili 1:10, nakon čega su ćelije brojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Bürker-Türku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po ml suspenzije računat je po obrascu: broj ćelija / broj polja x 0,5 ili 2,5, zavisno od toga da li su ćelije mešane sa bojom 1:1 ili 1:10, respektivno, x  $10^6$ . Nakon utvrđivanja broja ćelija u suspenziji, njihova gustina je razblaživanjem podešena za kultivaciju i dalji eksperimentalni rad. Za određivanje broja živih ćelija preračunat je broj neobojenih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija koji je određen kao 100%.

### **3.6. Određivanje broja leukocita**

Za određivanje broja leukocita u krvi, krv je prvo izolovana iz retroorbitalnog pleksusa miševa. Stavljena je u male konusne epruvete koje su prethodno obložene heparinom (zidovi epruveta se obliju sa po 500  $\mu$ l heparina) kako bi se sprečila koagulacija krvi. Nakon toga, krv je pomešana sa Tirkovim (Türk) rastvorom u odnosu 1:5. Tirkov rastvor sastoji se od boje (gencijan ljubičasta) i sirćetne kiseline. Rastvor uništava eritrocite dok istovremeno boji jedra leukocita što omogućava vidljivost i kvantifikaciju leukocita. Nakon pravljenja 1:5 rastvora leukocita i Tirkovog rastvora, ćelije su izbrojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Bürker-Türku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po ml suspenzije računat je po obrascu: broj ćelija / broj polja x  $1.25 \times 10^6$  ćelija po ml.

### **3.7. Određivanje broja eritrocita**

Za određivanje broja eritrocita, krv je izolovana iz retroorbitalnog pleksusa životinja i stvaljena u male konusne epruvete obložene heparinom. Krv životinja rastvarana je u rastvoru PBS u odnosu 1:10, nakon čega su eritrociti izbrojani pod svetlosnim



mikroskopom u komori po Bürker-Türku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po ml suspenzije računat je po obrascu: broj ćelija / broj polja x  $2,5 \times 10^6$ .

### **3.8. MTT test za određivanje preživljavanja i proliferativnog kapaciteta**

Za određivanje preživljavanja ćelija korišćen je MTT test. On je zasnovan na redukciji tetrazolijumove soli 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (MTT), koju obavljaju dehidrogenaze aktivnih mitohondrija živih ćelija. Ovom redukcijom nastaje obojeno jedinjenje formazan. Nakon tretmana ćelija ili pankreasnih ostrvaca, na njihov talog je dodavano po 100  $\mu$ l rastvora MTT (0,5 mg/ml) (MTT je rastvoren u medijumu za kultivisanje). Potom su uzorci inkubirani 15 min na 37°C nakon čega su centrifugirani (500g, 5 min). Na talog ćelija dodato je po 100  $\mu$ l DMSO kako bi se ćelije lizirale i nastao formazan. Apsorbancija svetlosti, koja je proporcionalna broju živih ćelija, merena je na 540 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006; LKB, Beč, Austrija). Proliferativni kapacitet je izražen kao odnos vrednosti apsorbancije dobijene merenjem ćelija stimulisanih ConA i nestimulisanih ćelija.

### **3.9. Tripsinizacija ćelija**

RINm5F ćelije su adherentne ćelije, odnosno lepe se za podlogu flašice u kojima se nalaze. Za potrebe pasažiranja ili korišćenja u eksperimentu neophodno ih je prvo odlepiti od podloge što se radi tehnikom tripsinizacije. Tripsin je enzim koji iseca međućelijske veze i tako prekida veze ćelija sa podlogom. Nakon dostizanja konfluentnosti RINm5F ćelija (rast od 80%), medijum za kultivisanje ćelija je uklanjan, a u plastične flašice u kojima su gajene ćelije sipano je 10 ml PBS kako bi se uklonile mrtve i neadherentne ćelije, višak preostalog medijuma i FCS, kako ne bi ometali sam postupak tripsinizacije. Potom je PBS uklonjen, a na ćelije je dodato 1 ml rastvora tripsina (0,25%) i EDTA (0,02%) u PBS. Proces odlepljivanja ćelija prekidan je dodavanjem medijuma za kultivisanje u flašice u kojima su gajene ćelije. Ćelijska suspenzija centrifugirana je na 500g, 5 min, a talog ćelija resuspendovan u medijumu za kultivisanje, ćelije su brojane i korišćene za dalje eksperimente.

### **3.10. Test merenja apoptoze**

Kako bi odredili da li, i u kojoj meri ćelije pankreasnih ostrvaca umiru apoptozom nakon tretmana, urađen je ELISA test za detekciju apoptoze koji je komercijalno dostupan. Postupak izvođenja metode je obavljen prateći protokole obezbeđene od strane proizvođača (Roche Applied Science, Manhajm, Nemačka). Ukratko, nakon tretmana pankreasna ostrvca su prebacivana u plastične konusne epruvete i centrifugirane (500g, 5 min). Zatim je na talog ćelija dodat rastvor za liziranje ćelija (Roche Applied Science) i uzorci su ostavljeni 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega su centrifugirani (500g, 5 min). Supernatanti uzoraka (20 µl) prebačeni su u mikroploču (Roche Applied Science) i na njih je dodato 80 µl prethodno napravljenog imunoreagensa (anti-histon antitelo obeleženo biotinom i anti-DNK antitelo obeleženo peroksidazom poreklom iz rena (HRP eng. Horse Radish Peroxidase), u odnosu 1:1, rastvoreni u puferu za inkubaciju (Roche Applied Science). Uzorci su inkubirani 2h na sobnoj temperaturi, a potom je u ploču dodat pufer za inkubaciju, 3 puta po 300 µl. Potom je u svaki bunarić dodato po 100µl supstrata za peroksidazu (ABTS Substrate, Roche Applied Science), a ploča je inkubirana 15–20 min do razvijanja boje. Reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora za prekidanje (ABTS Stop Solution, Roche Applied Science) a apsorbancija je očitana pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče korišćenjem filtera za 405 nm. Dobijene vrednosti merene apsorbancije proporcionalne su broju ćelija u apoptozi.

### **3.11. Fluorimetrijski test za detekciju aktivnosti kaspaze 3**

Kaspaza 3 je protein je uključen u signalni put pokretanja procesa apoptoze. Aktivnost kaspaze 3 određena je fluorimetrijskim, komercijalno dostupnim testom (Biotium, Hejvord, SAD) prema uputstvima obezbeđenim od strane proizvođača. Nakon tretmana, pankreasna ostrvca prebačena su u male konusne epruvete i centrifugirana na 500g, 3 min. Talog ostrvaca resuspendovan je u puferu za rastvaranje (Assay Buffer) i ostrvca su lizirana 10 min na ledu. Nakon liziranja, uzorci su centrifugirani 5 min na 12000g. Talog (sa delovima ćelijskih membrana i jedrima) je odbačen, a supernatanti prebačeni u ploču za merenje fluorescencije. Njima je dodavan supstrat za kaspazu 3 (1

mM, (Ac-DEVD)<sub>2</sub>-R110, Biotium) i pufer za rastvaranje (Biotium), nakon čega su inkubirani 45 min na 37° C. Potom je vrednost fluorescencije očitana korišćenjem ekscitacionog filtera na 485 nm i emisionog filtera na 535 nm pomoću Chameleon fluorimetar (Hidex, Oj, Turku, Finska). Dobijena vrednost fluorescencije proporcionalna je aktivnosti kaspaze 3.

### **3.12. Merenje akumulacije nitrita Grisovom reakcijom**

Koncentracija nitrita, kao merilo produkcije NO i efektorske funkcije makrofaga, određivana je Grisovom reakcijom. Ukratko, nakon inkubacije ćelija uzeto je po 50 µl supernatanta i prebačeno u ploče sa 96 bunarića. Potom je u ploču dodato po 50 µl Grisovog reagensa (0,1% rastvor N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1% rastvor sulfanilamida u 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Uzorci su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi a apsorbancija razvijene boje merena je na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Da bi izračunali koncentraciju nitrita, napravljena je standardna kriva određivanjem apsorbancija poznatih koncentracija NaNO<sub>2</sub>, na osnovu koje su preračunate koncentracije nitrita u uzorcima.

### **3.13. Merenje sekrecije proteina ELISA testom**

Kako bi odredili koncentraciju citokina u izolovanim serumima i supernatantima korišćen je sendvič ELISA test pomoću kojeg se proteini detektuju visokom specifičnošću i osetljivošću. Korišćeni su komercijalni kompleti monoklonskih antitela za merenje proteina: insulin (Mercodia, Upsala, Švedska), IL-17, TNF (BD Bioscience, Bedford, SAD), IL-2, IL-4, IL-6, TGFβ, IL-23, IFN-γ, IL-10 (eBioscience), IL-1β i IL-17 (R&D systems, Mineapolis, Minesota, SAD). Postupak izvođenja ELISA testa obavljen je prema protokolima obezbeđenim od strane proizvođača. Ploče sa 96 mesta (MaxiSorp, Nunk, Danska) obložene su primarnim antitelom (50 µl po bunariću) i ostavljene preko noći. Zatim su bunarići ispirani rastvorom PBS + 0,01% Tween (3 puta sa 300 µl po bunariću) u cilju uklanjanja nevezanog antitela. Nespecifična mesta vezivanja na primarnom antitelu blokirana su sa po 100 µl blokirajućeg rastvora, 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja ploča je ponovo ispirana sa rastvorom PBS + 0,01% Tween (3 puta sa 300 µl po bunariću), a potom je dodato po 50 µl uzoraka

(serumi, supernatanti ili standard) po 50  $\mu$ l po bunariću. Nakon dva sata inkubacije ploče su ispirane 3 puta nakon čega je dodato 50  $\mu$ l po bunariću sekundarnog antitela obeleženog biotinom. Nakon 1 h ploče su ispirane 3 puta a zatim je sipan rastvor avidina konjugovanog sa HRP (50  $\mu$ l po bunariću), nakon čega su ploče inkubirane 30 min u mraku. Po isteku inkubacije i ispiranju ploča, dodato je po 50  $\mu$ l supstrata za peroksidazu, tetrametilbenzidina (TMB), a zatim su ploče držane u mraku dok se razvijala boja. Reakcija razvijanja boje prekinuta je dodavanjem po 50  $\mu$ l 1M HCl, a apsorbancija je očitana pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče korišćenjem filtera za 405 nm. Koncentracija proteina određena je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za serijska razblaženja standarda poznatih koncentracija.

### **3.14. Metoda protočne citofluorimetrije**

Metoda protočne citofluorimetrije (FACS eng. Fluorescence Activated Cell Sorting) je posebna vrsta protočne citometrije. FACS omogućava brzo, tačno i kvantitativno karakterisanje fluorescentnih signala poreklom od individualnih ćelija. S obzirom na to da se fluorescencija detektuje po jednoj ćeliji, moguća je primena više različitih fluorofora po istom uzorku. FACS se zasniva na korišćenju fluorescentnih boja pomoću kojih se obeležavaju površinski i unutarćelijski markeri. Zatim se fluorofora ekscituje svetlošću određene talasne dužine (ekscitacioni maksimum), a emisija fluorofore se čita na emisionoj talasnoj dužini. Intenzitet fluorescencije obeleženih uzoraka detektovan je na CyFlow Space protočnom citofluorimetru i analiziran je korišćenjem softverskog programa FloMax (Partec GmbH, Münster, Nemačka). U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće fluorescentne boje: mišja antitela obeležena sa fluorescein izotiocijanatom (FITC, eng. Fluorescein Isothiocyanate), fikoeritriinom (PE, eng. Phycoerythrin), alofikocijaninom (APC, eng. Allophycocyanin), eFluor®660 ili PE-cijaninom 5 (PE-Cy5, eng. PE-Cyanine 5). Ekscitacioni i emisioni maksimumi fluorescentnih boja dati su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Fluorescentne boje korišćene u eksperimentima

<b>Fluorescentna boja</b>	<b>Ekscitacioni maksimum (nm)</b>	<b>Emisioni maksimum (nm)</b>
<b>PE</b>	488	578
<b>FITC</b>	488	518
<b>APC</b>	633	660
<b>PE-Cy5</b>	488	667
<b>eFluor®660</b>	633	668

### 3.14.1. Detekcija površinskih markera ćelija

Kako bi utvrdili fenotip ćelija izolovanih *ex vivo* kultura peritonealnog ispirka, slezine, pankreasnog limfnog čvora i mononuklearnih pankreasnih infiltrata, izložili smo ih fluorescentno obeleženim antitelima za površinske markere ćelija imunskog sistema. Ćelije su prvo oprane u PBS sa 1% BSA i centrifugirane su (500g, 3 min). Potom je talog ćelija resuspendovan u PBS sa 1% BSA u koji je dodavano odgovarajuće obeleženo antitelo ili izotipska kontrola. Izotipska kontrola predstavlja antitelo koje nije specifično za ciljani antigen, ali ima nespecifične odlike antitela koje se koristi u eksperimentu. Korišćenjem izotipske kontrole proverava se specifičnost vezivanja primarnog antitela, odnosno odbacuje se mogućnost vezivanja zbog nespecifičnih interakcija sa drugim ćelijskim proteinima ili sa receptorom za konstantni deo antitela. Takođe, korišćena je i negativna kontrola u kojoj su ćelije inkubirane bez dodatog antitela (nebojene ćelije). U eksperimentima su korišćena sledeća mišja antitela i odgovarajuće izotipske kontrole: CD4-PE (izotipska kontrola: IgG2b κ lanac iz pacova), CD4-FITC (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova), CD8-PE (izotipska kontrola Ig G2a κ lanac iz pacova), CD25-PE (izotipska kontrola IgG1 iz pacova), F4/80-FITC (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), CD40 APC (izotipska kontrola IgM iz hrčka) (sva iz eBioscience) ili CD206-PE (izotipska kontrola IgG iz

koze) (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, SAD). Nakon 1h inkubacije u mraku na 4°C, uzorci su prani kako bi se uklonio višak nevezanog antitela i finalno resuspendovani u 1 ml PBS. Fluorescencija je detektovana na protočnom citofluorimetru i analizirana pomoću softverskog programa.

### **3.14.2. Detekcija unutarćelijskih citokina**

Kako bi detektovali citokine unutar ćelija, *ex vivo* kulture ćelija slezine, pankreasnih limfnih čvorova i mononuklearnih pankreasnih infiltrata resuspendovane su u 500 µl medijuma za kultivisanje ćelija u koji je dodavano PMA (400 ng/ml) i jonomicin (800 ng/ml), koji služe za *in vitro* stimulaciju i aktivaciju ćelija, i brefeldin A (5 µg/ml). Brefeldin A je inhibitor transporta proteina i omogućava unutarćelijsku detekciju citokina jer sprečava njihovu sekreciju tako što ih akumulira u Goldžijevom kompleksu i endoplazmatskom retikulumu. Uzorci su inkubirani 4h na 37°C. Po završetku inkubacije u uzorke je dodat PBS sa 1% BSA i centrifugirani su na 800g, 3 min. Zatim su bojeni površinski markeri ćelija CD4-FITC antitelom po opisanom protokolu. Nakon bojenja površinskih markera, uzorcima je dodavan rastvor PBS sa 1% BSA i nakon centrifugiranja na 800g, 3 min, ćelije su fiksirane 2% rastvorom paraformaldehida (Serva, Hajdelberg, Nemačka) 15 min u mraku na 4°C. Fiksacija je proces kojim se zadržava struktura ćelija i sprečava gubitak ćelijskih konstituenata. Potom je ćelijama dodat rastvor PBS sa 1% BSA i nakon centrifugiranja na 800g, 3 min, permeabilizovane su rastvorom za permeabilizaciju ćelija (PB eng. Permeabilization Buffer, eBioscience) preko noći u mraku na 4°C. Permeabilizacija ćelija služi za pravljenje pora na ćelijskoj membrani i tako molekuli unutar ćelija postaju dostupni. Nakon permeabilizacije, ćelije su prane dva puta u PB uz međukorak centrifugiranja na 800g, 3 min, i zatim su dodavana fluorescentno obeležena mišja antitela za IFN-γ-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), IL-4-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), IL-10-PE (izotipska kontrola IgG2b iz pacova) (sva iz eBioscience) ili IL-17-PE (izotipska kontrola IgG1 lanac iz pacova) (BD Bioscience) ili odgovarajuće izotipske kontrole. Po završetku inkubacije 1 h u mraku na 4°C, uzorcima je dva puta dodavan PB, uz međukorak centrifugiranja na 800g, 3 min i talog ćelija je finalno resuspendovan u 1 ml

PBS. Fluorescencija je detektovana na protočnom citofluorimetru i analizirana pomoću softverskog programa.

### **3.14.3. Detekcija Treg ćelija**

Treg ćelije detektovane su korišćenjem kompleta za bojenje Treg ćelija miša (eBioscience) prema protokolu obezbeđenom od strane proizvođača. Najpre je ćelijskim suspenzijama *ex vivo* kultura ćelija slezine, pankreasnog limfnog čvora i mononuklearnih pankreasnih infiltrata dodavan rastvor za protočnu citofluorimetriju (FCBS eng. Flow Cytometry Staining Buffer, eBioscience). Nakon centrifugiranja na 500g tokom 3 min, talog ćelija je resuspendovan u FCBS u koji su dodavana CD4-FITC (izotipska kontrola IgG2b  $\kappa$  lanac iz pacova) i CD25-PE (izotipska kontrola IgG1 iz pacova) i inkubirana 1 h u mraku na 4°C. Potom su nevezana antitela uklanjana dodavanjem FCBS u uzorke, 2 puta uz međukorak centrifugiranja na 500g, 5 min. Nakon toga ćelije su fiksirane rastvorom za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija (eBioscience) preko noći u mraku na 4°C. Potom je usledilo sipanje FCBS u uzorke i nakon centrifugiranja na 500g, 5 min, ćelije su permeabilizovane rastvorom za permeabilizaciju za FoxP3 (FoxP3 PB, eBioscience) 30 min u mraku na 4°C. Zatim je u uzorke dodavano mišje antitelo FoxP3-PE-Cy5 (izotipska kontrola IgG2a iz pacova, eBioscience) i uzorci su bojeni 1h u mraku na 4°C. U eksperimentu su korišćene odgovarajuće izotipske kontrole, kao i negativna kontrola. Po završetku inkubacije, višak nevezanih antitela uklanjan je dva puta sa FoxP3 PB (eBioscience), uz centrifugiranje na 800g, 5 min, a ćelije su finalno resuspendovane u FCBS i analizirane na protočnom citofluorimetru.

### **3.14.4. Detekcija transkripcionih faktora**

Za detekciju transkripcionih faktora, ćelije slezine su fiksirane rastvorom za fiksaciju i permeabilizaciju ćelija (eBioscience) preko noći u mraku na 4°C. Potom im je dodavan FCBS (eBioscience) uz centrifugiranje na 500g, 5 min i permeabilizovane su sa FoxP3 PB (eBioscience) 30 min u mraku na 4°C. Zatim su dodavana antitela za humani ili mišji T-bet-PE (izotipska kontrola IgG1  $\kappa$  lanac iz miša), humani ili mišji GATA-3-eFluor®660 (izotipska kontrola IgG2b  $\kappa$  lanac iz pacova) ili humani ili mišji ROR $\gamma$ T-

PE (izotipska kontrola IgG2a iz pacova) (svi iz eBioscience). Nakon 1 h inkubacije u mraku na 4°C, višak nevezanih antitela uklanjan je rastvorom FoxP3 PB (eBioscience), uz centrifugiranje na 800g, 3 min. Talog ćelija finalno je resuspendovan u FCBS (eBioscience) i analiziran na protočnom citofluorimetru.

### **3.15. Priprema uzoraka za izolovanje RNK i proteina**

Nakon izolacije tkiva, ona su obrađena do dobijanja ćelijskih suspenzija *ex vivo*. Zatim su ćelije prebačene u male konusne epruvete i centrifugirane (2000g, 3 min) da bi na njihov talog bilo dodato 500 µl reagensa za liziranje (mi-Total RNA Isolation Kit, Metabion). Epruvete su lagano promućkane i inkubirane na 4°C 10 min. Nakon toga u svaki uzorak dodato je po 100 µl hloroforma pa su uzorci stavljeni na centrifugiranje (12000g, 4°C, 20 min). Posle centrifugiranja, u svakom uzorku su bila uočljiva jasno izdvojena tri sloja: gornja, vodena faza, u kojoj se nalazila ribonukleinska kiselina (RNK), intermedijarna faza sa DNK prstenom i donja fenolna faza u kojoj su proteini i lipidi. Vodena faza prebacivana je u nove male konusne epruvete u cilju izolovanja RNK, a fenolna faza je korišćena za izolovanje proteina.

### **3.16. Izolovanje proteina i određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju**

Fenolna faza dobijena pri izolovanju RNK prebačena je u nove konusne epruvete. Proteini su precipitirani pomoću acetona koji je dodat u odnosu 1:3, a uzorci su zatim inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani (12000g, 4°C, 10 min). Supernatanti su odbačeni, a talog, koji predstavlja proteine, je resuspendovan u 1 ml 0,3 M guanidin hidrohlorida rastvorenog u 95% etanolu i 2,5% glicerolu i sonifikovan 2 puta po 10 s (Sonics & Materials, Inc., Njutaun, Konektikat, SAD). Zatim je inkubiran 10 min na sobnoj temperturi, a potom centrifugiran na (8000g, 4°C, 5 min). Ovaj proces (dodavanje rastvora guanidin hidrohlorida, inkubacija, centrifuga) ponovljen je još dva puta. Finalno, talog je rastvoren u 1 ml 95% etanola sa 2,5% glicerola, inkubiran u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi i centrifugiran (8000g, 4°C, 5 min). Potom je etanol odlivan, a talog proteina sušen 5 do 15 min, odnosno dok nije ispario sav etanol. Osušeni talog finalno je rastvoren u 100 µl



pufera za liziranje ćelija (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 na 25°C, 2% SDS, 10% glicerola i 50 mM DTT u destilovanoj vodi).

Nakon tretmana izolovanih pankreasnih ostrvaca, uzorci su lizirani puferom za liziranje ćelija, u koji su neposredno pred upotrebu dodati inhibitori proteaza (10 µg/ml aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF). Zatim su uzorci centrifugirani (20000g, 4°C, 20 min), a supernatanti (sa rastvorenim proteinima) su prebacivani u nove male konusne epruvete dok je talog (sa ćelijskim ostatkom i DNK) odbacivan.

Koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija merena je metodom po Loriju (Lowry i sar, 1951). Uzeto je po 20 µl uzoraka (razblaženih 10 puta u destilovanoj vodi) i pomešano sa 300 µl rastvora 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O i 2% K-Na-tartarat u H<sub>2</sub>O, pomešanih u razmeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60 µl Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Narednih 30 min, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Apsorbancija uzoraka merena je na 670 nm automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija proteina određena je na osnovu standardne krive rastvora BSA (0,1-1 mg/ml) u destilovanoj vodi.

### **3.17. Imunoblot analiza za određivanje količine proteina**

Uzorci (30 µg proteina) su mešani u odnosu 3:1 sa standardnim puferom za nalivanje na gel za elektroforezu (1 M Tris-HCl pH 6,8, 20% SDS, 0,2 M β-merkaptotanol, 0,004% bromfenol plavo, 20% glicerol) i razdvajani elektroforezom na 12% SDS-poliakrilamidnom gelu. Po završenoj elektroforezi sledio je transfer na polivinil di fluoridnu membranu korišćenjem polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka) na 5 mA/cm<sup>2</sup>. Nakon transfera, kako bi sprečili nespecifično vezivanje antitela za membranu, membrana je blokirana korišćenjem 5% BSA u PBS sa 0,1% Tween-20, 1 h na sobnoj temperaturi. Zatim je membrana inkubirana preko noći na 4°C sa primarnim antitelima specifičnim za fosforisanu formu p38 (p-p38) (Cell Signaling Technology, Boston, Masačusets, SAD), fosforisanu formu STAT3 (pSTAT3) i STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Kruz, Kalifornija, SAD) i β-

aktin (Abcam, Kembridž, Velika Britanija) koja su sva proizvedena u kuniću. Sva primarna antitela stavljena su u koncentraciji 1:1000. Potom je usledila inkubacija od 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa HRP (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija) koja pokazuje specifičnost za kunićev IgG (1:10000). Vezana antitela detektovana su hemiluminescencijom (ECL, GE Healthcare). Količina proteina merena je denzitometrijski upotrebom programa Scion Image (2000-2001 Scion Corporation) i preračunata u odnosu na količinu ukupnog p38 ili  $\beta$ -aktina, što je izraženo grafički na slikama.

### **3.18. Izolovanje RNK**

Nakon razdvajanja uzoraka tretiranih reagensom za liziranje u faze hloroformom, vodena faza koja sadrži RNK prebačena je u male konusne epruvete. RNK je staložena dodavanjem 350  $\mu$ l izopropanola i držanjem 10 min na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Uzorci su centrifugirani na 12000g, 20 min na  $4^{\circ}\text{C}$ , a na talog RNK je dodavan hladni 70% etanol, 2 puta, uz međukorak taloženja centrifugiranjem uzoraka na 12000g, 10 min na  $4^{\circ}\text{C}$ . Po završetku ispiranja, etanol je uklanjao pipetiranjem, a talog RNK je sušen 5 do 15 min (dok ne ispari sav etanol) i potom rastvaran u 20  $\mu$ l DEPC (eng. Diethylpyrocarbonate) vode (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Koncentracija izolovane RNK u uzorcima određivana je merenjem apsorbancije na 260 i 280 nm poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu (odnos  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu korišćen je spektrofotometar (GeneQuant Pro, Ameršam, Bakingemašajr, Velika Britanija).

### **3.19. Reakcija reverzne transkripcije**

Nakon izolovanja i merenja, RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevedena u komplementarnu DNK (cDNK). cDNK predstavlja lanac DNK sintetisan na osnovu lanca iRNK u reakciji koju katalizuje enzim reverzna transkriptaza. U 1,5  $\mu$ g RNK dodavano je 1  $\mu$ l rastvora nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas) i 1  $\mu$ l rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas). Kao kontrola za eventualnu kontaminaciju služila je destilovana voda kojoj su dodavani nasumični prajmeri i dNTP označena kao negativna kontrola. Uzorci su inkubirani na  $70^{\circ}\text{C}$  u

trajanju od 5 min, da bi se nasumični prajmeri vezali za RNK, nakon čega je reakcija prekidana prebacivanjem uzoraka na led. Potom je u uzorke dodavano po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (Fermentas), po 1 µl enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas) i po 0,5 µl inhibitora RNaze (Fermentas). Uzorci su inkubirani na 25°C 15 min, a potom na 42°C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze u trajanju od 60 min. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70°C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije enzima reverzne transkriptaze, 10 min i 95°C, u cilju razdvajanja sintetisanih lanaca cDNK, 3 min. Uzorci sa cDNK su čuvani na -20°C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

### **3.20. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu**

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (eng. Real-time PCR) je metoda koja pored umnožavanja proizvoda omogućava njegovu kvantifikaciju i koristi se za analizu relativne ekspresije gena. U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bunarića adaptirana za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Varington, Velika Britanija) i u svaki bunarić dodavano je po 5 µl reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix, koji sadrži potrebnu fluorescentnu boju SYBR Green, enzim AmpliTaq Gold koji je DNK polimeraza i dNTP (Applied Biosystems) i po 1 µl specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je 500 nM) za gen od interesa ili za referentni gen *β-aktin*. Korišćeni parovi prajmera dati su u Tabeli 3. Potom je u svaki bunarić dodavano po 3 µl odgovarajućeg uzorka cDNK. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Ploča je pokrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), centrifugirana 2 min na 1000g i prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 min na 95°C (u cilju denaturacije lanaca), a zatim 40 ciklusa koji su obuhvatali 15 s na 95°C (za početnu denaturaciju lanaca), i 1 min na 60°C (za vezivanje prajmera i elongaciju lanaca). Po završenom umnožavanju postepeno se snižava temperatura termobloka, uz praćenje smanjenja intenziteta fluorescencije, koje odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Ovaj korak obezbeđuje proveru nastalog proizvoda i pokazuje da li je eventualno nastao dimer prajmera ili kontaminacija genomskom DNK. Za analizu

dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući softverski program (7000 System Software) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao  $2^{-dCt}$  gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i  $\beta$ -aktina.

**Tabela 3.** Parovi prajmera korišćeni u eksperimentima.

Gen	Parovi prajmera	Identifikacioni broj u bazi podataka
<i><math>\beta</math>-aktin</i>	5'-GACCTGACAGACTACC-3' 5'-GGCATAGAGGTCTTTACGG-3'	NM_007393.2
<i>IL-17</i>	5'-GGAGAGCTTCATCTGT-3' 5'-GACCCTGAAAGTGAAGGG-3'	NM_010552.3
<i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	5'-CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3' 5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'	NM_011281.1
<i>IL-4</i>	5'-ATCCTGCTCTTCTTTCTCG-3' 5'-GATGCTCTTTAGGCTTTCC-3'	NM_021283.2

### 3.21. Priprema histoloških preparata u parafinu

Nakon uklanjanja iz životinja pankreasi su stavljeni u rastvor 10 % formalina u kome su stajali nedelju dana nakon čega su kalupljeni u parafin. Prvo je obavljena dehidratacija tkiva i to tako što su držana u etanolu rastućih koncentracija (70 - 100%). Nakon toga, tkiva su stavljana u, redom: 100% etanol-ksilol (1:1), ksilol (2 puta, 3 min) i na kraju u otopljeni parafin. Tkivo je držano u termostatu 2 h (56°C), a zatim je prebačeno u nov parafin u kome je stajalo tokom noći. Sutradan, tkivo je prebačeno u kalupe u kojima se nalazio finalni parafin i tako dobijeni trajni preparati čuvani su na sobnoj temperaturi. Tkiva su sečena na mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Veclar, Nemačka), a isecci debljine 5  $\mu$ m stavljeni su na predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, Braunšvajg, Nemačka).

### **3.22. Imunohistochemijsko bojenje**

Deparafinizacija tkivnih isečaka, neophodna kako bi oni bili dostupni za bojenje, izvršena je držanjem pločica sa tkivnim isečcima u ksilolu 2 puta po 2 min, a zatim su oni rehidratirani u rastvorima etanola od 100 do 70% i na kraju u destilovanoj vodi. U cilju demaskiranja antigena, tkiva su tretirana 0,1% rastvorom tripsina 30 min na 37°C. Endogena peroksidaza blokirana je rastvorom 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 min na sobnoj temperaturi. Dalje su isecci inkubirani sa antitelom za nitrotirozin (1:500, Sigma) proizvedenim u kuniću ili antitelom za insulin (1:100, Santa Cruz Biotechnology) proizvedenim u kuniću, 1 h na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Detekcija je rađena indirektnom imunoperoksidaznom metodom pomoću komercijalnog seta za antitela kunića (Rabbit ExtrAvidin peroxidase staining kit, Sigma). Preseci su inkubirani 30 min sa sekundarnim antitelom kunića obeleženim biotinom i avidinom konjugovanim sa HRP. Između svih opisanih koraka pločice su prane sa PBS 3 puta po 5 min kako bi se uklonio višak nevezanog antitela. Nakon toga na preseke je nanošen supstrat za peroksidazu, rastvor DAB. Razvijanje boje praćeno je pod mikroskopom 3-5 min. Po postizanju braon boje reakcija je prekidana nanošenjem rastvora PBS. Potom je rađeno kontrastno bojenje Majerovim hematoksilinom 3 min. Pokrovne pločice lepljene su gelom (DakoCytomation, Kalifornija, SAD), a preparati analizirani na svetlosnom mikroskopu. Prisustvo infiltriranih mononuklearnih ćelija analizirano je pri uveličanju preseka 40 x. Na osnovu prisustva insulitisa, pankreasna ostrvca raspoređena su u sledeće kategorije: zdrava ostrvca – nisu bili prisutni infiltrati mononuklearnih ćelija, peri-insulitits – prisutni su infiltrati ćelija oko ostrvaca, ali je očuvana arhitektura ostrvaca, i insulitis – intenzivna infiltracija ćelija u ostrvca, uz gubitak arhitekture ostrvaca. Reprezentativni preseci fotografisani su korišćenjem Leica fotomikroskopa (Leica Microsystems GmbH) pri 400 x uveličanju.

### **3.23. Određivanje metaboličkih parametra**

Četrnaestog dana od početka tretmana zdravih C57BL/6 miševa metanolnim ili etil-acetatnim ekstraktom, kao i kontrola tretiranih PBS + DMSO, urin životinja je ispitan na prisustvo proteina, glukoze i krvi, pomoću polu-kvantitativnih Bayer Multistixw 10

SG tračica za testiranje urina (Bayer, Leverkusen, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, tračica se uroni u urin životinje, sačeka se 60-120 s u zavisnosti od parametra a što je indikivano od strane proizvođača, dok se ne razviju boje na tračici. Svaka boja indikator je određenog parametra što je navedeno u legendi, a intenzitet boje odgovara koncentraciji datog parametra, što je takođe navedeno u legendi.

### **3.24. Statistička obrada podataka**

Rezultati *in vitro* eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD) triplikata kultura jednog reprezentativnog eksperimenta od najmanje tri izvedena ili SV + SD više nezavisnih eksperimenata. *In vivo* i *ex vivo* eksperimenti izvedeni su tri puta, grupe su imale ( $7 \leq n \leq 10$ ) životinja, a prikazane su SV  $\pm$  SD iz jednog reprezentativnog eksperimenta. Statistička značajnost određivana je analizom varijansi (ANOVA), nakon čega je rađen Student-Newman-Keuls-ov test za višestruka poređenja ili Student-ov t-test. Vrednost parametra  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom. Korišćen je paket Statistika 6.0 (StatSoft, INC, Tulsa, SAD).

# 4. Rezultati

#### **4.1. Dejstvo metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na ćelije imunskog sistema i beta ćelije pankreasa *in vitro***

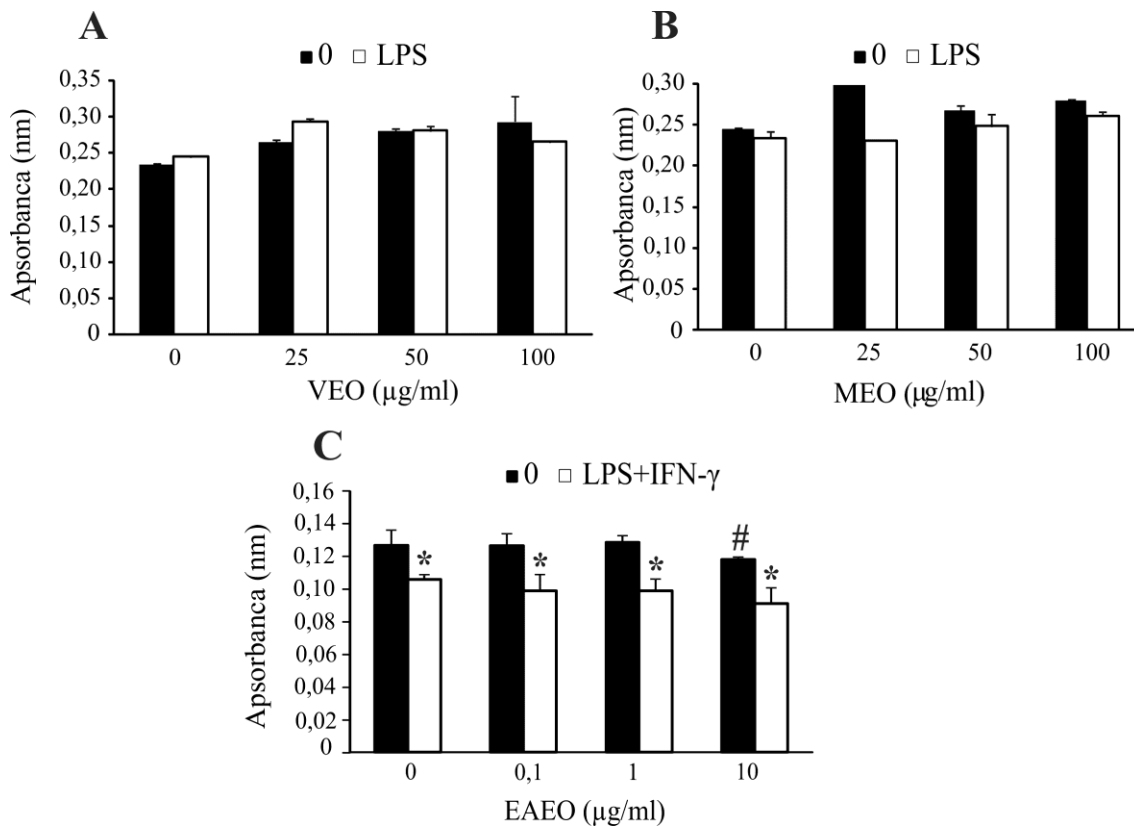
S obzirom na to da su ćelije imunskog sistema koje učestvuju u patogenezi DT1 makrofagi i limfociti, a da su ciljne ćelije protiv kojih je pokrenut autoimunski odgovor u DT1 beta ćelije pankreasa, prva istraživanja u ovoj studiji bila su usmerena na pojedinačno ispitivanje efekata metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na preživljavanje i funkciju makrofaga, limfocita i beta ćelija pankreasa u *in vitro* uslovima.

##### **4.1.1. *In vitro* efekat metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na ćelije peritoneuma**

Imajući u vidu da su makrofagi prve ćelije koje infiltriraju pankreasna ostrvca (Bluestone i sar, 2010), prva istraživanja su bila usmerena na ispitivanje *in vitro* efekta ekstrakata origana na preživljavanje i funkciju makrofaga. U tom kontekstu, izolovane su ćelije peritoneuma bogate makrofagima iz mužjaka miševa soja C57BL/6 koje su zatim tretirane različitim koncentracijama metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana. Koncentracije su odabrane na osnovu podataka iz literature (Ocana-Fuentes i sar, 2010). Makrofagi su istovremeno stimulisani LPS-om. LPS, endotoksin Gram negativnih bakterija, poznat je po tome da može da stimuliše snažnu inflamaciju (Abbas, 2006). On se vezuje za TLR receptore (eng. Toll Like Receptors) na površini makrofaga i promoviše sekreciju inflamacijskih citokina i azot monoksida (NO) (Abbas, 2006). U slučaju etil-acetatnog ekstrakta origana, ćelije su stimulisane kombinacijom LPS i IFN- $\gamma$ , koja dodatno potencira stimulaciju makrofaga. U uslovima stimulacije ćelija peritoneuma LPS-om, tretman metanolnim i vodenim ekstraktom origana nije imao efekta na preživljavanje ćelija u odnosu na stimulisane, netretirane ćelije (Slika 4A i 4B). Tretman ćelija peritoneuma etil-acetatnim ekstraktom origana u nestimulisanim uslovima imao je efekta na vijabilnost samo u najvećoj primenjenoj koncentraciji (10  $\mu\text{g/ml}$ ), u kojoj je smanjio ćelijsko preživljavanje (Slika 4C). Nakon što su ćelije stimulisane LPS-om i IFN- $\gamma$ , preživljavanje ćelija je bilo očekivano smanjeno u odnosu na nestimulisane ćelije. U takvim uslovima etil-acetatni ekstrakt



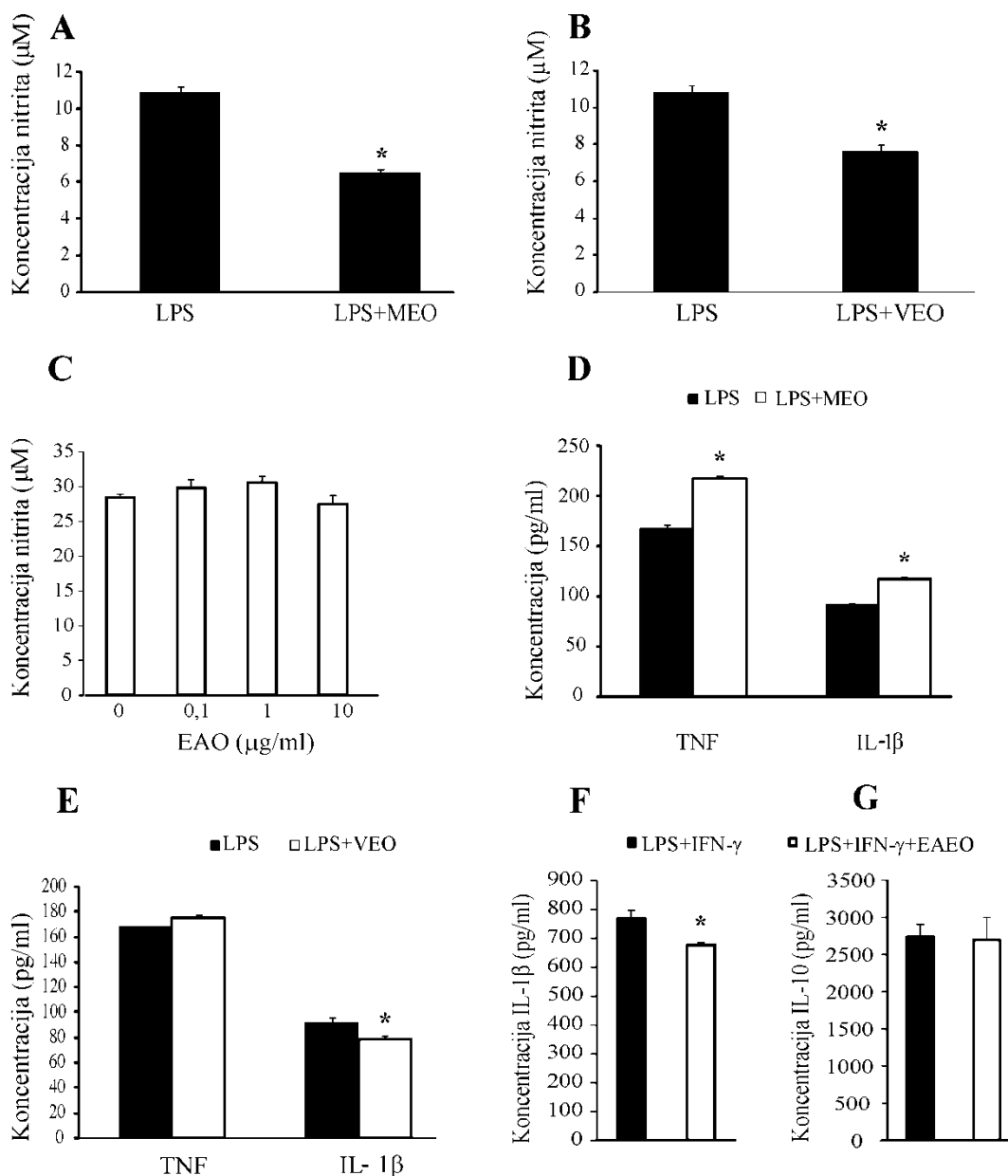
origana nije pokazao dodatni efekat na vijabilitet (Slika 4C). Dakle, ekstrakti origana nisu pokazali citotoksični efekat na makrofage.



**Slika 4. *In vitro* efekat metanolnog (MEO), vodenog (VEO) i etil-acetatnog (EAEO) ekstrakta origana na preživljavanje makrofaga.** Makrofagi su izolovani iz peritonealne tečnosti C57BL/6 miševa i stimulirani su LPS-om (MEO i VEO) ili LPS+IFN- $\gamma$  (EAEO) u odsustvu (0) ili prisustvu različitih koncentracija MEO, VEO i EAEO u trajanju od 24h. (A, B, C) Preživljavanje makrofaga mereno MTT testom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \*P < 0,05 u odnosu na kontrolu, #P < 0,05 EAEO tretirana u odnosu na netretiranu grupu.

U sledećem eksperimentu je ispitano stanje efektorskih funkcija makrofaga, koje se određuju merenjem njihovih pro- i anti-inflamacijskih medijatora. Sekretija NO, medijatora inflamacije, je bila značajno niža u ćelijama peritoneuma stimuliranim LPS-om i tretiranim metanolnim i vodenim ekstraktom origana (100 µg/ml) u odnosu na kontrolu (Slika 5A i 5B). Za razliku od njih, tretman različitim koncentracijama etil-acetatnog ekstrakta origana nije značajno uticao na sekretiju NO ćelija peritoneuma stimuliranih LPS-om i IFN- $\gamma$  (Slika 5C). Sekretija inflamacijskih citokina makrofaga, IL-1 $\beta$  i TNF, je bila značajno povećana kod tretmana metanolnim ekstraktom origana (Slika 5D), dok je kod tretmana vodenim ekstraktom origana sekretija IL-1 $\beta$  bila

značajno smanjena (Slika 5E). Tretman ćelija peritoneuma etil-acetatnim ekstraktom origana značajno je smanjio sekreciju IL-1 $\beta$  (Slika 5F), dok na sekreciju anti-inflamacijskog IL-10 nije imao efekta (Slika 5G).



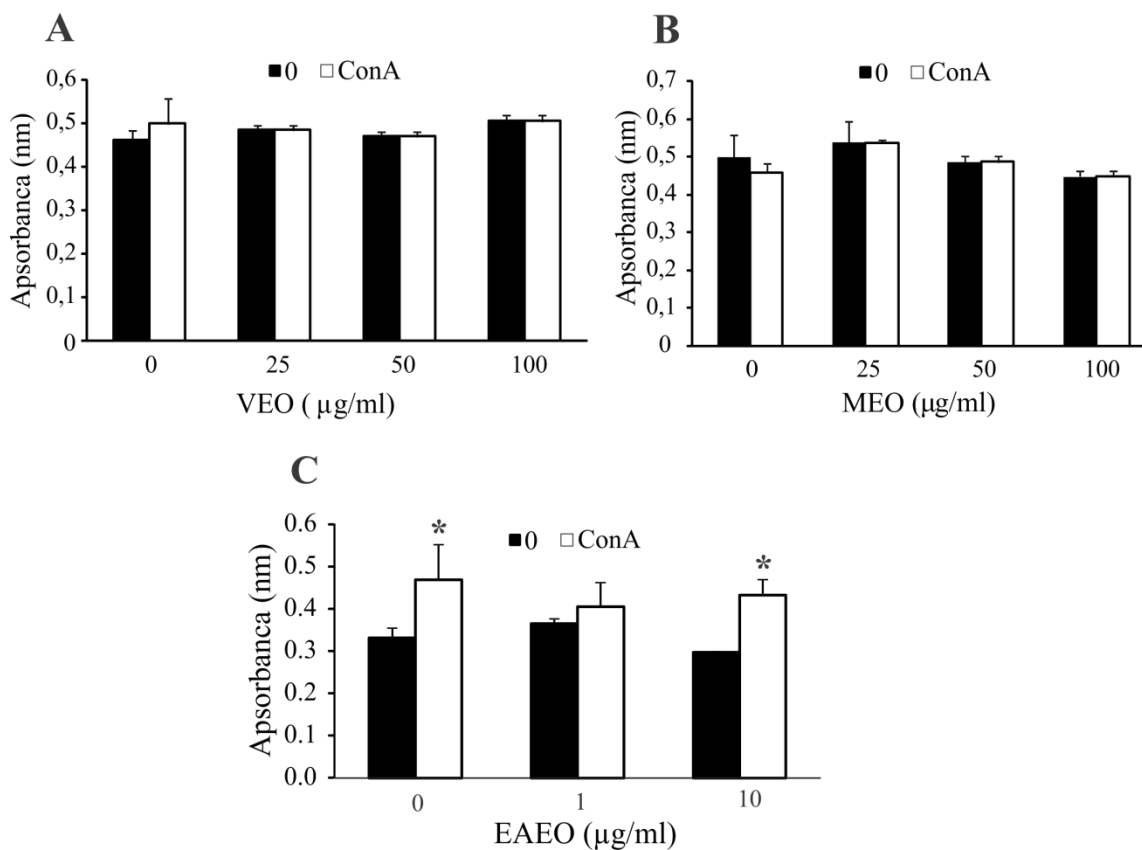
**Slika 5.** *In vitro* efekat metanolnog (MEO), vodenog (VEO) i etil-acetatnog ekstrakta origana (EAEO) na funkciju makrofaga. Makrofagi su izolovani iz peritonealne tečnosti C57BL/6 miševa i stimulisani su LPS-om (MEO i VEO) ili LPS+IFN- $\gamma$  (EAEO) u odsustvu (0) ili prisustvu različitih koncentracija MEO, VEO i EAEO u trajanju od 24h. Nakon toga izolovani su supernatanti. (A, B, C) Akumulacija nitrita merena Grisovom reakcijom. (D, E, F) Koncentracija citokina TNF, IL-1 $\beta$ . (G) Koncentracija citokina IL-10. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \*P < 0,05 u odnosu na kontrolu.

Dakle, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su ekstrakti origana, primenjeni u koncentracijama koje nisu bile citotoksične za makrofage, promenili imunski odgovor makrofaga. Vodeni i etil-acetatni ekstrakt origana su smanjili inflamacijski potencijal makrofaga, bilo putem smanjene sekrecije NO (vodeni ekstrakt origana), bilo putem smanjene sekrecije inflamacijskih citokina (IL-1 $\beta$  kod vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana). Metanolni ekstrakt origana je, sa druge strane, povećao sekreciju inflamacijskih IL-1 $\beta$  i TNF, a smanjio sekreciju NO.

#### **4.1.2. Dejstvo ekstrakata origana na limfocite *in vitro***

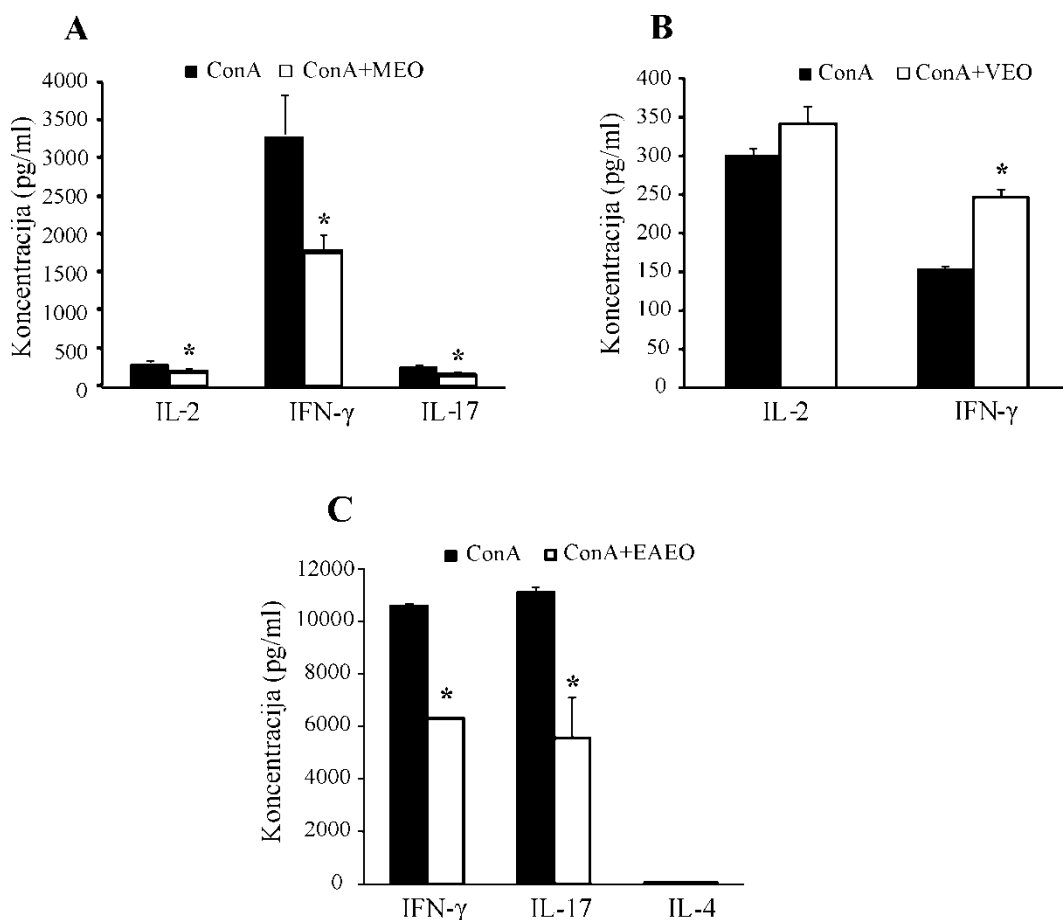
Iako su makrofagi prve ćelije imunskog sistema koje ulaze u pankreasna ostrvca, smatra se da su T limfociti glavni medijatori autoimunskog dijabetesa (Anderson i Bluestone, 2005). Stoga je u narednom eksperimentu određivan *in vitro* efekat različitih ekstrakata origana na preživljavanje i funkciju limfocita izolovanih iz cervikalnih limfnih čvorova mužjaka miševa soja C57BL/6. Ćelije su dodatno stimulisane sa ConA, poliklonskim aktivatorom limfocita biljnog porekla. Stimulacija sa ConA je neophodna kako bi sekrecija citokina bila detektabilna. On aktivira T limfocite i stimuliše njihovu diferencijaciju u različite subpopulacije (Wands i sar, 1976), koje se razlikuju po vrsti imunskog odgovora koji pokreću (pretežno inflamacijski i pretežno anti-inflamacijski). Svaka subpopulacija pomoćničkih T limfocita (Th) okarakterisana je citokinima karakterističnim za tu subpopulaciju. Tako je za inflamacijske Th1 i Th17 limfocite karakteristična sekrecija IFN- $\gamma$  i IL-17, respektivno, a za anti-inflamacijske Th2 limfocite sekrecija IL-4. T regulatorni limfociti (Treg) tipično sekretuju IL-10 i TGF- $\beta$ , dok je za njihovu diferencijaciju neophodno prisustvo IL-2 (Abbas, 2006), i ovi limfociti spadaju u anti-inflamacijske limfocite.

Rezultati pokazuju da ekstrakti origana nisu imali uticaja na preživljavanje limfocita *in vitro* (Slika 6A-C).



**Slika 6. *In vitro* efekat metanolnog (MEO), vodenog (VEO) i etil-acetatnog ekstrakta origana (EAEO) na preživljavanje limfocita.** Limfociti su izolovani iz cervikalnih limfnih čvorova C57BL/6 miševa i tretirani su sa ConA u odsustvu (0) ili prisustvu različitih koncentracija MEO, VEO i EAEO u trajanju od 48h. (A, B, C) Preživljavanje limfocita mereno MTT testom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \* $P < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

U cilju utvrđivanja efektorskih funkcija limfocita, izmerena je sekrecija pro- i anti-inflamacijskih citokina limfocita. Tretman limfocita metanolnim ekstraktom origana značajno je smanjio produkciju IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-17 (Slika 7A). U slučaju tretmana vodenim ekstraktom origana, IFN- $\gamma$  je bio značajno povećan nakon tretmana za razliku od IL-2 koji je ostao nepromenjen (Slika 7B). Tretman limfocita etil-acetatnim ekstraktom origana značajno je smanjio sekreciju inflamacijskih IFN- $\gamma$  i IL-17 dok na sekreciju anti-inflamacijskog IL-4 nije imao efekta (Slika 7C).



**Slika 7. *In vitro* efekat metanolnog (MEO), vodenog (VEO) i etil-acetatnog ekstrakta origana (EAEO) na funkciju limfocita.** Limfociti su izolovani iz cervikalnih limfnih čvorova C57BL/6 miševa i tretirani su sa ConA u odsustvu (0) ili prisustvu različitih koncentracija MEO, VEO i EAEO u trajanju od 48h, nakon čega su pokupljeni supernatanti. (A, B, C) Koncentracija citokina IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-4 merena ELISA testom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \* $P < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

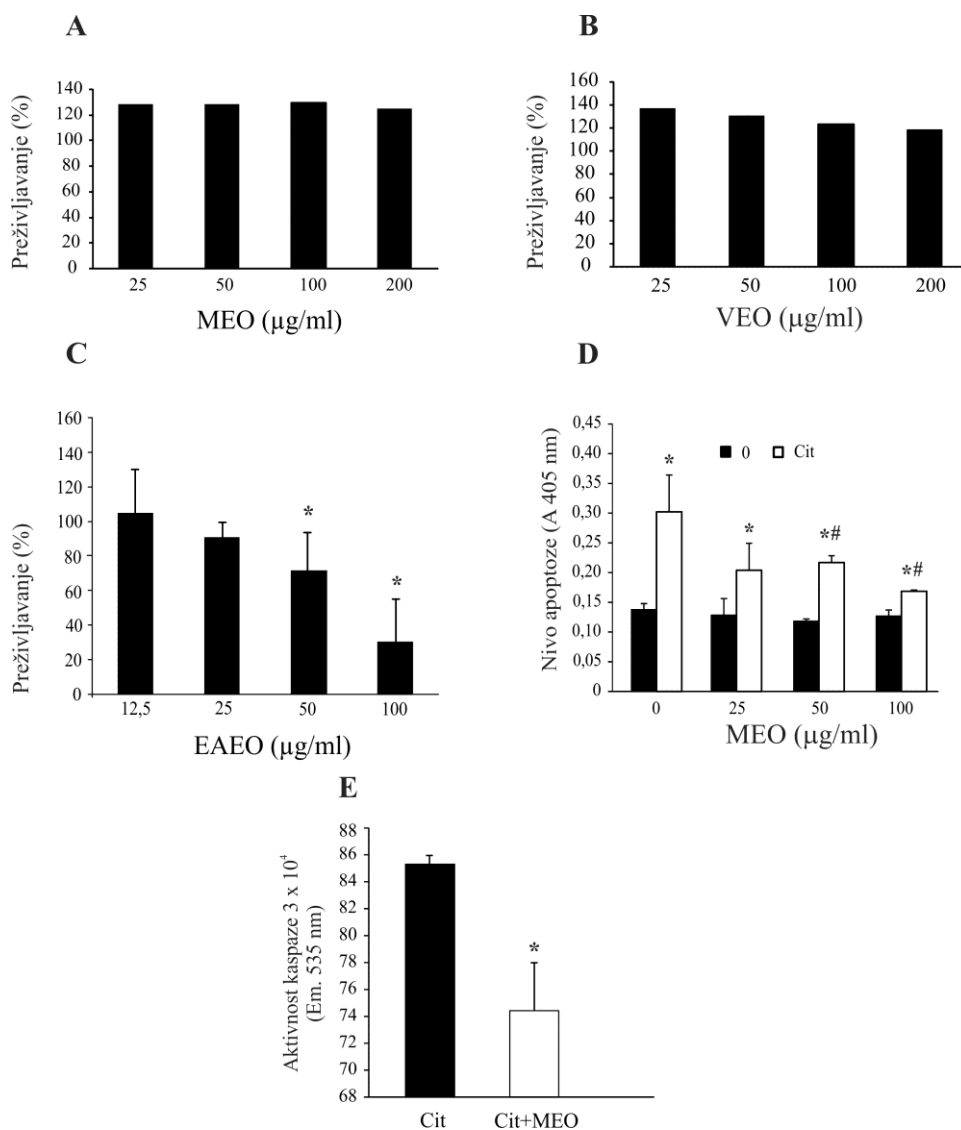
Dakle, metanolni i etil-acetatni ekstrakt origana su u koncentracijama koje nisu bile citotoksične smanjili inflamacijski kapacitet limfocita.

#### 4.1.3. *In vitro* efekat ekstrakata origana na beta ćelije pankreasa

Nakon testiranja efekata ekstrakata na imunske ćelije, sledeći korak bio je utvrđivanje potencijalnog efekta ekstrakata na beta ćelije pankreasa. U te svrhe su pacovske beta ćelije pankreasa (RINm5F ćelijska linija) tretirane različitim koncentracijama ekstrakata i mereno je njihovo preživljavanje. RINm5F je jedna od prvih ćelijskih linija stvorenih za izučavanje autoimunskog dijabetesa za koju je karakterističan visok

kapacitet proizvodnje insulina (Skelin i sar, 2010). Tokom razvoja DT1, imunske ćelije ciljano infiltriraju pankreasna ostrvca i lučenjem sopstvenih medijatora (citokini, NO) stvaraju inflamacijski milje koji dovodi do uništavanja beta ćelija. U cilju imitiranja uslova koji su prisutni u autoimunskom dijabetesu, RINm5F ćelije su tretirane i citotoksičnom kombinacijom citokina (TNF+ IL-1 $\beta$ + IFN- $\gamma$ ) koji za cilj imaju stvaranje inflamacijskog miljea prisutnog i u DT1. Pokazano je da je tretman različitim koncentracijama metanolnog i vodenog ekstrakta origana zaštitio RINm5F ćelije od citotoksičnog dejstva citokina (TNF+ IL-1 $\beta$ + IFN- $\gamma$ ) (Slika 8A i 8B). Etil-acetatni ekstrakt origana je sačuvao pacovske beta ćelije od smrti indukovane citokinima samo u dve najniže koncentracije (12.5  $\mu$ g/ml i 25  $\mu$ g/ml), dok su se koncentracije od 50  $\mu$ g/ml i 100  $\mu$ g/ml pokazale kao citotoksične, s obzirom na nisko preživljavanje beta ćelija (Slika 8C).

S obzirom na to da se MTT test zasniva na merenju aktivnosti mitohondrija i tako posredno prikazuje preživljavanje, bilo je potrebno izmeriti broj beta ćelija koje su ušle u proces programirane ćelijske smrti, apoptoze. U tom smislu ispitivan je efekat metanolnog ekstrakta origana (s obzirom na to da je najviše stimulisao preživljavanje beta ćelija) na apoptozu beta ćelija pankreasnih ostrvaca izolovanih iz C57BL/6 miševa, a koja je izazvana kombinacijom citokina (TNF+ IL-1 $\beta$ + IFN- $\gamma$ ). Primenjeni citokini indukovali su apoptozu pankreasnih ostrvaca koja je merena preko oslobađanja kompleksa histon-DNK. Rezultati su pokazali da metanolni ekstrakt origana primenjen u koncentraciji od 50  $\mu$ g/ml nije podstakao apoptozu pankreasnih ostrvaca, a uspeo je i da smanji apoptozu indukovanu citokinima (Slika 8D). Kako bi se odredio mehanizam koji je u osnovi zaštitnog dejstva metanolnog ekstrakta origana u apoptozu pankreasnih ostrvaca indukovanoj citokinima, merena je aktivnost kaspaze 3, proteina koji učestvuje u mitohondrijskom putu apoptoze (Porter i Jänicke, 1999). Aktivnost kaspaze 3 bila je značajno smanjena posle tretmana beta ćelija pankreasnih ostrvaca sa metanolnim ekstraktom origana (Slika 8E), tako da se može zaključiti da je metanolni ekstrakt origana suprimirao aktivnost kaspaze 3 i tako spasio beta ćelije od apoptoze indukovane citokinima.



**Slika 8. *In vitro* efekat metanolnog (MEO), vodenog (VEO) i etil-acetatnog (EAEO) ekstrakta origana na beta ćelije pankreasa.** RINm5F ćelije su tretirane kombinacijom citokina (IFN- $\gamma$  + TNF + IL-1 $\beta$ ) u odsustvu (0) ili prisustvu različitih koncentracija MEO, VEO i EAEO. Nakon 48h mereno je preživljavanje MTT testom. (A, B, C) Preživljavanje RINm5F ćelija. Procenat preživljavanja RINm5F ćelija predstavljen je kao procenat vijabilnih ćelija u odnosu na netretirane ćelije (vijabilnost 100%). Pankreasna ostrvca izolovana su iz mužjaka C57BL/6 miševa i tretirana su sa MEO u kocentraciji od 50 µg/ml u odsustvu ili prisustvu kombinacije citokina (IFN- $\gamma$  + TNF + IL-1 $\beta$ ) 24h. (D) Apoptoza beta ćelija merena DNK-histon ELISA metodom. (E) Aktivnost kaspaze 3 u beta ćelijama izmerena je fluorimetrijski. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta.\*P < 0,05 u odnosu na kontrolu †P < 0,05 u odnosu na MOE tretiranu grupu.



Dakle, metanolni i vodeni ekstrakt origana su ispoljili citoprotektivni efekat na beta ćelije pankreasa, dok je etil-acetatni ekstrakt origana to pokazao u najnižim primenjenim koncentracijama. Metanolni ekstrakt origana sprečio je apoptozu beta ćelija indukovanu citokinima putem supresije aktivnosti kaspaze 3.

#### **4.2. Uticaj metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na kliničke parametre DT1**

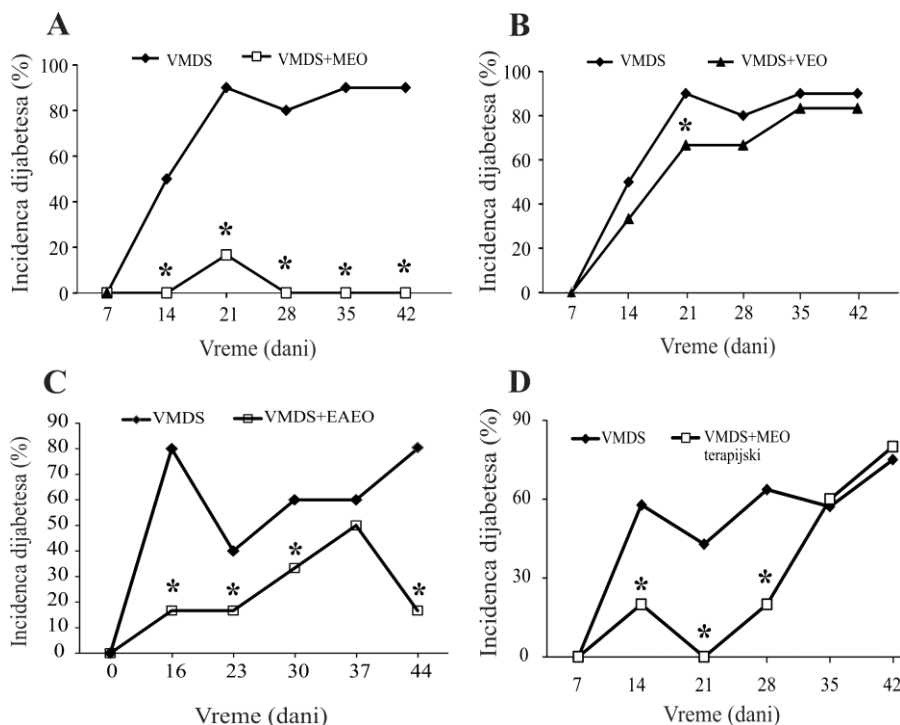
S obzirom na to da su metanolni, vodeni i etil-acetatni ekstrakt origana pokazali anti-inflamacijske, a metanolni i vodeni i citoprotektivne efekte *in vitro*, sledeći logični korak bio je ispitivanje efekata ovih ekstrakata na razvoj i kliničke parametre DT1 u eksperimentalnom modelu bolesti kod miševa soja C57BL/6.

##### **4.2.1. *In vivo* efekat metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na razvoj DT1**

Kako bi se utvrdio efekat ekstrakata origana na razvoj DT1 izabran je animalni model autoimuskog dijabetesa kod koga se bolest izaziva višestrukim malim dozama streptozotocina (VMDS). Model se zasniva na primeni VMDS kojima se narušava arhitektura ostrvaca i pokreće autoimunski odgovor (Rossini i sar, 1977). Prednost ovog animalnog modela leži u činjenici da pokazuje dosta sličnosti sa inflamacijskim promenama u pankreasu zabeleženih kod ljudi obolelih od autoimuskog dijabetesa. U ovom modelu, STZ se primenjuje 5 uzastopnih dana u sub-dijabetogenim dozama (40 mg/kg telesne mase), intraperitonealno. Pet do šest dana nakon poslednje injekcije STZ primećuje se odloženi, ali progresivni porast nivoa glukoze u krvi. Odložena pojava hiperglikemije implicira da STZ nije imao trenutni toksični efekat. U periodu dok se hiperglikemija još nije razvila dolazi do blage infiltracije ćelija imunskog sistema u pankreas (peri-insulitis), ali još uvek postoji dovoljan broj funkcionalnih beta ćelija koje održavaju normoglikemiju. Dve nedelje nakon prve injekcije STZ može se reći da se bolest razvila. Morfološke promene u pankreasu uključuju naglašeni insulitis, gde pankreasna ostrvca infiltriraju makrofagi i limfociti. Takođe je narušena arhitektura ostrvaca, a prisutno je i odumiranje beta ćelija. C57BL/6 mužjaci miševa kod kojih je dijabetes izazvan VMDS tretirani su metanolnim (5 mg/kg po danu), vodenim (5 mg/kg

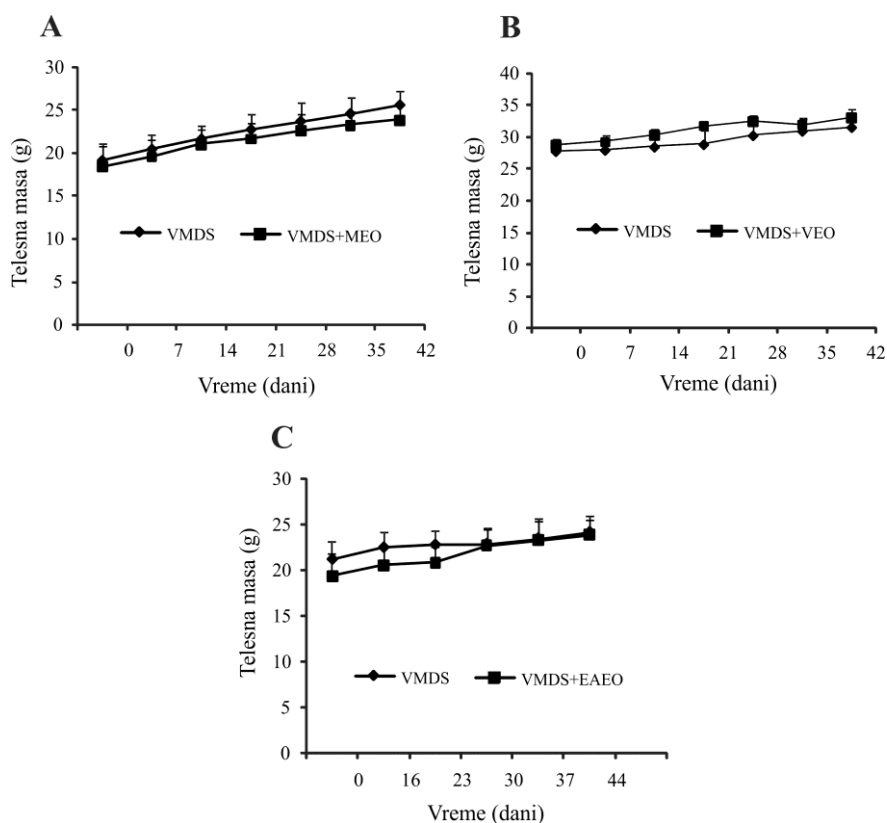
po danu) i etil-acetatnim ekstraktom origana (2,5 mg/kg po danu); intraperitonealno, u profilaktičkom režimu (početak tretmana poklapa se sa početkom davanja STZ). Intraperitonealni način davanja ekstrakata izabran je zbog jednostavnosti eksperimentalnog sistema, činjenice da je ciljno tkivo smešteno u peritoneumu, kao i zbog toga što je intraperitonealna tečnost bogata ćelijama koje mogu da pokrenu imunski odgovor (npr. makrofagi). Doze ekstrakata su izabrane na osnovu podataka iz literature (Lemhandri i sar, 2004). *In vivo* doza etil-acetatnog ekstrakta origana smanjena je u odnosu na dozu iz literature s obzirom na to da je u *in vitro* testiranju etil-acetatni ekstrakt origana pokazao citotoksično dejstvo na makrofage (Slika 4) i pankreasna ostrvca (Slika 8). Četrnaestog dana od početka tretmana u kontrolnim grupama (kod kojih je DT1 indukovano primenom VMDS) za sva tri ekstrakta, incidenca dijabetesa bila je preko 50% (Slika 9A-C). Već 21. dana od početka tretmana se razbolelo 90% životinja u kontrolnoj grupi za metanolni i vodeni ekstrakt origana, dok je kontrolna grupa za etil-acetatni ekstrakt origana zabeležila manji pad u incidenci dijabetesa (40% obolelih). Ovaj pad je bio prolazan, i incidenca dijabetesa je do kraja praćenja (44. dan od početka tretmana) stabilno bila iznad 60%. Sa druge strane, primena metanolnog ekstrakta origana u profilaktičkom režimu potpuno je suprimirala razvoj DT1 (Slika 9A). Nijedna životinja nije razvila hiperglikemiju do kraja eksperimenta (42. dan od početka tretmana). Prolazna pojava hiperglikemije bila je prisutna samo 21. dana od početka tretmana kod dve životinje, nakon čega su uspostavile normoglikemiju. Sa druge strane, primena vodenog ekstrakta origana nije uspeła da spreči pojavu DT1 (Slika 9B). Statistički značajno manja incidenca dijabetesa grupe tretirane vodenim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu bila je prisutna samo 21. dana od početka tretmana, ali je ona bila prolaznog karaktera. Primena etil-acetatnog ekstrakta uspeła je da spreči pojavu DT1 sa statističkom značajnošću - tokom čitavog eksperimenta incidenca dijabetesa u etil-acetatnoj grupi bila je niža od 50% (Slika 9C). S obzirom na to da se metanolni ekstrakt grčkog origana najbolje pokazao u sprečavanju razvoja DT1 u profilaktičkom režimu, sledeći eksperiment imao je za cilj proučavanje njegovog efekta na DT1 u terapijskom režimu (prva injekcija metanolnog ekstrakta daje se jedan dan nakon poslednje injekcije STZ). Za razliku od profilaktičkog režima davanja kod koga je zaštita od DT1 trajala tokom čitavog posmatranja, u terapijskom režimu metanolni ekstrakt origana je uspeo samo

privremeno da zaštititi životinje od razvoja bolesti (Slika 9D). Četvrte nedelje od početka tretmana izgubila se statistički značajno manja incidenca DT1 u grupi tretiranoj metanolnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu (Slika 9D).



**Slika 9. Efekat metanolnog (MEO), vodenog (VEO) i etil-acetatnog ekstrakta origana (EAEO) na incidencu DT1.** Dijabetes je indukovao kod mužjaka miševa C57BL/6 davanjem VMDS (40 mg/kg telesne mase) u trajanju od 5 dana. Životinje su tretirane metanolnim, vodenim i etil-acetatnim ekstraktom origana. Incidenca dijabetesa izračunata je kao procenat životinja koje su razvile hiperglikemiju (glukoza u krvi  $\geq 11$  mmol/l). (A) Incidenca dijabetesa profilaktičkog tretmana životinja sa MEO u dozi od 5 mg/kg po danu u trajanju od 10 dana u odnosu na indukciju bolesti davanjem VMDS. (B) Incidenca dijabetesa profilaktičkog tretmana životinja sa VEO u dozi od 5 mg/kg po danu u trajanju od 10 dana u odnosu na indukciju bolesti davanjem VMDS. (C) Incidenca dijabetesa profilaktičkog tretmana životinja sa EAEO u dozi od 2,5 mg/kg po danu u trajanju od 10 dana u odnosu na indukciju bolesti davanjem VMDS. (D) Incidenca dijabetesa terapijskog tretmana životinja sa MEO u dozi od 5 mg/kg po danu u trajanju od 10 dana u odnosu na indukciju bolesti davanjem VMDS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ( $n=10$  miševa po grupi)  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  u odnosu na VMDS grupu.

Važno je naglasiti da nijedan od ekstrakata tokom trajanja svih tretmana nije uticao na promenu telesne mase miševa (Slika 10), što uz činjenicu da su izgled i ponašanje životinja bili nepromenjeni sugeriše da ekstrakti nisu pokazali toksično dejstvo na životinje u primenjenim dozama.



**Slika 10. Efekat metanolnog, vodenog i etil-acetatnog ekstrakta origana na telesnu masu C57BL/6 miševa.** (A, B, C) DT1 je izazvan VMDS. Životinje su tretirane ekstraktima origana. Telesna masa životinja merena je na nedelju dana. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n=10 miševa po grupi)  $\pm$  SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

Ovo je potvrđeno i određivanjem metaboličkih parametara gde su zdrave životinje tretirane metanolnim ili etil-acetatnim ekstraktom, a kao kontrola je korišćen rastvarač dimetil sulfoskid (DMSO) + PBS. Ovi rezultati su pokazali da tretman zdravih životinja sa metanolnim i etil-acetatnim ekstraktom nije imao uticaja na glikemiju, funkciju bubrega (količina proteina, glukoze i eritrocita u urinu), niti na broj eritrocita i leukocita u krvi (Tabela 4), što potvrđuje zaključak da ekstrakti ne deluju toksično u primenjenim dozama.

**Tabela 4.** MEO i EAEO ne pokazuju negativne efekte na metaboličke parametre kod zdravih mužjaka miševa C57BL/6. (Srednja vrednost i standardna devijacija. n=7 miševa po grupi)

	Kontrola + rastvarač*		Kontrola + MEO		Kontrola + EAEO	
	SV	SD	SV	SD	SV	SD
<b>Glukoza u krvi</b> (mmol/l)	8.3	1.4	9.1	0.5	9.2	0.8
<b>Proteinurija</b> (mg/ml)	0.3 $\Delta$	0	0.3	0	0.3	0
<b>Glikozurija</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Eritrociti u urinu</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Leukociti u krvi x10<sup>9</sup>/ml</b>	5.0	0.9	5.1	1.2	6	1.4
<b>Eritrociti u krvi</b> x10 <sup>12</sup> /ml	8.7	0.4	7.9	1.1	7.8	0.2

\* Rastvarač je PBS + DMSO

$\Delta$  Normalna koncentracija proteina u krvi

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je profilaktički tretman metanolnim i etil-acetatnim, ali ne i vodenim ekstraktom origana, značajno smanjio incidencu DT1 *in vivo*. Terapijski tretman metanolnim ekstraktom origana pružio je samo delimičnu zaštitu životinjama od razvoja DT1. Ekstrakti nisu delovali toksično na životinje.

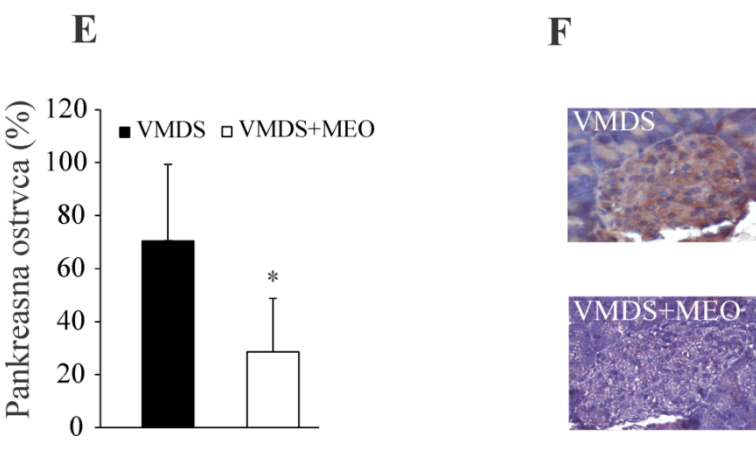
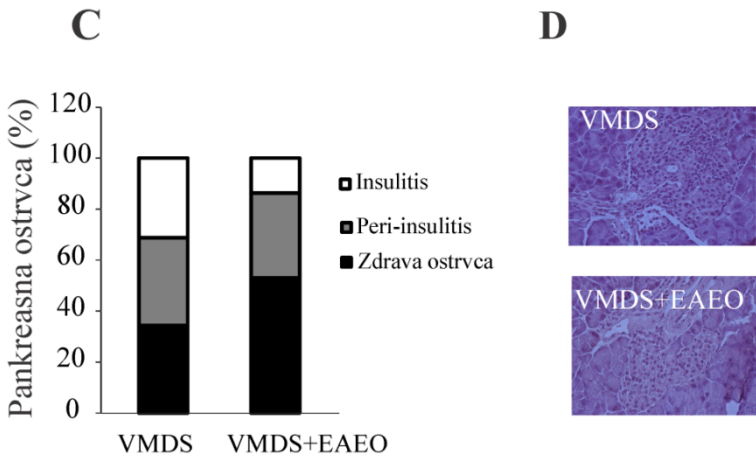
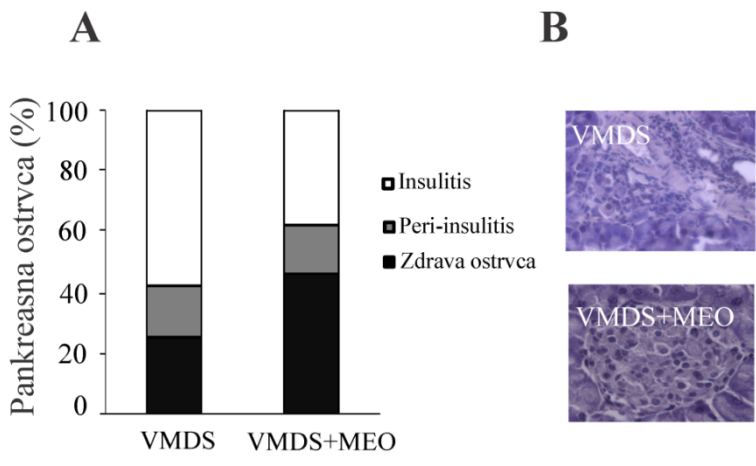
S obzirom na to da vodeni ekstrakt origana nije pružio zaštitu od razvoja DT1, on je isključen iz daljih ispitivanja. Pošto se profilaktički tretman metanolnim i etil-acetatnim ekstraktom pokazao kao najuspešniji, ovaj pristup je nastavljen u daljim *ex vivo* eksperimentima.

#### **4.2.2. Dejstvo ekstrakata origana na morfologiju pankreasnih ostrvaca**

Kako bi se utvrdio efekat metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na morfologiju pankreasnih ostrvaca analizirani su histološki preseci pankreasa obojenih hematoksilinom 42. i 44. dana od početka tretmana sa metanolnim i etil-acetatnim ekstraktom origana, respektivno. Utvrđeno je da su životinje tretirane metanolnim i etil-acetatnim ekstraktom origana imale značajno manji procenat pankreasnih ostrvaca sa mononuklearnim ćelijskim infiltratima (insulitis) u odnosu na netretiranu VMDS grupu, dok je procenat ostrvaca sa blagim insulitisom (peri-insulitis) bio sličan u svim grupama (Slika 11A-D). Tretmani metanolnim i etil-acetatnim ekstraktom imali su najveći procenat zdravih ostrvaca u odnosu na ukupan broj pregledanih ostrvaca. Sa druge strane, životinje tretirane samo sa VMDS imale su značajno veći procenat pankreasnih ostrvaca zahvaćenih insulitisom i praćenih atrofijom ostrvaca i narušenom arhitekturom.

Tokom autoimunskog procesa, imunske ćelije i ćelije pankreasa stvaraju reaktivne vrste kiseonika i azota koje doprinose patogenezi DT1 i dovode do smrti beta ćelija pankreasa (Eizirik i Mandrup-Poulsen, 2001). Zato su histološki preseci pankreasa bojeni na prisustvo nitrozilovanog tirozina koji je produkt dejstva ROS i RNS. Kvantitativna analiza pankreasnih ostrvaca pozitivnih na nitrotirozin pokazala je da je kod miševa tretiranih metanolnim ekstraktom origana bilo značajno manje ostrvaca sa nitrozilovanim proteinima u odnosu na VMDS grupu, što se može uočiti i na reprezentativnim presecima (Slika 11E i 11F).

Na osnovu ovih rezultata može da se zaključi da su metanolni i etil-acetatni ekstrakt origana uspeli da održe brojnost i funkciju pankreasnih ostrvaca na fiziološkom nivou, sprečavanjem infiltracije ćelija imunskog sistema i inhibicijom produkcije prooksidativnih medijatora.

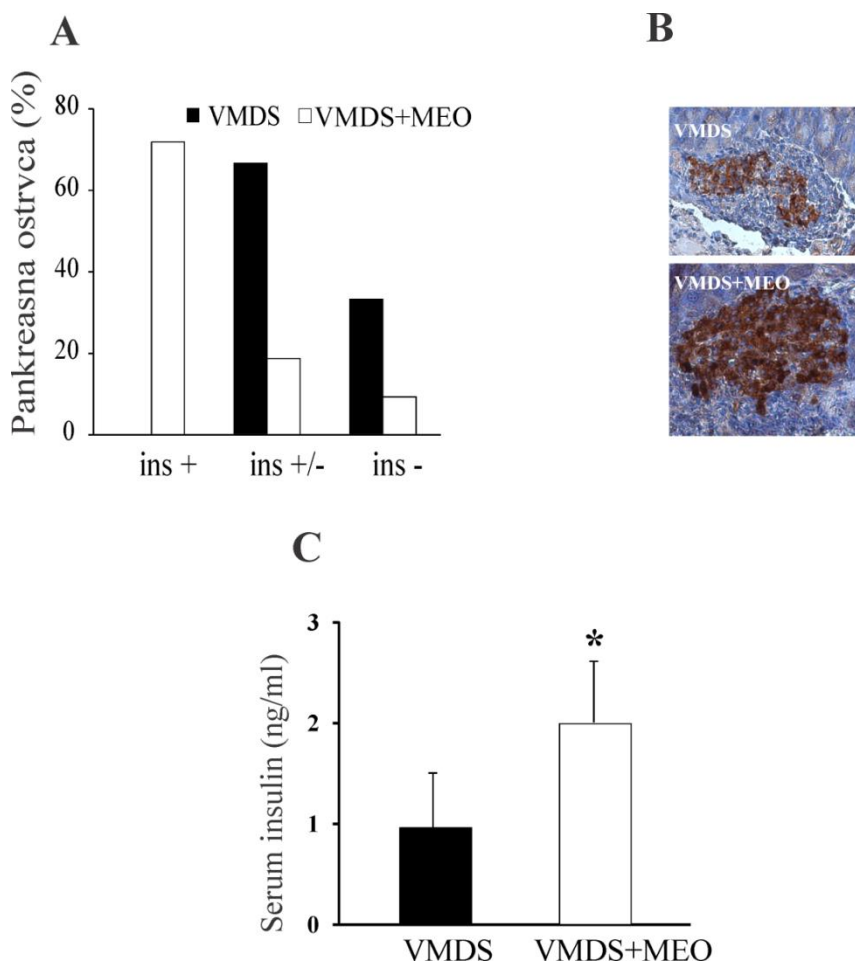


**Slika 11. Efekat metanolnog (MEO) i etil-acetatnog (EAEO) ekstrakta origana na morfologiju pankreasnih ostrvaca.** (A) Prisustvo infiltriranih ćelija detektovano je bojenjem hematoksilinom na parafinskim presecima pankreasa 42. dana od indukcije bolesti iz miševa koji su primali VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu. Kvantitativna analiza pankreasnih ostrvaca zahvaćenih insulitisom predstavljena je u vidu % infiltriranih ostrvaca (zdrava ostrvca – nisu bili prisutni mononuklearni infiltrati pankreasa, peri-insulitits – prisutni su infiltrati ćelija oko ostrvaca, ali je očuvana arhitektura ostrvaca, insulitis – intenzivna infiltracija ćelija u ostrvca, uz gubitak arhitekture ostrvaca). (B) Reprezentativni histološki preseki pankreasa 42. dana od indukcije bolesti. (C) Prisustvo infiltriranih ćelija detektovano je bojenjem hematoksilinom na parafinskim presecima pankreasa 44. dana od indukcije bolesti iz miševa koji su primali VMDS i VMDS+EAEO u profilaktičkom režimu. Kvantitativna analiza pankreasnih ostrvaca zahvaćenih insulitisom predstavljena je u vidu % infiltriranih ostrvaca (peri-insulitits, insulitis, zdrava ostrvca). (D) Reprezentativni histološki preseki pankreasa 44. dana od indukcije bolesti. (E) Kvantitativna analiza nitrotirozin pozitivnih ostrvaca. Parafniski preseki pankreasa izolovanih 42. dana od indukcije bolesti iz miševa koji su primali VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu bojeni su imunohistohemijski na nitrotirozin. (F) Reprezentativne slike pankreasnih ostrvaca bojenih na nitrotirozin. Rezultati su prikazani kao procenat od ukupnog broja pankreasnih ostrvaca  $\pm$  SD iz reprezentativnog od tri izvedena nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

#### **4.2.3. Efekat metanolnog ekstrakta origana na funkciju pankreasnih ostrvaca**

Hiperglikemija može nastati kako zbog smanjene funkcije tako i zbog potpunog odsustva beta ćelija pankreasa. U tom kontekstu ispitivana je funkcija beta ćelija pankreasa merenjem koncentracije insulina u serumu životinja. Pokazano je da je nivo insulina u serumu miševa tretiranih metanolnim ekstraktom origana bio značajno veći u odnosu na VMDS grupu miševa (Slika 12C). Ovaj rezultat potvrđen je i imunohistohemijskim bojenjem pankreasnih ostrvaca na insulin, gde je jasno pokazano da su pankreasna ostrvca životinja tretiranih metanolnim ekstraktom origana proizvodila značajno više insulina (Slika 12A, B). Dakle, tretman metanolnim ekstraktom origana doveo je do većeg broja očuvanih beta ćelija pankreasa.





**Slika 12. Efekat metanolnog ekstrakta origana na funkcionalnost pankreasnih ostrvaca.** (A) Kvantitativna analiza insulin pozitivnih ostrvaca. Parafinski preseki pankreasa izolovanih 42. dana od indukcije bolesti iz miševa koji su primali VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu bojeni su imunohistohemijski na insulin. (B) Reprerzentativne slike pankreasnih ostrvaca izolovanih 42. dana od indukcije bolesti bojenih na insulin kod miševa koji su primali VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu. (C) Koncentracija insulina u serumu merena je insulin ELISA testom. Serumi su izolovani 42. dana od indukcije bolesti iz životinja tretiranih VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu. Rezultati su prikazani kao procenat od ukupnog broja pankreasnih ostrvaca  $\pm$  SD iz reprezentativnog od tri izvedena nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševе tretirane samo VMDS.

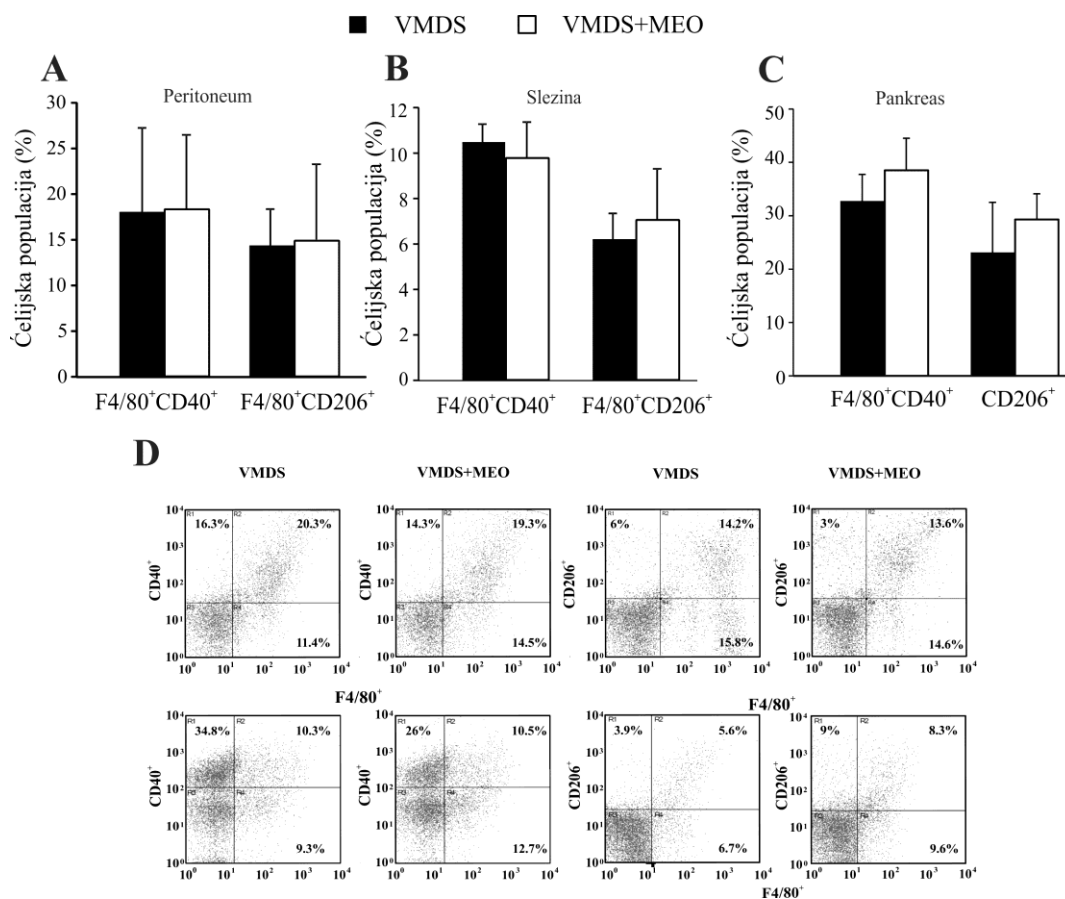
### 4.3. Ispitivanje ćelijskih i molekulskih mehanizama dejstva metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na DT1

S obzirom na to da je pokazano da su metanolni i etil-acetatni ekstrakt origana sprečili nastanak DT1 izazvanog VMDS kod C57BL/6 miševa, sledeći korak u istraživanju bilo

je utvrđivanje ćelijskih i molekulskih mehanizama koji dovode do uočenih efekata metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana. U tom kontekstu izvršene su *ex vivo* analize 14. dana nakon indukcije bolesti VMDS kod miševa koji su primali metanolni i etil-acetatni ekstrakt origana u profilaktičkom režimu.

#### **4.3.1. Efekat metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na makrofage *ex vivo***

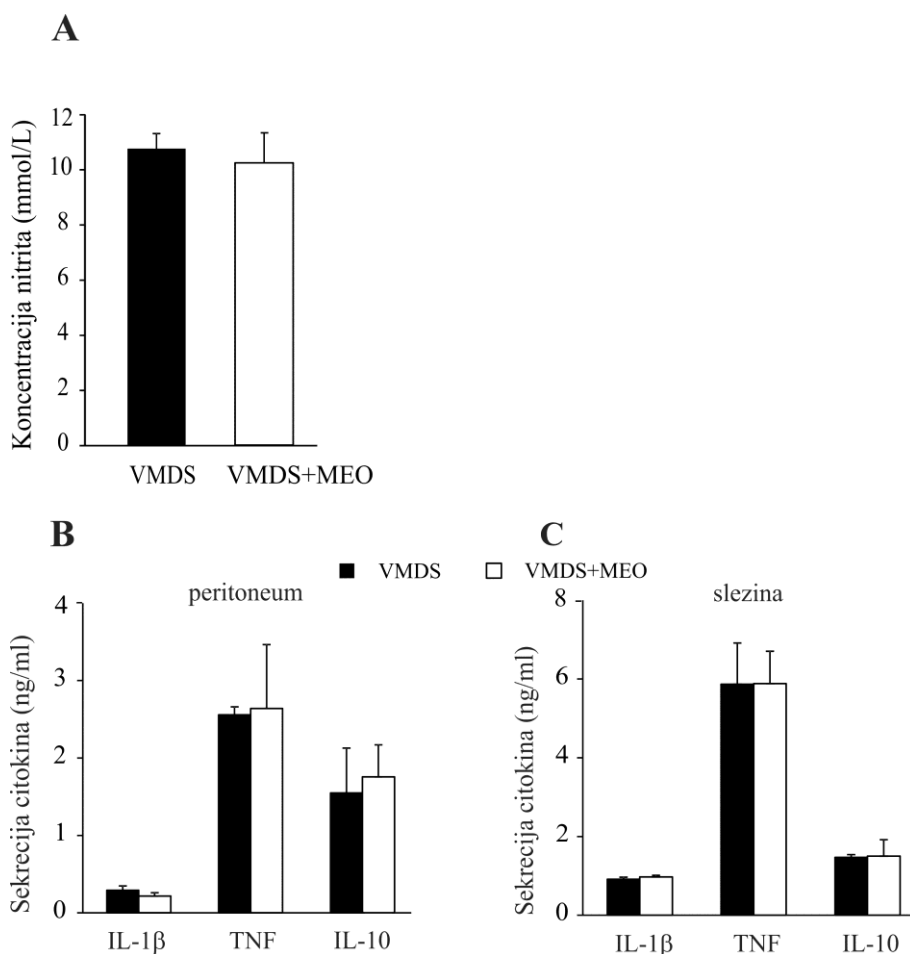
U cilju utvrđivanja efekta ekstrakata na ćelije urođene imunosti uključenih u destrukciju beta ćelija pankreasa, ispitivana je brojnost i funkcija makrofaga koji mogu postojati u dva funkcionalna stanja (fenotipa), M1 i M2 (Mantovani i sar, 2004). M1 funkcionalni fenotip je inflamacijskog karaktera i karakteriše se proizvodnjom inflamacijskih citokina poput IL-1 $\beta$  i TNF, kao i proizvodnjom NO (Mantovani i sar, 2004). Može se okarakterisati preko površinskih markera F4/80 (marker zrelih makrofaga) i CD40 (kostimulatorni protein na površini antigen prezentujućih ćelija). Sa druge strane, M2 stanje makrofaga je anti-inflamacijsko i ovakvi makrofagi se nazivaju i alternativno aktivirani makrofagi. Takvi makrofagi sintetišu i sekretuju IL-10, a opisuju se površinskim markerima F4/80 i CD206 (manozni recetor). Da bi se ispitalo efekat ekstrakata origana na infiltraciju u pankreasna ostrvca, polarizaciju u M1 ili M2 fenotip, kao i sekreciju citokina i produkciju NO, izvršena je *ex vivo* analiza 14-og dana nakon početka tretmana na miševima. Analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala je da životinje tretirane metanolnim ekstraktom origana nisu pokazale značajnu razliku u količini M1 (F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> ćelije) i M2 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> ćelije) makrofaga prisutnih u peritonealnoj tečnosti, slezini i pankreasnim infiltratima u odnosu na kontrolu (Slika 13A-C). Dakle, tretman metanolnim ekstraktom origana nije uticao na fenotip makrofaga u peritoneumu, slezini i mononuklearnim pankreasnim infiltratima.



**Slika 13. Efekat metanolnog ekstrakta origana (MEO) na fenotip makrofaga.** *Ex vivo* analize su izvršene 14-og dana od početka tretmana C57BL/6 miševa VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu. Izolovane su ćelije slezine, peritoneuma i mononuklearnih pankreasnih infiltrata. Ćelije su bojene na površinske markere makrofaga. (A, B, C) Procenat klasično (F4/80<sup>+</sup>/CD40<sup>+</sup>) i alternativno (F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>) aktiviranih makrofaga meren protočnom citofluorimetrijom u peritoneumu (A), slezini (B) i pankreasu (C) miševa. (D) Specifični prikaz “dot plot” rezultata protočne citofluorimetrije. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

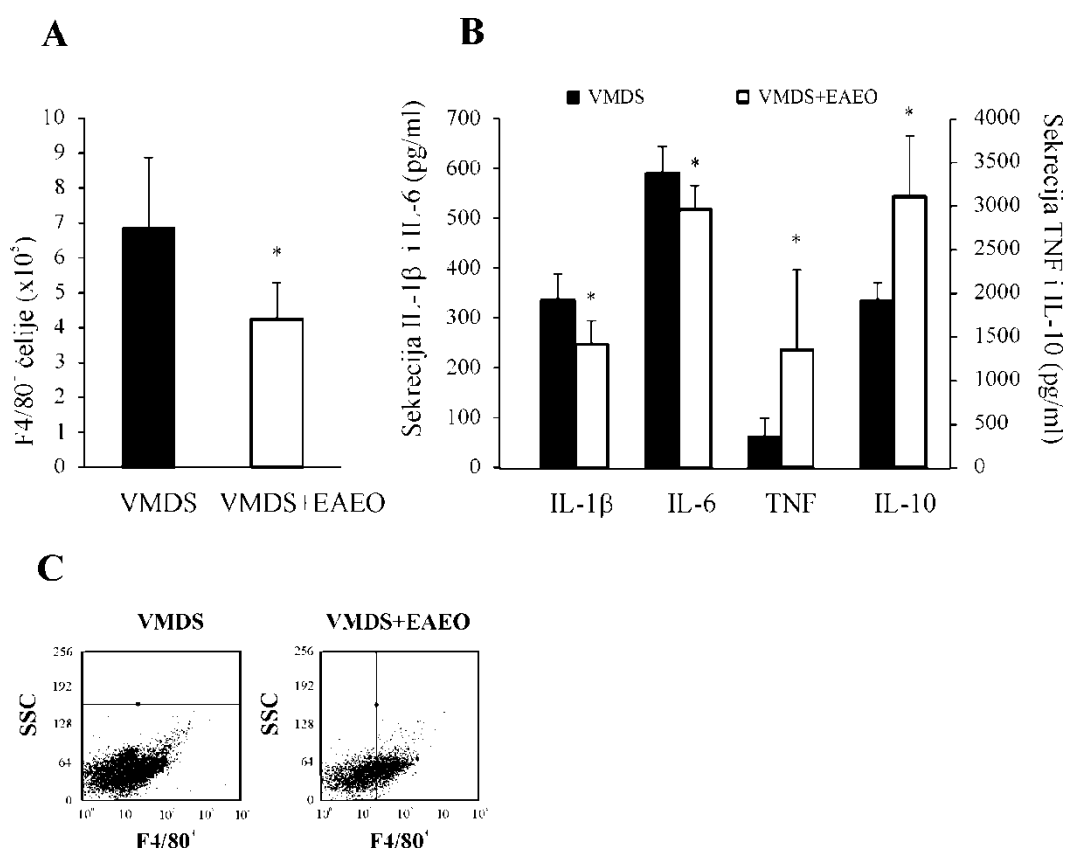
Imajući u vidu da tretman metanolnim ekstraktom origana nije uticao na polarizaciju makrofaga, sledeći korak u istraživanju bilo je ispitivanje da li je imao uticaja na funkciju makrofaga. U tom smislu merena je koncentracija citokina ELISA metodom, kao i produkcija NO Gris metodom iz supernatanata ćelija peritoneuma i slezine stimulisanih LPS-om. Tretman metanolnim ekstraktom origana nije uticao značajno na produkciju NO (Slika 14A). Takođe je utvrđeno da tretman metanolnim ekstraktom origana nije bitno izmenio sekreciju inflamacijskih citokina IL-1 $\beta$  i TNF, kao i anti-

inflamacijskog IL-10 (Slika 14B, C). Dakle, tretman metanolnim ekstraktom origana nije imao efekta na polarizaciju, sekreciju citokina i produkciju NO makrofaga.



**Slika 14. Efekat metanolnog ekstrakta origana na produkciju NO i citokina ćelija peritoneuma i slezine.** (A) Sekrecija nitrita LPS stimuliranih makrofaga izolovanih iz peritoneuma C57BL/6 miševa tretiranih VMDS ili VMDS+MEO u profilaktičkom režimu nakon 24h inkubacije. (B, C) Sekrecija citokina ćelija izolovanih iz peritoneuma (B) ili slezine (C) VMDS i VMDS + MEO miševa nakon 24 h (B) ili 48 h (C) inkubacije merena ELISA metodom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \* $P < 0,05$  u odnosu na VMDS grupu.

Sa druge strane, tretman etil-acetatnim ekstraktom origana smanjio je broj ćelija peritoneuma koje ekspiriraju F4/80 receptor, a takođe je smanjio i njihov inflamacijski kapacitet smanjenjem produkcije inflamacijskih citokina (IL-1 $\beta$  i IL-6) (Slika 15A, B), dok je produkcija inflamacijskog TNF bila povećana (Slika 15B). Deluje da je etil-acetatni ekstrakt origana usmerio makrofage ka antiinflamacijskom M2 fenotipu, s obzirom na to da je povećao produkciju anti-inflamacijskog citokina IL-10 (Slika 15B).



**Slika 15. Efekat etil-acetatnog ekstrakta origana na brojnost makrofaga i sekreciju citokina.** Makrofagi su izolovani iz peritonealne tečnosti C57BL/6 miševa tretiranih VMDS ili VMDS+EAEO u profilaktičkom režimu. (A) Broj F4/80<sup>+</sup> ćelija izmeren je protočnom citofluorimetrijom. (B) Sekrecija citokina merena je ELISA metodom. Citokini su određivani iz supernatata LPS stimulisanih makrofaga poreklom iz VMDS i VMDS+EAEO miševa nakon 24h inkubacije. (C) Specifični prikaz “dot plot” rezultata protočne citofluorimetrije. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

Iz ovih rezultata može se zaključiti da, dok metanolni ekstrakt origana nije uticao na infiltraciju, polarizaciju, sekreciju pro- i anti-inflamacijskih citokina i produkciju NO od strane makrofaga, etil-acetatni ekstrakt origana je ispoljio kompleksniji efekat (inhibirao neke aspekte inflamacijskih aktivnosti, uz potenciranje drugih, istovremeno potencirajući pojedine aspekte anti-inflamacijskih aktivnosti), što daje osnova za stav da može da usmeri makrofage ka anti-inflamacijskom, M2 fenotipu.

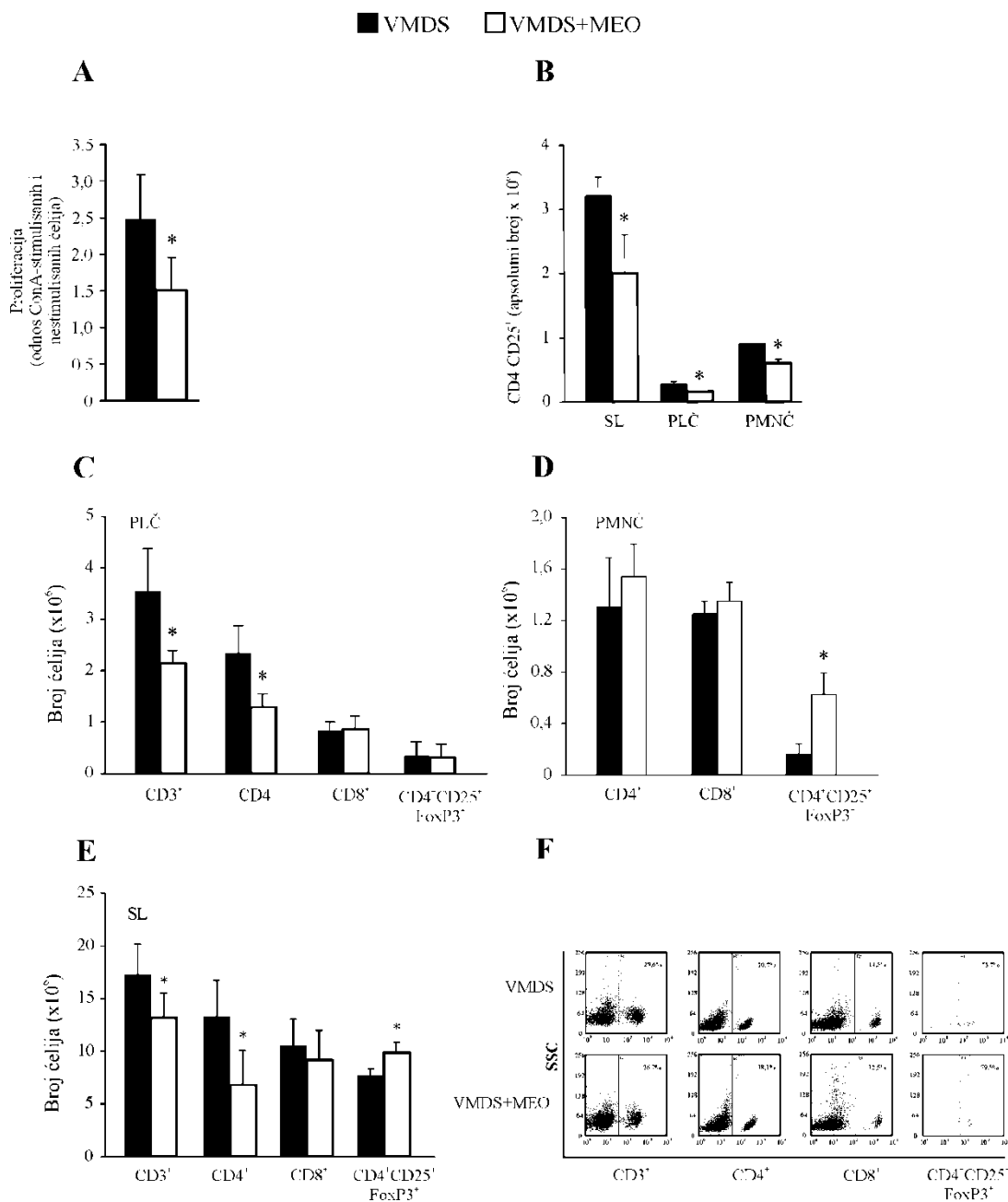
#### **4.3.2. Dejstvo metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na diferencijaciju T limfocita**

Imajući u vidu da je patogeneza dijabetesa u najvećoj meri posredovana autoreaktivnim ćelijama stečene imunosti tj. T limfocitima (Di Lorenzo i Serreze, 2005; Burton i sar, 2008; Han i sar, 2005), naredni korak u istraživanju bio je ispitivanje efekta metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na proliferaciju, diferencijaciju i sekreciju limfocita *ex vivo*.

Životinje kod kojih je DT1 izazvan VMDS tretirane su metanolnim ili etil-acetatnim ekstraktom origana u profilaktičkom režimu. Analize *ex vivo* izvršene su 14-og dana od indukcije bolesti na ćelijama slezine, drenirajućih limfnih čvorova i mononuklearnih pankreasnih infiltrata.

Rezultati pokazuju da je proliferativni kapacitet ćelija slezine, predstavljen odnosom odgovora ConA stimulisanih i nestimulisanih splenocita, bio značajno niži kod tretmana metanolnim ekstraktom origana u odnosu na VMDS grupu (Slika 16A). Dalje je određivan stepen aktivacije limfocita kako bi se dobio podatak o obimu pokrenutog imunskog odgovora. Aktivacija limfocita dovodi do ispoljavanja transmembranskog proteina CD25, koji predstavlja  $\alpha$ -lanac receptora za IL-2. Ako se na protočnoj citofluorimetriji analiziraju ćelije koje na svojoj površini eksprimiraju CD4 i CD25 proteine, dobija se podatak o broju aktiviranih pomoćničkih T limfocita. Rezultati su pokazali da je tretman životinja metanolnim ekstraktom origana smanjio broj aktiviranih pomoćničkih T limfocita u slezini, pankreasnim limfnim čvorovima i mononuklearnim infiltratima pankreasa u odnosu na VMDS kontrole (Slika 16B). Detaljnija analiza limfocitnih populacija pokazala je da je metanolni ekstrakt origana značajno smanjio broj pomoćničkih T limfocita (CD4<sup>+</sup> ćelija) u slezini i pankreasnim

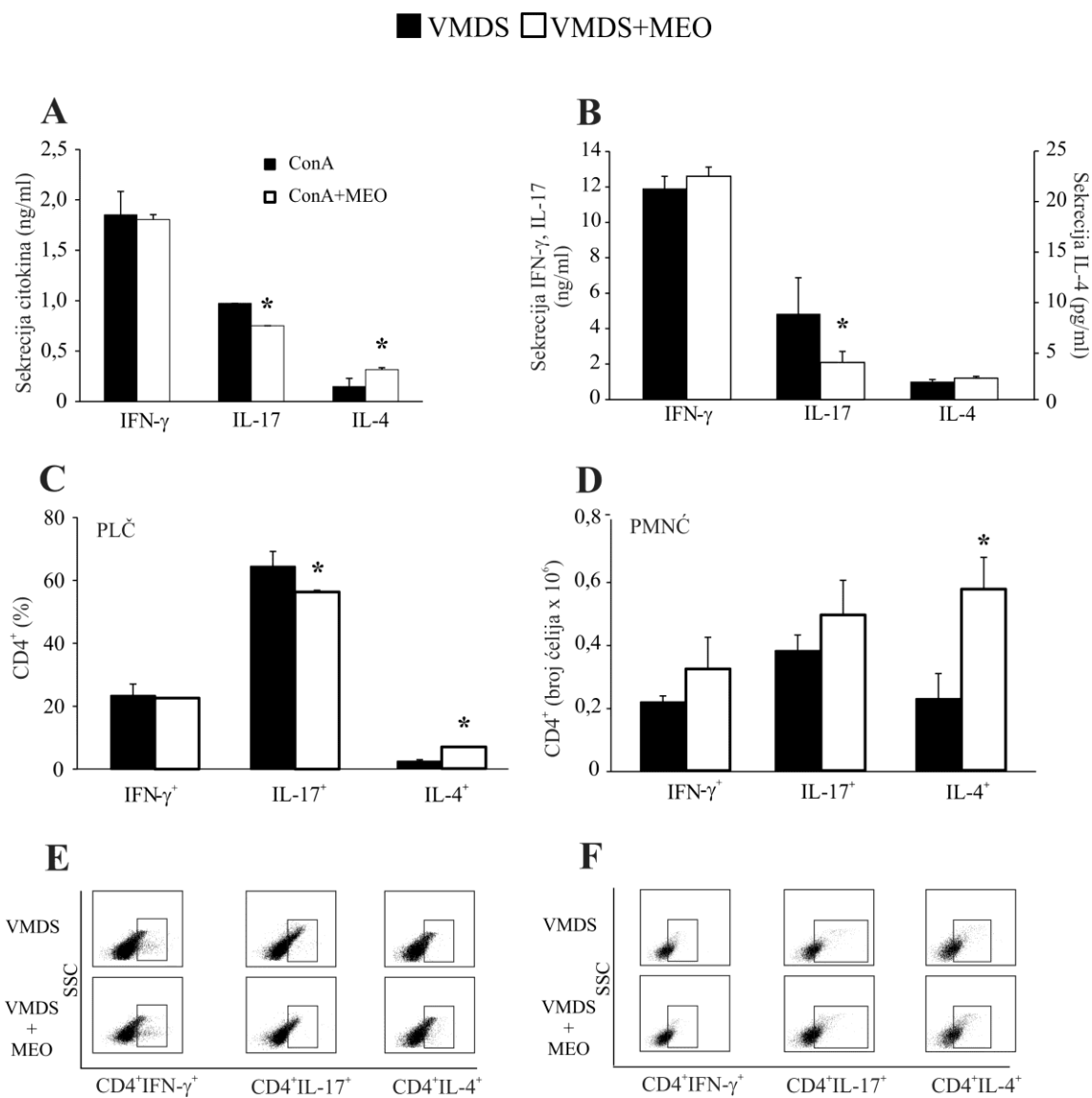
limfnim čvorovima, dok na broj citotoksičnih T limfocita ( $CD8^+$  ćelija) nije imao efekta (Slika 16E i 16C). Značajnije, MOE je uticao na povećanje regulatornih T limfocita (opisani su kao ćelije koje ispoljavaju CD4, CD25 i FoxP3 proteine) u slezini i među mononuklearnim infiltratima pankreasa (Slika 16E i 16D). Dakle, može se pretpostaviti da je MOE svoj imunosupresivni efekat ispoljio redukcijom Th populacija limfocita.



**Slika 16. Efekat metanolnog ekstrakta origana na proliferaciju i diferencijaciju limfocita.** (A) Proliferacija ćelija slezine izolovanih iz VMDS i VMDS + MEO miševa, sa ili bez stimulacije ConA i nakon 48h inkubacije. Rezultat je predstavljen kao odnos između ConA tretiranih i netretiranih ćelija. (B) Procenat aktiviranih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T limfocita izolovanih iz slezine (SL), pankreasnog limfnog čvora (PLČ) i pankreasnih mononuklearnih ćelijskih infiltrata (PMNČ) meren protočnom citofluorimetrijom. Raspodela T limfocita u okviru pankreasnih limfnih čvorova (C), mononuklearnih pankreasnih infiltrata (D) i slezine (E) merena protočnom citofluorimetrijom. (F) Specifični prikaz "dot plot" rezultata protočne citofluorimetrije. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.



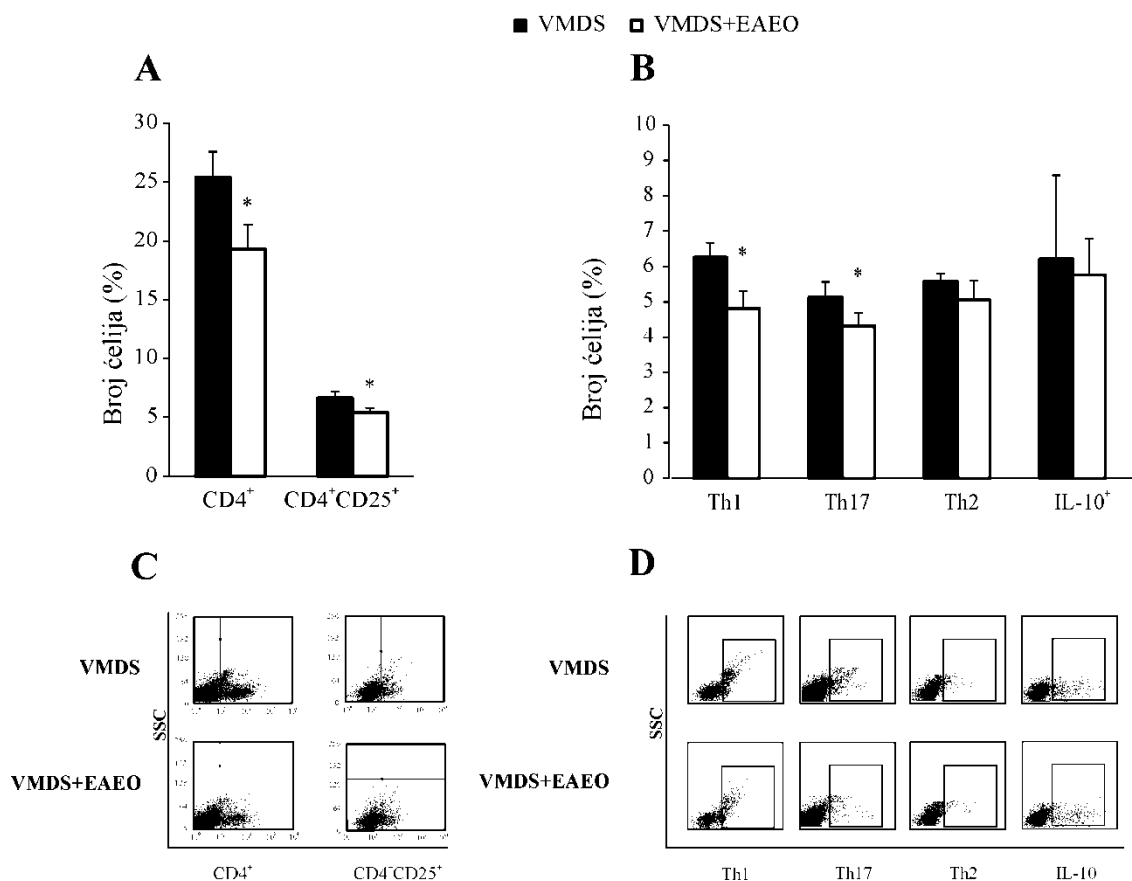
Da bi se ovi nalazi dalje proverili, bliže je ispitivana sekrecija i produkcija citokina tipičnih za različite populacije pomoćničkih T limfocita. Pokazano je da je MEO smanjio sekreciju IL-17, a povećao sekreciju IL-4 u ćelijama slezine, kako u *in vitro* (Slika 17A) tako i u *ex vivo* (Slika 17B) uslovima. Izgleda da je MEO sprečio razvoj dijabetesa utišavanjem inflamacijskog Th17 imunskog odgovora, a potenciranjem Th2 anti-inflamacijskog imunskog odgovora, što se vidi u značajno smanjenoj produkciji IL-17 u ćelijama pankreasnih limfnih čvorova (Slika 17C) i značajno povećanoj produkciji IL-4 u pankreasnom limfnom čvoru (Slika 17C) i mononuklearnim infiltratima pankreasnih ostrvaca (Slika 17D). MEO nije pokazao efekat na proinflamatornu Th1 ćelijsku populaciju s obzirom na to da produkcija IFN- $\gamma$  u pankreasnim limfnim čvorovima i mononuklearnim pankreasnim infiltratima nije bila izmenjena (Slika 17C i D).



**Slika 17. Efekat metanolnog ekstrakta origana na sekreciju i produkciju citokina limfocita.** (A) *In vitro* sekrecija citokina ćelija izolovanih iz slezine C57BL/6 miševa tretiranih VMDS i VMDS+MEO u profilaktičkom režimu merena ELISA testom. (B) ConA stimulisana *ex vivo* sekrecija citokina ćelija slezine izolovanih iz VMDS i VMDS + MEO miševa merena ELISA testom. (C, D) Distribucija tri glavne populacije pomoćničkih T limfocita u okviru pankreasnih limfnih čvorova (C) i pankreasnih infiltrata (D) merena protočnom citofluorimetrijom. (E, F) Specifični prikaz “dot plot” rezultata protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n=7 miševa po grupi)  $\pm$  SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

Dakle, metanolni ekstrakt origana uspešno je suprimirao imunski odgovor posredovan T limfocitima kod VMDS miševa, i to tako što je smanjio Th17 inflamacijski odgovor a povećao anti-inflamacijski, Th2 imunski odgovor.

I etil-acetatni ekstrakt origana je pokazao direktan efekat na pomoćničke T limfocite. Za sprečavanje razvoja DT1 delom je odgovorno smanjenje populacije pomoćničkih T limfocita- kako ukupnog broja (smanjenje broja ćelija koje ispoljavaju CD4 protein), tako i aktiviranog dela populacije pomoćničkih T limfocita koji na svojoj površini ispoljava markere CD4 i CD25 (Slika 18A). Etil-acetatni ekstrakt origana je izmenio i profil Th ćelija. Naime, pokazano je da je etil-acetatni ekstrakt origana smanjio broj inflamacijskih Th1 i Th17 limfocita u odnosu na VMDS grupu, dok na anti-inflamacijske Th2 i regulatorne T limfocite nije imao efekta (Slika 18B). Efekat supresije Th1 i Th17 populacije je potvrđen i merenjem sekrecije citokina, gde je pokazana značajno manja sekrecija IFN- $\gamma$  i IL-17 u grupi tretiranoj etil-acetatnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu (Slika 18C).

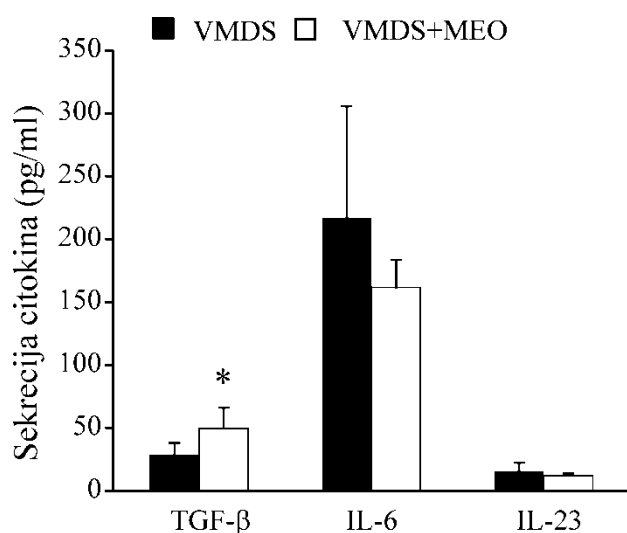


**Slika 18. Efekat etil-acetatnog ekstrakta origana na broj i diferencijaciju T limfocita.** (A) Procenat ukupnog (CD4<sup>+</sup>) i broja aktiviranih (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) T limfocita ćelija slezine VMDS i VMDS + EAEO C57BL/6 miševa meren protočnom citofluorimetrijom. (B) Procenat određenih populacija pomoćničkih T limfocita iz slezine VMDS i VMDS+EAEO C57BL/6 miševa meren protočnom citofluorimetrijom. (C, D) Specifični prikaz “dot plot” rezultata protočne citofluorimetrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n= 4 miša po grupi) ± SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

U zaključku, metanolni i etil-acetatni ekstrakt origana sprečili su razvoj DT1 modulacijom imunskog odgovora posredovanog T limfocitima. Metanolni ekstrakt origana je suprimirao inflamacijski Th17 imunski odgovor a povećao protektivni Th2 i Treg imunski odgovor. Sa druge strane, etil-acetatni ekstrakt origana je suprimirao inflamacijski Th1 i Th17 imunski odgovor.

### 4.3.3. Molekulski mehanizmi dejstva metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na diferencijaciju Th limfocita

Na diferencijaciju Th17 limfocita utiču citokini poput TGF- $\beta$ , IL-6 i IL-23, tako da je u narednom eksperimentu ispitivano da li postoje razlike u sekreciji ovih citokina između grupa životinja tretiranih metanolnim ekstraktom origana i VMDS grupe. ELISA testom je pokazano da je metanolni ekstrakt origana delovao samo na sekreciju TGF- $\beta$ , i to samo na nivou slezine, dok je sekrecija IL-6 i IL-23 ostala nepromenjena (Slika 19). Dakle, dejstvo metanolnog ekstrakta origana na diferencijaciju Th17 populacije desilo se mnogo niže u signalnoj kaskadi.

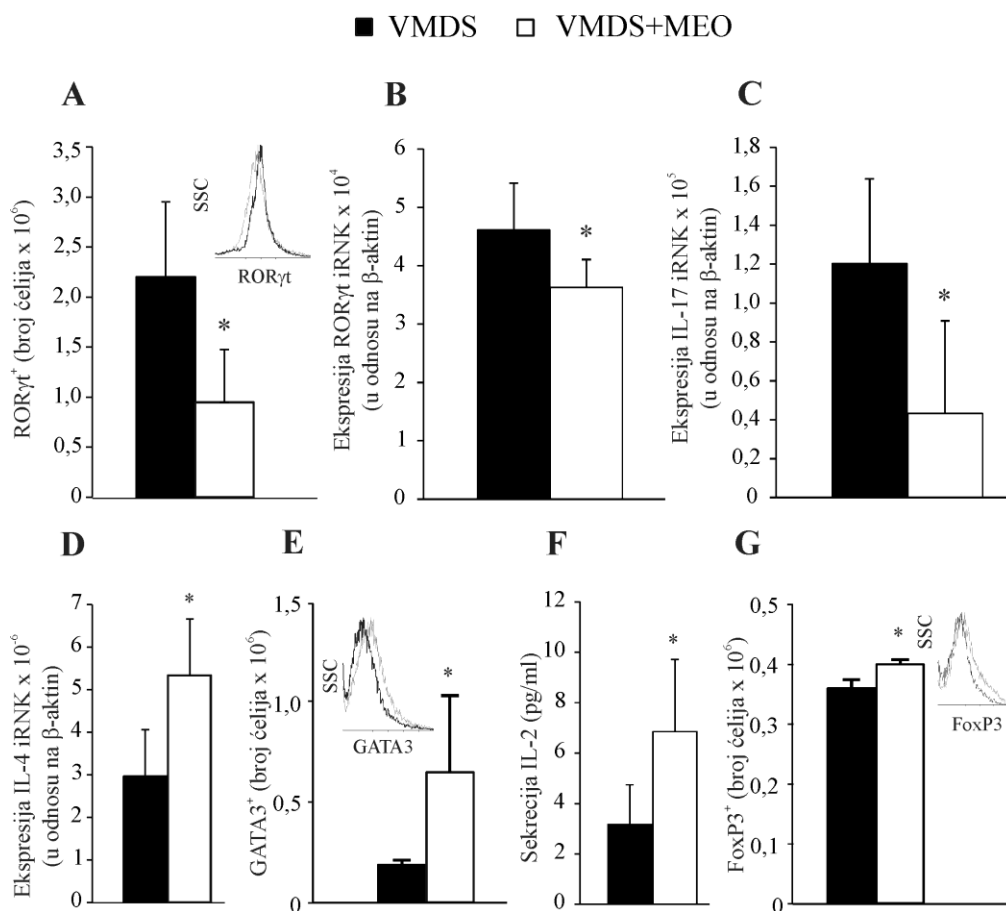


**Slika 19. Efekat metanolnog ekstrakta origana na sekreciju citokina koji učestvuju u diferencijaciji Th17 populacije.** ConA stimulirana sekrecija citokina ćelija slezine izolovanih iz VMDS i VMDS+MEO C57BL/6 miševa merena je iz supernatanta ELISA metodom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n=7 miševa po grupi)  $\pm$  SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

U diferencijaciji Th populacija na molekulskom nivou važan događaj jeste transkripcija gena specifičnih za datu populaciju Th ćelija. Transkripciju omogućavaju proteini transkripcioni faktori, koji se vezuju za specifične sekvence DNK i na taj način kontrolišu prepisivanje DNK u iRNK, odnosno kontrolišu ekspresiju gena koji se nalaze u blizini mesta vezivanja transkripcionog faktora. Tako se zna da je u diferencijaciju Th17 limfocita uključen transkripcioni faktor RAR-povezan receptor siročće gama T (eng. RAR-related Orphan Receptor Gamma T, ROR $\gamma$ T). Za

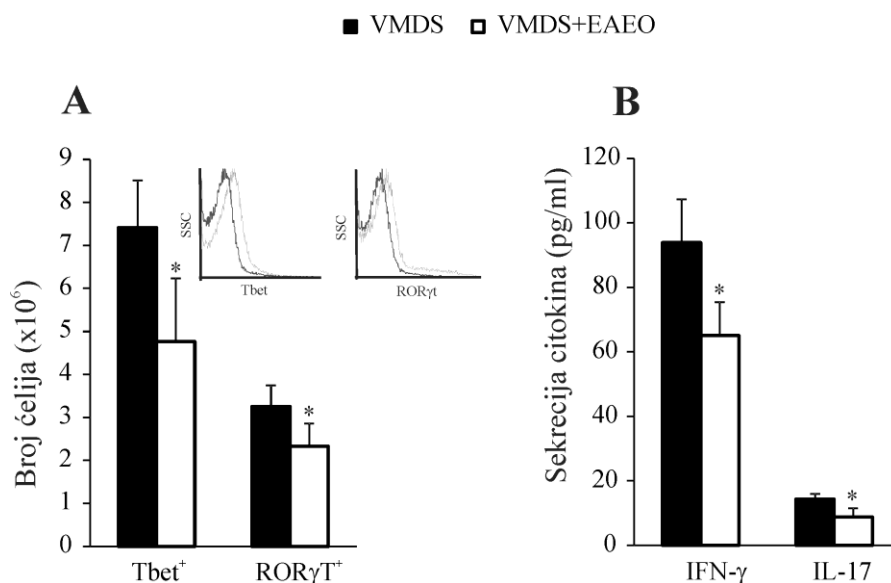
diferencijaciju Th2 limfocita neophodan je transkripcioni faktor GATA-3, Th1 limfocita Tbet, a Treg limfocita FoxP3 (Zhu i Paul, 2010).

Stoga je dalje analizirana ekspresija transkripcionih faktora koji učestvuju u diferencijaciji Th populacija, kao i ekspresija iRNK za citokine predstavnike Th populacija u limfocitima izolovanih iz slezina VMDS i VMDS+MEO tretiranih C57BL/6 miševa. Rezultati pokazuju da je tretman metanolnim ekstraktom origana doveo do značajno manjeg broja ćelija koje poseduju ROR $\gamma$ T transkripcioni faktor (Slika 20A), kao i iRNK za *ROR $\gamma$ T* gen u odnosu na kontrolu (Slika 20B). Ovaj pad ekspresije i sinteze ROR $\gamma$ T transkripcionog faktora za posledicu je imao i značajno manju ekspresiju iRNK za *IL-17* gen u grupi tretiranoj metanolnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu (Slika 20C). Uočena značajno veća ekspresija iRNK za *IL-4* gen (Slika 20D) može se objasniti značajno većim brojem ćelija koje su eksprimirale GATA3 u grupi tretiranoj metanolnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu (Slika 20E). Takođe, značajno veći broj ćelija koje eksprimiraju FoxP3 (Slika 20G) u grupi tretiranoj metanolnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu bio je praćen značajno većom sekrecijom IL-2 (Slika 20F). Dakle, metanolni ekstrakt origana suprimirao je Th17 imunski odgovor a potencirao Th2 i Treg imunski odgovor direktnim uticajem na smanjenje (Th17) i povećanje (Th2 i Treg) ekspresije transkripcionih faktora koji učestvuju u diferencijaciji ovih ćelijskih populacija.



**Slika 20. Efekat metanolnog ekstrakta origana na transkripcione faktore i gene koji učestvuju u diferencijaciji Th limfocita.** Limfociti su izolovani iz slezina VMDS i VMDS+MEO tretiranih C57BL/6 miševa. Broj ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> (A), GATA3<sup>+</sup> (E) i FoxP3<sup>+</sup> (G) ćelija slezine meren protočnom citofluorimetrijom. (B, C, D) Ekspresija iRNK ćelija slezine merena RT-PCR metodom. (F) Sekrecija IL-2 ćelija slezine merena ELISA metodom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n= 5-7 miševa po grupi)  $\pm$  SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

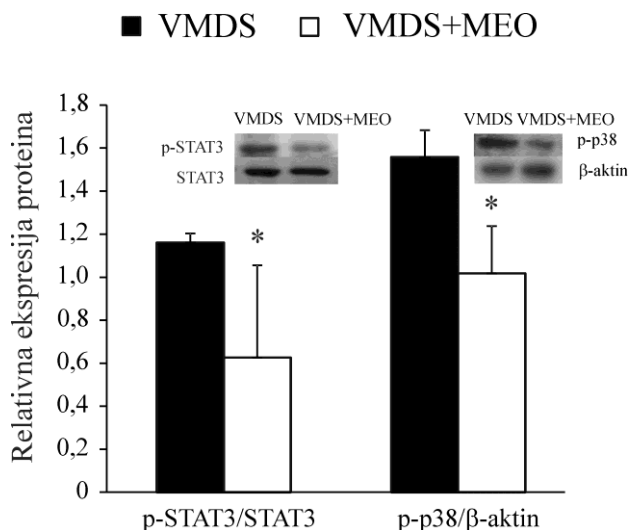
Kao što je ranje pokazano, etil-acetatni ekstrakt origana suprimirao je inflamacijski imunski odgovor posredovan Th1 i Th17 limfocitima. U analizi mehanizama uočenog efekta došlo se do podataka da je etil-acetatni ekstrakt origana direktno uticao na smanjenje ekspresije transkripcionih faktora ove dve populacije- Tbet (Th1) i ROR $\gamma$ T (Th17) (Slika 21A). Posledica ovakvog dejstva je smanjena sekrecija IFN- $\gamma$  i IL-17 (Slika 21B).



**Slika 21. Efekat etil-acetatnog ekstrakta origana na transkripcione faktore Th limfocita i sekreciju citokina.** Ćelije su izolovane iz slezina VMDS i VMDS+EAE0 C57BL/6 miševa. (A) Ukupan broj Tbet<sup>+</sup> i RORγT<sup>+</sup> ćelija meren je protočnom citofluorimetrijom. (B) ConA stimulisana *ex vivo* sekrecija citokina ćelija slezine izolovanih iz VMDS i VMDS + EAE0 C57BL/6 miševa nakon kultivacije od 48 h. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n= 4 miša po grupi) ± SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

U cilju bližeg ispitivanja mehanizma efekta metanolnog ekstrakta origana na supresiju RORγT transkripcionog faktora merena je količina aktivne, fosforilisane forme STAT 3 (pSTAT 3) u odnosu na količinu ukupnog STAT 3, kao i količina fosforilisane forme mitogen aktivirane protein kinaze p38 (pMAP38), s obzirom na to da se zna da oni utiču na ekspresiju ovog transkripcionog faktora (Kingston, 2008). Imunoblot analizom utvrđeno je značajno smanjenje fosforilacije STAT 3 transkripcionog faktora i p-p38 mitogen aktivirane protein kinaze (Slika 22) u grupi tretiranoj metanolnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu. Iz dobijenih rezultata može se izvesti zaključak da je metanolni ekstrakt origana smanjio ekspresiju RORγT putem smanjenja količine proteina pSTAT 3 i p-p38, što je za posledicu imalo smanjenje ekspresije i produkcije IL-17 i suprimiranja Th17 imunskog odgovora.





**Slika 22. Efekat metanolnog ekstrakta origana na sintezu pSTAT 3 i p-p38.** Relativna količina proteina izmerenih iz ćelija slezine VMDS i VMDS+MEO C57BL/6 miševa merena je imunoblot tehnikom a rezultati su normalizovani u odnosu na količinu ukupnog STAT 3 proteina i β-aktina. Reprezentativne trake od imunoblot analize prikazane su iznad grafika. Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$  iz reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \* $P < 0,05$  se odnosi na statistički značajnu razliku u odnosu na miševe tretirane samo VMDS.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je mehanizam dejstva metanolnog ekstrakta origana na smanjenje Th17 imunskog odgovora ostvaren smanjenjem količine pSTAT 3 i p-p38 proteina što je za posledicu imalo smanjenu količinu transkripcionog faktora diferencijacije Th17 limfocita ROR $\gamma$ T, što je dovelo do smanjene ekspresije i sekrecije IL-17. Mehanizam dejstva metanolnog ekstrakta origana na Th limfocite uključuje i povećanje količine GATA3 i FoxP3 transkripcionih faktora, a samim tim i povećanje broja anti-inflamacijskih Th2 i Treg limfocita. Takođe se može zaključiti da je etil-acetatni ekstrakt origana utišao inflamacijski Th1 i Th17 imunski odgovor direktnim smanjenjem količine transkripcionih faktora odgovornih za diferencijaciju ovih populacija limfocita.

#### **4.4. *In vitro* i *in vivo* uticaj pojedinačnih supstanci koje se nalaze u sastavu ekstrakata origana**

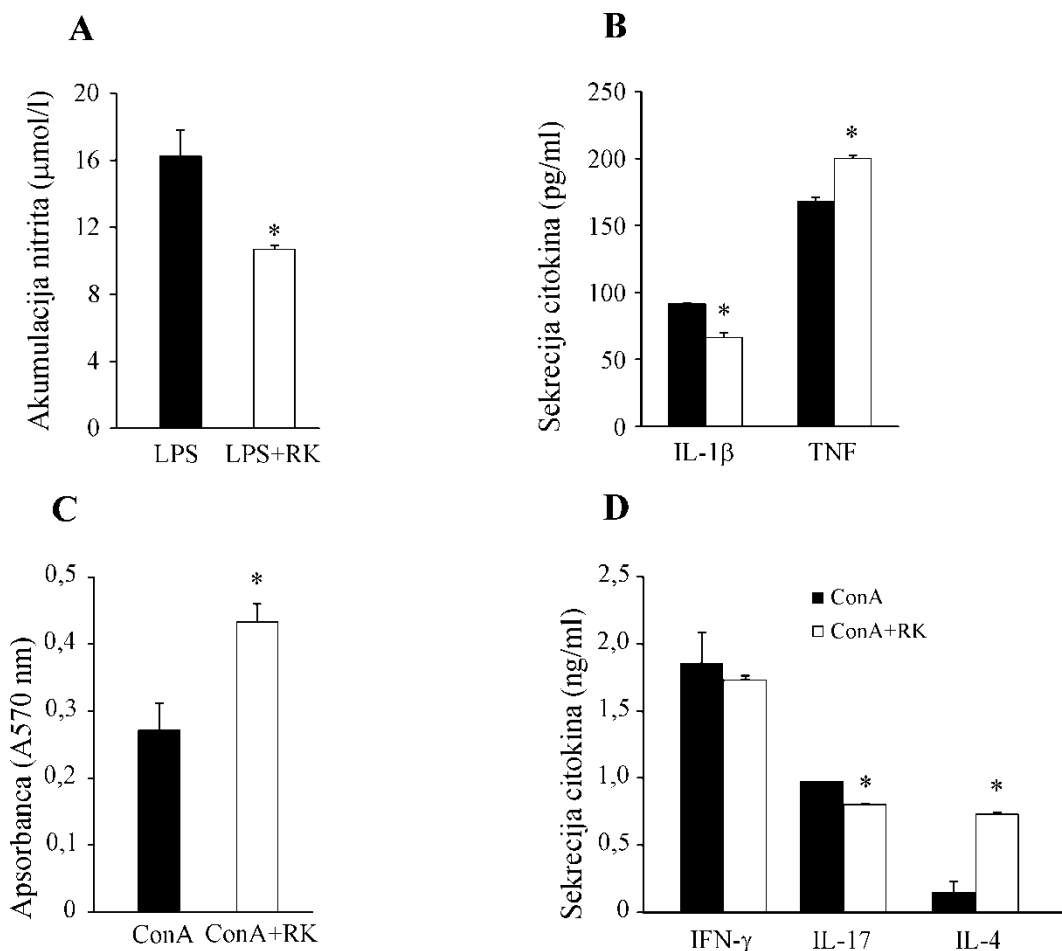
Prilikom određivanja sastava ekstrakata grčkog origana metodom masene spektrometrije, kolege sa odeljenja za hemiju Univerziteta u Janjini, Grčka, utvrdile su da su u metanolnom ekstraktu najzastupljenije ruzmarinska i salvijanolična kiselina. U etil-acetatnom ekstraktu origana najzastupljeniji je bio karvakrol, ali u velikoj količini bila je prisutna i ruzmarinska kiselina.

S obzirom na to da je uloga ovih jedinjenja u nekim patološkim stanjima potvrđena prethodnim istraživanjima, cilj sledeće grupe eksperimenata je bio utvrđivanje da li su ova jedinjenja pojedinačno odgovorna za uočene efekte ekstrakata na razvoj DT1 pokazane u ovom istraživanju.

##### **4.4.1. Uticaj ruzmarinske kiseline na ćelije imunskog sistema i razvoj DT1**

Kako bi se ispitala mogućnost da je ruzmarinska kiselina (RK) aktivni princip metanolnog ekstrakta origana, prvo su izolovani makrofagi iz peritonealne tečnosti kao i limfociti iz cervikalnih limfnih čvorova C57BL/6 miševa i tretirani su ruzmarinskom kiselinom u koncentraciji od 50 µg/ml. Makrofagi su stimulisani LPS-om, a limfociti ConA. Nakon 48 h izmereno je preživljavanje, akumulacija nitrita i sekrecija citokina (IL-1β i TNF za makrofage, IFN-γ, IL-17 i IL-4 za limfocite).

*In vitro* ispitivanja ruzmarinske kiseline pokazala su njen uticaj i na makrofage i na limfocite. RK je inhibirala funkciju makrofaga, imajući u vidu smanjenu produkciju nitrita kao i inflamacijskog citokina IL-1β (Slika 23A i B). Sa druge strane, RK je povećala proliferaciju limfocita prethodno stimulisanih ConA (Slika 23C). Imunomodulatorni efekat RK je ispoljila i smanjenjem sekrecije IL-17, a povećanjem sekrecije anti-inflamacijskog IL-4 u limfocitima (Slika 23D).

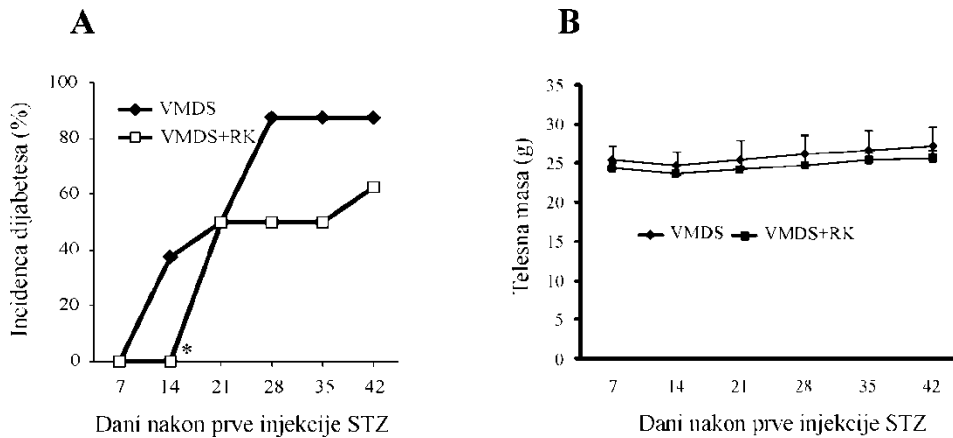


**Slika 23. Efekat ružmarinske kiseline na makrofage i limfocite *in vitro*.** Makrofagi su izolovani iz peritonealne tečnosti a limfociti iz cervikalnog limfnog čvora C57BL/6 miševa. Suspenzija makrofaga stimulisana je LPS-om a limfocita ConA i tretirana ružmarinskom kiselinom. (A) Akumulacija nitrita makrofaga nakon 48 h merena Gris reakcijom. (B) Sekretija citokina makrofaga nakon 48 h merena ELISA testom. (C) Preživljavanje limfocita nakon 48 h mereno je MTT testom. (D) Sekretija citokina limfocita nakon 48 h merena ELISA testom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \* $P < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Imajući u vidu ove rezultate, naredni korak bilo je ispitivanje dejstva ružmarinske kiseline na razvoj DT1 u *in vivo* sistemu. U ovoj postavci, DT1 je izazvan VMDS a životinje su tretirane u profilaktičkom režimu intraperitonealnom injekcijom ružmarinske kiseline u dozi od 2,5 mg/kg po danu u trajanju od 10 dana. Doza je odabrana na osnovu podataka iz literature (Boonyarikpunchaia i sar, 2014). Incidenca dijabetesa određivana je merenjem glukoze u krvi životinja.

Pokazano je da je profilaktički tretman VMDS tretiranih miševa C57BL/6 ružmarinskom kiselinom samo delimično zaštitio miševe od razvoja dijabetesa.

Incidenca dijabetesa u grupi tretiranoj ruzmarinskom kiselinom je u prve dve nedelje od početka eksperimenta bila nula, da bi nakon toga porasla na 50% i ostala na tom nivou do kraja eksperimenta (Slika 24A).



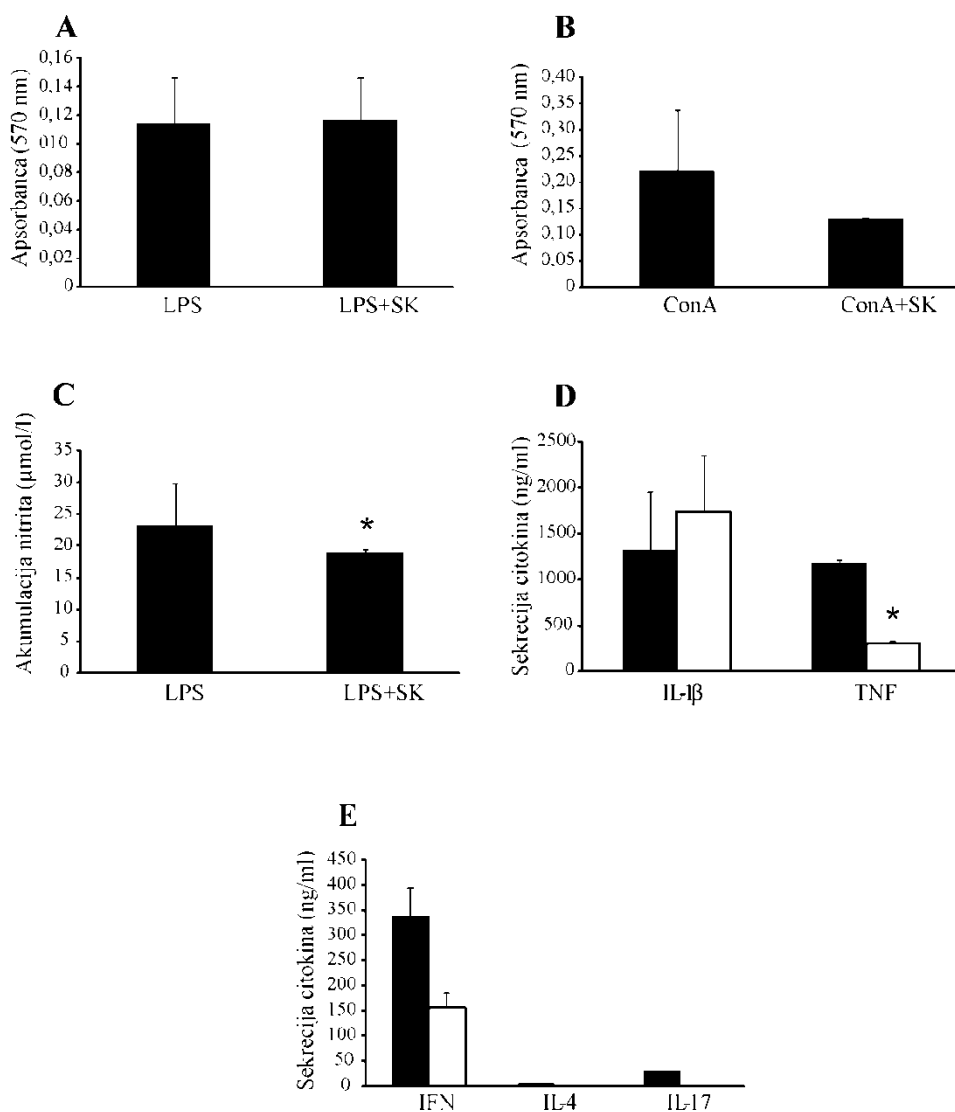
**Slika 24. Efekat ruzmarinske kiseline na incidencu DT1.** Dijabetes je indukovao kod mužjaka miševa C57BL/6 davanjem VMDS (40 mg/kg telesne mase) u trajanju od 5 dana. Životinje su tretirane ruzmarinskom kiselinom u dozi od 2,5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u profilaktičkom režimu, u trajanju od 10 dana. (A) Incidenca dijabetesa izračunata je kao procenat životinja koje su razvile hiperglikemiju (glukoza u krvi  $\geq 11$  mmol/l). (B) Telesna masa životinja merena je na nedelju dana. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ( $n=10$  miševa po grupi)  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  u odnosu na VMDS grupu.

Iz ovoga se može zaključiti da ruzmarinska kiselina nije sama aktivni princip metanolnog ekstrakta origana, već da verovatno deluje u sadejstvu sa jednom ili više dodatnih komponenti.

#### 4.4.2. Efekat salvijanolične kiseline na ćelije imunskog sistema i razvoj DT1

Kako bi se ispitala mogućnost da je salvijanolična kiselina (SK) odgovorna za uočena dejstva metanolnog ekstrakta origana, izolovane su ćelije peritoneuma kao i limfociti iz cervikalnih limfnih čvorova C57BL/6 miševa i tretirani su ovom kiselinom u koncentraciji od 50  $\mu$ g/ml. Ćelije peritoneuma su stimulirane LPS-om a limfociti ConA. Nakon 48 h izmereno je preživljavanje, akumulacija nitrita i sekrecija citokina (IL-1 $\beta$  i TNF za makrofage, IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-4 za limfocite). *In vitro* ispitivanja salvijanolične kiseline pokazala su da ona nije bila toksična po ćelije peritoneuma i limfocita u primenjenoj koncentraciji (Slika 25A i B). Dalje, salvijanolična kiselina

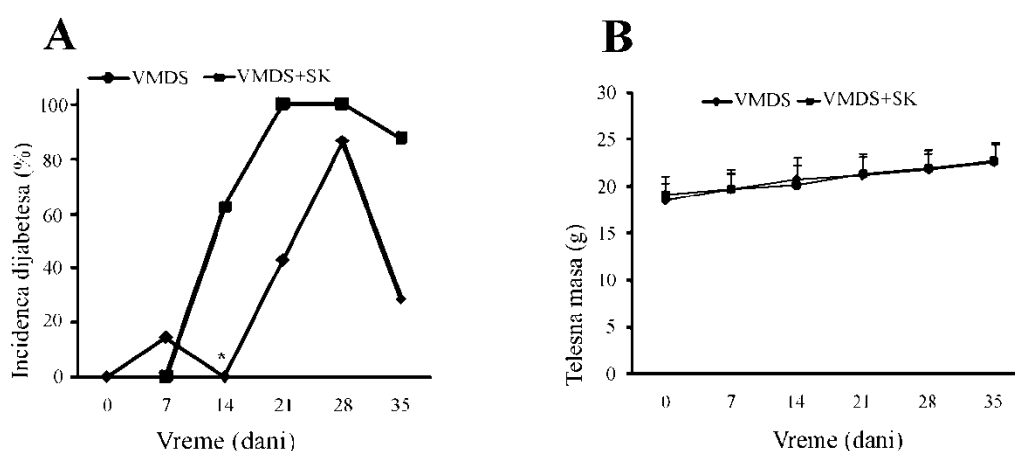
smanjila je produkciju nitrita (Slika 25C) kao i sekreciju TNF (Slika 25D) ćelija peritoneuma. Sa druge strane, salvijanolična kiselina nije delovala na funkciju limfocita s obzirom na to da je sekrecija IFN, IL-4 i IL-17 bila nepromenjena u odnosu na kontrolu (Slika 25E). Dakle, salvijanolična kiselina ostvarila je imunomodulatorno dejstvo na ćelije peritoneuma smanjenjem proizvodnje NO i TNF.



**Slika 25. Efekat salvijanolične kiseline na ćelije peritoneuma i limfocite *in vitro*.** Ćelije peritoneuma izolovane su iz peritonealne tečnosti a limfociti iz cervikalnog limfnog čvora C57BL/6 miševa. Suspenzija ćelija peritoneuma stimulisana je LPS-om a limfocita ConA i tretirana salvijanoličnom kiselinom (50 μg/ml). (A) Preživljavanje ćelija peritoneuma nakon 48 h mereno je MTT testom. (B) Preživljavanje limfocita nakon 48h mereno je MTT testom. (C) Akumulacija nitrita ćelija peritoneuma nakon 48 h merena Gris reakcijom. (D) Sekrecija citokina ćelija peritoneuma nakon 48 h merena ELISA testom. (E) Sekrecija citokina limfocita nakon 48h merena ELISA testom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \*P < 0,05 u odnosu na kontrolu.

Kako bi se ispitao samostalno dejstvo salvijanolične kiseline na razvoj DT1 mužjaci C57BL/6 miševa kod kojih je DT1 izazvan VMDS tretirani su salvijanoličnom kiselinom u dozi od 2,5 mg/kg po danu, u profilaktičkom režimu, deset dana (Wang i sar, 2014).

Rezultati ukazuju na to da salvijanolična kiselina nije jedinjenje zaslužno za ispoljene efekte metanolnog ekstrakta origana na razvoj DT1, s obzirom na to da *in vivo* tretman salvijanoličnom kiselinom nije uspeo da zaštiti VMDS tretirane miševe od pojave dijabetesa već je potencirao bolest (Slika 26A).



**Slika 26. Efekat salvijanolične kiseline na incidencu DT1.** Dijabetes je indukovao kod mužjaka miševa C57BL/6 davanjem VMDS (40 mg/kg telesne mase) u trajanju od 5 dana. Životinje su tretirane salvijanoličnom kiselinom u dozi od 2,5 mg/kg po danu, intraperitonealno, u profilaktičkom režimu, u trajanju od 10 dana. (A) Incidencija dijabetesa izračunata je kao procenat životinja koje su razvile hiperglikemiju (glukoza u krvi  $\geq 11$  mmol/l). (B) Telesna masa životinja merena je na nedelju dana. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ( $n=10$  miševa po grupi)  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  u odnosu na VMDS grupu.

#### 4.4.3. *In vitro* i *in vivo* uticaj karvakrola na ćelije imunskog sistema i razvoj DT1

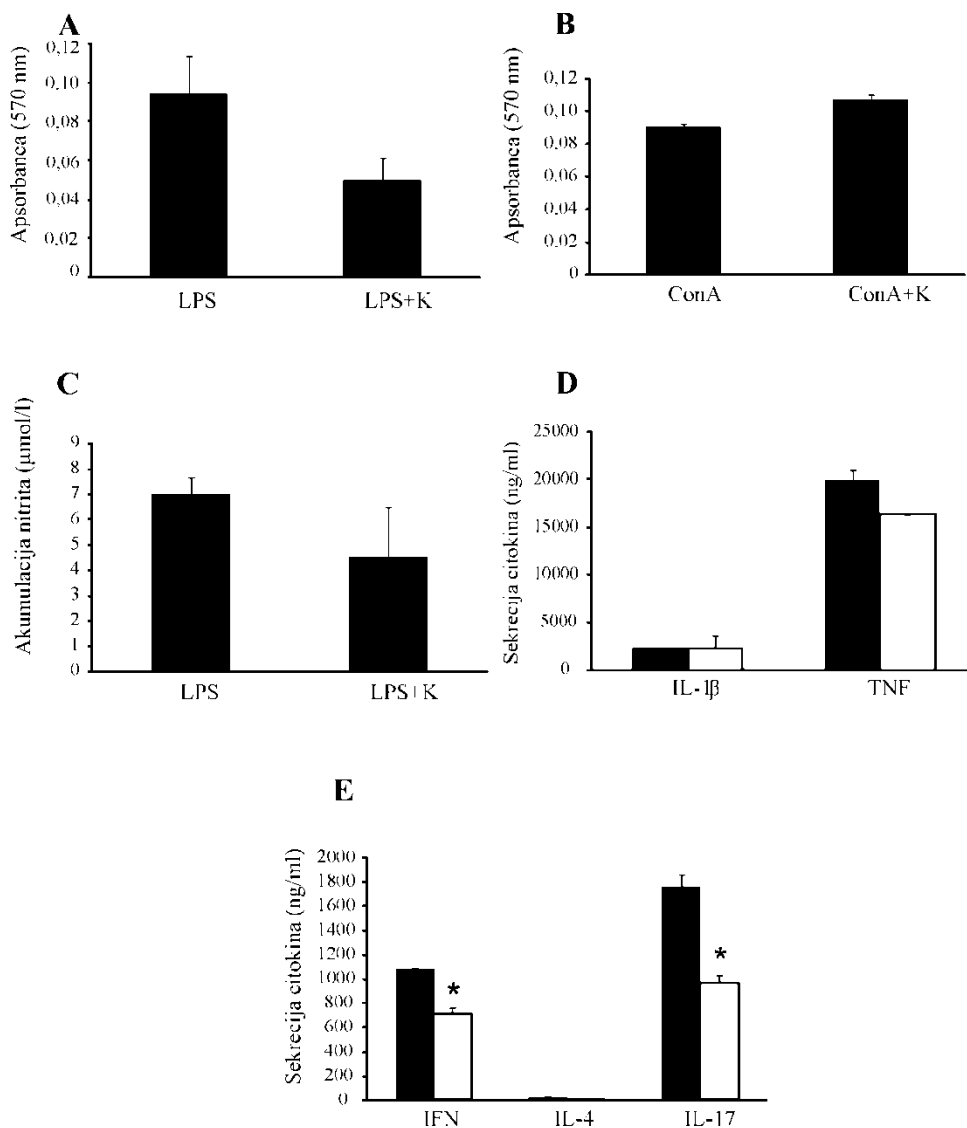
Karvakrol, kao jedna od najzastupljenijih komponenti etil-acetatnog ekstrakta origana dobar je kandidat za fitohemijsku supstancu zaslužnu za uočene imunomodulatorne efekte etil-acetatnog ekstrakta origana.

U cilju odgovora na pitanje da li je karvakrol aktivni princip odgovoran za uočena dejstva etil-acetatnog ekstrakta origana izolovane su ćelije peritoneuma kao i limfociti iz cervikalnih limfnih čvorova C57BL/6 miševa i tretirani su karvakrolom u koncentraciji od 50 µg/ml. Ćelije peritoneuma su stimulisane LPS-om a limfociti ConA. Nakon 48 h izmereno je preživljavanje, akumulacija nitrita i sekrecija citokina (IL-1β i TNF za makrofage, IFN-γ, IL-17 i IL-4 za limfocite).

*In vitro* ispitivanja karvakrola pokazala su da on nije bio toksičan po ćelije peritoneuma i limfocita u ispitivanoj koncentraciji, sudeći po nepromenjenoj aktivnosti mitohondrija merenoj MTT testom (Slika 27A i B). Karvakrol nije ispoljio dejstvo na ćelije peritoneuma *in vitro*, s obzirom na to da su produkcija NO (Slika 27C) i sekrecija citokina (Slika 27D) bile nepromenjene u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, karvakrol je delovao na funkciju limfocita *in vitro* imajući u vidu da je sekrecija inflamacijskih citokina IFN i IL-17 bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolu (Slika 27E).

Dakle, karvakrol je ostvario imunomodulatorno dejstvo na limfocite *in vitro* smanjenjem njihovog inflamacijskog kapaciteta, dok na ćelije peritoneuma nije imao uticaja u koncentraciji primenjenoj *in vitro*.

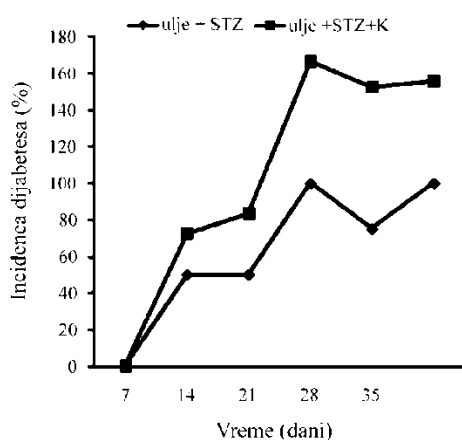




**Slika 27. Efekat karvakraola na ćelije peritoneuma i limfocite *in vitro*.** Ćelije peritoneuma izolovane su iz peritonealne tečnosti a limfociti iz cervikalnog limfnog čvora C57BL/6 miševa. Suspenzija ćelija peritoneuma stimulisana je LPS-om a limfocita ConA i tretirana karvakraolom (50  $\mu\text{g/ml}$ ). (A) Preživljavanje ćelija peritoneuma nakon 48 h mereno je MTT testom. (B) Preživljavanje limfocita nakon 48 h mereno je MTT testom. (C) Akumulacija nitrita ćelija peritoneuma nakon 48 h merena Gris reakcijom. (D) Sekrecija citokina ćelija peritoneuma nakon 48h merena ELISA testom. (E) Sekrecija citokina limfocita nakon 48 h merena ELISA testom. Podaci, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta. \* $P < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Kako bi se ispitalo dejstvo karvakrola na razvoj DT1 mužjaci C57BL/6 miševa kod kojih je DT1 izazvan VMDS tretirani su karvakrolom u dozi od 50 mg/kg po danu, *per os*, svakog drugog dana počevši od 7 dana pre prve injekcije STZ a završivši se 1 dan nakon poslednje injekcije STZ (rani profilaktički tretman). *Per os* način davanja izabran je na osnovu podataka iz literature (Francilene i sar, 2013).

Iako se dve nedelje od prve injekcije streptozotocina nijedna od životinja iz grupe tretirane karvakrolom nije razbolela, već u trećoj nedelji eksperimenta incidenca DT1 u ovoj grupi je bila 40% a u četvrtoj čak 90% (Slika 28).



**Slika 28. Efekat karvakrola na incidencu DT1.** Dijabetes je indukovao kod mužjaka miševa C57BL/6 davanjem VMDS (40 mg/kg telesne mase) u trajanju od 5 dana. Životinje su tretirane karvakrolom u dozi od 50 mg/kg po danu, *per os*, svakog drugog dana, a počevši od 7 dana pre prve injekcije STZ (rani profilaktički režim). Incidenca dijabetesa izračunata je kao procenat životinja koje su razvile hiperglikemiju (glukoza u krvi  $\geq 11$  mmol/l). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (n=10 miševa po grupi)  $\pm$  SD. \*P < 0,05 u odnosu na VMDS grupu.

Iz ovoga se može zaključiti da karvakrol nije uspeo da zaštiti miševе od razvoja DT1, već je i potencirao razvoj bolesti i da je za anti-inflamacijske efekte etil-acetatnog ekstrakta origana verovatno zaslužna kombinacija više supstanci koje su u sastavu ekstrakta, a da karvakrol uopše ne učestvuje.

# **5. Diskusija**

Autoimunski dijabetes je hronična bolest koja nastaje prevashodno kod dece i nosi sa sobom i rizik od raznih drugih komplikacija kao što su oštećenja nervnog i kardiovaskularnog sistema. Ova bolest je za sada neizlečiva, te postoje konstantni naponi svetske naučne zajednice u smeru boljeg razumevanja etiopatogeneze ove bolesti kao i pokušaja pronalazjenja svrsishodnih lekova. DT1 nastaje kao posledica imunskog „napada” posredovanog T limfocitima koje prate i makrofagi odgovorni za oštećenja beta ćelija pankreasa uzrokovana reaktivnim vrstama kiseonika i azota (Nicolls i sar, 2007; Padgett i sar, 2013). S obzirom na način odigravanja autoimunske reakcije u pankreasu, potpuno je opravdano potencijalne terapeutike tražiti među supstancama koje imaju anti-inflamacijske i/ili anti-oksidativne karakteristike. Zapravo biofenoli ili fenolska jedinjenja zadovoljavaju oba ova kriterijuma, te su u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani ekstrakti mediteranske biljke *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, grčkog origana za koji se već zna da poseduje antibakterijska, anti-inflamacijska i antioksidativna dejstva (Coccimiglio i sar, 2016; Ocaña-Fuentes i sar, 2010).

Kao model DT1 u ovom istraživanju izabran je tretman miševa C57BL/6 soja višestrukim malim dozama streptozotocina (VMDS) koji izaziva blago oštećenje beta ćelija pankreasa. Nakon ovog inicijalnog oštećenja oslobađaju se autoantigeni beta ćelija koje preuzimaju lokalne dendritske ćelije, prikazuju ih u drenirajućem limfnom čvoru T limfocitima i započinje autoimunski odgovor na beta ćelije pankreasa. Ćelije imunskog sistema infiltriraju u pankreasna ostrvca gde lučenjem inflamacijskih citotoksičnih medijatora dovode do dalje smrti beta ćelija pankreasa. Iako VMDS model dijabetesa nije u potpunosti nalik humanom DT1, on ipak pokriva nekoliko važnih aspekata bolesti kod ljudi (Weide i Lacy, 1991) i često se koristi u istraživanjima koja za cilj imaju prevenciju DT1 (King i Bowe, 2015). Tako, intraperitonealna primena metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana na C57BL/6 miševima kojima je dijabetes indukovano streptozotocinom dovela je do povoljnog dejstva ovih ekstrakata na razvoj bolesti- naime, incidenca DT1 je bila značajno manja kod tretiranih miševa. Sa druge strane, primena vodenog ekstrakta origana nije imala modulacioni efekat na razvoj DT1. Očigledno je da efekat ekstrakta zavisi od načina njegovog dobijanja, tj. sastava datog ekstrakta. Sastav metanolnog i vodenog ekstrakta origana je kvalitativno vrlo sličan, ali kvantitativno postoje razlike, naročito u prisustvu

ruzmarinske kiseline koje u metanolnom ekstraktu origana ima dva puta više nego u vodenom (Vujicic i sar, 2015). Sa druge strane, etil-acetatni ekstrakt origana ima više jednostavnih fenola u odnosu na druga dva ekstrakta (Vujicic i sar, 2016). U tom smislu se nemogućnost vodenog ekstrakta origana da spreči nastanak DT1 može objasniti drugačijim sastavom, u kome možda nema, ili ima, ali u nedovoljnoj količini, supstanci ključnih za zapažena dejstva metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana u sprečavanju nastanka DT1. Vodeni ekstrakt origana je pokazao efekat na smanjenje hiperglikemije u toksičnom modelu dijabetesa kod pacova (Lemhadri i sar, 2004), što je u suprotnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Međutim, ako imamo u vidu razlike između samih animalnih modela (vrsta životinja i način izazivanja bolesti) korišćenih u ova dva istraživanja, kao i različitu etiologiju i patogenezu dijabetesa u ova dva animalna modela, neslaganje u dejstvu vodenog ekstrakta origana na hiperglikemiju nije iznenađujuće. Takođe treba imati u vidu da i metodološke razlike u pripremi ekstrakata mogu dovesti do nešto drugačijeg sastava, a posledično i drugačijeg dejstva ekstrakata u eksperimentima.

Primena potencijalnih terapeutika za prevenciju nastanka DT1 je potpuno opravdana s obzirom na to da se rizik za razvoj DT1 individue može odrediti genetskim testiranjem na visokorizične HLA alele i pre nastupanja same bolesti, a testovima na autoantitela tipična za DT1 mogu se otkriti individue kod kojih je autoimunski proces već otpočeo, a kod kojih je glikemija i dalje u fiziološkim granicama (Beauchamp i Haller, 2015). Kada u ove dve grupe individua dodamo i rođake osoba već obolelih od DT1, dobijamo grupu individua sa visokim rizikom za razvoj DT1 kod kojih bi preventivne strategije usmerene protiv razvoja ove bolesti imale nemerljiv značaj. Takođe je atraktivan i pronalazak terapeutika koji bi delovao nakon što se bolest razvije. S tim u vezi, metanolni ekstrakt origana primenjen je u ranom terapijskom režimu (nakon uspostavljanja hiperglikemije), ali je ovaj tretman dao kratkoročne rezultate imajući u vidu da se nakon prestanka davanja metanolnog ekstrakta razvila hiperglikemija kod životinja. Ovo sugeriše da jednom kada je uspostavljen imunski odgovor ka beta ćelijama pankreasa, metanolni ekstrakt origana nije u stanju da ga zaustavi. Samim tim može se zaključiti da metanolni ekstrakt origana ne može da pokrene regeneraciju beta ćelija pankreasa. Ipak, dugoročni tretman metanolnim ekstraktom origana može se koristiti kao dodatak drugim terapijama koje imaju za cilj uklanjanje simptoma DT1.

Naše oslanjanje primarno na imunoterapije DT1 koje nisu specifične za antigen govori o nepotpunom razumevanju etiopatogeneze DT1 i podvlači potrebu za uzimanjem u obzir pristupa lečenju DT1 koji bi kombinovao ove sa antigen-specifičnim terapijama DT1 (Beauchamp i Haller, 2015). Dakle, efekat metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana možda bi se najbolje mogao iskoristiti u preventivnim i kombinovanim terapijskim pristupima u tretmanu DT1.

Važnu ulogu u otpočinjanju autoimunskog procesa ima narušen balans patogenih M1/Th1/Th17 i protektivnih M2/Th2/Treg ćelijskih populacija. Jedna od strategija u lečenju DT1 bi bila upravo usmerena na pomeranje ove ravnoteže u korist protektivnog imunskog odgovora što bi moglo da doprinese zaštiti beta ćelija od inflamacije i autoimunskog odgovora. Samim tim bi se povećao ukupan broj beta ćelija kojima je očuvana funkcija, što bi za krajnji efekat imalo očuvanje glukozne homeostaze. Upravo ovaj efekat su ostvarili metanolni i etil-acetatni ekstrakt origana, svaki na svoj način. Naime, metanolni ekstrakt origana nije ispoljio efekat na makrofage (prve ćelije koje infiltrišu pankreasna ostrvca u ovom modelu (Anderson i Bluestone, 2005) već je uticao na ćelije koje nakon makrofaga ulaze u ostrvca tj. inflamacijske Th17 populacije ćelija (Slika 29). Pored smanjenja njihove brojnosti, metanolni ekstrakt origana inhibirao je i njihovu funkciju tj. proizvodnju IL-17 u slezini i limfnim čvorovima, ali i u ćelijama limfnih čvorova *in vitro*. Kritična uloga Th17 ćelija u patogenezi DT1 je relativno skorašnje, ali nesumnjivo važno otkriće (Shao i sar, 2012). U radu Emamaulija i saradnika pokazano je da eliminacija Th17 ćelija pomoću antitela na IL-17 sprečava nastanak DT1 kod NOD miševa (Emamaullee i sar, 2009), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Sa druge strane, primena metanolnog ekstrakta povećala je zastupljenost anti-inflamacijske Th2 populacije tako da je balans imunskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima bio pomeren ka protektivnoj imunosti (Slika 29). Od ranije je poznato da egzogeno dodavanje IL-4 koga proizvode Th2 ćelije sprečava nastanak dijabetesa kod NOD miševa (Rapoport i sar, 1993). Takođe, infekcija helmintima, koja izaziva snažan Th2 odgovor štiti od razvoja DT1 u animalnim modelima bolesti (Zaccone i Cooke, 2013). Uočeni efekat metanolnog

ekstrakta origana na Th ćelijske populacije verovatno je ključan u prevenciji razvoja DT1.

Diferencijacija Th17 ćelija otpočinje stimulacijom T ćelijskog receptora (TCR) i aktivnošću citokina TGF- $\beta$  i IL-6/IL-21 (Mangan i sar, 2006; Zhou i sar, 2007). Ovi citokini stimulišu ekspresiju ROR $\gamma$ T koji je transkripcioni faktor neophodan za ekspresiju *Il-17* (Korn i sar, 2009). Sa druge strane, IL-23 je citokin koji je neophodan za stabilizaciju Th17 fenotipa (Aggarwal i sar, 2003). U ovoj studiji je pokazano da uticaj metanolnog ekstrakta na Th17 ćelijsku populaciju nije ostvaren na nivou njihove diferencijacije i propagacije, već se ostvaruje nizvodnom regulacijom fosforilacije p38 mitogen aktivirajuće protein kinaze i fosforilacijom STAT3, što dovodi do supresije ROR $\gamma$ T (Slika 29). Direktan uticaj metanolnog ekstrakta origana na Th17 limfocite naročito je značajan ako imamo u vidu da je relativno skoro pokazana patogena uloga Th17 u razvoju DT1 i kod ljudi, i da je u krvi pacijenata sa DT1 povećan IL-17 (Baharlou i sar, 2016).

Važno je napomenuti da naivni T limfociti mogu da se diferenciraju u Th17 ili Treg u zavisnosti od citokinskog miljea (Komatsu i sar, 2014). Samim tim, uočena uzvodna regulacija Treg limfocita u ovom istraživanju može da se objasni time da je metanolni ekstrakt origana preokrenuo signalni put diferencijacije limfocita od pro-Th17 ka pro-Treg putu u okviru ćelije. Imajući u vidu plastičnost Th17 ćelija, odnosno njihovu sposobnost prelaska u Th1 ili Th1/Th17 fenotip (Chen i sar, 2013), može se pretpostaviti da je manji broj Th17 ćelija kod životinja tretiranih metanolnim ekstraktom origana posledica njihove transformacije u drugi Th fenotip. Međutim, procenat Th1/Th17 kao i Th1 ćelija nije se promenio nakon tretmana metanolnim ekstraktom u odnosu na VMDS životinje, tako da promena fenotipa Th17 ćelija nije odgovorna za primećeno smanjenje njihovog broja.

S obzirom na to da je metanolni ekstrakt origana stimulisao proizvodnju IL-2 (faktor rasta Treg ćelija) i TGF- $\beta$ , moguće je da ovaj ekstrakt podstiče proliferaciju Treg ćelija (Chen i sar, 2003; Laurence i sar, 2007). Treba pomenuti i da je veliki broj pankreasnih ostrvaca iz grupe životinja tretiranih metanolnim ekstraktom origana bio u stanju peri-insulitisa, i ovi miševi su i dalje održavali normoglikemiju. Ovo može biti posledica sastava ćelija u okviru infiltrata. Naime, iako je broj Th1 i Th17 ćelija bio sličan u obe



grupe životinja, primećen je veći broj Th2 i Treg ćelija u pankreasnim infiltratima. Povećano prisustvo ove dve grupe ćelija moglo bi biti odgovorno za sprečavanje prelaska insulitisa iz benigne u destruktivnu formu kod miševa tretiranih metanolnim ekstraktom origana, naročito ako se uzme u obzir podatak da transgena ekspresija IL-4 u pankreasnim ostrvcima sprečava nastanak DT1 u animalnim modelima (Mueller i sar, 1996).

Iako je u *in vitro* uslovima metanolni ekstrakt origana delovao na sekreciju medijatora inflamacije makrofaga, u *in vivo* modelu nije ispoljio nikakav efekat na dejstvo makrofaga. Uočeno neslaganje u rezultatima moglo bi se objasniti samim razlikama dva primenjena model sistema. *In vivo* model istraživanja je daleko kompleksniji, kako u smislu prisutnih tipova ćelija tako i u smislu ostvarenih interakcija, što na lokalnom, što na sistemskom nivou. Ekstrati esencijalnog ulja origana pokazali su antiinflamacijsko dejstvo na makrofage (Ocana-Fuentes i sar, 2010), što se ne slaže sa rezultatima ove studije. Međutim, činjenica da je studija sa uljem origana rađena u *in vitro* uslovima, da su korišćeni makrofagi iz različitog izvora, kao i da je sastav ulja origana drugačiji od metanolnog ekstrakta origana (Ocana-Fuentes i sar, 2010; Vujicic i sar, 2015; Vujicic i sar, 2016) može objasniti uočeno neslaganje.

Mehanizam dejstva etil-acetatnog ekstrakta origana bazira se na utišavanju inflamacijskog M1/Th1/Th17 odgovora, kao i pomeranju fenotipa makrofaga ka protektivnom M2 fenotipu (Slika 29). Razlika u dejstvu etil-acetatnog ekstrakta origana na makrofage u odnosu na metanolni ekstrakt origana je očigledna, i verovatno je posledica različitog sastava ekstrakata. Klasično aktivirani makrofagi (M1) imaju ulogu u inflamaciji koju ostvaruju sekrecijom inflamacijskih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6) i ROS i RNS, dok alternativno aktivirani makrofagi (M2, sekretuju IL-10) imaju protektivnu ulogu u patogenezi DT1 koju ostvaruju ograničavanjem inflamacije (Padgett i sar, 2015). U ovom istraživanju, etil-acetatni ekstrakt origana smanjio je aktivnost M1 makrofaga smanjenjem sekrecije inflamacijskih citokina, a istovremeno je i povećao aktivnost M2 makrofaga, sudeći po povećanoj sekreciji citokina IL-10, za koga se zna da stimuliše razvoj M2 populacije makrofaga (Padgett i sar, 2015). U skladu sa našim rezultatima, prethodna istraživanja sa uljem origana pokazala su da su ulja primarno delovala na smanjenje produkcije inflamacijskih citokina makrofaga i

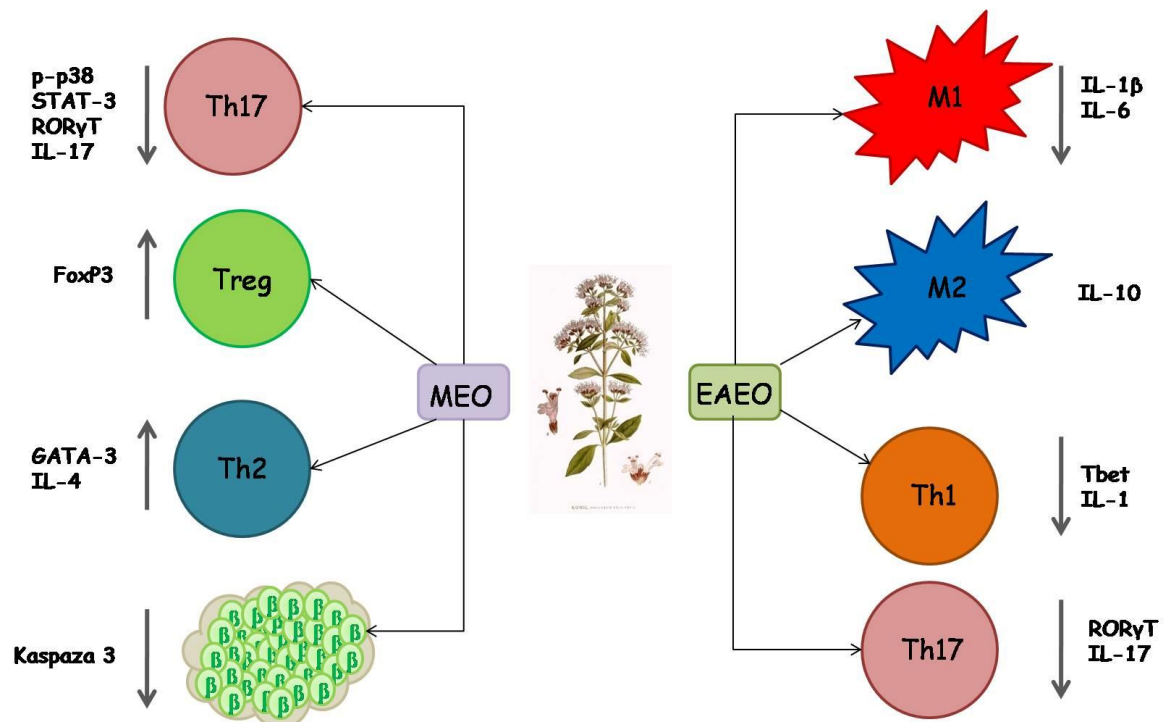
povećanje anti-inflamacijskog IL-10 (Ocana-Fuentes i sar, 2010). Zanimljivo je da makrofagi iz miševa tretiranih etil-acetatnim ekstraktom imaju povećanu produkciju TNF što bi moglo da sugeriše povećanu aktivnost inflamacijskih makrofaga. Iako je TNF najčešće povezan sa inflamacijskim imunskim odgovorom, njegova uloga u autoimunskim procesima zavisi od više faktora- faze u kojoj se autoimunski proces nalazi i trenutka ekspresije ovog citokina. Dodatno, dvojaka uloga TNF u autoimunosti izgleda da potiče od različitih aktivnosti transmembranskih i solubilnih formi TNF kao i funkcionalne različitosti njegovih receptora TNFR1 i TNFR2 (Blazevski i sar, 2015). Studije koje su ispitivale TNF i DT1 na NOD miševima su pokazale da kada je TNF prekomerno ekspimiran na lokalnom nivou, tj. u pankreasnim ostrvcima, dolazi do sprečavanja nastanka autoreaktivnih T limfocita specifičnih za pankreasna ostrvca (Grewal i sar, 1996). Imajući u vidu ove podatke, povećano prisustvo TNF u ovom istraživanju može se pripisati pozitivnim efektima etil-acetatnog ekstrakta origana.

Kao što je već naglašeno, diferencijacija Th ćelija smatra se ključnom tačkom u određivanju toka autoimunskog procesa (Steinman L. 2007). Ova studija je pokazala da je etil-acetatni ekstrakt origana specifično delovao na Th1 i Th17 (Slika 29) ćelijsku populaciju, dok je broj protektivnih Th2 i IL-10 produkujućih ćelija ostao nepromenjen. Uloga Th1 limfocita u patogenezi DT1 je dobro dokumentovana. Poznato je da prekomerna ekspresija IFN- $\gamma$  u stanju da izazove DT1 kod miševa (Sarvetnick i sar, 1988), dok blokada IFN- $\gamma$  kod NOD miševa dovodi do sprečavanja nastanka DT1 (Debray-Sachs i sar, 1991). Imunomodulatorno dejstvo etil-acetatnog ekstrakta origana verovatno je ostvareno na nivou transkripcionih faktora Th1 i Th17 ćelijskih populacija, Tbet i ROR $\gamma$ T, respektivno (Slika 29).

U poređenju sa *in vivo* tretmanom, *in vitro* tretman etil-acetatnim ekstraktom pokazao je suptilni efekat na nizvodnu regulaciju makrofaga. Nesklad između ove dve grupe podataka može se objasniti razlikama između dva model sistema. Treba napomenuti da su limfociti reagovali na tretman etil-acetatnim ekstraktom origana u sličnom maniru i u *in vivo* i u *in vitro* istraživanjima ove studije.

Iako je u *in vitro* uslovima vodeni ekstrakt origana značajno redukovao sekreciju inflamacijskih IL-1 $\beta$  i NO u ćelijama peritonealne tečnosti, *in vivo* primena vodenog ekstrakta origana nije inhibirala razvoj DT1. Ovakav rezultat može se objasniti

razlikama u *in vitro* i *in vivo* sistemima, kao i neadekvatnim prevođenjem doze ekstrakta koja je ispoljila efekat u *in vitro* sistemu na živi sistem.



Slika 29. Mehanizmi dejstva metanolnog (MEO) i etil-acetatnog (EAEO) ekstrakta origana u sprečavanju razvoja DT1 pokazani u ovoj studiji.

Jedan od ciljeva u razvoju novih pristupa DT1 je očuvanje/povećanje ukupne mase beta ćelija sprečavanjem destruktivnog inflamacijskog imunskog odgovora (Jay i Ricordi, 2011). U ovoj studiji je po prvi put pokazano citoprotektivno dejstvo metanolnog ekstrakta origana na beta ćelije pankreasa koje je sačuvao od apoptoze izazvane citokinima. U literaturi se može naći podatak o proapoptotskom dejstvu origana (Savini i sar, 2009).

Međutim, uočeno citotoksično dejstvo etanolnog ekstrakta origana u tom radu bilo je specifično isključivo za tumorske ćelije kancera kolona, dok na zdrave ćelije nije delovao. Neslaganje u rezultatima ove dve studije dodatno se može pojasniti i činjenicom da su tumorske ćelije vrlo izmenjene raznim mutacijama, pa samim tim i odgovor na stimulus može biti različit u odnosu na neizmenjene ćelije. Beta ćelije pankreasa podležu apoptozi preko dejstva ROS i RNS ili citokinima posredovanog oštećenja mitohondrija što na kraju dovodi do isecanja proteina koje je indukovano

kaspazama (Padgett i sar, 2013; Vieira i sar, 1998). Uočeni citoprotektivni efekt metanolnog ekstrakta origana može biti povezan ili sa njegovim antioksidativnim dejstvom ili sa direktnim uticajem na apoptotske signalne puteve. Za nekoliko komponenti metanolnog ekstrakta origana pokazano je da inhibiraju indukciju apoptoze- ruzmarinska kiselina je inhibirala apoptozu mišićnih ćelija srca izazvanu adriamicinom (Kim i sar, 2005), a salvijanolična kiselina je zaštitila neuronske ćelije PC12 od apoptoze indukovane vodonik peroksidom direktnim dejstvom na kaspazu 3 (Liu i sar, 2007). U ovom istraživanju metanolni ekstrakt origana sačuvao je beta ćelije od citokinima indukovane apoptoze smanjenjem aktivnosti kaspaze 3, enzima koji seče vitalne ćelijske proteine u finalnoj fazi procesa apoptoze. Citoprotektivno dejstvo metanolnog ekstrakta origana uočeno je i u *in vivo* eksperimentima ove studije gde je pokazana povećana količina insulina u krvi životinja kao i broj beta ćelija pankreasa na histološkim preparatima u odnosu na VMDS, što sve zajedno govori o većoj brojnosti i funkciji beta ćelija kod životinja tretiranih metanolnim ekstraktom origana u odnosu na kontrolu.

Može se reći da je i etil-acetatni ekstrakt origana ispoljio citoprotektivno dejstvo i to u posrednom maniru, sprečavanjem infiltracije imunskih ćelija u pankreasna ostrvca.

Antioksidativna aktivnost origana je jedno od njegovih najviše ispitivanih dejstava (Cervato i sar, 2000). U ovom istraživanju pokazana je smanjena nitrozilacija pankreasnih ostrvaca tretiranih metanolnim ekstraktom origana. Nitrozilacija pankreasnih ostrvaca odražava oksidativni i nitrozativni stres kojima su izložene beta ćelije pankreasa a koji nastaje zbog povećanog prisustva reaktivnih vrsta kiseonika i azota kao posledica efektorskih mehanizama ćelija imunskog sistema (Cnop i sar, 2005). Smanjenja nitrozilacija pankreasnih ostrvaca nakon tretmana metanolnim dejstvom origana uočena u ovoj studiji može biti posledica antioksidativnog dejstva ekstrakta.

U nekoliko istraživanja je naglašeno da biljni ekstrakti bogati biofenolima mogu direktno delovati na metabolizam glukoze i ubrzati preuzimanje glukoze iz krvi u tkiva (Lemhadri i sar, 2004). Imajući u vidu da i metanolni i etil-acetatni ekstrakt u svom sastavu imaju biofenole, može se reći da je za uočene efekte na smanjenu incidencu DT1 odgovorno upravo direktno dejstvo biofenola na smanjenje glukoze u krvi.

Međutim, s obzirom da davanje metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta zdravim miševima nije uticalo na glikemije miševa, može se zaključiti da metanolni i etil-acetatni ekstrakti ne utiču na metabolizam glukoze kod miševa. Samim tim, uočeno antidijabetogeno dejstvo ekstrakata na DT1 je najverovatnije posredovano direktnim dejstvom na imunski sistem.

Postoji mali broj studija koje ispituju efekat ekstrakata origana ili ulja origana na imunski odgovor. Rezultati ove studije ukazuju na to da različiti ekstrakti origana imaju različite mehanizme kojima sprečavaju nastanak DT1. Dok metanolni ekstrakt origana ima vrlo određen efekat na imunski odgovor u smislu da je specifičan za T limfocite, naročito Th17 populaciju CD4<sup>+</sup> T limfocita, etil-acetatni ekstrakt ostvaruje svoj efekat na makrofage i sve populacije T limfocita.

Dalja ispitivanja imala su za cilj potragu za aktivnim principom ili principima zaslužnim za uočena antidijabetogena dejstva metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta origana. Odabrani su ruzmarinska kiselina, salvijanolična kiselina i karvakrol, s obzirom na to da su najzastupljeniji u datim ekstraktima i da je njihovo antiinflamacijsko dejstvo već pokazano u ranijim studijama.

Ruzmarinska kiselina je fenolsko jedinjenje koje predstavlja estar kafeinske kiseline i 3,4- dihidroksifenillaktičke kiseline (Liang i sar, 2016). Ruzmarinska kiselina je u ovoj studiji pokazala imunomodulatorno dejstvo u *in vitro* uslovima. Antiinflamacijsko dejstvo ruzmarinske kiseline na makrofage u skladu je sa istraživanjima drugih autora u kojima je pokazano da je ruzmarinska kiselina smanjila LPS-om indukovanu produkciju NO makrofaga mišje ćelijske linije RAW 264.7 (So i sar, 2016). Imunomodulatorno dejstvo ruzmarinske kiseline na T limfocite *in vitro* u skladu je sa zapaženim dejstvom metanolnog ekstrakta origana. Međutim, *in vivo* tretman ruzmarinskom kiselinom je bio značajno manje povoljan u sprečavanju razvoja DT1 u odnosu na metanolni ekstrakt origana. Ovo može biti posledica doze korišćene u *in vivo* istraživanju. Međutim, u studiji koja je ispitivala uticaj ruzmarinske kiseline na cerebralnu ishemiju kao posledicu toksičnog dijabetesa pokazano je da je ruzmarinska kiselina imala anti-inflamacijski efekat bez uticaja na glikemiju eksperimentalnih životinja (Luan i sar, 2013). Na osnovu ovih podataka može se pretpostaviti da ruzmarinska kiselina verovatno nije samostalni aktivni princip metanolnog i etil-

acetatnog ekstrakta origana, i da ako učestvuje u pozitivnim efektima ekstrakata origana na DT1 to ostvaruje u kombinaciji sa jednom ili više supstanci.

Salvijanolična kiselina je supstanca sa potvrđenim anti-inflamacijskim efektom (Ding i sar, 2016 ) koji je uočen i u ovom istraživanju u *in vitro* modelu u kom je salvijanolična kiselina prevashodno delovala na funkciju makrofaga. Međutim, u *in vivo* eksperimentima salvijanolična kiselina nije uspela da spreči nastanak DT1, čak je potencirala hiperglikemiju u određenim vremenskim tačkama, što sugeriše da ova supstanca nije aktivni princip ekstrakta origana. Moguće je da razlog neuspeha salvijanolične kiseline u *in vivo* tretmanu DT1 leži u samoj dozi salvijanolične kiseline koja je primenjena, s obzirom na to da postoje neki radovi kod kojih je antihiperglikemično dejstvo salvijanolične kiseline zapaženo u nižim dozama od doze primenjene u ovoj studiji (Qiang i sar, 2015).

Karvakrol, koji je obilno zastupljen u etil-acetatnom ekstraktu origana, pokazao je imunomodulatorno dejstvo *in vitro* na humanoj Jurkat T ćelijskoj liniji (Gholijani i sar, 2015). Slično dejstvo na limfocite pokazano je i u ovom istraživanju, gde je karvakrol smanjio sekreciju inflamacijskih IFN- $\gamma$  i IL-17. Međutim, *in vivo* tretman karvakrolom ne samo da nije sprečio nastanak DT1 već je i potencirao razvoj bolesti, iz čega se može zaključiti da karvakrol nije aktivni princip etil-acetatnog ekstrakta origana. Ipak, uloga karvakrola u uočenim dejstvima etil-acetatnog ekstrakta origana ne može se u potpunosti odbaciti, s obzirom na to da podaci iz literature pokazuju ulogu karvakrola u inhibiciji autoimunskog artritisa (Spiering i sar, 2012). Moguće je da je karvakrol antibakterijskim dejstvom (Xu i sar, 2008) doveo do promene crevne mikrobiote prilikom oralne administracije. Promenjena crevna mikrobiota povezana je sa patogeneom DT1 (Knip i Siljander, 2016), pa je moguće da je uočeno dejstvo karvakrola na potenciranje DT1 zapravo posledica oralnog načina administracije.

Imajući u vidu da nijedna od supstanci u sastavu ekstrakata koje su ispitivane u ovom istraživanju nije samostalno pokazala efekte koji bi dovoljno dobro mogli da objasne uočeno protektivno dejstvo ekstrakata na razvoj DT1, može se pretpostaviti da je u ekstraktima prisutno više aktivnih supstanci koje udruženim dejstvom deluju na razvoj autoimunskog dijabetesa. Koje su aktivne supstance odgovorne za protektivne efekte ekstrakata origana je nešto što je vredno budućih istraživanja.

Autoimunski dijabetes je bolest koja predstavlja veliki izazov, kako za pojedinca tako i za društvo u celini. I pored značajnih napora uložениh u kreiranje novih terapijskih pristupa u lečenju ove bolesti, uzimanje egzogenog insulina ostaje norma u pokušaju ublažavanja posledica DT1. Doživotno uzimanje insulina može dovesti do neželjenih posledica poput bubrežnih i očnih oboljenja, hipoglikemične kome. Osim što ove komplikacije predstavljaju rizik po zdravlje pacijenta, one ujedno i smanjuju kvalitet života. Takođe, doživotan unos insulina predstavlja i ekonomsko opterećenje. S obzirom na to da je DT1 imunoinflamacijsko oboljenje, kao pristup lečenju ove bolesti korišćeni su razni anti-inflamacijski pristupi koji su do sada, nažalost, imali vrlo malo uspeha. Potraga za uspešnim tretmanima je i dalje u toku.

Biljke i njihovi ekstrakti predstavljaju prirodan izvor supstanci koje mogu imati različita dejstva na ljudski organizam. U ovoj studiji je po prvi put pokazano citoprotektivno i imunomodulatorno dejstvo metanolnog ekstrakta origana, koji je sprečio razvoj DT1 kod životinja direktnim dejstvom na Th17 limfocite i pomeranjem balansa od destruktivnog Th1/Th17 imunskog odgovora ka protektivnom Th2/Treg imunskom odgovoru. Takođe, etil-acetatni ekstrakt origana sprečio je nastanak DT1 umirivanjem M1/Th1/Th17 imunskog odgovora, kao i pomeranjem odgovora makrofaga ka antiinflamacijskom M2 odgovoru. Implikacije ovog istraživanja mogu biti značajne za dalji razvoj terapija u lečenju DT1. Prednosti korišćenja ekstrakata origana u lečenju DT1 su mnoge. Origano je lako dostupan, a sama ekstrakcija nije skup proces. S obzirom na to da je origano prisutan u ishrani ljudi milenijumima, a bez nekih neželjenih efekata po zdravlje, može se reći da je njegova upotreba bezbedna. Takođe, jedna od velikih prednosti ekstrakata, a koja se pokazala i u ovom istraživanju, je u tome što supstance koje ih čine mogu međusobno da reaguju i da takvim, sinergističkim efektom, generalno ostvare povoljnije dejstvo na organizam nego u slučaju unošenja pojedinačnih supstanci u njihovom sastavu.

Ovi rezultati čine ekstrakte origana pogodnim kandidatima za potencijalni tretman DT1, kako u preventivnim strategijama tako i u kombinovanim terapijskim pristupima.

# **6. Zaključci**



Na osnovu dobijenih rezultata može se izvesti nekoliko zaključaka:

1. Metanolni vodeni i etil-acetatni ekstrakt origana su pokazali anti-inflamacijsko dejstvo *in vitro* na makrofage i limfocite.
2. Metanolni ekstrakt origana delovao je citoprotektivno na beta ćelije pankreasa *in vitro*.
3. Metanolni i etil-acetatni, ali ne i vodeni ekstrakt origana, sprečili su razvoj DT1 u profilaktičkom režimu kod C57BL/6 miševa kod kojih je dijabetes indukovao VMDS.
4. Terapijski režim davanja metanolnog ekstrakta origana doveo je do kratkotrajnog povoljnog efekta na razvoj DT1.
5. Metanolni ekstrakt origana sprečio je nastanak DT1 direktnim inhibitornim uticajem na Th17 ćelijsku populaciju u slezini i drenirajućim limfnim čvorovima putem smanjenja mehanizama fosforilacije STAT3 i p38, a stimulacijom Th2 imunskog odgovora u slezini, drenirajućim limfnim čvorovima i mononuklearnim pankreasnim infiltratima.
6. Etil-acetatni ekstrakt origana sprečio je nastanak DT1 inhibicijom M1/Th1/Th17 imunskog odgovora i stimulacijom protektivnog M2 imunskog odgovora.
7. Karvakrol, salvijanolična kiselina i ruzmarinska kiselina, iako su pokazali anti-inflamacijsko dejstvo *in vitro*, nisu sprečili nastanak DT1 *in vivo*.

# **7. Literatura**

1. Abbas, Abul. *Basic Immunology*. Elsevier 2006; ISBN 978-1-4160-2974-8.
2. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278,1910–1914.
3. Anderson RP, van Heel DA, Tye-Din JA, Barnardo M, Salio M, Jewell DP and Hill AVS. T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut* 2005; 54(9):1217-1223.
4. Anderson, M. S. & Bluestone, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:447–485.
5. Arvan P, Pietropaolo M, Ostrov D, Rhodes CJ. Islet autoantigens: structure, function, localization, and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2.
6. Augustin Scalbert, Ian T Johnson, and Mike Saltmarsh. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* January 2005; 81(1): 215S-217S.
7. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151–6.
8. Baharlou R, Ahmadi-Vasmehjani A, Davami MH, Faraji F, Atashzar MR, Karimipour F, Sadeghi A, Asadi MA, Khoubyari M. Elevated levels of T-helper 17-associated cytokines in diabetes type I patients: indicators for following the course of disease. *Immunol Invest* 2016; 9: 1-11.
9. Barrett, J.C. et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2009; 41: 703–707.
10. Blazevski J, Petkovic F, Momcilovic M, Jevtic B, Mostarica Stojkovic M, Miljkovic D. Tumor necrosis factor stimulates expression of CXCL12 in astrocytes. *Immunobiology* 2015; 220:340 845–50.
11. Bluestone J, Herold K & Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010; 464: 1293-1300.
12. Bonifacio E. Predicting type 1 diabetes using biomarkers. *Diabetes Care* 2015; 38: 989–96.

13. Boonyarikpunchaia W, Sukrongb S, Towiwat P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 124: 67–73.
14. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; 2: 1279–83.
15. Burren OS, Adlem EC, Achuthan P, Christensen M, Coulson RM, Todd JA. T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. *Nucleic acids res* 2011; 39: D997-1001.
16. Burt SA, Reinders RD. Anti-bacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36: 162–167.
17. Burton AR, Vincent E, Arnold PY, Lennon GP, Smeltzer M, Li CS, Haskins K, Hutton J, Tisch RM, Sercarz EE, Santamaria P, Workman CJ, Vignali DA. On the pathogenicity of autoantigen-specific T-cell receptors. *Diabetes* 2008; 57: 1321–1330.
18. Byun EB, Sung NY, Byun EH, Song DS, Kim JK, Park JH, Song BS, Park SH, Lee JW, Byun MW, Kim JH. The procyanidin trimer C1 inhibits LPS-induced MAPK and NF- $\kappa$ B signaling through TLR4 in macrophages. *Int Immunopharmacol* 2013; 15 (2): 450-6.
19. Cervato G, Carabelli M, Gervasio S, Cittera A, Cazzola R and Cestaro B. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. *J Food Biochem* 2000; 24: 453–465.
20. Chen CY, Li H, Yuan YN, Dai HQ, Yang B. Antioxidant activity and components of a traditional Chinese medicine formula consisting of *Crataegus pinnatifida* and *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 99.
21. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875–1886.
22. Citro A, Valle A, Cantarelli E, Mercalli A, Pellegrini S, Liberati D, Daffonchio L, Kastsuchenka O, Ruffini PA, Battaglia M, Allegretti M, Piemonti L.

- CXCR1/2 inhibition blocks and reverses type 1 diabetes in mice. *Diabetes* 2015; 64: 1329-40.
23. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: Many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; 54(suppl 2):S97–S107.
  24. Coccimiglio J, Alipour M, Jiang ZH, Gottardo C, Suntres Z. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxid Med Cell Long* 2016; 2016: 8.
  25. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, Greissl C, Ramos-Lopez E, Hyppönen E, Dunger DB, Spector TD, Ouweland WH, Wang TJ, Badenhop K, Todd JA. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 1624–1631.
  26. Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatr Diabetes* 2013; 14: 149–158.
  27. Crozier A, Yokota T, Jaganath IB, Marks S, Saltmarsh M, and Clifford MN. Secondary metabolites as dietary components in plant-based foods and beverages. In: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, edited by Crozier A, Clifford MN, and Ashihara H. Oxford: Blackwell Publishing, 2006, pp. 208–302.
  28. Cvjetičanin T, Miljković D, Stojanović I, Dekanski D and Stošić-Grujičić S. Dried leaf extract of *Olea europaea* ameliorates islet-directed autoimmunity in mice. *Br J Nutr* 2010; 103 (10): 1413–1424.
  29. Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z, Hu J, Shao Z, Pleass RJ. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol Med* 2012; 4( 10): 1015-28.
  30. de Lemos ML. Effects of Soy Phytoestrogens Genistein and Daidzein on Breast Cancer Growth. *Ann Pharmacother* 2001; 35 (9): 1118–21.
  31. Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, Cohen H, Gresser I, Bedossa P, Bach JF. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmun* 1991; 4: 237–48.

32. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G and Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18 (14).
33. Devendra D, Jasinski J, Melanitou E, Nakayama M, Li M, Hensley B, Paronen J, Moriyama H, Miao D, Eisenbarth GS, Liu E. Interferon- $\alpha$  as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 2549–2556.
34. Di Lorenzo TP & Serreze DV. The good turned ugly: immunopathogenic basis for diabetogenic CD8<sup>+</sup>T cells in NOD mice. *Immunol Rev* 2005; .204:250–263.
35. Diaz-Gerevini GT, Repposi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* 2016; 32 (2): 174-8.
36. Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. I Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 1987; 139: 1902–1910.
37. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 633-52.
38. Ding C, Zhao Y, Shi X, Zhang N, Zu G, Li Z, Zhou J, Gao D, Lv L, Tian X, Yao J. New insights into salvianolic acid A action: Regulation of the TXNIP/NLRP3 and TXNIP/ChREBP pathways ameliorates HFD-induced NAFLD in rats. *Sci Rep* 2016; 27 (6):28734.
39. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P: Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5115–5120.
40. Driver JP, Chen YG, Mathews CE. Comparative genetics: synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud* 2012; 9: 169-87.

41. Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopath* 2011; 33: 67-87.
42. Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol* 2002; 82: 97–103.
43. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001; 44 :2115-2133.
44. Eizirik DL, Sammeth M, Bouckenoghe T, Bottu G, Sisino G, Igoillo-Esteve M, Ortis F, Santin I, Colli ML, Barthson J, Bouwens L, Hughes L, Gregory L, Lunter G, Marselli L, Marchetti P, McCarthy MI, Cnop M. The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet* 2012; 8, e1002552.
45. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009; 58 (6): 1302-11.
46. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy. PHLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 2008; 57 (4): 1084-1092.
47. Evans J S, Gerittsen GC, Mann K M and Owen SP. Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, U-15,774. *Cancer Chemother Rep* 1965; 48: 1-6.
48. Evans-Molina C, Hatanaka M, Mirmira RG. Lost in translation: endoplasmic reticulum stress and the decline of  $\beta$ -cell health in diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15:159 – 69.
49. Ezhumalai M, Radhiga T & Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of carvacrol in combination with rosiglitazone in high-fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. *Mol Cell Biochem* 2014; 385: 23.

50. Flodstrom M, Tyrberg B, Eizirik DL, Sandler S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 706-13.
51. Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M. Treatment of diabetes in the mouse model by delphinidin and cyanidin hydrochloride in free and liposomal forms. *Planta Med* 2013; 79(17): 1599-1604.
52. Gholijani N, Gharagozloo M, Kalantar F, Ramezani A, Amirghofran Z. Modulation of cytokine production and transcription factors activities in human jurkat T cells by thymol and carvacrol. *Adv Pharm Bull* 2015; 5 (Suppl 1): 653-660.
53. Giancchetti E, Fierabracci A. Gene/environment interactions in the pathogenesis of autoimmunity: New insights on the role of Toll-like receptors. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 971-83.
54. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertocelli L, Cooper EL, Cossarizza A. et al. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011:591356.
55. Giovanna Beauchamp & Michael J. Haller. Can we prevent type 1 diabetes? *Curr Diab Rep* 2015; 15: 86.
56. Goldwasser J, Cohen PY, Lin W, Kitsberg D, Balaguer P, Polyak SJ, Chung RT, Yarmush ML, Nahmias Y. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J Hepatol* 2011; 55 (5): 963-971.
57. González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51 (4): 331-62.
58. Gormaz JG, Quintremil S and Rodrigo R. Cardiovascular disease: a target for the pharmacological effects of quercetin. *Curr Top Med Chem* 2015; 15(17): 1735-42.
59. Goun E, Cunningham G, Krasnykch O, Miles H. Anti-thrombin activity of some constituents from *Origanum vulgare*. *Fitoterapia* 2002; 73: 692–694.



60. Greeley SA, Katsumata M, Yu L, Eisenbarth GS, Moore DJ, Goodarzi H, Barker CF, Najj A, Noorchashm H. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nature Med* 2002; 8: 399–402.
61. Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Picarella DE, Janeway CA Jr, Flavell RA. Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med* 1996; 184: 1963-74.
62. Guerreiro S, Monteiro R, Calhau C, Azevedo I and Soares R. Naringenin inhibits cell growth and migration in human breast cancer cell lines. *The FASEB Journal* 2007; 21: 848.5.
63. Haiyun Luan, Zechun Kan, Yong Xu, Changjun Lv and Wanglin Jiang. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response. *J Neuroinflammation* 2013; 10:28.
64. Hakonarson H, Grant S. Genome-wide association studies (GWAS): impact on elucidating the aetiology of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27(7): 685–696.
65. Han B, Serra P, Yamanouchi J, Amrani A, Elliott JF, Dickie P, Diloranzo TP, Santamaria P. Developmental control of CD8 T cell-avidity maturation in autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1879–1887.
66. Hanafusa T, Miyagawa J, Nakajima H, Tomita K, Kuwajima M, Matsuzawa Y, Tarui S. The NOD mouse. *Diabetes res clin pract* 1994; 24 Suppl: S307-11.
67. Herr RR, Eble TE, Bergy ME & Jahnke HK. *Antibiot Annu* 1959-1960; 236-240.
68. International Diabetes Federation 2015. *IDF DIABETES ATLAS*, Seventh edition Online version (<http://www.idf.org/diabetesatlas> ), ISBN: 978-2-930229-81-2, (pristup stranici u avgustu 2016).
69. Jaganath IB and Crozier A. Overview of health promoting compounds in fruits and vegetables. In: *Phenolic Compounds of Plant Origin and Health: The Biochemistry Behind Their Nutritional and Pharmacological Value*, edited by

- Fraga C. Chichester, United Kingdom: Wiley 2009; 1–48. ISBN: 9781845691844.
70. Jayasimhan A, Mansour KP, Slattery RM. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clin sci* 2014; 126:1-18.
71. Jeker LT, Bour-Jordan H, Bluestone JA. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2 (3): a007807.
72. 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; 59 (20): 11287-93.
73. Kim DS, Kim HR, Woo ER, Hong ST, Chae HJ, Chae SW. Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1066–1078.
74. King A and Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol* 2016; 1 (99): 1-10.
75. Kingston HGM. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2636–2649.
76. Knip M and Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12 (3): 154-67.
77. Knip M, Akerblom HK, Becker D, Dosch H-M, Dupre J, Fraser W, et al. Hydrolyzed infant formula and early  $\beta$ -cell autoimmunity: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 311: 2279–87.
78. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3(+) T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014; 20: 62–68.
79. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485–517.

80. Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu HJ, Benoist C, Mathis D. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 11548–11553.
81. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 443–452.
82. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371–381.
83. Lemhadri A, Zeggwagh NA, Maghrani M, Jouad H, Eddouks M. Antihyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 251–256.
84. Levetan CS, Upham LV, Deng S, Laury-Kleintop L, Kery V, Nolan R, Quinlan J, Torres C, El-Hajj RJ. Discovery of a human peptide sequence signaling islet neogenesis. *Endocr Pract* 2008; 14: 1075–1083.
85. Liu CS, Chen NH & Zhang JT. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *Radix Salviae miltiorrhizae*. *Phytomedicine* 2007; 14: 492–497.
86. Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P & Nerup J. Long-term risk of IDDM in first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetology* 1994; 37: 321–327.
87. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 (1): 265-75.
88. Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunolo* 1998; 6: 119-28.
89. Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity* 2010; 32: 488-99.
90. Maahs D M & Rewers M. Editorial: mortality and renal disease in type 1 diabetes mellitus—progress made, more to be done. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3757–3759.

91. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu* 1980; 29: 1-13.
92. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231–234.
93. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25 (12): 677-86.
94. Martinez SE, Davies NM, Reynolds JK. "Toxicology and Safety of Flavonoids". *Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology*. John Wiley & Son. 2013; p. 257. ISBN 978-0-470-57871-1.
95. Martin-Pagola A, Sisino G, Allende G, Dominguez-Bendala J, Gianani R, Reijonen H, Nepom GT, Ricordi C, Ruiz P, Sageshima J, Ciancio G, Burke GW, Pugliese A. Insulin protein and proliferation in ductal cells in the transplanted pancreas of patients with type 1 diabetes and recurrence of autoimmunity. *Diabetologia* 2008; 51: 1803–1813.
96. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamisi M, Wei X, Lukic ML. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. *Eur J Immunol* 2006; 36: 216–223.
97. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1978; 1: 57–60.
98. Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1996; 184:1093–9.
99. Mujtaba MA, Fridell J, Book B, Faiz S, Sharfuddin A, Wiebke E, et al. Re-exposure to beta cell autoantigens in pancreatic allograft recipients with preexisting beta cell autoantibodies. *Clin Transplant* 2015; 29: 991–6.
100. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, Queipo-Ortuño MI. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med* 2013; 11: 46.

101. Nakatani N. Phenolic anti-oxidants from herbs and spices. *Biofactors* 2003; 141–146.
102. Nakhoda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 1977; 26: 100-12.
103. Nicolls MR, Haskins K & Flores SC. Oxidant stress, immune dysregulation, and vascular function in type I diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 879–889.
104. Nokoff N, Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1281: 1–15.
105. Ocana-Fuentes A, Arranz-Gutierrez E, Senorans FJ, Reglero G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1568–1575.
106. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1281: 16–35.
107. Padgett LE, Burg AR, Lei W, Tse HM. Loss of NADPH oxidase–derived superoxide skews macrophage phenotypes to delay type 1 diabetes. *Diabetes* 2015; 64: 937–46.
108. Palmer J, Asplin C, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu P, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 1983; 222: 1337–9.
109. Peakman M, Dayan CM. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune disease: fighting fire with fire? *Immunology* 2001; 104 (4): 361-6.
110. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 2006; 6 (5 Pt 1): 859-66.
111. Piemonti L, Everly MJ, Maffi P, Scavini M, Poli F, Nano R, Cardillo M, Melzi R, Mercalli A, Sordi V, Lampasona V, Espadas de Arias A, Scalapogna M, Bosi E, Bonifacio E, Secchi A, Terasaki PI. Alloantibody and autoantibody

- monitoring predicts islet transplantation outcome in human type 1 diabetes. *Diabetes* 2013; 62: 1656–64.
112. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6 (2): 99-104.
  113. Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunology today* 1993; 14: 193-6.
  114. Pozzilli P. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 69e84.
  115. Prasad S, Kohm AP, McMahon JS, et al. Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9--23 epitope and involves functional epitope spreading. *J Autoimmun* 2012; 39 (4): 347-53.
  116. Qiang G, Yang X, Shi L, Zhang H, Chen B, Zhao Y, Zu M, Zhou D, Guo J, Yang H, Zhang L, Du G. Antidiabetic effect of salvianolic acid A on diabetic animal models via AMPK activation and mitochondrial regulation. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36: 395-408.
  117. Rabin DU, Pleasic SM, Palmer-Crocker R, Shapiro JA. Cloning and expression of IDDM- specific human autoantigens. *Diabetes* 1992; 41: 183–6.
  118. Rakieten N, Gordon BS, Cooney DA, Davis RD & Schein PS. Renal tumorigenic action of streptozotocin (NSC-85998) in rats. *Cancer Chemother Rep* 1968; 52: 563-567.
  119. Rakieten N, Rakieten ML & Nadkarni MR. Toxicologic and pharmacologic evaluation of phleomycin including special studies on its nephrotoxicity. *Cancer Chemother Rep* 1963; 29: 91-98.
  120. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993; 178: 87–99.
  121. Rhee K-J, Lee CG, Kim SW, Gim D-H, Kim H-C, Jung BD. Extract of *Ginkgo Biloba* ameliorates streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus and high-fat diet-induced type 2 diabetes mellitus in mice. *Int J Med Sci* 2015; 12 (12): 987-994.

122. Rigby MR, DiMeglio LA, Rendell MS, et al. Targeting effector memory T cells with alefacept in new onset type 1 diabetes: 12 month results from the T1DAL study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013; 1 (4): 284-94.
123. Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74 (6): 2485-2489.
124. Runtuwene J, Cheng KC, Asakawa A, Amitani H, Amitani M, Morinaga A, Takimoto Y, Kairupan BH, Inui A. Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10: 2193-2202.
125. Sandler S, Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets *in vitro*. *Diabetologia* 1983; 25: 444-7.
126. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell* 1988; 52: 773-82.
127. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011; 8 (1): 1-10.
128. Savini I, Arnone R, Catani MV and Avigliano L. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer Caco2 cells. *Nutr Cancer* 2009; 61 (3): 381-389.
129. Shao S, He F, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell Immunol* 2012; 280 (1): 16-21.
130. Sherry N, Hagopian W, Ludvigsson J, et al. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protege study): 1-year results from a randomised, placebo controlled trial. *Lancet* 2011; 378 (9790): 487-97.
131. Shukla S, Gupta S. Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharm res* 2010; 27 (6): 962-978.
132. Silva F, Guimarães A, Silva E, Sousa-Neto B, Machado F, Quintans-Júnior L, Arcanjo D, Oliveira F and Oliveira R. Anti-inflammatory and anti-

- ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *J Med Food* 2012; 15 (11): 984-991.
133. Skelin M , Rupnik M, Cencič A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altex* 2010; 27 (2): 105-13.
  134. Skyler J and Ricordi C. Stopping type 1 diabetes: attempts to prevent or cure type 1 diabetes in man. *Diabetes* 2011 Jan; 60(1): 1–8.
  135. Skyler JS, Ricordi C. Stopping Type 1 Diabetes: Attempts to prevent or cure type 1 diabetes in Man. *Diabetes*. 2011; 60 (1):1-8.
  136. Sorrenti V, Vanella L, Acquaviva R, Cardile V, Giofrè S & Di Giacomo C. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2015; 47: 1303-1310.
  137. Spencer JPE and Crozier A (eds.) In: *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function. Oxidative Stress and Disease*, Vol. 30, edited by Packer L and Cadenas H. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012. ISBN 9781439848265.
  138. Spiering R, van der Zee R, Wagenaar J, Kapetis D, Zolezzi F, van Eden W, Broere F. Tolerogenic dendritic cells that inhibit autoimmune arthritis can be induced by a combination of carvacrol and thermal stress. *PLoS One* 2012; 7 (9): e46336.
  139. Steck AK and Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem* 2011; 57: 176–185.
  140. Steffes MW et al. (EDIC Research Group). Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *J Am Med Assoc* 2003; 290: 2159–2167.
  141. Steinman L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T-cell mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13: 139–45.
  142. Suarez-Pinzon WL, Power RF, Yan Y, Wasserfall C, Atkinson M, Rabinovitch A. Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes* 2008; 57: 3281–3288.



143. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2001; 50: 537-46.
144. Taylor C. Wallace. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr* January 2011; 2: 1-7.
145. Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 2010; 464: 1149–1154.
146. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Gen* 2007; 39 (7): 857–864.
147. Trudeau J, Dutz J, Arany E, Hill D, Fieldus W and Finegood D. Neonatal  $\beta$ -cell apoptosis. A trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 2000; 49: 1-7.
148. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med* 2003; 198: 1527–1537.
149. Ulasli SS, Celik S, Gunay E, Ozdemir M, Hazman O, Ozyurek A, Koyuncu T, Unlu M. Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14 (10): 6159-64.
150. Utset TO, Auger JA, Peace D, Bluestone JA, Clark MR. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol* 2002; 29: 1907-13.
151. Vauzelle-Kervroedan F, Delcourt C, Forhan A, Jouglu E, Hatton F, Papoz L. Analysis of mortality in French diabetic patients from death certificates: a comparative study. *Diabete Metab* 1999; 25: 404–411.
152. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2010; 2 (11): 1106-1131.

153. Velayutham P, Babu A, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr med chem* 2008; 15 (18): 1840-1850.
154. Venigalla M, Gyengesi E, Münch G. Curcumin and Apigenin – novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Neural Reg Res* 2015; 10 (8): 1181-1185.
155. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 565–573.
156. Von Herrath M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes* 2009; 58: 2–1.
157. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Orescanin-Dusic Z, Blagojevic D, Stosic-Grujicic S, Tzakos AG and Stojanovic I. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. *British Journal of Nutrition* 2015; 113 (5), 770–782.
158. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Vasic B, Stosic-Grujicic S, Gerothanassis I P, Tzakos AG and Stojanovic I. Ethyl Acetate Extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* Prevents Streptozotocin-Induced Diabetes in C57BL/6 Mice. *J Food Sci* 2016; 81: H1846–H1853.
159. Walker LSK and von Herrath M. CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2016; 183 (1): 16-29.
160. Wands JR, Podolsky DK, Isselbacher KJ. Mechanism of human lymphocyte stimulation by concanavalin A: role of valence and surface binding sites. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73(6):2118-2122.
161. Wang J, Zhang R, Xu Y, Zhou H, Wang B, Li S. Genistein inhibits the development of atherosclerosis *via* inhibiting NF- $\kappa$ B and VCAM-1 expression in LDLR knockout mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86 (11): 777-84.

162. Wang P, Xu S, Li W, Wang F, Yang Z, Jiang L, Wang Q, Huang M, Zhou P, Salvianolic acid B inhibited PPAR $\alpha$  expression and attenuated weight gain in mice with high-fat diet-induced obesity. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34: 288-298.
163. Weide LG & Lacy PE. Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes* 1991; 40: 1157–1162.
164. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455: 1109–1113.
165. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (43): 17040–17045.
166. Winter WE, Pittman D. The clinical application of islet autoantibody testing for the diagnosis of autoimmune diabetes. *MLO. Med Lab Obs* 2013; 45: 16, 20, 22 passim.
167. Woodle ES, Xu D, Zivin RA, et al. Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3g1 (Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1999; 68 (5): 608-16.
168. Xu J, Zhou, Ji BP, Pei RS and Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett App Micro* 2008; 47: 174–179.
169. Yangkang So, Seung Young Lee, Ah-Reum Han, Jin-Baek Kim, Hye Gwang Jeong and Chang Hyun Jin. Rosmarinic Acid methyl ester inhibits LPS-induced NO production via suppression of MyD88- dependent and -independent pathways and induction of HO-1 in RAW 264.7 Cells. *Molecules* 2016; 21 (8): 1083.
170. Yu K, Liu C, Kim BG, Lee DY. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol Adv* 2015; 33 (1): 155-64.
171. Zaccane P and Cooke A. Infectious triggers protect from autoimmunity. *Semin Immunol* 2011; 23: 122–129.

172. Zaccone P, Cooke A. Helminth mediated modulation of type 1 diabetes (T1D). *Int J Parasitol* 2013; 43:311–8.
173. Zhengmin Liang, Yangfeng Xu, Xuemei Wen, Haiying Nie, Tingjun Hu, Xiaofeng Yang, Xiao Chu, Jian Yang, Xuming Deng and Jiakang He. Rosmarinic acid attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Molecules* 2016; 21 (6): 769.
174. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967–974.
175. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455:627–632.
176. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Imm rev* 2010; 238 (1): 247-262.
- Zipris D, Lien E, Nair A, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP and Rossini AA. TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. *J Immunol* 2007; 178: 693–701.
177. Zipris D, Lien E, Nair A, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP and Rossini AA. TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. *J Immunol* 2007; 178: 693–701.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Milica Vujičić rođena je 24. aprila 1982. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine, studijsku grupu Molekularna biologija i fiziologija. Redovne studije završila je 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,60. Diplomski rad pod naslovom: „In vitro ispitivanje efekta interferona  $\alpha$ , genisteina i forbol 12-miristat 13-acetata na proliferaciju humanih tumorskih ćelijskih linija K562, HeLa i FemX“ uradila je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije pod neposrednim rukovodstvom Prof. dr Gordane Konjević i odbranila ga 28. decembra 2011. godine sa ocenom 10. Školske 2012/2013. godine upisala je prvu godinu doktorskih studija na modulu Imunobiologija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 1. marta 2012. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za imunologiju. Od momenta diplomiranja do zasnivanja radnog odnosa volontirala je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 19.03.2013. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Ivane Stojanović, a u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (br. 173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno radikalsku fiziologiju, a putem ovih i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Internacionalne unije imunoloških društava (International Union of Immunological Societies, IUIS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Milica Vujičić je učestvovala u organizaciji i realizaciji projekta promocije imunologije u Srbiji, u sklopu proslave svetskog dana imunologije (29.04.2016), na poziv IUIS, a na temu: „Imunoterapija“. Kampanja je nagrađena od strane IUIS kao kampanja sa najboljom temom.

Milica Vujičić je do danas učestvovala kao autor/koautor na 11 radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, ima 7 saopštenja na međunarodnim i 4 na domaćim naučnim skupovima.