

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

НАЗИВ ФАКУЛТЕТА

ПРИМЛ.	02. 09. 2025
Орг. јед.	Вредност
05	7482

ОЦЕНА МЕНТОРА О ИЗВЕШТАЈУ О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ ОДНОСНО ДОКТОРСКОГ УМЕТНИЧКОГ ПРОЈЕКТА

НАЗИВ ДИСЕРТАЦИЈЕ	Утицај семаглутида на прогресију мишијег карцинома дојке	
Кандидат	Исидора А. Станисављевић	
Ментор:	Проф. Др Слађана Павловић	
Датум пријема потпуног извештаја о провери оригиналности докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта	01.09.2025.	

Овим потврђујем да је наведена докторска дисертација оригинална, тј. да представља резултат оригиналног рада докторанда. Такође, потврђујем да су током рада поштована академска правила цитирања, навођења извора и сл. Подударање текста ове дисертације са другим изворима чини свега 9% укупно. Подударање текста која нису последица цитата, личних имена и библиографских података о коришћеној литератури, односи се на примену исте или сличне методологије коришћене при прикупљању података у оквиру ове докторске дисертације.

Овај извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за одбрану може наставити.

Датум

01.09.2025.

ПОТПИС МЕНТОРА

Слађана Павловић

УТИЦАЈ СЕМАГЛУТИДА НА ПРОГРЕСИЈУ МИШЈЕГ КАРЦИНОМА ДОЈКЕ

Бу Исидора Станисављевић



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Исидора А. Станисављевић

**УТИЦАЈ СЕМАГЛУТИДА НА ПРОГРЕСИЈУ
МИШЈЕГ КАРЦИНОМА ДОЈКЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Isidora A. Stanisavljević

**THE EFFECT OF SEMAGLUTIDE ON THE
PROGRESSION OF MURINE BREAST CANCER**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Исидора Станисављевић
Датум и место рођења: 02.11.1997. Смедеревска Паланка
Садашње запослење: Факултет медицинских наука, сарадник у настави
Докторска дисертација
Наслов: Утицај семаглутида на прогресију мишјег карцинома дојке
Број страница: 112
Број слика: 45 (37 графикона, 6 слика, 2 табеле)
Број библиографских података: 303
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: Проф. Др Слађана Павловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну области Микробиологија и имунологија
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:
Број: IV-03-148/6 ; Датум: 19.03.2025.

Doctoral dissertation identification page

Author
Name and surname: Isidora Stanisavljević
Date and place of birth: 02.11.1997. Smederevska Palanka
Current employment: Faculty of medical sciences, junior teaching assistant
Doctoral Dissertation
Title: The effect of semaglutide on the progression of murine breast cancer
No. of pages: 112
No. of images: 45 (37 charts, 6 images, 2 tables)
No. of bibliographic data: 303
Institution and place of work: Faculty of medical sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medical sciences
Mentor: Slađana Pavlović, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of medical sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology
Topic Application Date:
03.10.2024.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
Decision number: IV-03-148/6 ; Date: 19.03.2025.

Најпре желим да изразим дубоку захвалност мојој менторки, проф. др Слађани Павловић, за указано поверење, стручне смернице, стрпљење и несебичну подршку током целокупног истраживачког рада. Искрено се захваљујем и проф. др Ивану Јовановићу, на вредним саветима, подршци и конструктивним сугестијама које су значајно допринеле квалитету овог рада.

Посебну захвалност дугујем својој сјајној екипи – вишем научном сараднику др Бојани Симовић Марковић и др Ирфану Ђоровићу, на сарадњи, подршци и дружењу које је овај процес учинило лакшим и лепим.

Мом драгом Андрији, хвала ти на разумевању, великом стрпљењу и љубави, који су ми били, и биће, ослонац у сваком кораку.

На крају, али најважније — мојој породици. Без ваше безусловне љубави, подршке и вере у мене, ниједан део овог пута не би био могућ. Овај успех је и ваш.

САЖЕТАК

Семаглутид, агониста рецептора за глутагону-сличан пептид 1, представља антидијабетик који показује обећавајућа имуномодулаторна и антитуморска својства. Карцином дојке представља најчешћи облик малигнитета код жена широм света. Циљ овог истраживања био је да се испита утицај семаглутида на раст и прогресију тумора, као и на антитуморски имунски одговор у 4T1 мишјем моделу карцинома дојке. Након индукције тумора, BALB/C мишеви су интраперитонеално третирани семаглутидом. Примена семаглутида одложила је појаву палпабилног тумора и успорила раст примарног тумора, као и смањила појаву удаљених метастаза у плућима и јетри. Лек није испољио директно цитотоксичко дејство на ћелијске линије мишјег и хуманог карцинома дојке *in vitro*, нити је значајно утицао на неоангиогенезу у туморском ткиву. Такође, деплеција NK ћелија није утицала на раст тумора код мишева третираних семаглутидом, што указује на механизам независан од NK ћелија. Апликација семаглутида повећала је заступљеност и сазревање CD11c⁺ дендритских ћелија у слезини и туморском ткиву, истовремено смањујући заступљеност CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регулаторних Т лимфоцита и њихову продукцију IL-10. Додатно, семаглутид је повећао заступљеност и цитотоксичку активност CD8⁺ Т лимфоцита, што се огледа у смањеној експресији PD-1 и продукцији IL-10, а повећању експресије CD69, NKG2D, CD107a и гранзима В. Деплецијом CD8⁺ Т лимфоцита неутралисан је антитуморски ефекат семаглутида, чиме се потврђује да су ове ћелије кључна мета дејства семаглутида. Резултати указују да семаглутид подстиче стечени антитуморски имунски одговор и представља потенцијално ефикасан додатни имуноterapiјски агенс у лечењу карцинома дојке.

Кључне речи: Семаглутид, карцином дојке, антитуморски имунски одговор, CD8⁺ Т лимфоцити.

ABSTRACT

1 Semaglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, is an antidiabetic that has demonstrated promising immunomodulatory and antitumor properties. Breast cancer is the most common form of malignancy among women worldwide. The aim of this study **1** was to investigate the effects of semaglutide on tumor growth and progression, as well as on the antitumor **1** immune response in the 4T1 murine model of breast cancer. Following tumor induction, BALB/C mice were treated intraperitoneally with semaglutide. Semaglutide administration delayed the onset of palpable tumors and slowed the growth of primary tumors, while reducing the occurrence of distant metastases in the lungs and liver. The drug did not exhibit direct cytotoxic effects on murine or human breast cancer cell lines *in vitro*, nor did it significantly affect neovascularization in tumor tissue. Furthermore, NK cell depletion did not influence tumor growth in semaglutide-treated mice, indicating an NK cell-independent mechanism of action. Semaglutide treatment increased the presence and maturation of CD11c⁺ dendritic cells in the spleen and tumor tissue, while simultaneously reducing the percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and their production of IL-10. Additionally, s**1**maglutide enhanced both the presence and cytotoxic activity of **1**CD8⁺ T cells, reflected in reduced expression of PD-1 and IL-10 production, alongside increased expression of CD69, NKG2D, CD107a, and granzyme B. Depletion of CD8⁺ T cells neutralized the antitumor effect **1** of semaglutide, confirming that CD8⁺ T cells are the key target of semaglutide's action. These results suggest that semaglutide promotes an adaptive antitumor immune response and represents a potentially effective adjunct immunotherapeutic agent in breast cancer treatment.

Keywords: Semaglutide, breast cancer, antitumor immunity, CD8⁺ T cells.

САДРЖАЈ

1. УВОД	11
1.1 Глукагону сличан пептид-1	11
1.2 Агонисти рецептора за глукагону сличан пептид-1	13
1.2.1 Семаглутид	15
1.2.2 Антитуморска дејства агониста рецептора за глукагону сличан пептид-1	16
1.2.3 Имуномодулаторна дејства агониста рецептора за глукагону сличан пептид-1	18
1.3 Карактеристике малигних ћелија	21
1.4 Карцином дојке	22
1.4.1 Експериментални 4T1 модел карцинома дојке	23
1.5 Антитуморски имунски одговор	24
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	27
2.1 Циљеви студије	27
2.2 Хипотезе студије	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	28
3.1 Лабораторијске животиње	28
3.2 Тестови вијабилности- МТТ и <i>Crystal violet</i>	28
3.3 Индукција карцинома дојке	29
3.4 Начин давања семаглутида	29
3.5 Одређивање дана појаве и величине примарног тумора	30
3.6 Одређивање присуства удаљених метастаза	30
3.7 Деплеција NK ћелија и CD8 ⁺ Т лимфоцита <i>in vivo</i>	31
3.8 Квантификација некрозе	31
3.9 Имунохистохемијске анализе	31
3.10 Имунофлуоресценција	32
3.11 Изолација спленоцита	32
3.12 Изолација тумор-инфилтришућих леукоцита	33
3.13 Фенотипизација и процена функционалног статуса ћелија слезине и моноклеарног инфилтрата примарног тумора	33
3.13.1 Бојење мембранских ћелијских маркера	33
3.13.2 Бојење унутарћелијских маркера	34
3.14 Изолација ћелија имунског система из слезине	35
3.14.1 Изолација NK ћелија позитивном селекцијом употребом магнетних куглица	35

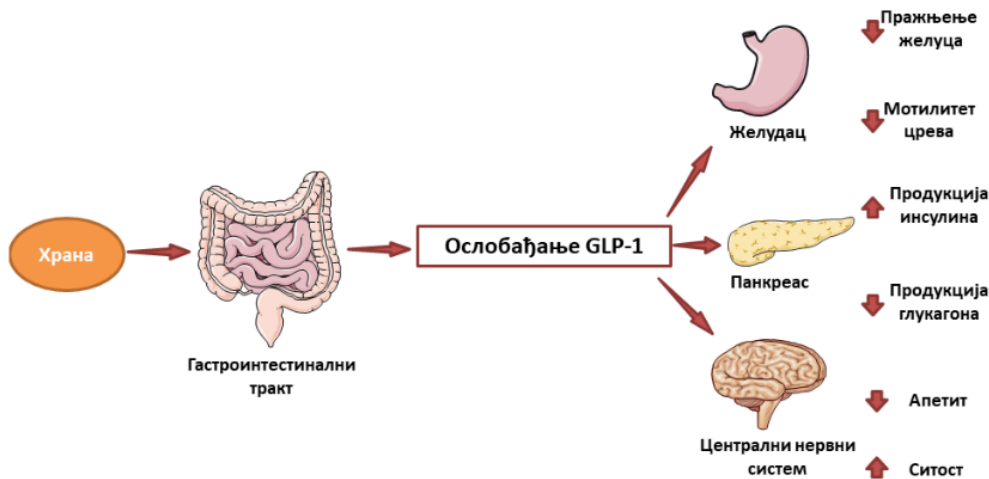
3.14.2 Изолација CD8 ⁺ Т лимфоцита негативном селекцијом коришћењем магнетних куглица	36
3.14.3 Изолација дендритских ћелија позитивном селекцијом коришћењем магнетних куглица	36
3.15 Тест цитотоксичности	37
3.16 <i>In vitro</i> имуномодулација	37
3.17 Изолација RNA и реакција ланчане полимеризације	37
3.18 Статистичка обрада података	38
4. РЕЗУЛТАТИ	39
4.1 Третман семаглутидом одлаже појаву палпабилног тумора дојке и успорава прогресију тумора.....	39
4.2 Третман семаглутидом смањује метастатско ширење карцинома дојке у јетру и плућа	40
4.3 Примена семаглутид не показује директан антитуморски ефекат	41
4.4 Третман семаглутидом смањује некрозу у примарном тумору дојке	42
4.5 Апликација семаглутида не утиче на ангиогенезу и микроваскуларну густину ..	43
4.6 Примена семаглутида појачава антитуморски фенотип CD3 ⁺ CD49b ⁺ ћелија у слезини и примарном тумору	45
4.7 Утицај примене семаглутида на фенотип CD3 ⁺ CD49b ⁺ ћелија.....	49
4.8 Утицај примене семаглутида на цитотоксички капацитет NK ћелија <i>in vitro</i>	52
4.9 Деплеција NK ћелија није утицала на раст тумора код мишева третираних семаглутидом.....	53
4.10 Апликација семаглутида повећава акумулацију и сазревање CD11c ⁺ ћелија	54
4.11 Примена семаглутида смањује заступљеност CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ ћелија и продукцију IL-10 у слезини и примарном тумору мишева.....	59
4.12 Примена семаглутида смањује акумулацију CD11c ⁺ CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ ћелија и продукцију TGF- β у примарном тумору дојке	61
4.13 Утицај апликације семаглутида на Lin ⁺ Sca ⁺ ћелије у примарном тумору дојке ...	62
4.14 Примена семаглутида појачава антитуморски фенотип CD3 ⁺ CD49b ⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке	63
4.15 Апликација семаглутида повећава заступљеност и антитуморски фенотип CD3 ⁺ CD49b ⁺ ћелија у карциному дојке.....	67
4.16 Утицај примене семаглутида на цитотоксички капацитет CD8 ⁺ Т лимфоцита <i>ex vivo</i>	72
4.17 Деплеција CD8 ⁺ ћелија неутралише разлику у расту приманог тумора између мишева третираних семаглутидом и контролних мишева	73
4. 18 Третман семаглутидом стимулише производњу проинфламацијских цитокина <i>in vitro</i>	74

4. 19 Третман семаглутидом подстиче производњу проинфламацијских цитокина у CD3 ⁺ ћелијама <i>in vitro</i>	76
5. ДИСКУСИЈА	79
5.1 Утицај семаглутида на појаву и прогресију примарног тумора дојке	80
5.2 Директно цитотоксичко дејство семаглутида	80
5.3 Утицај семаглутида на неоангиогенезу у примарном тумору дојке	81
5.4 Утицај семаглутида на NK ћелије	81
5.5 Утицај семаглутида на дендритске ћелије	83
5.6 Утицај семаглутида на регулаторне Т лимфоците и мијелоидне супресорске ћелије	84
5.7 Утицај семаглутида на Т лимфоците	84
5.8 Имуномодулаторна дејства семаглутида	86
6. ЗАКЉУЧАК	87
7.СКРАЋЕНИЦЕ	89
8. ЛИТЕРАТУРА	91

1.УВОД

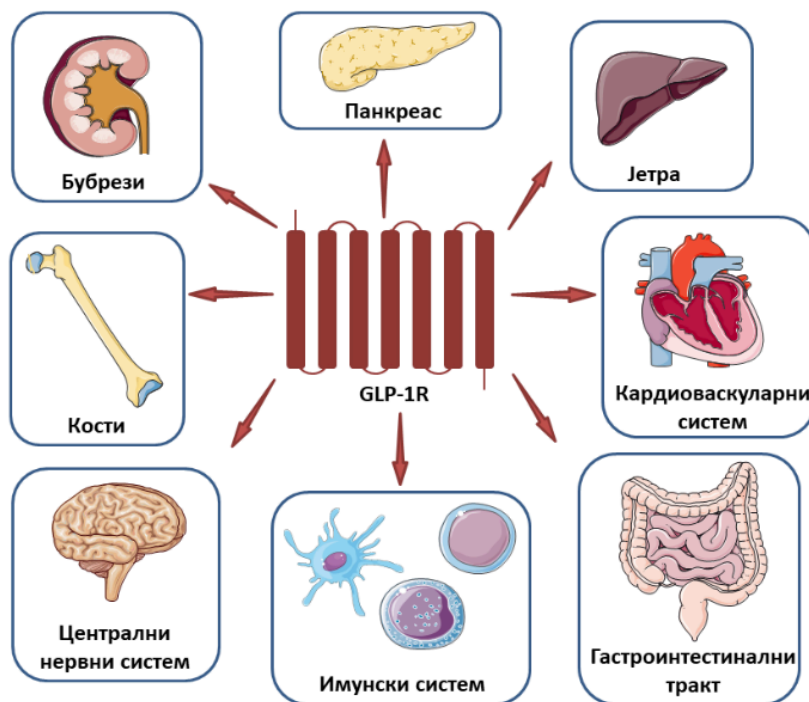
1.1 Глукагону сличан пептид-1

Глукагону сличан пептид 1 (енгл. *Glucagon like peptide 1*- GLP-1) представља инкретински хормон кога претежно секретују L ћелије танког црева као одговор на унос хранљивих материја, посебно угљених хидрата и масти (1). GLP-1 доприноси одржавању стабилног нивоа глукозе у крви подстицањем лучења инсулина из β -ћелија Лангерхансових острваца панкреаса када је ниво глукозе повишен. Овај механизам је од суштинског значаја за ефикасну гликорегулацију, нарочито након оброка. Истовремено GLP-1 смањује ослобађање глукагона из α -ћелија панкреаса, чиме ограничава прекомерну производњу глукозе у јетри (2). Овим двоструким деловањем, GLP-1 обезбеђује контролисану регулацију глукозе у крви, чиме игра значајну улогу у превенцији и лечењу дијабетеса типа 2. Због изузетно кратког полуживота, брзе елиминације и осетљивости на разградњу путем ди-пептидил пептидазе-4 (енгл. *Dipeptidyl peptidase 4*- DPP-4) у крви, овај хормон се првенствено метаболише у јетри и излучује преко бубрега (3). Његова улога у регулацији метаболизма добила је значајну пажњу због његових вишеструких ефеката који се протежу изван метаболизма глукозе, обухватајући регулацију апетита, кардио и неуропротективне ефекте (4). GLP-1, поред одржавања стабилног нивоа глукозе, помаже у контроли апетита тако што успорава пражњење желуца и шаље сигнале неуронима хипоталамуса, подстичући осећај ситости. Овај ефекат се такође одражава на успоравање пражњења желуца, што омогућава постепену апсорпцију хранљивих материја, доприносећи правилној расподели енергије и контроли телесне тежине (5).



Слика 1. Улога GLP-1 у гликорегулацији и контроли телесне масе

Везивањем за GLP-1 рецептор (енгл. *Glucagon like peptide 1 receptor*- GLP-1R), GLP-1 испољава ефекте на различите ћелије и ткива. GLP-1R припада породици глугагонских рецептора повезаних са G-протеином (6). Постоји приближно 90% идентичности у секвенци између људског и пацовског GLP-1R. GLP-1R је експримиран у панкреасу, мозгу, хипофизи, желуцу, срцу, бубрезима и хепатопорталној регији, што одговара његовој широкој биолошкој активности и указује на метаболичку угроженост поменутих органа. На то указује чињеница да се GLP-1 рецептори налазе у масном ткиву, скелетним мишићима, јетри и другим ткивима која су мета инсулина (7). Такође, експресија GLP-1R детектована је и на ћелијама имунског система (8). Природни агонисти GLP-1R укључују GLP-1(7–37) амид и ексендин-4 (9–39), GLP-1 миметик пронађен у плувачки гуштера *Heloderma suspectum*. У нормалним концентрацијама, GLP-1R се не активира везивањем структурно сличним пептидима, као што су глугагон, глугагону сличан пептид 2 или производи разградње GLP-1 (7).



Слика 2. Дистрибуција GLP-1R у различитим органима и типовима ћелија

С обзиром на широку експресију GLP-1R, није изненађујуће што GLP-1 има плејотропне ефекте који превазилазе регулацију нивоа глукозе. Најбоље проучена функција GLP-1 је његова улога у ендокриним функцијама панкреаса. Поред тога, он има и бројне ван-панкреасне ефекте, као што су регулација енергетског метаболизма, побољшање апсорпције хранљивих материја у цревима и подстицање складиштења и коришћења нутријената у јетри, мишићима и масном ткиву (9, 8). GLP-1 такође учествује у процесима диурезе, метаболизма липида, функцији и репарацији мозга, као

и у регулацији кардиоваскуларних функција и крвног притиска (10). Ослобађање инсулина и соматостатина регулише се GLP-1R рецепторима на β и δ ћелијама панкреаса, док соматостатин, преко својих рецептора, инхибира секрецију глукагона из α ћелија острваца (11).

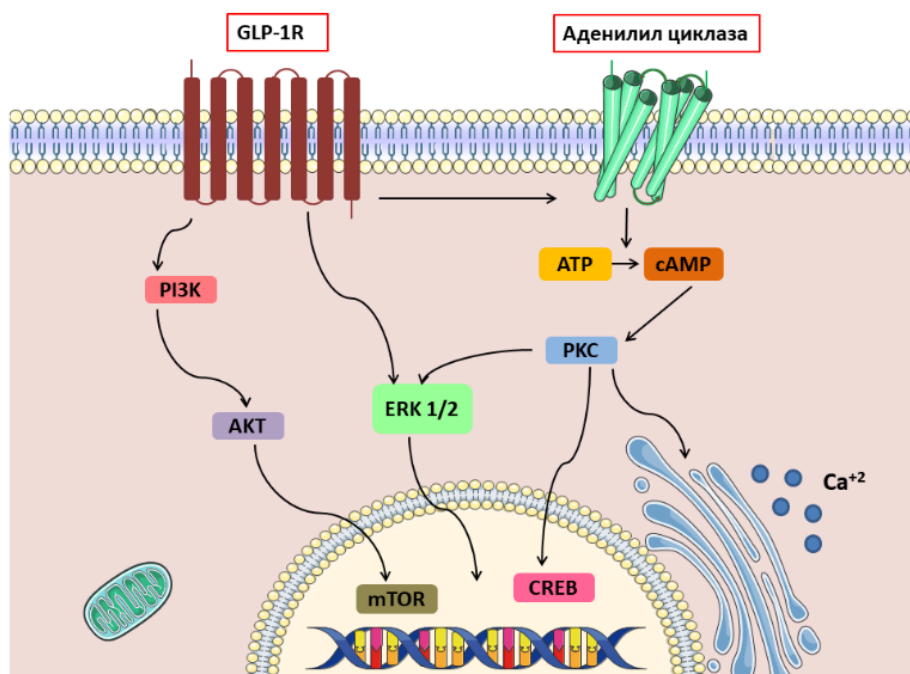
1.2 Агонисти рецептора за глукагону сличан пептид-1

Агонисти GLP-1 рецептора (енгл. *Glucagon like peptide 1 receptor agonists*- GLP-1RA) су широко признати антидијабетици због својих анти-хипергликемијских ефеката, безбедности примене и повољног утицаја на метаболизам (12). Терапијска ефикасност агониста GLP-1 рецептора заснива се на њиховој слојеној интеракцији са више ћелијских сигналних путева, који заједно доприносе њиховим метаболичким и регулаторним ефектима. При везању за GLP-1R, активира се низ унутар-ћелијских сигналних путева који утичу на различите ћелијске процесе. Један од кључних ефеката је појачана секреција инсулина из β -ћелија панкреаса, што се одвија кроз активацију екстрацелуларним сигналом регулисаних киназа 1/2 (енгл. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2* – ERK 1/2), чиме се доприноси побољшању гликорегулације (13, 14). Осим што утиче на инсулинску секрецију, GLP-1 сигнализација регулише и ослобађање проглукагона из α -ћелија панкреаса путем механизма зависних од цикличног аденозин монофосфата (енгл. *Cyclic adenosine monophosphate*- cAMP), чиме додатно смањује продукцију глукозе у јетри (15). Недавна истраживања указују да GLP-1RA делују кроз активацију фосфатидилинозитол-3 киназног (енгл. *Phosphatidylinositol 3-kinase*-PI3K)/протеин киназа В (енгл. *Protein kinase B*- pAkt) сигналног пута. Активација овог сигналног пута резултира деловањем транскрипциони фактор mTOR (енгл. *Mammalian target of rapamycin*) који игра кључну улогу у регулацији ћелијског раста, пролиферације, метаболизма и преживљавања, као одговор на нутријенте, факторе раста и енергетски статус ћелије (16). Поред ових основних метаболичких улога, све више истраживања указује на то да GLP-1 учествује у слојеној мрежи сигналних путва који укључују митогеном активiranу протеин киназу (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*-MAPK) и протеин киназу С (енгл. *Protein kinase C*-PKC) (17, 18).

GLP-1RA се генерално деле у две основне групе: краткоделујуће, који укључују ексенатид и беинаглутид, и дугоделујуће, као што су лираглутид и ликсизенатид. Краткоделујући агонисти делују углавном на постпрандијалну регулацију глукозе, јер се брзо елиминису из организма и захтевају чешћу примену, обично два до три пута дневно, док дугоделујући агонисти обезбеђују стабилнију гликемијску контролу и користе се једном дневно (19, 20). Посебно су значајни једнонедељни ултра-дугоделујући агонисти GLP-1 рецептора, у које спадају семаглутид, дулаглутид, дугоделујућа формулација ексенатида и полиетилен-гликол локсенатид, јер омогућавају продужено деловање и једноставнију примену, чиме се повећава комплијанса пацијената (19). Краткоделујући и дугоделујући GLP-1RA имају различите ефекте на контролу нивоа шећера у крви. Краткоделујући препарати углавном снижавају постпрандијалну гликемију тако што успоравају пражњење желуца и подстичу секрецију инсулина (21). Насупрот томе, дугоделујући GLP-1RA одржавају активiranост GLP-1 рецептора током дужег временског периода, чиме стимулишу секрецију инсулина и инхибирају лучење глукагона, али имају ограничен утицај на постпрандијалне осцилације глукозе (22). Иако сви GLP-1RA имају сличан фармаколошки механизам, клиничке предности варирају због разлика у њиховој структури и потентности. Ултра-дугоделујући GLP-1RA дулаглутид показује веома повољне анти-хипергликемијске ефекте, док семаглутид, осим снажног утицаја на редукцију глукозе, значајно доприноси и губитку телесне масе. Поред тога, утврђено је да дугоделујући лираглутид и ултра-дугоделујући семаглутид могу смањити ризик од

кардиоваскуларних обољења код пацијената са дијабетесом типа 2, док ексенатид нема значајан утицај на смањење овог ризика (20, 23). Поједини GLP-1RA, као што су лираглутид и семаглутид, показали су се као ефикасни у лечењу стеатозне болести јетре и користе се код пацијената са дијабетесом типа 2 и стеатозном болести јетре повезане са метаболичком дисфункцијом. Њихов терапијски ефекат остварује се кроз побољшање метаболичке функције, смањење инсулинске резистенције и редукцију липотоксичности органа укључених у патогенезу ове болести, што резултира успоравањем фиброзног процеса и смањењем садржаја масти у јетри (24). Поред смањења нивоа шећера у крви, GLP-1RA могу позитивно утицати на редукцију телесне масе, побољшање липидног профила и смањење кардиоваскуларног ризика (25). Они такође налазе примену у терапији синдрома полицистичних јајника кроз смањење хиперандрогенемije и побољшање метаболичких параметара. Комбинација краткоделујућег ексенатида и дугоделујућег лираглутида значајно повећава број природних трудноћа код жена са синдромом полицистичних јајника, побољшава регуларност менструалног циклуса и повећава успех вантелесне оплодње (26, 27). Осим тога, GLP-1RA имају и нефропротективни ефекат, смањујући ниво протеина у урину и стабилизујући гломеруларну филтрацију (28). Анти-хипергликемијски ефекат GLP-1RA се огледа у њиховој способности да утичу на ниво глукозе у стању гладовања, као и на постпрандијалну гликемију и гликозилирани хемоглобин. Мада постоји могућност да GLP-1RA изазову хипогликемију, овај ризик је минималан када се користе самостално и углавном се јавља само када се комбинују са другим хипогликемичним лековима, као што су деривати сулфонилуреје и препарати инсулина (29). Поред хипогликемије, могуће нежељене реакције укључују гастроинтестиналне тегобе, попут мучнине, повраћања и пролива, које су углавном благе и привремене. Међутим, у неким студијама је забележена повезаност између GLP-1RA и повећаног ризика од панкреатитиса и тумора штитасте жлезде, али због ограниченог броја испитаника и малог узорка, није јасно да ли је ова повезаност директно узрокована самим леком (20, 30).

Упркос овим потенцијалним нежељеним ефектима, увођење GLP-1RA у лечење дијабетеса типа 2 и гојазности представља велики напредак, а њихов потенцијал у кардиопротекцији, неуропротекцији и онкологији све више добија на значају, отварајући нове могућности за њихову примену у клиничкој пракси и индивидуализацију терапије у складу са потребама пацијената.



Слика 3. Сигнални путеви активирани GLP-1 молекулом

1.2.1 Семаглутид

Семаглутид је агонист GLP-1 рецептора који припада групи инкретинских миметика и представља један од најефикаснијих савремених лекова за терапију дијабетеса типа 2 и гојазности (31). Његов механизам деловања заснива се на опонашању природног инкретинског хормона GLP-1, који игра кључну улогу у регулацији глукозе у крви (31, 32). Семаглутид стимулише секрецију инсулина на начин зависан од нивоа глукозе, што значи да повећава ослобађање инсулина када су нивои шећера у крви повишени, док истовремено смањује лучење глутагона, хормона који стимулише продукцију глукозе у јетри, чиме спречава његову прекомерну продукцију и хипергликемију (12). Поред тога, успорава пражњење желуца, што доводи до продуженог осећаја ситости, смањења апетита и, самим тим, значајног губитка телесне масе (33). Овај ефекат на телесну тежину је посебно важан за пацијенте са дијабетесом типа 2 који се често боре са гојазношћу као додатним фактором ризика за кардиоваскуларне компликације (4). Семаглутид је доступан у облику поткожних инјекција које се примењују једном недељно, док је његова орална форма тренутно у фази клиничког испитивања (34). Упркос разликама у апсорпцији и дејству између ове две формулације, резултати студија указују да се одређени биолошки ефекти, међу којима и имуномодулаторно дејство, остварују без обзира на пут уноса лека (32). Поред примарне улоге у контроли гликемије, истраживања су показала да семаглутид има бројне додатне користи, укључујући кардиопротективне ефекте, смањење ризика од срчаног и možданог удара, као и потенцијалну примену у лечењу стеатохепатитиса (4, 35, 36, 37). Недавни докази указују на могућност да овај лек има и неуропротективне ефекте, што је предмет текућих истраживања, посебно у контексту

неуродегенеративних болести попут Алцхајмерове и Паркинсонове болести, а све више се проучава и његови потенцијални антитуморски ефекти (38, 39).

1.2.2 Антитуморска дејства агониста рецептора за глукагону сличан пептид-1

Повезаност између GLP-1RA и тумора још увек није у потпуности разјашњена, а подаци о њој су у великој мери контрадикторни. Док неке студије указују на потенцијални ризик, све више истраживања истиче могуће повољне ефекте GLP-1RA на одређене типове тумора, укључујући инхибицију раста туморских ћелија, модулацију туморског микроокружења и подстицање апоптозе. Показано је да GLP-1RA могу инхибирати пролиферацију и метастазирање тумора деловањем на различите сигналне путеве, као што су cAMP, p38, PI3K/Akt, ERK1/2 и нуклеарног фактора- κ B (енгл. *Nuclear factor- κ B*- NF- κ B) (3, 40-43). Поједине студије нису показале значајан утицај GLP-1RA на развој тумора, што се може објаснити варијабилношћу у експресији GLP-1 рецептора на различитим типовима туморских ћелија, као и разликама у коришћеним ћелијским моделима, популацијама пацијената и примењеним истраживачким методологијама (20, 44).

GLP-1RA показују разноврсне ефекте на развој и прогресију различитих типова тумора, укључујући карцином штитасте жлезде, дојке, колоне, панкреаса и туморе репродуктивног система. Код папиларног карцинома штитасте жлезде, GLP-1RA нема значајан утицај на пролиферацију туморских ћелија (45). Са друге стране, поједина истраживања указују на могућност да континуирана активација GLP-1 рецептора стимулише пролиферацију парафоликулских C ћелија, неуроендокриних ћелија штитасте жлезде, чија је основна функција да продукују калцитонин (46). Ова стимулација може утицати на повећање нивоа калцитонина, што се у одређеним случајевима повезује са повишеним ризиком од развоја медуларног карцинома штитасте жлезде (47).

Код карцинома дебелог црева, истраживања указују да GLP-1 рецептор није експримиран у туморском ткиву и ћелијским линијама, а додавање GLP-1RA није имало статистички значајан утицај на пролиферацију или миграцију ових ћелија (44). Поред тога, свеобухватна мета-анализа није показала повезаност између примене GLP-1RA и повећаног ризика од развоја малигних тумора код пацијената са дијабетесом типа 2 (48). Са друге стране, *Koehler* је известио да GLP-1RA могу индуковати апоптозу *in vitro* променом морфологије ћелија, вероватно путем активације експресије cAMP и инхибиције сигналних киназа гликоген синтазе 3 (енгл. *Glycogen synthase kinase 3*-GSK-3) и ERK1/2, што појачава апоптозу и смањује раст и преживљавање CT26 ћелија карцинома дебелог црева (49).

Passos и сарадници су показали да су пацијенти на терапији са GLP-1RA имали значајно смањену инциденцу хепатоцелуларног карцинома, инсуфицијенцију јетре, крварења из једњака као последица варикозних проширења вена у дисталном делу једњака и хепатичке енцефалопатије (50). Осим тога, GLP-1RA је показао способност да смањи учесталост тумора и величину туморске масе у моделима хепатоцелуларног карцинома код гојазних мишева, што сугерише његову могућу улогу у успоравању туморске прогресије код малигнитета повезаних са метаболичким поремећајима (51, 52).

Истраживање *Nie* и сарадника показује да су GLP-1R експримирани на ћелијским линијама глиома (U87, U251, U373 и A172) и да третман са GLP-1RA инхибира прогресију глиома (53). GLP-1RA је смањио преживљавање, пролиферацију, миграцију и инвазију ћелија глиома. Поред тога, инхибирао је епително-мезенхималну транзицију (енгл. *Epithelial-to-mesenchymal transition*- EMT), процес који игра кључну

улогу у метастазирању карцинома, у коме епителне ћелије губе своје карактеристике као што су поларизованост и ћелијска адхезија, и стичу мезенхимске особине које укључују повећану мобилност, инвазивност и отпорност на апоптозу (53, 54). GLP-1RA повећава експресију Е-кадхерина, епителног маркера повезаног са ћелијском адхезијом, док истовремено смањује експресију виментина, мезенхималног маркера повезаног са покретљивошћу ћелија (55). Посебно значајан налаз је да ексендин-4 повећава експресију сиртуина 3 (енгл. *Sirtuin 3-sirt3*), митохондријског протеина који учествује у регулацији метаболизма и одговору на стрес, али само у ћелијама глиома које имају високу експресију GLP-1 рецептора (56). Коначно, када је GLP-1R или sirt3 био инхибиран, инхибиторни ефекат GLP-1RA на миграцију и инвазију глиома је изостао (53).

У контексту карцинома панкреаса, налази у литератури су контрадикторни. Истраживање *Yan* и сарадника показало је да примена GLP-1RA може сузбити пролиферацију и инвазивност карцинома панкреаса путем инхибиције активације панкреасних стелатних ћелија, које представљају прекурсоре фибробласта асоцираних са канцером (енгл. *Cancer-associated fibroblasts- CAFs*) и играју кључну улогу у подстицању туморског раста, инвазије и метастазирања (57). Са друге стране, поједине студије указују да GLP-1RA може довести до хиперактивације GLP-1R, чиме се повећава осетљивост панкреаса на инфламацију и потенцијално повећава ризик од настанка карцинома (58).

Истраживање спроведено на ћелијским линијама хуманог карцинома јајника показало је да GLP-1RA могу успорити туморски раст и метастазирање путем инхибиције PI3K/Akt сигналног пута, који игра кључну улогу у преживљавању и пролиферацији туморских ћелија. Ови резултати су потврђени и у *in vivo* моделима, што додатно указује на њихов потенцијални антитуморски ефекат. Међутим, ефекат GLP-1RA зависи од експресије GLP-1R, па је код ћелијских линија са ниском или одсутном експресијом GLP-1R био минималан или га није било што сугерише да GLP-1RA могу имати антитуморски ефекат само код подгрупе пацијената са позитивном експресијом GLP-1R (59, 60). Код тумора репродуктивног система, нарочито ендометријалног карцинома, GLP-1RA могу испољити заштитни ефекат путем активације AMPK и инхибиције mTOR сигналног пута, што повећава апоптозу и смањује пролиферацију туморских ћелија (61, 62). Ови налази указују на могућност да GLP-1RA, поред своје примарне улоге у лечењу метаболичких поремећаја, имају потенцијал и у антитуморској терапији, али је њихова ефикасност ограничена на туморе који експримирају GLP-1R.

У случају карцинома дојке, *Ligumsky* и сарадници су у мишјем моделу карцинома дојке показали да GLP-1RA може инхибирати пролиферацију туморских ћелија путем активације cAMP сигналног пута (63). Такође, једна клиничка студија указује да GLP-1RA у комбинацији са метформином може инхибирати пролиферацију и подстаћи апоптозу ћелија карцинома дојке (64). У студији *Iwaya* и сарадника, GLP-1RA је смањило пролиферацију ћелија карцинома дојке на дозно-зависан начин, без индукције апоптозе. Инхибирао је нуклеарну транслокацију NF-κB и експресију његових циљних гена, што је смањило фосфорилације Akt и IκB, чиме је сузбијен раст тумора како *in vitro*, тако и у *in vivo* мишјем моделу. У истој студији је смањена пролиферација потврђена и смањеном експресијом познатог маркера пролиферације, Ki67, у ћелијама карцинома дојке (65). Међутим, *Liu* и сарадници су известили о могућности супротног ефекта, где је активација GLP-1 рецептора повећала пролиферацију туморских ћелија кроз активацију NOX4 (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)/ ROS (енгл. *Reactive oxygen species*)/ васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor-VEGF*) пута (66).

1.2.3 Имуномодулаторна дејства агониста рецептора за глутагону сличан пептид-1

Последњих година појавило се велико интересовање за истраживање плејотропних ефеката GLP-1RA. Иако је способност GLP-1RA да смањују гликемију и изазивају губитак телесне масе довела до њиховог одобравања за лечење дијабетеса типа 2 и гојазности, бројни докази *in vitro* студија и анималних модела указују на то да GLP-1RA могу модулисати имунски одговор (6, 67).

GLP-1R је првобитно идентификован у ендокрином панкреасу, а касније је детектовано његово присуство и у интраепителним лимфоцитима и ћелијама имунског система код мишева и људи (6), што додатно указује на његов широк спектар деловања. У складу са овим налазима, током последњих година спроведено је више студија које показују да GLP-1RA не само да регулишу хомеостазу глукозе, већ имају и специфичан допринос у регулацији имунског система и инфламације (6, 68). Докази о значају антиинфламацијских својстава GLP-1RAs прво потичу из студија на β -ћелијама панкреаса, а затим и на срцу, васкуларном систему, јетри, бубрезима, мозгу и оку (69-71). Наиме, бројна проинфламацијска стања, као што су глутотоксичност, оксидативни стрес, регрутовање ћелија имунског система, продукција цитокина и липотоксичност, могу бити модулисани утицајем GLP-1RA (72). Ово је од изузетног значаја због повезаности инфламације са дугорочним компликацијама дијабетеса и гојазности (73, 74) као и стеатозне болести јетре повезане са метаболичком дисфункцијом (75). Претпоставља се да GLP-1RA могу смањити инфламацију директним механизмом, деловањем на ћелије имунског система које експримирају GLP-1R, или индиректним механизмом преко контроле гликемије и смањења телесне тежине. Занимљиво је да је такође показано да примена GLP-1RAs код животиња и људи са дијабетесом или гојазношћу доводи до смањења локалне или системске инфламације, независно од промена у гликемијском стању и телесној тежини (69).

Ексендин и ексенатид, агонисти GLP-1R, показују изражене имуномодулаторне ефекте који превазилазе њихову основну улогу у контроли гликемије. Поред својства снижавања нивоа глукозе у крви, ови лекови делују на различите компоненте имунског система, доприносећи смањењу инфламације и модулацији имунског одговора. Они смањују секрецију важних проинфламацијских цитокина попут фактора некрозе тумора α (енгл. *Tumor-necrosis factor α -TNF- α*), интерлеукина (енгл. *Interleukin-IL*) IL-6, IL-1 β , интерферона γ (енгл. *Interferone γ -IFN- γ*), IL-17 и IL-2 од стране макрофага и моноцита, док истовремено подстичу њихов антиинфламацијски фенотип повећањем продукције IL-10 (76-78). Ови агенси такође модулишу функцију макрофага преко појачане експресије специфичних антиинфламацијских маркера моноцитно/макрофагне лозе CD163 и CD204, активацијом STAT3 пута (79) и смањењем експресије проинфламацијских површинских молекула као што су CD36 и CD11b, што доприноси смањеном формирању пенастих ћелија и адхезији моноцита (80-82). Посебно је важно што се ови ефекти јављају независно од промена у гликемији и телесној тежини, што указује на директну имуномодулаторну улогу. Додатни механизми укључују смањену експресију рецептора сличних Толу 2 и 4 (енгл. *Toll-like receptor-TLR*), хемокинских рецептора, као и активацију cAMP сигналних путева који додатно сузбијају проинфламацијске медијаторе (83). Код мишева са очуваним и функционалним GLP-1R, ексендин-4 повећава акумулацију cAMP у пречишћеним интраепителним лимфоцитима и снижава експресију IL-1 β , IL-6, IL-22, IL-12 β и TNF- α , као и хемокина CCL2, CXCL1 и CXCL2 (84). У моделу дијабетеса типа 1, код NOD мишева (*Non-Obese Diabetic* мишеви који спонтано развијају аутоимуни дијабетес типа 1), ексендин-4 повећава заступљеност имunosупресивних регулаторних Т лимфоцита (енгл. *Regulatory T cells- Tregs*) и продукцију трансформирујућег фактора раста β (енгл. *Transforming growth factor β -TGF- β*) (85). Поред тога, ексендин и ексенатид утичу и на друге ћелије

имунског система. Повећавају миграцију CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита у панкреасу мишева који спонтано развијају дијабетес. Такође, може смањити серумске концентрације IL-2 и IFN- γ код истих мишева (86). Ексенатид је појачао антитуморску ефикасност блокаде PD-1 путем смањења неутрофилне екстрацелуларних замки (енгл. *Neutrophil extracellular traps- NETs*) које представљају екстрацелуларне мреже састављене од дезоксирибонуклеинске киселине (енгл. *Deoxyribonucleic acid- DNA*), хистона и грануларних компонената, као што су миелопероксидаза (енгл. *Myeloperoxidase- MPO*) и еластаза, које неутрофили ослобађају (87). Све ово указује на широк антиинфламацијски потенцијал ових агенаса и њихову могућу терапијску примену у стањима изван дијабетеса и гојазности.

Лираглутид, агонист GLP-1R, подстиче алтернативну активацију макрофага и њихову поларизацију у М2 фенотип, подстичући активацију транскрипционих фактора STAT3 и STAT6 (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription*). Истовремено, лираглутид смањује експресију проинфламацијских маркера који су карактеристични за класично активирани макрофаге М1 фенотипа, делимично путем супресије активације STAT1 (88-91). STAT3 и STAT6 имају кључну улогу у подстицању антиинфламацијског одговора и М2 поларизације, стимулишући експресију гена као што су Arg1, IL-10 и CD206, који доприносе регулацији имуносупресије, репарације ткива и смањењу инфламације (92, 93). Насупрот томе, STAT1 је централни медијатор М1 поларизације и учествује у активацији гена као што су iNOS, TNF- α и IL-6, који доприносе проинфламацијском и цитотоксичком одговору (94). У моделу трансплантације срца код мишева, лираглутид је смањио инфилтрацију макрофага, CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, као и CD11b⁺ ћелија, као и нивое моноцитног хемоатрактантног протеина-1 (енгл. *Monocyte Chemoattractant Protein- MCP-1*), хемокина који производе ћелије имунског система и који посредује у регрутовању моноцита из циркулације на место инфламације, као и TNF- α и TGF- β 1 (95). CD11b је рецептор присутан искључиво на ћелијама беле крвне лозе и представља важан маркер за идентификацију моноцита и макрофага, гранулоцита и ћелија природних убица (енгл. *Natural killer cells- NK*) (96). У моделима Алцхајмерове болести, смањује нивое С-реактивног протеина (енгл. *C-reactive protein-CRP*) и IL-10 у мозгу, утиче на неуроинфламацију и активира инваријантне природне Т ћелије убице (енгл. *Invariant Natural Killer T cells-iNKT*) (97, 98). CRP се претежно синтетише у јетри, углавном као одговор на IL-6, а у мањој мери као одговор на IL-1 β , IL-17 и TNF- α (67). Представља један од најзначајнијих маркера системске инфламације, често коришћен у клиничкој пракси за процену акутног и хроничног инфламацијског одговора (99). У моделима дијабетеса и фиброзе јетре, лираглутид повећава број Tregs и смањује број проинфламацијских помоћничких Т лимфоцита 1 (енгл. *T helper-Th1*) (CD4⁺IFN- γ ⁺) и Th17 (CD4⁺IL-17a⁺), док у моделу нефритиса блокира формирање Th1 и Th17 ћелија (6). Посебно је значајно што лираглутид испољава синергистичко дејство са PD-1 инхибиторима, доприносећи јачању дуготрајног цитотоксичког одговора CD8⁺ Т лимфоцита у мишијим моделима карцинома плућа и јетре (100). Сви ови подаци указују на терапијски потенцијал лираглутида ван области метаболичких болести, захваљујући његовом утицају на имунски одговор.

Још један GLP-1RA, дулаглутид, смањује експресију проинфламацијских цитокина, укључујући IL-1 β , TNF- α и IL-6, у мишићном ткиву старих мишева (101). У мишијем моделу атеросклерозе, дулаглутид је показао рано антиинфламацијско дејство смањењем нивоа галектина 3 (енгл. *Galectin 3-Gal-3*) и CD68, маркера активације макрофага (102.). Поред тога, дулаглутид је утицао на популацију имунских ћелија у централном нервном систему, смањујући присуство дендритских ћелија (енгл. *Dendritic cells- DCs*) и макрофага, као и експресију фактора стимулације колонија гранулоцита и

макрофага (енгл. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*- GM-CSF) и Th1 и Th17 ћелија (103).

Ликсисенатид, припадник GLP-1RA, подстиче поларизацију макрофага ка M2 антиинфламацијском фенотипу смањењем секреције IL-6 *in vivo* и снижавањем нивоа TGF- β код дијабетичних пацова (104, 105). Поред тога, GLP-1RA, укључујући и ликсисенатид, показују анти-неуроинфламацијска својства у животињским моделима (106). У моделу повреде оптичког нерва код пацова, интравитреална примена дугоделујућих GLP-1RA смањила је популацију инфламацијских ћелија CD11b⁺ CD45⁺ и супримирала проинфламацијске медијаторе, укључујући IL-1, TNF- α , IL-6 и CXCL2 (107).

Семаглутид је првобитно развијен у субкутаној форми која се примењује једном недељно, док је у новије време доступна и орална формулација (108). Иако постоје фармакокинетичке и фармакодинамичке разлике између ових облика, истраживања показују да се одређени биолошки ефекти, укључујући и имуномодулаторно дејство, испољавају независно од начина примене (67). Ова сазнања указују на шири терапијски потенцијал семаглутида, не само у контексту гликемијске контроле, већ и у модулацији инфламације и имунског одговора.

Семаглутид показује значајне имуномодулаторне ефекте. У *in vivo* моделу гојазношћу изазване кардиоинфламације код мишева, семаглутид је значајно смањio системске нивое инфламацијских цитокина, као што су TNF- α и IL-6, редуковао продукцију реактивних кисеоничних врста, као и умањio регрутовање имунских ћелија у срчано ткиво (109). Поред тога, семаглутид је смањio миграцију и инфилтрацију моноцита, независно од губитка телесне тежине, смањењем експресије MCP-1 (110). Утврђено је да GLP-1RA инхибирају активацију NLRP3 инфламазома, чиме се смањује сазревање и ослобађање инфламацијских цитокина (111). Инфламазом представља комплекс протеина високе молекулске масе који се формира у цитосолу као одговор на различите стимулусе (112). Међу најистраженијим инфламазомама јесте NLRP3 инфламазом, који има функцију да активира каспазу-1 и подстакне синтезу проинфламацијских цитокина (113). У једногодишњем испитивању утицаја на телесну тежину, код гојазних пацијената без дијабетеса, током лечења семаглутидом забележено је смањење нивоа CRP (114).

Један од кључних налаза бројних истраживања указује да је примена GLP-1RA, попут семаглутида, повезана са смањењем нивоа протеина акутне фазе инфламације, како код особа са дијабетесом типа 2, тако и код особа изван ове патологије. Разјашњавање различитих ћелијских механизма који повезују инфламацију са инсулинском резистенцијом и дисфункцијом β -ћелија значајно је допринело разумевању патогенезе дијабетеса типа 2, који се данас све чешће посматра као метаболички и инфламацијски поремећај. С обзиром на доказану повезаност инфламације са прогресијом дијабетеса типа 2 и развојем његових хроничних компликација, потенцијални антиинфламацијски ефекат GLP-1RA представља важан терапијски аспект (114, 115). Са друге стране, гојазност се све више препознаје као стање хроничне инфламације ниског степена и као преддијабетично стање. Патолошко-физиолошки механизми који укључују инфламацију, инсулинску резистенцију, дисфункцију масног ткива и β -ћелија, утичу на појаву дијабетеса типа 2 и пратећих микро и макроваскуларних компликација (67, 116-118). Стога, испитивање антиинфламацијског потенцијала GLP-1RA у популацијама пацијената са болестима повезаним са гојазношћу, као што су метаболички синдром и дијабетес типа 2, има посебан значај.

1.3 Карактеристике малигних ћелија

Малигне ћелије карактерише губитак диференцијације, незрелост и присуство атипичних морфолошких обележја, што их значајно разликује од нормалних, неизмењених ћелија у погледу величине, облика и изгледа једра (119). Притом, долази до поремећаја нуклеоцитоплазматског односа, тј. једро постаје релативно веће у односу на цитоплазму (однос приближно 1:1, уместо физиолошког 1:4) (120). Ове ћелије испољавају атипичност како на ћелијском (целуларна атипичност), тако и на ткивном нивоу (ткивна атипичност), при чему су ћелије неправилно распоређене и недостаје нормална организација ткива (121, 122). Поред тога, малигне ћелије поседују више специфичних својстава, као што су: независна способност размножавања, отпорност на инхибиторне сигнале раста, избегавање апоптозе, неограничен митотски потенцијал, индукција ангиогенезе, као и инвазивност и способност метастазирања у удаљене органе (123-126). Уз то, оне улазе у метаболички репрограм и успевају да избегну имунски надзор организма (127). У физиолошким условима, ћелијска деоба се регулише и покреће само у присуству специфичних фактора раста. Најзначајнији међу њима су: епидермални фактор раста (енгл. *Epidermal growth factor*- EGF), фактор раста тромбоцитног порекла (енгл. *Platelet-derived growth factor*- PDGF), фактор раста фибробласта (енгл. *Fibroblast growth factor*-FGF) и васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor*- VEGF) (128-131). За разлику од здравих ћелија, малигне ћелије имају способност континуиране деобе, чак и у одсуству спољашњих сигнала. Ова способност се остварује путем аутономне продукције фактора раста, стимулације околних ћелија да их продукују или повећањем броја рецептора на сопственој површини, чиме се повећава осетљивост на постојеће факторе раста (132).

У нормалним ћелијама постоје механизми који спречавају прекомерну пролиферацију. Један од најважнијих је контактна инхибиција, која зауставља ћелијску деобу у присуству суседних ћелија (133). Овај регулаторни механизам је, међутим, одсутан код туморских ћелија (134). Поред тога, малигне ћелије избегавају дејство инхибиторних сигнала који контролишу ћелијски циклус. Ово се углавном дешава услед мутација у тумор-супресорским генима, као што су p53 и протеин ретинобластома (енгл. *Retinoblastoma protein*- pRB), што ремети раст и доприноси настанку различитих облика карцинома (135, 136). Са прогресијом туморске масе, повећава се и потреба за кисеоником и хранљивим материјама које су неопходне за даљи раст и преживљавање малигног ткива. Процес формирања нових крвних судова унутар туморског ткива, познат као ангиогенеза, подразумева пролиферацију ендотелних ћелија, њихово међусобно повезивање и стварање нових судова из већ постојећих васкуларних структура (137). Иницијални сигнал за овај процес долази од самих туморских ћелија које почињу да секретују VEGF, чиме се активирају ендотелне ћелије и покреће серија биохемијских догађаја (131). Поред VEGF, и други молекули, попут TGF- β и различитих фактора који стимулишу васкулогенезу, играју значајну улогу у овом процесу (138). Ангиогенеза не само да омогућава снабдевање тумора потребним материјама, већ је од суштинске важности за инвазију тумора и настанак метастаза. Бројна истраживања на животињским моделима показала су да антитела усмерена против VEGF могу инхибирати ангиогенезу, успорити раст тумора и смањити ризик од метастатског ширења (139).

Једна од најозбиљнијих карактеристика малигнитета јесте способност метастазирања, односно формирања секундарних тумора у удаљеним органима. Метастазе се формирају када туморске ћелије напусте примарни тумор, уђу у крвоток или лимфни систем и мигрирају до других ткива (140). У регулацији ћелијске адхезије значајну улогу има Е-кадхерин, протеин који омогућава чврсто међусобно повезивање ћелија унутар ткива. У туморским ћелијама експресија Е-кадхерина је смањена, што

повећава њихову покретљивост и омогућава одвајање од примарне масе (55). Поред тога, малигне ћелије синтетишу металопотеиназе, ензиме који разграђују екстрацелуларни матрикс, чиме се олакшава продирање у околна ткива и омогућава миграција ка удаљеним органима (141).

Да би обезбедиле континуирану пролиферацију, туморске ћелије модификују свој енергетски метаболизам. Под нормалним условима, ћелије разлажу глукозу у пируват путем гликолизе у цитоплазми, који се затим у митохондријама претвара у угљен-диоксид у присуству кисеоника. У анаеробним условима, гликолиза остаје примарни механизам производње енергије, док метаболизам митохондрија изостаје услед недостатка кисеоника (142, 143). Малигне ћелије су у стању да се адаптирају на хипоксично микросредину тумора, развијајући различите механизме преживљавања. Иако има података да хронична хипоксија може утицати на настанак генетске нестабилности, чиме се поспешује еволуција агресивнијих туморских фенотипова (144). Све је јасније да је у основи напредовања малигних болести метаболички и епигенетски репрограм и следствена кооперација различитих типова ћелија унутар микросредине.

1.4 Карцином дојке

Карцином дојке представља малигну болест која настаје у ткиву дојке као последица сложених и вишефакторских механизма. Генетске мутације у нормалним ћелијама могу нарушити регулацију њихове деобе и функције, што резултира аутономним и убрзаним размножавањем, формирањем тумора и оштећењем околног здравог ткива. Ипак, код великог броја пацијената не може се идентификовати јасна повезаност са специфичним мутацијама, што указује на значај епигенетских и других етиолошких фактора (145, 146).

Ћелије организма уобичајено пролазе кроз строго контролисан ћелијски циклус, који подразумева раст и деобу ћелије ради стварања нових, такозваних „ћерки ћелија“, које замењују старе или оштећене ћелије. Поред сигнала који подстичу њихов раст и пролиферацију, здраве ћелије такође примају сигнале за апоптозу – програмирану ћелијску смрт – када више нису функционалне или када је дошло до оштећења њиховог генетског материјала (147,148). Туморске ћелије стичу способност аутономне пролиферације и резистенције на апоптозу. Иако се карцином дојке може јавити код оба пола, учесталост обољевања је знатно већа код жена, које оболевају приближно 100 пута чешће него мушкарци (145). Највећи број малигних тумора дојке потиче од епитела каналића или режњева млечне жлезде. У зависности од начина раста и инвазивности, карциноми дојке се класификују као неинвазивни (*Carcinoma in situ*), који остају ограничени на примарни локус и не нарушавају базалну мембрану, и инвазивни (инфилтришући) карциноми, који нарушавају базалну мембрану, продиру у суседна ткива и имају потенцијал да се шире у удаљене органе путем лимфног и крвотока (149). У већини случајева, карцином дојке је спорадичног порекла. То значи да настаје као последица генетских оштећења стечених током живота, односно након рођења, те се као такав не наслеђује и не представља ризик за потомство (150). Узрок настанка спорадичног карцинома дојке најчешће је мултифакторски и обухвата утицај ендегених фактора, начина живота, фактора животне средине, као и нормалних физиолошких процеса као што је репликација генетичког материјала (151, 152). Приближно 10% свих карцинома дојке повезано је са наслеђеним мутацијама у генима који предиспонирају развој ове малигне болести. Најчешће мутације повезане са хередитарним карциномом дојке јесу мутације у тумор-супресорским генима BRCA1 (енгл. *Breast Cancer gene 1*) и BRCA2 (енгл. *Breast Cancer gene 2*) (153). У нормалним условима, ови гени имају кључну улогу у поправци дволанчаног прекида DNA путем

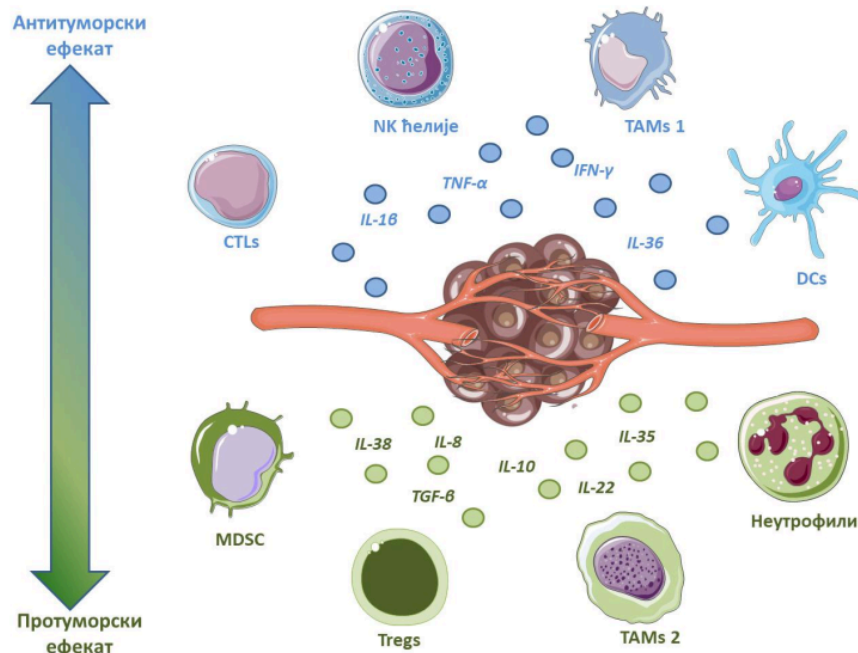
механизма хомологне рекомбинације. Мутације које утичу на губитак функције BRCA1/2 гена резултују повећаним генетским оптерећењем мутацијама и убрзаним развојем тумора, што доводи до развоја агресивнијег карцинома са лошијом прогнозом и неповољним клиничко-патолошким карактеристикама (154). Као одговор на овај повишен генетски ризик, успостављене су стратегије примарне и секундарне превенције, које укључују генетски скрининг и програме раног откривања болести. Посебно се наследни карцином дојке јавља у млађем животном добу у односу на пацијенткиње са спорадичним облицима болести. Ова млађа популација, нарочито жене узраста између 35 и 65 година, често се подвргава хемиотерапеутицима чија је примена потенцијално кардиотоксична, што их уводи у повећан ризик од кардиоонколошких компликација (155, 156).

1.4.1 Експериментални 4T1 модел карцинома дојке

Ћелијска линија 4T1 мишјег карцинома дојке током година је нашла широку примену у експерименталним истраживањима, пре свега захваљујући својој способности да формира метастазе које морфолошки и биолошки подсећају на метастатске промене код хуманог карцинома дојке (157). Управо због ових карактеристика, 4T1 линија представља поуздан и репрезентативан модел IV стадијума карцинома дојке (158, 159). Поред тога, 4T1 мишји карцином дојке се сматра добро утемељеним експерименталним моделом троструко негативног карцинома дојке (енгл. *Triple-Negative Breast Cancer- TNBC*), који се одликује брзим растом тумора и агресивним метастатским потенцијалом, како након ортотопског, тако и хетеротопског инокуирања у BALB/C мишеве (160). TNBC представља специфичан и клинички изазован хистолошки тип карцинома дојке, који се одликује одсуством естрогенских и прогестеронских рецептора, као и недостатком прекомерне експресије или амплификације рецептора за хумани епидермални фактор раста 2 (енгл. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2- HER2*) (161). Управо због одсуства ових молекулских мета, TNBC слабо реагује на стандардне хормонске терапије и HER2-усмерене лекове, који иначе представљају основу лечења других типова карцинома дојке. Ова терапијска ограничења значајно компликују лечење TNBC-а и доприносе његовој агресивности, већој стопи рецидива и неповољнијој прогнози (162-164). Додатно, лечење TNBC-а је отежано и због фармакокинетичких недостатака већине доступних цитотоксичних лекова. Ови недостаци укључују слабу растворљивост у води, лошу хемијску и метаболичку стабилност, неповољну дистрибуцију у организму и изражену токсичност, што све заједно доводи до смањене ефикасности терапије и повећаног ризика од нежељених ефеката на здрава ткива (165).

Апликација ћелија може се изводити различитим методама, укључујући директну инјекцију у масно ткиво млечне жлезде, интравенску примену путем репне вене, артеријску примену увођењем катетера у десну каротидну артерију, или интракардијалну инјекцију у леву преткомору срца. Када се 4T1 ћелије убризгају директно у ткиво дојке, на месту апликације долази до формирања примарног тумора, а у периоду од три до шест недеља након инокулације, развијају се метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу (161, 166, 167). Метастазе се најчешће јављају у плућима, јетри, костима и мозгу, што у великој мери одражава метастатску дистрибуцију типичну за хумане карциноме дојке. Развој тумора у овом моделу праћен је значајним променама у микроокружењу, како на нивоу примарне туморске масе, тако и метастатских лезија. Те промене обухватају инфилтрацију различитих ћелија имунског одговора, реорганизацију екстрацелуларног матрикса, као и интензивну ангиогенезу, што све заједно доприноси брзом напретку болести и стварању услова за ширење тумора (161, 168). Овај модел се такође показао као веома погодан за проучавање улоге имунског

система у процесима раста и прогресије тумора, што је омогућено чињеницом да је 4T1 туморска линија, у контексту генетике, компатибилна са BALB/C мишевима (164).



Слика 4. Туморско микроокружење

1.5 Антитуморски имунски одговор

Ткива одрасле јединке садрже различите ћелије које су одговорне за регулацију и одржавање ткивне хомеостазе. У случају повреде, активирају се ћелије имунског система које покрећу запаљенски процес усмерен на обнављање хомеостазе и санирања повреде (169, 170). Тумори имају сличне карактеристике као повређена ткива, активирају ћелије имунског система и подстичу хроничну инфламацију (171). Ћелије имунског система играју значајну улогу у туморском микроокружењу, где могу имати и протективни и подстицајни ефекат на развој тумора. Тумори стимулишу различите врсте имунских ћелија, као што су макрофаги, Т лимфоцити, DCs и NK ћелије, које се акумулирају унутар туморског ткива (161, 172.). Међутим, у овом микроокружењу долази до поремећаја имунског одговора, јер туморске ћелије развијају механизме избегавања имунског одговора (173). Хронична инфламација у туморској микросредини може пореметити активност имунских ћелија, што омогућава туморима да наставе са растом и ширењем у организму.

Макрофаги играју кључну улогу у борби против инфекција, ремоделовању оштећеног ткива и одржавању хомеостазе (174). Висока инфилтрација макрофагима, примећена у 80% карцинома, повезана је са лошом прогнозом (175, 176). Тумор асоцирани макрофаги (енгл. *Tumor-associated macrophages* TAMs) представљају значајну компоненту туморске масе (177). TAMs секретирају факторе раста, протеазе и цитокине омогућавају интравасацију туморских ћелија и продор у циркулацију (178).

Поларизација макрофага игра важну улогу у његовој функцији; Класично активирани, M1 макрофаги, продукују проинфламацијске цитокине, учествују у презентацији антигена и имају антитуморску улогу. Алтернативно активирани, M2 макрофаги, продукују антиинфламацијске цитокине и имају протуморску улогу (179).

Неутрофили су најзаступљенија популација леукоцита у циркулацији и играју важну улогу у раној фази инфламације. У туморима, неутрофили се регрутују као одговор на цитокине и хемоатрактанте. У туморској микросредини, неутрофили имају двоструку улогу: с једне стране, неутрофили стимулирани фактором стимулације гранулоцитних колонија (енгл. *Granulocyte colony-stimulating factor G-CSF*) помажу туморским ћелијама да се шире на секундарна туморска места (180, 181). Неутрофили могу имати N1 или N2 фенотип. N1 фенотип је проинфламацијски и ангажује CD8⁺ Т лимфоците и Th1 цитокине, што потпомаже антитуморски одговор. Насупрот томе, N2 фенотип има имуносупресивно дејство и подстиче туморогенезу преко TGF-β (182, 183).

Мијелоидне супресорске ћелије (енгл. *Myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs) су прекурсори DCs, макрофага и гранулоцита са имуносупресивним ефектом и улогом у одржавању хомеостазе (184). Њихов број у циркулацији расте током инфекција и присуства тумора, јер тумори секретују цитокине који привлаче MDSCs у крвоток (185). Код карцинома дојке, TGF-β сигнални пут повећава секрецију хемокина CXCL5, који привлачи MDSCs везивањем за CXCR2 рецептор (186). Повећана акумулација MDSCs у тумору смањује терапијску ефикасност. Њихова главна функција је инхибирање имунског надзора, прекидајући презентацију антигена и механизме ћелијске имуности, директно инхибирајући CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоците. MDSCs делују продукцијом азот монооксида и подстицањем M2 фенотипа TAMs. Заједно са TAMs, производе IL-10, који инхибира IL-12 и смањује IFN-γ продукцију од стране NK ћелија (187).

NK ћелије припадају урођеном имунском одговору. Оне могу разликовати нормалне ћелије од абнормалних, као што су туморске ћелије, без потребе за претходним контактима са антигенима. За разлику од CD8⁺ Т лимфоцита, NK ћелије користе активационе и инхибиторне рецепторе за препознавање циљних ћелија (188, 189). Активациони рецептори реагују на молекуле који се експримирају у одговору на стрес, малигне трансформације или вирусне инфекције, што доводи до убијања циљне ћелије. Инхибиторни рецептори препознају МНС молекуле класе I, који су присутни на већини ћелија са једром (188, 190). Туморске ћелије могу уклонити МНС молекуле са своје површине, чиме постају „невидљиве” за CD8⁺ Т лимфоците. У том случају, инхибиторни рецептори NK ћелија не могу да се вежу, што активира NK ћелије (191). Студије су показале да антитуморска активност NK ћелија може бити ослабљена након хируршког уклањања тумора, што је повезано са већим ризиком од метастазирања (192,193).

CD4⁺ Т лимфоцити се деле на Th1 и Th2 субпопулације у зависности од продукције цитокина. IL-12 подстиче диференцијацију у Th1 лимфоците, док IL-4 стимулише формирање Th2 лимфоцита. Th1 лимфоцити секретују проинфламацијске цитокине као што су IFN-γ, TNF-α, IL-2 и IL-12, који побољшавају антигенску презентацију и цитотоксичност CD8⁺ Т лимфоцита. Они такође ослобађају грануле које директно убијају туморске ћелије. Са друге стране, Th2 лимфоцити производе антиинфламацијске цитокине (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) и инхибирају активност CD8⁺ Т лимфоцита, подстичући протуморогене ефекте (194, 195). Насупрот томе Th2 лимфоцити такође имају антитуморска својства. Показана је позитивна корелација између инфилтрације тумора Th2 лимфоцитима и преживљавања пацијената са лимфомом (196). Однос Th1/Th2 лимфоцита може бити важан за прогностичку процену тумора, али степен инфилтрације ових субпопулација није увек пресудан (197).

Tregs су субпопулација $CD4^{+}$ Т лимфоцита која експримира $CD4$ и $FoxP3$ молекуле (198). Њихова повећана инфилтрација негативно утиче на преживљавање пацијената са карциномом дојке и хепатоцелуларним карциномом, јер ослобађају $TGF-\beta$ и $Th2$ цитокине, који инхибирају презентацију антигена и смањују ефекат $CD8^{+}$ Т и NK лимфоцита (199, 200.).

$CD8^{+}$ цитотоксички Т лимфоцити (енгл. *Cytotoxic T lymphocytes*-CTLs) елиминишу инфициране и малигно измењене ћелије. Они експримирају Т ћелијске рецепторе који препознају антигене презентоване на МНС молекулима I класе на антиген-презентујућим ћелијама (201). Активацијом, они ослобађају садржај гранула које садрже перфोरине и гранзиме. Перфорин формира поре у ћелијској мембрани кроз које гранзим В улази у цитоплазму и активира каспазе (202). Примећено је да су присутни у великом броју на ивици тумора, што побољшава ефекат хемиотерапије (203).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1 Циљеви студије

Основни циљ овог истраживања је испитивање утицаја примене семаглутида на раст и развој мишјег карцинома дојке. У складу са главним циљем истраживања дефинисани су следећи експериментални задаци:

1. Одредити утицај семаглутида на дан појаве, раст и метастазирање тумора дојке;
2. Тестирати директан цитотоксички ефекат семаглутида на туморске ћелије, *in vitro*;
3. Испитати утицај семаглутида на некрозу, ангиогенезу и микроваскуларну густину у примарном тумору дојке;
4. Деплецијом NK ћелија *in vitro* показати значај утицаја семаглутида на NK ћелије у антитуморском имунском одговору;
5. Анализирати фенотипске и функционалне особине DCs, Tregs, NK ћелија и цитотоксичких Т лимфоцита, након индукције тумора, са/без апликације семаглутида.

2.2 Хипотезе студије

1. Примена семаглутида значајно успорава раст примарног карцинома дојке и смањује учесталост метастазирања;
2. Семаглутид не показује значајан директан цитотоксички ефекат на туморске ћелије, *in vitro*;
3. Примена семаглутида утиче на некрозу али не и на, ангиогенезу и не мења микроваскуларну густину у примарном тумору дојке;
4. Деплеција NK ћелија не утиче значајно на динамику раста примарног тумора у мишева третираних семаглутидом;
5. Апликација семаглутида значајно утиче на фенотипске и функционалне карактеристике DCs, Tregs и цитотоксичких Т лимфоцита, док значајно мање утиче на фенотип NK ћелија.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експерименти су реализовани у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, у периоду од 2022. до 2024. године. Истраживање је одобрено од стране Етичке комисије за заштиту добробита огледних животиња Факултета медицинских наука у Крагујевцу број 01-2214.

3.1 Лабораторијске животиње

У студији су коришћене женке мишева старости од 8 до 10 недеља, соја BALB/C *wild type*. Експерименталне животиње су биле усклађене по старости и телесној маси у оквиру експерименталних група. Мишеви су набављени са Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду и узгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Мишеви су гајени под контролисаним лабораторијским условима (22 ± 2 °C, релативна влажност $51 \pm 5\%$ и наизменични 12-часовни циклус светлости и таме) током целе студије. За време свих експеримената, животињама је био омогућен слободан приступ стандардној храни и води.

3.2 Тестови вијабилности- MTT и *Crystal violet*

Тестови вијабилности у *in vitro* условима рађени су на две ћелијске линије карцинома дојке, мишијој 4T1 и људској MDA-MB-231, користећи тестове 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) и кристал виолет (енгл. *Crystal violet*- CV) тест, као што је раније описано (204). Тест мери активност ензима сукцинат дехидрогеназе, који је активан само у живим ћелијама. Редукцијом MTT реагенса жути тетразолијум се преводи у љубичасти формазан, при чему интензитет љубичасте боје корелира са бројем живих ћелија, јер одражава метаболичку активност. Процедура почиње додавањем циљних ћелија у микротитар плоче са 96 бунара равног дна. Ћелије се претходно одвајају третманом трипсином, након чега се проверава њихова вијабилност. У експериментима су коришћене ћелијске суспензије са преко 90% вијабилности. Затим се ресуспендују у комплетном медијуму и додају по 5×10^3 ћелије у сваки бунар. Након центрифугирања на 1500 rpm 5 минута, плоче се инкубирају преко ноћи. Другог дана, након уклањања супернатанта, додају се ефекторске ћелије у сваки бунар. Након инкубације преко ноћи, плоче се поново центрифугирају, а затим се дода MTT раствор. Инкубирају се на 37°C током 4 сата, а затим се кристали формазана растворе са DMSO (*Dimethylsulfoxide*)/глицинским пуфером. Након 30 минута мешања на собној температури, оптичка густина се мери на читачу плоча на таласној дужини од 570 nm. CV тест представља додатну методу за процену вијабилности и пролиферације ћелија, засновану на способности кристал виолет боје да се везује за DNA адхерентних ћелија. Након фиксације ћелија и бојења, вишак боје се испира, а затим се везана боја екстрахује. Апсорпција екстраховане боје мери се на таласној дужини од 570 nm, при чему интензитет боје корелира са бројем вијабилних ћелија.

Све ћелијске линије су комерцијално доступне и потичу из Америчке колекције културних сојева (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA*). Ћелије су узгајане на 37°C у влажној атмосфери са 5% CO₂ и одржаване у RPMI-1640 медијуму обогаченом са 10% хипертермично инактивираног феталног телећег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum*- FBS), 2 mM L-глутамина, 0,01% натријум-пирувата, пеницилином (100 јединица/mL) и стрептомицином (100 µg/mL) (комплетан медијум за раст). Субконфлуентни монослојеви, у фази логаритамског раста, добијени су краткотрајним третманом са 0,25% трипсином и 0,02% EDTA у фосфатном пуферу (енгл. *Phosphate*-

uffered Saline- PBS) и опране три пута у PBS-у (PAA Laboratories GmbH) без серума пре употребе у свим *in vitro* и *in vivo* експериментима. Вијабилност ћелија је утврђена применом *trypan blue* теста, а за даље експерименте су коришћене само суспензије са вијабилношћу од најмање 95%. Растворен семаглутид (0,5 mg/0,37 mL) чуван је на +4°C. Радне концентрације су припремане у медијуму за култивацију пре третмана. За утврђивање вијабилности ћелија коришћен је МТТ тест, при чему су ћелије инкубиране са МТТ раствором (0,5 mg/mL) отприлике пола сата, док нису формирани љубичасти формазан кристали, који су затим растворени у DMSO. Алтернативно, ћелије су фиксиране са 4% PFA током 10 минута, а затим обојене са 0,02% CV раствором током 15 минута на собној температури. Боја је затим растворена у 33% ацетној киселини. Абсорбанца боје за оба теста вијабилности мерена је помоћу аутоматског читача микроплоча на таласним дужинама 570/670 nm. Резултати, из три независно изведена експеримента, изражени су као проценат абсорбованих вредности контролних, нетретираних ћелија, којима је арбитрарно додељена вредност вијабилности од 100%.

3.3 Индукција карцинома дојке

У овим експерименталним моделима коришћена је ћелијска линија 4T1, која потиче од мишијег тумора дојке (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA). Ова линија је изолована из спонтаног развијеног тумора дојке код BALB/C миша и користи се као анимални модел за истраживање IV стадијума карцинома дојке.

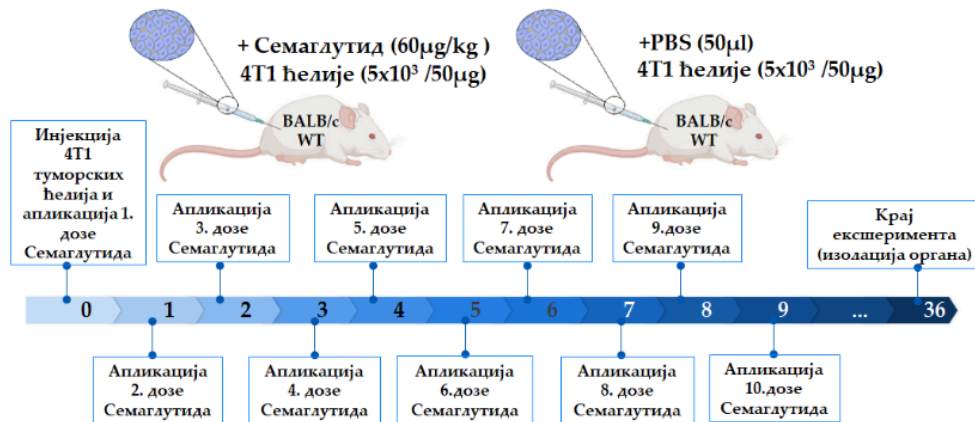
Туморске ћелије 4T1 су култивисане у DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagle Medium) са 10% FBS, 2 mmol/l L-глутамина, 1 mmol/l пеницилин/стрептомицина и 1 mmol/l не-есенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Ћелије су одмрзаване из течног азота у воденом купатилу на 37°C. Након тога додато је 9 ml комплетног медијума, а затим су ћелије центрифугиране на 1500rpm током 10 минута, како би се уклонио крио-протективни медијум који садржи 5% DMSO. Након уклањања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума и култивисане у асептичним условима на 37°C уз 5% CO₂. Време удвостручавања броја ћелија износило је од 24 до 48 сати. Пре почетка експеримената, субконфлуентне ћелије (око 80% конфлуентности) одвојене су са дна флашка краткотрајном применом трипсина [0,25% трипсин са 0,02% EDTA (PAA Laboratories GmbH) у PBS-у]. Затим су ћелије ресуспендоване у 6 ml DMEM медијума са 10% FBS у циљу неутрализације трипсина, а затим су центрифугиране при 1500rpm током 10 минута. Затим су додатно опране PBS-ом без FBS пре употребе у експериментима. Вијабилност ћелија је процењена уз помоћ *trypan-blue* теста и само су ћелије са вијабилношћу већом од 95% коришћене у истраживањима. У овом истраживању за индукцију тумора коришћено је 5x10³ ћелија. Малигне ћелије 4T1 (5x10³) су ресуспендоване у 50 µl PBS-а и инјектоване директно у масно ткиво млечне жлезде број 4 помоћу инсулинског система (шприц и игла 21G).

3.4 Начин давања семаглутида

За све *in vivo* експерименте, експерименталне животиње су подељене у две групе: 1) BALB/C мишеви третираны PBS-ом и 2) BALB/C мишеви третираны семаглутидом. Семаглутид (растворен у PBS-у) је апликован интраперитонеално у дози од 60 µg/kg почевши од дана индукције тумора и наредних десет узастопних дана. Контролни мишеви који нису примали семаглутид, добијали су инјекцију од 50 µl PBS-а истим данима.

3.5 Одређивање дана појаве и величине примарног тумора

Појава примарног тумора праћена је свакодневним палпацијама након индукције тумора. Након појаве тумора, његов пречник је мерен помоћу нониуса два до три пута недељно. Запремина тумора је израчуната након жртвовања користећи формулу: $L \times W^2/2$, где L представља највећи, а W представља најмањи пречник тумора.



Слика 5. Схема дозирања и начина примене семаглутида током *in vivo* експеримента

3.6 Одређивање присуства удаљених метастаза

Након 36. дана од индукције тумора, животиње су жртвоване, јетра и плућа су хируршки уклоњени како би се утврдило присуство метастаза.

Одмах по изолацији, узорци плућног и јетриног ткива су фиксирани у 10% раствору формалдехида на собној температури, при чему је волумен фиксатива био десетоструко већи од запремине ткива. Након фиксације, ткиво је укалупљено у парафинске блокове, а затим су микротомом исечени резови дебљине 5µm. Добијени пресеци су постављени на предметна стакла и бојени хематоксилином и еозином (енгл. *Hematoxylin and eosin-H&E*). Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56°C током 45 минута, а затим депарафинисани у ксилолу. Процес рехидратације ткива обављен је испирањем у смањујућим концентрацијама етил алкохола: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Потом је ткиво бојено Mayer-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута и испирано прво дестилованом водом, а затим текућом водом 5 минута. Затим су препарати бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. После бојења, ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. Процес дехидратације је обухватао растуће концентрације алкохола: 5 минута у 70%, затим 5 минута у 90%, 5 минута у 96% алкохолу и на крају су препарати третирани два пута по 5 минута апсолутним

алкохолом. По зрешетку бојења и дехидратације, препарати су просветљени тако што су потапани по 1 минут у мешавину ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 1 минут у чистом ксилолу. Ткивни исечци су покривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Serbia*) и покровним стаклима. После 24 сата сушења, препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*).

Метастазе у плућима и јетри су детектоване помоћу микроскопа. У оквиру ове студије, утврђена је инциденца метастазирања, односно број мишева са детектабилним метастазама у плућима или јетри. Резултати су приказани као просечна вредност $\pm$ стандардна грешка.

3.7 Деплеција NK ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита *in vivo*

Мишевима су селективно уклоњене ћелије (NK ћелије или CD8⁺ Т лимфоцити) пре индукције 4Т1 карцинома дојке. Палпацијом је праћен развој и раст примарног тумора. За деплецију CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија, коришћена су моноклонска антитела IgG класе која су специфична за ове ћелије. Везивање антитела изазива елиминацију обележених ћелија од стране сопственог имунског система (205).

Деплеција NK ћелија извршена је интраперитонеалном применом 20 μ g анти-*asialo* GM1 антитела (*Invitrogen*) мишевима, један дан пре и петог дана након инокулације тумора. Ефикасност деплеције је потврђена проточном цитометријом анализом спленоцита, при чему је ефекат био већи од 95%.

Деплеција CD8⁺ Т лимфоцита извршена је интраперитонеалном апликацијом 100 μ g анти-CD8 моноклонског антитела (YTS 169.4) мишевима, један дан пре и на петог дан након инокулације тумора. Ефикасност деплеције потврђена је 24 сата након примене антитела помоћу проточне цитометрије анализом спленоцита, а ефекат је био већи од 95%.

3.8 Квантификација некрозе

Ткивни пресеци тумора су фотографисани појединачно при увећању од 200x. Некроза, дефинисана као безћелијска (бледо ружичаста) подручја унутар тумора, идентификована је помоћу H&E бојења (206). Квантитативно одређивање некрозе је извршено као што је описано у претходним студијама (207). Свако специфично подручје од интереса (некроза) је ручно обележена коришћењем алата за слободно цртање и измерена помоћу функције *Analyze* у *ImageJ*. Резултати су представљени као проценат некротичног подручја у односу на укупно видно поље.

3.9 Имунохистохемијске анализе

Експресија VEGF, α - глатко мишићног актина (енгл. *α -Smooth muscle actin- α -SMA*), и CD31 у ткиву примарног тумора дојке анализирана је методом имунохистохемије, уз употребу моноклонских/полиоклонских антитела специфичних за VEGF (*ab16883, Abcam, Cambridge, UK*), α -SMA (*ab7817, Abcam, Cambridge, UK*) и CD31 (*ab28364, Abcam, Cambridge, UK*) као што је раније описано (3). Ткиво је фиксирано у 4%-тном неутралном, пуферизованом формалдехиду током 24 сата и калупљено у парафин. Резови дебљине 3-4 μ m су постављени на високо адхерентне плочице *SuperFrost®* и сушени на температури од 56°C током једног сата. Исечци су депарафинизовани пролазом кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Процес ослобађања антигена извршен је „кувањем” узорака у микроталасној пећи на 560W, у цитратном пуферу, два пута по 5 минута и једном 8 минута. После тога, плочице су испиране текућом водом 5 минута. Ткиво је затим третирано 3% раствором водоник-пероксида (H₂O₂) током 5 минута. Након испирања, плочице су премештене у фосфатни пуфер, осушене и обележене посебном оловком. Затим су постављене у влажну комору,

где је на њих нането примарно антитело (100 μ l), које је инкубирано 30-60 минута. Након инкубације, плочице су испране фосфатним пуфером и третиране секундарним антителом према упутствима произвођача, које је такође инкубирано у складу са препорукама. Реакција је визуализована наношењем AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole) и инкубацијом 5-10 минута. После испирања, узорци су обојени по Mayer-овој методи и прекривени покривним стаклом са глицеролом.

Негативне контроле су третиране на исти начин, изостављајући примарна антитела. Позитивне контроле су се састојале од ткива за које се знало да садржи протеин од интереса. Фото-микрографије су снимљене при увећању од 200x помоћу Olympus микроскопа (BX50 модел) са уграђеном опремом. Интензитет цитоплазматског бојења за VEGF, CD-31 и α -SMA процењиван је према ранијим публикацијама (206, 208, 209). Анти-CD-31 и α -SMA моноклонска антитела су коришћена за детекцију микроваскуларних судова. Појединачне ендотелне ћелије или групе ендотелних ћелија које су биле позитивне на CD-31/ α -SMA сматране су микроваскуларним судовима, према процени два патолога (206). На свакој слици су идентификоване три области са највишом густином микроваскуларних судова, такозвани „Hot spots”, који су фотографисани дигиталном камером при оригиналном увећању од 200x. Површина овог хистолошког поља била је 0,704 квадратна микрометра. Густина микроваскуларних судова процењена је према Weidner-у и сарадницама, бројећи микроваскуларне судове по видном пољу са великим увећањем (210). Микроваскуларна густина узорка израчуната је као аритметичка средина броја микроваскуларних судова у три хистолошка поља.

3.10 Имунофлуоресценција

За бојење методом имунофлуоресценције коришћени су крио-исечци ткива примарног карцинома дојке мишева третираних семаглутидом/PBS-ом дебљине 5 μ m. Након што су препарати одмрзнути на собној температури у трајању од 5 минута, ткиво је пермеабелизовано употребом ледено хладног ацетона на +4°C током 5 минута. Препарати су потом испрани три пута по 5 минута у PBS-у, након чега је блокирано могуће неспецифично везивање антитела употребом 200 μ l 10% нормалног козјег серума у PBS-у. Након испирања у PBS-у, нането је анти-мишје CD11c Alexa Fluor® 488 конјуговано моноклонско антитело (Santa Cruz) за идентификацију DCs. Након једночасовне инкубације на собној температури у влажној комори, препарати су поново испрани три пута у PBS-у. Након тога, додато је секундарно козје анти-зечје IgG антитело конјуговано са PE-Cy 5.5 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) у разблажењу 1:400, инкубирано 45 минута у влажној комори. Препарати су поново испрани три пута у PBS-у, а затим је нането FITC конјуговано антитело на мишји инсулин (Abcam) у запремини од 200 μ l са разблажењем 1:400. Након последњег испирања PBS-ом, на обојене пресеке ткива нанет је медијум који садржи DAPI за визуализацију нуклеуса (ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Имунофлуоресцентна анализа извршена је помоћу инвертног микроскопа Nikon Eclipse Ti-E са одговарајућим софтвером (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Током анализе извршене су само промене у осветљености и контрасту.

3.11 Изолација спленоцита

Након жртвовања у атмосфери zasiћеној диетилетром, 36. дана експеримента, мишевима је изолована слезина. Поступак изолације спленоцита изведен је на температури од +4°C. Прво је слезина потиснута кроз ћелијско сито (Cell strainer, BD Pharmingen, USA) са помоћним медијумом (RPMI-1640, PAA Laboratories GmbH, са

10% FBS) у 50ml епрувету. Издвојене ћелије су центрифугиране 5 минута при 1500гpm. Супернатант је одливен, а ћелијски талог је третиран раствором за лизирање који садржи 4mg EDTA, 100mg NaHCO₃, 826mg NH₄Cl у 100ml ddH₂O и инкубирано на леду 5 минута. Лизирање је заустављено додавањем RPMI-1640 медијума са 10% FBS. Након поновног центрифугирања, талог је ресуспендован у 8ml RPMI-1640 са 10% FBS. Како би се избегла контаминација спленоцита хистиоцитима, ћелије су поново пропуштене кроз ћелијско сито. Суспензија ћелија добијена овим поступком коришћена је за проточну цитометрију. Након изолације, вијабилност ћелија је одређена помоћу *trypan-blue* бојења под светлосним микроскопом, а само суспензије са вијабилношћу већом од 90% су коришћене у експериментима.

3.12 Изолација тумор-инфилтришућих леукоцита

По истеку 36. дана од инокулације тумора, сви мишеви су жртвовани у атмосфери засићеној етилетром. Након изолације, примарни тумори су уситњени маказама и испрани 2-3 пута у PBS-у. Уситњени тумори су ресуспендовани у 5 ml медијума за дигестију, који се састојао од 2 mg/ml колагеназе тип I, 1 mM EDTA у 10 ml RPMI и 2% FBS. Дигестија је трајала два сата на 37°C уз константно мешање на шејкеру. Након завршене дигестије, ћелијска суспензија је центрифугирана 5 минута при 1500гpm. Супернатант је одливен, а талог је затим третиран са 10 ml претходно загрејаног трипсина и инкубиран 3 минута на 37°C. Садржај епрувета је поново центрифугиран 10 минута на 1500 гpm. На талог је додато 2,5 ml претходно припремљене и загрејане DNA-зе (10 µg/ml), а инкубација је трајала 1 минут на 37°C. Након инкубације, у епрувете је додато 7 ml комплетног медијума, након чега је садржај поново центрифугиран 10 минута на 1500гpm. Супернатант је одливен, а затим је додато 5 ml свеже припремљеног комплетног медијума. Добијена суспензија је процеђена кроз ћелијско сито и поново центрифугирана под истим условима. Ћелије су ресуспендоване у 0,5 ml комплетног медијума. Бројање ћелија и процена њихове вијабилности извршени су помјоћу *trypan-blue* бојења, а само суспензије са вијабилношћу већом од 90% су коришћене у експериментима. Овако припремљена суспензија појединачних тумор-инфилтришућих леукоцита коришћена је за даља испитивања.

3.13 Фенотипизација и процена функционалног статуса ћелија слезине и моноклеарног инфилтрата примарног тумора

Проточном цитометријом су 36. дана након индукције тумора идентификоване различите субпопулације лимфоцита и акцесорних ћелија из слезине и примарног тумора и утврђена је њихова процентуална заступљеност. Анализиране су NK и NKT ћелије, различите субпопулације Т лимфоцита, DCs и MDSC уз процену њиховог функционалног фенотипа.

3.13.1 Бојење мембранских ћелијских маркера

За идентификацију мембранских маркера у циљу фенотипизације и одређивања функционалног фенотипа субпопулација моноклеарних ћелија из слезине и примарног тумора, коришћена су анти-мишија моноклонска антитела (Табела 1). На 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (*Staining Buffer*, *BD Biosciences*) додата је одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела која су специфична за антигене различитих субпопулација моноклеарних ћелија. Ћелије изоловане из слезине и примарног тумора инкубиране су и са адекватним изотипским контролама (*Elabscience*, *Miltenyi Biotec*, *eBioscience*, *BioLegend*, *Invitrogen*, *BD Biosciences*).

Сва антитела за бојење мембранских ћелијских маркера, као и изотипске контроле, коришћена су у концентрацијама које су омогућавале да крајње разблажење буде 1:100 у суспензији ћелија. Након кратког вортексовања, узорци су инкубирани 30 минута у мраку на температури од +4°C. По завршетку инкубације, ћелије су опране додавањем 2 ml хладног пуфера за бојење (*Staining Buffer*, *BD Biosciences*) и центрифугиране 5 минута при 1500rpm. Супернатант је одливан, а талог ћелија ресуспендован у 250 µl пуфера за бојење. Одмах након бојења, експресија површинских маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences*) уз помоћ *FlowJo* (*Tree Star*) софтвера. За све анализе коришћен је регион моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. У свакој цитометријској анализи регистровано је најмање 20 000 догађаја.

3.13.2 Бојење унутарћелијских маркера

У овом истраживању, ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA; Sigma) и јономицином (*Ionomycin*; Sigma). Ови активатори снажно покрећу активност PKC и подстичу интрацелуларну акумулацију калцијума, што повећава експресију гена за цитокина у ћелијама које су већ биле активирани физиолошким стимулусима (211). Инкубација је трајала 4 сата. Током стимулације ћелија *in vitro* коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgiStop*TM (који садржи моненсин) и *BD GolgiPlug*TM (који садржи брефелдин А). Ови инхибитори блокирају интрацелуларни транспорт, што доприноси акумулацији цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, чиме се повећава могућност детекције ћелија које производе цитокине (212, 213). Будући да моненсин и брефелдин А имају цитотоксични ефекат који зависи од дозе и времена излагања, излагање ћелија овим агенсима не сме прелазити 12 часова, јер дужи период инкубације може бити токсичан за ћелије.

Суспензија спленотоца (1×10^6 /ml) је припремљена у комплетном медијуму и инкубирана на 37°C са 5% CO₂. У суспензију су додати PMA (Sigma; 50ng/ml) и јономицин (Sigma; 500ng/ml). После два сата, додат је *BD GolgiStop*TM (0,7µl/ml), који блокира секрецију цитокина и повећава њихову акумулацију у ћелији.

Након завршетка предвиђеног времена активације, ћелије су центрифугиране 5 минута на 1500rpm и ресуспендоване у пуферу за бојење (*Staining Buffer*, *BD Biosciences*). Прво је урађено бојење мембранских маркера према раније описаној методи. По завршетку инкубације, ћелије су испране са 2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 1500rpm. Затим су фиксирани и пермеабилizовани применом 250 µl раствора за фиксацију и пермеабилizацију (*Fixation/Permeabilisation solution*, *BD Biosciences*) на +4°C током 20 минута. Пре и после додавања раствора, узорци су добро вортексовани. После инкубације, ћелије су опране са 2 ml 10%-тног пуфера за пермеабилizацију (*Perm/WashTM*, *BD Biosciences*) 5 минута на 1500 rpm. Након уклањања супернатанта, додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина (Табела 1), а ћелије су инкубирани 30 минута на +4°C. Примарно конјугована анти-мишја антитела коришћена су у разблажењу 1:100. По завршетку инкубације, ћелије су поново испране у 2 ml 10%-пуфера за пермеабилizацију (*Perm/WashTM*, *BD Biosciences*) и центрифугиране 5 минута на 1500 rpm. После последњег прања, ћелије су ресуспендоване у 250 µl пуфера за бојење. Одмах након бојења, ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences*).

Антитело	Клон	Произвођач
CD3	REA641	Miltenyi Biotec
CD49b	DX5	Invitrogen
CD8	QA17A07	BioLegend
CD4	H129.19	BD Biosciences
CD25	PC61.5	Elabscience
FoxP3	REA788	Miltenyi Biotec
CD11c	N418	Molecular Probes
CD11b	OTI12C10	Invitrogen
CD107a	REA792	Miltenyi Biotec
Perforin	5B10	eBioscience
Granzim B	NGZB	eBioscience
NKG2D	REA1175	Miltenyi Biotec
CD69	REA824	Miltenyi Biotec
PD1	REA1165	Miltenyi Biotec
MHC II	REA813	Miltenyi Biotec
CD86	GL1	eBioscience
IL-1 β	30311	R&D Systems
IL-10	JES5-16E3	BioLegend
IFN- γ	XMG1.2	BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	Miltenyi Biotec
TGF- β	OTI9A11	Invitrogen

Табела 1. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији

3.14 Изолација ћелија имунског система из слезине

По истеку 21. дана од инокулације 4T1 тумора дојке, мишеви су жртвовани и изоловани су спленоцити по претходно описаном поступку. Спленоцити су пропуштени кроз LS колоне магнетног MACS сепаратора (енгл. *Magnetic Cell Sorting*), а коришћена су анти-CD49b, анти-CD8 антитела и анти-CD11c антитела коњугована са магнетним честицама за изолацију NK ћелија, цитотоксичних Т лимфоцита и DCs, респективно. Цитотоксична активност NK ћелија и цитотоксичних Т лимфоцита тестирана је МТТ тестом у различитим односима циљне (4T1)/ефекторске ћелије (NK/CTL). Изоловане DCs су коришћење за даље анализе, укључујући реакцију ланчане полимеризације (енгл. *Polymerase chain reaction- PCR*).

3.14.1 Изолација NK ћелија позитивном селекцијом употребом магнетних куглица

Из суспензије моноклеарних ћелија (3×10^7) NK ћелије су издвојене позитивном селекцијом користећи магнетни MACS сепаратор. Овај процес је изведен помоћу моноклонског анти-мишијег CD49b антитела (*Clone DX5, Miltenyi Biotec*), које је било коњуговано са магнетним куглицама, у складу са препорученим протоколом произвођача (*Miltenyi Biotec*). Након изолације моноклеарних ћелија из слезине, узето је 5×10^7 ћелија које су центрифугиране 10 минута при 1500rpm. Потом је уклоњен супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 90 μ l пуфера (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA), након чега је додато 10 μ l CD49b (DX5) *MicroBeads*. Даље су спленоцити инкубирани са антителом специфичним за NK ћелије, које је било коњуговано са магнетним куглицама, током 15 минута на леду. Након инкубације, ћелије су опране у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута на 1500 rpm. Супернатант је одстрањен, а

ћелије су ресуспендоване у 500 μ l пуфера. LS колона је постављена у магнетно поље MACS сепаратора и припремљена испирањем са 3 ml пуфера. Ћелијска суспензија је затим пропуштена кроз LS колону, где су се NK ћелије везале за зидове колоне помоћу магнетних куглица конјугованих са анти-CD49b антителима. Након уклањања колоне са MACS сепаратора, додато је 5 ml пуфера како би се ослободиле везане ћелије, а затим је пластичним клипом потиснут садржај. По прикупљању позитивно селекованих NK ћелија, додато је још 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-а, а ћелије су центрифугиране 10 минута на 1500 rpm. Након уклањања супернатанта, талог ћелија је ресуспендован у 500 μ l RPMI-1640 са 10% FBS-а и процењена је њихова вијабилност *trypan-blue* тестом под светлосним микроскопом. Коришћене су ћелијске суспензије са вијабилношћу изнад 90%.

3.14.2 Изолација CD8⁺ Т лимфоцита негативном селекцијом коришћењем магнетних куглица

За изолацију CD8⁺ Т лимфоцита из слезине, коришћен је CD8a⁺ T Cell Isolation Kit mouse, у складу са упутствима произвођача (Miltenyi Biotec). Прво су изоловани спленоцити, који су пребројени, а затим је узето 10⁷ ћелија. Ћелије су центрифугиране 10 минута на 1500 rpm. Талог ћелија је ресуспендован у 40 μ l пуфера (PBS без Ca²⁺ и Mg²⁺, са 0.1% BSA и 2mM EDTA, pH 7.4). У ову суспензију додато је 10 μ l CD8a⁺ T Cell Isolation-Antibody Cocktail, који садржи антитела против различитих ћелијских маркера (CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, MHC Class II, Ter-119 и TCR γ / δ), чиме се уклањају CD4⁺ Т лимфоцити, В лимфоцити, моноцити/макрофаги, NK ћелије, DCs, еритроцити и гранулоцити. Талог је мешан и инкубиран 5 минута на температури од 2-8°C. Након тога, додато је 30 μ l пуфера и 20 μ l Anti-Biotin MicroBeads, након чега је поново инкубирано 10 минута на 2-8°C. Талог је затим ресуспендован у 500 μ l пуфера. LS колона је припремљена испирањем са 3 ml пуфера и постављена у магнетно поље на MACS сепаратору (Miltenyi Biotec). Ћелијска суспензија је пропуштена кроз колону, што је омогућило прикупљање необележених CD8⁺ Т лимфоцита. Колона је испрана са 3 ml пуфера, а необележени CD8⁺ Т лимфоцити су сакупљени. Након прикупљања негативно селекованих ћелија, додато је још 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-а, а ћелије су центрифугиране 10 минута на 1500 rpm. Након уклањања супернатанта, талог ћелија је ресуспендован у 500 μ l RPMI-1640 са 10% FBS-а и процењена је њихова вијабилност. Изоловани CD8⁺ Т лимфоцити, са приносом већим од 90%, коришћени су као ефекторске ћелије у тесту цитотоксичности.

3.14.3 Изолација дендритских ћелија позитивном селекцијом коришћењем магнетних куглица

Из суспензије моноклеарних ћелија DCs су издвојене помоћу позитивне селекције уз употребу магнетног MACS сепаратора. Ова процедура је изведена коришћењем моноклонског анти-мишијег CD11c антитела (Miltenyi Biotec), која је била конјугована са магнетним куглицама, у складу са упутствима произвођача. Након изолације моноклеарних ћелија из слезине, узето је 5 $\times$ 10⁷ ћелија које су центрифугиране 10 минута при 1500 rpm. Супернатант је уклоњен, а талог ћелија је ресуспендован у 90 μ l пуфера (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA). Затим је додато 10 μ l CD11c MicroBeads, а спленоцити су инкубирани са антителима специфичним за DCs, конјугованим са магнетним куглицама, током 15 минута на леду. После инкубације, ћелије су опране у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута при 1500 rpm. Супернатант је одстрањен, а ћелије су ресуспендоване у 500 μ l пуфера. LS колона је постављена у магнетно поље MACS сепаратора и припремљена испирањем са 3 ml

пуфера. Ђелијска суспензија је затим пропуштена кроз LS колону, при чему су DCs везане за зидове колоне помоћу магнетних куглица конјугованих са анти-CD11c антителима. Након уклањања колоне из сепаратора, додато је 5 ml пуфера како би се ослободиле везане ћелије, а затим је пластичним клипом потиснут садржај. По прикупљању позитивно селекутованих NK ћелија, додато је још 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS, а ћелије су центрифугиране 10 минута при 1500 rpm. После одливања супернатанта, ћелијски талог је ресуспендован у 500 µl RPMI-1640 са 10% FBS и њихова вијабилност је процењена *trypan-blue* тестом под светлосним микроскопом. Све ћелијске суспензије са вијабилношћу већом од 90% су коришћене у PCR анализи.

3.15 Тест цитотоксичности

Цитотоксичка активност NK ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита изолованих из слезине мишева процењена је МТТ тестом у трајању од 4 сата, при различитим односима циљних и ефекторских ћелија (Т:Е), као што је описано у литератури (214). Као циљне ћелије коришћене су 4Т1 мишије туморске ћелије, постављене у микротитар плоче са 96 бунара (5x10³ ћелија/по бунару). Након 48 сати инкубације, проценат цитотоксичности израчунат је према формули: Цитотоксичност (%) = [1 – (ефекторске и туморске ћелије / ефекторске ћелије)] × 100. Резултати су приказани као просечне вредности трипликата ± стандардна грешка.

3.16 *In vitro* имуномодулација

У циљу испитивања утицаја семаглутида на продукцију цитокина од стране спленоцита, пре свега су изоловани спленоцити из здравих BALB/C мишева, као што је раније описано (215), а укупан број ћелија одређен је методом разблаживања 1:10 уз помоћ *trypan-blue* есеја. Само ћелије са више од 95% вијабилности су коришћене у експериментима. Спленоцити су затим постављени у микротитар плоче (1x10⁶ ћелија/по бунару) и подељени у четири групе: спленоцити инкубирани са комплетним медијумом, ћелије стимулисане са конканавалином А, познатим пан-активатором Т лимфоцита (енгл. *Concanavalin A* – ConA) (0,5 µg/ml), спленоцити третирани семаглутидом (10nM) и група која је третирана и семаглутидом и ConA (216, 217). Ђелије су инкубиране 24 сата на 37°C у влажном окружењу са 5% CO₂. Након инкубације, вијабилност је процењена коришћењем *trypan-blue* теста, а резултати су показали да је животна способност у свим групама била изнад 90% без разлика између група. После инкубације, ћелије су центрифугиране, а супернатанти су сакупљени и чувани на -80°C до извођења анализе. Концентрације цитокина IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-17 и IL-10 мерене су помоћу високоосетљивих ELISA тестова од R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) у складу са упутством произвођача (218). Производња цитокина процењена је проточном цитометријом, употребом антитела обележених флуорохромима која су специфична за IL-10, IL-1β, TNF-α, IFN-γ и IL-17, као што је раније описано (219).

3.17 Изолација RNA и реакција ланчане полимеризације

За анализу експресије жељених гена (Табела 2) као узорак-су коришћене CD11c⁺ ћелије изоловане из слезине мишева са тумором. Ђелије су инкубиране са семаглутидом и PBS-ом у трајању од 24 сатова.

После мерења концентрације RNA на *Gene Quant* колориметру, у раствор који садржи 1 µg RNA додато је 15 µl воде и 0,2 µg насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius, Lithuania*). Затим је у раствор додат dNTP (3'-деокси нуклеотид трифосфат) (*Fermentas, Vilnius, Lithuania*) тако да је финална концентрација износила 1mM. Вода је коришћена као контрола за евентуалну контаминацију. Раствори су инкубирани 10 минута на 70°C

како би се прајмери (хексамери) везали за RNA. Након инкубације, узорци су постављени на суви лед, а након пет минута додато је по 4 μ l пуфера за реверзну транскрипцију и 1 μ l реверзне транскриптазе. Након тога је уследила инкубација од 10 минута на 25°C, а затим 60 минута на 42°C у циљу спровођења реверзне транскрипције. Реакција је прекинута инкубацијом на 70°C током 10 минута. Тако је добијена комплементарна DNA, која је након тога чувана на +4°C до употребе у PCR реакцији.

	Forward sequence	Reverse sequence
GAPDH	ACTCCACTCACGGCAAATTC	TCTCCATGGTGGTGAAGACA
NFAT	GGTGCCTTTTTCGAGCAGTATC	CGTATGGACCAGAATGTGACGG
NKG2D	CCAAGCTTCCTGTTTGTCTCA	TCCCATCCAGTGATAGGACTT
pAkt	AAGGAGGTCATCGTCGCCAA	ACAGCCCCGAAGTCCGTTATC
PI3K	ACTTTGTGACCTTCGGCTT	TCCTGTACTTCTGGATCTTTAA
MHC I	GGGAGCCCCGGTACATGGAA	GGTGACTTTATCTTCAGGTCTGCT
TAP	GACTCCTTGCTCTCCACTCAGT	AACGCTGTCACCGTTCAGGAT

Табела 2. RNA секвенце коришћене за qRT-PCR испитивање

Реакција ланчаног умножавања-у реалном времену изведена је на апарату ABI *Prism 7500 Thermocycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Реакције су припремане према стандардном протоколу (220) уз коришћење комерцијално-доступних прајмера (Табела 2) (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Први корак RT-PCR реакције био је 2 минута на 50°C, након чега је уследило загревање на 95°C током 10 минута. Реакција је укључивала 40 циклуса, који су се састојали од 15 секунди топлења на 95°C, након чега је уследио један минут везивања прајмера и синтезе DNA на 60°C. Све реакције су извођене у трипликатима. Праг за анализу циклуса подешен је на 0,1 релативних флуоресцентних јединица. Резултати су приказани као релативне вредности у односу на контролу, која је арбитрарно подешена на 1.

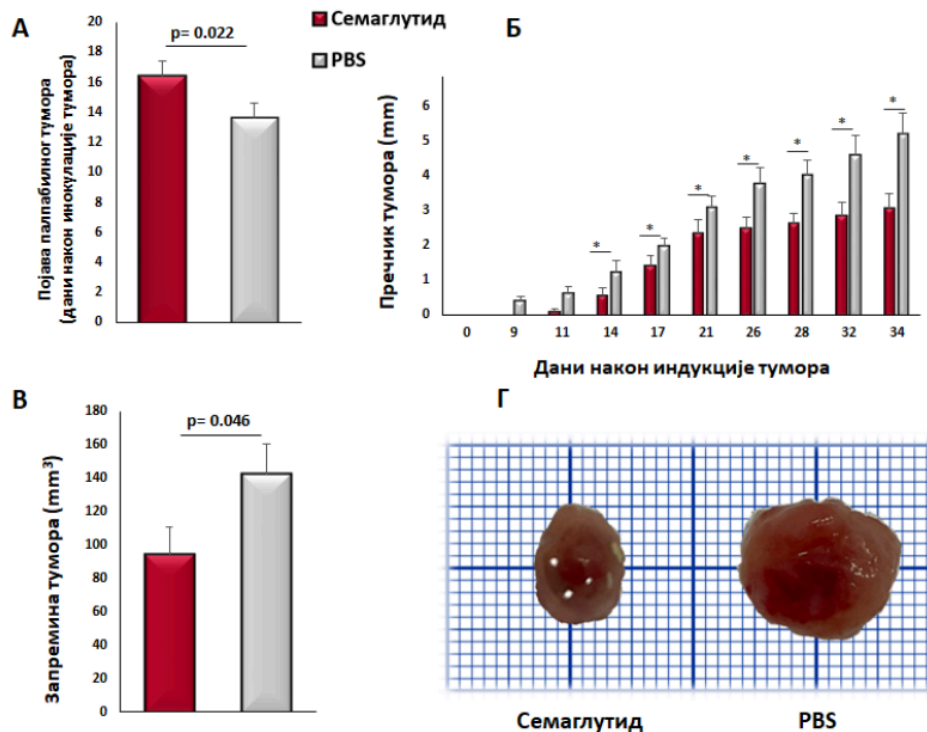
3.18 Статистичка обрада података

Подаци су обрађени помоћу комерцијално доступног софтвера (*SPSS* верзија 23.0). За све анализе коришћени су *Student's t-test*, *Mann-Whitney U* тест или *Kruskal-Wallis* тест, у складу са потребом. Резултати су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна грешка средње вредности (SE) или средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD). Статистичка значајност је дефинисана као $p < 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Третман семаглутидом одлаже појаву палпабилног тумора дојке и успорава прогресију тумора

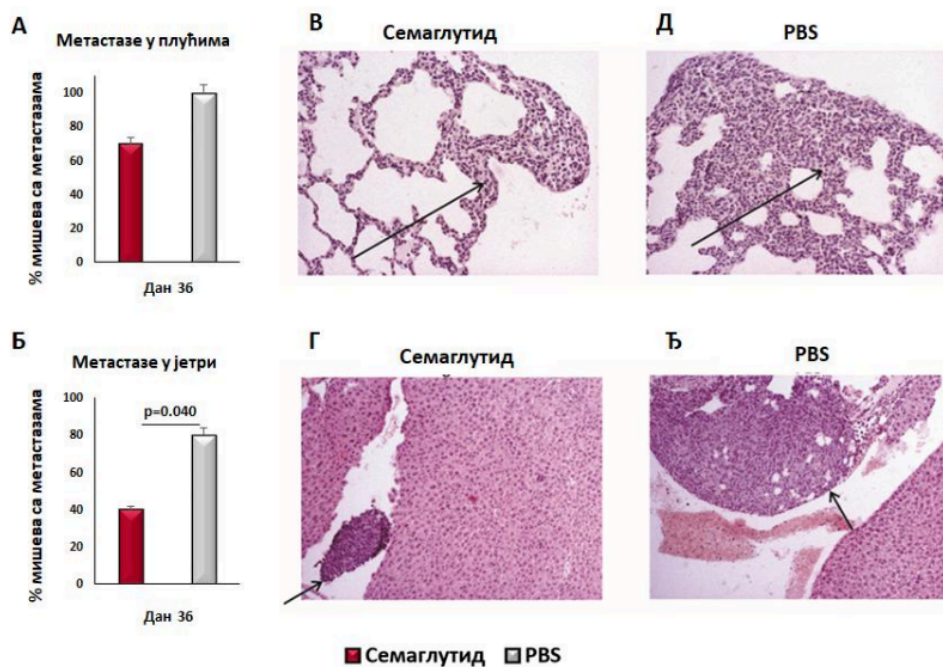
Примена семаглутида значајно је одложила појаву палпабилног 4T1 карцинома дојке код третиранних BALB/C мишева у поређењу са контролном групом (Семаглутид vs. PBS: 16.4 ± 1.3 vs. 13.4 ± 1.1 ; $p=0.022$; Фигура 1.А). Мишеви који су били третирани семаглутидом током целог експеримента имали су мање туморе у односу на контролну групу. Значајна разлика у пречнику тумора уочена је 14. дана након индукције тумора (Семаглутид vs. PBS: 0.55 ± 0.3 vs. 1.23 ± 0.2 ; $p=0.011$; Фигура 1.Б) и одржала се до 36. дана експеримента када су мишеви жртвовани (Семаглутид vs. PBS: 3.1 ± 0.4 vs. 5.2 ± 0.6 mm; $p=0.037$; Фигура 1.Б). Након жртвовања, одређен је волумен тумора, а вредности су показале да је исти био значајно мањи код мишева третираних семаглутидом (Семаглутид vs. PBS: 94 ± 11.1 vs. 142.8 ± 17.3 ; $p=0.046$; Фигура 1.В).



Фигура 1. Утицај примене семаглутида на дан појаве палпабилног тумора и прогресију мишијег карцинома дојке. Третман семаглутидом одложио је појаву палпабилног тумора (А). Мишевима су инокулисане 4T1 ћелије карцинома дојке (5×10^3). Палпабилни тумори су праћени 36 дана, а пречници тумора су мерени два до три пута недељно (Б). Запремина тумора је одређена након жртвовања 36. дана експеримента (В). Приказане су репрезентативне слике тумора (Г).

4.2 Третман семаглутидом смањује метастатско ширење карцинома дојке у јетру и плућа

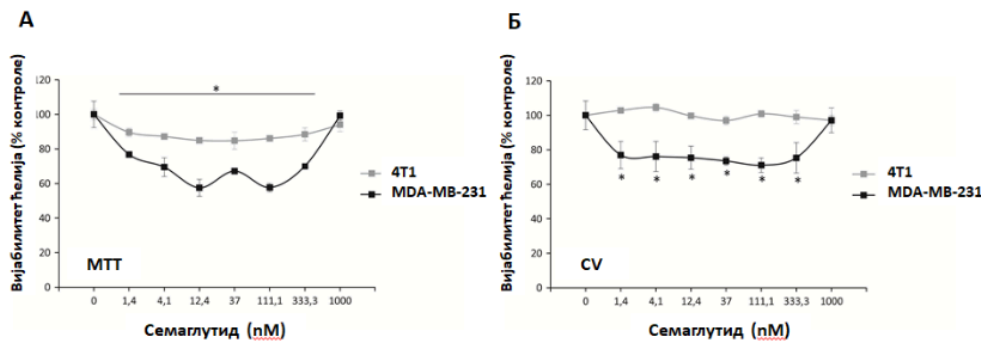
Коришћењем светлосног микроскопа, процењено је метастатско ширење туморских ћелија у паренхимске органе. Парафински исечци плућа и јетре, обојени Н&Е пажљиво су испитивани како би се утврдило присуство метастатских колонија. Појава детектабилних метастаза одређена је 36. дана након индукције карцинома дојке, након жртвовања. Проценат мишева са детектабилним метастазама у плућима био је значајно мањи у групи мишева третираних семаглутидом (7/10; 70%) у поређењу са PBS-третираним мишевима (10/10; 100%) (Фигура 2.А). Такође, 10 од 10 PBS-третираних мишева (100%) развило је бројне метастазе у јетри, док је само 5 од 10 мишева третиранних семаглутидом (50%) развило метастазе у јетри ($p=0.040$), као што је приказано на Фигури 2.Б. Такође, запажено је да су метастатске колоније код PBS-третираних мишева биле веће у поређењу са онима код мишева третираних семаглутидом.



Фигура 2. Метастатско ширење туморских ћелија у плућа и јетру код мишева третираних семаглутидом. Анализом парафинских исечака плућа и јетре обојених хематоксилин-еозином, процењено је метастатско ширење туморских ћелија у плућа (А) и јетру (Б). Репрезентативне слике приказане на панелима у средини и десно (увећање, 10х) приказују секције ткива плућа и јетре (В-Ѕ) са метастатским колонијама (стрелице).

4.3 Примена семаглутида не показује директан антитуморски ефекат

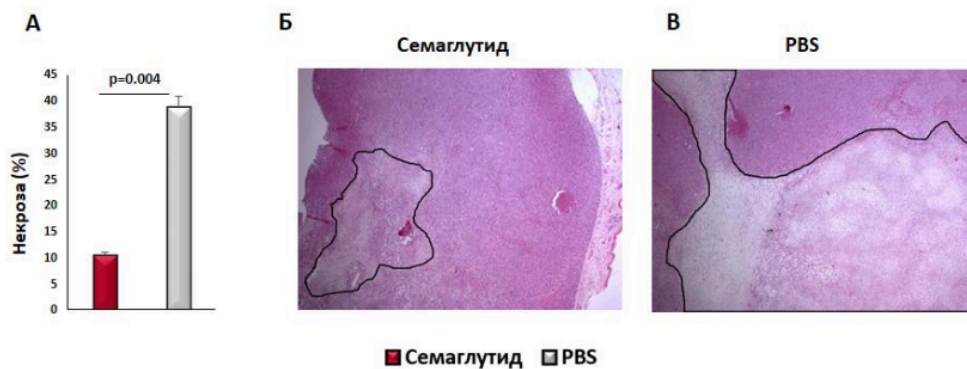
Да би се тестирао директан туморицидни ефекат семаглутида, ћелијске линије 4T1 и MDA-MB-231 постављене су у микротитар плоче са по 96 бунарчића у густини од 2×10^3 и 4×10^3 ћелија по бунару, респективно. Следећег дана, обе ћелијске линије биле су изложене широком опсегу концентрација (1.37 – 1000 nM) семаглутида током 72 сата. Процена вијабилности ћелија помоћу MTT и CV тестова није показала значајан пад броја вијабилних ћелија. Према оба теста, семаглутид није убио више од 50% ћелија и нису детектоване IC₅₀ вредности ни са највишим концентрацијама семаглутида (Фигура 3. А, Б).



Фигура 3. Утицај примене семаглутида на вијабилност мишјих и хуманих ћелија карцинома дојке *in vitro*. Вијабилност мишјих 4T1 и хуманих MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке третираних широким опсегом концентрација семаглутида (1.37 – 1000 nM) током 72 часа одређена је помоћу MTT и CV тестова (А, Б). Вијабилност је изражена као проценат апсорпционе вредности контролних култура ћелија узгајаних у медијуму, којима је произвољно додељена вредност вијабилности од 100%.

4.4 Третман семаглутидом смањује некрозу у примарном тумору дојке

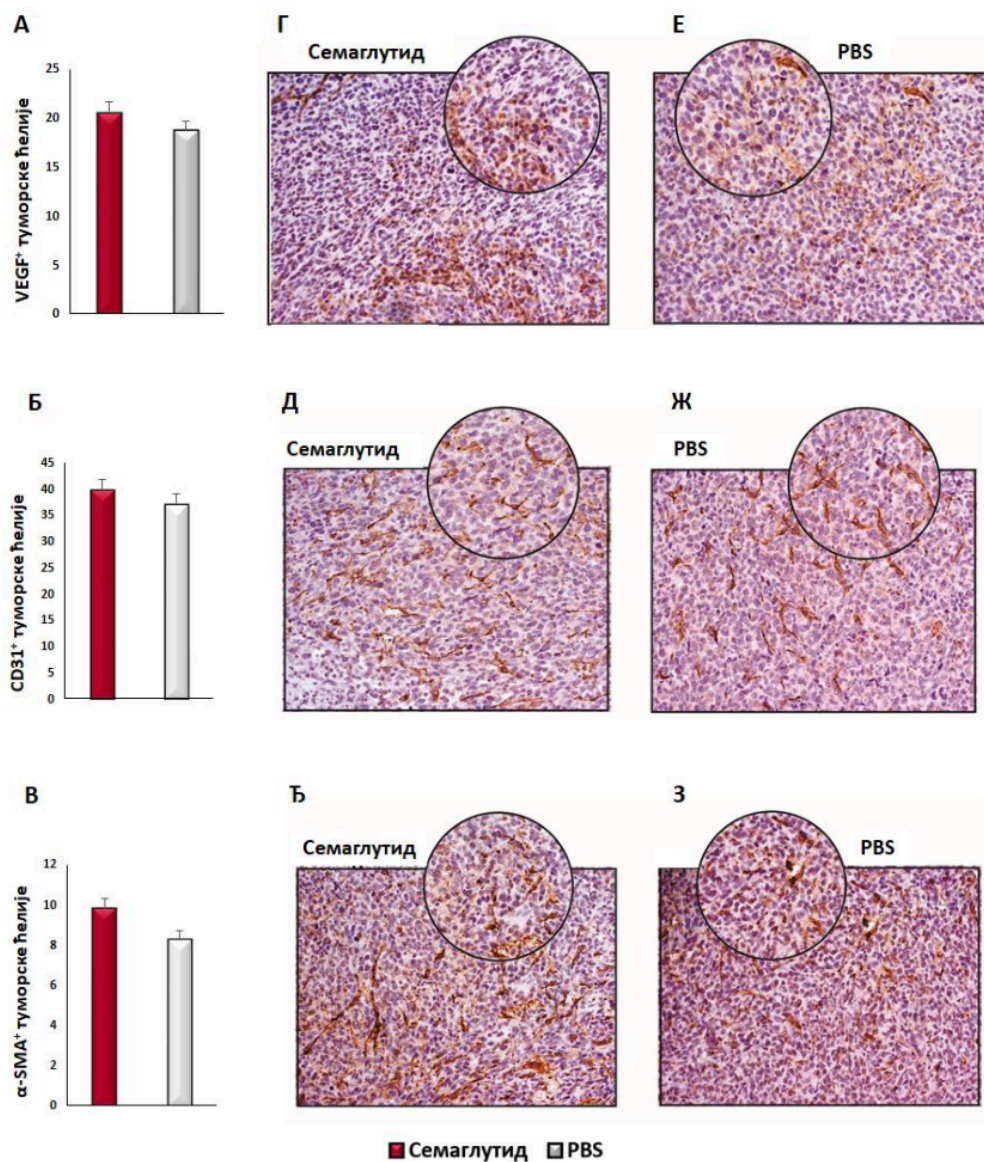
Након тридесетшестог дана експеримента, на пресецима примарног тумора анализирана је некроза ткива, где је пажљиво процењено присуство и величина некротичних поља. Квантитативна процена некротичних области извршена је светлосним микроскопом, при чему су ове области биле видљиве као бледо ружичасте, ацелуларне регије. Резултати су показали да је семаглутид значајно утицао на смањење величине ових некротичних регија. Графикон А на Фигури 4 показује проценат некрозе тумора, који је био значајно мањи код мишева који су били третирани семаглутидом у поређењу са мишевима третираних PBS-ом. Статистички значајно смањење некрозе (Семаглутид vs. PBS: 10.6 ± 0.3 vs. 38.9 ± 2.5 ; $p=0.004$; Фигура 4. Б, В) забележено је 36. дана након индукције тумора, што указује на позитиван ефекат семаглутида на смањење некрозе у туморском ткиву.



Фигура 4. Проценат некрозе у ткиву примарног тумора дојке. Примена семаглутида је значајно смањила проценат некротичног поља у примарном тумору дојке (А). Репрезентативне слике Н&Е-обојених парафинских секција тумора фиксираних формалдехидом, које приказују вијабилне и некротичне области тумора при увећању $\times 100$ (Б, В).

4.5 Апликација семаглутида не утиче на ангиогенезу и микроваскуларну густину

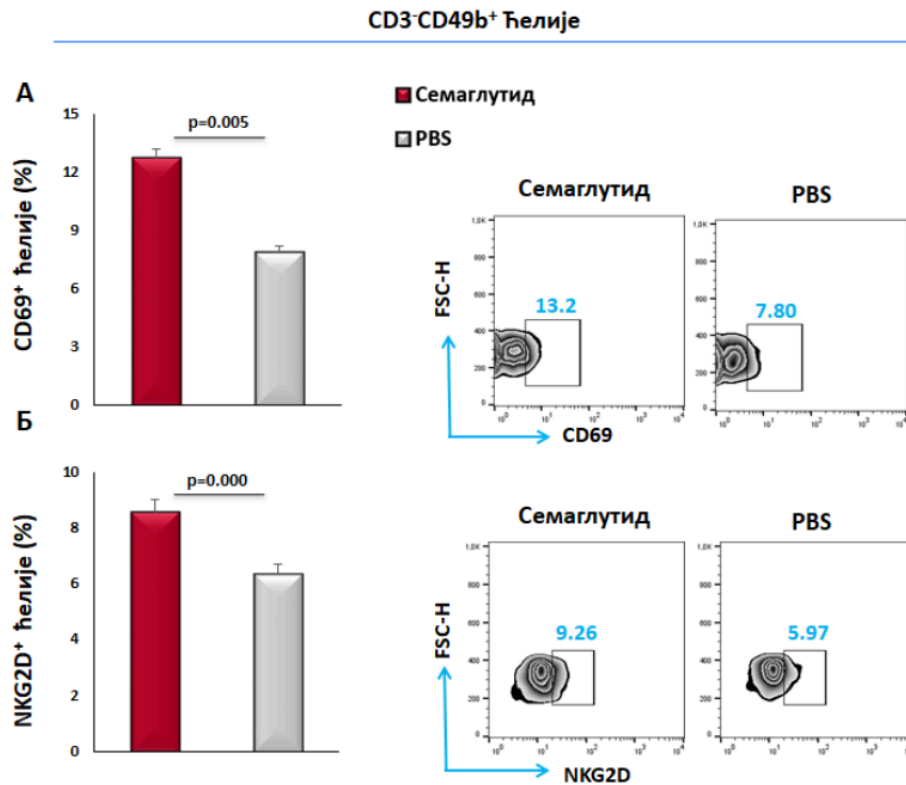
Имунохистохемијском анализом је процењена је експресија VEGF, маркера микроваскуларне густине CD31 и α -SMA у секцијама ткива примарног карцинома дојке добијених од мишева третираних семаглутидом и PBS-ом. Резултати анализе експресије VEGF показали су да није било статистички значајне разлике између примарног туморског ткива мишева који су били третираны семаглутидом и ткива мишева третираных PBS-ом (Фигура 5.А). Поред тога, није било значајних разлика у микроваскуларној густини, која је процењена на основу присуства CD31⁺ и α -SMA⁺ ћелија (Фигура 5. Б, В). Ови резултати указују да семаглутид није имао утицаја на експресију VEGF нити на микроваскуларну густину у примарном тумору.



Фигура 5. Утицај примене семаглутида на неоангиогенезу. Н&Е обојене секције тумора (увећање: $\times 100$) и квантитативно одређивање имунохистохемијске експресије VEGF, CD31 и α -SMA у примарном тумору дојке мишева третираних семаглутидом и PBS-ом (А, Б, В). Репрезентативне слике секције ткива примарног тумора (Г-З).

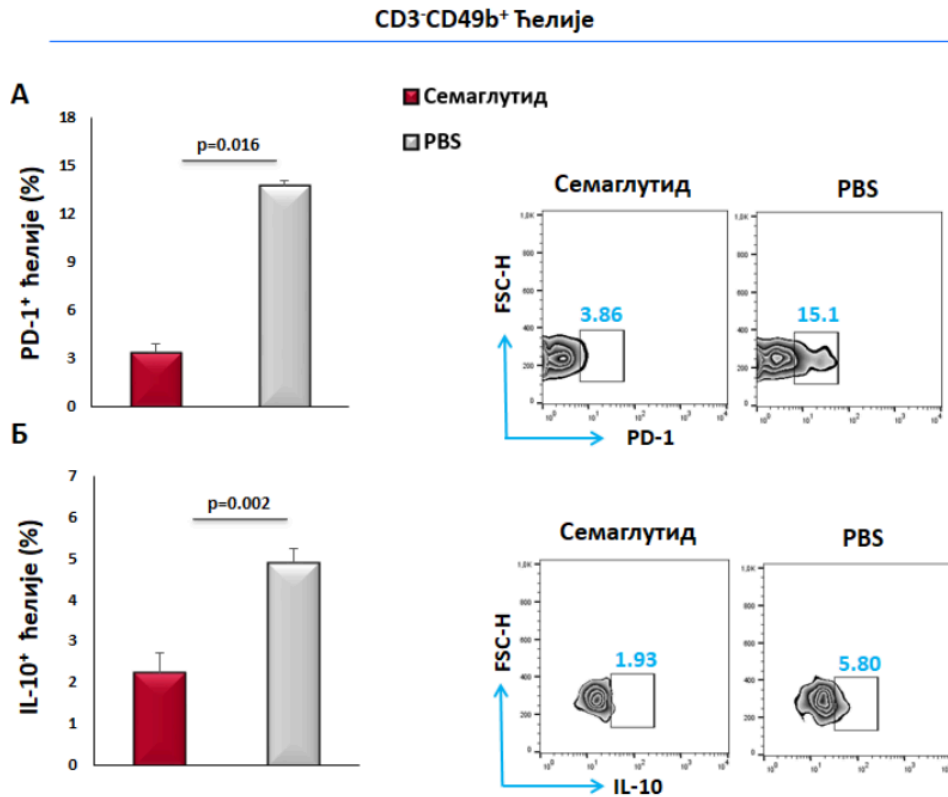
4.6 Примена семаглутида појачава антитуморски фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини и примарном тумору

У наставку истраживања испитиван је антитуморски имунски одговор, кроз анализу функционалног фенотипа имунокомпетентних ћелија из слезине и примарног тумора мишева. Методом проточне цитометрије, одређен је функционални фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом или PBS-ом. Примена семаглутида је значајно повећала експресију активационих маркера CD69 (Семаглутид vs. PBS: 13.4 ± 0.3 vs 7.5 ± 0.2 ; $p=0.005$; Фигура 6.А) и NKG2D (Семаглутид vs. PBS: 8.8 ± 0.6 vs 6.1 ± 0.4 ; $p=0.000$; Фигура 6.Б) у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у слезини мишева са примарним карциномом дојке у односу на мишеве третиране PBS-ом.



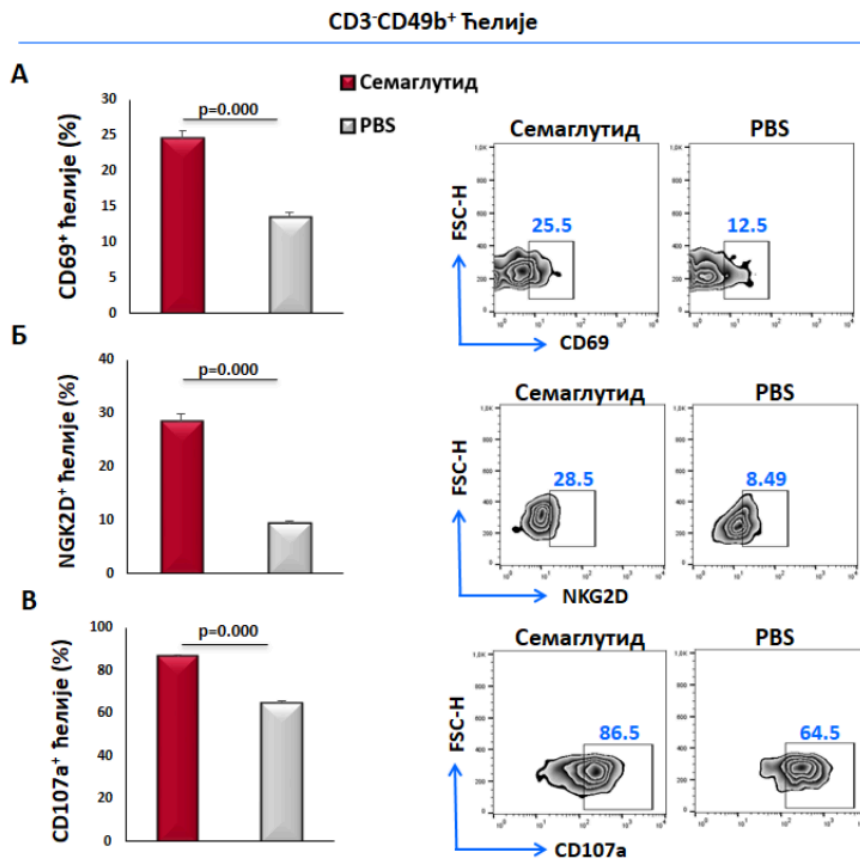
Фигура 6. Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Семаглутид повећава експресију рецептора CD69 и NKG2D на CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у слезини мишева са карциномом дојке. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD69⁺ (А) и NKG2D⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом и PBS-ом.

Истовремено, семаглутид је смањио експресију инхибиторног рецептора PD-1 (Семаглутид vs. PBS: 3.4 ± 0.3 vs 14.6 ± 0.2 ; $p=0.016$; Фигура 7.А) и IL-10 (Семаглутид vs. PBS: 2.1 ± 0.5 vs 4.9 ± 0.4 ; $p=0.002$; Фигура 7.Б) у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у слезини мишева са примарним карциномом дојке у односу на мишеве третиране PBS-ом.



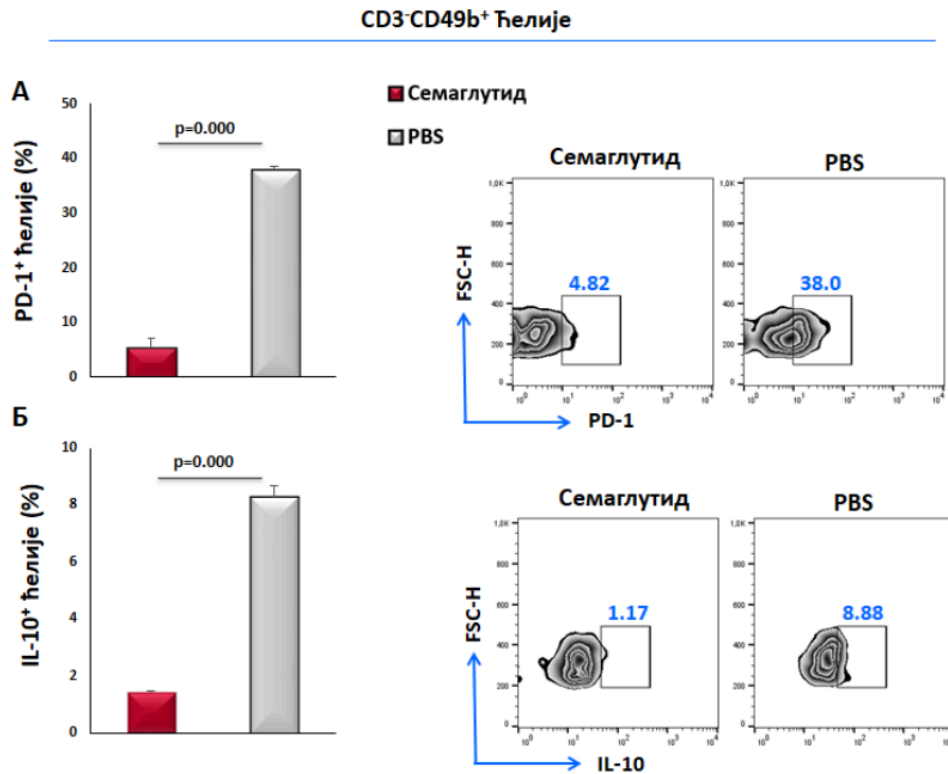
Фигура 7. Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Семаглутид смањује експресију PD-1 и продукцију IL-10 у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат PD-1⁺ (А) и IL-10⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом и PBS-ом.

Анализиран је функционални фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном тумору дојке мишева који су третирани семаглутидом или PBS-ом, проточном цитометријом. Третман семаглутидом је значајно повећао проценат CD69⁺ (Семаглутид vs. PBS: 24.9 ± 0.3 vs 12.3 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 8.А), NKG2D⁺ (Семаглутид vs. PBS: 27.8 ± 0.6 vs 8.7 ± 0.1 ; $p=0.000$; Фигура 8.Б) и CD107a⁺ (Семаглутид vs. PBS: 85.7 ± 0.1 vs 62.5 ± 0.1 ; $p=0.000$; Фигура 8.В) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у туморској микросредини у односу на PBS-третирану групу.



Фигура 8. Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ћелија у примарном тумору дојке. Семаглутид повећава експресију активационих маркера CD69, NKG2D и CD107a на CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном тумору дојке. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD69⁺ (А), NKG2D⁺ (Б) и CD107a (В) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном карциному дојке мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

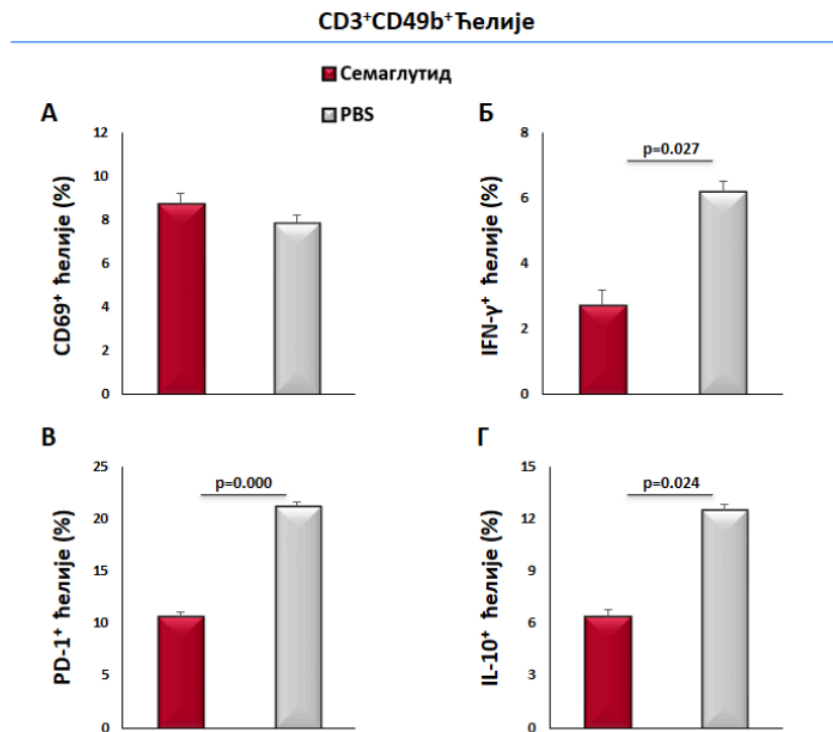
Поред тога, семаглутид је смањио експресију PD-1⁺ (Семаглутид vs. PBS: 4.7 ± 0.8 vs 37.8 ± 0.2 ; $p=0.000$; Фигура 9.А) и IL-10⁺ (Семаглутид vs. PBS: 1.6 ± 0.1 vs 8.9 ± 0.4 ; $p=0.000$; Фигура 9.Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у ткиву примарног тумора дојке у односу на мишеве третиране PBS-ом.



Фигура 9. Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ћелија у примарном тумору дојке. Семаглутид смањује експресију инхибиторног рецептора PD-1 и продукцију IL-10 у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у примарном тумору дојке. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат PD-1⁺ (А) и IL-10⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ћелија у карциному дојке мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

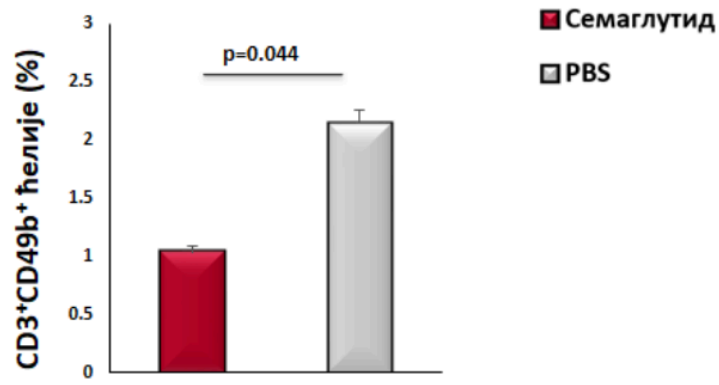
4.7 Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија

Методом проточне цитометрије, анализиран је функционални фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке. Примена семаглутида је повећала експресију активационог маркера CD6, али разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 10.А). Семаглутид је значајно смањио проценат IFN- γ ⁺CD3⁺CD49b⁺ ћелија у односу на контролну PBS групу (Семаглутид vs. PBS: 2.7 ± 0.5 vs 6.2 ± 0.3 ; $p=0.027$; Фигура 10.Б). Поред тога је семаглутид статистички значајно смањио експресију PD-1 молекула (Семаглутид vs. PBS: 10.6 ± 0.2 vs 21.2 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 10.В) као и продукцију IL-10 (Семаглутид vs. PBS: 6.3 ± 0.3 vs 12.5 ± 0.2 ; $p=0.024$; Фигура 10.Г).



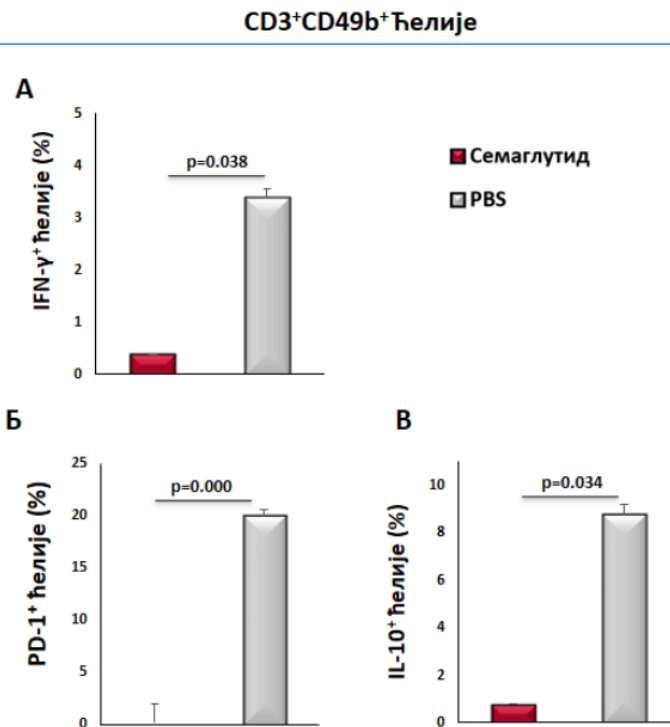
Фигура 10. Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија. Утицај семаглутида на CD3⁺CD49b⁺ ћелије у слезини мишева са карциномом дојке. Проценат CD69⁺ ћелија (А), IFN- γ ⁺ ћелија (Б), PD-1⁺ ћелија (В) и IL-10⁺ (Г) CD3⁺CD49b⁺ ћелија из слезине мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

У туморској микросредини, семаглутид је статистички значајно смањио процентуалну заступљеност CD3⁺CD49b⁺ ћелија (Семаглутид vs. PBS: 1.0 ± 0.03 vs 2.2 ± 0.2 ; $p=0.044$; Фигура 11) у поређењу са PBS-третираним мишевима.



Фигура 11. Утицај примене семаглутида на заступљеност CD3⁺CD49b⁺ћелија у примарном тумору дојке. Семаглутид смањује заступљеност CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном тумору дојке.

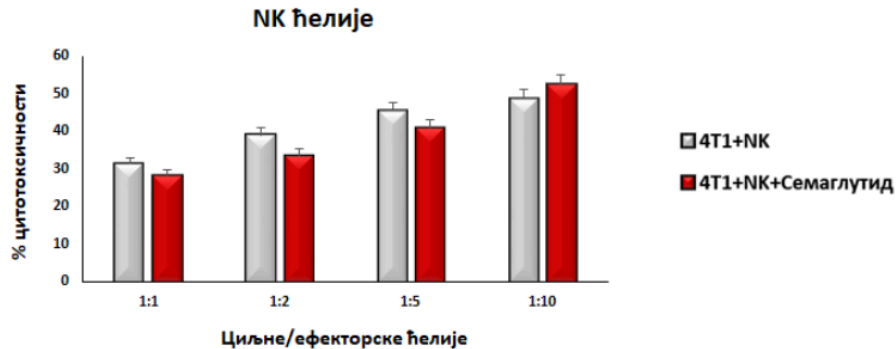
Такође, примена семаглутида је статистички значајно смањила процентуалну заступљеност $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD3}^+ \text{CD49b}^+$ (Семаглутид vs. PBS: 0.7 ± 0.01 vs 3.4 ± 0.2 ; $p=0.038$; Фигура 12.А), $\text{PD-1}^+ \text{CD3}^+ \text{CD49b}^+$ (Семаглутид vs. PBS: 0.2 ± 1.6 vs 19.9 ± 0.2 ; $p=0.000$; Фигура 12.В) и $\text{IL-10}^+ \text{CD3}^+ \text{CD49b}^+$ (Семаглутид vs. PBS: 0.7 ± 0.01 vs 8.7 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 12.В) ћелија у примарном тумору дојке у односу на контролну групу.



Фигура 12. Утицај примене семаглутида на фенотип CD3⁺CD49b⁺ћелија. Утицај семаглутида на CD3⁺CD49b⁺ ћелије у примарном тумору дојке мишева. Проценат $\text{IFN-}\gamma^+$ ћелија (А), PD-1⁺ ћелија (Б) и IL-10⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија из примарног тумора мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

4.8 Утицај примене семаглутида на цитотоксички капацитет NK ћелија *in vitro*

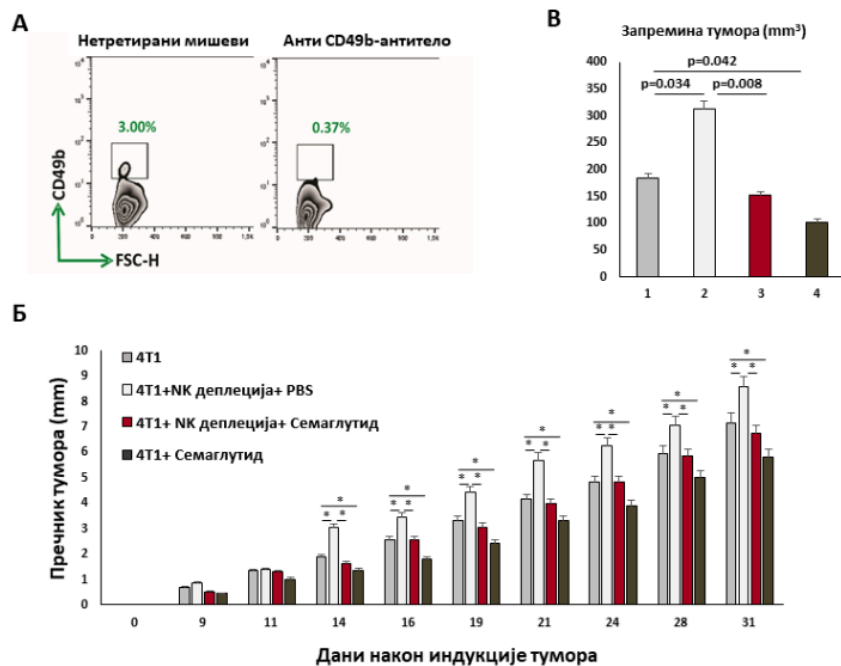
Антитуморска цитотоксичност изолованих NK ћелија добијених из мишева са карциномом дојке, тестирана је МТТ тестом. Проценат цитотоксичности је процењен у различитим односима циљне/ефекторске ћелије (1:1, 1:2, 1:5 и 1:10). Третман семаглутидом ни у једном односу није статистички значајно повећао цитотоксични капацитет NK ћелија, као што је приказано на Фигури 13.



Фигура 13. Цитотоксична активност NK ћелија против 4T1 туморских ћелија у различитим односима циљне/ефекторске ћелије. Цитотоксична активност NK ћелија тестирана је у 4-часовном МТТ тесту против 4T1 туморских ћелија, у четири различита односа циљне/ефекторске ћелије (1:1, 1:2, 1:5 и 1:10) 22. дана експеримента, након 48-часовне инкубације.

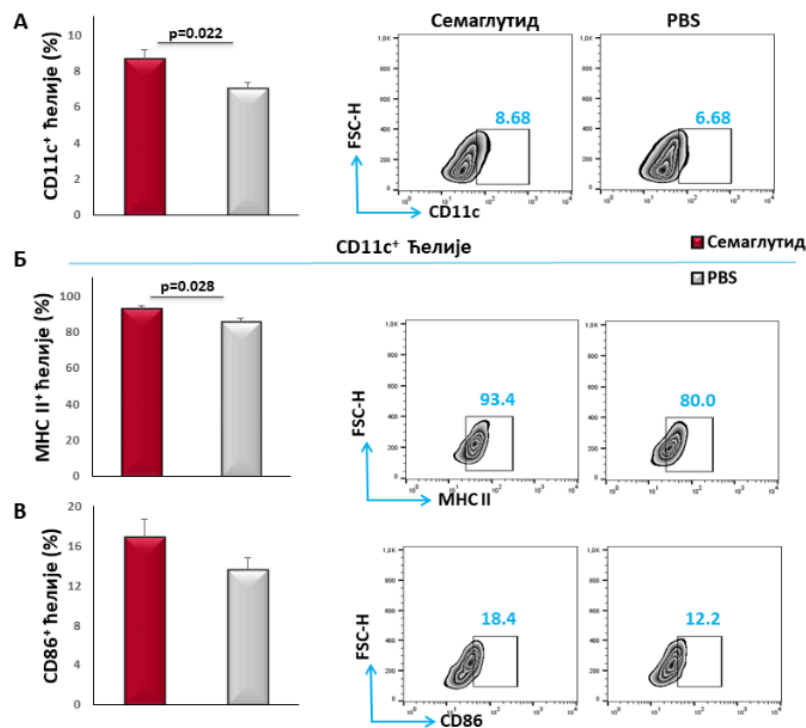
4.9 Деплеција NK ћелија није утицала на раст тумора код мишева третираних семаглутидом

Да би се потврдила или искључила значајна улога NK ћелија у добијеном феномену, деплетиране су NK ћелије коришћењем анти-*asialo* антитела (Фигура 14. А). Након деплеције, мишевима је индукован карцином дојке, а резултати су поређени са мишевима код којих није спроведена деплеција, третираним семаглутидом и/или PBS-ом. Резултати су показали да деплеција NK ћелија значајно повећава пречник примарног тумора у поређењу са мишевима који нису имали деплетиране NK ћелије. Статистички значајна разлика у пречнику тумора између ове две групе примећена је већ од 14. дана експеримента (4T1 vs. 4T1+NK деплеција: 1.88 ± 0.2 vs. 3.02 ± 0.1 ; $p=0.019$; Фигура 14.Б), а разлика је остала присутна и до 31. дана (4T1 vs. 4T1+NK деплеција+PBS: 7.16 ± 0.4 vs. 8.55 ± 0.5 ; $p=0.043$; Фигура 14.Б). Третман семаглутидом значајно је смањио пречник тумора код мишева са деплетираним NK ћелијама у поређењу са контролном групом, која је примала само PBS. Ово смањење је било статистички значајно већ од 14. дана (4T1+NK деплеција+PBS vs. 4T1+NK деплеција+Семаглутид: 3.02 ± 0.1 vs. 1.56 ± 0.07 ; $p=0.042$; Фигура 14.Б) и одржало се до 31. дана (4T1+NK деплеција+PBS vs. 4T1+NK деплеција+Семаглутид: 8.55 ± 0.5 vs. 6.73 ± 0.4 ; $p=0.049$; Фигура 14.Б) када су мишеви жртвовани. Након жртвовања, 34. дана експеримента, одређена је запремина примарног тумора при чему је утврђено да је запремина била значајно мања у групи деплетираних мишева третираних семаглутидом у односу на деплетиране мишеве третиране PBS-ом (4T1+NK деплеција+PBS vs. 4T1+NK деплеција+Семаглутид: 312.5 ± 38.2 vs. 152.1 ± 47.3 ; $p=0.008$; Фигура 14.В).



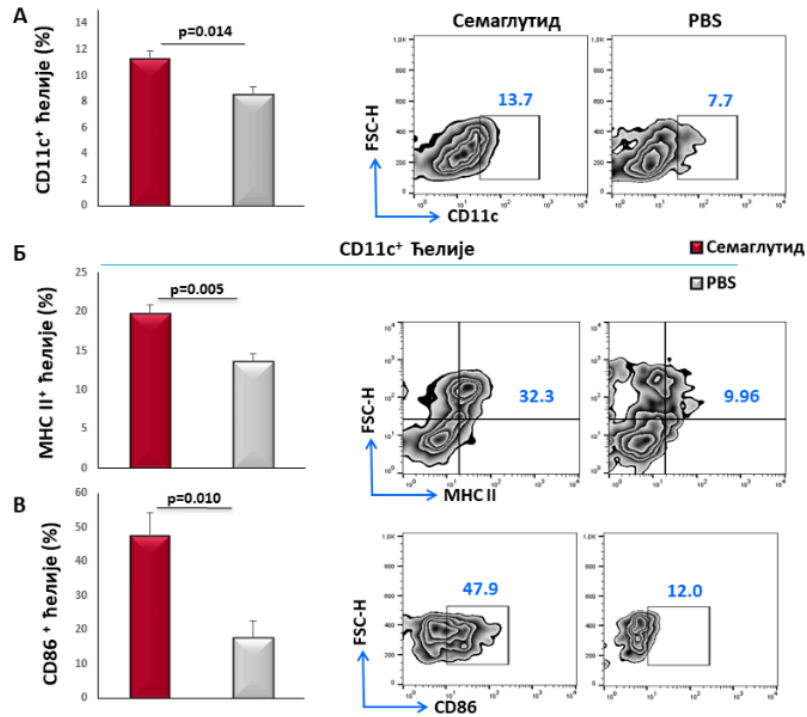
Фигура 14. Раст тумора након *in vivo* уклањања NK ћелија. Репрезентативни цитометријски графикони показују проценат NK ћелија након примене анти-*asialo* GM1 антитела *in vivo* (А). Мишеви су инокулисани са 5×10^3 4T1 туморских ћелија и раст примарног тумора је праћен мерењем пречника тумора од 9. дана експеримента у мишевима третираним PBS-ом и NK деплетираним мишевима са или без третмана семаглутидом (Б). Запремина тумора је одређена након жртвовања, на 31. дан од инокулације (В).

Проточном цитометријом је анализирана заступљеност и фенотип CD11c⁺ ћелија у слезини и примарном тумору. Проценат CD11c⁺ ћелија у слезини мишева са тумором који су били третирани семаглутидом био је значајно већи у поређењу са контролном групом (Семаглутид vs. PBS: 8.4 ± 0.5 vs 6.2 ± 0.3 ; $p=0.022$, Фигура 15.А). Експресија МНС II на CD11c⁺ ћелијама такође је била значајно повећана у слезини мишева третираних семаглутидом (Семаглутид vs. PBS: 94.3 ± 2.5 vs 81.2 ± 3.2 ; $p=0.028$, Фигура 15.Б). У погледу експресије CD86 молекула у CD11c⁺ популацији, семаглутид је изазвао повећање процента ових ћелија, али овај ефекат није достигао статистичку значајност (Фигура 15.В).



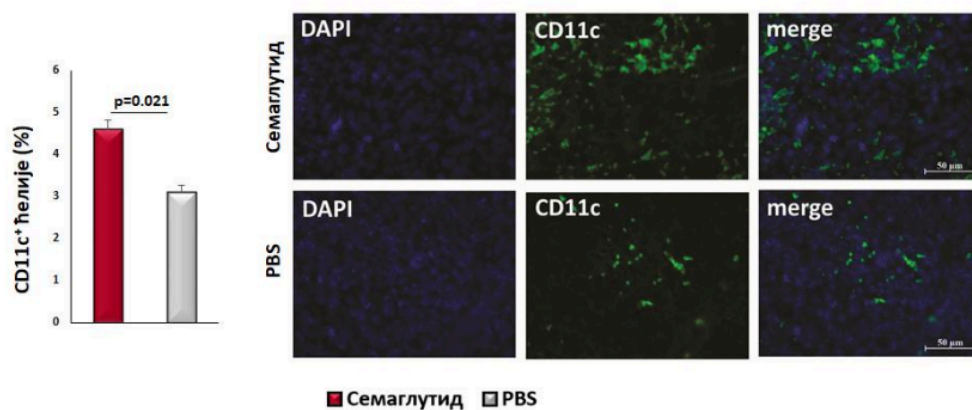
Фигура 15. Утицај примене семаглутида на заступљеност и сазревање CD11c⁺ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Проценат CD11c⁺ ћелија (А), МНС II⁺ ћелија (Б) и CD86⁺ ћелија (В), уз репрезентативне FACS-плотове из слезине мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

У примарном тумору мишева третианих семаглутидом, проценат CD11c⁺ ћелија био је значајно повећан (Семаглутид vs. PBS: 12.8 ± 0.5 vs 7.9 ± 0.4 ; $p=0.014$, Фигура 16.А). Такође, експресија МНС II на CD11c⁺ ћелијама била је значајно већа у примарном тумору мишева који су примали семаглутид (Семаглутид vs. PBS: 20.0 ± 0.8 vs 11.2 ± 0.6 ; $p=0.005$, Фигура 16.Б). У истој популацији CD11c⁺ ћелија, семаглутид је повећао експресију CD86 молекула у примарном тумору (Семаглутид vs. PBS: 47.6 ± 7.1 vs 16.3 ± 4.2 ; $p=0.010$, Фигура 16.В).



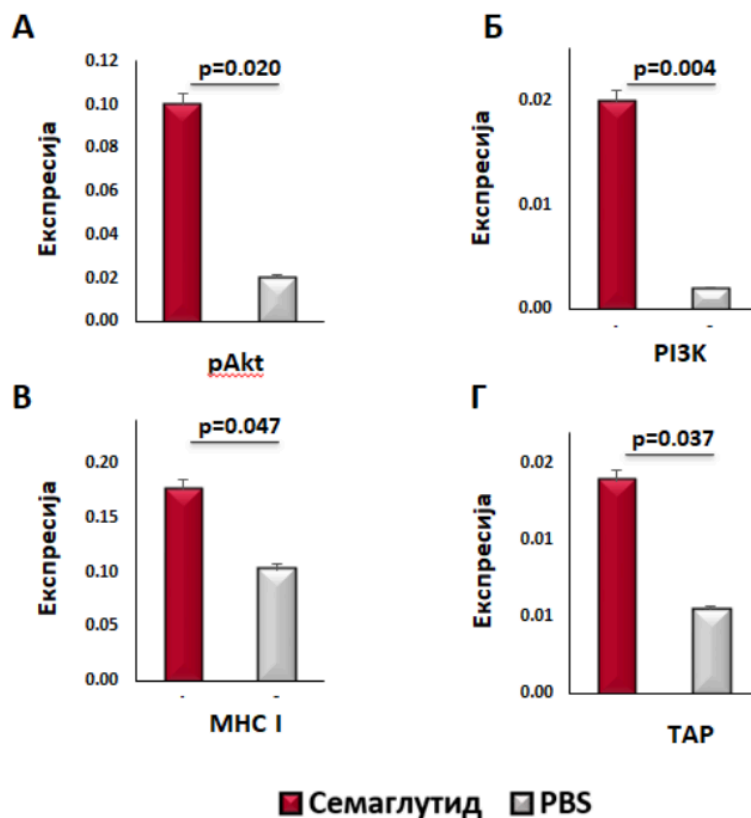
Фигура 16. Утицај примене семаглутида на заступљеност и сазревање CD11c⁺ ћелија у примарном тумору дојке. Проценат CD11c⁺ ћелија (А), МНС II⁺ ћелија (Б) и CD86⁺ ћелија (В), уз репрезентативне FACS-плотове из примарних тумора мишева третианих семаглутидом и PBS-ом.

Заступљеност CD11c⁺ ћелија унутар тумора испитана је и методом имунофлуоресценције. Већи број CD11c⁺ ћелија детектован је у туморима мишева који су третирани семаглутидом у поређењу са контролном групом која је третирана PBS-ом (Семаглутид vs. PBS: 4.7 ± 0.3 vs 3.1 ± 0.2 ; $p=0.021$; Фигура 17).



Фигура 17. Утицај примене семаглутида на број CD11c⁺ ћелија у примарном тумору дојке. Репрезентативне слике парафинских исечака примарног тумора дојке фиксираних формалдехидом. Број CD11c⁺ ћелија одређен је методом имунохистохемије.

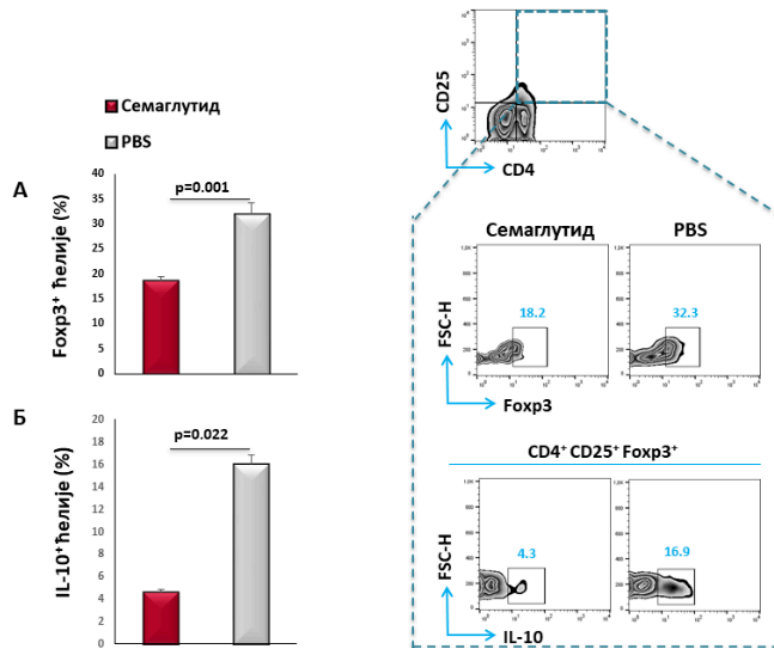
Култивација свеже изолованих CD11c⁺ ћелија из слезине мишева са карциномом дојке у присуству семаглутида значајно је повећала експресију mRNA за pAkt (Семаглутид vs. PBS: 0.10 ± 0.005 vs 0.02 ± 0.001 ; $p=0.020$; Фигура 18. А), PI3K (Семаглутид vs. PBS: 0.02 ± 0.002 vs 0.003 ± 0.000 ; $p=0.040$; Фигура 18. Б), MHC I (Семаглутид vs. PBS: 0.18 ± 0.005 vs 0.10 ± 0.002 ; $p=0.047$; Фигура 18. В) и TAP (Семаглутид vs. PBS: 0.019 ± 0.002 vs 0.01 ± 0.0001 ; $p=0.037$; Фигура 18. Г) у поређењу са ћелијама инкубираним само у комплетном медијуму, што је утврђено PCR анализом.



Фигура 18. Утицај семаглутида на експресију mRNA за pAkt, PI3K, MHC I и TAP у CD11c⁺ ћелијама. Семаглутид повећава експресију mRNA за pAkt (А), PI3K (Б), MHC I (В) и TAP (Г) у CD11c⁺ ћелијама.

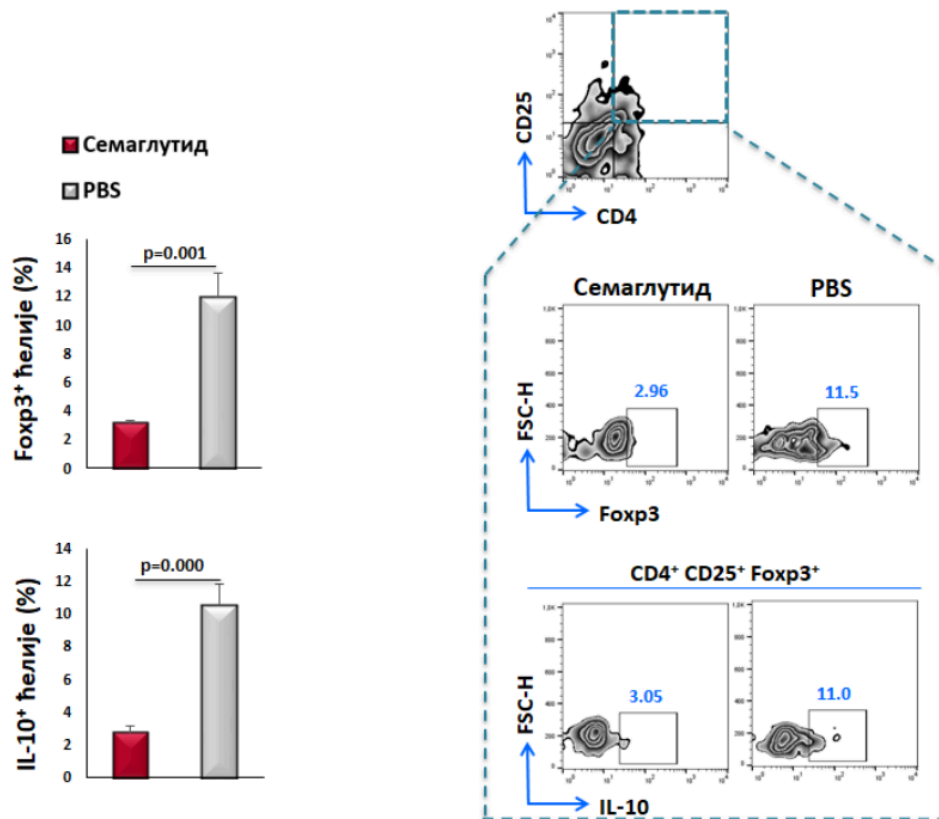
4.11 Примена семаглутида смањује заступљеност CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ћелија и продукцију IL-10 у слезини и примарном тумору мишева

Процентуална заступљеност CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ћелија у слезини и мононуклеарном туморском инфилтрату одређена је проточном цитометријом. У слезини мишева третираних семаглутидом, проценат CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ћелија био је значајно нижи у поређењу са контролном групом (Семаглутид vs. PBS: 18.1 ± 0.4 vs 31.7 ± 1.8; p=0.000, Фигура 19.А). Такође, анализиран је функционални фенотип CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ћелија, при чему је показано да је продукција IL-10 у овим ћелијама била значајно нижа код мишева третираних семаглутидом (Семаглутид vs. PBS: 4.1 ± 0.1 vs 15.9 ± 1.0 p=0.022; Фигура 19.Б).



Фигура 19. Утицај примене семаглутида на проценат и функционални фенотип CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Графикони и репрезентативни FACS-плотови приказују проценат FoxP3⁺ (А) и IL-10⁺ (Б) CD4⁺CD25⁺ ћелија у слезини мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

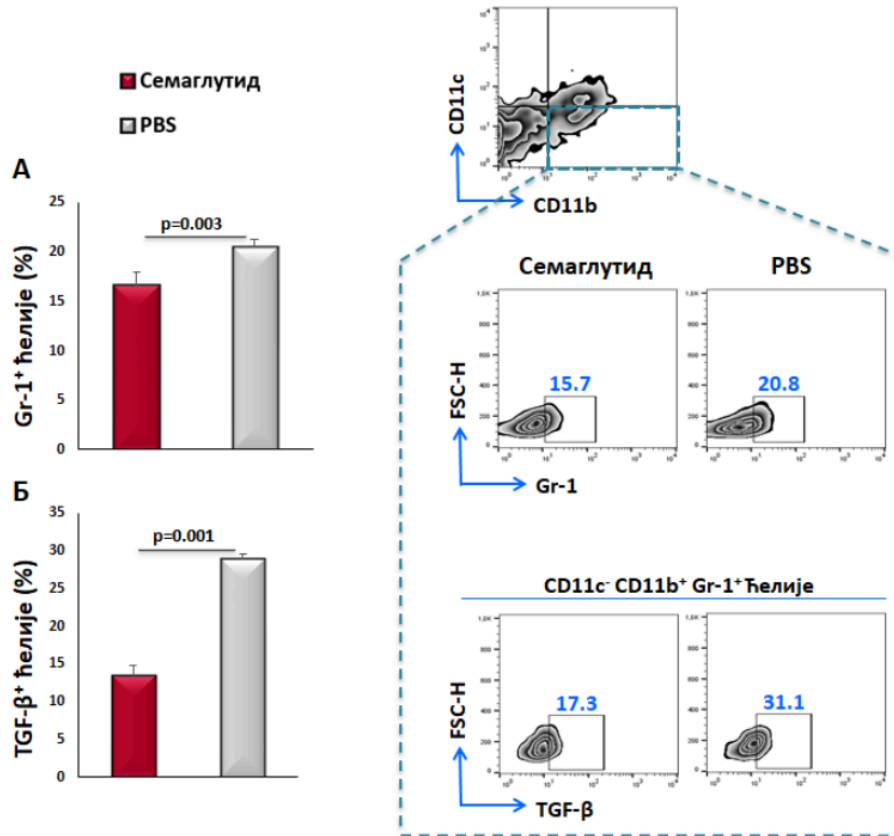
У примарном тумору мишева третираних семаглутидом, проценат $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија био је значајно нижи у поређењу са контролом (Семаглутид vs. PBS: 2.9 ± 0.2 vs 11.6 ± 1.7 ; $p=0.001$, Фигура 20.А). Анализом функционалног фенотипа $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија, показана је смањена продукција IL-10 у примарном тумору мишева третираних семаглутидом у односу на мишеве третиране PBS-ом (Семаглутид vs. PBS: 2.8 ± 0.2 vs 10.8 ± 1.4 ; $p=0.000$, Фигура 20.Б).



Фигура 20. Утицај примене семаглутида на проценат и функционални фенотип $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелија у примарном тумору дојке мишева. Графики и репрезентативни FACS плотови приказују проценат $FoxP3^+$ (А) и $IL-10^+$ (Б) $CD4^+CD25^+$ ћелија у примарном тумору мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

4.12 Примена семаглутида смањује акумулацију CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ ћелија и продукцију TGF- β у примарном тумору дојке

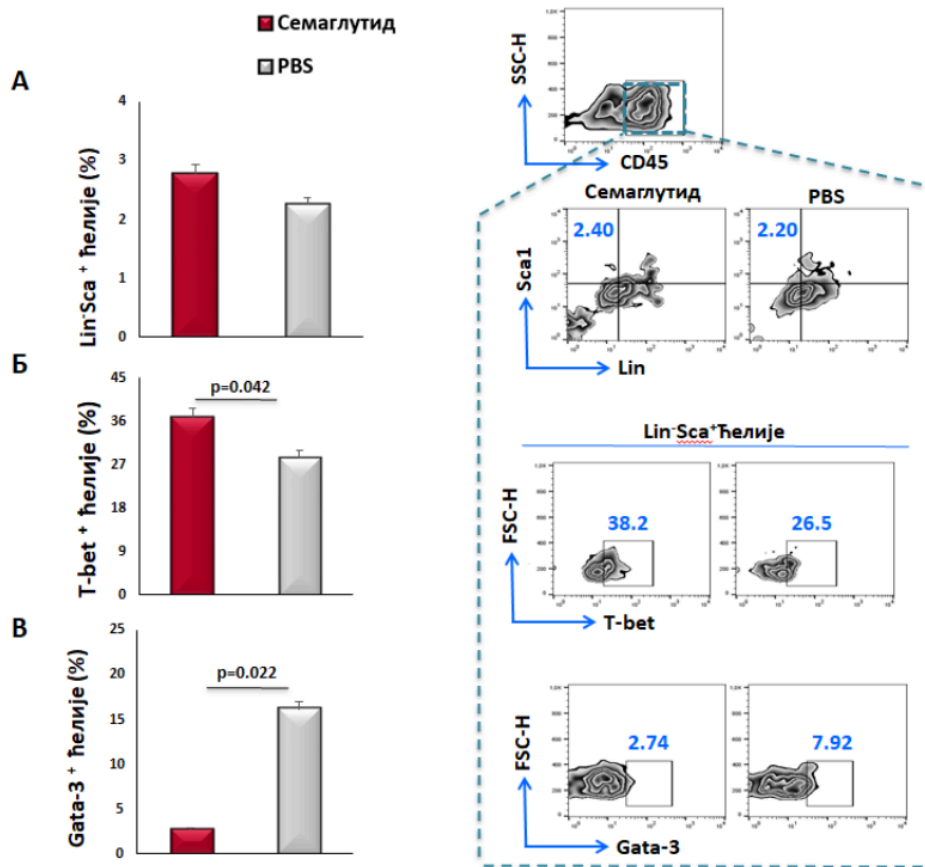
Процентуална заступљеност CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ ћелија у мононуклеарном туморском инфилтрату одређена је проточном цитометријом. У примарном тумору дојке мишева третираних семаглутидом, проценат CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ ћелија био је значајно смањен у поређењу са PBS-третираном групом (Семаглутид vs. PBS: 15.4 ± 0.5 vs 20.2 ± 0.4 ; $p=0.003$, Фигура 21.А). Такође, анализиран је функционални фенотип CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ ћелија. Производња TGF- β у овим ћелијама била значајно нижа код мишева третираних семаглутидом у односу на контролну групу (Семаглутид vs. PBS: 15.3 ± 1.3 vs 29.8 ± 0.4 ; $p=0.001$; Фигура 21.Б).



Фигура 21. Утицај примене семаглутида на заступљеност и функционални фенотип CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ ћелија у примарном тумору дојке мишева. Графици и репрезентативни FACS плотови приказују проценат Gr-1⁺ (А) и TGF- β ⁺ (Б) CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ ћелија у примарном тумору мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

4.13 Утицај апликације семаглутида на Lin⁺Sca⁺ ћелије у примарном тумору дојке

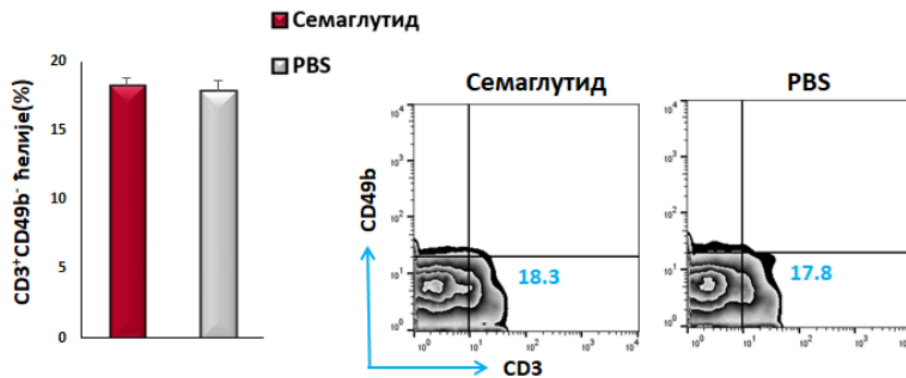
Примена семаглутида је повећала процентуалну заступљеност Lin⁺Sca⁺ ћелија у примарном карциному дојке, али повећање није достигло статистичку значајност (Фигура 22.А). Такође, третман семаглутидом је статистички значајно повећао процентуалну заступљеност Lin⁺Sca⁺T-bet⁺ (Семаглутид vs. PBS: 36.1 ± 1.3 vs 26.3 ± 0.6 ; $p=0.042$; Фигура 22. Б) ћелија у поређењу са контролном групом. Истовремено, семаглутид је значајно смањио процентуалну заступљеност Lin⁺Sca⁺Gata-3⁺ (Семаглутид vs. PBS: 2.8 ± 0.01 vs 15.6 ± 0.4 ; $p=0.022$; Фигура 22. В) ћелија у односу на групу третирану PBS-ом.



Фигура 22. Утицај примене семаглутида на заступљеност и функционални фенотип Lin⁺Sca⁺ ћелија ћелија у примарном тумору дојке мишева. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат Lin⁺Sca⁺ (А), T-bet⁺ (Б) и Gata-3⁺ (В) ћелија у примарном тумору мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

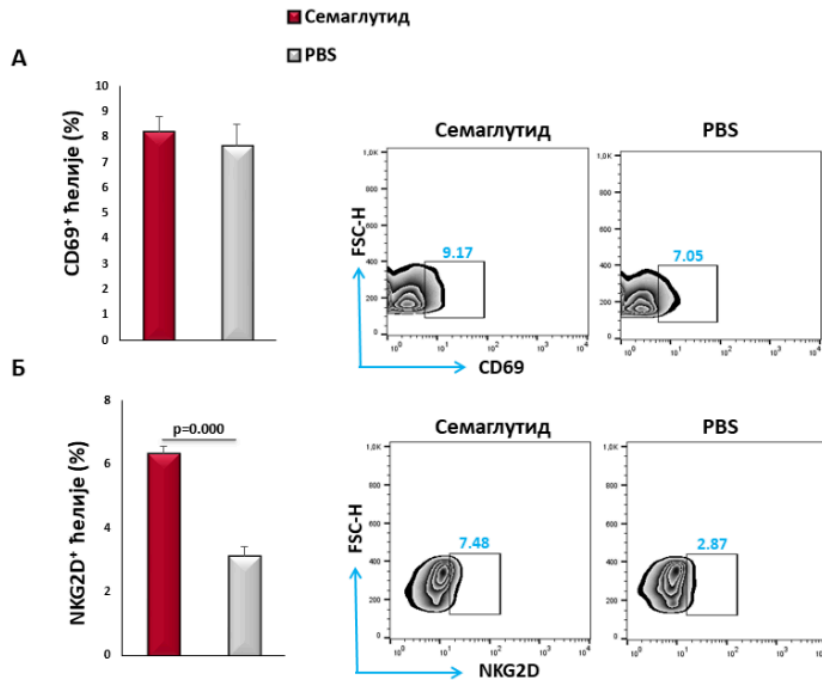
4.14 Примена семаглутида појачава антитуморски фенотип $CD3^+CD49b^-$ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке

Проточном цитометријом су анализирани процентуална заступљеност и антитуморски фенотип $CD3^+CD49b^-$ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке. Семаглутид је повећао процентуалну заступљеност $CD3^+CD49b^-$ ћелија у слезини мишева са тумором дојке, али то повећање није достигло статистичку значајност (Фигура 23).



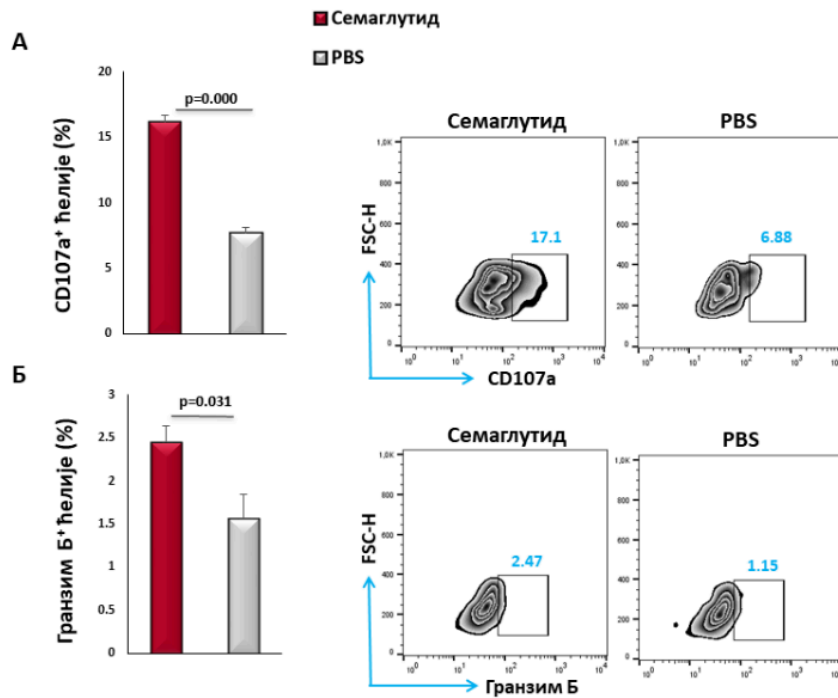
Фигура 23. Утицај примене семаглутида на заступљеност $CD3^+CD49b^-$ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Семаглутид повећава заступљеност $CD3^+CD49b^-$ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Репрезентативни FACS плотови приказују проценат $CD3^+CD49b^-$ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом и PBS-ом.

У контексту антитуморског фенотипа, код мишева третираних семаглутидом забележена је повишена експресија CD69, иако разлика није достигла ниво статистичке значајности (Фигура 24.А), као и значајно повећана експресија NKG2D (Семаглутид vs. PBS: 6.3 ± 0.3 vs 2.6 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 24.Б) на CD3⁺CD49b⁻ ћелијама из слезине мишева са карциномом дојке у односу на мишеве третиране PBS-ом.



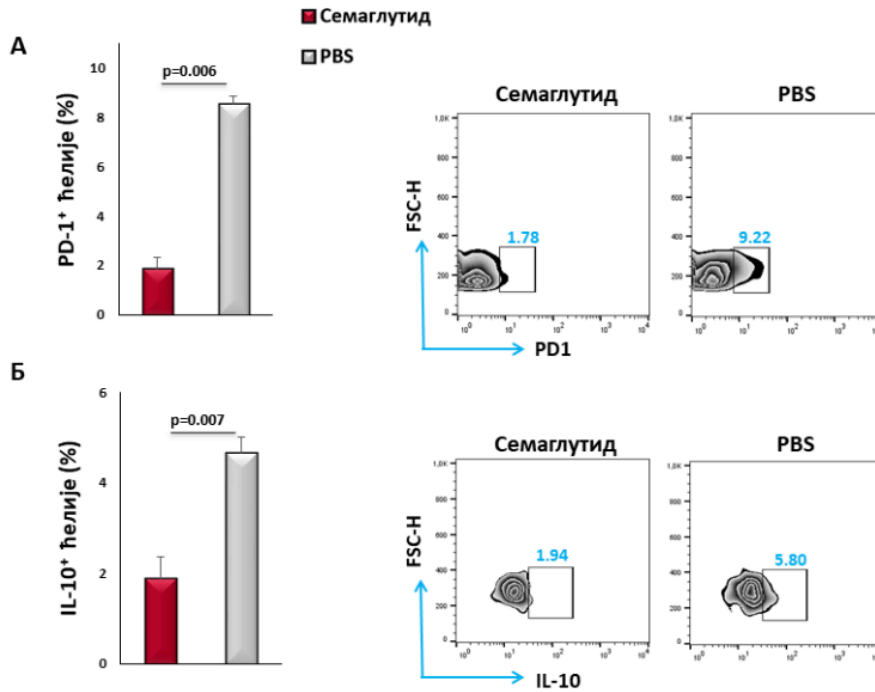
Фигура 24. Утицај примене семаглутида на антитуморски фенотип CD3⁺CD49b⁻ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Семаглутид повећава експресију активационог рецептора CD69 и NKG2D на CD3⁺CD49b⁻ ћелијама. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD69⁺ (А) и NKG2D⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁻ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом и PBS-ом.

Такође, третман семаглутидом је статистички значајно повећао проценат CD3⁺CD49b⁺ ћелија које продукују CD107a (Семаглутид vs. PBS: 16.3 ± 0.3 vs 6.5 ± 0.4; p=0.000; Фигура 25.А) и гранзим В (Семаглутид vs. PBS: 2.4 ± 0.6 vs 1.4 ± 0.4; p=0.031; Фигура 25.Б)



Фигура 25. Утицај примене семаглутида на антитуморски фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Семаглутид повећава експресију CD107a и Гранзима В у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD107a⁺ (А) и Гранзим Б⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом и PBS-ом.

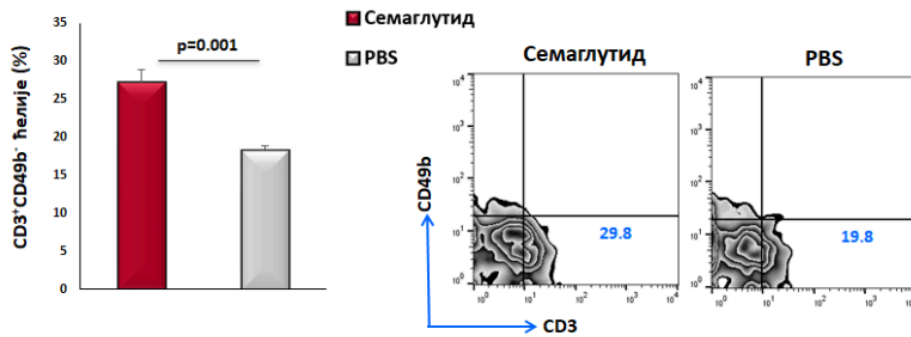
Поред тога, семаглутид је значајно смањио експресију инхибиторног рецептора PD-1 (Семаглутид vs. PBS: 1.7 ± 0.5 vs 8.5 ± 0.2 ; $p=0.006$; Фигура 26.А) и продукцију IL-10 (Семаглутид vs. PBS: 1.9 ± 0.8 vs 4.7 ± 0.4 ; $p=0.007$; Фигура 26.Б) у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у односу на PBS-третирану групу.



Фигура 26. Утицај примене семаглутида на антитуморски фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са тумором дојке. Семаглутид смањује експресију PD-1 и продукцију IL-10 у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат PD-1⁺ (А) и IL-10⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у слезини мишева са карциномом дојке третираних семаглутидом и PBS-ом.

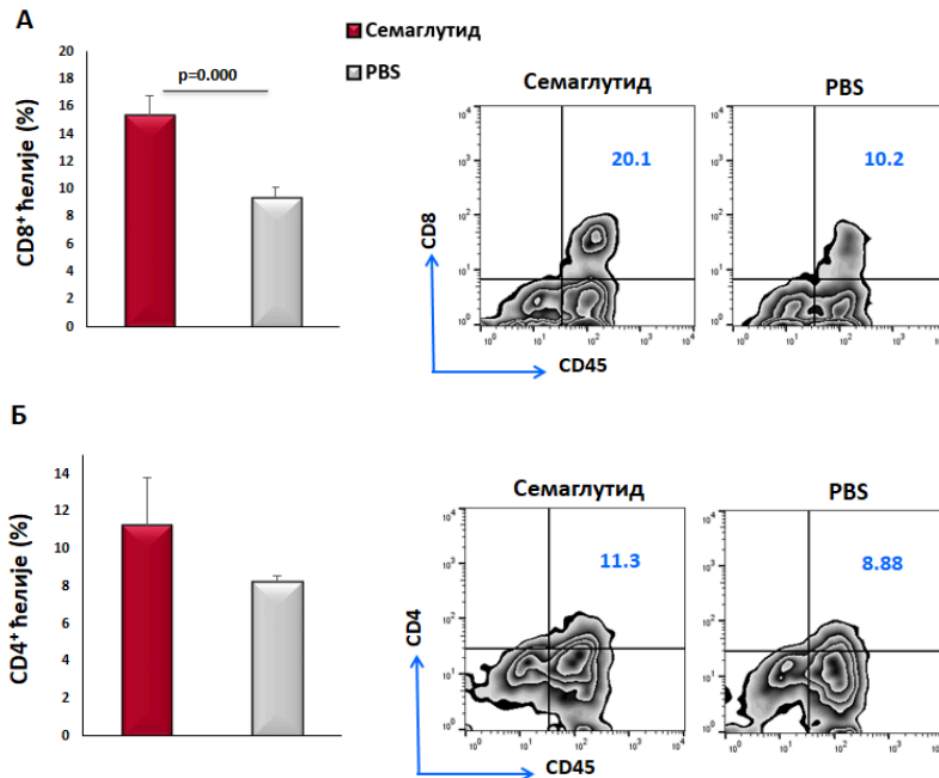
4.15 Апликација семаглутида повећава заступљеност и антитуморски фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија у карциному дојке

Испитана је заступљеност и функционални фенотип CD3⁺CD49b⁺ ћелија проточном цитометријом. У туморској микросредини, семаглутид је значајно повећао процентуалну заступљеност CD3⁺CD49b⁺ ћелија (Семаглутид vs. PBS: 28.7 ± 0.5 vs 18.6 ± 0.2 ; $p=0.001$, Фигура 27) у односу на групу третирану PBS-ом.



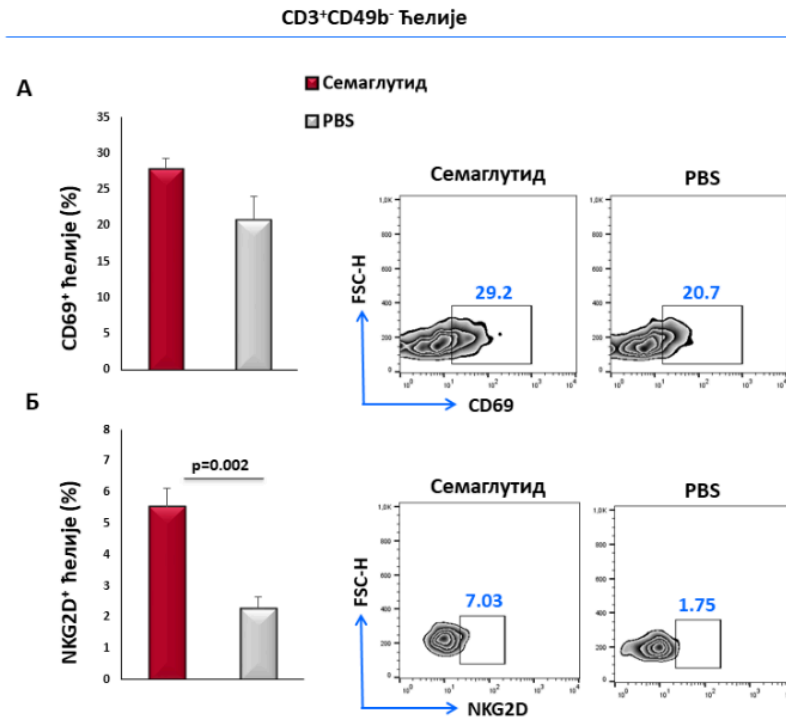
Фигура 27. Утицај примене семаглутида на заступљеност CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном карциному дојке мишева. Репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном тумору мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

Такође, проценат $CD45^+CD8^+$ ћелија био је значајно повећан код мишева третираних семаглутидом (Семаглутид vs. PBS: 15.7 ± 2.1 vs 9.8 ± 1.1 ; $p=0.000$; Фигура 28. А), док повећање процента $CD45^+CD4^+$ ћелија није достигло статистичку значајност (Фигура 28. Б) у примарном карциному дојке.



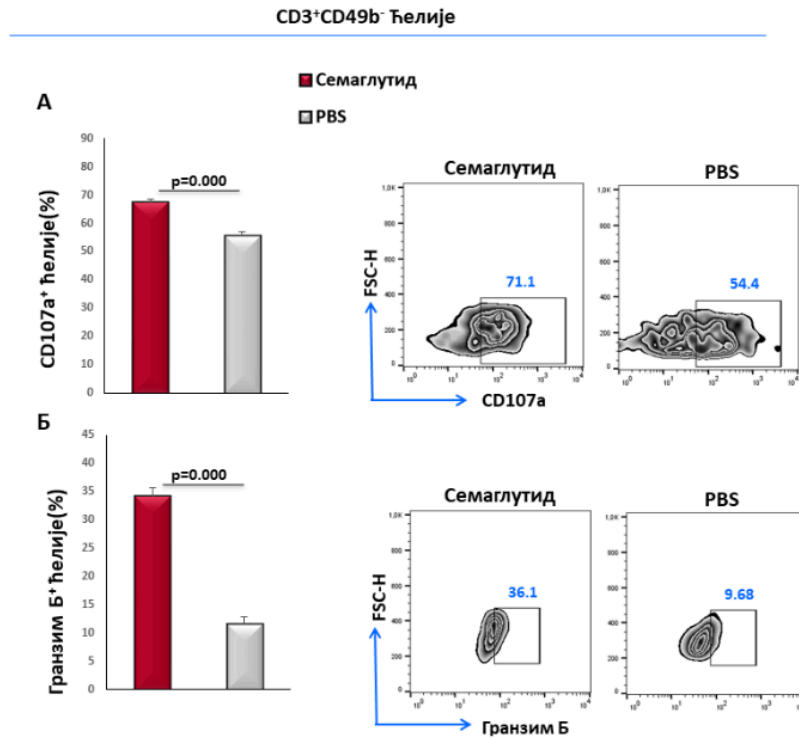
Фигура 28. Утицај примене семаглутида на заступљеност $CD8^+$ и $CD4^+$ ћелија у примарном карциному дојке мишева. Репрезентативни FACS плотови приказују проценат $CD8^+$ (А) и $CD4^+$ (Б) ћелија, у примарном тумору мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

Анализа фенотипа тумор-инфилтришућих CD3⁺CD49b⁻ ћелија код мишева третираних семаглутидом показала је повећање експресије CD69, иако разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 29.А), као и NKG2D (Семаглутид vs. PBS: 5.7 ± 0.7 vs 2.2 ± 0.5; p=0.002; Фигура 29.Б) у односу на мишеве третиране PBS-ом.



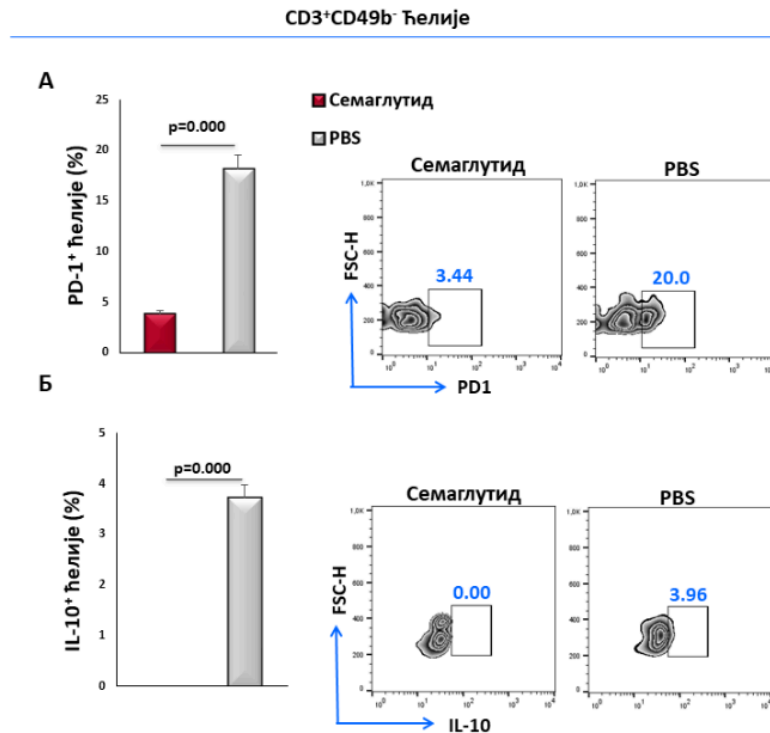
Фигура 29. Утицај примене семаглутида на експресију активационих маркера CD69 и NKG2D на CD3⁺CD49b⁻ ћелијама у примарном тумору дојке. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD69⁺ (А) и NKG2D⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁻ ћелија у примарном карциному дојке мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

Такође, примена семаглутида је значајно повећала експресију CD107a (Семаглутид vs. PBS: 68.4 ± 0.5 vs 53.7 ± 0.4 ; $p=0.000$; Фигура 30.А) и гранзима В (Семаглутид vs. PBS: 33.9 ± 1.3 vs 11.2 ± 0.8 ; $p=0.000$; Фигура 30.Б) у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у примарном тумору дојке у односу на контролну групу.



Фигура 30. Утицај примене семаглутида на експресију маркера дегранулације CD107a и Гранзима В у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у примарном тумору дојке. Графикони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат CD107a⁺ (А) и Гранзим В⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у примарном карциному дојке мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

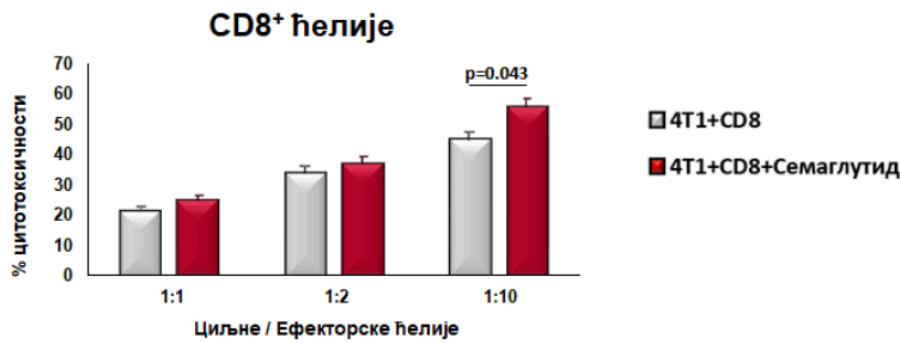
Поред тога, семаглутид је значајно смањио експресије PD-1 (Семаглутид vs. PBS: 3.8 ± 0.2 vs 18.5 ± 1.6 $p=0.000$; Фигура 31.А) и продукцију IL-10 (Семаглутид vs. PBS: 0.00 ± 0.00 vs 3.96 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 31.Б) у CD3⁺CD49b⁺ ћелијама у поређењу са групом третирану PBS-ом.



Фигура 31. Утицај примене семаглутида на експресију инхибиторног рецептора PD-1 на CD3⁺CD49b⁺ ћелијама и продукцију IL-10 у примарном тумору дојке. Графициони и репрезентативни FACS плотови приказују проценат PD-1⁺ (А) и IL-10⁺ (Б) CD3⁺CD49b⁺ ћелија у карциному дојке мишева третираних семаглутидом и PBS-ом.

4.16 Утицај примене семаглутида на цитотоксички капацитет CD8⁺ Т лимфоцита *ex vivo*

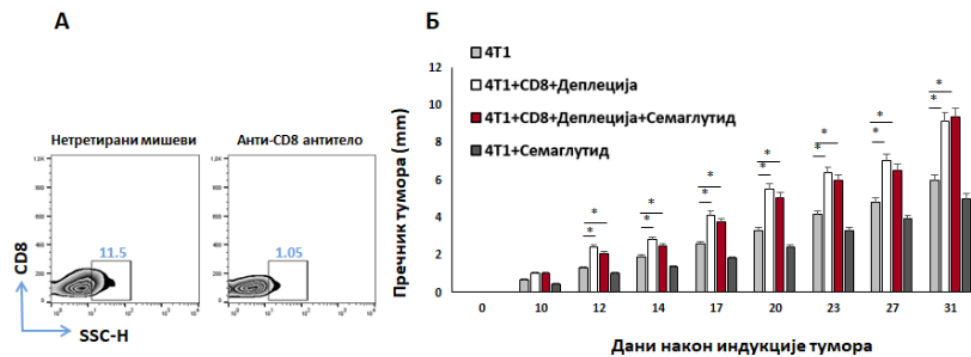
Антитуморска активност изолованих CD8⁺ Т лимфоцита, добијених од мишева са карциномом дојке, испитивана је у различитим односима са туморским ћелијама. Након изолације, CD8⁺ Т лимфоцити су додавани у микротитар плоче у којима су се претходно налазиле адхерентне туморске ћелије линије 4Т1, фиксиране за дно бунарчића. Након додавања ефекторских ћелија, семаглутид је додат у једну од експерименталних група ради процене његовог утицаја на цитотоксичну активност CD8⁺ лимфоцита. Значајно повећање цитотоксичности посредоване CD8⁺ лимфоцитима детектовано је код ћелија третираних семаглутидом у односу 1:10 (4Т1+CD8⁺ vs. 4Т1+CD8⁺+Семаглутид: 44.8 ± 2.8 vs. 55.6 ± 2.2 ; $p=0.043$; Фигура 32). Повећање је такође примећено у односима 1:1 и 1:2 циљне/ефекторске ћелије, али разлика није достигла статистичку значајност.



Фигура 32. Цитотоксична активност CD8⁺ Т лимфоцита против 4Т1 туморских ћелија у различитим односима циљне/ефекторске ћелије. Цитотоксичка активност CD8⁺ Т лимфоцита тестирана је у 4-часовном МТТ тесту против 4Т1 туморских ћелија, у три различита односа циљне/ефекторске ћелије (1:1, 1:2 и 1:10) 22. дана експеримента, након 48-часовне инкубације.

4.17 Деплеција CD8⁺ ћелија неутралише разлику у расту приманог тумора између мишева третираних семаглутидом и контролних мишева

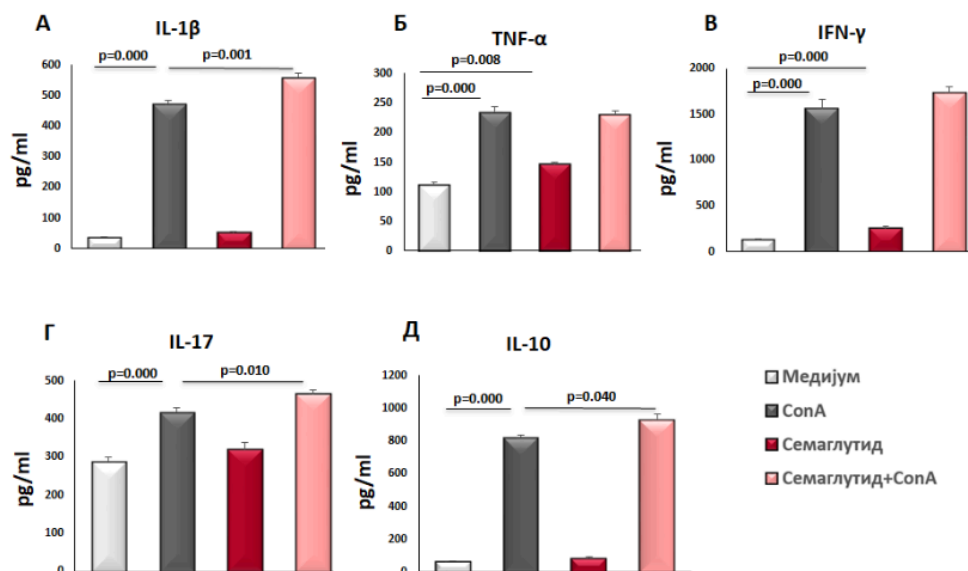
Цитотоксички Т лимфоцити су уклоњени код мишева применом анти-CD8 антитела, након чега је свим групама индукован 4T1 карцином дојке (Фигура 33.А). Добијени резултати су поређени са контролним мишевима који су имали очувану популацију NK ћелија и који су примали семаглутид и/или PBS. Деплеција CD8⁺ ћелија убрзала је раст тумора у обе групе мишева третираних семаглутидом/PBS-ом, у поређењу са недеплетираним мишевима. Разлика у пречнику тумора између CD8⁺-деплетиране и недеплетиране групе постала је статистички значајна од 12. дана експеримента (4T1 vs. 4T1+CD8⁺ деплеција: 1.88 ± 0.1 vs. 2.3 ± 0.2 ; $p=0.037$; Фигура 33.Б) и овај феномен се одржао до 31. дана експеримента (4T1 vs. 4T1+CD8⁺ деплеција: 5.94 ± 0.4 vs. 8.8 ± 0.7 ; $p=0.027$; Фигура 33.Б). Након деплеције CD8⁺ Т лимфоцита, више није било статистички значајне разлике у пречнику тумора између деплетираних група које су примале семаглутид и PBS (Фигура 33.Б), што указује на значајну улогу CD8⁺ ћелија у механизмима који утичу на раст тумора.



Фигура 33. Раст тумора након *in vivo* уклањања CD8⁺ ћелија. Репрезентативни FACS плотови приказују процентуалне вредности CD8⁺ ћелија након примене анти-CD8 антитела (А). Након деплеције мишевима је инокулисано 5×10^3 4T1 туморских ћелија, а раст примарног тумора је праћен мерењем пречника од 10. дана експеримента (Б).

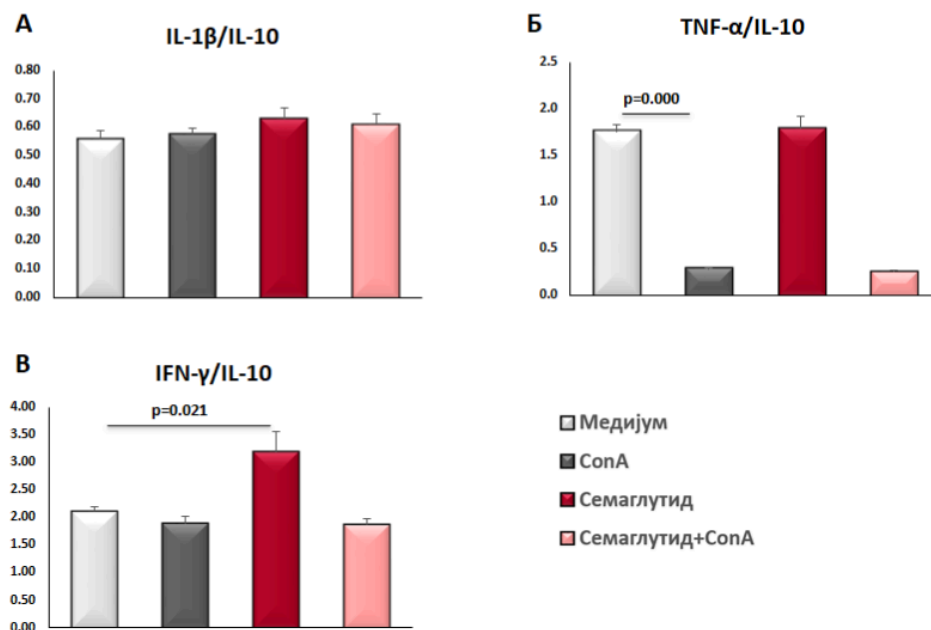
4. 18 Третман семаглутидом стимулише производњу проинфламацијских цитокина *in vitro*

Свеже изоловани спленоцити здравих мишева су постављени у микротитар плоче и распоређени у четири групе: спленоцити култивисани у медијуму, стимулирани ConA-ом, третирани семаглутидом или истовремено семаглутидом и ConA-ом. Стимулација са ConA значајно је повећала концентрацију IL-1 β (Медијум vs. ConA: 35.59 ± 2.8 vs. 471.94 ± 5.4 $p=0.000$; Фигура 24.А), TNF- α (Медијум vs. ConA: 112.30 ± 3.5 vs. 233.22 ± 10.3 ; $p=0.000$; Фигура 24.Б), IFN- γ (Медијум vs. ConA: 134.86 ± 5.7 vs. 1561.48 ± 57.4 ; $p=0.000$; Фигура 24.В), IL-17 (Медијум vs. ConA: 286.28 ± 13.6 vs. 415.42 ± 14.6 ; $p=0.000$; Фигура 24.Г) и IL-10 (Медијум vs. ConA: 64.13 ± 6.7 vs. 821.41 ± 20.7 ; $p=0.000$; Фигура 24.Д) у супернатанту ћелија након 24 сата инкубације у поређењу са ћелијама инкубираним у медијуму. Семаглутид је самостално значајно повећао нивое TNF- α (Медијум vs. Семаглутид: 112.30 ± 3.5 vs. 146.45 ± 5.3 ; $p=0.008$; Фигура 24.Б) и IFN- γ (Медијум vs. Семаглутид: 134.86 ± 5.7 vs. 259.21 ± 8.6 ; $p=0.000$; Фигура 24.В) у поређењу са нетретираним спленоцитима. Такође, детектовано је и повећање концентрације IL-1 β , IL-17 и IL-10, али ове разлике нису достигле ниво статистичке значајности. Истовремена примена ConA и семаглутида значајно је повећала концентрацију IL-1 β (ConA vs. Семаглутид+ ConA: 471.94 ± 5.4 vs. 556.64 ± 21.7 ; $p=0.001$; Фигура 24.А), IL-17 (ConA vs. Семаглутид+ ConA: 415.42 ± 14.6 vs. 463.90 ± 17.1 ; $p=0.010$; Фигура 24.Г) и IL-10 (ConA vs. Семаглутид+ ConA: 821.41 ± 20.7 vs. 926.22 ± 22.7 ; $p=0.040$; Фигура 24.Д) у поређењу са ћелијама стимулираним ConA. Повећање је детектовано и у концентрацијама TNF- α и IFN- γ , али разлике нису достигле ниво статистичке значајности.



Фигура 34. Семаглутид повећава концентрацију IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-10 *in vitro*. Графици приказују концентрације IL-1 β (A), TNF- α (Б), IFN- γ (В), IL-17 (Г) и IL-10 (Г) мерене у супернатантима спленоцита изолованих из здравих мишева након 24-часовне инкубације само у медијуму, са конканавлином А, семаглутидом или ко-стимулацијом са семаглутидом и конканавлином А.

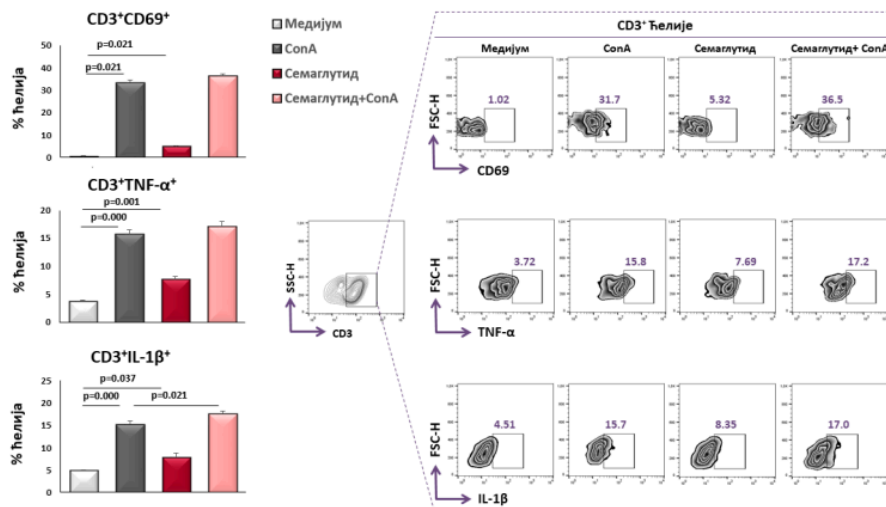
Додатно, инкубација спленocyтa семаглутидом довела је до повећања односа проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у поређењу са ћелијама инкубираним само у медијуму. Забележено је повећање односа IL-1 β /IL-10 и TNF- α /IL-10, али ове разлике нису достигле ниво статистичке значајности (Фигура 35.А и 35.Б). Насупрот томе, однос IFN- γ /IL-10 био је значајно повишен након инкубације са семаглутидом (Медијум vs. Семаглутид: 2.11 ± 0.2 vs. 3.20 ± 0.3 ; $p = 0.021$; Фигура 35.В).



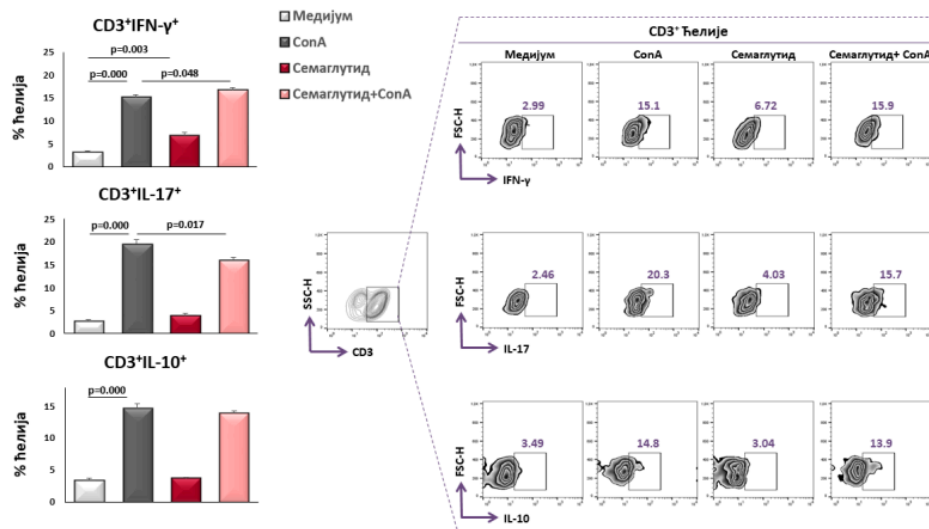
Фигура 35. Семаглутид повећава¹ однос IL-1 β /IL-10, TNF- α /IL-10 и IFN- γ /IL-10 *in vitro*. Графици приказују однос IL-1 β /IL-10 (А), TNF- α /IL-10 (Б) и IFN- γ /IL-10 (В) мерене у супернатантима спленocyтa изолованих из здравих мишева након 24-часовне инкубације само у медијуму, са конканавлином А, семаглутидом или ко-стимулацијом са семаглутидом и конканавлином А.

4. 19 Третман семаглутидом подстиче производњу проинфламацијских цитокина у CD3⁺ ћелијама *in vitro*

Међу CD3⁺ ћелијама, култивација са ConA довела је до значајног повећања процента CD69⁺ (Медијум vs. ConA: 0.49 ± 0.3 vs. 33.45 ± 0.6 ; $p=0.021$; Фигура 36.А), TNF- α ⁺ (Медијум vs. ConA: 3.67 ± 0.2 vs. 15.67 ± 0.7 ; $p=0.000$; Фигура 36.Б), IL-1 β ⁺ (Медијум vs. ConA: 4.87 ± 0.3 vs. 15.24 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 36.В), IFN- γ ⁺ (Медијум vs. ConA: 3.17 ± 0.3 vs. 15.13 ± 0.3 ; $p=0.000$; Фигура 37.А), IL-17⁺ (Медијум vs. ConA: 2.71 ± 0.2 vs. 19.46 ± 1.4 ; $p=0.000$; Фигура 37.Б) и IL-10⁺ (Медијум vs. ConA: 3.33 ± 0.6 vs. 14.67 ± 1.1 ; $p=0.000$; Фигура 37.В) ћелија, у поређењу са нетретираним спленоцитима. CD3⁺ ћелије третиране семаглутидом показале су значајно повећање процента CD69⁺ (Медијум vs. Семаглутид: 0.49 ± 0.3 vs. 4.81 ± 0.1 ; $p=0.021$; Фигура 36.А), TNF- α ⁺ (Медијум vs. Семаглутид: 3.67 ± 0.2 vs. 7.60 ± 0.3 ; $p=0.001$; Фигура 36.Б), IL-1 β ⁺ (Медијум vs. Семаглутид: 4.87 ± 0.3 vs. 7.88 ± 0.6 ; $p=0.037$; Фигура 36.В) и IFN- γ ⁺ (Медијум vs. Семаглутид: 3.17 ± 0.3 vs. 6.83 ± 0.6 ; $p=0.003$; Фигура 37.А) у поређењу са нетретираним ћелијама. У популацији CD3⁺ ћелија, истовремени третман са ConA и семаглутидом довео је до значајног повећања процента IL-1 β ⁺ (ConA vs. Семаглутид + ConA: 15.24 ± 0.3 vs. 17.57 ± 0.4 ; $p=0.021$; Фигура 36.В), IFN- γ ⁺ (ConA vs. Семаглутид + ConA: 15.13 ± 0.3 vs. 16.76 ± 0.5 ; $p=0.048$; Фигура 37.А) и IL-17⁺ (ConA vs. Семаглутид + ConA: 19.46 ± 1.4 vs. 15.98 ± 1.1 ; $p=0.017$; Фигура 37.Б) ћелија које продукују цитокине, у поређењу са популацијом CD3⁺ ћелија стимулисаном само ConA.



Фигура 36. Семаглутид повећава проценат CD69⁺, TNF- α ⁺ и IL-1 β ⁺ IFN- γ ⁺, IL-17⁺ и IL-10⁺ CD3⁺ спленоцита *in vitro*. Графици и репрезентативни FACS графикони приказују проценат CD69⁺ (А), TNF- α ⁺ (Б) и IL-1 β ⁺ (В) CD3⁺ спленоцита изолованих из здравих мишева након 24-часовне инкубације само у медијуму, са конканавалином А, семаглутидом или ко-стимулацијом са семаглутидом и



Фигура 37. Семаглутид повећава проценат IFN- γ ⁺, IL-17⁺ и IL-10⁺ CD3⁺ спленоцита *in vitro*. Графици и репрезентативни FACS графикони приказују проценат IFN- γ ⁺ (A), IL-17⁺ (Б) и IL-10⁺ (В) CD3⁺ спленоцита изолованих из здравих мишева након 24-часовне инкубације само у медијуму, са конканавлином А, семаглутидом или ко-стимулацијом са семаглутидом и конканавлином А.

5. ДИСКУСИЈА

У овој студији, по први пут смо показали да семаглутид, антидијабетик из групе GLP-1 рецептор агониста, успорава прогресију карцинома дојке у мишјем моделу болести. Наши резултати указују да третман семаглутидом значајно одлаже појаву палпабилног тумора, смањује средњу вредност пречника и запремину примарног тумора, као и да смањује инциденцу метастазирања у плућима и јетри у поређењу са мишевима третираним PBS-ом.

Испитивањем директног антитуморског дејства семаглутида показали смо да није значајно смањена вијабилност тестираних туморских ћелија *in vitro*. Примена семаглутида је значајно смањила појаву некрозе у примарном тумору дојке *in vivo*. Осим тога, показали смо да примена семаглутида није имала утицаја на неоангиогенезу и микроваскуларну густину, чиме је и овај механизам елиминисан као могући узрок одлагања појаве тумора и раста и прогресије тумора.

Анализом функционалног фенотипа NK ћелија, утврдили смо да семаглутид појачава њихов антитуморски фенотип. Међутим, семаглутид није повећао цитотоксичку активност NK ћелија према туморским ћелијама, *in vitro*. После деплеције NK ћелија *in vivo*, уочена је значајна разлика у динамици раста тумора између деплетираних мишева третираних семаглутидом, односно PBS-ом.

Даљим истраживањем, утврђено је да примена семаглутида значајно повећава акумулацију и сазревање DCs, како у слезини тако и у примарном тумору дојке.

У наставку истраживања показано је да семаглутид смањује имуносупресивно микроокружење у примарном тумору дојке. Његова примена смањује заступљеност MDSC и Tregs у слезини, и што је још значајније, у примарном тумору. Поред тога, семаглутид је смањио и продукцију имуносупресивних цитокина у овим ћелијама, додатно доприносећи ремоделовању туморског микроокружења.

Истраживање је настављено анализом стеченог антитуморског имунског одговора. Утврђено је да семаглутид значајно повећава заступљеност и појачава антитуморски фенотип CD8⁺ Т лимфоцита, као и њихов цитотоксички капацитет, *in vitro*. Ови резултати су потврђени и *in vivo*, где је након деплеције CD8⁺ Т лимфоцита нестала разлика у брзини раста и величини примарног тумора између CD8⁺ деплетираних мишева третираних семаглутидом и оних који су примали PBS.

На крају, изоловане су ћелије из слезине здравих мишева и инкубиране са медијумом/ConA/семаглутидом. Семаглутид самостално је значајно повећао продукцију про-инфламацијских цитокина у неактивираним (наивним) ћелијама, а такође је испољио стимулаторни ефекат и на активираним ћелијама.

5.1 Утицај семаглутида на појаву и прогресију примарног тумора дојке

Карцином дојке представља један од водећих узрока обољевања и смртности од малигних болести код жена широм света (221). Упркос напретку у дијагностици и терапији, висока стопа рецидива и метастазирања остаје велики изазов у клиничкој пракси. GLP-1RA су нови анти-хипергликемијски лекови чија се примена шири на све више терапијских области (222). Недавна истраживања, иако још увек ограничена, указују на њихова значајна антитуморска и имуномодулаторна својства. GLP-1RA показују различите ефекте у зависности од типа карцинома. У моделу медуларног карцинома штитасте жлезде глодара, постоје докази да може активирати сигналне путеве преко GLP-1R и стимулирати пролиферацију туморских ћелија. Насупрот томе, код папиларног карцинома штитасте жлезде резултати показују да GLP-1RA немају значајан утицај на раст тумора (223, 224). Са друге стране, резултати истраживања на анималним моделима, су показали да GLP-1RA могу индуковати експресију фосфорилисаног AMPK, инхибирати експресију и фосфорилацију mTOR протеина, подстићи апоптозу ћелија карцинома ендометријума и тиме испољавати потенцијални антитуморски ефекат (225, 226). У случају карцинома дебелог црева, истраживања указују да агонисти GLP-1 рецептора инхибирају туморски раст блокадом PI3K/Akt и ERK1/2 сигналних путева, што смањује пролиферацију и индукује апоптозу у CT26 ћелијској линији мишијег колоректалног карцинома (227). У студијама на гојазним мишевима, утврђено је да семаглутид смањује појаву тумора и туморску масу у моделу хепатоцелуларног карцинома (228, 229). С обзиром на све веће доказе о антитуморским ефектима GLP-1RA, у овој студији смо испитивали утицај семаглутида на раст и прогресију карцинома дојке, као и његово дејство на антитуморски имунски одговор.

У овој студији, мишевима је индукован тумор, убризгавањем 4T1 ћелија карцинома дојке директно у 4. млечну жлезду. Наредних десет узастопних дана мишеви су третирани семаглутидом, односно PBS-ом у једној дневној дози. Након жртвовања, 36. дана експеримента, одређена је запремина тумора, а примарни тумор и органи су изоловани за даље анализе. Резултати указују да примена семаглутида значајно одлаже појаву палпабилног примарног тумора дојке код BALB/C мишева, као и да смањује пречник и запремину тумора (Фигура 1). Поред тога, третман семаглутидом је редуковао и метастазирање, што се огледа у нижој инциденци метастаза у плућима и јетри до 36. дана експеримента (Фигура 1). Познато је да се код карцинома дојке метастазе најчешће прво јављају у плућима (230). Иако је у групи третираној семаглутидом забележено смањење детектабилних плућних метастаза, ова разлика није достигла статистичку значајност, што може бити последица каснијег жртвовања мишева и детекције метастатских жаришта (Фигура 2). Са друге стране, семаглутид је значајно смањио појаву детектабилних метастаза у јетри. Уочени тренд указује да семаглутид може играти улогу у ограничавању метастазирања (Фигура 2). Генерално, добијени резултати указују да семаглутид одлаже појаву и прогресију карцинома дојке код мишева. У складу са нашим резултатима, *Glenny* и сарадници су показали да дуготрајно лечење тирзепатидом, дуални агонистом GLP-1R и гастричног инхибиторног полипептида, сузбија раст ортотопског тумора дојке индукованог E0771 ћелијама код мишева са гојазношћу изазваном исхраном богатом мастима (231).

5.2 Директно цитотоксичко дејство семаглутида

GLP-1RA показују потенцијалне директне антитуморске ефекте кроз инхибицију пролиферације, миграције, инвазије и епително-мезенхималне транзиције туморских ћелија, што је потврђено на моделима глиома, карцинома дојке и карцинома панкреаса (53, 57, 65). Полазећи од ових налаза, у оквиру овог истраживања најпре је испитан потенцијални цитотоксични ефекат семаглутида применом серије *in vitro* тестова.

Резултати су показали да семаглутид није значајно утицао на вијабилност мишићних (4T1) и хуманих (MDA-MB-231) ћелија карцинома дојке (Фигура 3). Како нисмо потврдили директан цитотоксички ефекат испитиваног лека, даље смо истраживали његов потенцијални утицај на туморско микроокружење. Некроза у туморима најчешће настаје као последица хроничне исхемије проузроковане недостатком кисеоника и хранљивих материја (232). Централна некроза је једна од карактеристичних особина инвазивног карцинома дојке и повезана је са повећаном пролиферативном активношћу туморских ћелија и неповољном прогнозом (233). У нашем истраживању, величина централне некрозе била је значајно мања код мишева третираних семаглутидом у поређењу са контролним мишевима третираним PBS-ом (Фигура 4), што указује да примена семаглутида може допринети инхибицији брзог раста примарног тумора који је уочен код PBS-третираних мишева. Ови налази су у сагласности са подацима из литературе који сугеришу да GLP-1RA, попут ексендина и ексенатида, могу смањити величину поља инфаркта миокарда, што указује на њихов потенцијал у смањењу исхемијски индукованог оштећења ткива (234, 235).

5.3 Утицај семаглутида на неоангиогенезу у примарном тумору дојке

Обзиром да није показан директан цитотоксички ефекат семаглутида, даља истраживања су усмерена на анализу његовог утицаја на туморску микросредину, са посебним фокусом на неоангиогенезу и антитуморски имунски одговор, како бисмо идентификовали могући механизам дејства семаглутида на успорену прогресију тумора.

Ангиогенеза представља процес формирања нових крвних судова из постојећих и игра кључну улогу у расту и преживљавању тумора. Овај процес омогућава туморским ћелијама снабдевање кисеоником и хранљивим материјама, чиме се подстиче њихова пролиферација, инвазија и метастазирање (236). С обзиром на њену улогу у прогресији болести, инхибиција ангиогенезе представља једну од стратегија у лечењу карцинома (247). Поред тога, познато је да хипоксија игра значајну улогу у подстицању туморске ангиогенезе, доприносећи адаптацији тумора на неповољне услове и његовој даљој прогресији (238). Хипоксија је један од кључних фактора који регулишу продукцију VEGF у туморском микроокружењу, а овај молекул је познат као један од најпотентнијих проангиогених фактора (239). Колико је нама познато, до сада, ово је прва студија која показује да семаглутид не утиче значајно на неоваскуларизацију у тумору дојке, што је потврђено одсуством статистички значајне разлике у нивоу експресије VEGF између тумора мишева третираних семаглутидом и оних који су примали PBS (Фигура 5). Поред тога, микроваскуларна густина је уско повезана са убрзаном прогресијом карцинома дојке (233). У нашој студији, нису забележене разлике у броју CD31⁺ и α -SMA⁺ ћелија између групе третиране семаглутидом и контролне групе, што додатно указује на то да семаглутид нема значајан утицај на ангиогенезу у овом експерименталном моделу (Фигура 5).

Иако семаглутид значајно смањује централну некрозу, делује да његов третман не утиче на експресију VEGF нити на микроваскуларну густину у примарном карциному дојке. Ови налази указују да семаглутид не делује кроз механизме који укључују регулацију ангиогенезе, већ да његов антитуморски ефекат може бити посредован другим механизмима, попут модулације имунског одговора на тумор.

5.4 Утицај семаглутида на NK ћелије

Имунски систем игра кључну улогу у борби против карцинома, при чему овај процес обухвата урођени и стечени имунски одговор (240, 241). Имунски надзор је процес у којем имунске ћелије активно прате и елиминишу абнормалне (потенцијалне

туморске) ћелије у организму (242-244). NK ћелије су главне ефекторске ћелије урођеног антитуморског имунског одговора, захваљујући својој способности да директно препознају и елиминишу туморске ћелије путем цитотоксичке активности и продукције цитокина (245, 246). Бројне студије истичу значај NK ћелија у имунском надзору (214, 215, 219). NK ћелије идентификују измене на МНС молекулима I класе на површини туморских ћелија или уочавају њихово одсуство, што следствено покреће цитотоксичку активност и елиминацију малигних ћелија. NK ћелије су нарочито значајне у антитуморском имунском одговору, посебно у случају слабо имуногенних тумора као што је 4T1 (247). Недавне студије су показале да семаглутид повећава продукцију IFN- γ и гранзима B у NK ћелијама гојазних пацијената (248). Такође, у мишијем моделу хепатоцелуларног карцинома, као и *in vitro*, показано је да лираглутид појачава цитотоксичност NK ћелија супресијом IL-6/STAT3 сигналног пута, који је конститутивно активиран у различитим карциномима и повезан са пролиферацијом, инвазијом и избегавањем антитуморског имунског надзора (249). У циљу испитивања антитуморског фенотипа NK ћелија, у овој студији смо анализирали експресију површинских маркера CD69, NKG2D и PD-1, и интрацелуларну експресију маркера дегранулације CD107a и IL-10. CD69 је маркер ране активације ћелија имунског система, експримиран на површини активираних Т лимфоцита, NK ћелија, В лимфоцита, моноцита и DCs. Игра улогу у регулацији имунског одговора, укључујући миграцију леукоцита, одржавање ткивне хомеостазе и модулацију запаљења (250, 251). Активациони рецептор NKG2D се експримира на NK и NK-Т ћелијама, $\gamma\delta$ Т, CD8⁺ и одређеним CD4⁺ Т лимфоцитима. Препознаје протеине сличне МНС молекулима I класе, који се појављују на мембрани ћелија под стресом, инфицираних или туморских ћелија. Везивање лиганда за NKG2D иницира активациони сигнал у NK ћелијама, доводећи до дегранулације, ослобађања перфоринона и гранзима, као и секреције цитокина (252). Мембрански протеин 1 удружен са лизозомом (енгл. *Lysosome-associated membrane glycoprotein 1* - LAMP-1; CD107a) представља гликопротеин који припада групи мембранских гликопротеина удружених са лизозомом. CD107a је маркер дегранулације NK ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита, који одржава стабилност лизозомалне мембране и облаже цитолитичке грануле. Након дегранулације, експримира се на површини ових ћелија, штитећи мембрану од дејства перфоринона (253, 254). PD-1, везујући се за свој рецептор, инхибира пролиферацију лимфоцита и супримира имунски одговор (255). IL-10 је имуносупресивни цитокин који блокира активност макрофага и Т лимфоцита. Његова улога у туморској микросредини је широко проучавана, а повишене концентрације IL-10 су повезане са лошијом прогнозом онколошких пацијената (256). Анализа фенотипа слезинских и тумор-инфилтришућих NK ћелија показала је да семаглутид појачава њихов антитуморски профил. Ово се огледа у повећаној експресији активационих маркера CD69, NKG2D и CD107a (Фигуре 6, 8), као и смањеној експресији инхибиторног рецептора PD-1 и цитокина IL-10, што указује на потенцијално јачање њихове антитуморске функције (Фигуре 7, 9). Затим смо тестирали да ли семаглутид може утицати на цитотоксичност NK ћелија изолованих из мишева са карциномом дојке. Интересантно, третман семаглутидом није статистички значајно повећао цитотоксички капацитет NK ћелија (Фигура 13).

Како бисмо дефинитивно испитали значај NK ћелија у антитуморском имунском одговору „посредованом” семаглутидом, спровели смо њихову деплецију код мишева пре индукције тумора дојке. Као што је очекивано, уклањање NK ћелија значајно је убрзало раст примарног тумора (Фигура 14). Занимљиво је да је семаглутид и даље ефикасно смањивао пречник тумора код мишева са деплетираним NK ћелијама, при чему је разлика у расту тумора између група постајала све израженија са дужином трајања експерименталног модела (Фигура 14). Овај налаз сугерише да, иако

смаглутид може позитивно утицати на фенотип NK ћелија, оне нису кључни медијатори његовог антитуморског ефекта. Ови резултати указују на то да се антитуморско дејство семаглутида вероватно остварује кроз алтернативне механизме, попут активације стеченог имунског одговора или модулације туморског микроокружења.

5.5 Утицај семаглутида на дендритске ћелије

DCs су професионалне антиген-презентујуће ћелије које играју кључну улогу у иницирању стеченог имунског одговора (257). У лимфним чворовима, DCs представљају антиген Т лимфоцитима, обезбеђујући први сигнал неопходан за њихову активацију. Поред тога, ове ћелије пружају и други, костимулаторни сигнал, као и трећи сигнал кроз продукцију цитокина, који усмеравају диференцијацију Т лимфоцита у Th1, Th2 или Th17 подтипове, односно цитотоксичке Т лимфоците (258). DCs представљају један од централних медијатора антитуморског имунског одговора, презентујући туморске антигене путем МНС молекула II класе CD4⁺ Т лимфоцитима, као и путем МНС молекула I класе, кроз процес унакрсне презентације, омогућавајући активацију CD8⁺ цитотоксичких Т лимфоцита (259, 260). CD11c је интегрински рецептор експримиран превасходно на DCs, моноцитима и неким субпопулацијама макрофага и игра улогу у фагоцитози, адхезији и активацији имунског система (261). Студија коју су спровели *Chiou* и сарадници показала је да профилакса дулаглутидом, агонистом GLP-1 рецептора, смањује број укупних, плазмациитоидних и класичних DCs у мозгу у мишјем моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса у поређењу са контролном групом (262). У нашој студији, утврдили смо да третман семаглутидом значајно повећава акумулацију CD11c⁺ DCs у слезини и примарном тумору (Фигуре 15-17). Осим тога, забележена је повећана експресија молекула МНС II и костимулаторног молекула CD86, (263) на CD11c⁺ дендритским ћелијама, што указује да семаглутид подстиче не само акумулацију, већ и сазревање ових ћелија. Познато је да зреле DCs представљају снажне активаторе Т лимфоцита, чиме иницирају стечени антитуморски имунски одговор (264). PI3K/Akt/mTOR сигнални пут игра значајну улогу у регулацији ћелијског циклуса, апоптозе, метаболизма и пролиферације, а његова хиперактивација је повезана са развојем бројних малигнитета (265). Мутације у тумор супресорима као што су PTEN, TSC1/2 и NF1/2, као и онкогене мутације у K-RAS, PIK3 и Akt, активирају овај сигнални пут, што доприноси настанку и резистенцији на терапију код различитих карцинома (266, 267). Недавна истраживања указују да семаглутид испољава свој ефекат управо кроз активацију PI3K/pAkt сигналног пута (268, 269). *Zhang* и сарадници су показали да је PI3K/Akt сигнални пут кључан за унакрсну-презентацију антигена од стране DCs и активацију CD8⁺ Т лимфоцита. Поред тога, показали су да је овај пут укључен у преузимање антигена, као и у експресију костимулаторних и МНС молекула (270). У складу са тим налазима, у нашем истраживању потврдили смо да третман семаглутидом повећава експресију mRNA за PI3K и pAkt, што указује на појачану активност ових сигналних молекула у изолованим DCs *in vitro* (Фигура 18). Додатно, детектована је повећана експресија МНС I и TAP молекула, што нас је навело на закључак да су DCs третиране семаглутидом ефикасније у презентовању антигена CD8⁺ Т лимфоцитима, потенцијално доприносећи активацији стеченог антитуморског имунског одговора.

5.6 Утицај семаглутида на регулаторне Т лимфоците и мијелоидне супресорске ћелије

Tregs представљају субпопулацију Т лимфоцита које су кључне ћелије имунске толеранције и имуносупресије (271). Ове ћелије се могу класификовати на два основна подтипа: ћелије које се развијају у тимусу као последица интракције са сопственим антигенима и периферне Tregs, које настају диференцијацијом CD4⁺ Т лимфоцита као одговор на слабу стимулацију антигенима у периферним лимфним органима (272, 273). Оба подтипа се одликују експресијом специфичног транскрипционог фактора FoxP3 (енгл. *Forkhead helix transcription factor p3*), као и молекула CD25, који представља α ланац рецептора за IL-2 (274, 275). FoxP3 је добро познат транскрипциони фактор неопходан за развој и функцију Tregs, који се могу диференцирати из периферних CD4⁺FoxP3⁻ прекурсора (276). Студија *Hadjiyanni* и сарадника показала је да третман ексендином-4, једним од GLP-1RA, значајно смањује број CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs у тимусу, али не и у лимфним чворовима, код NOD мишева (277). Поред тога, *Sherry* и сарадници су утврдили да је комбиновани третман ексендином-4 и анти-CD3 антителом довео до ефикаснијег смањења броја FoxP3⁺ Tregs у поређењу са самосталним третманом анти-CD3 антителом код дијабетичних NOD мишева (278). Друга студија је показала да семаглутид подстиче акумулацију и активацију Tregs у плућима, у не-туморском експерименталном моделу (279). У нашем истраживању, третман семаглутидом значајно је смањио акумулацију FoxP3⁺ Tregs у слезини (Фигура 19), при чему је ефекат био још израженији у примарном тумору (Фигура 20). Осим тога, семаглутид је смањио продукцију IL-10 у Tregs. Неколико студија указује да незреле DCs у периферији поседују толерогене особине, доприносећи развоју CD4⁺FoxP3⁺ Tregs из FoxP3⁺CD4⁺ Т ћелија, као и CD4⁺IL-10⁺IFN- γ ⁺ Tregs, чиме учествују у регулацији имуно толеранције (280-282). Повећана акумулација и сазревање DCs код мишева третираних семаглутидом може индиковати смањене регрутације и активности Tregs.

MDSC такође представљају популацију циркулишућих ћелија у крви које играју значајну улогу у биологији тумора (283). Ове ћелије представљају хетерогену популацију незрелих MDSC које потичу од прекурсора гранулоцита, макрофага и DCs (284-286). Код мишева, ове ћелије се карактеришу експресијом површинских маркера CD11b и Gr1. Познато је да MDSC посредују у супресији Т лимфоцита у антитуморском имунском одговору, индукујући анергију Т ћелија и подстичући миграцију и развој Tregs код мишева са туморима (287). Такође, повећаном продукцијом реактивних кисеоничних радикала MDSC могу индуковати апоптозу Т лимфоцита и NK ћелија (284, 285). Наши резултати указују да семаглутид утиче на смањење процентуалне заступљености CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁺ MDSC у примарном тумору дојке мишева третираних семаглутидом у поређењу са контролном групом (Фигура 21). Поред смањења укупне популације MDSC, функционална анализа је показала да је продукција TGF- β у овим ћелијама значајно нижа код мишева третираних семаглутидом. С обзиром на то да је TGF- β један од кључних имуносупресивних цитокина који доприносе инхибицији ефекторских Т ћелија и промовишу прогресију тумора, наши налази указују да семаглутид може допринети ремоделовању туморског микроокружења у правцу смањења имуносупресије.

5.7 Утицај семаглутида на Т лимфоците

Т лимфоцити су централни медијатори стеченог антитуморског имунског одговора, а њихова функција у елиминацији туморских ћелија је добро проучена. CD8⁺ Т лимфоцити представљају главне ефекторске ћелије стеченог имунског одговора који препознају и елиминишу туморске ћелије (288, 289). Наивни Т лимфоцити се диферентују у CD8⁺ Т лимфоците и меморијске Т ћелије у периферним лимфним

органима (290). Док $CD8^+$ Т лимфоцити брзо препознају и уништавају туморске ћелије које експримирају специфичне антигене, меморијски Т лимфоцити обезбеђују дуготрајну заштиту (291). Њихова способност да ослобађају цитотоксичне молекуле и индукују ћелијску смрт у ћелијама карцинома је од круцијалног значаја за сузбијање тумора. С обзиром на њихову важност у антитуморском одговору, у овом истраживању смо испитали утицај семаглутида на $CD8^+$ цитотоксичке Т лимфоците. Студија коју су спровели *Piening* и сарадници показала је да губитак телесне тежине изазван семаглутидом није довео до побољшања антитуморског имунског одговора посредованог $CD8^+$ Т лимфоцитима у поређењу са губитком тежине постигнутим дијетом у мишијем моделу меланома (292). У нашем истраживању, иако семаглутид није значајно повећао акумулацију Т лимфоцита у слезини (Фигура 23), много значајнији налаз је да је семаглутид значајно изменио њихов фенотип. Ово је потврђено повећаном експресијом активационих маркера $CD69$ и $NKG2D$, што указује на појачану ефекторску функцију Т лимфоцита (Фигура 24). Поред тога, примећено је повећање експресије маркера дегранулације $CD107a$ и појачана продукција гранзима В, што указује на побољшану цитотоксичку способност ових ћелија (Фигура 25). Још један значајан налаз је смањена експресија имуносупресивног цитокина $IL-10$ и инхибиторног рецептора $PD-1$ (Фигура 26), што сугерише да семаглутид може допринети смањењу имуносупресије унутар туморског микроокружења. Ови резултати указују да семаглутид, иако не утиче на бројност $CD8^+$ Т лимфоцита у слезини, позитивно модулише њихов функционални статус, појачавајући њихову цитотоксичку активност и смањујући имунолошку исцрпљеност.

Са друге стране, семаглутид је повећао накупљање Т лимфоцита у примарном тумору дојке (Фигура 27). Иако је примећен пораст у обе подгрупе, $CD45^+CD4^+$ Т помоћничких и $CD45^+CD8^+$ цитотоксичких Т лимфоцита, овај ефекат је био израженији код цитотоксичких Т лимфоцита (Фигура 28). Ови резултати указују да је повећана акумулација Т лимфоцита у примарном тумору код мишева третираних семаглутидом углавном последица повећане миграције $CD8^+$ цитотоксичких Т лимфоцита. У складу са побољшаним антитуморским фенотипом Т лимфоцита у слезини, уочили смо повећану експресију маркера активације $CD69$ и $NKG2D$ (Фигура 29), као и повећану експресију маркера дегранулације $CD107a$ и продукцију гранзима В унутар примарног тумора код мишева третираних семаглутидом (Фигура 30). Ово указује на појачану функционалну активност цитотоксичких Т лимфоцита унутар ткива примарног тумора, што може допринети њиховој ефикаснијој елиминацији туморских ћелија. Поред тога, забележена је смањена експресија имуносупресивног рецептора $PD-1$ и редуквана продукција $IL-10$ у Т лимфоцитима примарног тумора (Фигура 31), што указује на смањење имуносупресије унутар туморског микроокружења. У складу са овим резултатима, *Chen* и сарадници су показали да лираглутид може појачати ефекте блокаде $PD-1$, подстичући снажан и дуготрајан цитотоксички одговор $CD8^+$ Т лимфоцита у мишијим моделима карцинома плућа и јетре (100). Поред тога, утврђено је да лираглутид побољшава функцију $CD8^+$ Т лимфоцита код пацијената са хроничном опструктивном болести плућа смањењем експресије $PD-1$, чиме се потенцијално ублажава имуносупресија и повећава њихова ефекторска способност (293).

На основу ових налаза, даље смо испитали утицај семаглутида на цитотоксичност $CD8^+$ цитотоксичких Т лимфоцита изолованих из слезине мишева са карциномом дојке. Експеримент је спроведен 22. дана, имајући у виду да је за активацију стеченог имунског одговора неопходно време. Овај временски оквир изабран је на основу претходних сазнања да Т лимфоцити достижу пун функционални капацитет након излагања антигену, што омогућава најпоузданију процену њихове цитотоксичке активности. (294-296). Резултати су показали да семаглутид значајно

повећава цитотоксички капацитет CD8⁺ ћелија, што је потврђено смањењем вијабилности 4T1 циљних (туморских) ћелија у присуству цитотоксичких Т лимфоцита третираних семаглутидом (Фигура 32). Како бисмо испитали у којој су мери добијени резултати у корелацији са ефектима семаглутида на раст тумора *in vivo*, уклонили смо CD8⁺ Т лимфоците уз индукцију тумора мишевима третираним семаглутидом/PBS-ом. Уклањањем CD8⁺ Т лимфоцита *in vivo*, раст тумора је убрзан у свим експерименталним групама, при чему је елиминисана разлика у динамици раста тумора између група мишева (Фигура 33). Ови налази указују на то да је ефекат семаглутида на успоравање раста тумора у великој мери посредован активним деловањем CD8⁺ Т лимфоцита.

Свеукупно, добијени резултати указују да семаглутид не само да подстиче акумулацију CD8⁺ Т лимфоцита у туморском микроокружењу, већ и директно појачава њихов цитотоксички потенцијал. Ово сугерише да CD8⁺ Т лимфоцити играју кључну улогу у антитуморском имунском одговору код мишева третираних семаглутидом, што додатно потврђује значај модулације имунског одговора у терапијском дејству овог лека.

5.8 Имуномодулаторна дејства семаглутида

Цитокини су мали протеини који учествују у међућелијској сигнализацији и који функционишу као главни медијатори запаљенских и имунских реакција (297, 298). Слезина, као периферни лимфни орган, представља важан резервоар ћелија урођеног и стеченог имунског одговора (299, 300). Бројне студије указују на антиинфламаторна дејства GLP-1 рецепторских агониста. У *in vivo* моделу акутне инфламације код мишева, семаглутид је смањио системске нивое проинфламацијских цитокина TNF- α и IFN- γ (301, 302). Такође, семаглутид смањује моноцитну миграцију и инфилтрацију на место упале, смањујући експресију MCP-1 (301). У овој студији, анализирали смо утицај семаглутида на продукцију цитокина у спленоцитима здравих мишева. Свеже изоловане ћелије слезине подељене су у четири групе: ћелије инкубиране у медијуму, ћелије стимулисане са ConA, ћелије третиране само семаглутидом и ћелије ко-третиране семаглутидом и ConA-ом. Како се и очекивало, ConA, као поликлонски активатор Т лимфоцита, стимулисао је продукцију цитокина у спленоцитима. Међутим, ко-култивација са семаглутидом и ConA значајно је повећала концентрације IL-1 β , IL-17 и IL-10 (Фигура 34). Даље је анализиран однос проинфламацијских и антиинфламаторних цитокина, што је показало да семаглутид првенствено подстиче доминацију проинфламацијског цитокина IFN- γ над IL-10 (Фигура 35). Ови резултати су били у складу са повећаном експресијом CD69, једног од најранијих маркера на површини ћелије који се експримира као одговор на активацију Т лимфоцита (302, 303), као и са повећаном продукцијом IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-10 код CD3⁺ спленоцита третираних са ConA и семаглутидом, у поређењу са ћелијама третираним само са ConA (Фигуре 36, 37). На основу ових резултата, закључили смо да у овом моделу болести семаглутид директно појачава продукцију проинфламацијских цитокина у активираним спленоцитима, потврђујући његове снажне имуномодулаторне ефекте. За разлику од *in vivo* студија, у којима семаглутид испољава антиинфламаторни ефекат, наш рад је спроведен на свеже изолованим спленоцитима, а не у живом систему, што би могло објаснити повећану продукцију проинфламацијских цитокина.

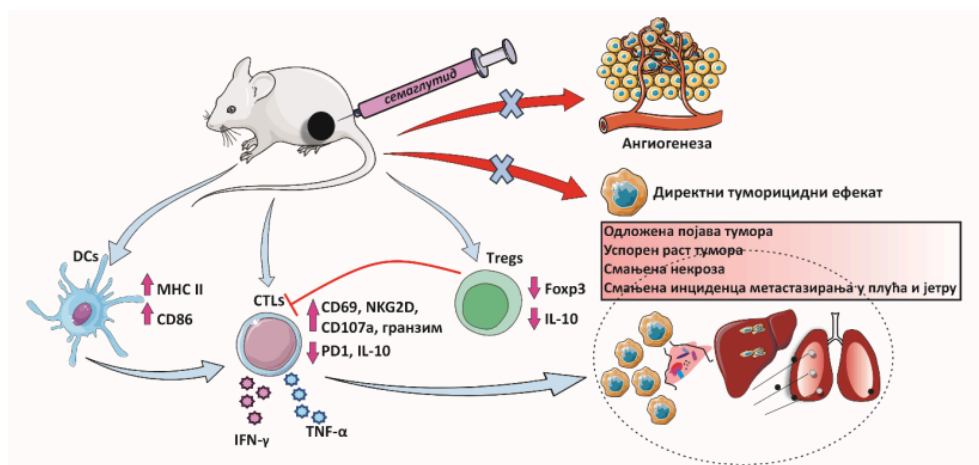
6. ЗАКЉУЧАК

У овој студији, по први пут је показано да примена семаглутида одлаже појаву и успорава прогресију карцинома дојке путем најмање три механизма. Семаглутид значајно повећава акумулацију и сазревање DCs што омогућава ефикаснију унакрсну-презентацију антигена цитотоксичким Т лимфоцитима. Семаглутид може директно или индиректно (посредовано појачаним сазревањем DCs) смањити инфилтрацију и активност MDSC и Tregs у примарном тумору, чиме се ублажава имуносупресија. Семаглутид, како директно тако и преко претходно описаних механизма, повећава акумулацију и туморицидну активност цитотоксичких Т лимфоцита унутар примарног тумора. Кроз поменуте механизме семаглутид показује значајан потенцијал као додатни терапијски агенс за карциноме дојке.

Закључак проистиче из следећих експерименталних резултата:

Апликација семаглутида мишевима са примарним тумором дојке:

1. Одлаже појаву палпабилног тумора и смањује пречник и волумен примарног тумора;
2. Успорава појаву удаљених метастаза у плућима и јетри;
3. Не показује директно цитотоксично дејство на хелијске линије мишјег и хуманог карцинома дојке, *in vitro*;
4. Смањује некрозу, док не утиче на експресију VEGF и маркера микроваскуларне густине CD31 и α -SMA, у примарном тумору дојке;
5. Повећава заступљеност DCs у слезини и примарном тумору дојке, као и њихово сазревање, што се огледа у повишеној експресији MHC II и CD86 молекула као и mRNA за PI3K, pAkt, MHC I и TAP;
6. Смањује заступљеност MDSC и Tregs у слезини и примарном тумору дојке, уз истовремену инхибицију њихове активности;
7. Значајно повећава акумулацију и туморицидни капацитет CD8⁺ Т лимфоцита, што се огледа у смањеној експресији PD-1 и IL-10, као и у повећаној експресији активационих молекула CD69, NKG2D, CD107a и гранзима B;
8. Директно стимулише продукцију цитокина IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-10 у CD3⁺ хелијама, *in vitro*;
9. Након *in vivo* деплеције NK хелија, задржава се тренд разлике у динамици раста примарног тумора између PBS мишева и мишева третираних семаглутидом;
10. *In vivo* деплецијом CD8⁺ Т лимфоцита поништена је разлика у динамици раста примарног тумора између PBS и семаглутид-третираних мишева.



Слика 6. Антитуморска дејства семаглутида у 4Т1 мишјем моделу карцинома дојке

7.СКРАЋЕНИЦЕ

GLP-1	ЕНГЛ. Glucagon-Like Peptide-1
GLP-1R	ЕНГЛ. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor
GLP-1RA	ЕНГЛ. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist
DPP-4	ЕНГЛ. Dipeptidyl Peptidase-4
ERK	ЕНГЛ. Extracellular Signal-Regulated Kinase
cAMP	ЕНГЛ. Cyclic Adenosine Monophosphate
DCs	ЕНГЛ. Dendritic cells
MDSC	ЕНГЛ. Myeloid-derived suppressor cells
Tregs	ЕНГЛ. Regulatory T cells
CTLs	ЕНГЛ. Cytotoxic T lymphocytes
PI3K	ЕНГЛ. Phosphatidylinositol 3-Kinase
pAkt	ЕНГЛ. phosphorylated Akt
mTOR	ЕНГЛ. Mammalian Target of Rapamycin
MAPK	ЕНГЛ. Mitogen-Activated Protein Kinase
PKC	ЕНГЛ. Protein Kinase C
NF-κB	ЕНГЛ. Nuclear Factor Kappa B
GSK-3	ЕНГЛ. Glycogen Synthase Kinase-3
EMT	ЕНГЛ. Epithelial-to-Mesenchymal Transition
VEGF	ЕНГЛ. Vascular Endothelial Growth Factor
TNF-α	ЕНГЛ. Tumor Necrosis Factor Alpha
IL	ЕНГЛ. Interleukin
IL-1β	ЕНГЛ. Interleukin-1β
IFN-γ	ЕНГЛ. Interferon Gamma
CD	ЕНГЛ. Cluster of Differentiation
STAT	ЕНГЛ. Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF-β	ЕНГЛ. Transforming Growth Factor Beta
PD-1	ЕНГЛ. Programmed Cell Death Protein 1
NETs	ЕНГЛ. Neutrophil Extracellular Traps
DNA	ЕНГЛ. Deoxyribonucleic Acid
MCP-1	ЕНГЛ. Monocyte Chemoattractant Protein-1
NK	ЕНГЛ. Natural Killer
CRP	ЕНГЛ. C-Reactive Protein
Th	ЕНГЛ. T helper
GM-CSF	ЕНГЛ. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
NLRP3	ЕНГЛ. NOD-, LRR- and Pyrin Domain-containing Protein 3
EGF	ЕНГЛ. Epidermal Growth Factor
pRb	ЕНГЛ. Retinoblastoma Protein
BRCA 1/2	ЕНГЛ. Breast Cancer Gene 1/2
TNBC	ЕНГЛ. Triple-Negative Breast Cancer
HER2	ЕНГЛ. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
FoxP3	ЕНГЛ. Forkhead box P3
CV	ЕНГЛ. Crystal Violet
PBS	ЕНГЛ. Phosphate-Buffered Saline
FBS	ЕНГЛ. Fetal bovine serum
MACS	ЕНГЛ. Magnetic cell sorting

H&E	ЕНГЛ. Hematoxylin and Eosin
α-SMA	ЕНГЛ. Alpha-Smooth Muscle Actin
PCR	ЕНГЛ. Polymerase Chain Reaction
RNA	ЕНГЛ. Ribonucleic Acid
NKG2D	ЕНГЛ. Natural Killer Group 2 Member D
mRNA	ЕНГЛ. messenger RNA
MHC	ЕНГЛ. Major Histocompatibility Complex
TAP	ЕНГЛ. Transporter Associated with Antigen Processing
Gr-1	ЕНГЛ. Granulocyte receptor-1
Lin	ЕНГЛ. Lineage
Sca	ЕНГЛ. Stem Cell Antigen

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Hjørne AP, Modvig IM, Holst JJ. The Sensory Mechanisms of Nutrient-Induced GLP-1 Secretion. *Metabolites*. 2022;12(5):420. doi: 10.3390/metabo12050420.
2. Khan R, Tomas A, Rutter GA. Effects on pancreatic Beta and other Islet cells of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Peptides*. 2020;125:170201. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170201
3. Zhao X, Wang M, Wen Z, Lu Z, Cui L, Fu C, Xue H, Liu Y, Zhang Y. GLP-1 receptor agonists: beyond their pancreatic effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:721135. doi: 10.3389/fendo.2021.721135
4. Zhang X, Shao F, Zhu L, Ze Y, Zhu D, Bi Y. Cardiovascular and microvascular outcomes of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled cardiovascular outcome trials with trial sequential analysis. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018;19(1):58. doi: 10.1186/s40360-018-0246-x
5. Voetmann LM, Underwood CR, Rolin B, Hansen AK, Kirk RK, Pyke C, Knudsen LB, Frederiksen KS. In vitro cell cultures of Brunner's glands from male mouse to study GLP-1 receptor function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022;322(6):C1260-C1269. doi: 10.1152/ajpcell.00345.2021
6. Bendotti G, Montefusco L, Lunati ME, Uselli V, Pastore I, Lazzaroni E, Assi E, Seelam AJ, El Essawy B, Jang J, Loretelli C, D'Addio F, Berra C, Ben Nasr M, Zuccotti G, Fiorina P. The anti-inflammatory and immunological properties of GLP-1 Receptor Agonists. *Pharmacol Res*. 2022;182:106320. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106320
7. Al-Noshokaty TM, Abdelhamid R, Abdelmaksoud NM, Khaled A, Hossam M, Ahmed R, Saber T, Khaled S, Elshaer SS, Abulsoud AI. Unlocking the multifaceted roles of GLP-1: Physiological functions and therapeutic potential. *Toxicol Rep*. 2025;14:101895. doi: 10.1016/j.toxrep.2025.101895
8. Rowlands J, Heng J, Newsholme P, Carlessi R. Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:672. doi: 10.3389/fendo.2018.00672.
9. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art. *Mol Metab*. 2021;46:101102. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101102.
10. Wojtasińska A, Kućmierz J, Tokarek J, Dybiec J, Rodzeń A, Młynarska E, Rysz J, Franczyk B. New Insights into Cardiovascular Diseases Treatment Based on Molecular Targets. *Int J Mol Sci*. 2023;24(23):16735. doi: 10.3390/ijms242316735
11. Drucker DJ. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab*. 2018;27(4):740-756. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.001
12. Madsbad S, Holst JJ. The promise of glucagon-like peptide 1 receptor agonists (GLP-1RA) for the treatment of obesity: a look at phase 2 and 3 pipelines. *Expert Opin Investig Drugs*. 2025;1-19. doi: 10.1080/13543784.2025.2472408
13. Ma X, Liu Z, Ilyas I, Little PJ, Kamato D, Sahebka A, Chen Z, Luo S, Zheng X, Weng J, Xu S. GLP-1 receptor agonists (GLP-1RAs): cardiovascular actions and therapeutic potential. *Int J Biol Sci*. 2021;17(8):2050-2068. doi: 10.7150/ijbs.59965
14. Wang P, Guo Z, Kong CY, Ma YL, Wang MY, Zhang XR, Yang Z. Danuglipron Ameliorates Pressure Overload-Induced Cardiac Remodelling Through the AMPK Pathway. *J Cell Mol Med*. 2025;29(5):e70488. doi: 10.1111/jcmm.70488.

15. Ali A, Khan D, Dubey V, Tarasov AI, Flatt PR, Irwin N. Comparative Effects of GLP-1 and GLP-2 on Beta-Cell Function, Glucose Homeostasis and Appetite Regulation. *Biomolecules*. 2024;14(12):1520. doi: 10.3390/biom14121520
16. Sadek MA, Kandil EA, El Sayed NS, Sayed HM, Rabie MA. Semaglutide, a novel glucagon-like peptide-1 agonist, amends experimental autoimmune encephalomyelitis-induced multiple sclerosis in mice: Involvement of the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Int Immunopharmacol*. 2023;115:109647. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109647
17. Wang C, Wu Z, Zhou J, Cheng B, Huang Y. Semaglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, inhibits oral squamous cell carcinoma growth through P38 MAPK signaling pathway. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2025;151(3):103. doi: 10.1007/s00432-025-06154-5
18. Turbitt J, Moffett RC, Brennan L, Johnson PRV, Flatt PR, McClenaghan NH, Tarasov AI. Molecular determinants and intracellular targets of taurine signalling in pancreatic islet β -cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2024;240(3):e14101. doi: 10.1111/apha.14101
19. Wang JY, Wang QW, Yang XY, Yang W, Li DR, Jin JY, Zhang HC, Zhang XF. GLP-1 receptor agonists for the treatment of obesity: Role as a promising approach. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1085799. doi: 10.3389/fendo.2023.1085799
20. Ji L, He X, Min X, Yang H, Wu W, Xu H, Chen J, Mei A. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in neoplastic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1465881. doi: 10.3389/fendo.2024.1465881
21. Bai S, Lin C, Jiao R, Cai X, Hu S, Lv F, Yang W, Zhu X, Ji L. Is the steady-state concentration, duration of action, or molecular weight of GLP-1RA associated with cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes? *Eur J Intern Med*. 2023;109:79-88. doi: 10.1016/j.ejim.2023.01.008
22. Harris K, Nealy KL. The Clinical Use of a Fixed-Dose Combination of Insulin Degludec and Liraglutide (Xultophy 100/3.6) for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Ann Pharmacother*. 2018;52(1):69-77. doi: 10.1177/1060028017726348
23. Holman RR, Bethel MA, Mentz RJ, Thompson VP, Lokhnygina Y, Buse JB, Chan JC, Choi J, Gustavson SM, Iqbal N, Maggioni AP, Marso SP, Öhman P, Pagidipati NJ, Polter N, Ramachandran A, Zinman B, Hernandez AF; EXSCEL Study Group. Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377(13):1228-1239. doi: 10.1056/NEJMoa1612917
24. Barritt AS 4th, Marshman E, Noureddin M. Review article: role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in non-alcoholic steatohepatitis, obesity and diabetes-what hepatologists need to know. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022;55(8):944-959. doi: 10.1111/apt.16794
25. Yan J, Yao B, Kuang H, Yang X, Huang Q, Hong T, Li Y, Dou J, Yang W, Qin G, Yuan H, Xiao X, Luo S, Shan Z, Deng H, Tan Y, Xu F, Xu W, Zeng L, Kang Z, Weng J. Liraglutide, Sitagliptin, and Insulin Glargine Added to Metformin: The Effect on Body Weight and Intrahepatic Lipid in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2019;69(6):2414-2426. doi: 10.1002/hep.30320
26. Tao T, Zhang Y, Zhu YC, Fu JR, Wang YY, Cai J, Ma JY, Xu Y, Gao YN, Sun Y, Fan W, Liu W. Exenatide, Metformin, or Both for Prediabetes in PCOS: A Randomized, Open-label, Parallel-group Controlled Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(3):e1420-e1432. doi: 10.1210/clinem/dgaa692
27. Salamun V, Jensterle M, Janez A, Vrtacnik Bokal E. Liraglutide increases IVF pregnancy rates in obese PCOS women with poor response to first-line reproductive

- treatments: a pilot randomized study. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(1):1-11. doi: 10.1530/EJE-18-0175
28. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Furtado RHM, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Sabatine MS. Comparison of the Effects of Glucagon-Like Peptide Receptor Agonists and Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors for Prevention of Major Adverse Cardiovascular and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation.* 2019;139(17):2022-2031. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038868
 29. Nauck MA, Petrie JR, Sesti G, Mannucci E, Courrèges JP, Lindegaard ML, Jensen CB, Atkin SL; Study 1821 Investigators. A Phase 2, Randomized, Dose-Finding Study of the Novel Once-Weekly Human GLP-1 Analog, Semaglutide, Compared With Placebo and Open-Label Liraglutide in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39(2):231-41. doi: 10.2337/dc15-0165
 30. Bezin J, Gouverneur A, Pénichon M, Mathieu C, Garrel R, Hillaire-Buys D, Pariente A, Faillie JL. GLP-1 Receptor Agonists and the Risk of Thyroid Cancer. *Diabetes Care.* 2023;46(2):384-390. doi: 10.2337/dc22-1148
 31. Knudsen LB, Lau J. The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:155. doi: 10.3389/fendo.2019.00155.
 32. Christou GA, Katsiki N, Blundell J, Fruhbeck G, Kiortsis DN. Semaglutide as a promising antiobesity drug. *Obes Rev.* 2019;20(6):805-815. doi: 10.1111/obr.12839.
 33. Zhang R, Hou QC, Li BH, Deng L, Yang YM, Li TX, Yao XQ, Yang LL, Lin XL, Liao YQ, Wang L, Liu YP, Tan J, Wan ZW, Shuai P. Efficacy and safety of subcutaneous semaglutide in adults with overweight or obese: a subgroup meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1132004. doi: 10.3389/fendo.2023.1132004
 34. Meier JJ. Efficacy of Semaglutide in a Subcutaneous and an Oral Formulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:645617. doi: 10.3389/fendo.2021.645617.
 35. Rakipovski G, Rolin B, Nøhr J, Klewe I, Frederiksen KS, Augustin R, Hecksher-Sørensen J, Ingvorsen C, Pølex-Wolf J, Knudsen LB. The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(6):844-857. doi: 10.1016/j.jacbts.2018.09.004
 36. Yang Y, Song L, Yu L, Zhang J, Zhang B. Transcriptomics and proteomics characterizing the antioxidant mechanisms of semaglutide in diabetic mice with cognitive impairment. *Int J Mol Med.* 2025;55(4):56. doi: 10.3892/ijmm.2025.5497
 37. Hu Q, Zhang L, Tao Y, Xie S, Wang A, Luo C, Yang R, Shen Z, He B, Fang Y, Chen P. Semaglutide Ameliorates Hepatocyte Steatosis in a Cell Co-Culture System by Downregulating the IRE1 α -XBP1-C/EBP α Signaling Pathway in Macrophages. *Pharmacology.* 2025;110(1):26-35. doi: 10.1159/000540654
 38. Elbadawy NN, Saad MA, Elfarrash S, Ahmed MAE, Abdelkader NF. The GLP-1 agonist semaglutide ameliorates cognitive regression in P301S tauopathy mice model via autophagy/ACE2/SIRT1/FOXO1-Mediated Microglia Polarization. *Eur J Pharmacol.* 2025;991:177305. doi: 10.1016/j.ejphar.2025.177305
 39. Salem EA, Alqahtani SM, El-Shoura EAM, Zaghlool SS, Abdelzaher LA, Mohamed SAM, Alalhareth IS, Sheref AAM. Neuroprotective effects of semaglutide and metformin against rotenone-induced neurobehavioral changes in male diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2025. doi: 10.1007/s00210-025-03920-7
 40. Zhao H, Wei R, Wang L, Tian Q, Tao M, Ke J, Liu Y, Hou W, Zhang L, Yang J, Hong T. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits growth and promotes apoptosis of human pancreatic cancer cells in a cAMP-dependent manner. *Am J*

- Physiol Endocrinol Metab. 2014;306(12):E1431-41. doi: 10.1152/ajpendo.00017.2014.
41. Zhao H, Wang L, Wei R, Xiu D, Tao M, Ke J, Liu Y, Yang J, Hong T. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits tumorigenicity and metastasis of human pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(9):850-3. doi: 10.1111/dom.12291
 42. Bobustuc GC, Kassam AB, Rovin R, Jeudy S, Smith JS, Isley B, Singh M, Sassoon D, Srivenugopal KS, Konduri SD. MGMT inhibition in ER positive breast cancer leads to CDC2, TOP2A, AURKB, CDC20, KIF20A, Cyclin A2, Cyclin B2, Cyclin D1, ER α and Survivin inhibition and enhances response to temozolomide. *Oncotarget.* 2018;9(51):29727-29742. doi: 10.18632/oncotarget.25696.
 43. Quoyer J, Longuet C, Broca C, Linck N, Costes S, Varin E, Bockaert J, Bertrand G, Dalle S. GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2002;277(3):1989-2002. doi: 10.1074/jbc.M109.067207.
 44. Wenjing H, Shuang Y, Weisong L, Haipeng X. Exendin-4 does not modify growth or apoptosis of human colon cancer cells. *Endocr Res.* 2017;42(3):209-218. doi: 10.1080/07435800.2017.1292525
 45. He L, Zhang S, Zhang X, Liu R, Guan H, Zhang H. Effects of insulin analogs and glucagon-like peptide-1 receptor agonists on proliferation and cellular energy metabolism in papillary thyroid cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:5621-5631. doi: 10.2147/OTT.S150701
 46. Waser B, Beetschen K, Pellegata NS, Reubi JC. Incretin receptors in non-neoplastic and neoplastic thyroid C cells in rodents and humans: relevance for incretin-based diabetes therapy. *Neuroendocrinology.* 2011;94(4):291-301. doi: 10.1159/000330447
 47. Niederle MB, Binter T, Riss P, Niederle B, Scheuba C. Tailored Surgery for Medullary Thyroid Cancer (MTC) Based on Pretherapeutic Basal Calcitonin and Intraoperative Diagnosis of Desmoplastic Stroma Reaction: A Proposal for a New Surgical Concept. *Ann Surg Oncol.* 2025. doi: 10.1245/s10434-025-16958-x
 48. Liu Y, Zhang X, Chai S, Zhao X, Ji L. Risk of Malignant Neoplasia with Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Treatment in Patients with Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *J Diabetes Res.* 2019;1534365. doi: 10.1155/2019/1534365.
 49. Koehler JA, Kain T, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation inhibits growth and augments apoptosis in murine CT26 colon cancer cells. *Endocrinology.* 2011;152(9):3362-72. doi: 10.1210/en.2011-1201
 50. Passos PRC, Filho VOC, Noronha MM, Hyppolito EB, Saldanha EF, Motta RV. Influence of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on hepatic events in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2025;40(1):67-77. doi: 10.1111/jgh.16752
 51. Alfawaz S, Burzangi A, Esmat A. Mechanisms of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Beneficial Effects of Semaglutide: A Review. *Cureus.* 2024;16(8):e67080. doi: 10.7759/cureus.67080.
 52. Liu Y, Chen S, Zhen R. Effect of Semaglutide on High-Fat-Diet-Induced Liver Cancer in Obese Mice. *J Proteome Res.* 2024;23(2):704-717. doi:10.1021/acs.jproteome.3c00498
 53. Nie ZJ, Zhang YG, Chang YH, Li QY, Zhang YL. Exendin-4 inhibits glioma cell migration, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition through GLP-1R/sirt3 pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1364-1369. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.092

54. Sarkar S, Kandasamy T, Ghosh SS. Inhibition of the MLL1-WDR5 interaction modulates epithelial to mesenchymal transition and metabolic pathways in triple-negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2025;755:151559. doi: 10.1016/j.bbrc.2025.151559
55. Zhou H, Zhang J, Feng W, Chen N, Umar T, Feng X, Liu W, Qiu C, Deng G. YAP1 regulates endometrial receptivity by promoting the plasma membrane transformation and proliferation of bovine endometrial epithelial cells. *Theriogenology*. 2025;237:166-177. doi: 10.1016/j.theriogenology.2025.02.017
56. Lv P, Hu Y, Ding L, Xiang W. Puerarin triggers sensitivity to ferroptosis in glioblastoma cells by activating SIRT3/NCOA4-dependent autophagy. *Int Immunopharmacol*. 2025;149:114246. doi: 10.1016/j.intimp.2025.114246
57. Yan M, Shen M, Xu L, Huang J, He G, An M, Li X, Gao Z, Meng X. Inactivation of Pancreatic Stellate Cells by Exendin-4 Inhibits the Migration and Invasion of Pancreatic Cancer Cells. *Onco Targets Ther*. 2020;13:9455-9463. doi:10.2147/OTT.S259853
58. Dal Molin M, Kim H, Blackford A, Sharma R, Goggins M. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Expression in Normal and Neoplastic Human Pancreatic Tissues. *Pancreas*. 2016;45(4):613-9. doi: 10.1097/MPA.0000000000000521.
59. Aliyari M, Ghoflchi S, Hashemy SI, Hashemi SF, Reihani A, Hosseini H. The PI3K/Akt pathway: a target for curcumin's therapeutic effects. *J Diabetes Metab Disord*. 2025;24(1):52. doi: 10.1007/s40200-025-01563-2
60. He W, Yu S, Wang L, He M, Cao X, Li Y, Xiao H. Exendin-4 inhibits growth and augments apoptosis of ovarian cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;436:240-249. doi:10.1016/j.mce.2016.07.032
61. Kanda R, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Ichinose T, Nagasaka K, Sasajima Y, Ryo E, Fujii T, Osuga Y, Ayabe T. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor and its role in regulating autophagy in endometrial cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):657. doi: 10.1186/s12885-018-4570-8
62. Zhang Y, Xu F, Liang H, Cai M, Wen X, Li X, Weng J. Exenatide inhibits the growth of endometrial cancer Ishikawa xenografts in nude mice. *Oncol Rep*. 2016;35(3):1340-8. doi: 10.3892/or.2015.4476
63. Ligumsky B, Wolf I, Israeli S, Haimsohn M, Ferber S, Karasik A, Kaufman B, Rubinek T. The peptide-hormone glucagon-like peptide-1 activates cAMP and inhibits growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(2):449-61. doi: 10.1007/s10549-011-1585-0
64. Tanaka Y, Iwaya C, Kawanami T, Hamaguchi Y, Horikawa T, Shigeoka T, Yanase T, Kawanami D, Nomiyama T. Combined treatment with glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 and metformin attenuates breast cancer growth. *Diabetol Int*. 2021;13(3):480-492. doi: 10.1007/s13340-021-00560-z.
65. Iwaya C, Nomiyama T, Komatsu S, Kawanami T, Tsutsumi Y, Hamaguchi Y, Horikawa T, Yoshinaga Y, Yamashita S, Tanaka T, Terawaki Y, Tanabe M, Nabeshima K, Iwasaki A, Yanase T. Exendin-4, a Glucagonlike Peptide-1 Receptor Agonist, Attenuates Breast Cancer Growth by Inhibiting NF-κB Activation. *Endocrinology*. 2017;158(12):4218-4232. doi:10.1210/en.2017-00461
66. Liu ZZ, Duan XX, Yuan MC, Yu J, Hu X, Han X, Lan L, Liu BW, Wang Y, Qin JF. Glucagon-like peptide-1 receptor activation by liraglutide promotes breast cancer through NOX4/ROS/VEGF pathway. *Life Sci*. 2022;294:120370. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120370.

67. Masson W, Lobo M, Nogueira JP, Rodriguez-Granillo AM, Barbagelata LE, Siniawski D. Anti-inflammatory effect of semaglutide: updated systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2024;11:1379189. doi: 10.3389/fcvm.2024.1379189
68. Alharbi SH. Anti-inflammatory role of glucagon-like peptide 1 receptor agonists and its clinical implications. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2024;15:20420188231222367. doi: 10.1177/20420188231222367
69. Yarıbeygi H, Maleki M, Sathyapalan T, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Anti-inflammatory potentials of incretin-based therapies used in the management of diabetes. *Life Sci*. 2020;241:117152. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117152
70. McEwan P, Bøg M, Faurby M, Foos V, Lingvay I, Lübker C, Miller R, Toliver JC, Yeates F, Lincoff AM. Cost-effectiveness of semaglutide in people with obesity and cardiovascular disease without diabetes. *J Med Econ*. 2025;28(1):268-278. doi: 10.1080/13696998.2025.2459529
71. Amini A, Hamann S, Larsen M. Semaglutide and non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy: Review and interpretation of reported association. *Acta Ophthalmol*. 2025. doi: 10.1111/aos.17473
72. Lee YS, Jun HS. Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:3094642. doi: 10.1155/2016/3094642
73. Yang W, Zhong Y, Zhou P, Lu D. Monocyte to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a marker of the presence and progression of diabetic kidney disease. *Ren Fail*. 2025;47(1):2438846. doi: 10.1080/0886022X.2024.2438846
74. Nishida N, Sugimoto S, Miyagaki S, Cho C, Konishi M, Goda T, Yamaguchi M, Kawabe Y, Morimoto H, Kusuyama J, Okamura T, Hamaguchi M, Mori J, Nakajima H, Fukui M, Iehara T. Anti-inflammatory effect of Angiotensin 1-7 in white adipose tissue. *Adipocyte*. 2025;14(1):2449027. doi: 10.1080/21623945.2024.2449027
75. Kalacun V, Ekart R, Bevc S, Skok P, Hojs R, Vodošek Hojs N. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis: a comparison of patients with or without advanced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ren Fail*. 2025;47(1):2455523. doi: 10.1080/0886022X.2025.2455523.
76. Bułdak Ł, Machnik G, Bułdak RJ, Łabuzek K, Böldys A, Belowski D, Basiak M, Okopień B. Exenatide (a GLP-1 agonist) expresses anti-inflammatory properties in cultured human monocytes/macrophages in a protein kinase A and B/Akt manner. *Pharmacol Rep*. 2016;68(2):329-37. doi: 10.1016/j.pharep.2015.10.008
77. Noguchi T, Katoh H, Nomura S, Okada K, Watanabe M. The GLP-1 receptor agonist exenatide improves recovery from spinal cord injury by inducing macrophage polarization toward the M2 phenotype. *Front Neurosci*. 2024;18:1342944. doi: 10.3389/fnins.2024.1342944
78. Lu Y, Liu S, Yang P, Kou Y, Li C, Liu H, Li M. Exendin-4 and eldecalcitol synergistically promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through M2 macrophages polarization via PI3K/AKT pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):113. doi: 10.1186/s13287-022-02800-8.
79. Shiraishi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Mizuta H, Takeya M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(2):304-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.086.
80. Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, Saheki T, Japar S, Iwama H, Matsumura Y, Ozaki M, Yoshimura T, Murao K. Exendin-4 Increases Scavenger Receptor Class BI Expression via Activation of AMPK/FoxO1 in Human Vascular Endothelial Cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2022;44(11):5474-5484. doi: 10.3390/cimb44110370

81. Kalavalapalli S, Bril F, Guingab J, Vergara A, Garrett TJ, Sunny NE, Cusi K. Impact of exenatide on mitochondrial lipid metabolism in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J Endocrinol.* 2019;241(3):293-305. doi: 10.1530/JOE-19-0007
82. Fang S, Cai Y, Lyu F, Zhang H, Wu C, Zeng Y, Fan C, Zou S, Zhang Y, Li P, Wang L, YaomingXue, Guan M. Exendin-4 Improves Diabetic Kidney Disease in C57BL/6 Mice Independent of Brown Adipose Tissue Activation. *J Diabetes Res.* 2020;2020:9084567. doi: 10.1155/2020/9084567.
83. Chaudhuri A, Ghanim H, Vora M, Sia CL, Korzeniewski K, Dhindsa S, Makdissi A, Dandona P. Exenatide exerts a potent antiinflammatory effect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):198-207. doi: 10.1210/jc.2011-1508
84. Yusta B, Baggio LL, Koehler J, Holland D, Cao X, Pinnell LJ, Johnson-Henry KC, Yeung W, Surette MG, Bang KW, Sherman PM, Drucker DJ. GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R. *Diabetes.* 2015;64(7):2537-49. doi: 10.2337/db14-1577
85. Tian B, Hao J, Zhang Y, Tian L, Yi H, O'Brien TD, Sutherland DE, Hering BJ, Guo Z. Upregulating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in pancreatic lymph nodes in diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Transplantation.* 2009;87(2):198-206. doi: 10.1097/TP.0b013e3181933261
86. He J, Lian C, Fang Y, Wu J, Zhou H, Ye X. The influence of exendin-4 intervention on -obese diabetic mouse blood and the pancreatic tissue immune microenvironment. *Exp Ther Med.* 2016;12(5):2893-2898. doi: 10.3892/etm.2016.3694
87. Chen D, Li Q, Liang H, Huang L, Zhou H, Zheng X, Wang Z. Exenatide enhanced the antitumor efficacy on PD-1 blockade by the attenuation of neutrophil extracellular traps. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;619:97-103. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.06.052
88. Sun Z, Zhang F, Gao Z, Wu J, Bi Q, Zheng X, Zhang J, Cao P, Wang W. Liraglutide alleviates ferroptosis in renal ischemia reperfusion injury via inhibiting macrophage extracellular trap formation. *Int Immunopharmacol.* 2024;142(Pt B):113258. doi: 10.1016/j.intimp.2024.113258.
89. Bułdak Ł, Boldys A, Skudrzyk E, Machnik G, Okopień B. Liraglutide Therapy in Obese Patients Alters Macrophage Phenotype and Decreases Their Tumor Necrosis Factor Alpha Release and Oxidative Stress Markers-A Pilot Study. *Metabolites.* 2024;14(10):554. doi: 10.3390/metabo14100554
90. Meurot C, Martin C, Sudre L, Breton J, Bougault C, Rattenbach R, Bismuth K, Jacques C, Berenbaum F. Liraglutide, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, exerts analgesic, anti-inflammatory and anti-degradative actions in osteoarthritis. *Sci Rep.* 2022;12(1):1567. doi: 10.1038/s41598-022-05323-7
91. He Y, Song W, Deng Y, Lin X, Gao Z, Ma P. Liraglutide promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting M1 macrophage polarization and CXCL9 release in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2025;597:112441. doi: 10.1016/j.mce.2024.112441
92. Fan Z, Cui Y, Chen L, Liu P, Duan W. 23-Hydroxybetulinic acid attenuates 5-fluorouracil resistance of colorectal cancer by modulating M2 macrophage polarization via STAT6 signaling. *Cancer Immunol Immunother.* 2024;73(5):83. doi: 10.1007/s00262-024-03662-0
93. Chai G, Nan Y, Zhao H, Hu Q. SHP2 mediates STAT3/STAT6 signaling pathway in TAM to inhibit proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma. *Aging (Albany NY).* 2024;16(18):12498-12509. doi: 10.18632/aging.205799
94. Zhang S, Li D, Wang H, Liu B, Du F, Wang Q. CAFs-derived Exosomal miR-889-3p Might Repress M1 Macrophage Polarization to Boost ESCC Development by

- Regulating STAT1. *Cell Biochem Biophys*. 2025;83(1):633-646. doi: 10.1007/s12013-024-01496-2
95. Wang Z, Wang M, Hu X, Li Y, Ma D, Li S, Zhao G, Xie Y, Shu Y, Yang J. Liraglutide, a Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist, Attenuates Development of Cardiac Allograft Vasculopathy in a Murine Heart Transplant Model. *Transplantation*. 2019;103(3):502-511. doi: 10.1097/TP.0000000000002448
 96. Li Y, Wang Y, Ren G, Yu H, Yin Y, Ma L, Yu X, Chen W, Zhang K, Zhao Y, Liu Z. Characterization of novel mouse esophageal squamous cell carcinoma cell lines and their utility as preclinical models. *Cancer Lett*. 2025;616:217600. doi: 10.1016/j.canlet.2025.217600
 97. Lv R, Zhao Y, Wang X, He Y, Dong N, Min X, Liu X, Yu Q, Yuan K, Yue H, Yin Q. GLP-1 analogue liraglutide attenuates CIH-induced cognitive deficits by inhibiting oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis via the Nrf2/HO-1 and MAPK/NF- κ B signaling pathways. *Int Immunopharmacol*. 2024;142(Pt B):113222. doi: 10.1016/j.intimp.2024.113222.
 98. Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, Corrigan MA, Gaoatswe G, Jackson R, O'Reilly V, Lynch L, Doherty DG, Moynagh PN, Kirby B, O'Connell J, O'Shea D. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. *Diabetologia*. 2011;54(11):2745-54. doi: 10.1007/s00125-011-2232-3
 99. Sen P, Demirdal T, Nemli SA, Sencan A. Diagnostic and prognostic value of new bioscore in critically ill septic patients. *Arch Physiol Biochem*. 2022;128(2):300-305. doi: 10.1080/13813455.2019.1677720
 100. Chen D, Liang H, Huang L, Zhou H, Wang Z. Liraglutide enhances the effect of checkpoint blockade in lung and liver cancers through the inhibition of neutrophil extracellular traps. *FEBS Open Bio*. 2024;14(8):1365-1377. doi: 10.1002/2211-5463.13499.
 101. Deng F, Wu W, Fan X, Zhong X, Wang N, Wang Y, Pan T, Du Y. Dulaglutide Protects Mice against Diabetic Sarcopenia-Mediated Muscle Injury by Inhibiting Inflammation and Regulating the Differentiation of Myoblasts. *Int J Endocrinol*. 2023;2023:9926462. doi: 10.1155/2023/9926462
 102. Sanada J, Obata A, Obata Y, Fushimi Y, Shimoda M, Kohara K, Nakanishi S, Mune T, Kaku K, Kaneto H. Dulaglutide exerts beneficial anti atherosclerotic effects in ApoE knockout mice with diabetes: the earlier, the better. *Sci Rep*. 2021;11(1):1425. doi: 10.1038/s41598-020-80894-x
 103. Chiou HC, Lin MW, Hsiao PJ, Chen CL, Chiao S, Lin TY, Chen YC, Wu DC, Lin MH. Dulaglutide Modulates the Development of Tissue-Infiltrating Th1/Th17 Cells and the Pathogenicity of Encephalitogenic Th1 Cells in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1584. doi: 10.3390/ijms20071584
 104. Vinué Á, Navarro J, Herrero-Cervera A, García-Cubas M, Andrés-Blasco I, Martínez-Hervás S, Real JT, Ascaso JF, González-Navarro H. The GLP-1 analogue lixisenatide decreases atherosclerosis in insulin-resistant mice by modulating macrophage phenotype. *Diabetologia*. 2017;60(9):1801-1812. doi: 10.1007/s00125-017-4330-3
 105. Abdel-Latif RG, Ahmed AF, Heeba GH. Low-dose lixisenatide protects against early-onset nephropathy induced in diabetic rats. *Life Sci*. 2020;263:118592. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118592
 106. Chen SD, Chuang YC, Lin TK, Yang JL. Alternative role of glucagon-like Peptide-1 receptor agonists in neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol*. 2023;938:175439. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175439.

107. Chung YW, Lee JY, Ju HH, Choi JA. Anti-inflammatory effect of glucagon-like Peptide-1 receptor agonist on the neurosensory retina in an acute optic nerve injury rat model. *Eur J Pharmacol.* 2022;933:175269. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175269
108. Zhang J, Wang X, Zhou Y. Comparative analysis of semaglutide induced adverse reactions: Insights from FAERS database and social media reviews with a focus on oral vs subcutaneous administration. *Front Pharmacol.* 2024;15:1471615. doi: 10.3389/fphar.2024.1471615.
109. Pan X, Yang L, Wang S, Liu Y, Yue L, Chen S. Semaglutide ameliorates obesity-induced cardiac inflammation and oxidative stress mediated via reduction of neutrophil Cxcl2, S100a8, and S100a9 expression. *Mol Cell Biochem.* 2024;479(5):1133-1147. doi: 10.1007/s11010-023-04784-2
110. Petralli G, Zoppo AD, Rovera C, Raggi F, Salvati A, Moriconi D, Distaso M, Brunetto MR, Solini A. Different formulations of semaglutide and oxidative stress in subjects with type 2 diabetes and MASLD: an open-label, real-life study. *Acta Diabetol.* 2025. doi: 10.1007/s00592-025-02466-7
111. He W, Wei J, Liu X, Zhang Z, Huang R, Jiang Z. Semaglutide ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by improving cardiac mitophagy to suppress the activation of NLRP3 inflammasome. *Sci Rep.* 2024;14(1):11824. doi: 10.1038/s41598-024-62465-6
112. Fang J, Li Z, Wang P, Zhang X, Mao S, Li Y, Yu D, Li X, Xing Y, Shi H, Yin S. Inhibition of the NLRP3 inflammasome attenuates spiral ganglion neuron degeneration in aminoglycoside-induced hearing loss. *Neural Regen Res.* 2025;20(10):3025-3039. doi: 10.4103/NRR.NRR-D-23-01879
113. Li JY, Chen MB, Fu TT, Liu FF, Liu J, Xu CJ, Zhou J, Rao Y, Jiang ZP, Huang L. Discovery of structurally intriguing diterpenoids as anti-neuroinflammatory agents from mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. via inhibiting macrophage polarization and inflammasome. *Phytochemistry.* 2025;234:114440. doi: 10.1016/j.phytochem.2025.114440
114. Verma S, Petrie MC, Borlaug BA, Butler J, Davies MJ, Kitzman DW, Shah SJ, Rönnbäck C, Abildstrøm SZ, Liisberg K, Wolf D, von Lewinski D, Lelonek M, Melenovsky V, Senni M, Kosiborod MN; STEP-HFpEF Trial Committees and Investigators. Inflammation in Obesity-Related HFpEF: The STEP-HFpEF Program. *J Am Coll Cardiol.* 2024;84(17):1646-1662. doi: 10.1016/j.jacc.2024.08.028
115. Newsome P, Francque S, Harrison S, Ratzliff V, Van Gaal L, Calanna S, Hansen M, Linder M, Sanyal A. Effect of semaglutide on liver enzymes and markers of inflammation in subjects with type 2 diabetes and/or obesity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50(2):193-203. doi: 10.1111/apt.15316
116. Liu X, Zhu J, Li C, Tong C, Zhao C, Lin X, Wang Y, Alinejad T, Wu H, Chen G, Li L. Alleviation of obesity cardiomyopathy by Fisetin through the inhibition of NF-κB/MAPK signaling. *Int Immunopharmacol.* 2025;151:114319. doi: 10.1016/j.intimp.2025.114319
117. Yang Z, Luo Y, He J, Yuan Y, Liu Q, Guo J, Lin Y, Sun L, Fan G. Association between weekend catch-up sleep and the systemic immune-inflammation index in adults: Evidence from the NHANES 2017-2020. *J Psychosom Res.* 2025;191:112070. doi: 10.1016/j.jpsychores.2025.112070
118. Suhaimi SQA, Azemi AK, Mokhtar SS, Mat Zin AA, Rasool AHG. Impact of time-restricted feeding on glycemic indices, vascular oxidative stress, and inflammation in an obese prediabetes rat model induced by a high-fat diet and sugar drink. *Nutrition.* 2025;133:112692. doi: 10.1016/j.nut.2025.112692.

119. Simeonov R, Simeonova G. Nucleomorphometric analysis of feline basal cell carcinomas. *Res Vet Sci.* 2008;84(3):440-3. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.06.012.
120. Ilic IR, Stojanović NM, Randjelović PJ, Mihajlović MN, Radulović NS, Ilić RS. Evaluation of pathological parameters and morphometric data of desmoplastic lobular breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2016;59(4):463-468. doi: 10.4103/0377-4929.191775
121. Weissferdt A, Wenig B, Moran CA. Salivary gland-like low-grade clear cell carcinomas of the thoracic cavity: A clinical, immunohistochemical, and molecular analysis of three cases. *Ann Diagn Pathol.* 2025;75:152446. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2025.152446
122. Nakhlis F, Baker GM, Li T, McAuliffe PF, Plitas G, Ludwig KK, Boisvert M, Rosenberger LH, Gallagher KK, Jacobs L, Nimbkar SN, Feldman S, Lange P, Attaya V, DeMeo M, Fraetarelli A, Schnitt SJ, King TA. Incidence of Adjacent Synchronous Ipsilateral Infiltrating Carcinoma and/or Ductal Carcinoma In Situ in Patients Diagnosed with Flat Epithelial Atypia by Core Needle Biopsy (TBCRC 034). *Ann Surg Oncol.* 2025;32(4):2578-2584. doi: 10.1245/s10434-024-16762-z.
123. Du R, Xia L, Sun S, Lian Z, Zou X, Gao J, Xie H, Fan R, Song J, Li X, Liu J, Fan D. URG11 promotes gastric cancer growth and invasion by activation of beta-catenin signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):621-35. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00622.x
124. Zhong L, Zhu J, Chen J, Jin X, Liu L, Ji S, Luo J, Wang H. MGAT4EP promotes tumor progression and serves as a prognostic marker for breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2025;26(1):2475604. doi: 10.1080/15384047.2025.2475604.
125. Zhang C, Yin H, Li T, Chen J, He W, Ren K, Li B, Liu X. Identification of multicohort-based predictive signature for NMIBC recurrence reveals SDCBP as a novel oncogene in bladder cancer. *Ann Med.* 2025;57(1):2458211. doi: 10.1080/07853890.2025.2458211.
126. Chriqui LE, Cavin S, Perentes JY. Dual implication of endothelial adhesion molecules in tumor progression and cancer immunity. *Cell Adh Migr.* 2025;19(1):2472308. doi: 10.1080/19336918.2025.2472308
127. Zheng C, Hei H, Zhai Y, Gong W, Zhang R, Zhang S. CAFs-released exosomal CREB1 promotes cell progression and immune evasion in thyroid cancer via the positive regulation of CCL20. *Autoimmunity.* 2025;58(1):2458324. doi: 10.1080/08916934.2025.2458324
128. Rösner H, Torremante P, Möller W, Gärtner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010;118(7):410-9. doi: 10.1055/s-0029-1225615
129. Haqq J, Howells LM, Garcea G, Dennison AR. Targeting pancreatic cancer using a combination of gemcitabine with the omega-3 polyunsaturated fatty acid emulsion, Lipidem™. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(6):1437-47. doi: 10.1002/mnfr.201500755
130. Gao L, Lang L, Zhao X, Shay C, Shull AY, Teng Y. FGF19 amplification reveals an oncogenic dependency upon autocrine FGF19/FGFR4 signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2019;38(13):2394-2404. doi: 10.1038/s41388-018-0591-7
131. Watanabe S, Suzuki T, Kondo Y, Naoe A, Uga N, Yasui T, Hara F, Tsuchiya T. Evaluation of Ki-67 as prognostic factor for pediatric neuroblastoma and the possibility of molecular-targeted drugs with VEGF and PDGFR. *Minerva Pediatr (Torino).* 2023;75(4):561-566. doi: 10.23736/S2724-5276.18.05444-0

132. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology* (Bethesda). 2010;25(2):85-101. doi: 10.1152/physiol.00045.2009
133. Vuong NH, Salah Salah O, Vanderhyden BC. 17 β -Estradiol sensitizes ovarian surface epithelium to transformation by suppressing Disabled-2 expression. *Sci Rep*. 2017;7(1):16702. doi: 10.1038/s41598-017-16219-2
134. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
135. Kojja V, Kumar D, Kalavagunta PK, Bhukya B, Tangutur AD, Nayak PK. 2-(Diarylalkyl)aminobenzothiazole derivatives induce autophagy and apoptotic death through SIRT inhibition and P53 activation In MCF7 breast cancer cells. *Comput Biol Chem*. 2025;116:108395. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2025.108395
136. Sun QX, Wang RR, Liu N, Liu C. Dysregulation of miR-204-3p Driven by the Viability and Motility of Retinoblastoma via Wnt/ β -catenin Pathway In Vitro and In Vivo. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(3):1549-1558. doi: 10.1007/s12253-019-00722-0
137. Marone G, Varricchi G, Loffredo S, Granata F. Mast cells and basophils in inflammatory and tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Eur J Pharmacol*. 2016;778:146-51. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.088.
138. Zonneville J, Safina A, Truskinovsky AM, Arteaga CL, Bakin AV. TGF- β signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association. *BMC Cancer*. 2018;18(1):670. doi: 10.1186/s12885-018-4587-z.
139. Shen L, Li S, Wang Y, Yin Y, Liu Y, Zhang Y, Zheng X. Alternating electric fields transform the intricate network of tumour vasculature into orderly parallel capillaries and enhance the anti-angiogenesis effect of bevacizumab. *Cell Prolif*. 2025;58(1):e13734. doi: 10.1111/cpr.13734
140. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, Thompson SK, Zollo M, Spano D, Dhawan P, Sliva D, Subbarayan PR, Sarkar M, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG, Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Ye L, Helferich WG, Yang X, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Azmi AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Nowsheen S, Pantano F, Santini D. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl:S244-S275. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.008
141. Guo F, Du Y, Wang Y, Wang M, Wang L, Yu N, Luo S, Wu F, Yang G. Targeted drug delivery systems for matrix metalloproteinase-responsive anoparticles in tumor cells: A review. *Int J Biol Macromol*. 2024;257(Pt 1):128658. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128658.
142. Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(7):1333-48. doi: 10.1007/s00018-015-2098-5
143. Singh J, Suh EH, Sharma G, Khemtong C, Sherry AD, Kovacs Z. Probing carbohydrate metabolism using hyperpolarized ¹³C-labeled molecules. *NMR Biomed*. 2019;32(10):e4018. doi: 10.1002/nbm.4018
144. Harris BH, Barberis A, West CM, Buffa FM. Gene Expression Signatures as Biomarkers of Tumour Hypoxia. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2015;27(10):547-60. doi: 10.1016/j.clon.2015.07.004
145. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers* (Basel). 2021;13(17):4287. doi: 10.3390/cancers13174287.

146. Yan W, Xiang S, Feng J, Zu X. Role of ubiquitin-specific proteases in programmed cell death of breast cancer cells. *Genes Dis.* 2024;12(3):101341. doi: 10.1016/j.gendis.2024.101341
147. Seymour L, Nuru N, Johnson KR, Gutierrez JMV, Njoku VT, Darie CC, Neagu AN. Roles of Post-Translational Modifications of Transcription Factors Involved in Breast Cancer Hypoxia. *Molecules.* 2025;30(3):645. doi: 10.3390/molecules3003064
148. Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biol.* 2017;11:240-253. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.011
149. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* 2001;15(1):50-65. doi: 10.1101/gad.828901
150. Prado A, Andrades P, Parada F. Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63(10):1581-7. doi: 10.1016/j.bjps.2009.06.034
151. Ryu JM, Nam SJ, Kim SW, Lee JE, Chae BJ, Lee SK, Yu J. Prognosis of BRCA1/2-negative breast cancer patients with HBOC risk factors compared with sporadic breast cancer patients without HBOC risk factors. *Jpn J Clin Oncol.* 2020;50(2):104-113. doi: 10.1093/jjco/hyz147.
152. Manna EDF, Serrano D, Aurilio G, Bonanni B, Lazzeroni M. Chemoprevention and Lifestyle Modifications for Risk Reduction in Sporadic and Hereditary Breast Cancer. *Healthcare (Basel).* 2023;11(16):2360. doi: 10.3390/healthcare11162360.
153. Kirova YM, Savignoni A, Sigal-Zafrani B, de La Rochefordiere A, Salmon RJ, This P, Asselain B, Stoppa-Lyonnet D, Fourquet A. Is the breast-conserving treatment with radiotherapy appropriate in BRCA1/2 mutation carriers? Long-term results and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(1):119-26. doi: 10.1007/s10549-009-0685-6.
154. Fazekas T, Széles ÁD, Teutsch B, Csizmarik A, Vékony B, Kóti T, Ács N, Hegyi P, Hadaschik B, Nyirády P, Szarvas T. Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitors Have Comparable Efficacy with Platinum Chemotherapy in Patients with BRCA-positive Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol.* 2024;7(3):365-375. doi: 10.1016/j.euo.2023.09.001
155. Yazdani Y, Jalali F, Tahmasbi H, Akbari M, Talebi N, Shahrtash SA, Mobed A, Alem M, Ghazi F, Dadashpour M. Recent advancements in nanomaterial-based biosensors for diagnosis of breast cancer: a comprehensive review. *Cancer Cell Int.* 2025;25(1):50. doi: 10.1186/s12935-025-03663-8.
156. Nakamura S, Kojima Y, Takeuchi S. Causative Genes of Homologous Recombination Deficiency (HRD)-Related Breast Cancer and Specific Strategies at Present. *Curr Oncol.* 2025;32(2):90. doi: 10.3390/curroncol32020090
157. Cassali GD, Nakagaki KYR, Salvi M, Dos Reis MP, Rocha MAN, de Campos CB, Ferreira E, Rodrigues ACB, Dos Reis DC, Damasceno KA, Estrela-Lima A. Canine, Feline, and Murine Mammary Tumors as a Model for Translational Research in Breast Cancer. *Vet Sci.* 2025;12(2):189. doi: 10.3390/vetsci12020189
158. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:228. doi: 10.1186/1471-2407-8-228.

159. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992;52(6):1399-405
160. Campos LC, Lavalle GE, Estrela-Lima A, Melgaço de Faria JC, Guimarães JE, Dutra ÂP, Ferreira E, de Sousa LP, Rabelo EM, Vieira da Costa AF, Cassali GD. CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors. *J Vet Intern Med.* 2012;26(6):1383-8. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.01014.x
161. Nascimento C, Ferreira F. Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021;1876(1):188587. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188587
162. Gil Del Alcazar CR, Alečković M, Polyak K. Immune Escape during Breast Tumor Progression. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(4):422-427. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0786
163. Dias AS, Almeida CR, Helguero LA, Duarte IF. Metabolic crosstalk in the breast cancer microenvironment. *Eur J Cancer.* 2019;121:154-171. doi: 10.1016/j.ejca.2019.09.002
164. Ravelli A, Roviello G, Cretella D, Cavazzoni A, Biondi A, Cappelletti MR, Zanotti L, Ferrero G, Ungari M, Zanconati F, Bottini A, Alfieri R, Petronini PG, Generali D. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumour Biol.* 2017;39(4):1010428317695023. doi: 10.1177/1010428317695023
165. Udappusamy V, Thinagaran R, Mayakrishnan V, Balakarthikeyan J, Kannappan P, Al-Ghamdi S, Alrudian NA, Saad Alqahtani M, Albasheer K, Sureka C, El-Bidawy MH, Alsanousi N, Gamil S, Ramesh T. An integrated *in vitro* and *in silico* approach to assess targeted cytotoxicity against MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells with *Psidium guajava* peel-derived chitosan nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2025;53(1):43-55. doi: 10.1080/21691401.2025.2462333
166. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004;117(7):927-39. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.006
167. Bu W, Li Y. Rat Models of Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2025;1464:123-148. doi: 10.1007/978-3-031-70875-6_8
168. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015;82(3-4):142-52. doi: 10.1159/000430499
169. Ali A, Younas K, Khatoon A, Murtaza B, Ji Z, Akbar K, Tanveer Q, Bahadur SUK, Su Z. Immune watchdogs: Tissue-resident lymphocytes as key players in cancer defense. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2025;208:104644. doi: 10.1016/j.critrevonc.2025.104644
170. Guan F, Wang R, Yi Z, Luo P, Liu W, Xie Y, Liu Z, Xia Z, Zhang H, Cheng Q. Tissue macrophages: origin, heterogeneity, biological functions, diseases and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):93. doi: 10.1038/s41392-025-02124-y
171. Qadir J, Wen SY, Yuan H, Yang BB. CircRNAs regulate the crosstalk between inflammation and tumorigenesis: The bilateral association and molecular mechanisms. *Mol Ther.* 2023;31(6):1514-1532. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.12.005
172. Ding S, Hao Y, Qi Y, Wei H, Zhang J, Li H. Molecular mechanism of tumor-infiltrating immune cells regulating endometrial carcinoma. *Genes Dis.* 2024;12(3):101442. doi: 10.1016/j.gendis.2024.101442

173. Jiang T, Jin H, Ji X, Zheng X, Xu CX, Zhang PJ. Drivers of centrosome abnormalities: Senescence progression and tumor immune escape. *Semin Cancer Biol.* 2025;110:56-64. doi: 10.1016/j.semcancer.2025.01.008
174. Wu J, Qian Y, Yang K, Zhang S, Zeng E, Luo D. Innate immune cells in vascular lesions: mechanism and significance of diversified immune regulation. *Ann Med.* 2025;57(1):2453826. doi: 10.1080/07853890.2025.2453826
175. Zheng X, Turkowski K, Mora J, Brüne B, Seeger W, Weigert A, Savai R. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017;8(29):48436-48452. doi: 10.18632/oncotarget.17061
176. Braster R, Bögels M, Beelen RH, van Egmond M. The delicate balance of macrophages in colorectal cancer; their role in tumour development and therapeutic potential. *Immunobiology.* 2017;222(1):21-30. doi: 10.1016/j.imbio.2015.08.011.
177. Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1865(1):23-34. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.009
178. Farajzadeh Valilou S, Keshavarz-Fathi M, Silvestris N, Argentiero A, Rezaei N. The role of inflammatory cytokines and tumor associated macrophages (TAMs) in microenvironment of pancreatic cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;39:46-61. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.01.007
179. Jafarzadeh S, Nemati M, Zandvakili R, Jafarzadeh A. Modulation of M1 and M2 macrophage polarization by metformin: Implications for inflammatory diseases and malignant tumors. *Int Immunopharmacol.* 2025;151:114345. doi: 10.1016/j.intimp.2025.114345
180. Khanzadeh S, Zarimeidani F, Kashani E, Babadi S, Rahmati R, Lucke-Wold B, Cerillo J, Ghaedi A. Neutrophil to lymphocyte ratio in urolithiasis: a systematic review. *BMC Urol.* 2025;25(1):51. doi: 10.1186/s12894-025-01720-y
181. Hou R, Wu X, Wang C, Fan H, Zhang Y, Wu H, Wang H, Ding J, Jiang H, Xu J. Tumor-associated neutrophils: Critical regulators in cancer progression and therapeutic resistance (Review). *Int J Oncol.* 2025;66(4):28. doi: 10.3892/ijo.2025.5734.
182. Zhang J, Gu J, Wang X, Ji C, Yu D, Wang M, Pan J, Santos HA, Zhang H, Zhang X. Engineering and Targeting Neutrophils for Cancer Therapy. *Adv Mater.* 2024;36(19):e2310318. doi: 10.1002/adma.202310318
183. Lu F, Verleg SMNE, Groven RVM, Poeze M, van Griensven M, Blokhuis TJ. Is there a role for N1-N2 neutrophil phenotypes in bone regeneration? A systematic review. *Bone.* 2024;181:117021. doi: 10.1016/j.bone.2024.117021
184. Bergerud KMB, Berkseth M, Pardoll DM, Ganguly S, Kleinberg LR, Lawrence J, Odde DJ, Largaespada DA, Terezakis SA, Sloan L. Radiation Therapy and Myeloid-Derived Suppressor Cells: Breaking Down Their Cancerous Partnership. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2024;119(1):42-55. doi: 10.1016/j.ijrobp.2023.11.050
185. Saad EE, Michel R, Borahay MA. Immunosuppressive tumor microenvironment and uterine fibroids: Role in collagen synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2024;75:93-100. doi: 10.1016/j.cytogfr.2023.10.002
186. Alqathama A. Natural products as promising modulators of breast cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2024;15:1410300. doi: 10.3389/fimmu.2024.1410300

187. Park SY, Pylaeva E, Bhuria V, Gambardella AR, Schiavoni G, Mougiakakos D, Kim SH, Jablonska J. Harnessing myeloid cells in cancer. *Mol Cancer*. 2025;24(1):69. doi: 10.1186/s12943-025-02249-2
188. He Y, Tian Z. NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(4):321-330. doi: 10.1038/cmi.2016.26
189. McQueen KL, Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(5):615-21. doi: 10.1016/s0952-7915(02)00380-1.
190. Béziat V, Hilton HG, Norman PJ, Traherne JA. Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology*. 2017;150(3):248-264. doi: 10.1111/imm.12684.
191. Tumor Cells Alter NK Cell Surface Topology for Immune Evasion. *Cancer Discov*. 2023;13(6):1283. doi: 10.1158/2159-8290.CD-RW2023-052.
192. Kim EY, Yoon YC, Hong TH. The role of natural killer cell activity as a milestone in oncologic outcome after curative resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2023;128(8):1353-1364. doi: 10.1002/jso.27432
193. Lu YC, Ho CH, Hong JH, Kuo MC, Liao YA, Jaw FS, Cheng JC, Huang CY, Chang KP, Chen CH, Lin JA, Hsiao A, Kung HN. NKG2A and circulating extracellular vesicles are key regulators of natural killer cell activity in prostate cancer after prostatectomy. *Mol Oncol*. 2023;17(8):1613-1627. doi: 10.1002/1878-0261.13422.
194. Wangkahart E, Secombes CJ, Wang T. Dissecting the immune pathways stimulated following injection vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against enteric redmouth disease (ERM). *Fish Shellfish Immunol*. 2019;85:18-30. doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.056
195. Hwang E, Lee T, Okifo K, Murphy M, Damsky W. Retrospective assessment of immunologic and histologic heterogeneity in granuloma annulare by cytokine staining. *Int J Dermatol*. 2024;63(5):655-659. doi: 10.1111/ijd.16998
196. Dehghani M, Ramzi M, Kalani M, Golmoghaddam H, Arandi N. Higher Peripheral Blood IFN- γ /IL-4+ Th2 Lymphocytes Are Associated with Lower Rate of Relapse in Patients with Lymphoma. *Immunol Invest*. 2022;51(2):452-463. doi: 10.1080/08820139.2020.1840583
197. Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J Leukoc Biol*. 2019;105(2):243-255. doi: 10.1002/JLB.MR0318-097R.
198. Najafi S, Mirshafiey A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2019;41(1):16-24. doi: 10.1080/08923973.2019.1566925
199. Abdelkader MM, Saied EM, ElShourbagy SH, El-Anwer NM. Prognostic Significance Of FOXP3+ Tumour-Infiltrating Tregs In Egyptian Breast Cancer Patients. *J Pak Med Assoc*. 2023;73(Suppl 4)(4):S146-S150. doi: 10.47391/JPMA.EGY-S4-30
200. Sara A, Ruff SM, Noonan AM, Pawlik TM. Real-World Use of Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma. *Pragmat Obs Res*. 2023;14:63-74. doi: 10.2147/POR.S397972
201. Reinherz EL, Hwang W, Lang MJ. Harnessing $\alpha\beta$ T cell receptor mechanobiology to achieve the promise of immuno-oncology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(27):e2215694120. doi: 10.1073/pnas.2215694120
202. Keckler MS. Dodging the CTL response: viral evasion of Fas and granzyme induced apoptosis. *Front Biosci*. 2007;12:725-32. doi: 10.2741/2096.

203. Lin Y, Song Y, Zhang Y, Li X, Kan L, Han S. New insights on anti-tumor immunity of CD8⁺ T cells: cancer stem cells, tumor immune microenvironment and immunotherapy. *J Transl Med.* 2025;23(1):341. doi: 10.1186/s12967-025-06291-y.
204. Jelača S, Jovanovic I, Bovan D, Pavlovic S, Gajovic N, Dunderović D, Dajić-Stevanović Z, Acović A, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D. Antimelanoma Effects of *Alchemilla vulgaris*: A Comprehensive In Vitro and In Vivo Study. *Diseases.* 2024;12(6):125. doi: 10.3390/diseases12060125.
205. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(14):18106-15. doi: 10.18632/oncotarget.7635.
206. Loyau J, Monney T, Montefiori M, Bokhovchuk F, Streuli J, Blackburn M, Goepfert A, Caro LN, Chakraborti S, De Angelis S, Grandclément C, Blein S, Mbow ML, Srivastava A, Perro M, Sammiceli S, Zhukovsky EA, Dyson M, Dreyfus C. Biparatopic binding of ISB 1442 to CD38 in trans enables increased cell antibody density and increased avidity. *MAbs.* 2025;17(1):2457471. doi: 10.1080/19420862.2025.2457471.
207. Yee PP, Wang J, Chih SY, Aregawi DG, Glantz MJ, Zacharia BE, Thamburaj K, Li W. Temporal radiographic and histological study of necrosis development in a mouse glioblastoma model. *Front Oncol.* 2022;12:993649. doi: 10.3389/fonc.2022.993649.
208. Skuletic V, Radosavljevic GD, Pantic J, Markovic BS, Jovanovic I, Jankovic N, Petrovic D, Jevtovic A, Dzodic R, Arsenijevic N. Angiogenic and lymphangiogenic profiles in histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Pol Arch Intern Med.* 2017;127(6):429-437. doi: 10.20452/pamw.3999.
209. Pavlovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Mitrovic S, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Jovanovic I. Diverse Expression of IL-32 in Diffuse and Intestinal Types of Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2018;2018:6578273. doi: 10.1155/2018/6578273.
210. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8. doi: 10.1056/NEJM199101033240101.
211. Gu Y, Zhang J, Mi W, Yang J, Han F, Lu X, Yu W. Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2008;10(1):R1. doi: 10.1186/bcr1841.
212. Pan W, Huang X, Guo Z, Nagarajan R, Mylonakis E. Identification and Functional Analysis of Cytokine-Like Protein CLEC-47 in *Caenorhabditis elegans*. *mBio.* 2021;12(5):e0257921. doi: 10.1128/mBio.02579-21.
213. Haliloglu Y, Ozcan A, Erdem S, Azizoglu ZB, Bicer A, Ozarslan OY, Kilic O, Okus FZ, Demir F, Canatan H, Karakukcu M, Uludag SZ, Kutuk MS, Unal E, Eken A. Characterization of cord blood CD3⁺ TCRV α 7.2⁺ CD161^{high} T and innate lymphoid cells in the pregnancies with gestational diabetes, morbidly adherent placenta, and pregnancy hypertension diseases. *Am J Reprod Immunol.* 2022;88(1):e13555. doi: 10.1111/aji.13555.
214. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):1902-12. doi: 10.1002/eji.201141417.

215. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1669-82. doi: 10.1002/ijc.28481.
216. Chang YF, Zhang D, Hu WM, Liu DX, Li L. Semaglutide-mediated protection against A β correlated with enhancement of autophagy and inhibition of apoptosis. *J Clin Neurosci*. 2020;81:234-239. doi: 10.1016/j.jocn.2020.09.054.
217. Stanisavljevic I, Zivkovic M, Obradovic M, Jurisevic M, Pavlovic S, Simovic Markovic B, Gajovic N, Corovic I, Jovic M, Kostic A, Jovanovic I. Immunomodulatory effects of mononuclear 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-phenanthroline platinum (II) complex. *Kragujevac J Sci* 2024; doi: 10.5937/KgJSci2400003S
218. Jovanovic M, Simovic Markovic B, Gajovic N, Jurisevic M, Djukic A, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic A, Zdravkovic N. Metabolic syndrome attenuates ulcerative colitis: Correlation with interleukin-10 and galectin-3 expression. *World J Gastroenterol*. 2019;25(43):6465-6482. doi: 10.3748/wjg.v25.i43.6465.
219. Jovanovic MZ, Geller DA, Gajovic NM, Jurisevic MM, Arsenijevic NN, Jovanovic MM, Supic GM, Vojvodic DV, Jovanovic IP. Dual blockage of PD-L/PD-1 and IL33/ST2 axes slows tumor growth and improves antitumor immunity by boosting NK cells. *Life Sci*. 2022;289:120214. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120214.
220. Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Jeremic J, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic M, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1315378. doi:10.1155/2017/1315378
221. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46(4):765-81. doi: 10.1016/j.ejca.2009.12.014.
222. Smits MM, Van Raalte DH. Safety of Semaglutide. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:645563. doi: 10.3389/fendo.2021.645563.
223. Ji L, He X, Min X, Yang H, Wu W, Xu H, Chen J, Mei A. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in neoplastic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1465881. doi: 10.3389/fendo.2024.1465881.
224. Feier CVI, Vonica RC, Faur AM, Streinu DR, Muntean C. Assessment of Thyroid Carcinogenic Risk and Safety Profile of GLP1-RA Semaglutide (Ozempic) Therapy for Diabetes Mellitus and Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Mol Sci*. 2024;25(8):4346. doi: 10.3390/ijms25084346.
225. Kanda R, Hiraike H, Wada-Hiraike O, Ichinose T, Nagasaka K, Sasajima Y, Ryo E, Fujii T, Osuga Y, Ayabe T. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor and its role in regulating autophagy in endometrial cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):657. doi: 10.1186/s12885-018-4570-8.
226. Zhang Y, Xu F, Liang H, Cai M, Wen X, Li X, Weng J. Exenatide inhibits the growth of endometrial cancer Ishikawa xenografts in nude mice. *Oncol Rep*. 2016;35(3):1340-8. doi: 10.3892/or.2015.4476.
227. Koehler JA, Kain T, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation inhibits growth and augments apoptosis in murine CT26 colon cancer cells. *Endocrinology*. 2011;152(9):3362-72. doi: 10.1210/en.2011-1201.
228. Hansen HH, Pors S, Andersen MW, Vyberg M, Nøhr-Meldgaard J, Nielsen MH, Oró D, Madsen MR, Lewinska M, Møllerhøj MB, Madsen AN, Feigh M. Semaglutide reduces tumor burden in the GAN diet-induced obese and biopsy-

- confirmed mouse model of NASH-HCC with advanced fibrosis. *Sci Rep*. 2023;13(1):23056. doi:10.1038/s41598-023-50328-5
229. Liu Y, Chen S, Zhen R. Effect of Semaglutide on High-Fat-Diet-Induced Liver Cancer in Obese mic.J *Proteome Res*. 2024;23(2):704-717. doi:10.1021/acs.jproteome.3c00491
 230. Zylla JLS, Hoffman MM, Plesselova S, Bhattacharya S, Calar K, Afeworki Y, de la Puente P, Gnimpieba EZ, Miskimins WK, Messerli SM. Reduction of Metastasis via Epigenetic Modulation in a Murine Model of Metastatic Triple Negative Breast Cancer (TNBC). *Cancers (Basel)*. 2022;14(7):1753. doi: 10.3390/cancers14071753.
 231. Glenny EM, Ho AN, Kiesel VA, Chen F, Gates CE, Paules EM, Xu R, Holt CA, Coleman MF, Hursting SD. Tirzepatide attenuates mammary tumor progression in diet-induced obese mice. *bioRxiv [Preprint]*. 2024:2024.01.20.576484. doi: 10.1101/2024.01.20.576484.
 232. Yee PP, Wang J, Chih SY, Aregawi DG, Glantz MJ, Zacharia BE, Thamburaj K, Li W. Temporal radiographic and histological study of necrosis development in a mouse glioblastoma model. *Front Oncol*. 2022;12:993649. doi: 10.3389/fonc.2022.993649.
 233. Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol*. 2002;9(9):509-14. doi: 10.1046/j.1442-2042.2002.00511.x.
 234. Boshchenko AA, Maslov LN, Mukhomedzyanov AV, Zhuravleva OA, Slidnevskaya AS, Naryzhnaya NV, Zinovieva AS, Ilinykh PA. Peptides Are Cardioprotective Drugs of the Future: The Receptor and Signaling Mechanisms of the Cardioprotective Effect of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists. *Int J Mol Sci*. 2024;25(9):4900. doi: 10.3390/ijms25094900
 235. Mikhail N. Effects of incretin-based therapy in patients with heart failure and myocardial infarction. *Endocrine*. 2014;47(1):21-8. doi: 10.1007/s12020-014-0175-4.
 236. Pezzella F, Ribatti D. Vascular co-option and vasculogenic mimicry mediate resistance to antiangiogenic strategies. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2022;5(12):e1318. doi: 10.1002/cnr2.1318.
 237. Feng W, Zhou L, He J, Wang Y, Cai J, Jiang T, Zhao Q, Ren T. Association of VEGFR2 polymorphisms with clinical outcomes of anti-angiogenesis therapy in cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Pharmacol*. 2025;990:177299. doi: 10.1016/j.ejphar.2025.177299.
 238. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999;79(5-6):991-5. doi: 10.1038/sj.bjc.6690158
 239. Giri VK, Zaemes J. The selection of targeted therapies for relapsed or refractory advanced renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2025. doi: 10.1080/14737140.2025.2468765.
 240. Polak ME. Isolation of inflammatory cells from human tumours. *Methods Mol Biol*. 2011;731:201-8. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_17.
 241. Berrou J, Fougerey S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A, Peraldi MN. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(4):e62418. doi: 10.1371/journal.pone.0062418.
 242. Yamasaki T, Moritake K, Klein G. Experimental appraisal of the lack of antitumor natural killer cell-mediated immunosurveillance in response to lymphomas

- growing in the mouse brain. *J Neurosurg.* 2003;98(3):599-606. doi: 10.3171/jns.2003.98.3.0599.
243. Wei HC. Mathematical modeling of tumor growth: the MCF-7 breast cancer cell line. *Math Biosci Eng.* 2019;16(6):6512-6535. doi: 10.3934/mbe.2019325.
 244. Van den Broek MF, Hengartner H. The role of perforin in infections and tumour surveillance. *Exp Physiol.* 2000;85(6):681-5. doi: 10.1017/S0958067000020972.
 245. Zhang Z, Luo L, Xing C, Chen Y, Xu P, Li M, Zeng L, Li C, Ghosh S, Della Manna D, Townes T, Britt WJ, Wajapeyee N, Sleckman BP, Chong Z, Leavenworth JW, Yang ES. RNF2 ablation reprograms the tumor-immune microenvironment and stimulates durable NK and CD4+ T-cell-dependent antitumor immunity. *Nat Cancer.* 2021;2(10):1018-1038. doi: 10.1038/s43018-021-00263-z.
 246. Vujanovic NL, Basse P, Herberman RB, Whiteside TL. Antitumor Functions of Natural Killer Cells and Control of Metastases. *Methods.* 1996;9(2):394-408. doi: 10.1006/meth.1996.0044.
 247. Gajovic N, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(4):493-507. doi: 10.1530/ERC-17-0529.
 248. De Barra C, Khalil M, Mat A, O'Donnell C, Shaamile F, Brennan K, O'Shea D, Hogan AE. Glucagon-like peptide-1 therapy in people with obesity restores natural killer cell metabolism and effector function. *Obesity (Silver Spring).* 2023;31(7):1787-1797. doi: 10.1002/oby.23772.
 249. Lu X, Xu C, Dong J, Zuo S, Zhang H, Jiang C, Wu J, Wei J. Liraglutide activates nature killer cell-mediated antitumor responses by inhibiting IL-6/STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Transl Oncol.* 2021;14(1):100872. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100872.
 250. Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun.* 2011;3(3):258-63. doi: 10.1159/000323923.
 251. Lamana A, Martin P, de la Fuente H, Martinez-Muñoz L, Cruz-Adalia A, Ramirez-Huesca M, Escribano C, Gollmer K, Mellado M, Stein JV, Rodriguez-Fernandez JL, Sanchez-Madrid F, del Hoyo GM. CD69 modulates sphingosine-1-phosphate-induced migration of skin dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2011;121(7):1503-12. doi: 10.1038/jid.2011.54.
 252. Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology.* 2009;128(1):1-6. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03147.x.
 253. Bernard NF, Kiani Z, Tremblay-McLean A, Kant SA, Leeks CE, Dupuy FP. Natural Killer (NK) Cell Education Differentially Influences HIV Antibody-Dependent NK Cell Activation and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Front Immunol.* 2017;8:1033. doi: 10.3389/fimmu.2017.01033.
 254. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, Janßen O, Cerwenka A, Bryceson YT, Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood.* 2013;122(8):1411-8. doi: 10.1182/blood-2012-07-441832.
 255. Lee TA, Tsai EY, Liu SH, Chou WC, Hsu Hung SD, Chang CY, Chao CH, Yamaguchi H, Lai YJ, Chen HL, Li CW. Regulation of PD-L1 glycosylation and advances in cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* 2025;612:217498. doi: 10.1016/j.canlet.2025.217498.

256. Zhao S, Wu D, Wu P, Wang Z, Huang J. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139598. doi: 10.1371/journal.pone.0139598.
257. Vatner RE, Janssen EM. STING, DCs and the link between innate and adaptive tumor immunity. *Mol Immunol*. 2019;110:13-23. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.001.
258. Corridoni D, Simmons A. Innate immune receptors for cross-presentation: The expanding role of NLRs. *Mol Immunol*. 2019;113:6-10. doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.028.
259. Zwick M, Ulas T, Cho YL, Ried C, Grosse L, Simon C, Bernhard C, Busch DH, Schultze JL, Buchholz VR, Stutte S, Brocker T. Expression of the Phosphatase Ppaf2 Controls Survival and Function of CD8+ Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2019;10:222. doi: 10.3389/fimmu.2019.00222.
260. Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, Delcayre A, Le Pecq JB, Combadière B, Amigorena S, Théry C. Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res*. 2008;68(4):1228-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3163.
261. Ghajar-Rahimi G, Yusuf N, Xu H. Ultraviolet Radiation-Induced Tolerogenic Dendritic Cells in Skin: Insights and Mechanisms. *Cells*. 2025;14(4):308. doi: 10.3390/cells14040308.
262. Chiou HC, Lin MW, Hsiao PJ, Chen CL, Chiao S, Lin TY, Chen YC, Wu DC, Lin MH. Dulaglutide Modulates the Development of Tissue-Infiltrating Th1/Th17 Cells and the Pathogenicity of Encephalitogenic Th1 Cells in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1584. doi: 10.3390/ijms20071584.
263. Su XZ, Xu F, Stadler RV, Teklemichael AA, Wu J. Malaria: Factors affecting disease severity, immune evasion mechanisms, and reversal of immune inhibition to enhance vaccine efficacy. *PLoS Pathog*. 2025;21(1):e1012853. doi: 10.1371/journal.ppat.1012853.
264. Zwart W, Peperzak V, de Vries E, Keller AM, van der Horst G, Veraar EA, Geumann U, Janssen H, Janssen L, Naik SH, Neefjes J, Borst J. The invariant chain transports TNF family member CD70 to MHC class II compartments in dendritic cells. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 21):3817-27. doi: 10.1242/jcs.068510.
265. Jhanwar-Uniyal M, Wainwright JV, Mohan AL, Tobias ME, Murali R, Gandhi CD, Schmidt MH. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul*. 2019;72:51-62. doi: 10.1016/j.jbior.2019.03.003.
266. Rasi Bonab F, Baghbanzadeh A, Ghaseminia M, Bolandi N, Mokhtarzadeh A, Amini M, Dadashzadeh K, Hajiasgharzadeh K, Baradaran B, Bannazadeh Baghi H. Molecular pathways in the development of HPV-induced cervical cancer. *EXCLI J*. 2021;20:320-337. doi: 10.17179/excli2021-3365.
267. Sanchez VE, Nichols C, Kim HN, Gang EJ, Kim YM. Targeting PI3K Signaling in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):412. doi: 10.3390/ijms20020412.
268. Sadek MA, Kandil EA, El Sayed NS, Sayed HM, Rabie MA. Semaglutide, a novel glucagon-like peptide-1 agonist, amends experimental autoimmune encephalomyelitis-induced multiple sclerosis in mice: Involvement of the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Int Immunopharmacol*. 2023;115:109647. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109647.
269. Tiba AT, Qassam H, Hadi NR. Semaglutide in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Med Life*. 2023;16(2):317-324. doi: 10.25122/jml-2022-0291.

270. Yamasaki T, Moritake K, Klein G. Experimental appraisal of the lack of antitumor natural killer cell-mediated immunosurveillance in response to lymphomas growing in the mouse brain. *J Neurosurg.* 2003;98(3):599-606. doi: 10.3171/jns.2003.98.3.0599.
271. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6. doi: 10.1038/ni904
272. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6(4):345-52.
273. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007;12:217-23.
274. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133:775–787.
275. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2006;212:8–27.
276. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood.* 2007;110(13):4293-302. doi: 10.1182/blood-2007-05-088831.
277. Hadjiyanni I, Baggio LL, Poussier P, Drucker DJ. Exendin-4 modulates diabetes onset in nonobese diabetic mice. *Endocrinology.* 2008;149(3):1338-49. doi: 10.1210/en.2007-1137.
278. Sherry NA, Chen W, Kushner JA, Glandt M, Tang Q, Tsai S, Santamaria P, Bluestone JA, Brillantes AM, Herold KC. Exendin-4 improves reversal of diabetes in NOD mice treated with anti-CD3 monoclonal antibody by enhancing recovery of beta-cells. *Endocrinology.* 2007;148(11):5136-44. doi: 10.1210/en.2007-0358.
279. Pang J, Feng JN, Ling W, Jin T. The anti-inflammatory feature of glucagon-like peptide-1 and its based diabetes drugs-Therapeutic potential exploration in lung injury. *Acta Pharm Sin B.* 2022;12(11):4040-4055. doi: 10.1016/j.apsb.2022.06.003.
280. Yamazaki S, Morita A. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific natural and induced regulatory T cells. *Front Immunol.* 2013;4:151. doi: 10.3389/fimmu.2013.00151.
281. Yamazaki S, Maruyama A, Okada K, Matsumoto M, Morita A, Seya T. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3(+) regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS One.* 2012;7(12):e51665. doi: 10.1371/journal.pone.0051665.
282. Zhou F, Ciric B, Zhang GX, Rostami A. Immune tolerance induced by intravenous transfer of immature dendritic cells via up-regulating numbers of suppressive IL-10(+) IFN-γ(+)-producing CD4(+) T cells. *Immunol Res.* 2013;56(1):1-8. doi: 10.1007/s12026-012-8382-7.
283. Anani W, Shurin MR. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1036:105-128.
284. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich D.I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 2016;37:208–220.
285. Parker K.H, Beury D.W, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv. Cancer Res.* 2015;128:95–139. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.002.

286. Meirou Y, Kanterman J, Baniyash M. Paving the Road to Tumor Development and Spreading: Myeloid-Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. *Front. Immunol.* 2015 doi: 10.3389/fimmu.2015.00523.
287. Zhang Y, Xu B, Luan B, Zhang Y, Wang X, Xiong X, Shi H. Tumor-derived MDSCs inhibit airway remodeling in asthmatic mice through regulating IL-10 and IL-12. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):4192-4201.
288. Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. *J Immunother.* 2002;25(4):289-303. doi: 10.1097/00002371-200207000-00001.
289. van Dorp J, van der Heijden MS. The bladder cancer immune micro-environment in the context of response to immune checkpoint inhibition. *Front Immunol.* 2023;14:1235884. doi:10.3389/fimmu.2023.1235884
290. Yerinde C, Siegmund B, Glauben R, Weidinger C. Metabolic control of epigenetics and its role in CD8(+) T cell differentiation and function. *Front Immunol.* 2019;10:2718. doi:10.3389/fimmu.2019.02718.
291. Bevilacqua A, Li Z, Ho PC. Metabolic dynamics instruct CD8(+) T-cell differentiation and functions. *Eur J Immunol.* 2022;52(4):541–549. doi:10.1002/eji.202149486
292. Piening A, Ebert E, Gottlieb C, Hojandi N, Kuehm LM, Hoft SG, Pyles KD, McCommis KS, DiPaolo RJ, Ferris ST, Alspach E, Teague RM. Obesity-related T cell dysfunction impairs immunosurveillance and increases cancer risk. *Nat Commun.* 2024;15(1):2835. doi: 10.1038/s41467-024-47359-5.
293. Huang J, Yi H, Zhao C, Zhang Y, Zhu L, Liu B, He P, Zhou M. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) signaling ameliorates dysfunctional immunity in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:3191-3202. doi: 10.2147/COPD.S175145.
294. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(2):107-19. doi: 10.1038/nri2251.
295. Badovinac VP, Harty JT. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev.* 2006;211:67-80. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00384.x.
296. Herkenham M, Kigar SL. Contributions of the adaptive immune system to mood regulation: Mechanisms and pathways of neuroimmune interactions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;79(PtA):49-57. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.09.003.
297. Jørgensen TN, Haase C, Michelsen BK. (2002) Treatment of an immortalized APC cell line with both cytokines and LPS ensures effective T-cell activation in vitro. *Scand J Immunol.* 2002. 492-503. doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01166.x.
298. Chen Y, Xu Y, Li H, Sun T, Cao X, Wang Y, Xue F, Liu W, Liu X, Dong H, Fu R, Dai X, Wang W, Ma Y, Song Z, Chi Y, Ju M, Gu W, Pei X, Yang R, Zhang L. A Novel Anti-CD38 Monoclonal Antibody for Treating Immune Thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 2024;390(23):2178-2190. doi: 10.1056/NEJMoa2400409.
299. Bick F, Blanchetot C, Lambrecht BN, Schuijs MJ. Targeting γ c family cytokines with biologics: current status and future prospects. *MAbs.* 2025;17(1):2468312. doi: 10.1080/19420862.2025.2468312.
300. Wixler V, Zaytsev IZ, Boergeling Y, Ludwig S. The anti-inflammatory and tolerogenic potential of small spleen peptides. *Front Immunol.* 2024;15:1449657. doi: 10.3389/fimmu.2024.1449657.
301. Bendotti G, Montefusco L, Lunati ME, Uselli V, Pastore I, Lazzaroni E, Assi E, Seelam AJ, El Essawy B, Jang J, Loretelli C, D'Addio F, Berra C, Ben Nasr M,

- Zuccotti G, Fiorina P. The anti-inflammatory and immunological properties of GLP-1 Receptor Agonists. *Pharmacol Res.* 2022;182:106320. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106320.
302. Li Y, Gu Y, Yang P, Wang Y, Yu X, Li Y, Jin Z, Xu L. CD69 is a Promising Immunotherapy and Prognosis Prediction Target in Cancer. *Immunotargets Ther.* 2024;13:1-14. doi: 10.2147/ITT.S439969.
303. Martín P, Sánchez-Madrid F. T cells in cardiac health and disease. *J Clin Invest.* 2025;135(2):e185218. doi: 10.1172/JCI185218

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Исидора Станисављевић, рођена је 02.11.1997. у Смедеревској Паланци. Основну школу „Станоје Главаш” у Глибовцу завршила је као ђак генерације, а Паланачку гимназију као носилац дипломе „Вук Караџић”. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уписала је 2016. године, а дипломирала 2022. са просечном оценом 9,24 (9 и 24/100). Исте године, уписује докторске академске студије, изборно подручје Онкологија. Од 04.11.2022. ангажована је као фацитатор за ужу научну област Микробиологија и имунологија, где учествује у практичној настави и истраживачком раду у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија. 10.07.2023. започиње специјалистичке студије из Медицинске микробиологије. 20.09.2023. Изабрана је у звање сарадник у настави за ужу научну област Микробиологија и имунологија, где учествује у извођењу практичне наставе са домаћим и иностраним студентима на енглеском језику. Усмени докторандски испит положила је 27.09.2024. са оценом 10. Члан је Лекарске коморе Србије и Друштва имунолога Србије. Учесница је бројних међународних и националних научних скупова, аутор и коаутор више радова. Говори енглески и немачки језик.

1. **Stanisavljevic I**, Zivkovic M, Rajkovic S, Obradovic M, Jurisevic M, Pavlovic S, Simovic Markovic B, Gajovic N, Corovic I, Jovic M, Kostic A, Jovanovic I. Immunomodulatory effects of mononuclear 5,6-epoxy5,6-dihydro-1,10-phenanthroline platinum(II) complex. **Kragujevac J. Sci.** 2024. doi: 10.5937/KgJSci2400003S
2. **Stanisavljevic I**, Pavlovic S, Simovic Markovic B, Jurisevic M, Krajnovic T, Mijatovic S, Spasojevic M, Mitrovic S, Corovic I, Jovanovic I. Semaglutide decelerates the growth and progression of breast cancer by enhancing the acquired antitumor immunity. **Biomed Pharmacother.**2024. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117668.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Утицај семаглутида на прогресију мишићег карцинома дојке“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 08.04.2025 године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Утицај семаглутида на прогресију мишићг карцинома дојке“

истоветне.

У Крагујевцу, 08.04.2025 године,

И. Станисављевић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Исидора Станисављевић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Утицај семаглутида на прогресију мишјег карцинома дојке“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 08.04.2025 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

УТИЦАЈ СЕМАГЛУТИДА НА ПРОГРЕСИЈУ МИШЈЕГ КАРЦИНОМА ДОЈКЕ

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	Isidora Stanisavljevic, Sladjana Pavlovic, Bojana Simovic Markovic, Milena Jurisevic et al. "Semaglutide decelerates the growth and progression of breast cancer by enhancing the acquired antitumor immunity", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024 Crossref	1946 words — 5%
2	fedorakg.kg.ac.rs Internet	1272 words — 3%
3	www.frontiersin.org Internet	282 words — 1%

EXCLUDE QUOTES OFF
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY OFF

EXCLUDE SOURCES < 1%
EXCLUDE MATCHES < 9 WORDS