



Efekti ekstrakta bele imele na markere aktivacije i agregacije trombocita

Srdić-Rajić Tatjana¹, Konić-Ristić Aleksandra², Tišma-Miletić Nevena¹, Kardum Nevena², Galun Danijel^{3,4}, Jelena Sikimić¹, Marija Glibetić², Milićević Miroslav^{3,4}

¹Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenje eksperimentalne onkologije

²Institut za medicinska istraživanja, Centar izuzetne vrednosti u oblasti ishrane i metabolizma, Univerzitet u Beogradu

³Klinika za digestivnu hirurgiju - Prva hirurška klinika KCS, Beograd

⁴Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

rezime **UVOD:** Preparati biljke *Viscum album* se intenzivno koriste kao komplementarna terapija u lečenju kancera. Mehanizmi antitumorskog delovanja, potvrđeni *in vitro*, uključuju citotoksično delovanje, indukciju apoptoze, inhibiciju angiogeneze, imunomodulatorno delovanje.

CILJ: Cilj ovog istraživanja je ispitivanje uticaja ekstrakta bele imele na funkciju trombocita i monocita kao važnih faktora u imunomodulaciji kancerskog procesa, metastatskom potencijalu i tumorskoj angiogenezi.

METODE: Uticaj različitih koncentracija ekstrakta bele imele na markere agonistom indukovane aktivacije trombocita i njihove agregacije sa leukocitima ispitivan je u krvi zdravih ispitanika (n=6) primenom protočne citometrije. Uticaj na markere LPS indukovane aktivacije određivan je u krvi ispitanika i kulturi THP-1 ćelija korišćenjem ELISA eseja i protočne citometrije.

REZULTATI: Ekstrakt imele značajno inhibira ekspresiju P-selektina i trombocitno-monocitnu agregaciju. Pokazana stimulacija produkcije TNF-a u LPS-om aktiviranim monocitima dodatno doprinosi antitumorskom potencijalu.

ZAKLJUČAK: Dobijeni rezultati potvrđuju potencijal ekstrakta imele da modulira trombocitnu i monocitnu funkciju, kao deo pleotropnog antitumorskog delovanja.

Ključne reči: *Viscum album*, trombociti, P-selektin, monociti

UVOD

Bela imela (lat. *Viscum album*) je poluparazitska biljka iz familije Viscaceae (Loranthaceae). Poreklom je iz Evrope, zapadne i južne Azije. Raste u krošnjama različitih vrsta drveća (jabuka, bor, jela, javor, brest, breza) kao zimzeleni žbun sveričnog oblika. Najznačajnije i

najintenzivnije proučavane biološki aktivne komponente bele imele su lektini i viskotoksini¹⁻³. Ova biljka predstavlja i značajan biološki izvor i drugih farmakološki aktivnih komponenti, pre svega: drugih proteina malih molekulskih masa, oligo i polisaharida, flavonoida, triterpenskkih kiselina i dr.⁴⁻¹⁰. Dugi niz godina komercijalni ekstrakti bele imele se koriste kao komplementarna alternativna terapija (KAM) za pacijente obolelele od kancera^{11,12}. Terapeutska korist ekstrakta bele imele u različitim oboljenjima zavisi od postupka pripreme, odnosa različitih bioaktivnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu, kao i od vrste drveta domaćina na kome je imela rasla.

Veliki broj *in vitro* studija je pokazao da je antikancersko dejstvo ekstrakta bele imele zasnovano na indukciji apoptoze tumorskih ćelija, inhibiciji ćelijske proliferacije, kao i inhibiciji procesa angiogeneza¹³⁻²⁰. Kliničke studije su pokazale da adjuvantni tretman bolesnika obolelih od kancera preparatima bele imele kada se koriste zajedno sa hemioterapijom, radioterapijom ili operativnim lečenjem, doprinosi ukupnom poboljšanju kvaliteta života²¹⁻³⁰. Bioaktivne komponente bele imele pokazuju i imunostimulatorno dejstvo u interakciji sa ćelijskim i humoralnim komponentama imunog sistema i na taj način potencirajući antitumorski imunološki odgovor^{5-7,31-35}. Uprkos njihovoj upotrebi u poslednjih nekoliko decenija, precizni mehanizmi povezani sa antitumorskim efektima biljke bele imele nisu u potpunosti poznati.

Rezultati brojnih epidemioloških studija i brojnih eksperimenata u *in vitro* uslovima i na animalnim modelima pokazuju da trombociti imaju veliki značaj u patogenezi i progresiji malignih bolesti. Aktivacija trombocita, prisutna kod malignih bolesti, posredovana je trombinom koji oslobađaju maligne ćelije, ADP-om poreklom iz malignih ćelija ili trombocita, i tromboksanom A2 iz trombocita. Trombin, prisutan na površini

aktiviranih trombocita, stimuliše njihovu aktivaciju i agregaciju sa malignim ćelijama, posredovanu pre svega P-selektinom, ali i GPIIb-IIIa, fibronektinom i vWF-om (von Willebrand factor). Sekvestracija trombocita omogućava malignim ćelijama da izbegnu mehanizme imunološke kontrole tumorskog procesa i dodatno doprinosi njihovom metastatskom potencijalu. Uloga trombocita u rastu tumora i njegovom metastatskom potencijalu poznata je dugi niz godina, podržana studijama koje su pokazale inhibiciju rasta tumora i inhibiciju metastaziranja smanjenjem broja trombocita^{36,37}.

Aktivirani trombociti oslobađaju faktore rasta tumora (PDGF) i faktore angiogeneze (VEGF i angiopoetin-1). Pored VEGF koji se smatra odgovornim za povećanje permeabilnosti endotela važnu ulogu imaju i integrini i glikoproteini, a pre svega P-selektin koji se smatra primarnim medijatorom³⁸⁻⁴⁰. P-selektin eksprimiran na aktiviranim trombocitima i endotelnim ćelijama posreduje u vezivanju tumorskih ćelija i olakšava ekstravazaciju, mikrocirkulatorni zastoj i formiranje metastaza. Shodno tome, ekstravazacija tumorskih ćelija i njihov metastatski potencijal direktno je srazmeran njihovoj sklonosti da vezuju trombocite, odnosno da formiraju agregate⁴¹⁻⁴³.

Cilj ovih istraživanja je bio utvrditi potencijalni efekat bioaktivnih sastojaka bele imele na funkciju trombocita i njima posredovane međućelijske interakcije, kao i na aktivacioni status monocita/makrofaga u kulturi. Kao specifični markeri aktivacije trombocita praćeni su površinski antigeni (P-selektin i GPIIb-IIIa), koji predstavljaju ujedno i adhezione receptore kojim je posredovana homotipska, odnosno heterotipska agregacija trombocita. Uporedo sa delovanjem na aktivaciju, ispitan je i uticaj ekstrakta bele imele na formiranje heterotipskih agregata trombocita sa drugim krvnim ćelijama (monocitima i neutrofilima), koje je posredovano prvenstveno P-selektinom, ključnim molekulom za ulogu trombocita u procesu metastaze i angiogeneze. Dodatno, uticaj ekstrakta na funkciju monocita/makrofaga praćen je uporednim određivanjem više markera aktivacije monocot/makrofaga u kulturi nakon delovanja LPS-a: nivoa oksidativnih vrsta u ćelijama, ekspresije CD11b receptora na površini ćelija i nivoa TNF-a u supernatantu.

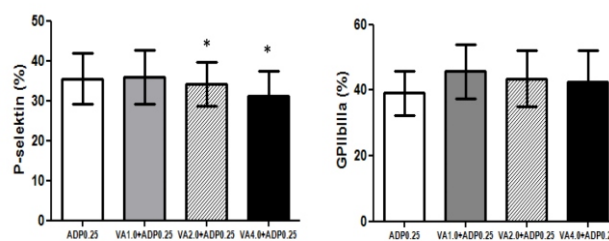
MATERIJAL I METODE

Ekstrakt bele imele

Ekstrakt bele imele je dobijen ultrazvučnom metodom. Lišće bele imele (*Viscum album*) je brano sa biljke koja raste na drvetu jabuke (*Malus domestica B.*) u zapadnom regionu Srbije. Vodeni ekstrakt je dobijen od sveže samlevenog lišća ultrazvučnom ekstrakcijom.⁴⁴

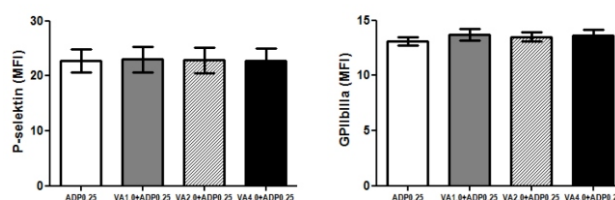
Ćelijske linije u kulturi

THP-1 ćelije akutne monocitne leukemije (American Type Culture Collection, Rockville, MD) su gajene u hranljivom medijumu (RPMI1640) uz dodatak penicilina (192 U/ml), streptomicina (200 µg/ml), HEPES (25 mM), L-glutamina (3 mM) i 10% fetalnog telećeg seruma



GRAFIKON 1
EFEKAT TRETMANA EKSTRAKTOM BELE IMELE NA EKSPRESIJU P-SELEKTINA I GPIIb-IIIa AKTIVIRANIH TROMBOCITA.

(Procenat P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 µM) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele-VA (1.0, 2.0 i 4.0 µg/mL ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu, određivan je metodom protočne citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD; Zvezdice predstavljaju statističku značajnost u odnosu na kontrolu (* p=0,05; Studentov t-test)



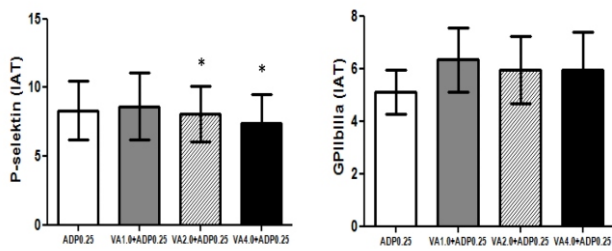
GRAFIKON 2
EFEKAT TRETMANA EKSTRAKTOM BELE IMELE NA RESPODELU GUSTINE P-SELEKTINA I GPIIb-IIIa NA AKTIVIRANIM TROMBOCITIMA.

(Gustina P-selektina i GPIIb-IIIa na pojedinačnim trombocitima nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 µM) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele-VA (1.0, 2.0 i 4.0 µg/mL ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu određivana je metodom protočne citometrije.

(FCS) (pH 7.2), na 37°C u 5% CO₂ u atmosferi povećane vlažnosti.

Određivanje sadržaja ukupnih protein i fenola

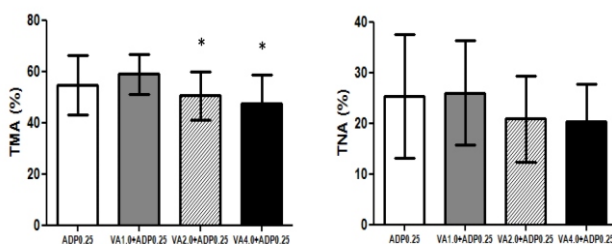
Sadržaj ukupnih proteina u vodenom ekstraktima bele imele određivan je spektrofotometrijski Bradford-ovom mikro metodom⁴⁵, a sadržaj ukupnih fenola reakcijom sa Folin Ciocalteu (FC) reagensom^{46,47}. Rezultati sadržaja fenola su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po gramu vodenog ekstrakta



GRAFIKON 3

UTICAJ EKSTRAKTA BELE IMELE NA INDEKS AKTIVACIJE TROMBOCITA (IAT) U ODNOSU NA P-SELEKTIN I GPIIb/IIIa.

(IAT u ukupnoj populaciji trombocita nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25 \mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele ($1.0, 2.0$ i $4.0 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu, određivan je metodom protočne citometrije.



GRAFIKON 4

EFEKAT EKSTRAKTA BELE IMELE NA PARAMETRE HETEROTIPSKE AGREGACIJE TROMBOCITA SA LEUKOCITIMA.

(Procenat agregata trombocita i monocita (TMA); i agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji monocita, odnosno neutrofila nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25 \mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele ($1.0, 2.0$ i $4.0 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu, određivan je metodom protočne citometrije.

Određivanje parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa leukocitima primenom protočne citometrije

Uzorkovanje krvi

Krv zdravih dobrovoljaca uzorkovana je u skladu sa standardnim protokolima za određivanje markera aktivacije trombocita i agregacije trombocita i leukocita metodom protočne citometrije^{48,49}, na tašte, u ranim jutarnjim časovima, nakon potpunog mirovanja u trajanju od najmanje 20 minuta. Uzorci krvi su korišćeni u daljoj analizi odmah po venepunkciji, uz minimalnu manipulaciju uzoraka, na sobnoj temperaturi.

Određivanje parametara aktivacije trombocita u in vitro eksperimentalnim uslovima

Aktivacioni status trombocita pod dejstvom ekstrakta bele imele određen je metodom protočne citometrije. Za ispitivanje delovanja ekstrakta bele imele u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, korišćena je modifikovana metoda Frelingera i sar.⁵⁰. Ukratko, alikvot razblažene krvi ($1:10$ u Hapes-Tyrode puferu, pH 7.4) inkubiran je sa različitim koncentracijama ($1.0; 2.0$ i 4.0 mg/mL ukupnih proteina) ekstrakta bele imele u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je obeležena anti-CD61-PerCP (trombocitni marker), anti-CD62P-PE (anti-P-selektin) i PAC1-FITC (anti-GPIIb-IIIa) antitelima i tretirana rastvorom ADP-a, kao agonistom aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od $0.25 \mu\text{M}$, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije uzorci su analizirani na protočnom citometru BD FACSCalibur koristeći Cell Quest program.

Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima- in vitro

Agregati trombocita sa monocitima TMA (eng. *platelet-monocyte aggregates, PMA*) i agregati trombocita sa neutrofilima, TNA (eng. *platelet-neutrophil aggregates, PNA*) određivani su korišćenjem pune krvi ispitanika po prethodno opisanim metodama^{49,51}. Puna krv tretirana je različitim koncentracijama ($1.0, 2.0$ i 4.0 mg/mL ukupnih proteina) ekstrakta bele imele na isti način kao i uzorci razblažene krvi pri analizi markera aktivacije trombocita. Po završetku inkubacije, alikvot pune krvi tretirane ispitivanim ekstraktom obeležen je anti-CD61-FITC, anti-CD11b-PE i anti-CD14-PerCP antitelima i tretiran rastvorom ADP-a, kao agonista aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od $0.25 \mu\text{M}$ 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Zatim su uzorci lizirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon fiksacije uzorci su analizirani na protočnom citometru BD FACSCalibur koristeći Cell Quest program.

Diferencijacija THP-1 ćelija

2.5×10^5 THP-1 ćelije/mL su tretirane vitaminom D3 pri koncentraciji od 100 nM , 72 sata. Nakon 72 sata tretmana ćelije su isprane dva puta RPMI 1640 medijumom, kako bi se odstranio vitamin D₃, i tako diferencirane ćelije su kasnije polarizovane LPS-om.

Određivanje aktivacije monocita u kulturi merenjem produkcije TNF α

0.5×10^5 THP-1 ćelije/otvoru mikrotitar ploče tretirane su u trajanju od 1 h na 37°C različitim koncentracijama ekstrakta bele imele ($2.0, 4.0, 8.0 \mu\text{g/mL}$), nakon čega su stimulisane sa $1 \mu\text{g/mL}$ LPS-a u trajanju od četiri sata na 37°C . Kao kontrola korišćene su netretirane nestimulisane THP-1 ćelije i tretirane nestimulisane THP-1 ćelije. Delovanje ekstrakata poređeno je sa netretiranim

THP-1 ćelijama stimulisanim delovanjem LPS-a. Nakon isteka četvoročasovne inkubacije nivo produkcije TNF- α u supernatantu određen je komercijalnim ELISA esejem (Biosciences,) u skladu sa protokolom proizvođača.

Određivanje aktivacije monocita/makrofaga u kulturi merenjem nivoa slobodnih kiseoničnih radikala i ekspresije CD11b

5×10^5 diferenciranih THP-1 ćelija tretirano ekstraktom bele imele u različitim koncentracijama (2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u trajanju od 1 h na 37°C , nakon čega su ćelije izložene delovanju 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS-a u periodu od 2 sata na 37°C . Nakon toga, ćelije isprane PBS-om inkubirane su 15 min anti-CD11b monoklonskim antitelom i sukcesivno bojene rastvorom dihlorofluorescein diacetata (DCFDA, 50 μM) 30 minuta inkubiranjem na 37°C . Ćelije su nakon toga isprane PBS-om i analizirane na BD FACS Calibur protočnom citometru, koristeći Cell Quest Pro kompjuterski softver.

REZULTATI

Uticaoj ekstrakta bele imele na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa

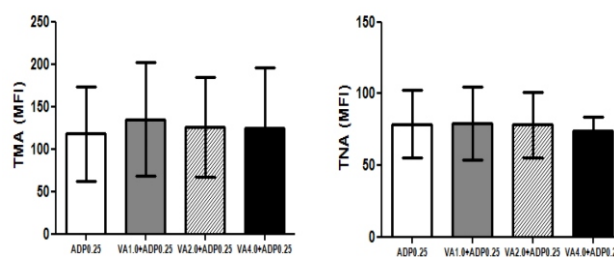
Uticaoj ekstrakta bele imele (1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa *in vitro*, ispitivan je u uzorcima krvi 6 zdravih ispitanika, nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 μM). Dobijeni rezultati, u uzorcima pune krvi tretirane ekstraktom bele imele, u odnosu na kontrolu tretiranu samo ADP-om, prikazani su na Grafikonu 1.

Prikazani rezultati, izraženi kao procenat trombocita koji eksprimira odgovarajuće aktivacione markere (P-selektin i GPIIbIIIa) u ukupnoj populaciji trombocita (20000 ispitivanih događaja), pokazuju da je ekstrakt bele imele u koncentracijama od 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina doveo do statistički značajnog smanjenja procenta P-selektin pozitivnih trombocita, tretiranih suboptimalnom koncentracijom ADP-a kao agoniste. Istovremeno pri ispitivanim koncentracijama ekstrakta nije pokazan efekat na procenat trombocita koji eksprimiraju GPIIbIIIa aktivacioni marker.

Pored procenta P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita određivana je i gustina ovih receptora na površini trombocita. Dobijeni rezultati, izraženi su kao geometrijska sredina intenziteta fluorescence ukupne populacije trombocita (eng. *mean fluorescence intensity, MFI*), koja je srazmerna prosečnoj gustini aktivacionih markera na pojedinačnom trombocitu prikazani su na Grafikonu 2.

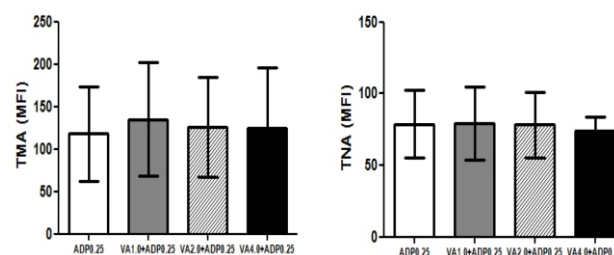
Pokazano je da smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita nije bilo praćeno smanjenjem gustine P-selektina. Istovremeno, nije uočeno delovanje ekstrakta bele imele na gustinu GPIIbIIIa.

Relativnu meru svih raspoloživih receptora na površini antigen-pozitivnih trombocita daje „indeks aktivacije trombocita“ - IAT (eng. *index of platelet activation, IPA*) kao proizvod udela antigen pozitivnih trombocita u analiziranoj populaciji trombocita i odgovarajuće MFI



GRAFIKON 5
EFEKAT EKSTRAKTA BELE IMELE NA RASPODELU GUSTINE TROMBOCITA NA MONOCITIMA I NEUTROFILIMA.

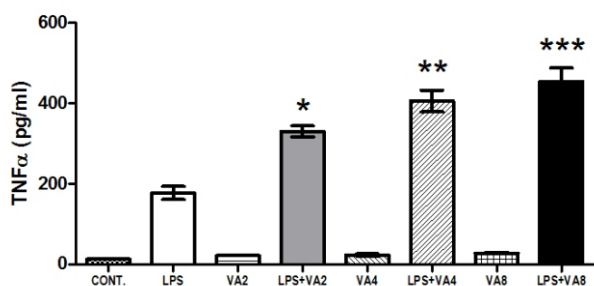
(Gustina trombocita na monocitima i neutrofilima u ukupnoj populaciji monocita, odnosno neutrofila nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 μM) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu, određivana je metodom protočne citometrije.



GRAFIKON 6
UTICAJ EKSTRAKTA BELE IMELE NA INDEKS AGREGACIJE TROMBOCITA (IAT) SA MONOCITIMA I NEUTROFILIMA.

Indeks agregacije trombocita (IAT) sa monocitima, odnosno neutrofilima nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 μM) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu, određivana je metodom protočne citometrije.

vrednosti (njihove gustine), na osnovu jednačine $\text{MPA} = \% \times \text{MFI} / 100$ ⁵². Uticaji ekstrakta bele imele na indeks aktivacije trombocita prikazan je na Grafikonu 3. Delovanje ekstrakta bele imele na smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita kao odgovora na delovanje ADP-a praćeno je i smanjenjem indeksa aktivacije trombocita u odnosu na P-selektin kao markera aktivacije, bez pokazanog delovanja na indeks aktivacije u odnosu na GPIIbIIIa.



GRAFIKON 7
EKSTRAKT BELE IMELE STIMULIŠE OSLOBAĐANJE
TNF-Á IZ PROINFLAMATORNIH M1 MAKROFAGA.

(Diferencirane THP-1 ćelije su prethodno tretirane ekstraktom bele imele-VA u koncentracijama 2.0, 4.0 i 8.0 µg/mL ukupnih proteina, tokom 30 minuta, a zatim su ćelije stimulisane LPS-om (1.0 µM/mL), četiri sata, nakon čega je merena produkcija TNF-á u supernatantu ELISA esejem.

Uticaj ekstrakta bele imele na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima

Uporedo sa uticajem na parametre aktivacije praćen je i uticaj ekstrakta bele imele na parametre agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima: procenat agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita (TMA) i procenat agregata trombocita i neutrofila u ukupnoj populaciji neutrofila (TNA) zdravih ispitanika, kao odgovor na agonističko delovanje suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 µM/mL). Dobijeni rezultati prikazani su na Grafikonu 4.

Pokazano je da je ekstrakt bele imele u većim koncentracijama (2.0 i 4.0 µg/mL) dovodi do smanjenja procenta agregata trombocita sa monocitima u ukupnoj populaciji monocita. Nije uočeno statistički značajno delovanje ispitivanog ekstrakta na agregaciju trombocita sa neutrofilima, najverovatnije kao posledica interindividualnih varijacija u odgovoru ispitanika, ali je uočen pozitivan trend ($p=0.080$ i $p=0.096$, redom).

Određivanjem MFI karakteristične fluorescence na monocitima i neutrofilima, pokazano je da nema statistički značajnog smanjenja relativne gustine trombocita na površini pojedinačnih monocita i neutrofila u ukupnoj populaciji ovih ćelija pod delovanjem ispitivanog ekstrakta (Grafikon 5). Dobijeni rezultati prikazani kao „indeks agregacije trombocita“- IAT (eng. *index of platelet aggregation, IPA*), tj. proizvod udela antigen pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji monocita, onosno neutrofila, i odgovarajuće MFI vrednosti, koji daje relativnu meru svih raspoloživih trombocitnih receptora na površini monocita, odnosno neutrofila, pokazuju da nema statistički značajnog delovanja ispitivanog ekstrakta (Grafikon 6).

Imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele na monocitno/makrofagne ćelije u kulturi

U cilju ispitivanja imunomodulatornog dejstva ekstrakta bele imele na monocite/makrofage korišćene su THP-1 ćelije u kulturi. THP-1 ćelije su diferencirane u mirujuće M0 makrofage vitaminom D₃ (100nM) 72 sata. Nakon 72 sata određivana je ekspresija CD11b, kako bi se proverila uspešnost diferencijacije (rezultati nisu prikazani). Potom su M0 makrofage stimulisane LPS-om kako bi se dobile M1 polarizovane proinflamatorne makrofage. Kako bi smo potvrdili prisustvo M1 makrofaga, određivali smo ekspresiju CD40, kao marker koji je karakterističan za M1 makrofage, CD36 kao marker karakterističan za M2 makrofage i određivali nivo IL-6 i TNF-á u supernatantu, takođe kao markeri M1 makrofaga (rezultati nisu prikazani).

Rezultati prikazani na Grafiku 7, pokazuju da vodeni ekstrakt bele imele dovodi do značajnog otpuštanja TNF-á u hranljivi medijum jedino iz LPS-om stimulisanih THP-1 ćelija, odnosno proinflamatornih M1 makrofaga i to na dozno-zavisan način.

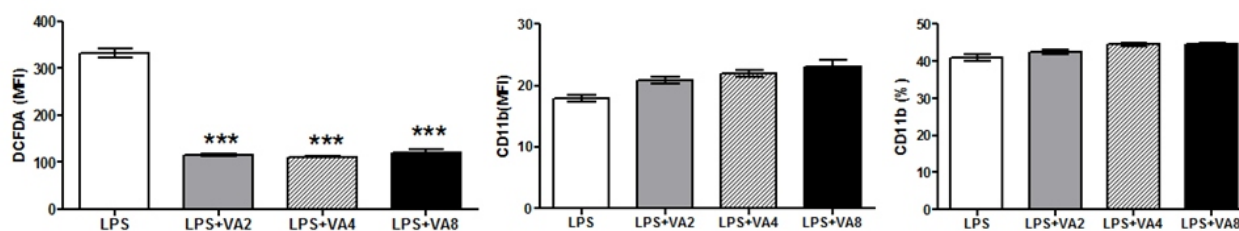
Uticaj ekstrakta bele imele na nivo slobodnih kiseoničnih radikala i ekspresiju CD11b u monocitima/makrofaga u kulturi

Da bi smo ispitali uticaj ekstrakta bele imele na markere aktivacije monocita pored delovanja na sekreciju TNF-á određivali smo nivo slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) unutar ćelija i ekspresiju CD11b na površini diferenciranih THP-1 ćelija protočnom citometrijom. Diferencirane ćelije su prvo tretirane različitim koncentracijama ekstrakta bele imele (2.0, 4.0 i 8.0 µg/mL ukupnih proteina), a zatim stimulisane LPS-om.

Rezultati prikazani na Grafiku 8 pokazuju da tretiranjem diferenciranih THP-1 ćelija ekstraktom bele imele dolazi do sniženja nivoa slobodnih kiseoničnih radikala, dok se procenat CD11b pozitivnih THP-1 ćelija i prosečna gustina CD11b na pojedinačnim THP-1 ćelijama ne menjaju značajno.

DISKUSIJA

Ekstrakti biljke bele imele su među najčešće primenjenim komplementarnim analternativnim terapijama (KAM) za bolesnike obolele od raka. Veliki broj studija je pokazao da u osnovi antikancerskog dejstva ekstrakta bele imele leži njena sposobnost indukcije apoptoze tumorskih ćelija, inhibicija ćelijske proliferacije, kao i inhibicija procesa angiogeneza¹⁵⁻²⁰. Rezultati epidemioloških studija i brojnih eksperimenata u *in vitro* uslovima i na animalnim modelima su pokazali da trombociti imaju veliki značaj u patogenezi i progresiji malignih bolesti. Interakcija trombocita sa malignim ćelijama značajno doprinosi razvoju malignog procesa i dovodi do stanja povećane aktivacije trombocita, hiperkoagulacije i trombocitopenije, kao čestih pratećih simptoma malignih bolesti. Značaj uloge trombocita u nastanku i progresiji malignog procesa potvrđen je i antitumorskim efektima trombinskih inhibitora i prostaciklina. Najnovija saznanja



GRAFIKON 8

EKSTRAKT BELE IMELE NE DOVODI DO AKTIVACIJE DIFERENCIRANIH THP-1 ČELIJA

Diferencirane THP-1 ćelije su prethodno tretirane ekstraktom bele imele pri koncentracijama 2.0, 4.0 i 8.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina tokom 60 minuta, a zatim su tako tretirane ćelije stimulirane LPS-om (1.0 $\mu\text{g/mL}$) tokom dva sata, nakon čega je određivan nivo ekspresije CD11b i DCFDA protočnom citometrijom.

o ulozi trombocita u nastanku i progresiji malignog procesa otvaraju novu oblast istraživanja antitumorskog delovanja sastojaka biljaka, usmerenog na funkciju trombocita⁵³.

Ispitivanjem delovanja ekstrakata bele imele na funkciju trombocita pokazali smo da bioaktivne komponente bele imele dovode do smanjenja ekspresije P-selektina, kao i smanjenjem indeksa aktivacije trombocita u odnosu na ekspresiju P-selektina. Pored značaja za sam tumorski proces, inhibicija ekspresije P-selektina, kao ključnog medijatora u patogenezi ateroskleroze, ukazuje na potencijal bele imele da prevenira dodatne vaskularne komplikacije tumorima posredovane aktivacije trombocita. Ekstrakt bele imele nije uticao na ekspresiju GPIIb/IIIa, receptora koji posreduje u homotipskoj agregaciji i patogenezi tromboze.

Takođe smo pokazali da uporedo sa uticajem na ekspresiju P-selektina ekstrakt bele imele dovodi i do smanjenja heterotipske agregacije trombocita posredovane P-selektinom, što je pokazano smanjenjem procenta agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita izloženih ispitivanom ekstraktu i stimuliranih adenozin-difosfatom. O delovanju ekstrakta imele na funkciju trombocita nema podataka u dostupnoj literaturi.

Makrofage predstavljaju još jednu veoma značajnu ćelijsku populaciju koja sačinjava tumorsko mikrookruženje⁵⁴. Ova heterogena ćelijska populacija je sposobna da menja svoj fenotip u zavisnosti od okruženja⁵⁵, efekat koji je posebno zapažen kod tumora^{56,57}. THP-1 ćelijska linija koja se rutinski koristi kao model ispitivanja imunomodulatornog delovanja agenasa, je linija humane mijeloidne monocitne leukemije. THP-1 monociti predstavljaju hematopoetski CD34⁺ prekursori koji lako mogu diferencirati u makrofage pomoću različitih stimulusa. Dva glavna tipa makrofaga su klasično aktivirane proinflamatorne M1 i alternativno aktivirane imunosupresivne M2 makrofage. U našem radu THP-1 ćelije prethodno diferencirane u mirujuće makrofage

vitaminom D₃ su stimulirane LPS-om kako bi se dobile M1 polarizovane proinflamatorne makrofage, a zatim je meren nivo TNF- α u hranljivom medijumu. Dobijeni rezultati pokazuju da tretiranje proinflamatornih M1 makrofaga ekstraktom bele imele dovodi do značajnog otpuštanja TNF- α u hranljivi medijum.

Poznato je da TNF- α ima dvojak ulogu u tumorima i obično je povezan sa indukcijom kancera, angiogenezom, proliferacijom i pojavom metastaza⁵⁸⁻⁶⁰. Sa druge strane, visok nivo TNF- α ima antitumorsko dejstvo⁵⁸. Ovo povećanje produkcije TNF- α može biti posledica prisustva lektina i/ili triterpena, kao što je sugerisano u prethodnim studijama na M1 makrofagama⁶¹.

S obzirom da smo u prethodnim eksperimentima pokazali da ekstrakt bele imele stimuliše oslobađanje TNF- α iz proinflamatornih makrofaga, postavlja se pitanje da li pod dejstvom ekstrakta bele imele dolazi do promena u aktivacionom statusu monocita/makrofaga.

Ispitivanjem uporedo i delovanja na druge aktivacione markere M1 makrofaga, nivo kiseoničnih radikala i ekspresiju CD11b, pokazano je da je aktivacija monocita/makrofaga selektivna i ograničena isključivo na stimulaciju oslobađanja TNF- α . Sve ovo ukazuje da ekstrakt bele imele ima TNF- α posredovano antitumorsko dejstvo bez pratećih komplikacija u smislu nespecifične aktivacije monocita. Sumirani, dobijeni rezultati ukazuju na složen mehanizam delovanja ispitivanih ekstrakata na trombocite i monocite. S jedne strane, delovanjem na trombocite inhibira se njihova agregacija sa monocitima i time smanjuje verovatnoća kardiovaskularnih komplikacija. Pokazano inhibitrono delovanje na LPS-om stimulisanu produkciju slobodnih radikala i odsustvo stimulatornog delovanja na ekspresiju CD11b ukazuje da i monociti mogu predstavljati ciljno mesto delovanja ispitivanog ekstrakta u prevenciji njegove agregacije sa trombocitima. Takođe, stimulacijom produkcije TNF- α u LPS-om polarizovanim ćelijama, potencira se uloga makrofaga i njihovih citokina u imunskom odgovoru na tumor.

ZAKLJUČAK

Po prvi put je pokazana sposobnost ispitivanog ekstrakta da moduliše heterotipsku interakciju aktiviranih trombocita sa monocitima u *ex vivo* uslovima kao ključnog događaja u patogenezi ateroskleroze, ali i heterotipsku agregaciju sa drugim ćelijama, takođe posredovanu P-selektinom, uključujući interakciju aktiviranih trombocita sa malignim ćelijama, i potencijalni uticaj na njihovu sekvestraciju, interakciju sa endotelnim ćelijama i uticaj na ekstravazaciju sekvestriranih malignih ćelija, kao i delovanje na aktivaciju trombocita i oslobađanje faktora rasta značajnih za proces angiogeneze. Uzimajući u obzir stimulatorno delovanje ekstrakta bele imele na monocite i makrofage i time potenciranje njihovog antikancerogenog potencijala, smanjenje agregacije monocita sa trombocitima delovanjem direktno na trombocite predstavlja regulatorni protektivni mehanizam u sklopu pleotropnog antikancerskog potencijala ispitivane biljke. Prikazani rezultati predstavljaju osnovu za ispitivanje delovanja ekstrakta bele imele na funkciju trombocita i monocita, kao važnog mehanizma njihovog antitumorskog delovanja, kako u *in vitro* uslovima tako i u okviru kliničkih studija.

SUMMARY

EFFECTS OF MISTLETOE EXTRACT ON MARKERS OF PLATELET ACTIVATION AND AGGREGATION

BACKGROUND: *Viscum album* preparations are extensively used as complementary therapy in cancer and are shown to exert antitumor activities which involve the cytotoxic properties, induction of apoptosis, inhibition of angiogenesis and several other immunomodulatory mechanisms.

AIM: The aim of this study was to investigate the effects of mistletoe extract on platelet as well as monocyte functions, as an important factors in immunomodulation of cancers metastatic potencial and angiogenesis in tumors.

METHODS: The effect of different concentrations of mistletoe extract on agonist -induced platelet activation markers and their aggregation with leukocytes was examined in the blood of healthy subjects (n = 6) using flow cytometry. Effects on LPS -induced activation markers was determined in the blood of healthy subjects as well as on THP- 1 cell line using an ELISA essays and flow cytometry.

RESULTS: Mistletoe extract significantly inhibited agonist induced P selectin expression and platelet-monocytes aggregation. Additionally, mistletoe extract exerts anti-tumor effect through the stimulation of TNF- α production in LPS induced monocytes activation.

CONCLUSION: Obtained data demonstrate that mistletoe extract was effective in modulating platelet and monocyte functions, as a part of pleiotropic anticancer effect.

Key words: *Viscum album*, platelets, P-selectin, monocytes

REFERENCE

1. Endo Y, Tsurugi K, Franz H. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. *FEBS Letters* 1988; 231:378-380.
2. Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J Biological Chem* 1982; 257:13271-13277.
3. Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10:405-412.
4. Peumans WJ, Verhaert P, Pfüller U, Van Damme EJM. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Letters* 1996; 396:261-265.
5. Klett CY, Anderer FA. Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from *Viscum album* extract. *Arzneimittelforschung*. 1989; 39:1580-1585.
6. Mueller EA, Anderer FA. A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer. *Cancer Immunol Immunother* 1990; 32:221-227.
7. Orhan DD, Küpeli E, Yesilada E, Ergun F. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *VISCUM ALBUM* ssp. *ALBUM*. *Z Naturforsch C*. 2006; 61:26-30.
8. Winkler K, Leneweit G, Schubert R. Characterization of membrane vesicles in plant extracts. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2005; 45:57-65.
9. Jager S, Winkler K, Pfuller U, Scheffler A. Solubility studies of oleanolic acid and betulonic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Med* 2007; 73:157-162.
10. Kienle GS, Kiene H: *Die Mistel in der Onkologie – Fakten und konzeptionelle Grundlagen* Stuttgart, New York: Schattauer Verlag; 2003.
11. Kaegi E. Unconventional therapies for cancer: 3. Iscador. Task Force on Alternative Therapies of the Canadian Breast Cancer Research Initiative. *CMAJ* 1998; 158: 1157–1159.
12. Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. Efficacy and safety of long-term complementary treatment with standardized European mistletoe extract (*Viscum album* L.) in addition to the conventional adjuvant oncologic therapy in patients with primary non-metastasized mammary carcinoma. Results of a multi-center, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* 2004; 54: 456–466.
13. Bussing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res* 1999; 19: 23–28.
14. Stein GM, Pfuller U, Schietzel M, Bussing A. Toxic proteins from European mistletoe (*Viscum album* L.): increase of intracellular IL-4 but decrease of IFN-gamma in apoptotic cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 1673–1678.

15. Stein GM, Pfuller U, Schietzel M, Bussing A. Intracellular expression of IL-4 and inhibition of IFN-gamma by extracts from European mistletoe is related to induction of apoptosis. *Anticancer Res* 2000; 20: 2987–2994.
16. Duong Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, Gaston AT, Michel O, et al. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for antitumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med* 2002; 8: 600–606.
17. Choi SH, Lyu SY, Park WB. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. *Arch Pharm Res* 2004; 27:68-76.
18. Duong Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, Gaston AT, Michel O, et al. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for antitumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med* 2002; 8: 600–606.
19. Duong Van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Comparative study of the sensitivity of lymphoblastoid and transformed monocytic cell lines to the cytotoxic effects of *Viscum album* extracts of different origin. *Chemotherapy* 2003; 49: 298–302.
20. Duong Van Huyen JP, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD, Bruneval P, et al. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Lett* 2006; 243: 32–37.
21. Kienle GS, Kiene H. Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integr Cancer Ther* 2010; 9: 142–157.
22. Augustin M, Bock PR, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* 2005; 55:38-49.
23. Kienle GS, Kiene H. *Die Mistel in der Onkologie – Fakten und konzeptionelle Grundlagen* Schattauer Verlag, Stuttgart-New York; 2003.
24. Kienle GS, Kiene H. Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integr Cancer Ther* 2010; 9:142-157.
25. Melzer J, Iten F, Hostanska K, Saller R. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed* 2009; 16:217-226.
26. Ostermann T, Raak C, Bussing A. Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer* 2009; 9:451.
27. Troger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stankovic N, Milicevic M. *Viscum album* [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a randomised clinical trial on overall survival. *Eur J Cancer* 2013; 49:3788-3797.
28. Troger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stankovic N, Milicevic M. Quality of life of patients with advanced pancreatic cancer during treatment with mistletoe: a randomized controlled trial. *Dtsch Arztebl Int* 2014a; 111:493-502.
29. Troger W, Jezdic S, Zdravle Z, Tisma N, Hamre HJ, Matijasevic M. Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone. *Breast Cancer (Auckl)* 2009; 3:35-45.
30. Troger W, Zdravle Z, Tisma N, Matijasevic M. Additional therapy with a mistletoe product during adjuvant chemotherapy of breast cancer patients improves quality of life: An open randomized clinical pilot trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:430-518.
31. Bussing A, Bischof M, Hatzmann W, Bartsch F, Soto-Vera D, Fronk EM, et al. Prevention of surgery-induced suppression of granulocyte function by intravenous application of a fermented extract from *Viscum album* L. in breast cancer patients. *Anticancer Res* 2005; 25:4753-4757.
32. Klopp R, Schmidt W, Werner E, Werner M, Niemer W, Beuth J. Influence of complementary *Viscum album* (Iscador) administration on microcirculation and immune system of ear, nose and throat carcinoma patients treated with radiation and chemotherapy. *Anticancer Res* 2005; 25: 601-610.
33. Schink M, Troger W, Dabidian A, Goyert A, Scheuerecker H, Meyer J, et al. Mistletoe extract reduces the surgical suppression of natural killer cell activity in cancer patients. a randomized phase III trial. *Forsch Komplementmed* 2007; 14:9-17.
34. Frank U, Engels I, Wagner A, Lacour M, Daschner FD. Influence of mistletoe (*Viscum album*) extracts on phagocytosis/burst activity of human phagocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:501–503.
35. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428–435.
36. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61:46–52.
37. Gasic GJ, Gasic TB, Galanti N, Johnson T, Murphy S. Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int J Cancer* 1973; 11:704–718.
38. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8:1247–1255.
39. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9325–9330.
40. Li L, Short HJ, Qian KX, Elhammer AP, Geng JG. Characterization of glycoprotein ligands for P-selectin on a human small cell lung cancer cell line NCI-H345. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 288:637–644.

41. Nierodzik MN, Karpatkin S. Tumor growth and metastasis. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
42. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *The Lancet Oncology*. 2002; 3:425-30.
43. Ma YQ, Geng JG. Obligatory requirement of sulfation for P-selectin binding to human salivary gland carcinoma Acc-M cells and breast carcinoma ZR-75-30 cells. *J Immunol* 2002; 168: 1690-1696.
44. Srdic-Rajic T, Tisma-Miletic N, Cavic M, Kanjer K, Savikin K, Galun D, Konic-Ristic A, Zoranovic T. Sensitization of K562 leukemia cells to doxorubicin by the *Viscum album* extract. (in press)
45. Walker J. The protein protocols handbook, 2nd ed. Humana Press, New Jersey, USA; 2002
46. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 2003;51(3):609-14.
47. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2002;50(10):3010-4.
48. Krueger LA, Barnard MR, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD. Immunophenotypic analysis of platelets. *Curr Protoc Cytom*. 2002;Chapter 6:Unit 6.10.
49. Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD. Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. *Curr Protoc Cytom*. 2003;Chapter 6:Unit 6.15.
50. Frelinger AL, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2-independent pathway. *Circulation*. 2006;113:2888-96.
51. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 104:1533-7.
52. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273:565-70.
53. Negrão R, Duarte D, Costa R, Soares R. Could platelet-accumulating polyphenols prevent tumour metastasis? *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:685.
54. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420:860-7.
55. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Scientific World Journal*. 2011;11:2391-402.
56. Bogels M, Braster R, Nijland PG, Gul N, van de Luijtgarden W, Fijneman RJ, et al. Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *Onco Immunol*. 2012; 1:798-809.
57. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol*. 2008; 180:2011-7.
58. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149-185.
59. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117:1175-83.
60. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006; 66:605-12.
61. Estko M, Baumgartner S, Urech K, Kunz M, Regueiro U, Heusser P, Weissenstein U. Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:130.

Skraćenice

ADP	adenozin difosfat
CAF	ciklofosamid, adriamicin, 5-fluorouracil
CD	(eng. cluster of differentiation), diferencijacijska grupa
DCFDA	dihlorofluorescejin diacetat
FITC	fluorescein izotiocijanat, fluorescentna boja,
ELISA	(eng. enzyme-linked immunosorbent assay)
HTP	modifikovani HEPES Tirode-ov pufer
IAT	indeks aktivacije trombocita, (eng. index platelet activation, IPA)
KAM	komplementarni ili alternativni medikamenti
LPS	lipopolisaharid
MFI	(eng. mean fluorescence intensity), geometrijska sredina intenziteta fluorescencije
PDGF	faktor rasta poreklom iz trombocita
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta

ZAHVALNICA: Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije, kroz projekat broj III 41030.