



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

др Милан Зарић

**ЕФЕКАТ БИОАКТИВНИХ СУПСТАНЦИ НА ВИЈАБИЛНОСТ  
ЛИМФОЦИТА ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015. године

*родитељима, брату и супрузи*

*За велику помоћ у изради докторске дисертације  
и указано поверење, неизмерну захвалност дугујем  
свом ментору, проф. др Иванки Зелен,  
проф. др Марини Митровић,  
проф. др Дејану Баскићу,  
проф. др Предрагу Ђурђевићу,  
проф. др Зорану Милосављевићу,  
доц. др Сузани Поповић,  
др Данијели Јовановић и  
колегама са Катедре за биохемију Факултета  
медицинских наука у Крагујевцу.*

# Садржај

<b>1. Увод</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Хронична лимфоцитна леукемија</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Епидемиологија.....	1
1.1.2. Етиологија и патогенеза.....	2
1.1.3. Клиничка слика.....	3
1.1.4. Дијагноза и класификација.....	4
1.1.5. Терапија.....	7
<b>1.2. Програмирана ћелијска смрт</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Типови програмиране ћелијске смрти.....	10
1.2.2. Апоптоза.....	11
1.2.3. Механизам апоптозе.....	12
1.2.3.1. Спољашњи пут апоптозе.....	12
1.2.3.2. Унутрашњи пут апоптозе.....	13
1.2.3.3. Каспазе.....	15
<b>1.3. Биоактивне супстанце</b> .....	<b>16</b>
1.3.1. Прополис.....	17
1.3.2. Хризин.....	18
1.3.3. <i>Ligustrum vulgare</i> .....	20
1.3.4. <i>Teucrium pollium</i> .....	21
1.3.5. <i>Phellinus linteus</i> .....	22
1.3.6. <i>Cordyceps sinensis</i> .....	24
<b>2. Циљеви истраживања</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Материјал и методе</b> .....	<b>27</b>
3.1. Врста студије.....	27
3.2. Ћелијске линије.....	27
3.3. Популација која се испитује.....	27
3.4. Узорковање.....	28

3.5. Изолација лимфоцита и мононуклеарних леукоцита .....	29
3.6. Варијабле истраживања .....	29
3.7. <i>MTT</i> тест.....	31
3.8. Тест за одређивање активности лактат-дехидрогеназе ( <i>LDH</i> тест).....	32
3.9. <i>ANNEXIN V- FITC</i> тест апоптотичности .....	33
3.10. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за <i>Bax, Bcl-2,</i> цитохром <i>c</i> и активну каспазу-3.....	34
3.11. Флуоресцентна микроскопија.....	35
3.12. Евалуација проточном цитометријом .....	35
3.13. Снага студије и величина узорка.....	36
3.14. Статистичка обрада података .....	36
<b>4. Резултати.....</b>	<b>37</b>
4.1. Биоактивне супстанце мењају вијабилност леукемијских лимфоцита.....	37
4.1.1. Утицај прополиса 1 на вијабилност леукемијских лимфоцита .....	37
4.1.2. Утицај прополиса 2 на вијабилност леукемијских лимфоцита .....	41
4.1.3. Утицај хризина на вијабилност леукемијских лимфоцита .....	45
4.1.4. Утицај метанолског екстракта листа биљке <i>Ligustrum vulgare</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	48
4.1.5. Утицај метанолског екстракта плода биљке <i>Ligustrum vulgare</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	52
4.1.6. Утицај метанолског екстракта биљке <i>Teucrium pollium</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита .....	56
4.1.7. Утицај метанолског екстракта гљиве <i>Phellinus linteus</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита .....	60
4.1.8. Утицај метанолског екстракта гљиве <i>Cordyceps sinensis</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита .....	65
4.2. Биоактивне супстанце индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.....	69
4.2.1. Хризин индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.....	70
4.2.2. Метанолски екстракт листа биљке <i>Ligustrum vulgare</i> индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије .....	71

4.2.3. Метанолски екстракт плода биљке <i>Ligustrum vulgare</i> индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије .....	73
4.2.4. Метанолски екстракт биљке <i>Teucrium pollium</i> индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије .....	75
<b>4.3. Испитивање механизма индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије дејством хризина и метанолског екстракта биљке <i>Teucrium pollium</i>.....</b>	<b>77</b>
4.3.1. Хризин повећава однос <i>Bax/Bcl-2</i> и индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије каспаза зависним, митохондријалним сигналним путем .....	78
4.3.2. Метанолски екстракт биљке <i>Teucrium pollium</i> повећава однос <i>Bax/Bcl-2</i> и индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије каспаза зависним, митохондријалним сигналним путем.....	82
<b>5. Дискусија.....</b>	<b>87</b>
<b>6. Закључак .....</b>	<b>104</b>
<b>7. Литература.....</b>	<b>105</b>

# 1. Увод

## 1.1. Хронична лимфоцитна леукемија

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је малигно, прогресивно, клинички хетерогено обољење хематопоезног ткива које настаје пролиферацијом и акумулацијом клона дугоживећих лимфоцита у лимфним чворовима, костној сржи, слезини и другим органима (1). Овај тип леукемије представља болест Б лимфоцита у важећој класификацији хематолошких малигнитета светске здравствене организације, а болест која је раније била позната као Т-ХЛЛ, се данас класификује као Т пролимфоцитна леукемија (2). ХЛЛ настаје услед онкогене трансформације и клоналне експанзије субпопулације Б лимфоцита који експримирају антигене за *CD5*, *CD19* и *CD23*<sup>1</sup>, а имају смањену експресију површинских имуноглобулина *IgM*, *IgD* и *CD79b* (1, 3, 4) Такви лимфоцити се могу разликовати по стању активације, степену диференцијације или ћелијској подгрупи (4).

### 1.1.1. Епидемиологија

Сваке године у Сједињеним Америчким Државама се дијагностикује 15 000 нових случајева ХЛЛ, а око 5 000 оболелих од ХЛЛ премине (5). Просечан број новооткривених пацијената са дијагнозом ХЛЛ-а је 4,2 на 100 000 особа годишње. Чешће се јавља код старијих особа, тако да је просечан број новооткривених оболелих од ХЛЛ-а преко 30 на 100 000 особа годишње у популацији особа старијих од 80 година. Медијана старости при дијагностиковању ХЛЛ-а је 72 године, али је око 10% пацијената млађе од 55 година (6). ХЛЛ је најчешћи тип леукемије код одраслих особа и чини око 27% свих леукемија (5).

---

<sup>1</sup> Скраћенице у раду су унесене према међународној конвенцији и обележене су италиком у изворном облику, јер би њихово превођење могло да проузрокује одређене неразумљивости и термилошке несугласице.

### 1.1.2. Етиологија и патогенеза

Тачан разлог појаве хроничне лимфоцитне леукемије ни данас није познат. ХЛЛ је стечени поремећај и фамилијарна појава болести је изузетно ретка (7).

Резултати истраживања су показали да не постоји повезаност између појаве ХЛЛ-а и деловања етиолошких агенаса попут јонизујућег зрачења, хемијских агенаса и вирусних инфекција (8-10).

Леукемијске ћелије које се прогресивно акумулирају у крви не изазивају моментално симптоме болести, али не подлежу процесу програмиране ћелијске смрти (11-13). Стога се дуго сматрало да ХЛЛ настаје због дефектног процеса програмиране ћелијске смрти у леукемијским лимфоцитима, а не услед поремећаја у пролиферацији лимфоцита (3). Међутим, пронађене су пролиферативне нише у костној сржи и лимфним чворовима која сугеришу да је ХЛЛ заправо болест која настаје услед несразмере између пролиферације и апоптозе лимфоцита (14).

Последњих десетак година, показано је да је ХЛЛ изузетно хетерогено обољење (4). Ћелије које се јављају код ХЛЛ-а су заробљене у процесу диференцијације Б ћелија. Морфолошки, у периферној крви, ове ћелије подсећају на зреле Б лимфоците. Ипак, код већине пацијената се јављају различите генетске мутације. Најчешћа абнормалност је делеција *13q*, која се јавља код више од 50% пацијената. Код пацијената код којих се јаве поремећаји повезани са *13q14*, се обично јавља релативно бенигна форма болести која се најчешће манифестује као стабилна или споро прогресивна изолована лимфоцитоза.

Насупрот томе, код пацијената код којих се јави тризомија 12. хромозома, присутна је прогресивна форма болести карактеристична по лимфоцитима атипичне морфологије. Ова генетска абнормалност се јавља код око 15% пацијената.

Делеција кратког крака 17. хромозома корелира са брзом прогресијом, кратком ремисијом и генерално смањеним преживљавањем пацијената. Делеције *17p13* су повезане са губитком функције тумор супресор гена *TP53* што мења и могућност ћелија за улазак у апоптозу (15-20). Промена функције *TP53* гена услед *17p* делеције или мутације је повезана са смањеним преживљавањем и слабијим одговором на хемотерапеутике (21-24). Треба споменути да се код дела пацијената оболелих од ХЛЛ-а јављају мутације *TP53* које нису праћене делецијом *17p13*.



Недавно су откривене рекурентне лезије гена који учествују у различитим биолошким сигналним путевима и који могу утицати на патогенезу ХЛЛ-а (25-29). Такви гени су *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* и *MYD88* и сви они регулишу сигналне путеве повезане са пролиферацијом и преживљавањем туморских ћелија (30).

Посматрано у целини, стандардном методом флуоресцентне *in situ* хибридизације (енг. *FISH*) се код 80% пацијената детектују неке хромозомске аномалије (31).

Утврђено је и да је протоонкоген *BCL2* претерано експримиран и да је количина његовог антиапоптоличног протеина *Bcl-2* повећана код ХЛЛ лимфоцита (32-34). Интересантно је да генетске абнормалности за које се зна да узрокују повећање количине *Bcl-2* протеина, као што је транслокација 14. и 18. хромозома, нису детектоване код пацијената оболелих од ХЛЛ-а. Истраживања су показала да је повећање количине *Bcl-2* протеина повезана са делецијом *13q14*. Два гена означена *miRNA15a* и *miRNA16-1* која се налазе на *13q14*, кодирају синтезу регулаторне РНК означене као микро РНК (енг. *miRNA*). Транскрипти ових гена инхибирају експресију других гена узрокујући деградацију информационе РНК или блокирајући процес транскрипције. Делеције гена *miRNA15a* и *miRNA16-1* доводе до повећања количине антиапоптоличног протеина *Bcl-2* у ћелијама, услед губитка микро РНК. Генетским анализама је утврђено да 70% пацијената који болују од ХЛЛ-а имају делецију или неку мутацију на генима *miRNA15a* и *miRNA16-1*, па се претпоставља да је то разлог повећања количине *Bcl-2* протеина код ХЛЛ лимфоцита (33, 34).

### 1.1.3. Клиничка слика

Код хроничне лимфоцитне леукемије, клиничка слика настаје због прогресивног нагомилавања леукемијских ћелија у костној сржи и лимфоидним органима као и због поремећаја имунитета, хипогамаглобулинемије и аутоимунских поремећаја који прате ово обољење. Болест се обично открива случајно, приликом лабораторијских анализа крви, када се уочи лимфоцитоза као први патолошки налаз.

Када се у лимфним чворовима, слезини, јетри и костној сржи нагомила превелики број лимфоцита, јављају се слабост, лак замор, повишена температура у одсуству инфекције и склоност ка крварењу. Све тегобе се развијају постепено, тако да је тешко

одредити почетак болести. Понекад се јављају само неки од симптома различитог интензитета, а врло ретко се јављају сви симптоми максималног интензитета. Пошто се лимфоцити нагомилавају различитом брзином код различитих пацијената, клиничка слика и ток болести су разнолики. Код неких пацијената клиничка слика одговара акутном малигном обољењу, а остали пацијенти након дијагностиковања болести могу да живе од 2 до 3, па чак и преко 20 година.

Најчешћи клинички налаз су увећане лимфне жлезде у једној или више регија, а могућа је и појава генерализоване лимфаденопатије. Лимфедем је редак, а уколико се јаве асцитес и плеурални излив, прогноза болести је лоша.

Анемија и тромбоцитопенија се могу јавити због инфилтрације костне сржи лимфоцитима, а могу бити последица и стварања аутоантитела или хиперспленизма. Уколико се анемија јави услед инфилтрације костне сржи лимфоцитима, онда је она нормоцитна и нормохромна, а уколико настаје због аутоантитела, онда је праћена позитивним Кумбсовим тестом. Због губитка хемоглобина, код пацијената се јављају неспецифични симптоми као што су замор, малаксалост и главобоља. Број гранулоцита, такође може бити смањен, а због поремећаја хуморалног имунитета и хипогамаглобулинемије, јавља се склоност ка инфекцијама и аутоимунским болестима (35).

Неспецифична симптоматологија која се јавља код око 10% пацијената подразумева и губитак телесне тежине у последњих 6 месеци и налете ноћног знојења (5).

Малигно измењени лимфоцити могу инфилтрисати различите делове организма попут гастроинтестиналног тракта, плеуре, коже, бронхија и других органа, узрокујући клиничку слику карактеристичну за обољење инфилтрованог органа. Инфилтрати у бубрезима, срцу или неспецифична оспа се такође могу у изузетним случајевима наћи код пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије (35).

#### **1.1.4. Дијагноза и класификација**

Дијагноза хроничне лимфоцитне леукемије се поставља на основу физикалног налаза и прегледа крви и костне сржи (35). По препорукама радне групе националног института за канцер (енг. *NCI, The National Cancer Institute*), да би се дијагностиковала

хронична лимфоцитна леукемија потребно је да буде присутна апсолутна лимфоцитоза већа од  $5 \times 10^9/l$  и карактеристичан фенотип лимфоцита који експримирају *CD19*, *CD5* и *CD23* (5). Експресија *CD20* је обично слаба и малигним лимфоцитима обично недостаје  $\lambda$  или  $\kappa$  ланац (1, 5). Овакав имунофенотип је карактеристичан за лимфоците хроничне лимфоцитне леукемије и користи се за његово разликовање од других лимфопрролиферативних поремећаја код којих је терапијски приступ значајно другачији. Хистолошка потврда дијагнозе биопсијом лимфних чворова није рутински потребна када се дијагноза потврди проточном цитометријом периферне крви, већ је резервисана за случајеве код којих се сумња на постојање још неког малигнитета лимфног ткива. Такође, биопсија костне сржи се не изводи рутински, већ може бити индикована у случајевима код којих је потребно да се испита цитопенија уколико постоји (5).

По препорукама *IWCLL* (енг. *International Workshop for Chronic Lymphocytic Leukemia*) из 2008. године, за дијагнозу хроничне лимфоцитне леукемије је такође потребно да број лимфоцита буде већи од  $5 \times 10^9/l$  као и да се потврди клонални карактер лимфоцита проточном цитометријом. Морфолошки, ћелије у ХЛЛ-у су мали, зрели лимфоцити са мало цитоплазме, великим једром са кондензованим хроматином и без једарцета. У размазу периферне крви се налази већи број пролимфоцита као и Гумпрехтове сенке (36).

Разврставање пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије по *Rai* и *Binet* класификацији у циљу одређивања степена узрапредовалости болести се и даље користи, иако оба начина нису ефикасна у одређивању прогнозе раног стадијума болести (37, 38).

Оба начина су једноставна, јефтина и могу их користити лекари широм света јер се ослањају на физикални преглед и стандардне лабораторијске анализе и не захтевају примену ултразвука, компјутеризоване томографије или магнетне резонанце (36).

Оригинална *Rai* класификација је промењена смањивањем група за прогнозу болести са 5 на 3 групе. Модификована *Rai* класификација дефинише ХЛЛ као болест ниског ризика уколико пацијенти имају лимфоцитозу са леукемијским ћелијама присутним у крви и/или костној сржи (процент лимфоидних ћелија већи од 30%, претходно означен као градус 0). Пацијенти са лимфоцитозом, увећаним лимфним чворовима и спленомегалијом и/или хепатомегалијом са лимфним чворовима који могу а

не морају бити увећани су означени као пацијенти са болешћу умереног степена ризика (претходно означени као *Rai* градус 1 и 2). Пацијенти са болешћу високог степена ризика су они код којих се јавља анемија или тромбоцитопенија која је повезана са настанком ХЛЛ-а. Код ове групе пацијената, код које је узрапредовалост болести претходно означена као *Rai* градус 4, се у лабораторијским анализама детектују вредности хемоглобина мање од 110 g/l или број тромбоцита мањи од  $100 \times 10^9/l$  (табела 1.) (36).

Стадијум болести	Степен ризика	Клиничке особине	Године преживљавања
<b><i>Rai</i></b>			
0	Низак	Лимфоцитоза само у периферној крви и костној сржи	више од 10
I/II	Умерен	Лимфаденопатија са или без хепатоспленомегалије	7
III/IV	Висок	Анемија са или без тромбоцитопеније	мање од 4
<b><i>Binet</i></b>			
A	Низак	мање од 3 подручја са лимфаденопатијом	12
B	Умерен	више од 3 подручја са лимфаденопатијом	7
C	Висок	Анемија, тромбоцитопенија или и једно и друго	од 2 до 4

**Табела 1.** *Rai* и *Binet* системи за класификацију ХЛЛ-а по стадијумима болести

По *Binet* систему за одређивање клиничког стадијума болести, постоје три градуса. У стадијуму А има мање од 3 подручја са увећаним лимфним жлездама, нема анемије и тромбоцитопеније. У стадијуму Б има 3 или више подручја увећаних лимфних жлезда и такође се не јављају ни анемија ни тромбоцитопенија, а у стадијуму Ц је присутна анемија (вредности хемоглобина испод 100 g/l) или тромбоцитопенија (снижен број тромбоцита испод  $100 \times 10^9/l$ ) без обзира на број подручја са увећањем лимфоидног ткива (табела 1.) (35, 36).

Подручја која се рачунају као једно подручје по *Binet* систему за одређивање клиничког стадијума болести су:

1. Глава и врат укључујући Валдерејев прстен (све се рачуна као једно подручје, чак и у случају да је захваћено више група лимфних чворова).
2. Пазушна јама (увећање лимфних чворова у обе пазушне јаме се рачуна као једно подручје).

3. Препоне (увећање лимфних чворова у обе препоне се рачуна као једно подручје).
4. Палпабилна слезина (спленомегалија).
5. Палпабилна јетра (хепатомегалија) (35).

### 1.1.5. Терапија

Некада се терапија хроничне лимфоцитне леукемије заснивала искључиво на примени цитостатика који су припадали групи алкилирајућих агенаса или пуринских аналога (5). Недавно, увођењем у терапију и анти CD-20 антитела, дошло је до повећања преживљавања пацијената који се лече од хроничне лимфоцитне леукемије (табела 2.).

**Табела 2.** Категорије лекова који се користе у терапији ХЛЛ-а

**Алкилирајући агенси**

Хлорамбуцил  
Бендамустин  
Циклофосфамид

**Пурински аналози**

Флударабин (инхибитор ДНК полимеразе, примазе)  
Пентостатин (инхибира аденозин-дезаминазу)  
Кладрибин (инхибира аденозин-дезаминазу)

**Имунотерапија и моноклонска антитела**

Ритуксимаб (анти-CD20)  
Алемтузумаб (анти-CD52)  
Офатумумаб (анти- CD20)  
Обинутузумаб (анти-CD20)  
Леналидомид (имуномодулаторни агенс)

**Остали лекови**

Ибрутиниб  
Иделализиб

**Табела 3.** Индикације за почетак терапије ХЛЛ-а

1. Симптоми који настају због поремећаја функције костне сржи као што су анемија, тромбоцитопенија или и једно и друго
2. Изражена (> 6cm испод левог ребарног лука), симптоматска или прогресивна спленомегалија
3. Изражена (>10cm) аденопатија или прогресивна симптоматска аденопатија
4. Прогресивна лимфоцитоза (пораст броја лимфоцита за >50% за 2 месеца) или дуплирање броја лимфоцита за мање од 6 месеци
5. Аутоимунска анемија или тромбоцитопенија рефракторна на стандардну терапију
6. Конституционални симптоми: непланирани губитак тежине за више од 10% у последњих 6 месеци, необјашњиво ноћно знојење дуже од месец дана, необјашњиво повећање температуре (>38.1°C) дуже од две недеље

Терапија ХЛЛ-а се не започиње док се код пацијента не појаве симптоми или знаци који су индикација за примену терапије (табела 3.).

Иако рандомизирани студије нису показале повећано преживљавање код пацијената који су на терапији пуринским аналозима у односу на оне који су на терапији алкилирајућим агенсима, пацијенти у непрогресивном стадијуму болести који се лече пуринским аналозима имају бољи одговор на терапију. Стога су пурински аналози прва линија хемотерапеутика у терапији ХЛЛ-а (39). Резултати дугорочних студија у којима су поређени пурински аналог, флударабин, са алкилирајућим агенсом, хлорамбуцилом, показали су да је код пацијената лечених флударабином, медијана преживљавања била већа (40, 41). Иако нема дефинитивних доказа о супериорности једног пуринског аналога у односу на други, дуготрајна примена флударабина у терапији ХЛЛ-а је довела до тога да он буде основна компонентна тренутних терапијских модалитета (42, 43).

Алкилирајући агенси доводе до погрешног спаривања нуклеотида између комплементарних ланаца ДНК, оштећујући на тај начин канцерске ћелије. Пурински аналози, попут флударабина, спречавају поправљање ових дефеката, повећавајући тако ефекат алкилирајућих агенаса. Три проспективне рандомизирани клиничке студије су показале да примена алкилирајућих агенаса у комбинацији са пуринским аналозима у терапији ХЛЛ-а побољшава стање пацијената, ефикасније уводи пацијенте у ремисију и продужава период до уласка пацијента у прогресивну фазу болести, ефикасније од примене само флударабина у терапији ХЛЛ-а (5). Стога је примена циклофосфамида и флударабина постала стандард са којим се пореде сви остали хемотерапеутици у терапији ХЛЛ-а (5, 44).

Монотерапија моноклонским анти-*CD20* антителом, *rituximab*-ом, је јако ефикасна у терапији индолентних лимфома, али није у терапији ХЛЛ-а (45, 46). Примена флударабина и циклофосфамида у комбинацији са ритуксимабом довела је до одговора на терапију код 95% пацијената и до комплетне ремисије код 70% пацијената. Међутим, код пацијената старијих од 65 година, оваква терапија је деловала превише исцрпљујуће и доводила је до чешћег прераног прекидања терапијског режима (47). Тај проблем, као и повећана инциденца секундарних леукемија и мијелодисплазија код пацијената са оваквом терапијом је довео до комбиноване примене флударабина, циклофосфамида и

ритуксимаба само код млађих пацијената са ХЛЛ-ом код којих је очувана бубрежна функција (48, 49).

Други терапијски модалитети који су се касније појавили су подразумевали примену моноклонског антитела у комбинацији са једним или више хемотерапеутика. Код скоро свих пацијената код којих је примењивана оваква терапија, се јавио побољшан одговор на терапију, већи проценат пацијената је ушао у ремисију, и продужено је време до појаве прогресивне фазе болести у односу на групу пацијената који су примали само хемотерапеутике (5).

На површини зрелих здравих и леукемијских лимфоцита, али не и њихових прекурсора, се налази гликопротеин *CD52* (50, 51). Алемтузумаб, моноклонско анти-*CD52* антитело се често јавља у терапијским модалитетима за хроничну лимфоцитну леукемију. Ипак, студија која је поредила терапијски режим флударабин + циклофосфамид + ритуксимаб са режимом флударабин + циклофосфамид + алемтузумаб код две групе пацијената оболелих од ХЛЛ-а, је морала бити прекинута због превелике токсичности терапије у групи пацијената код којих је примењивана терапија укључивала алемтузумаб. Тако да се у овом случају примена терапијског режима флударабин + циклофосфамид + ритуксимаб показала као боља и безбеднија (52).

Због тога, примена терапијског режима флударабин + циклофосфамид + ритуксимаб би требало да буде стандард код пацијената оболелих од ХЛЛ-а у релативно добром физичком стању и са очуваном бубрежном функцијом (5, 53). Насупрот томе, код старијих и фракилнијих пацијената се користе друге комбинације хемотерапеутика које они боље подносе.

Пошто су стратегије за терапију хроничне лимфоцитне леукемије постале сложене, различита међународна удружења су објавила водиче за терапију ХЛЛ-а. Сви ови водичи прихватају значај прецизног дијагностиковања и код свих је заједничко одсуство терапије и иницијално праћење пацијената који су без симптома болести, без обзира на факторе ризика који су код њих присутни. Сви водичи препоручују примену хемоимунотерапије код оних пацијената код којих је први пут потребно применити терапију. Водич националне мреже за канцер (енг. *NCCI, National Comprehensive Cancer Network*) препоручује класификовање пацијената на основу резултата флуоресцентне *in situ* хибридизације (енг. *FISH*) и цитогенетских анализа, јер поједини пацијенти попут оних

који имају делецију *17p* могу добро одреаговати на алогену трансплантацију костне сржи (5, 44). Избор комбинације лекова који се користе у терапији у оквиру хемоимунотерапијских режима обично зависи од пацијентовог општег стања и коморбидитета. Немачка група за истраживање ХЛЛ-а (енг. *The German CLL Study Group*) класификује пацијенте на основу очуваности бубрежне функције (да ли је брзина гломерулске филтрације већа или мања од 70 ml/min) и на основу њихове скале за процену здравственог стања пацијената (5, 54). Терапијски режим се онда заснива на степену очуваности здравља пацијента. Наравно, са проналаском нових лекова, ови водичи ће вероватно у будућности бити промењени или прилагођени тренутном стању.

За развој и прогресију хроничне лимфоцитне леукемије је круцијалан Б ћелијски рецептор (5, 44). Стога се развијају нови лекови који делују на овај рецептор и друге сигналне протеине који се налазе у леукемијским лимфоцитима. Ибрутиниб је лек који је инхибитор Брутонове тирозин-киназе, а иделализиб (енг. *Idelalisib*) је инхибитор фосфатидилинозитол-3-киназе (*PI3K*) и оба лека су одобрена за примену у терапији ХЛЛ-а током 2014. године од стране америчке агенције за храну и лекове (енг. *FDA, Food and Drug Administration*) (55, 56). Такође, актуелна су истраживања о агенсима који делују на антиапоптозни протеин *Bcl-2* а модификују се и стварају нова анти-*CD20* антитела која би ефикасније убијала леукемијске лимфоците (44, 54, 57, 58).

## 1.2. Програмирана ћелијска смрт

Програмирана ћелијска смрт подразумева облике одумирања ћелија који зависе и контролисани су од стране генетски кодираних сигнала или унутрашњих биохемијских процеса умируће ћелије. Иако је дуго овај термин коришћен искључиво за апоптозу, данас је познато да програмирана ћелијска смрт обухвата и друге појмове као што су аутофагија и програмирана некроза (59).

### 1.2.1. Типови програмиране ћелијске смрти

Апоптоза или тип 1 програмиране ћелијске смрти је процес који је први описао Кар и сарадници и карактеришу је типичне морфолошке и биохемијске промене као што су



скупљање ћелија, кондензација и фрагментација једра, стварање протрузија на ћелијској мембрани и одвајање од суседних ћелија или екстрацелуларног матрикса (60, 61). Биохемијске карактеристике подразумевају цепање једарног хроматина на фрагменте, избацавање фосфатидилсерина ка спољашњој средини и протеолизу специфичних ћелијских протеина у унутрашњости ћелије под дејством специфичних протеаза (62, 63).

Аутофагија или тип 2 програмиране ћелијске смрти, започиње формирањем аутофагозома, структура које се састоје из двослојне мембране који окружују цитоплазматске макромолекуле и органеле предодређене за рециклирање (64). Аутофагија има кључну улогу у преживљавању ћелија током периода недостатка хранљивих материја и одсуства фактора раста. Ипак, постоје докази да ћелије у аутофагији могу ући у процес ћелијске смрти који се разликује од апоптозе и програмиране некрозе (65, 66).

Поред апоптозе и аутофагије, постоји и тип 3 програмиране ћелијске смрти који се назива програмирана некроза. Током овог процеса долази до бубрења ћелија, поремећаја функције органела и лизе ћелија (64).

## 1.2.2. Апоптоза

Апоптоза, по дефиницији, представља облик програмиране ћелијске смрти који је повезан са деловањем унутарћелијских ензима каспаза, при чему настаје кондензација цитоплазме и једра, раздвајање хроматина, формирање апоптотичних телашаца са одржавањем континуитета ћелијске мембране на којој се формирају бројни наставци, при чему не долази до запаљенског и имунског одговора (67).

Особине ћелије у апоптози се разликују у зависности од тога да ли се ћелија налази у раном или касном стадијуму апоптозе. У раном стадијуму, ћелија активира одбрамбене механизме за преживљавање који имају за циљ поправку насталих оштећења, а у фази касне апоптозе, ћелија неминовно подлеже смрти због немогућности репарације оштећења насталим у фази ране апоптозе (68-70). У почетој фази, апоптотична ћелија губи контакт са околним ћелијама, ћелија се смањује и формирају се наставци на ћелијској мембрани (68, 70). Пикноза настаје као последица кондензације хроматина и представља најкарактеристичнију промену код апоптозе. Такође, долази до стварања наставака на ћелијској мембрани које прати цепање једра и раздвајање ћелијских фрагмената на

апоптотска телашца. Апоптотска телашца садрже делове цитоплазме у којој су густо спаковане органеле са или без делова једра. Целовитост органела је очувана и сав овај садржај је обавијен ћелијском мембраном. Апоптотска телашца потом бивају фагоцитована од стране макрофага, паренхималних или туморских ћелија. Током апоптозе не долази до појаве запаљенске реакције јер ћелије које их фагоцитују не продукују инфламаторне цитокине, сам садржај из апоптотских телашца се не ослобађа у спољашњу средину а и околне ћелије их брзо фагоцитују (71).

### 1.2.3. Механизам апоптозе

Процес апоптозе покреће се активацијом једног од два основна сигнална пута, спољашњег или сигналног пута рецептора смрти или унутрашњег односно митохондријалног сигналног пута (72-74). Данас је познато да оба ћелијска пута укључују молекуле који могу утицати и на други ћелијски пут, а познато је и да су међусобно повезани преко митохондрија. И спољашњи и унутрашњи сигнални пут апоптозе могу да промене пермеабилност митохондријалне мембране, што резултује активацијом каспазе-3 и последичном фрагментацијом молекула ДНК, деградацијом цитоскелета и једарних протеина, формирањем апоптотских телашца и коначно њиховом фагоцитозом од стране макрофага (71).

#### 1.2.3.1. Спољашњи пут апоптозе

Спољашњи сигнални пут апоптозе може бити покренут активацијом неког од протеина који припадају рецепторима смрти. Фамилија протеина рецептора смрти обухвата рецептор 1 фактора некрозе тумора (енг. *TNF-R1, tumor necrosis factor receptor 1*), *Fas*, *DR3*, *TRAIL-R1/2 (DR4/5)* и *DR6* (75). Сличност чланова ове породице протеина је у цитоплазматским регионима ових протеина, односно доменима смрти, који када се вежу за свој одговарајући лиганд активирају домен смрти повезан са *Fas*-ом (енг. *FADD, Fas associated death domain*). Након тога *FADD* везује прокаспазу-8. Крајњи резултат активације овог рецептора је везивање прокаспазе-8 у *DISC* (енг. *death inducing signaling complex*). Прокаспаза-8 у овом комплексу подлеже димеризацији и активацији до

иницијаторске каспазе-8. Када се каспаза-8 активира, она доводи до цепања прокаспазе-3 у активну каспазу-3 и активира *Bid*, протеин који припада групи проапоптотских протеина *Bcl-2* фамилије. Осим иницијаторне прокаспазе-8, *FADD* може довести и до активације прокаспазе-10 у каспазу-10 (64).

### 1.2.3.2. Унутрашњи пут апоптозе

Насупрот спољашњем путу апоптозе који се покреће посредством специјализованог рецептора смрти, унутрашњи пут апоптозе може бити покренут дејством различитих ванћелијских и унутарћелијских фактора. Ванћелијски стимулус за апоптозу може бити недостатак хранљивих материја потребних за функционисање ћелије, радијација, као и физички и хемијски стресни фактори (токсини, хипоксија, хипертермија). Унутарћелијски фактори који могу довести до апоптозе ћелија су оксидативни стрес, оштећење молекула ДНК и оштећење ендоплазматског ретикулума.

Сви ови фактори могу изазвати промене у унутрашњој митохондријалној мембрани, отварања пора у митохондријама, губитка митохондријалног трансмембранског потенцијала и касније до отпуштања протеина из митохондријалног међумембранског простора у цитоплазму (71, 76).

Фамилија *Bcl-2* протеина обухвата молекуле који су кључни регулатори унутрашњег пута апоптозе (77). Количина *Bcl-2* протеина је повећана код великог броја туморских ћелија (78). Чланови ове породице протеина управљају пермеабилитетом митохондријалне мембране и регулишу излазак апоптогених молекула (нарочито цитохрома *c*) и последичну каскадну активацију каспаза. Фамилију *Bcl-2* протеина чине протеини који су класификовани у три групе:

1. антиапоптотични протеини (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *A1* итд.),
2. проапоптотични протеини са неколико *Bcl-2* хомологих (*BH*) домена означених *BH1-4* (*Bax*, *Bak* итд.)
3. протеини који садрже само *BH3* домене (*Bad*, *Bid*, *Bim*, *Puma*, *Noxa* итд.)

Постојање *BH* домена омогућава члановима *Bcl-2* фамилије протеина да формирају хомодимере и хетеродимере, чиме настају конформационе промене одговорне за њихову активност. Основна улога антиапоптотичних протеина је да изврше секвестрацију

проапоптотичних протеина као што су *Bax* и *Bak*. Сви антиапоптотични протеини имају могућност да изврше секвестрацију *Bax*-а, док једино *Bcl-xL* и *Mcl-1* могу да се вежу за *Bak* (3).

Још увек није потпуно јасно на који начин протеини *Bcl-2* фамилије регулишу апоптозу. По једној теорији, *Bax* и *Bak* се налазе у неактивном стању преко директних интеракција са једним или два различита антиапоптотична *Bcl-2* протеина. Када су активирани, протеини који садрже само *BH3* домене се могу везати за антиапоптотичне протеине, измештајући на тај начин *Bax* и *Bak* од њихових антиапоптотичних лиганата (3, 64). Ослобађање протеина *Bax* и *Bak*, омогућава њихову функционалну активацију односно формирање пора и пермеабилizацију митохондријалне мембране. Интеракције између протеина који садрже само *BH3* домене и антиапоптотичних протеина су селективне. *Noxa* се везује само за *Mcl-1* и *A1*, *Bad* се везује само за *Bcl-2*, *Bcl-w* и *Bcl-xL*, а *Bim* и *Puma* се могу везати за све наведене антиапоптотичне протеине (77, 79). Овај податак указује да зависно од стимулуса који изазива ћелијску смрт, може бити потребна активација већег броја протеина који садрже само *BH3* домене да би процес апоптозе започео. Тако је за активацију процеса апоптозе потребно повећање количине и протеина *Bad* и протеина *Noxa* да би дошло до ослобађања *Bak*-а од *Bcl-xL* и *Mcl-1* и његове активације. Уколико је појачано експримиран само један од ова два протеина, неће доћи до активације *Bak*-а и индукције апоптозе.

Насупрот томе, одређени протеини који садрже само *BH3* домене могу да интерагују директно са проапоптотичним протеинима и тако индукују апоптозу везивањем директно за *Bax* и *Bak* (80).

Као одговор на апоптотски сигнал, *Bax* протеин се транслоцира из цитоплазме у митохондрије, олигомеризује у активни *Bax* и уграђује у спољашњу митохондријалну мембрану што доводи до стварања пора у спољашњој митохондријалној мембрани, измене њене пермеабилности и ослобађања цитохрома *c* из међумембранског простора митохондрија у цитоплазму.

Сам цитохром *c* је хемпротеин који је повезан са спољашњом страном унутрашње митохондријалне мембране преко тј. везивањем за кардиолипине и за разлику од осталих цитохрома је хидросолубилан због изразито позитивног наелектрисања. Због своје хидросолубилности и присуства хем-групе, има важну физиолошку улогу у процесу

оксидативне фосфорилације током које преноси један по један електрон између комплекса III и комплекса IV респираторног ланца. Током ране фазе апоптозе, стимулирана је продукција кисеоничних слободних радикала у митохондријама па долази до оксидације кардиолипина и одвајања цитохрома *c* од унутрашње митондријалне мембране. На тај начин, цитохром *c* може напустити митохондријални међумембрански простор кроз формиране поре у спољашњој мембрани митохондрија и ући у цитоплазму (81). Цитохром *c* може потом интераговати са *Apaf-1* што доводи до активације каспазе-9. Активирана каспаза-9 активира каспазу-3 последично активирајући нисходну каскаду каспаза које доводе до апоптозе (82).

### 1.2.3.3. Каспазе

Једну од кључних улога у процесу апоптозе има група цистеин зависних специфичних протеаза за аспартат које се називају каспазе (енг. *cysteine-aspartic proteases* или енг. *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*). Каспазе су ендопептидазе чија је улога да врше хидролизу пептидних веза које формирају резидуе аспарагинске киселине супстрата у реакцији зависној од цистеинских остатака у активном месту каспаза (83).

Иако деловање каспаза може инактивирати молекуле супстрата, оне такође имају улогу у стварању активних сигналних молекула који учествују у уређеним процесима као што су апоптоза и инфламација. Сходно томе, каспазе су класификоване на основу улоге коју имају на оне које учествују у процесу апоптозе (каспаза-3, -6, -7, -8, -9) и на оне које учествују у процесу инфламације (каспаза-1, -4, -5 и -12). Каспаза-2, -10 и -14 се теже категоришу на основу улоге коју обављају. Каспазе које учествују у процесу апоптозе су даље подељене на оне које иницирају апоптозу (каспаза-8 и -9) и на оне које спроводе процес апоптозе (каспаза-3, -6 и -7).

Иницијално, каспазе се синтетишу као неактивни мономери који се називају прокаспазе. Да би се прокаспазе активирале, често је потребна њихова димеризација или ограничена протеолиза. Спајање прокаспаза у активне димере је олакшано различитим адаптерним протеинима који се везују за специфична места на продоменима прокаспаза. Прецизан механизам спајања прокаспаза у димере се разликује и зависи од протеина који су укључени у овај процес.

У процесу апоптозе, постоји контролисано „растурање“ унутарћелијских компонената, при чему се избегава инфламација и оштећење околних ћелија. Иницијаторске каспазе активирају каспазе које спроводе процес апоптозе, а оне последично усклађују своју активност да би разградиле кључне структурне протеине и активирале друге ензиме. Морфолошке промене које оне узрокују, а карактеристичне су за апоптозу, су фрагментација ДНК и стварање наставака на ћелијској мембрани.

Иницијаторске каспазе, каспаза-8 и каспаза-9, се нормално налазе у ћелији у облику неактивних мономера као прокаспаза-8 и прокаспаза-9. Ове каспазе се активирају димеризацијом, а не ограниченом протеолизом. Димеризацију каспаза покрећу различити сигнални догађаји у ћелији. Димеризација иницијаторских каспаза олакшава аутокаталитичко цепање других мономера иницијаторских каспаза на велику и малу подјединицу што резултује повећањем броја димера (84).

Егзекуторне, односно извршилачке каспазе се синтетишу у неактивном облику прокаспаза које се налазе у форми димера (85). Да би се егзекуторне каспазе активирале, потребно је да их иницијаторске каспазе поделе на велику и малу подјединицу. Ово одвајање велике и мале подјединице омогућава конформациону промену која приближава два активна места подјединица егзекуторних каспаза и стварање зрелих, функционалних протеаза. Када је активиран један молекул егзекуторне каспазе, он може да подели и активира друге молекуле егзекуторних каспаза, што позитивном повратном спрегом води активацији свих преосталих молекула егзекуторних каспаза (83).

### **1.3. Биоактивне супстанце**

Биоактивне супстанце су супстанце које испољавају одређени ефекат на живи организам, ткиво или ћелије (86). Оне могу бити биљног или животињског порекла или могу бити синтетисане вештачким путем (86, 87).

Природни препарати су богат извор састојака који имају бројне примене у терапији тумора. Поред тога, велики број природних састојака обезбеђује основне молекуле, који се могу модификовати и користити за побољшање терапије. Преко 70% супстанци које се користе у лечењу тумора су или супстанце природног порекла или супстанце добијене модификацијом природних супстанци. Такође, коњугација природних супстанци са

моноклоналним антителима или полимерима који служе као молекули носачи, доводи до ефикасније циљане терапије. Пошто је мање од 15% виших биљака систематски испитано, испитавање природних супстанци као хемотерапеутика заслужује повећану пажњу и примену мултидисциплинарних научних истраживања (88).

Биоактивне супстанце које смо укључили у наше истраживање су прополис, хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, листа биљке *Teucrium pollium* и метанолски екстракти гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*.

### 1.3.1. Прополис

Прополис или пчелињи лепак, је природна супстанца структуре сличне воску, коју пчеле користе за затварање пукотина или саћа. На нижим температурама, прополис је мек и лепљив, а на вишим постаје чврст и крт. Његова боја варира од зеленкасте до црвенобраон зависно од биљака које пчеле користе и географског порекла. До сада је пронађено преко 60 врста биљака са којих пчеле скупљају прополис (89). Ако се дуже чува, постаје тамнији и под дејством сунца губи еластичност. Има карактеристичан смоласт мирис и нагорак укус (88, 90, 91). Назив потиче од грчке речи „прополис“ што значи одбрана града (92).

Током историје, прополис је имао различиту примену. Египћани су га користили за балсамовање кадавера, док су га као антисептик користили антички Грци, Римљани и Инке (89, 91, 92). У кинеској култури, прополис је коришћен као помоћно лековито средство у лечењу инфекција и тумора. У модерној ери, забележено је да прополис има антивирусна, антибактеријска, антигљивична, антизапаљенска и хепатопротективна својства. Данас се користи и као састојак пасти за зубе, крема и лосиона (92).

Супстанце које улазе у састав прополиса су углавном екстракти биљних излучевина помешани са метаболичким продуктима самих пчела. Стога, састојци који улазе у састав прополиса различитог географског порекла се разликују зависно од врста биљака и цветова са којих они потичу (88, 92). До сада је идентификовано преко 300 састојака који улазе у састав прополиса (92, 93). Састојци који су идентификовани у прополису су углавном, полифеноли. Већина полифенола који се налазе у прополису су флавоноиди, заједно са фенолном киселином и алдехидима, фенолним алдехидима и

кетонима. Друге компоненте су лако испарљива уља и ароматичне киселине (5-10%) и воскови (30-40%) као и други састојци који се налазе у траговима (92). Могу се наћи и неки есенцијални елементи као што су магнезијум, калцијум, гвожђе, цинк, никл и витамини Б<sub>1</sub>, Б<sub>2</sub>, Ц и Е (92-94).

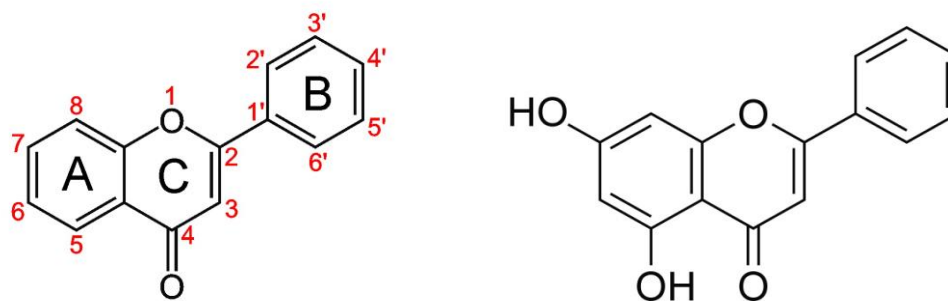
Антитуморска својства прополиса су потврђена у великом броју *in vitro* студија у којима су прополиси различитог географског порекла индуковали апоптозу испитиваних туморских ћелијских линија (91, 93, 95-98). Показано је да прополис индукује апоптозу хуманих епителијалних *HeLa* ћелија, хуманих хистиоцитних лимфомских ћелија *U937*, ћелијске линије карцинома дојке *MCF-7*, Јуркатових хуманих Т-лимфобластних леукемијских ћелија и хуманих промијелоцитних леукемијских ћелија *HL-60* (91). Показано је и да тај ефекат прополиси изазивају смањењем количине *Bcl-2* протеина, ослобађањем цитохрома *c* из митохондрија у цитосол и активацијом каспазе-3, каспазе-8 и каспазе-9 (91, 93).

Од активних компоненти присутних у прополису, фенил-естар кафеинске киселине (енг. *CAPE, caffeic acid phenil ester*) и хризин изгледа имају кључну улогу. *CAPE* је антиоксидативни агенс без познатих токсичних ефеката и показује снажан антитуморски ефекат на различитим ћелијама тумора усне дупље (99).

### 1.3.2. Хризин

Флавоноиди обухватају широк спектар биљних пигмената који су обавезно присутни у воћу и поврћу. До данас је откривено преко 4000 флавоноида који се даље могу поделити на флавоноле, флавоне, флаваноле, флаваноне, антоцијанидине и изофлавоноиде (95-97, 100). Хризин (5, 7-дихидроксифлаванон) је по хемијској природи флаванон. Сви флавоноиди имају заједничку хемијску структуру, односно садрже кондензоване А и С прстенове и фенил В прстен повезан са угљениковим атомом у положају 2 С прстена (Слика 1.). Хризин се разликује од осталих флавоноида по присуству хидроксилних група на угљениковим атомима у положајима 5 и 7 (Слика 1.) (97).





**Слика 1.** Заједничка хемијска структура флавонола (лево) и структурна формула хризина (десно)

Присуство хризина је доказано у прополису и у екстрактима биљака *Passiflora caerulea*, *Passiflora incarnata*, *Oroxylum indicum*, *Matricaria chamomilla* и гљивици *Pleurotus ostreatus* (94-97, 100). Такође се сматра једним од главних носилаца антитуморске активности прополиса (94).

Показано је да хризин делује као инхибитор ароматазе у високим концентрацијама у *in vitro* условима. Ипак, неке касније студије су оспориле овакав његов ефекат у *in vivo* условима и показале да не инхибира ароматазу уколико је дат орално (101). Такође, показано је да хризин испољава антиинфламаторни и антиоксидативне ефекте на појединим типовима ћелија *in vitro* (102, 103). Показано је да хризин смањује активност циклооксигеназе-2 и индуцибилне азот-моноксид синтетазе (102).

Иако до скоро није било пуно података о ефекту хризина на туморским ћелијама човека, овакво дејство хризина се последњих година много више испитује (97). До сада је показано да хризин инхибира пролиферацију и индукује апоптозу *HeLa* ћелија (карцинома цервикса) *in vitro* (104, 105). Такође, показано је да делује цитотоксично на начин који је дозно- и временски- зависан на *KYSE-510* ћелије езофагеалног сквамозелуларног карцинома (106, 107). Поред тога, показано је и да делује инхибиторно на раст ћелија хуманог глиобластома, *U87-MG*, астроцитома, *U-251* карцинома дојке, *MDA-MB-231*, и *PC-13* ћелија карцинома простате (108).

Хризин делује цитотоксично и смањује пролиферацију ћелија мишићег (*B16-F1*) и хуманог (*A-375*) меланома преко каспаза-зависних механизма (109, 110). Активација

апоптозе ових ћелија била је праћена унутарћелијском редистрибуцијом проапоптотичног протеина *Bax* из цитоплазме у митохондрије (110).

Ефекат хризина на поједине леукемијске ћелије је само делимично испитан. Показано је да смањује вијабилност и да индукује апоптозу *U-937* ћелија хуманог хистиоцитног лимфома и *MO7e* ћелија акутне мегакариобластне леукемије (111-114). Смањење вијабилности *U-937* ћелија је било повезано са активацијом каспазе-3 (112). Цитотоксични ефекат хризина је доказан *in vitro* и на ћелијским линијама акутне моноцитне леукемије *THP-1* и хумане промијелоцитне леукемије *HL-60* (115). Још увек није испитано да ли и на који начин хризин делује на ћелије хроничне лимфоцитне леукемије.

### 1.3.3. *Ligustrum vulgare*

*Ligustrum vulgare* је латински назив биљке која је код нас позната и по именима калина, зимолез или козје грожђе (116). То је жбунаста, листопадна биљка, висине до 5 метара, веома распрострањена у Србији, као и на подручју централне Европе, Крима, Кавказа, Молдавије и Украјине (116-118). Честа је биљка у шумским заједницама појаса храстова. Понекад се сади у парковима и двориштима као жива ограда. Сматра се да је биљка, а посебно плод биљке отрован, нарочито за децу (119). Листови су копљастог облика 2-7 cm дуги и 0,5-2 cm широки, на лицу тамнозелене, а на наличју светлозелене боје. Цветови су бели и формирају цвасти пирамидалног облика. Плод је бобичаст, црне боје и пречника је 0,5-1 cm (116).

У првом веку пре нове ере је забележена примена листа ове биљке у терапији инфламације меких ткива, као и у терапији опекотина. У средњем веку је лишће коришћено у терапији дијареје. Данас се у народној медицини лишће биљке *Ligustrum vulgare* користи у терапији инфламације меких ткива, а у подручју Кипра и јужне Италије сматра се да лишће биљке *Ligustrum vulgare* поседује антиинфламаторно, антиоксидативно и антиреуматско дејство, те се у складу са тим примењује (117, 120, 121). Претпоставља се да *Ligustrum vulgare* испољава антиинфламаторно дејство инхибицијом липооксигеназе (122).

Недавна студија је потврдила антиинфламаторно дејство метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare*. Аутори ове студије су изоловали и идентификовали шест флавоноида из листа ове биљке, као што су апигенин, лутеолин, апигенин-7-глукозид, апигенин-7-рутинозид, лигустрофлаван и лутеолин-7-глукозид (123). Употреба у традиционалној медицини, као и каснија научна истраживања која указују на цитотоксични ефекат листа биљке *Ligustrum vulgare* према *HeLa* ћелијама тумора цервикса, наводе на могућност да екстракте биљке *Ligustrum vulgare* треба испитати као потенцијалне антипролиферативне агенсе (124). Различити експерименти *in vitro* са екстрактом листа ове биљке показују обиман фармаколошки потенцијал због присуства флавоноида, фенилпропаноида и терпеноида (123, 124).

Показано је да метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* испољавају антипролиферативни и проапоптотични ефекат *in vitro* на ћелијској линији колоректалног тумора колоне, *HCT-116*, после 24 часа. Такође је показано да екстракт листа има израженији антипролиферативни ефекат, него екстракт плода. Комбинација метанолског екстракта листа или плода биљке *Ligustrum vulgare* и комплекса паладијума је испољила снажнији антипролиферативни ефекат него појединачна употреба сваког од тих агенаса. Екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* испољава јачи синергистички ефекат са комплексима паладијума него екстракт плода (125). Тренутно нема других студија у којима је испитивана цитотоксичност плода биљке *Ligustrum vulgare*.

#### **1.3.4. *Teucrium pollium***

*Teucrium pollium* је жбунаста биљка позната под називима дубачац или дупчац. Назив је добила по Теуцеру, краљу Тебе, који је препоручио свом народу употребу дубачаца у лековите сврхе (116). У традиционалној медицини се користи последњих 2000 година, а распрострањена је на већем делу Средњег Истока и у подручју Медитерана (126-128). Биљка је висине до 40 cm, са издуженим, овалним и благо назубљеним листовима. Цветови су бели до благо ружичасти, густо спаковани и на врху гране. Обично се налази у планинским и стеновитим пределима (129).

Биљке из рода *Teucrium* се користе у традиционалној медицини због тога што садрже бројна фенолна једињења са снажном биолошком активношћу, дитерпеноиде,

монотерпене, сесквитерпене, флавоноиде и естре масних киселина (130, 131). *Teucrium pollium* се често користи у традиционалној медицини као чај за регулисање губитка апетита, гастроинтестиналног дискомфора, бола у стомаку или као зачин (128, 129, 131, 132). У народној медицини се користи и за стимулацију разградње масног ткива и целулита, у терапији респираторних обољења, коњуктивитиса, а сматра се да поседује антиинфламаторно, антиоксидативно, антимиembroно, хипогликемијско, диуретско и аналгетско дејство (127-135).

Показано је да екстракт биљке *Teucrium pollium* инхибира инвазију и смањује покретљивост хуманих ћелија карцинома простате, PC3 и DU145 (126). Такође, *Teucrium pollium* испољава снажно цитотоксично дејство на четири туморске ћелијске линије: ћелијску линију мишје леукемије, RAW 264.7, хуманог крупноцелуларног карцинома плућа, COR-L23, хуманог меланома, C32 и хуманог колоректалног аденокарцинома, Caco-2 (127). Такође, метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* испољава антипролиферативни и проапоптотични ефекат на ћелијској линији колоректалног карцинома колоне, односно HCT-116 ћелијама, после 24 часа инкубације ћелија у присуству овог екстракта (130). Још једна студија је показала да метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* појачава цитотоксични и проапоптотични ефекат антитуморских лекова винкрестина, винбластина и доксорубицина на хуманим ћелијским линијама меланома коже (SKMEL-3), остеосаркома (Saos-2), аденокарцинома колоне (SW480), аденокарцинома дојке (MCF-7), епидермалног папилома (KB ћелије), ендометријалног карцинома (EJ ћелије) и епидермоидног карцинома (A431) (136).

### 1.3.5. *Phellinus linteus*

*Phellinus linteus* је медицинска гљива, позната и као „*mesimakobu*“ у Јапану и „*sangvang*“ у Кини, која се од давнина користи у медицини Далеког истока (137, 138). Сама гљива расте на стаблима бреста врбе и дуда, али се ретко налази у природи јер су за њу потребни специфични климатски услови. *Phellinus linteus*, оригинално описана као *Polyphorus linteus*, припада породици *Hymenochaetaceae* и дуго се користила у народној медицини у терапији абдоминалног бола, запаљења, артритиса колена, гастроинтестиналних поремећаја, дијабетеса и карцинома (137).

Показано је да *Phellinus linteus* испољава антимикуробну активност, нарочито против *Bacillus cereus*-а и метицилин-резистентног *Staphylococcus aureus*-а (139, 140). Супстанце које су претходно изоловане из гљиве *Phellinus linteus*, а за које је показано одређено фармаколошко дејство су лектини, тритерпени, мешимакобноли А и Б, хиспидин, давалиа-лактон, метил-давалиа-лактон, хифоломин Б, интерфунгин А, иноскавин А, кафеинска киселина, елагинска киселина, фелифуропиранон А, фелигридин Г и фелигридимер А (137, 141, 142). Поред тога, полисахариди изоловани из гљиве *Phellinus linteus*, а нарочито  $\beta$ -D-гљукани и полисахаропептиди су добро познате и најснажније супстенце изоловане из гљива са антитуморским и имуномодулаторним особинама (137).

Показано је и да полифеноли из гљиве *Phellinus linteus* делују као антиоксиданси, при чему су главни носиоци антиоксидантне активности *Phellinus linteus*-а хиспидин и његови димери (143).

Свакако, особина гљиве *Phellinus linteus* која привлачи највише пажње је његово дејство на туморе. У Јапану је забележен случај пацијента оболелог од хепатоцелуларног карцинома са метастазама на плућима, код кога је дошло до потпуне регресије тумора после узимања екстракта гљиве *Phellinus linteus* током 6 месеци, без икакве друге терапије. Поред тога, у Кореји је забележен случај пацијента са карциномом јетре са метастазама у централном нервном систему, код кога је терапија гљивом *Phellinus linteus* заједно са зрачном терапијом довела до спонтане ремисије. Други је случај пацијента са тумором простате са метастазама на костима код кога је тумор драстично смањен захваљујући узимању екстракта *Phellinus linteus*-а (144). Сви ови случајеви сугеришу повезаност између уноса *Phellinus linteus*-а и регресије појединих врста тумора.

*In vitro* студије, очекивано, дају много више података о антитуморском дејству различитих екстраката гљиве *Phellinus linteus*. Полисахарид изолован из гљиве *Phellinus linteus* је испољио снажну антитуморску активност индукујући апоптозу S-180 ћелија саркома (141). Алкохолни екстракт гљиве *Phellinus linteus* је индуковао апоптозу више ћелијских линија хуманог карцинома колона (CT26, HT-29, B16BL6, colon 26-M3.1 и SW480) (145, 146). Хисполон изолован из гљиве *Phellinus linteus* је изазвао активацију каспаза и апоптозу хуманих ћелија назофарингеалног карцинома (HONE-1 и NP-039) (147). Хисполон је, такође, индуковао ослобађање цитохрома c из митохондрија у

цитоплазму, активацију каспазе-3 и последично довео до апоптозе хуманих епидермоидних *KB* ћелија (148). Запажено је и да је *Phellinus linteus* учинио *LNCaP* ћелије карцинома простате осетљивијим на апоптозу индуковану доксорубицином (149).

Забележен је и инхибиторни и проапоптотични ефекат *Phellinus linteus*-а и на појединим типовима хуманих леукемијских ћелија као што су *NB4*, ћелије акутне промијелоцитне леукемије и *K562*, ћелије хроничне мијелоидне леукемије (150, 151).

У *in vivo* студијама на мишевима, *Phellinus linteus* је показао антитуморско дејство на мишевима оболелим од хепатоцелуларног карцинома и смањио је прогресију тумора и појаву метастаза код мишева са меланомом (142, 152).

### 1.3.6. *Cordyceps sinensis*

*Cordyceps sinensis* је гљива која паразитира на инсектима и то првенствено на глави ларви лептира врсте *Hepialus armoricanus*, мада се може наћи и на другим врстама лептира. У медицинске сврхе се користи у Кини преко 300 година. Садржи бројне биоактивне супстанце као што су полисахариди, нуклеозиди, кордицепин и његови деривати, кордицепинска киселина, манитол, аминокфенол и ергостерол. Дуго се користио у Кини и другим азијским земљама као тоник и дијететски суплемент код болешљивих, нарочито старијих пацијената. Доказано је да хемијски састојци изоловани из гљиве *Cordyceps sinensis* имају нефропротективно, хепатопротективно, инфламаторно, антиоксидантно и антиапоптотично дејство (153).

Последњих година је испитивана имуномодулаторна активност појединих супстанци изолованих из гљиве *Cordyceps sinensis*. Показано је да алкохолни екстракти поспешују фагоцитозу и повећавају активност *NK*-ћелија код мишева инфицираних стрептококом групе А (154).

Водени екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* садржи полисахарид, који испољава снажну антиоксидативну активност укључујући смањење штетних ефеката насталих дејством хидроксилног радикала, супероксид-анјон радикала, као и инхибицију хемоллизе индуковане водоник пероксидом (155). Поред тога, третман екстрактом гљиве *Cordyceps sinensis* је смањио оксидативни стрес и оштећење срчаног ткива на Лангендорфовом

моделу изолованог срца миша, повећањем активности супероксид дизмутазе и повећањем односа редукованог и оксидованог глутатиона (156).

Екстракти гљиве *Cordyceps sinensis*, као и различите супстанце изоловане из ових екстраката, испољавају цитотоксични ефекат на бројним туморским ћелијским линијама. Показано је да *Cordyceps sinensis* испољава антитуморску активност на хуманим ћелијама тумора јетре (*HepG2*), дојке (*MCF-7*) и плућа (*A549*) (157). Поред тога, полисахарид из *Cordyceps sinensis*-а повећава осетљивост *H157* ћелија немикроцелуларног карцинома плућа на цитотоксичност индуковану цисплатином (158). Две фракције метанолског екстракта *Cordyceps sinensis*-а делују инхибиторно на раст ћелијских линија хроничне мијелоидне леукемије (*K562*), ћелија карцинома плућа (*Calu-1*) и ћелија *Burkit*-овог лимфома (*Raji* ћелије) (159).

Поред тога, екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* је индуковао апоптозу хуманих ћелија промијелоцитне леукемије, *HL-60*, смањењем експресије антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, транслокацијом проапоптотичног протеина *Bax* из цитоплазме у митохондрије, ослобађањем цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму и активацијом каспаза 2, 3 и 9 (160). Такође, показано је и да је екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* инхибирао пролиферацију *U937* ћелија хистиоцитног лимфома, а једна ранија студија је потврдила да екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* инхибира пролиферацију хуманих ћелија промијелоцитне леукемије, односно *HL-60* ћелија (161, 162).

## 2. Циљеви истраживања

Основни циљ овог истраживања је да се испита ефекат две различите врсте прополиса, хризина и метанолских екстраката биљака *Ligustrum vulgare* и *Teucrium pollium* и гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на вијабилност ћелија леукемијских ћелијских линија *MOLT-4* и *JVM-13*, на вијабилност лимфоцита добијених из крви пацијената оболелих од ХЛЛ-а, као и на вијабилност мононуклеарних леукоцита изолованих из крви здравих особа (контрола).

С тим у вези, примарни циљеви ове студије су:

1. Испитати потенцијалну цитотоксичност наведених биоактивних супстанци *MTT* тестом и *LDH* тестом.
2. Утврдити које од ових биоактивних супстанци делују цитотоксично на леукемијске ћелије, а не мењају вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита, при истим концентрацијама супстанци и за исти временски период. Даља испитивања би укључила само такве супстанце.
3. Одредити релативни однос некротичне и апоптотске смрти ХЛЛ лимфоцита изазване испитиваним супстанцама.
4. Утврдити утицај испитиваних биоактивних супстанци на релативни однос проапоптотичног *Bax* и антиапоптотичног *Bcl-2* протеина.
5. Одредити ефекат испитиваних биоактивних супстанци на локализацију цитохрома *c* и активацију каспазе-3.

Сходно досадашњим сазнањима и постављеним циљевима, радне хипотезе студије су следеће:

1. Прополиси, хризин и екстракти биљака *Ligustrum vulgare* и *Teucrium pollium* и гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*, делују цитотоксично на леукемијске ћелије, а не делују цитотоксично на здраве мононуклеарне леукоците.
2. Наведене супстанце индукују апоптозу леукемијских лимфоцита.
3. Наведене супстанце повећавају релативни однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе.



## 3. Материјал и методе

### 3.1. Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. За истраживање су се користиле две леукемијске ћелијске линије *MOLT-4* и *JVM-13*, лимфоцити изоловани из узорак крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије који се лече у Клиници за хематологију Клиничког центра „Крагујевац“, као и мононуклеарни леукоцити (МН) контролне групе здравих испитаника који су добијени из узорак крви Службе за снабдевање крвљу и крвним производима КЦ „Крагујевац“.

### 3.2. Ћелијске линије

У истраживању су коришћене две хумане леукемијске ћелијске линије и то ћелијска линија акутне лимфобластне леукемије *MOLT-4* (ATCC® CRL-1582™) и ћелијска линија Б пролимфоцитне леукемије *JVM 13* (ATCC® CRL-3003™). Обе ћелијске линије су добијене као поклон у сарадњи са доц. др Соњом Мисирлић Денчић (Медицински факултет, Универзитет у Београду, пројекат број III41025). Ћелијске линије су култивисане на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у комплетном медијуму кога чине: *RPMI-1640* са 2 mM *L*-глутамином, 100 IU пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и 10% топлотом инактивисаног феталног телећег серума (енг. *FBS, fetal bovine serum*). Стерилизација медијума вршена је филтрирањем кроз нитроцелулозне филтере са порама дијаметра 0,22 µm, а сам медијум је чуван на +4°C до извођења експеримената.

### 3.3. Популација која се испитује

У студију су били укључени одрасли испитаници оба пола, који су имали потврђену дијагнозу хроничне лимфоцитне леукемије на основу клиничких, лабораторијских и имунофенотипских параметара, који су лечени у Клиници за

хематологију КЦ „Крагујевац“ и који су дали пристанак за добровољно учешће у студији у складу са Хелсиншком декларацијом (163). Имунофенотипски параметри одређивани за дијагностиковање ХЛЛ-а су били у складу са ревидираним водичима радне групе Националног института за канцер (енг. *NCI Working Group*) (2). Контролну групу су сачињавали здрави испитаници сличне полне и старосне структуре, који нису боловали од болести или стања која су на било који начин могла да утичу на вредност испитиваних параметара.

### **3.4. Узорковање**

Испитаници експерименталне групе, којих је било 33 су у студију регрутовани из укупне популације болесника оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије која се лечила у Клиници за хематологију КЦ „Крагујевац“. Укључивање је спроведено сукцесивно, према принципу случајног избора (без претходно утврђене рандомизације) до постизања довољног броја испитаника сходно прорачуну величине студијског узорка.

На основу карактеристика испитаника експерименталне групе, контролна група здравих је селектована након лекарског прегледа, из кохорте здравих добровољних давалаца крви (истог пола и старости  $\pm 2,5$  године, за одговарајућу особу из експерименталне групе) и чинило је 18 испитаника. Узорци крви испитаника контролне групе добијени су у Служби за снабдевање крвљу и крвним производима КЦ „Крагујевац“. Укључивање здравих испитаника је такође спроведено према принципу случајног избора до дана када је постигнут укупан број испитаника, а сходно прорачуну величине студијског узорка.

У истраживање нису били укључени испитаници који су у тренутку испитивања имали позитивне биохуморалне маркере запаљенског синдрома, болести или позитивну анамнезу о коришћењу лекова или супстанци (кортикостероиди, циклоспорин А, алкохол и др.) које су могле да утичу на вредности испитиваних параметара.

Од свих испитаника је прво затражен писани информисани пристанак уз пуну обавештеност. По обезбеђеном пристанку, прикупиљени су анамнестички подаци, а након тога испитаницима је узет узорак крви. Из узорака крви испитаника експерименталне, као и испитаника контролне групе, прво су изоловани моноклеарни леукоцити по методи

*Boyum*-а (164), а затим је извршено издвајање лимфоцита од моноцита по методи *Kennedy* и *Reynolds*-а (165).

### 3.5. Изолација лимфоцита и моноклеарних леукоцита

У зависности од тога да ли се радило о пацијентима оболелим од ХЛЛ-а или о здравим испитаницима, изоловани су лимфоцити или моноклеарни леукоцити из узорака крви. Ујутру је испитаницима узимано 10 ml крви у епрувете обложене антикоагулантним средством (*Terumo*<sup>®</sup>, *Silicone coated EDTA*). Након тога је крв центрифугирана на собној температури 10 минута брзином од 400xg. Потом је са врха епрувете покупљен серум који се касније додаје медијуму у коме су ћелије ресуспендоване. Са додирног слоја плазме и ћелија, покупљен је „бели тепих“ (слој ћелија беле лозе) и пребачен у епрувете којима је већ додато 3 ml *Histopaque 1077* (*Sigma-Aldrich*). Центрифугирањем ових епрувета у трајању од 25 минута на 800xg долази до раздвајања моноклеарних од полиморфонуклеарних леукоцита и еритроцита (164). Моноклеарни леукоцити који се налазе на слоју између плазме и *Histopaque 1077* су покупљени и опрани три пута у медијуму *RPMI-1640* и ресуспендовани у комплетном медијуму кога је, у овом случају, сачињавао *RPMI-1640* са 2mM *L*-глутамином, 100 IU пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина и 10% аутологог серума. Раздвајање лимфоцита од моноклеарних леукоцита је вршено захваљујући способности моноцита да адхерирају на пластику (дно Петри шоље) претходно обложену аутологим серумом (165). Инкубација суспензије моноклеарних леукоцита на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у трајању од 1 час доводила је до адхезије моноцита за Петријеве шоље, а лимфоцити су остајали у суспензији. Потом је одређиван број лимфоцита и вршена су даља испитивања.

### 3.6. Варијабле истраживања

Примењене биоактивне супстанце су представљале независне варијабле студије (узрок), а вредности мерених параметара вијабилности и апоптозе лимфоцита су представљале зависне варијабле (исход).

Од биоактивних супстанци којима смо третирали лимфоците *in vitro*, користиле су се две врсте прополиса различитог географског порекла и састава, хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* и метанолски екстракти гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*, код којих је већ претходно регистрована антитуморска активност на хуманим туморским ћелијским линијама (91, 97, 125, 130, 149, 152, 153).

Коришћени прополиси су различитог географског порекла и имају другачији однос активних супстанци. Добијени су у изворном, природном облику. У експериментима су се користили растворени у диметил-сулфоксиду (енг. *DMSO, dimethyl sulfoxide*) и разблажени у медијуму при чему финална концентрација диметил-сулфоксида није прелазила 0,5% v/v. Хризин је добијен као поклон од стране проф. др Ненада Вуковића (Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу). Хризин је растваран у диметил-сулфоксиду и разблаживан у медијуму. Метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и листа биљке *Teucrium pollium* су добијени на следећи начин. Након скупљања, листови су осушени, а плодови су коришћени свежи, одмах након брања. Листови наведених биљака, као и плод биљке *Ligustrum vulgare* су пребачени у флашице са тамним стаклом, а након тога је додато 200 ml метанола. Након 24 часа, екстракти су филтрирани кроз филтер папир *Whatman No. 1*. Супернатанти су просушени у вакууму на 40°C ротирајућим испаривачем. Добијени екстракти су пребачени у стерилне епрувете и чувани у фрижидеру на 4°C. Непосредно пре експерименталних екстракти су растворени у диметил-сулфоксиду и разблажени у медијуму. Метанолски екстракти гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* су добијени на идентичан начин коришћењем мицелијума ових гљива.

У свим узорцима који су били укључени у студију одређивана је вијабилност ћелија 24 и 48 часова након третмана различитим концентрацијама испитиваних супстанци у односу на нетретмане ћелије применом *MTT* теста (166), као и мерењем активности ослобођене лактат-дехидрогеназе, применом *LDH* теста (167). У даља истраживања су биле укључене само оне биоактивне супстанце које нису утицале на вијабилност мононуклеара здравих особа, а у испитиваним концентрацијама су деловале цитотоксично на ћелије леукемијских ћелијских линија *MOLT-4* и *JVM-13* и лимфоците изоловане из крви пацијената оболелих од ХЛЛ-а. Релативни однос некротичне и

апоптотске смрти ХЛЛ лимфоцита изазване испитиваним супстанцама испитан је методом проточне цитометрије бојењем *Annexin*-ом *V* и 7-аминоактиномицином *D*. Имуноцитохемијским бојењем специфичним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активну каспазу-3 је утврђена њихова ћелијска локализација у третираним и нетретираним леукемијским лимфоцитима. Такође, проточном цитометријом и бојењем специфичним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активну каспазу-3 смо одредили просечну количину протеина *Bax* и *Bcl-2*, односно проценат ћелија код којих је цитохром *c* транслоциран из митохондрија у цитоплазму и каспаза-3 активирана, у групи третираних у односу на нетретиране леукемијске лимфоците.

### 3.7. *MTT* тест

*MTT* тестом се одређује вијабилност или пролиферација ћелија (166). Коришћењем *MTT* теста извршена је квантификација цитотоксичног ефекта биоактивних супстанци на испитиваним ћелијама *in vitro*.

Принцип: *MTT* (3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид) је жуто обојена тетразолијумова со која се у реакцији са ензимом живих ћелија, *NAD(P)H* зависном оксидоредуктазом, редукује до љубичасто обојеног формаза. Интензитет боје је мерен на *ELISA* читачу (*Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments*) читавањем на таласној дужини од 595 nm.

Тест се изводи у микротитар плочи са 96 бунара. Сваки узорак је испитиван у трипликату. Приликом извођења *MTT* теста на лимфоцитима ХЛЛ-а или мононуклеарним леукоцитима здравих испитаника, тест је изведен на бар 6 узорака крви различитих пацијената у складу са проценом величине студијског узорка и снаге студије од 95%.

Концентрације хризина у микротитар плочама су биле у опсегу од 1,25  $\mu\text{M}$  до 40  $\mu\text{M}$  (1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  и 40  $\mu\text{M}$ ). Концентрације осталих тестираних биоактивних супстанци су биле у опсегу од 10  $\mu\text{g/ml}$  до 500  $\mu\text{g/ml}$  (10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ ). Све супстанце су прво растворене у диметилсулфоксиду (у концентрацији која је била бар 400 пута већа од највеће испитиване концентрације биоактивне супстанце) тако да финална концентрација *DMSO*-а у медијуму никада није била већа од 0.5% (v/v).

Вијабилност ћелија је одређивана након 24 и 48 часова инкубације са тестираним супстанцама или само у комплетном медијуму. Укупна запремина суспензије ћелија и тестиране биоактивне супстанце у сваком бунару је била 100  $\mu$ l.

Радни раствор *MTT*-а се добија из штока *MTT*-а (5 mg/ml *PBS*-а (енг. *Phosphate Buffer Saline*, фосфатни пуфер)) разблаживањем са медијумом у односу 1:10.

Након постављања ћелија у микротитар плочу и инкубације од 24 или 48 часова, у сваки бунар је додавано још 100  $\mu$ l радног раствора *MTT*-а и ћелије су инкубиране још 4 часа на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>. Потом су плоче центрифугиране 5 минута на 400xg, супернатант је пажљиво извучен, а у сваки бунарчић је додато 150  $\mu$ l чистог *DMSO*-а. Након тога плоча је постављена на шејкер 30 минута, а онда је читавана апсорбанца на 595nm. Очитане вредности апсорбанце су поређене са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија и на основу тога је израчунато смањење (или повећење) вијабилности ћелија услед дејства биоактивних супстанци. Процент цитотоксичних ћелија израчунат је по формули: Цитотоксичност (%) = [1 - (експериментална група (*OD*)) / (контролна група (*OD*)) x 100].

### **3.8. Тест за одређивање активности лактат-дехидрогеназе (*LDH* тест)**

*LDH* тест је тест цитотоксичности. Уколико се активност *LDH* мери у супернатанту ћелија након 30 минута до 4 часа од тренутка када се дода испитивана супстанца, *LDH* тест показује степен ткивне некрозе. Ако се дужина третмана испитиваном супстанцом повећа на 24 или 48 часова, детектује се и смрт оних ћелија које су ушле у процес апоптозе. Испитивањем промене активности *LDH* у супернатанту третираних у односу на нетретираних ћелија након 48 часова култивације, биће детектоване концентрације у којима биоактивне супстанце делују цитотоксично на ћелије без обзира на доминантан тип ћелијске смрти који испитиване супстанце индукују.

Након постављања ћелија у микротитар плочу на исти начин као код претходног теста, плоча се инкубира 48 часова на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>. Након инкубације, плоча се центрифугира 5 минута на 400xg, а супернатант се из сваког бунара пребацује у нову микротитар плочу (167).

Мерење активности лактат-деhidрогеназе (*LDH*) из супернатанта лимфоцита 48 часова након третирања испитиваним супстанцама, вршено је на анализатору *Olympus AU400*. Принцип методе заснива се на чињеници да ензим *LDH* катализује редукцију пирувата у лактат при неутралном рН. Ова реакција је куплована са оксидацијом *NADH* у *NAD<sup>+</sup>*. Смањење количине *NADH* је сразмерно смањењу апсорбанце која је мерена на 340 nm и директно је пропорционална ензимској активности у узорку. Измерене вредности ензимске активности су поређене са активношћу лактат-деhidрогеназе нетретираних ћелија и на основу тога је израчунато повећање (или смањење) активности *LDH* услед дејства биоактивних супстанци.

### **3.9. ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности**

Коришћењем *ANNEXIN V-FITC* теста апоптотичности испитан је ефекат биоактивних супстанци на апоптозу леукемијских лимфоцита. Помоћу сета *Annexin V-FITC/7-AAD* (енг. *Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/7-amino-actinomycin D (7-AAD) Apoptosis Kit, BD Biosciences*) одређен је проценат апоптотичних ћелија након 24 и 48 часова инкубације (168).

У раној фази апоптозе интегритет ћелијске мембране је очуван, али се губи асиметрија мембранских фосфолипида. Наиме, фосфатидил-серин је негативно наелектрисан фосфолипид који се уобичајено налази са унутрашње стране плазма мембране и који у раној фази апоптозе бива изложен на спољашњу страну ћелијске мембране. Annexin V је протеин који има способност да се везује за калцијум и фосфолипиде и који се везује за фосфатидил-серин. У касној фази апоптозе и у некрози, долази до губитка интегритета ћелијске мембране што омогућује вијабилним бојама, као што су *FITC* (флуоресцеин изотиоцијанат) и *7-AAD* (7-амино-актиномицин Д), да се вежу за молекуле ДНК. Комплет реагенаса који је коришћен у нашим експериментима садржи *7-AAD* који се везује директно за молекуле ДНК. Стога се претпоставља да су *Annexin V (-)/7-AAD (-)* ћелије вијабилне, *Annexin V (+)/7-AAD (-)* ћелије у раној фази апоптозе, *Annexin V (+)/7-AAD (+)* ћелије у касној фази апоптозе а да су некротичне ћелије *Annexin V (-)/7-AAD (+)*.

Након третмана биоактивним супстанцама, ћелије су опране у *PBS*-у и ресуспендоване у епруветама са ледено хладним везујућим пуфером (енг. *binding buffer*) до финалне концентрације ћелија од  $1 \times 10^6$ /ml. Након тога, у 100  $\mu$ l суспензије ћелија додато је 10  $\mu$ l *Annexin-V-FITC*-а и 20  $\mu$ l *7-AAD*. Потом су ћелије инкубиране 15 минута у мраку. Затим је садржај епрувета ресуспендован у 400  $\mu$ l везујућег пуфера и анализиран на проточном цитометру (*The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter*) до 20000 догађаја на популацији лимфоцита. Проенти ране и касне апоптозе и некрозе лимфоцита су одређени коришћењем софтвера *CXP Cytometer* и *Flowing software v2.5*.

### **3.10. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активну каспазу-3**

Да бисмо објаснили механизам настанка апоптозе, анализирано је присуство проапоптотичног протеина *Bax*, антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе-3 у лимфоцитима који су третирани биоактивним супстанцама након 12, 24 и 48 часова инкубације (169-171).

Ћелије су опране три пута ледено хладним *PBS*-ом и потом ресуспендоване у концентрацији  $2 \times 10^5$ /100  $\mu$ l, фиксиране и пермеабилсане (*Fixation and Permeabilization Kit, eBioscience*). Након тога следи инкубација од 20 минута раствором који садржи 0,2 М глицина, 20  $\mu$ l козјег серума и 30  $\mu$ l *PBS*-а да би се блокирало неспецифично везивање антитела. Затим се ћелије перу 3 пута у *PBS*-у додавањем 4 ml *PBS*-а, центрифугирањем 5 минута на 400xg и одливањем супернатанта као и у претходним прањима.

Потом се ћелије боје на четири различита начина. Пошто је антитело за *Bcl-2* примарно антитело већ обележено флуорохромом (*FITC*), пермеабилсане ћелије су инкубиране 15 минута на собној температури са антителом за *Bcl-2* у разблажењу 1:800 (*Bcl-2 fluorescein isothiocyanate primary antibody, mhbcl01, Life technologies*). Преостале три групе ћелија су инкубиране 30 минута на собној температури са примарним антителима за *Bax* (*N20, sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc*), цитохром *c* (*G7421, Promega*) и активну каспазу-3 (*#9661, Cell signaling Technology*). Затим су ћелије опране *PBS*-ом и инкубиране одговарајућим секундарним антителима 30 минута у мраку на собној температури. Коришћена су секундарна антитела у разблажењу од 1:2000 и то *Alexa 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (A-11001, Life Technologies)* за цитохром *c* и *goat to rabbit IgG FITC*



(Ab6717-1, Abcam) за *Bax* и каспазу-3 које је добијено као поклон од доц. др Ивана Јовановића (Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу). Све четири групе ћелија су потом опране и ресуспендоване у *PBS*-у и анализирание флуоресцентним микроскопом и на проточном цитометру.

### 3.11. Флуоресцентна микроскопија

Флуоресцентном микроскопијом је потврђено и локализовано присуство протеина *Bax*, *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе-3 у третираним и нетретираним леукемијским лимфоцитима.

Ћелијама припремљеним на претходно описан начин додато је по 1,5 ml *PBS*-а, а затим су центрифугиране 15 минута на 70xg (500 обртаја у минути). Пажљиво је аутоматском пипетом уклоњена течност из епрувета док није остало 20-ак  $\mu$ l суспензије ћелија. Након врло кратког вортексовања по 5  $\mu$ l суспензије лимфоцита је пребачено на предметна стакла, а потом су тако направљени препарати посматрани и фотографисани флуоресцентним микроскопом на увељичању 1000x (*Olympus BX51 са C5050Z*).

### 3.12. Евалуација проточном цитометријом

Проточном цитометријом су квантификовани протеини *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активна каспаза-3 у третираним и нетретираним леукемијским лимфоцитима.

Коришћењем проточног цитометра (*The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter*) до 20000 догађаја на популацији лимфоцита је мерена флуоресценција испитиваних протеина. Интензитет флуоресценције је стандардизован коришћењем антитела за негативну изотипску контролу. Просечан ниво флуоресценције испитиваних ћелија (енг. *MFI, mean fluorescence intensity*) за *Bax* и *Bcl-2* је израчунат као однос флуоресценције одговарајућег протеина (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле. Квантификација цитохрома *c* и активне каспазе-3 у третираним и нетретираним леукемијским лимфоцитима је извршена анализом процента ћелија које испољавају флуоресценцију.

### 3.13. Снага студије и величина узорка

Величина група је одређена на основу следећих почетних параметара: снага студије од 95%, вероватноће грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0,05 за двосмерно тестирање хипотезе. Укупна величина узорка (*total sample size*=54) израчуната је на основу програма *G power* и коришћењем теста корелације (*Correlation: point biserial model*). Вредност коефицијента детерминације ( $\rho^2$ ) је 0,2.

### 3.14. Статистичка обрада података

Пре статистичке обраде података испитана је правилност расподеле добијених вредности. Ако је број вредности био мањи од 50 за проверу се користио *Shapiro-Wilk* тест, а за узорак већи од 50 користио се *Kolmogorov-Smirnov* тест. На основу добијене вредности  $p$  одређиван је тест који се користио за статистичку анализу (параметарски Т–тест за  $p < 0,05$  или непараметарски Mann-Whitney-ев тест ако је  $p > 0,05$ ). За испитивање утицаја концентрације биоактивне супстанце на исход, користио се тест регресије. Вредност добијених података се сматрала статистички значајном уколико је  $p < 0,05$ . За статистичку обраду података коришћен је програмски пакет *SPSS 20*. Резултати експеримената су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Добијени резултати су приказани табеларно и графички.

## 4. Резултати

У циљу испитивања ефеката биоактивних супстанци, прво је испитивано дејство две врсте прополиса различитог географског порекла и састава, хризина, метанолских екстраката листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, листа биљке *Teucrium pollium* и метанолских екстраката гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на вијабилност леукемијских лимфоцита.

### 4.1. Биоактивне супстанце мењају вијабилност леукемијских ћелија

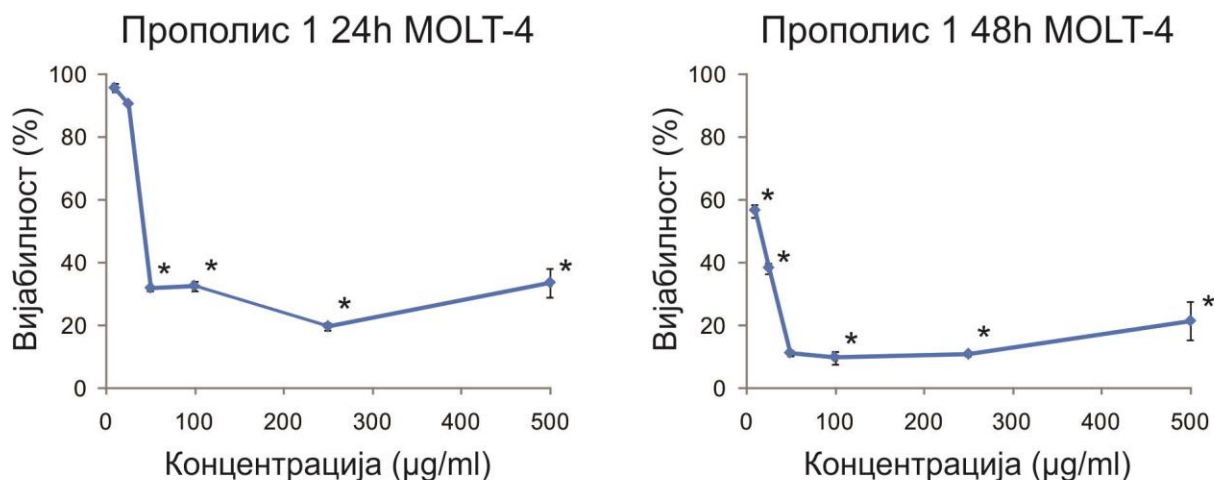
Утицај свих биоактивних супстанци одређиван је после култивације ћелија у присуству испитиваних супстанци у трајању од 24 и 48 часова, применом *MTT* теста вијабилности ћелија и *LDH* теста.

#### 4.1.1. Утицај прополиса 1 на вијабилност леукемијских лимфоцита

Истраживање је показало да примена прополиса 1 статистички значајно смањује вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија већ након култивације од 24 часа у концентрацији од 50 µg/ml на  $31,95 \pm 0,85\%$  и то смањење вијабилности је статистички значајно и у осталим испитиваним концентрацијама прополиса 1 у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ).

Након 48 часова инкубације, статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија је уочљиво одмах након третмана најмањом испитиваном концентрацијом од 10 µg/ml, при којој је вијабилност смањена на  $56,26 \pm 2,18\%$  у односу на вијабилност нетретираних лимфоцита ( $p < 0,05$ ). Такође, и концентрације прополиса 1 од 25 µg/ml до 500 µg/ml статистички значајно смањују вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија ( $p < 0,05$ ). При концентрацијама прополиса 1 од 500 µg/ml уочен је благи пораст

вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на вијабилност при концентрацији од 250  $\mu\text{g/ml}$ , али та разлика није статистички значајна ( $p>0,05$ ) (Графикон 1.,  $*p<0,05$ ).

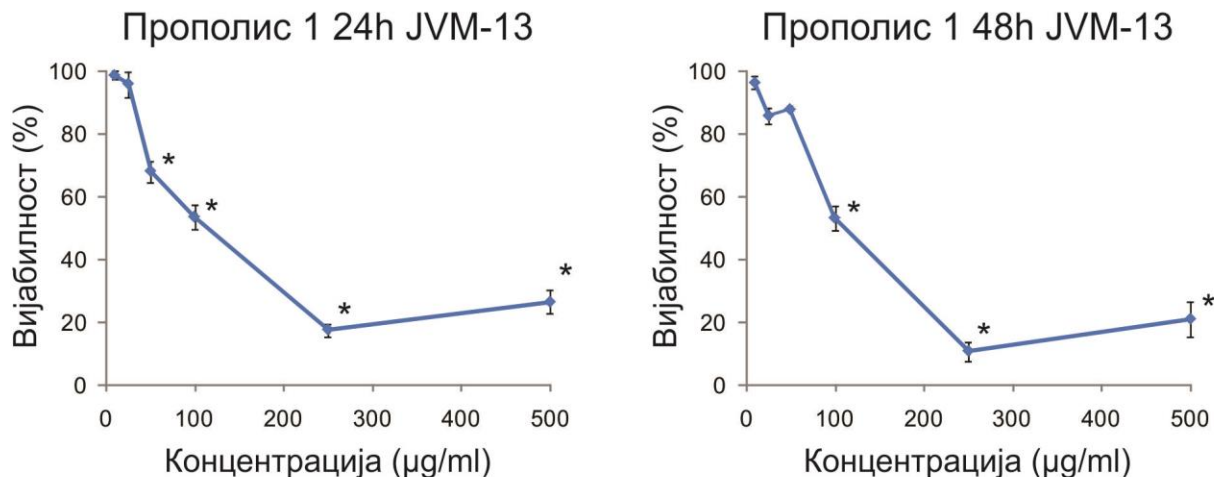


**Графикон 1.** Утицај прополиса 1 на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

Култивацијом *JVM-13* ћелија у присуству растућих концентрација прополиса 1, такође долази до смањења вијабилности ћелија у односу на нетретирание ћелије. Након 24 часа инкубације долази до статистички значајног смањења вијабилности *JVM-13* ћелија при концентрацији прополиса 1 од 50  $\mu\text{g/ml}$  на  $68,06 \pm 3,78\%$  ( $p<0,05$ ). Ипак, ово смањење вијабилности није дозно зависно, јер при вишим концентрацијама прополиса 1 не долази до даљег смањења вијабилности у односу на концентрацију прополиса 1 од 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $p>0,05$ ). Поред тога, прополис 1 и при концентрацијама од 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  статистички значајно смањује вијабилност *JVM-13* ћелија ( $p<0,05$ ).

Након инкубације *JVM-13* ћелија у трајању од 48 часова, статистички значајан пад вијабилности је уочљив тек при концентрацији прополиса 1 од 100  $\mu\text{g/ml}$ , када вијабилност третираних ћелија износи  $53,29 \pm 3,86\%$  у односу на нетретирание ћелије ( $p<0,05$ ). И код овог типа ћелија постоји благи тренд повећања вијабилности при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  у односу на концентрацију од 250  $\mu\text{g/ml}$ .

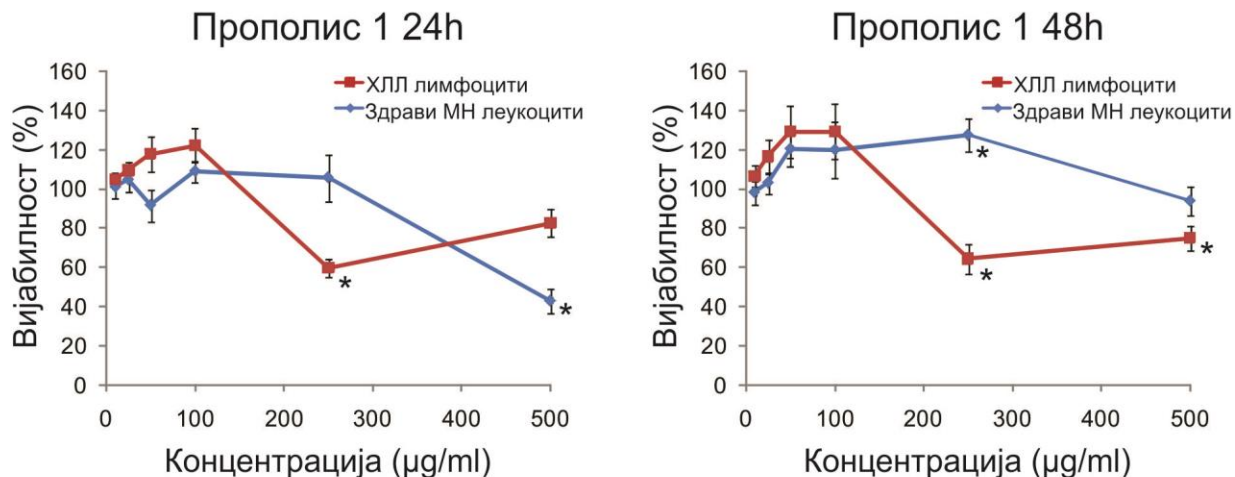
Прополис 1 је најснажније деловао на *JVM-13* ћелије при концентрацији од 250  $\mu\text{g/ml}$  где је након 24 часа смањивао вијабилност *JVM-13* ћелија на  $17,48 \pm 2,16\%$ , а након 48 часова култивације на  $10,69 \pm 3,14\%$  у односу на нетретирание *JVM-13* ћелије (Графикон 2.).



**Графикон 2.** Утицај прополиса 1 на вијабилност *JVM-13* ћелија.

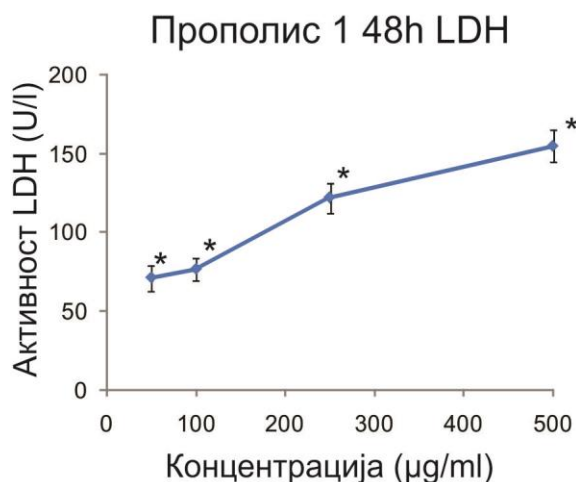
Након 24 часа инкубације лимфоцита изолованих из крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије утврђено је да само при вредностима прополиса 1 од 250 µg/ml долази до статистички значајног смањења вијабилности на  $59,77 \pm 4,61\%$  у односу на нетретиране лимфоците ( $p < 0,05$ ). Након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита у присуству прополиса 1 при концентрацијама од 250 и 500 µg/ml долази до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита на  $64,38 \pm 7,84\%$  и  $74,96 \pm 6,24\%$ , ( $p < 0,05$ ).

Након 24 часа инкубације мононуклеарних леукоцита (МН) изолованих из крви здравих испитаника у присуству прополиса 1 дошло је до промене вијабилности ових ћелија у односу на нетретиране мононуклеарне леукоците. Након 24 часа инкубације мононуклеарних леукоцита при концентрацији прополиса 1 од 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног смањења вијабилности на  $42,92 \pm 6,41\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита при концентрацијама прополиса 1 нижим од 500 µg/ml ( $p > 0,05$ ). Након 48 часова инкубације мононуклеарних леукоцита у присуству растућих концентрација прополиса 1, дошло је до статистички значајног пораста вијабилности при концентрацији од 250 µg/ml на  $127,52 \pm 8,51\%$ , ( $p < 0,05$ ) (Графикон 3.).



**Графикон 3.** Утицај прополиса 1 на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Анализом активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту ХЛЛ лимфоцита након 48 часова инкубације у присуству растућих концентрација прополиса 1, добили смо повећање активности *LDH* у односу на нетретирани лимфоците које је било дозно зависно. Највећи пораст активности *LDH* био је при концентрацији прополиса 1 од 500 µg/ml и износио је  $155 \pm 10.33$  U/l (Графикон 4.).

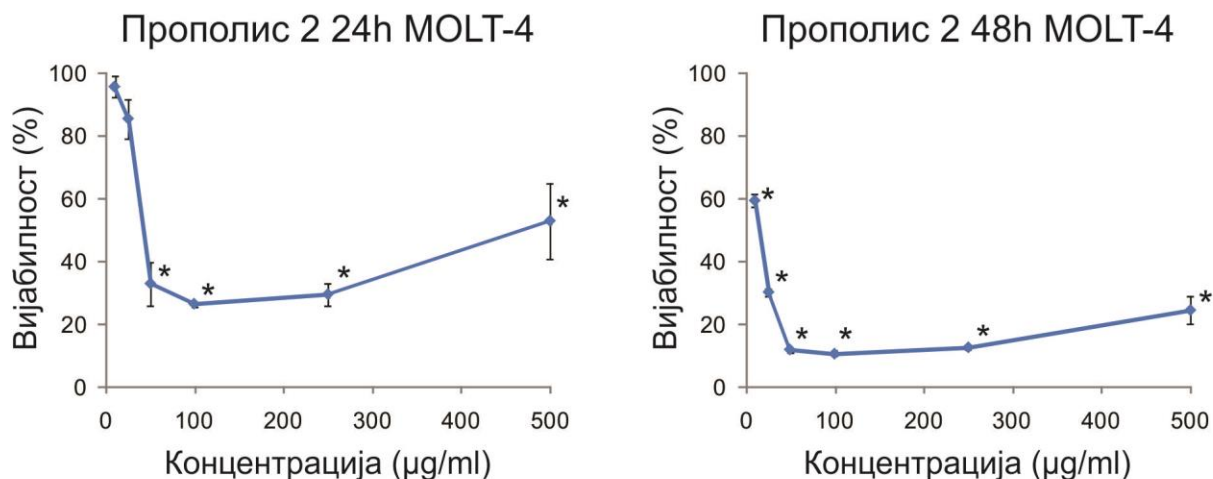


**Графикон 4.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним прополисом 1 у односу на нетретирани ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

#### 4.1.2. Утицај прополиса 2 на вијабилност леукемијских лимфоцита

Следећа биоактивна супстанца чији смо ефекат испитивали је био прополис 2, врста прополиса другачијег географског порекла у односу на прополис 1 и последично другачијег састава.

Примена прополиса 2 статистички значајно смањује вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија након култивације од 24 часа у концентрацији од 50  $\mu\text{g/ml}$  на  $32,92 \pm 6,91\%$  ( $p < 0,05$ ). Након 48 часова инкубације, уочљиво је статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија одмах након третмана најнижом испитиваном концентрацијом од 10  $\mu\text{g/ml}$ , при којој је вијабилност смањена на  $59,56 \pm 2,12\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ). Највеће смањење вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија уочава се при концентрацији прополиса 2 од 100  $\mu\text{g/ml}$  и износи  $26,33 \pm 0,74\%$  након 24 часа инкубације и  $10,55 \pm 1,87\%$  након 48 часова инкубације. При концентрацијама прополиса 2 од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , након 24 и 48 часова инкубације *MOLT-4* леукемијских ћелија, уочава се благо повећање вијабилности у односу на концентрације од 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$ , али то повећање није статистички значајно ( $p > 0,05$ ) (Графикон 5.).



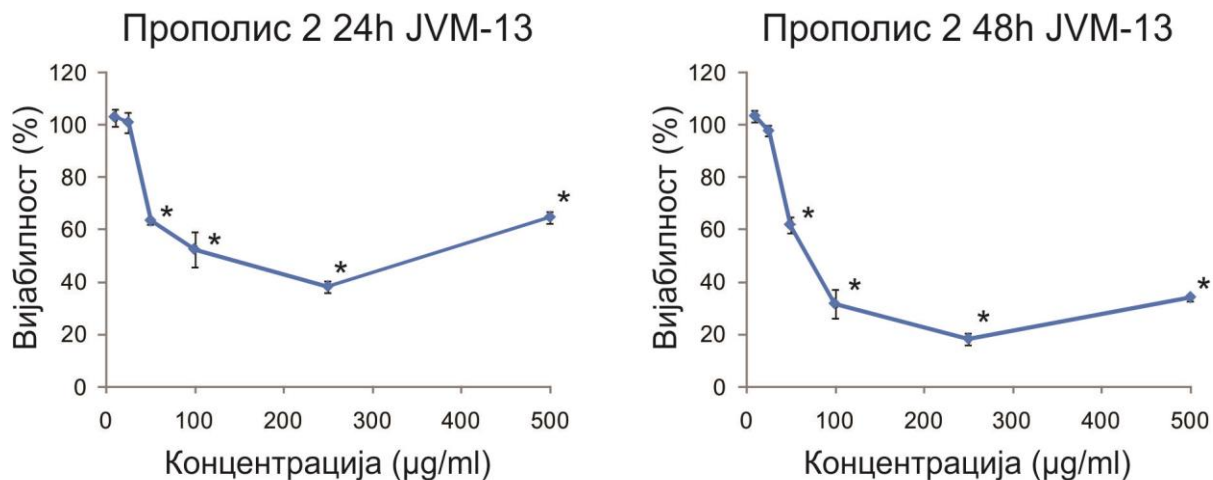
Графикон 5. Утицај прополиса 2 на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

У присуству растућих концентрација прополиса 2, такође долази до смањења вијабилности *JVM-13* леукемијских ћелија у односу на нетретиране ћелије. Након

инкубације *JVM-13* ћелија у трајању од 24 часа, долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија при концентрацији прополиса 2 од 50  $\mu\text{g/ml}$  на  $63,38 \pm 1,67\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). При вишим концентрацијама прополиса 2 долази до даљег смањења вијабилности у односу на концентрацију прополиса 2 од 50  $\mu\text{g/ml}$ , тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија при концентрацији прополиса 2 од 250  $\mu\text{g/ml}$  и она износи  $38,32 \pm 2,32\%$ . При концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  прополиса 2 долази до статистички значајног повећања вијабилности *JVM-13* ћелија на  $64,89 \pm 2,31\%$  у односу на концентрацију од 250  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ).

Након инкубације *JVM-13* ћелија у трајању од 48 часова, до статистички значајног пада вијабилности такође долази при концентрацији прополиса 2 од 50  $\mu\text{g/ml}$ , када вијабилност третираних ћелија износи  $61,93 \pm 2,99\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). Даље повећање концентрације прополиса 2 доводи до још већег пада вијабилности *JVM-13* ћелија све до концентрације од 250  $\mu\text{g/ml}$  када износи  $18,22 \pm 2,13\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија. При концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  прополиса 2 долази до статистички значајног повећања вијабилности *JVM-13* ћелија на  $34,07 \pm 1,26\%$  у односу на концентрацију од 250  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ).

Ни након 24 часа ни након 48 часова култивације *JVM-13* ћелија у присуству прополиса 2 у концентрацији од 10  $\mu\text{g/ml}$  и 25  $\mu\text{g/ml}$  не долази до статистички значајног смањења вијабилности *JVM-13* ћелија ( $p > 0,05$ ) (Графикон 6.).



**Графикон 6.** Утицај прополиса 2 на вијабилност *JVM-13* ћелија.

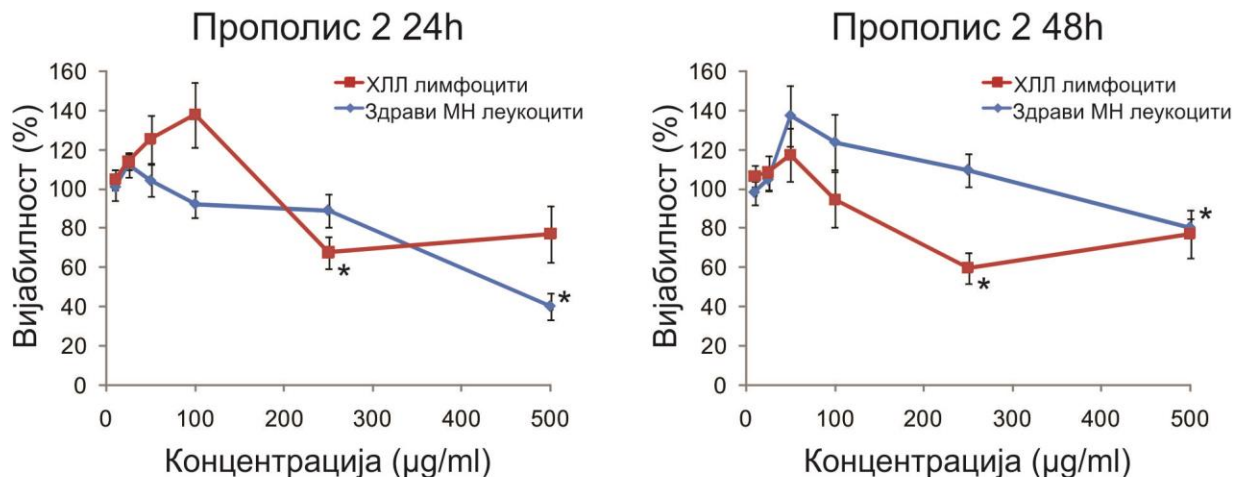


Након 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству прополиса 2 при концентрацији од 250  $\mu\text{g/ml}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита на  $67,65 \pm 8,11\%$  у односу на нетретирание ХЛЛ лимфоците ( $p < 0,05$ ). При нижим концентрацијама прополиса 2 од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , као ни при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ).

Након 48 часова култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству прополиса 2, такође долази до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита на  $59,71 \pm 7,63\%$  при концентрацији од 250  $\mu\text{g/ml}$  у односу на нетретирание ХЛЛ лимфоците ( $p < 0,05$ ). Као и после 24 часа инкубације, ни овде не долази до промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита при концентрацијама прополиса 2 од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , као ни при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $p > 0,05$ ).

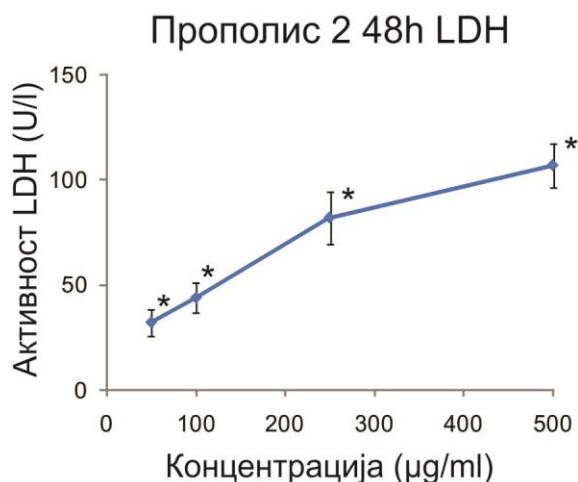
Ефекат прополиса 2 након 24 часа инкубације здравих мононуклеарних леукоцита је нешто другачији у односу на леукемијске лимфоците. Приликом култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 часа, ниске концентрације прополиса 2 од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  и 250  $\mu\text{g/ml}$  не мењају статистички значајно вијабилност мононуклеарних леукоцита ( $p > 0,05$ ). С друге стране, даљим повећањем концентрације прополиса 2 долази до статистички значајног смањења вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита, тако да при концентрацији прополиса 2 од 500  $\mu\text{g/ml}$  њихова вијабилност износи  $40,05 \pm 6,91\%$  у односу на нетретирание мононуклеарне леукоците ( $p < 0,05$ ).

Након 48 часова инкубације здравих мононуклеарних леукоцита у присуству 500  $\mu\text{g/ml}$  прополиса 2, долази до статистички значајног смањења вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита на  $80,47 \pm 4,34\%$  у односу на нетретирание ћелије. При осталим концентрацијама прополиса 2 не долази до статистички значајне промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита ( $p > 0,05$ ) (Графикон 7.).



**Графикон 7.** Утицај прополиса 2 на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Анализом активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту ХЛЛ лимфоцита након 48 часова инкубације у присуству растућих концентрација прополиса 2, дошло је до повећања активности *LDH* у односу на нетретирани лимфоците које је било дозно зависно. Највеће повећање активности *LDH* било је при концентрацији прополиса 2 од 500 µg/ml и износило је  $107 \pm 10,33$  U/l (Графикон 8.).

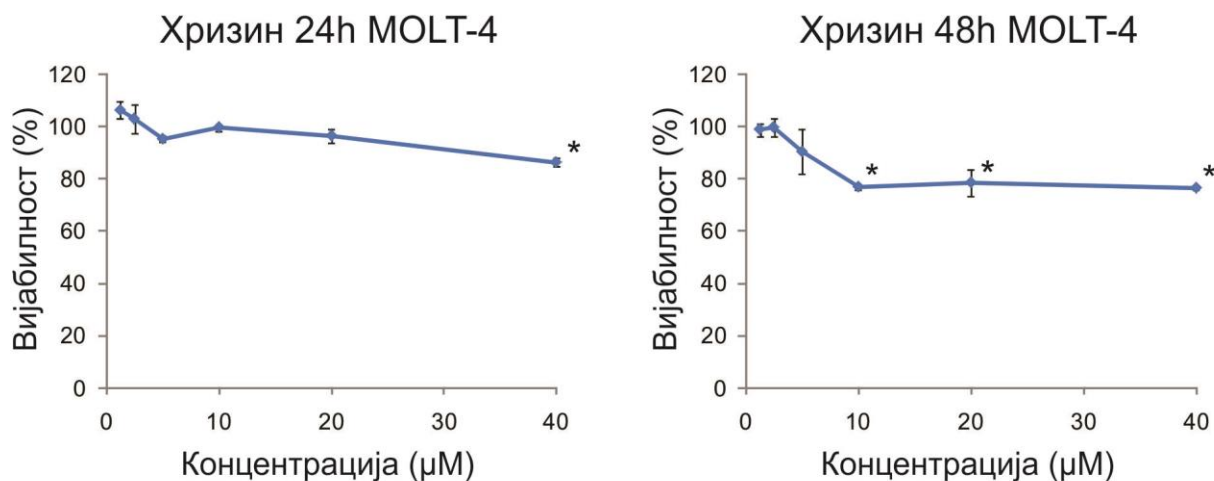


**Графикон 8.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним прополисом 2 у односу на нетретирани ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

### 4.1.3. Утицај хризина на вијабилност леукемијских лимфоцита

Ефекат хризина на вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија испитиван је након 24 и 48 часова инкубације у односу на нетретиране ћелије. Након 24 часа култивације *MOLT-4* леукемијских ћелија, није дошло до статистички значајног смањења вијабилности при концентрацијама хризина мањим од 40  $\mu\text{M}$  ( $p>0,05$ ). Тек при концентрацији хризина од 40  $\mu\text{M}$  је дошло до релативно малог, али статистички значајног смањења вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија на  $86,54 \pm 1,67\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p<0,05$ ).

Након 48 часова култивације *MOLT-4* леукемијских ћелија у присуству хризина концентрације 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  и 5  $\mu\text{M}$  није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на нетретиране лимфоците ( $p>0,05$ ). Међутим, до статистички значајног смањења вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија дошло је култивацијом у присуству хризина у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  и 40  $\mu\text{M}$  на  $76,92 \pm 1,07\%$ ,  $78,55 \pm 5,05\%$  и  $76,48 \pm 0,47\%$  у односу на нетретиране *MOLT-4* леукемијске ћелије ( $p<0,05$ ) (Графикон 9.).

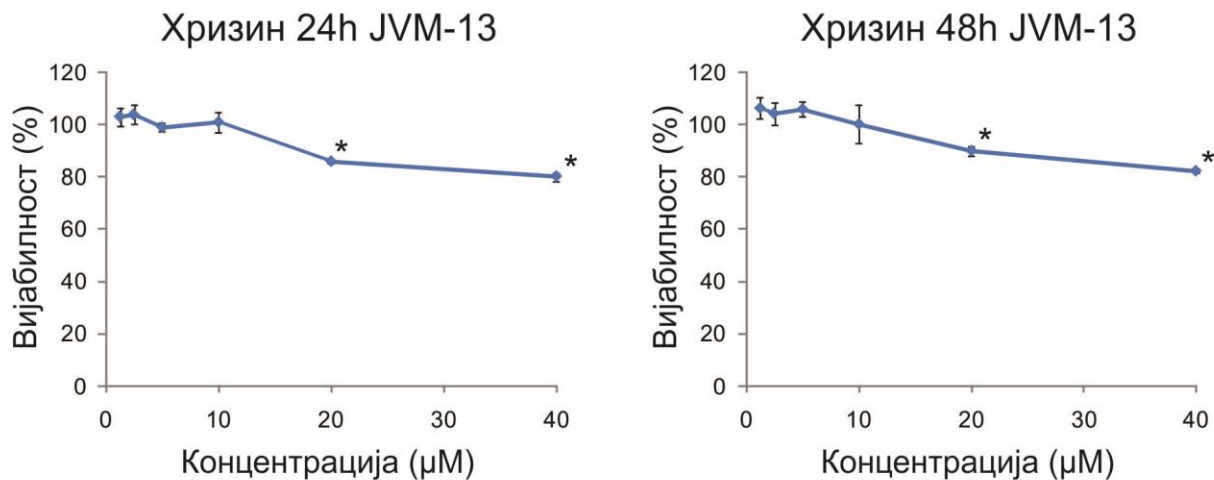


Графикон 9. Утицај хризина на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

Хризин је такође смањивао вијабилност *JVM-13* леукемијских ћелија после култивације у трајању од 24 и 48 часова при концентрацијама већим од 10  $\mu\text{M}$  у односу на нетретиране ћелије. Након 24 часа инкубације у присуству хризина концентрације 20  $\mu\text{M}$

и 40  $\mu\text{M}$ , дошло је до статистички значајног смањења вијабилности *JVM-13* ћелија на  $85,98 \pm 0,45\%$  и  $80,08 \pm 1,54\%$  у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ ).

Поред тога, при истим концентрацијама од 20  $\mu\text{M}$  и 40  $\mu\text{M}$ , хризин је довео до истог ефекта и након култивације од 48 часова *JVM-13* леукемијских ћелија и тако изазвао статистички значајно смањење вијабилности ових ћелија на  $90,06 \pm 1,95\%$  и  $82,37 \pm 0,78\%$  у односу на контролну групу нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ). Није постојала статистички значајна разлика услед дејства хризина при нижим концентрацијама од 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  између вредности вијабилности третираних и нетретираних *JVM-13* ћелија након инкубације у трајању од 24 и 48 часова ( $p > 0,05$ ) (Графикон 10.).



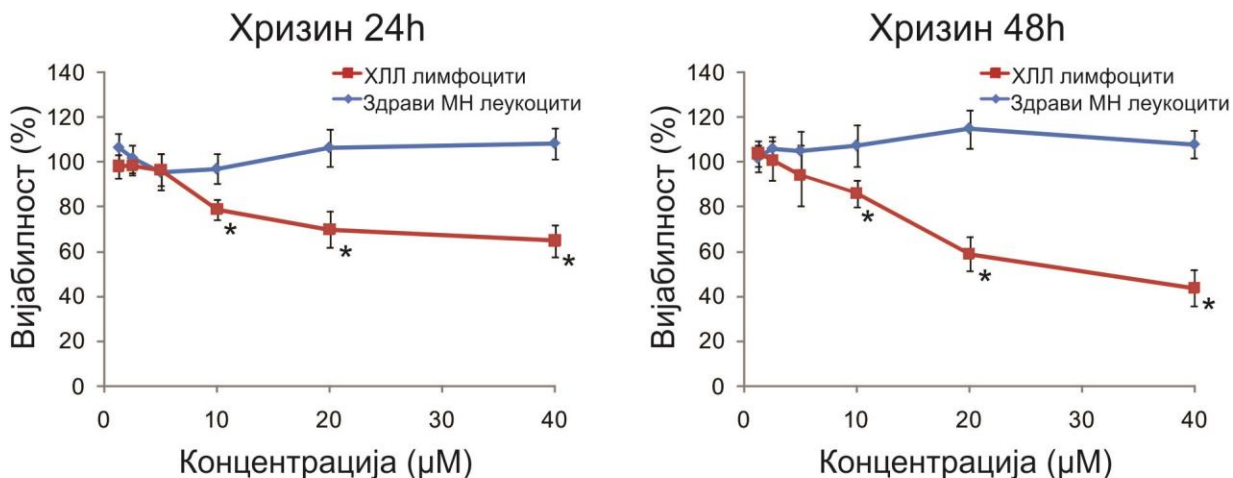
**Графикон 10.** Утицај хризина на вијабилност *JVM-13* ћелија.

Након испитивања утицаја хризина на вијабилност две врсте леукемијских ћелијских линија, испитан је и утицај хризина на вијабилност лимфоцита изолованих из крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије. Након 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству хризина концентрације од 10  $\mu\text{M}$  и већим, долазило је до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретирание ХЛЛ лимфоците ( $p < 0,05$ ). То смањење вијабилности је било дозно зависно, тако да је при концентрацији хризина од 10  $\mu\text{M}$ , дошло до смањења вијабилности на  $78,83 \pm 4,35\%$ , а при концентрацији од 40  $\mu\text{M}$ , вијабилност ХЛЛ лимфоцита је износила  $64,91 \pm 7,3\%$  у односу на нетретирание ХЛЛ лимфоците. Није било статистички значајне разлике између

вредности вијабилности ХЛЛ лимфоцита који су култивисани са хризином концентрације 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  и 5  $\mu\text{M}$  и вредности вијабилности нетретираних ХЛЛ лимфоцита након 24 часа ( $p>0,05$ ).

Поред тога, после 48 часова култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству хризина концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  и 40  $\mu\text{M}$  је дошло до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретираних хелије ( $p<0,05$ ) које је било дозно зависно. При концентрацији хризина од 10  $\mu\text{M}$ , вијабилност ХЛЛ лимфоцита је смањена на  $86,04 \pm 6,01\%$ , а при концентрацији од 40  $\mu\text{M}$ , вијабилност ХЛЛ лимфоцита је износила  $43,91 \pm 8,11\%$  у односу на нетретираних ХЛЛ лимфоците. Није било статистички значајне разлике услед дејства хризина у концентрацијама од 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  и 5  $\mu\text{M}$  између вредности вијабилности третираних ХЛЛ лимфоцита и нетретираних ХЛЛ лимфоцита након култивације од 48 часова ( $p>0,05$ ).

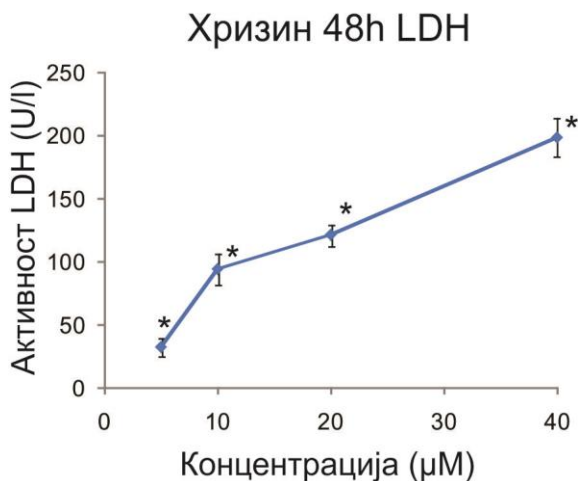
Ни након 24 часа, ни након 48 часова култивације здравих мононуклеарних леукоцита у присуству испитиваних концентрација хризина од 1,25  $\mu\text{M}$  до 40  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на нетретираних мононуклеарних леукоците ( $p>0,05$ ) (Графикон 11.).



**Графикон 11.** Утицај хризина на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Након 48 часовне култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству растућих концентрација хризина, дошло је до дозно зависног повећања активности лактат-

дехидрогеназе у супернатанту третираних ћелија у односу на нетретиране лимфоците. Највеће повећање активности *LDH* било је при концентрацији хризина од 40  $\mu\text{M}$  и износило је  $199 \pm 15$  U/l, док је при концентрацији хризина од 5  $\mu\text{M}$  дошло до повећања активности *LDH* од  $32 \pm 7,13$  U/l у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците (Графикон 12.).



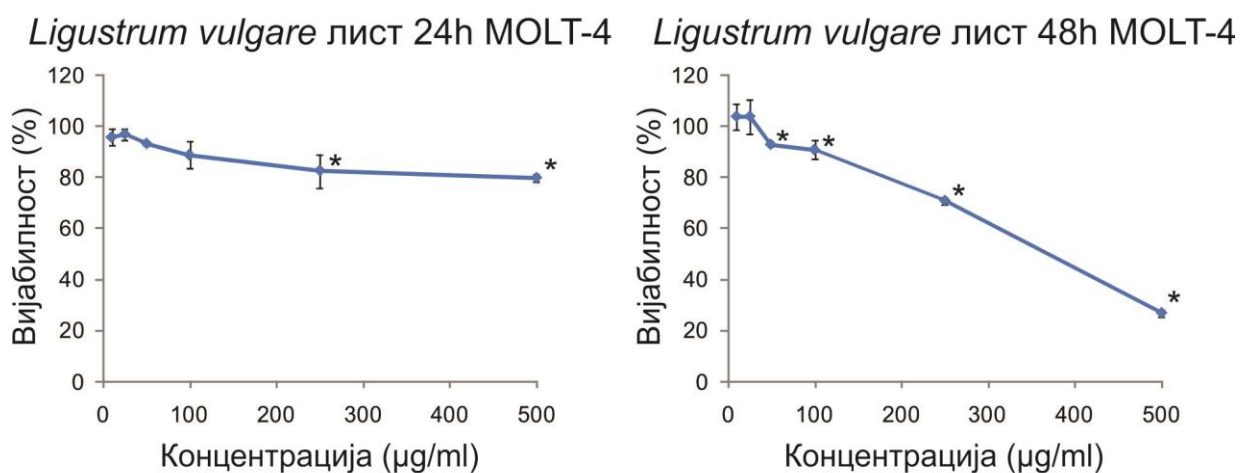
**Графикон 12.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним хризином у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

#### 4.1.4. Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност леукемијских лимфоцита

Ефекат метанолских екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* је испитиван након 24 и 48 часова култивације *MOLT-4* леукемијских ћелија. Након 24 часа дошло је до дозно зависног и статистички значајног смањења вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија при концентрацијама екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  на  $82,58 \pm 6,59\%$  и  $79,67 \pm 1,43\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). При нижим концентрацијама екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* није долазило до статистички значајног смањења вијабилности након 24 часа култивације *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p > 0,05$ ).

Након 48 часова култивације *MOLT-4* леукемијских ћелија, вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија се статистички значајно смањила већ при концентрацији екстракта

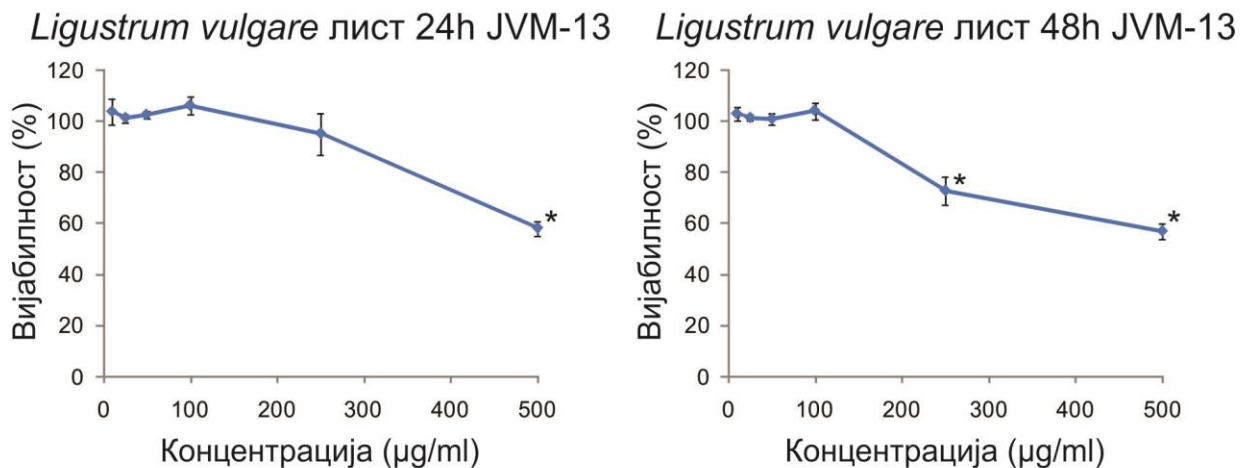
листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50  $\mu\text{g/ml}$  и она је износила  $93,04 \pm 1,05\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). Метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* је имао дозно зависни ефекат на смањење вијабилности, тако да је при максималној испитиваној концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$ , вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија износила  $26,75 \pm 1,47\%$  у односу на нетретиране ћелије (Графикон 13.).



**Графикон 13.** Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

Метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* је такође смањивао вијабилност и *JVM-13* ћелија након 24 и 48 часова инкубације. Након 24 часа инкубације, метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* је статистички значајно смањио вијабилности *JVM-13* ћелија при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  на  $58,04 \pm 2,73\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). При нижим концентрацијама екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* није дошло до статистички значајне промене вијабилности испитиваних ћелија ( $p > 0,05$ ).

Након 48 часова култивације *JVM-13* ћелија, до статистички значајног смањења вијабилности је дошло већ при концентрацији екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$ , где је измерена вијабилност *JVM-13* ћелија била  $72,88 \pm 5,62\%$  у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије ( $p < 0,05$ ). То смањење вијабилности *JVM-13* ћелија под дејством испитиваног екстракта је било дозно зависно, јер је већ при концентрацији екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* вијабилност *JVM-13* ћелија била  $57,02 \pm 2,91\%$  у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије (Графикон 14.).



**Графикон 14.** Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност JVM-13 ћелија.

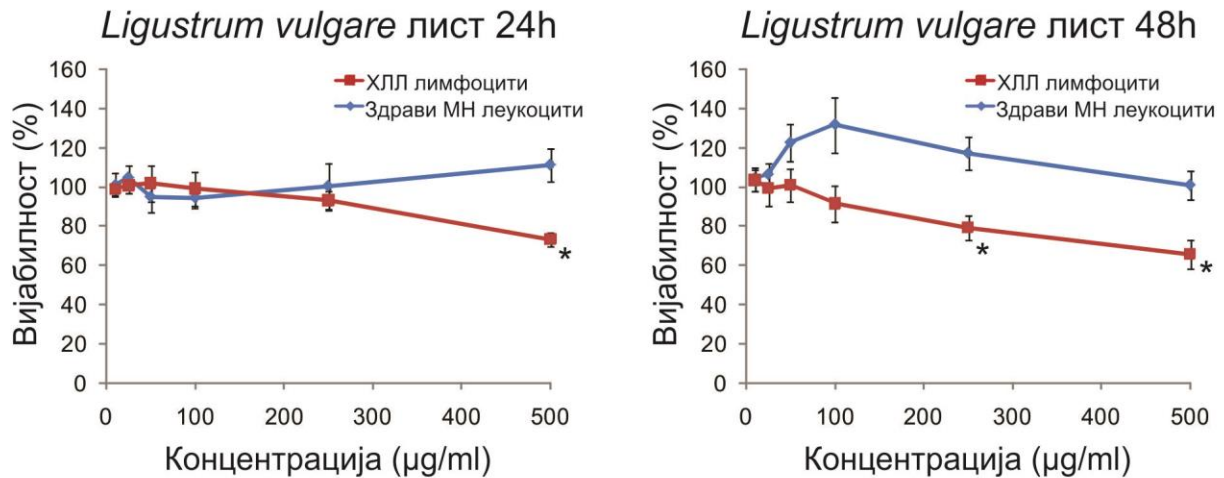
Након тога, испитали смо ефекат метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних леукоцита после култивације од 24 и 48 часова.

При инкубацији ХЛЛ лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита при концентрацијама од 10 µg/ml до 250 µg/ml у односу на нетретиране лимфоците ( $p > 0,05$ ). При концентрацији метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита које је износило  $73 \pm 3,58\%$  у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ).

Метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* је већ у концентрацијама од 250 µg/ml након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита статистички значајно смањив вијабилност ових ћелија на  $79,32 \pm 6,18\%$  у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p < 0,05$ ). Са даљим повећањем концентрације екстракта, смањење вијабилности је било израженије у односу на нетретиране лимфоците, тако да је износило  $65,71 \pm 7,34\%$  за концентрацију екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500 µg/ml. При нижим концентрацијама екстракта мањим од 250 µg/ml, није долазило до статистички значајне промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p > 0,05$ ).

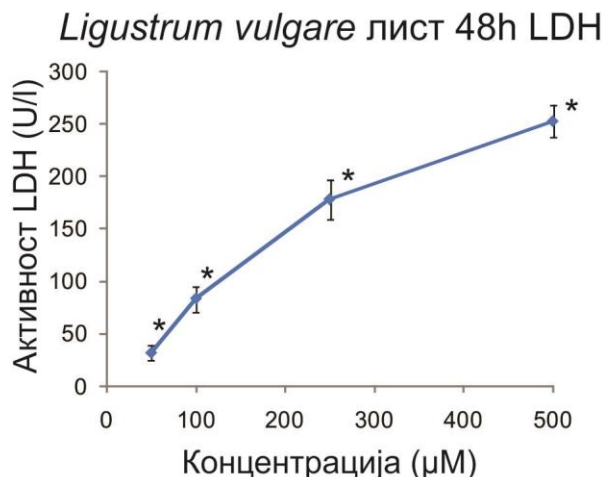


Интересантно је да ни након 24 часа, ни након 48 часова култивације здравих мононуклеарних леукоцита у присуству испитиваних концентрација метанолских екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* од 10 µg/ml до 500 µg/ml, није дошло до статистички значајне промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу мононуклеарних леукоцита који нису били изложени дејству екстраката ( $p>0,05$ ) (Графикон 15.).



**Графикон 15.** Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Приликом култивације ХЛЛ лимфоцита у току 48 часова у присуству растућих концентрација метанолских екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* јавило се дозно зависно повећање активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ћелије. Највеће повећање активности *LDH* било је при концентрацији екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500 µg/ml и износило је  $253 \pm 14,67$  U/l, док је при концентрацији метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50 µg/ml дошло до повећања активности *LDH* од  $32 \pm 6,19$  U/l у односу на нетретиране ћелије (Графикон 16.).



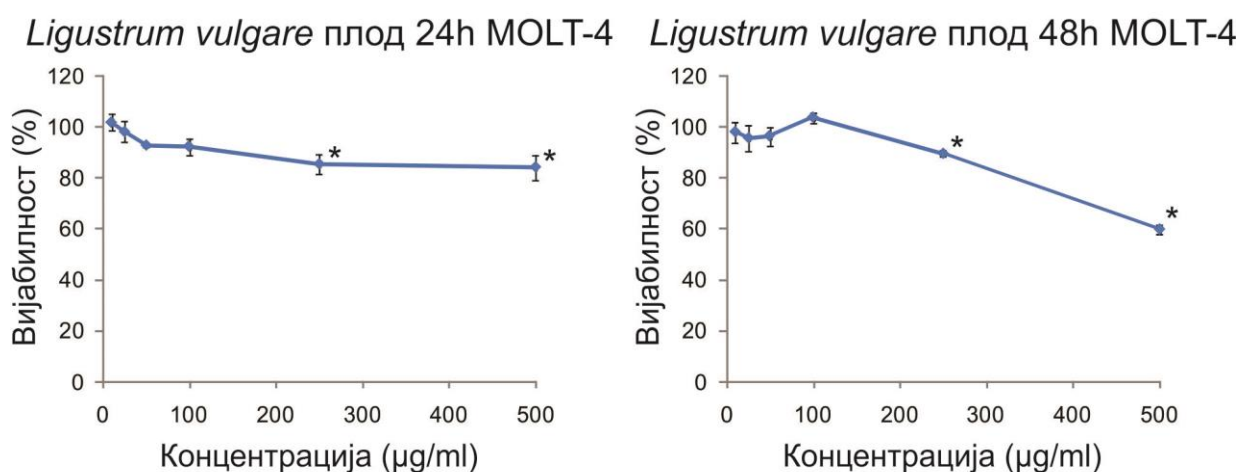
**Графикон 16.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом листа биљке *Ligustrum vulgare* у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

#### 4.1.5. Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност леукемијских лимфоцита

Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* доводи до незнатног смањења вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија након култивације од 24 часа. При концентрацијама од 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml не долази до статистички значајне промене вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p > 0,05$ ). Ипак, са повећањем концентрације метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare*, при концентрацијама од 250 µg/ml и 500 µg/ml, долази до статистички значајног смањења вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ). При концентрацији испитиваног екстракта од 250 µg/ml, вијабилност *MOLT-4* ћелија износи  $85,5 \pm 3,88\%$ , а при концентрацији од 500 µg/ml, вијабилност ових ћелија је  $84,21 \pm 4,94\%$  у односу на нетретиране ћелије.

Након култивације *MOLT-4* ћелија у присуству растућих концентрација метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* у трајању од 48 часова, при нижим концентрацијама екстракта од 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml, не долази до статистички значајне промене вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на

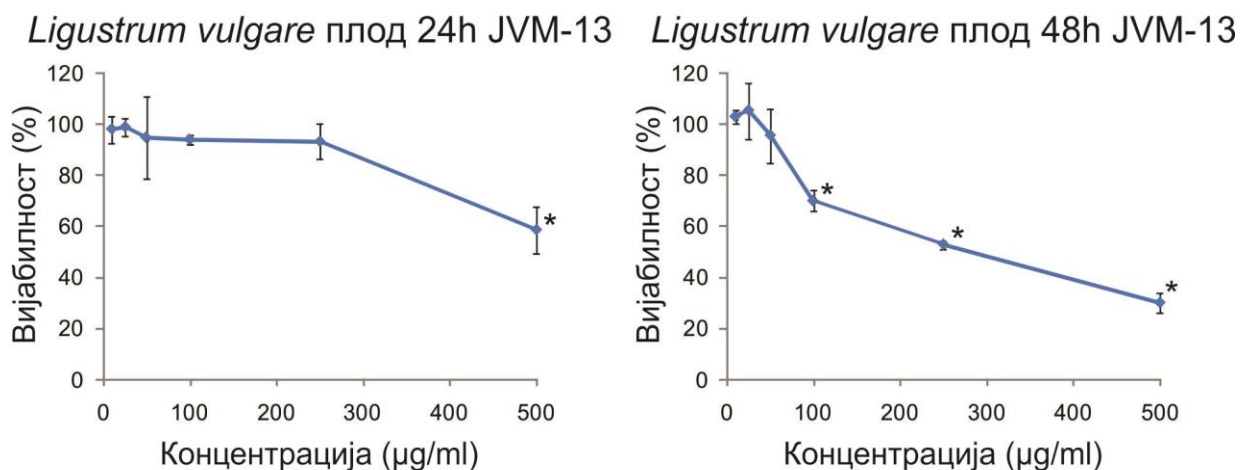
нетретиране ћелије ( $p>0,05$ ). Слично као и након култивације од 24 часа, после 48 часова култивације, до статистички значајног смањења вијабилности долази тек при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$ , када вијабилност испитиваних ћелија износи  $89,77 \pm 1,16\%$  у односу на нетретиране ћелије. Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$ , такође изазива статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* ћелија на  $59,76 \pm 1,91\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p<0,05$ ). Смањење вијабилности *MOLT-4* ћелија при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  је статистички значајно ниже након 48 часова у односу на исту концентрацију испитиваног екстракта после 24 часа култивације ћелија ( $p<0,05$ ) (Графикон 17.).



**Графикон 17.** Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност *JVM-13* ћелија након култивације од 24 часа. При концентрацијама од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  и 250  $\mu\text{g/ml}$  не долази до статистички значајне промене вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије ( $p>0,05$ ). Једино при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 500  $\mu\text{g/ml}$ , долази до статистички значајног смањења вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p<0,05$ ). При концентрацији испитиваног екстракта од 500  $\mu\text{g/ml}$ , вијабилност *JVM-13* ћелија износи  $58,73 \pm 9,09\%$ .

Након култивације од 48 часова *JVM-13* ћелија у присуству растућих концентрација метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare*, при нижим концентрацијама екстракта од 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml, не долази до статистички значајне промене вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p>0,05$ ). Међутим, после 48 часова култивације, до статистички значајног смањења вијабилности ипак долази при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 100 µg/ml када вијабилност *JVM-13* ћелија износи  $70,12 \pm 4,12\%$  од вијабилности нетретираних ћелија. Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* при концентрацијама од 250 µg/ml и 500 µg/ml, такође изазива статистички значајно смањење вијабилности *JVM-13* ћелија на  $52,76 \pm 1,61\%$  и  $30,04 \pm 3,92\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p<0,05$ ). Смањење вијабилности *JVM-13* ћелија при концентрацијама од 100 µg/ml, 250 µg/ml и 500 µg/ml је статистички значајно ниже након 48 часова у односу на исту концентрацију испитиваног екстракта после 24 часа култивације ћелија ( $p<0,05$ ), тако да при овим концентрацијама метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* испољава се временски зависно смањење вијабилности *JVM-13* ћелија (Графикон 18.).



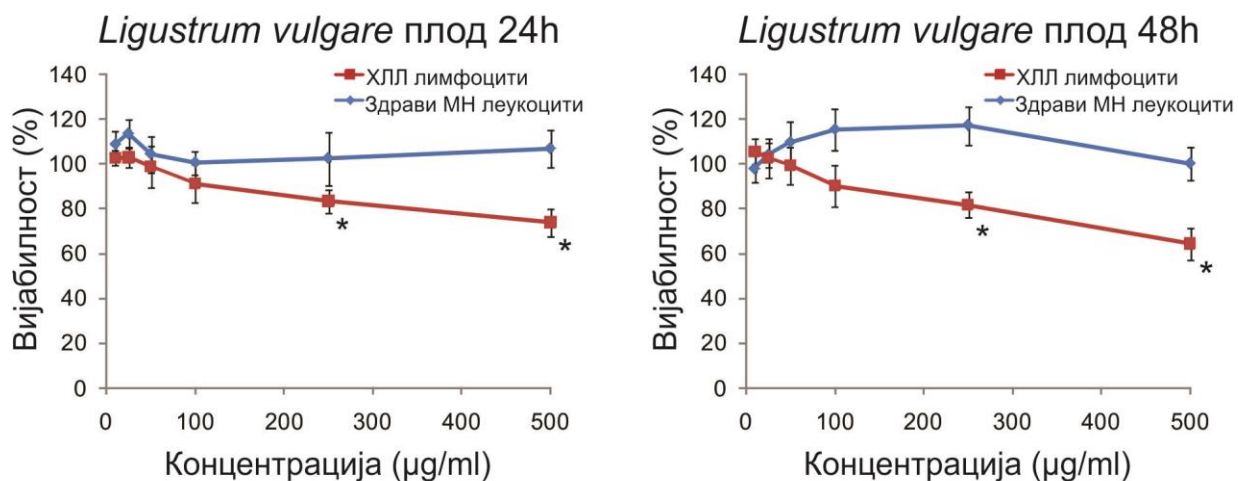
**Графикон 18.** Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност *JVM-13* ћелија.

При култивацији ХЛЛ лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита при концентрацијама од 10 µg/ml до 100 µg/ml у односу на нетретиране лимфоците ( $p>0,05$ ). При концентрацији метанолског

екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита које је износило  $83,48 \pm 5,08\%$  за 250  $\mu\text{g/ml}$  и  $74,04 \pm 6,22\%$  за 500  $\mu\text{g/ml}$  у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ).

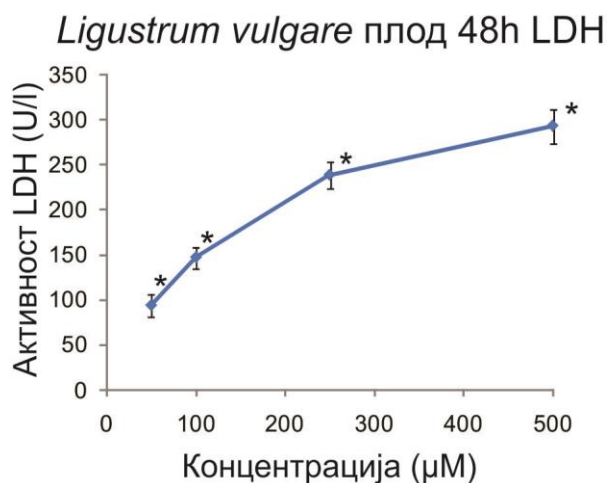
Није уочена статистички значајна разлика у дејству метанолског екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare*, након 48 часова инкубације, при концентрацијама екстракта од 10  $\mu\text{g/ml}$  до 100  $\mu\text{g/ml}$ , измеђи вредности вијабилности третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p > 0,05$ ). Ипак, при концентрацијама екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита, вијабилност испитиваних ћелија се статистички значајно смањивала и износила је  $81,93 \pm 5,74\%$  и  $64,52 \pm 7,12\%$  у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p < 0,05$ ).

Након култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 и 48 часова у присуству испитиваних концентрација метанолских екстраката плода биљке *Ligustrum vulgare* од 10  $\mu\text{g/ml}$  до 500  $\mu\text{g/ml}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу мононуклеарних леукоцита који нису били изложени дејству екстраката ( $p > 0,05$ ) (Графикон 19.).



**Графикон 19.** Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Након култивације ХЛЛ лимфоцита од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолских екстраката плода биљке *Ligustrum vulgare* дошло је до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците. Највеће повећање активности *LDH* било је при концентрацији екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 500  $\mu\text{g/ml}$  и износило је 293 U/l, док је при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 50  $\mu\text{g/ml}$  дошло до повећања активности *LDH* за 94 U/l у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците (Графикон 20.).



**Графикон 20.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом плода биљке *Ligustrum vulgare* у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

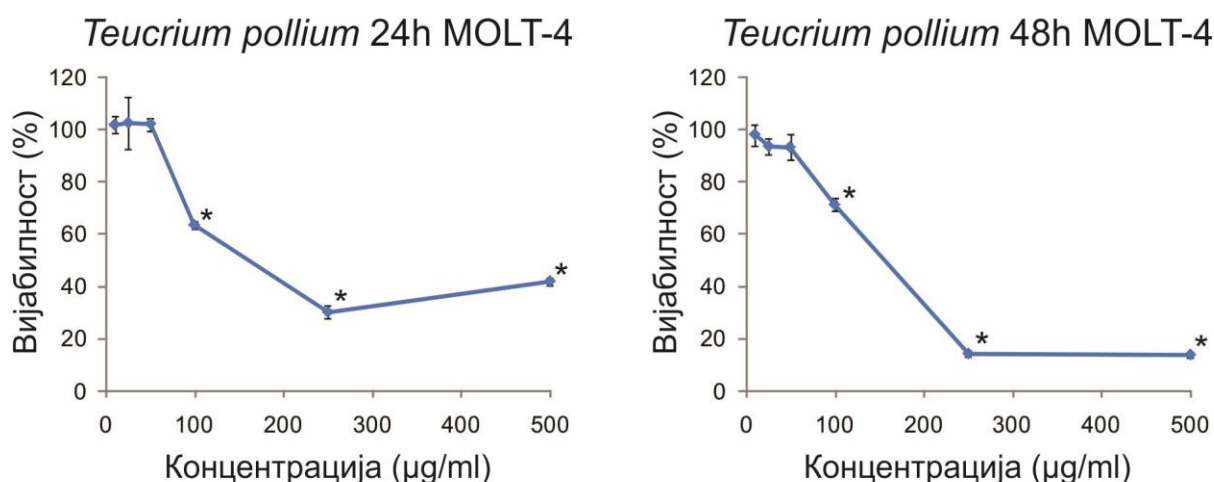
#### 4.1.6. Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност леукемијских лимфоцита

Још један метанолски екстракт из групе биљака чији смо ефекат на вијабилност леукемијских лимфоцита испитивали је и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*.

Након 24 часа инкубације *MOLT-4* леукемијских ћелија при концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  и 50  $\mu\text{g/ml}$  не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране *MOLT-4* леукемијске ћелије ( $p > 0,05$ ). При концентрацији екстракта од 100

$\mu\text{g/ml}$ ,  $250 \mu\text{g/ml}$  и  $500 \mu\text{g/ml}$ , јавља се статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* леукемијских ћелија у односу на нетретитане ћелије ( $p < 0,05$ ). Инкубација *MOLT-4* ћелија са  $100 \mu\text{g/ml}$  екстракта смањује вијабилност на  $63,56 \pm 1,27\%$ , вијабилност је најнижа за концентрацију екстракта од  $250 \mu\text{g/ml}$  и износи  $30,32 \pm 2,39\%$ , а при концентрацији од  $500 \mu\text{g/ml}$  је нешто већа и износи  $41,83 \pm 1,42\%$ .

Након 48 часова инкубације *MOLT-4* леукемијских ћелија, такође не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране *MOLT-4* ћелије ( $p > 0,05$ ) при концентрацијама екстракта од  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$  и  $50 \mu\text{g/ml}$ . Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретиране ћелије је уочљиво већ при концентрацији од  $100 \mu\text{g/ml}$ , када вијабилност *MOLT-4* ћелија износи  $71,41 \pm 2,39\%$  ( $p < 0,05$ ). Такође, при концентрацијама екстракта од  $250 \mu\text{g/ml}$  и  $500 \mu\text{g/ml}$  долази до још већег пада вијабилности *MOLT-4* ћелија, која за ове концентрације износи  $14,41 \pm 1,14\%$  и  $13,92 \pm 0,94\%$  ( $p < 0,05$ ) (Графикон 21.).



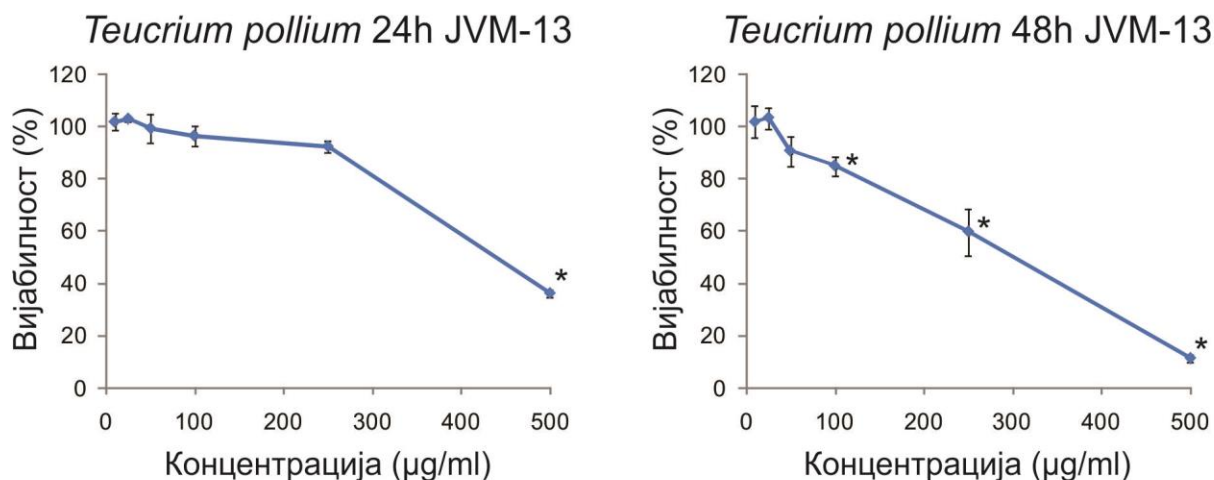
**Графикон 21.** Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

Након 24 часа инкубације *JVM-13* ћелија при концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  и  $250 \mu\text{g/ml}$  не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије ( $p > 0,05$ ). Једино при концентрацији екстракта од  $500 \mu\text{g/ml}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на

нетретитане ћелије ( $p < 0,05$ ). Инкубација *JVM-13* ћелија са 500  $\mu\text{g/ml}$  екстракта смањује вијабилност на  $36,24 \pm 1,52\%$ .

Након 48 часова инкубације *JVM-13* ћелија, такође не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретитане ћелије ( $p > 0,05$ ) при концентрацијама екстракта од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  и 50  $\mu\text{g/ml}$ . Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретитане ћелије је уочљиво већ при концентрацији од 100  $\mu\text{g/ml}$ , када вијабилност *JVM-13* ћелија износи  $84,96 \pm 3,53\%$  ( $p < 0,05$ ). Ово смањење вијабилности је дозно зависно, јер са повећањем концентрације екстракта на 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  долази до још значајнијег пада вијабилности *JVM-13* ћелија, која за ове концентрације износи  $59,85 \pm 8,98\%$  и  $11,31 \pm 1,35\%$  ( $p < 0,05$ ).

Смањење вијабилности *JVM-13* ћелија при концентрацијама од 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  је статистички значајно ниже након 48 часова у односу на исту концентрацију испитиваног екстракта после 24 часа култивације ћелија ( $p < 0,05$ ), тако да при овим концентрацијама метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* испољава временски зависно смањење вијабилности *JVM-13* ћелија ( $p < 0,05$ ) (Графикон 22.).



**Графикон 22.** Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност *JVM-13* ћелија.

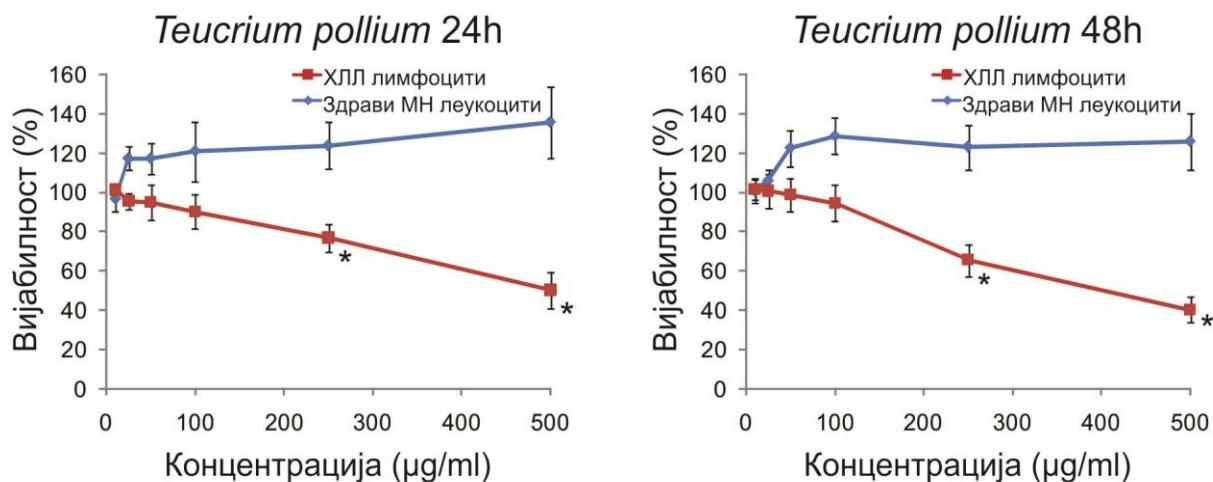
При култивацији ХЛЛ лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, није дошло до статистички



значајне промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита при концентрацијама од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$  у односу на нетретиране лимфоците ( $p>0,05$ ). При концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита, које је износило  $76,85 \pm 7,25\%$  за 250  $\mu\text{g/ml}$  и  $50,27 \pm 9,25\%$  за 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $p<0,05$ ).

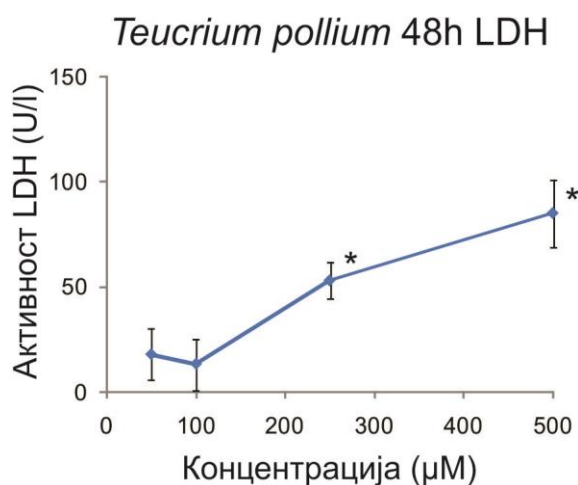
Није уочена статистички значајна разлика услед дејства метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, након 48 часова инкубације, при концентрацијама екстракта од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$ , између вредности вијабилности третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p>0,05$ ). Насупрот томе, при концентрацијама екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита, вијабилност испитиваних ћелија се статистички значајно смањила и износила је  $65,63 \pm 8,13\%$  за 250  $\mu\text{g/ml}$  и  $40,39 \pm 6,67\%$  за 500  $\mu\text{g/ml}$  у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p<0,05$ ).

Након култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 и 48 часова у присуству испитиваних концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 10  $\mu\text{g/ml}$  до 500  $\mu\text{g/ml}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу мононуклеарних леукоцита који нису били изложени његовом дејству ( $p>0,05$ ) (Графикон 23.).



**Графикон 23.** Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

После култивације лимфоцита изолованих из крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије у трајању од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, дошло је до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците. Највеће повећање активности *LDH* уочено је при концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 500  $\mu\text{g/ml}$  и износило је  $85 \pm 15,67$  U/l. у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците (Графикон 24.).



**Графикон 24.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium* у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

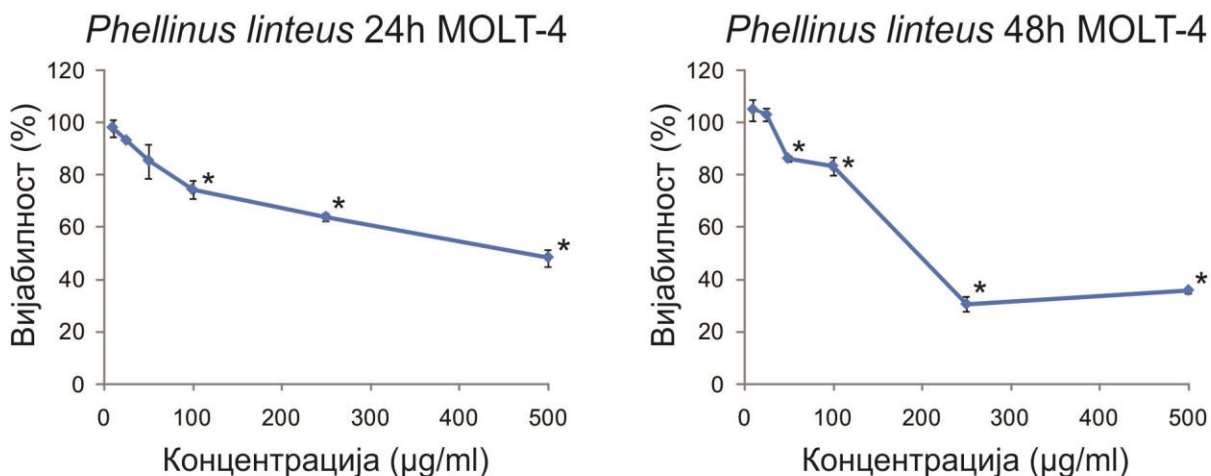
#### **4.1.7. Утицај метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност леукемијских лимфоцита**

Ефекат метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност леукемијских лимфоцита, такође је испитан на две леукемијске ћелијске линије, *MOLT-4* и *JVM-13*, лимфоцитима изолованим из крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије и мононуклеарним леукоцитима изолованим из крви здравих испитаника.

После 24 часа култивације *MOLT-4* ћелија при концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  и 50  $\mu\text{g/ml}$  не долази до

статистички значајне промене вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретирание *MOLT-4* ћелије ( $p>0,05$ ). При концентрацији екстракта од 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , јавља се дозно зависно и статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* ћелија у односу на нетретитане ћелије ( $p<0,05$ ). Инкубација *MOLT-4* ћелија са 100  $\mu\text{g/ml}$  екстракта смањује вијабилност на  $74,45 \pm 3,46\%$ , вијабилност је нешто нижа за концентрацију екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и износи  $64,04 \pm 1,39\%$ , а при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$  је најнижа и износи  $48,35 \pm 3,29\%$ .

Ни након 48 часова инкубације *MOLT-4* ћелија, такође не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретирание *MOLT-4* ћелије при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 10  $\mu\text{g/ml}$  и 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $p>0,05$ ). Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретирание ћелије је уочљиво већ при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 50  $\mu\text{g/ml}$ , када вијабилност *MOLT-4* ћелија износи  $86,34 \pm 1,01\%$  ( $p<0,05$ ). И при концентрацијама екстракта од 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  долази до пада вијабилности *MOLT-4* ћелија, која за ове концентрације износи  $83,45 \pm 3,42\%$ ,  $30,72 \pm 2,94\%$  и  $35,82 \pm 1,02\%$  ( $p<0,05$ ) (Графикон 25.).

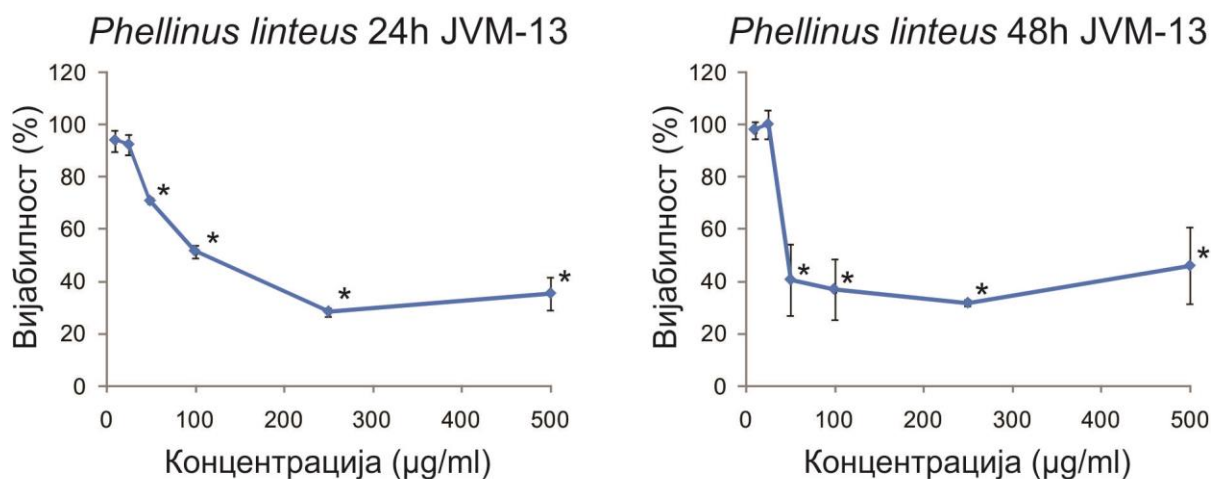


**Графикон 25.** Утицај метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

При концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 10  $\mu\text{g/ml}$  и 25  $\mu\text{g/ml}$ , након 24 часа инкубације *JVM-13* ћелија не долази до статистички значајне

промене вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије ( $p>0,05$ ). Већ се при концентрацији екстракта од 50  $\mu\text{g/ml}$  јавља статистички значајно смањење вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретитане ћелије ( $p<0,05$ ) и оно је присутно и при култивацији испитиваних ћелија у присуству концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ . Вредности вијабилности *JVM-13* ћелија у присуству овог екстракта ћелија износе  $70,91 \pm 1,06\%$  за 50  $\mu\text{g/ml}$ ,  $51,53 \pm 2,45\%$  за 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $28,37 \pm 1,55\%$  за 250  $\mu\text{g/ml}$ , а за 500  $\mu\text{g/ml}$  вијабилност *JVM-13* ћелија је  $35,43 \pm 6,48\%$  у односу на нетретиране ћелије.

После 48 часова култивације *JVM-13* ћелија, не долази до статистички значајне промене вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране ћелије при концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 10  $\mu\text{g/ml}$  и 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $p>0,05$ ). Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретиране ћелије је уочљиво већ при концентрацијама од 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$ , када вијабилност *JVM-13* ћелија износи  $40,63 \pm 13,57\%$  и  $37,04 \pm 11,43\%$  ( $p<0,05$ ). Ово смањење вијабилности није дозно зависно, јер са повећањем концентрације екстракта са 250  $\mu\text{g/ml}$  на 500  $\mu\text{g/ml}$  не долази до још већег пада вијабилности *JVM-13* ћелија, која за ове концентрације износи  $31,9 \pm 1,26\%$  и  $46,06 \pm 14,71\%$  ( $p<0,05$ ) (Графикон 26.).



**Графикон 26.** Утицај метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност *JVM-13* ћелија.

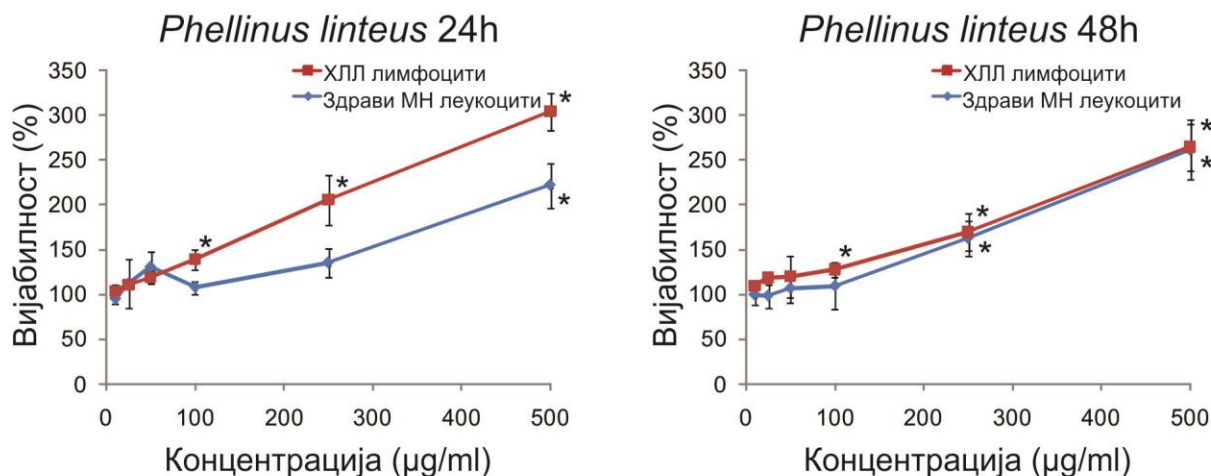
При култивацији ХЛЛ лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности ХЛЛ лимфоцита при концентрацијама од 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p>0,05$ ). При концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 100 µg/ml, 250 µg/ml и 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања вијабилности ХЛЛ лимфоцита у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита, које је износило  $139,37 \pm 11,17\%$  за 100 µg/ml,  $205,51 \pm 28,22\%$  за 250 µg/ml и  $314,04 \pm 21,11\%$  за 500 µg/ml ( $p<0,05$ ).

Није уочена статистички значајна разлика услед дејства метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, након 48 часова инкубације, при нижим концентрацијама екстракта од 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml, између вредности вијабилности третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p>0,05$ ). С друге стране, при концентрацијама екстракта од 100 µg/ml, 250 µg/ml и 500 µg/ml након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита, вијабилност испитиваних ћелија се статистички значајно повећала и износила је  $127,91 \pm 8,46\%$  за 100 µg/ml,  $169,67 \pm 20,08\%$  за 250 µg/ml и  $264,53 \pm 26,46\%$  за 500 µg/ml у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p<0,05$ ).

Након култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита при концентрацијама од 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml и 250 µg/ml у односу на нетретиране ћелије ( $p>0,05$ ). Ипак, при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу нетретираних ћелија, које је износило  $221,72 \pm 25,14\%$  ( $p<0,05$ ).

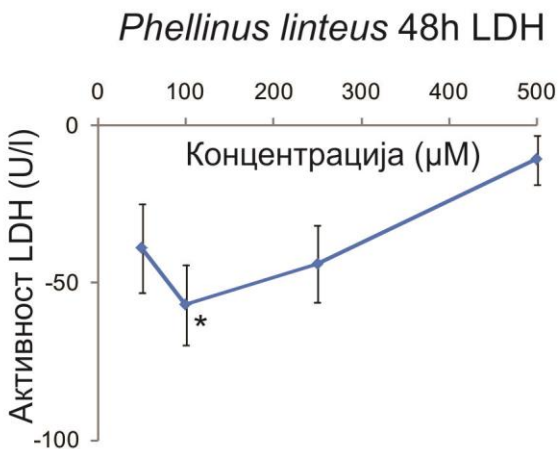
Ни после 48 часова култивације здравих мононуклеарних леукоцита у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности испитиваних ћелија при концентрацијама екстракта од 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml у односу на нетретиране ћелије ( $p>0,05$ ). Међутим, дошло је до статистички значајног повећања вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу нетретираних ћелија при

концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , које је износило  $162,73 \pm 19,74\%$  и  $261,75 \pm 33,28\%$  ( $p < 0,05$ ) (Графикон 27.).



**Графикон 27.** Утицај метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Након инкубације ХЛЛ лимфоцита у трајању од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, дошло је до смањења активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 100  $\mu\text{g/ml}$  и износило је  $57 \pm 12,73$  У/л у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците (Графикон 28.).



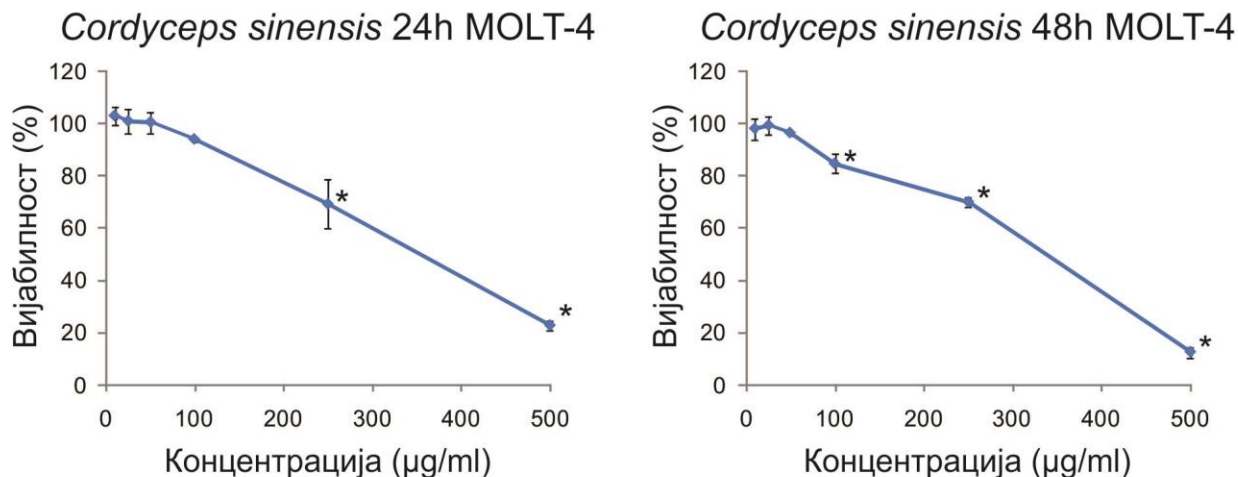
**Графикон 28.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Phellinus linteus* у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

#### **4.1.8. Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност леукемијских лимфоцита**

Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност леукемијских ћелија је испитан после 24 и 48 часова култивације две леукемијске ћелијске линије, *MOLT-4* и *JVM-13*, ХЛЛ лимфоцита и мононуклеарних леукоцита изолованим из крви здравих испитаника.

После 24 часа култивације *MOLT-4* ћелија при концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* од 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml не долази до статистички значајне промене вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране *MOLT-4* ћелије ( $p > 0,05$ ). При концентрацији екстракта од 250 µg/ml и 500 µg/ml, јавља се дозно зависно и статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* ћелија у односу на нетретитане ћелије ( $p < 0,05$ ). Инкубација *MOLT-4* ћелија са екстрактом концентрације 250 µg/ml смањује вијабилност на  $69,39 \pm 9,45\%$ , а при концентрацији екстракта од 500 µg/ml вијабилност износи  $22,75 \pm 1,68\%$  у односу на контролну групу нетретираних ћелија.

Ни након 48 часова инкубације *MOLT-4* ћелија не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране *MOLT-4* ћелије при концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* од 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml ( $p > 0,05$ ). Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретиране ћелије се јавља при концентрацији екстракта од 100 µg/ml, када вијабилност *MOLT-4* ћелија износи  $84,91 \pm 3,77\%$  ( $p < 0,05$ ). Такође, при концентрацијама екстракта од 250 µg/ml и 500 µg/ml долази до дозно зависног пада вијабилности *MOLT-4* ћелија, која за ове концентрације износи  $70,03 \pm 1,98\%$  и  $12,53 \pm 2,07\%$  ( $p < 0,05$ ) (Графикон 29.).



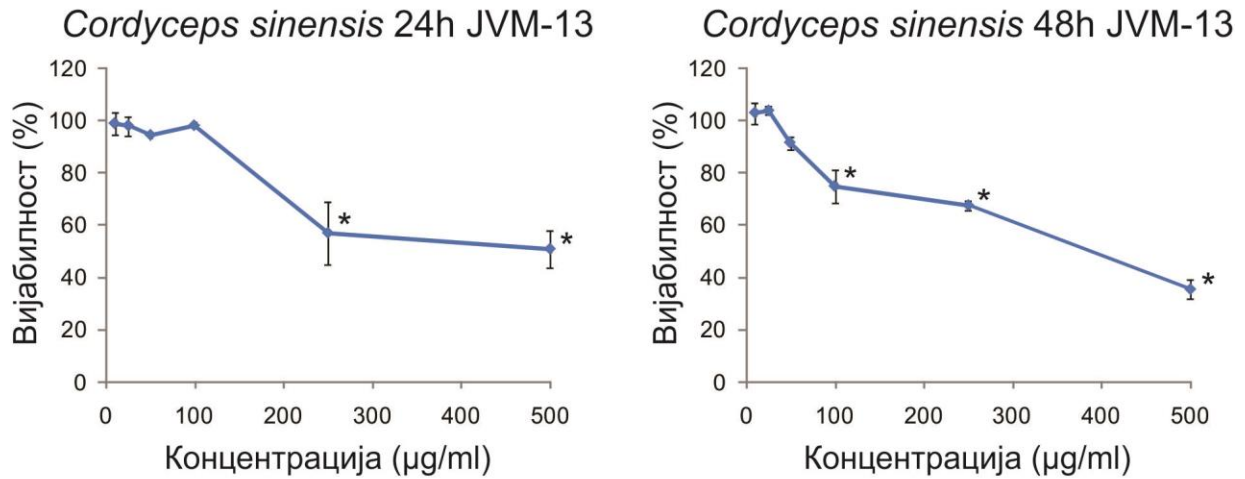
**Графикон 29.** Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност *MOLT-4* ћелија.

Метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањује вијабилност *JVM-13* ћелија након култивације од 24 часа. При концентрацијама екстракта од 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml не долази до статистички значајне промене вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије ( $p>0,05$ ). Насупрот томе, при концентрацији екстракта од 250 µg/ml и 500 µg/ml, долази до статистички значајног смањења вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретиране ћелије након 24 часа ( $p<0,05$ ). При концентрацији испитиваног екстракта од 250 µg/ml, вијабилност *JVM-13* ћелија износи  $57,14 \pm 12,02\%$ , а при концентрацији екстракта од 500 µg/ml вијабилност је  $50,79 \pm 7,21\%$  у односу на групу нетретираних ћелија.

Након култивације од 48 часова *JVM-13* ћелија у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis*, при концентрацијама екстракта од 10 µg/ml, 25 µg/ml и 50 µg/ml, не долази до статистички значајне промене вијабилности *JVM-13* ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p>0,05$ ). Ипак, после 48 часова култивације до статистички значајног смањења вијабилности долази при концентрацији екстракта од 100 µg/ml када вијабилност испитиваних ћелија износи  $75,04 \pm 6,28\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија. Метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* при концентрацијама од 250 µg/ml и 500 µg/ml, такође изазива



статистички значајно смањење вијабилности *MOLT-4* ћелија на  $67,56 \pm 1,81\%$  и  $35,59 \pm 3,63\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ ) (Графикон 30.).



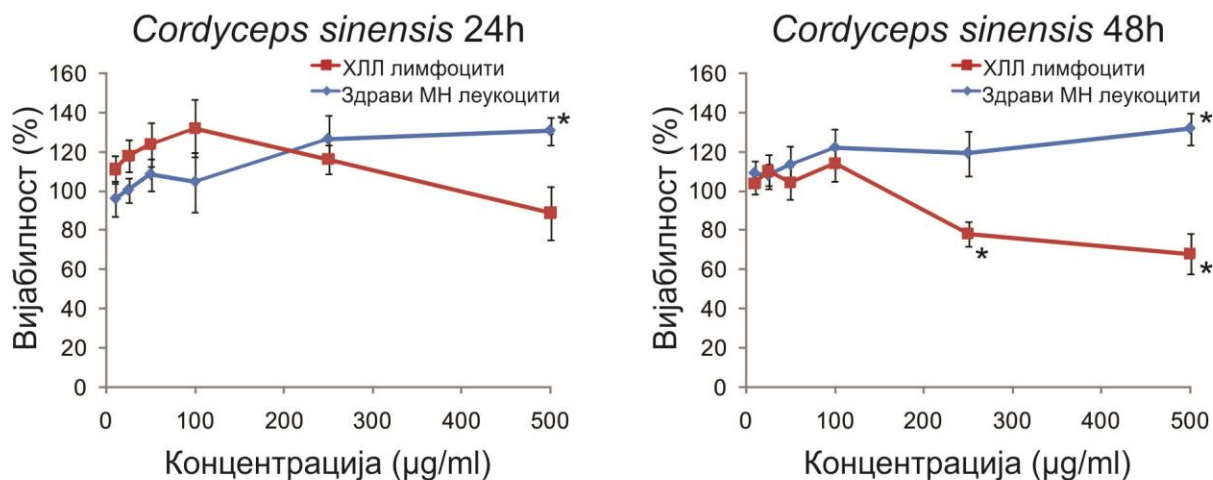
**Графикон 30.** Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност *JVM-13* ћелија.

Није било статистички значајне разлике након култивације ХЛЛ лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству испитиваних концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* од  $10 \mu\text{g/ml}$  до  $500 \mu\text{g/ml}$ , између вредности вијабилности третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). При највећој концентрацији дошло је до незнатног смањења просечне вијабилности ХЛЛ лимфоцита на вредност од  $88,81 \pm 13,59\%$  у односу на контролну групу ћелија, али та разлика није била статистички значајна.

Није уочена статистички значајна разлика услед дејства метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis*, након 48 часова инкубације, при концентрацијама екстракта од  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$  и  $100 \mu\text{g/ml}$ , између вредности вијабилности третираних и нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Међутим, при концентрацијама екстракта од  $250 \mu\text{g/ml}$  и  $500 \mu\text{g/ml}$  након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита, вијабилност испитиваних ћелија се статистички значајно смањила и износила је  $78,31 \pm 6,37\%$  за  $250 \mu\text{g/ml}$  и  $68,09 \pm 11,13\%$  за  $500 \mu\text{g/ml}$  у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците ( $p < 0,05$ ).

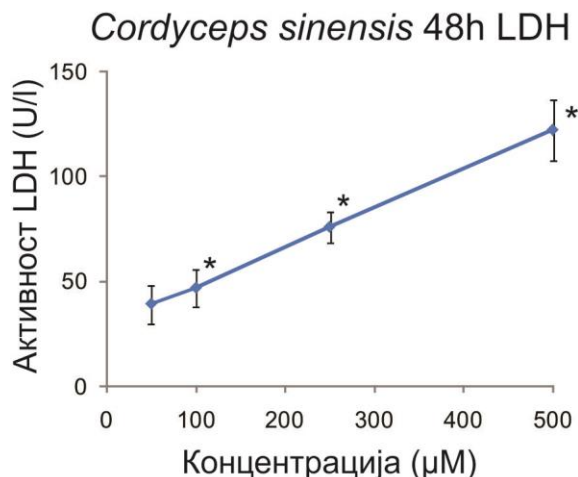
У присуству метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* концентрације од  $10 \mu\text{g/ml}$  до  $250 \mu\text{g/ml}$ , након култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24

и 48 часова, није било статистички значајне разлике између вредности вијабилности третираних здравих мононуклеарних леукоцита и контролне групе мононуклеарних леукоцита који нису били изложени његовом дејству ( $p>0,05$ ). При концентрацијама од 500  $\mu\text{g/ml}$  након 24 часа и 48 часова култивације, дошло је до статистички значајног повећања вијабилности испитиваних ћелија на  $130,63 \pm 7,26\%$  и  $131,89 \pm 8,16\%$  у односу на нетретиране ћелије ( $p<0,05$ ) (Графикон 31.).



**Графикон 31.** Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност ХЛЛ лимфоцита и здравих мононуклеарних (МН) леукоцита.

Након инкубације ХЛЛ лимфоцита од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis*, дошло је до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците. Највеће повећање активности *LDH* уочено је при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* од 500  $\mu\text{g/ml}$  и износило је 122 U/l у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците (Графикон 32.).



**Графикон 32.** Разлика активности лактат-дехидрогеназе (U/l) у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Cordyceps sinensis* у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците након 48 часова.

#### **4.2. Биоактивне супстанце индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије**

Пошто је након испитивања утицаја биоактивних супстанци на вијабилност леукемијских лимфоцита показано да поједине биоактивне супстанце смањују вијабилност леукемијских лимфоцита, а не утичу на вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита, наредним експериментима је испитивано да ли до смањења вијабилности леукемијских ћелија долази услед индукције апоптозе. Биоактивне супстанце које су испољиле такав ефекат на леукемијским лимфоцитима су хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*.

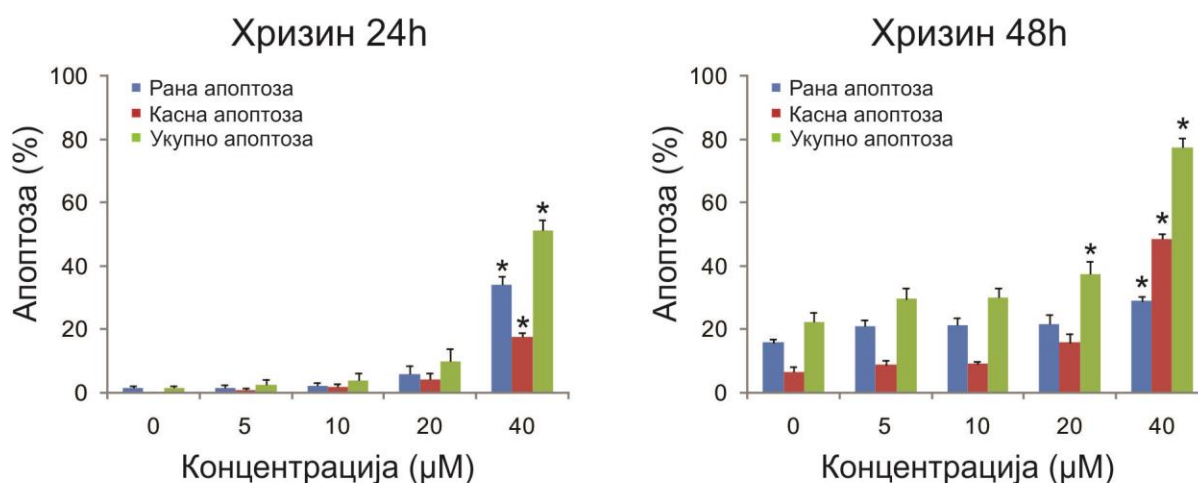
Праћен је проценат ћелија у раној апоптози, касној апоптози и укупан проценат апоптотичних ћелија након 24 часа и 48 часова култивације ХЛЛ лимфоцита са и без присуства испитиваних биоактивних супстанци.

#### 4.2.1. Хризин индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије

Након 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству хризина концентрације 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 20  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних ћелија у односу на исту групу нетретираних ћелија ( $p>0,05$ ). Такође, при овим концентрацијама хризина, ни удео ћелија које су се налазиле у једној од фаза апоптозе, није био статистички значајно различит у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита који нису култивисани у присуству хризина ( $p>0,05$ ). Ипак, при концентрацији хризина од 40  $\mu\text{M}$ , дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p<0,05$ ). При овој концентрацији хризина, уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у фази ране апоптозе, као и процента ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе ( $p<0,05$ ) у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита. Наиме, укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита при концентрацији хризина од 40  $\mu\text{M}$  је износио  $51,39 \pm 3,23\%$ , проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $33,93 \pm 2,84\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе је био  $17,46 \pm 1,49\%$ , од укупне популације ХЛЛ лимфоцита третираних хризином концентрације 40  $\mu\text{M}$ , док је укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита контролне групе ћелија био  $1,4 \pm 0,81\%$ , проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $1,35 \pm 0,79\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе је био  $0,06 \pm 0,04\%$ , од укупне популације нетретираних ХЛЛ лимфоцита.

После 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита у присуству хризина концентрације 5  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на исту групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p>0,05$ ). Поред тога, при овим концентрацијама хризина, ни проценат ћелија које су се налазиле у једној од фаза апоптозе, није био статистички значајно другачији у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита који нису култивисани у присуству хризина ( $p>0,05$ ). Међутим, култивацијом ХЛЛ лимфоцита у присуству концентрација хризина од 20  $\mu\text{M}$  и 40  $\mu\text{M}$ , дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p<0,05$ )

на  $37,35 \pm 4,17\%$  и  $77,4 \pm 3,24\%$  од укупне популације испитиване групе ћелија. Уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у фази ране апоптозе, као и процента ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе приликом култивације ХЛЛ лимфоцита концентрацијама хризина од  $40 \mu\text{M}$  у односу на контролну групу нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ). Наиме, проценат ћелија у раној фази апоптозе при концентрацији хризина од  $40 \mu\text{M}$  је износио  $28,86 \pm 1,67\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе је био  $48,53 \pm 1,58\%$  док је проценат ћелија у раној фази апоптозе нетретираних ћелија износио  $15,74 \pm 1,17\%$ , а у касној фази апоптозе нетретираних ћелија  $6,44 \pm 1,92\%$  од укупне популације одговарајуће групе ћелија. Укупан процентат апоптотичних нетретираних ћелија износио је  $22,18 \pm 3,09\%$  (Графикон 33.).



Графикон 33. Утицај хризина на апоптозу ХЛЛ лимфоцита.

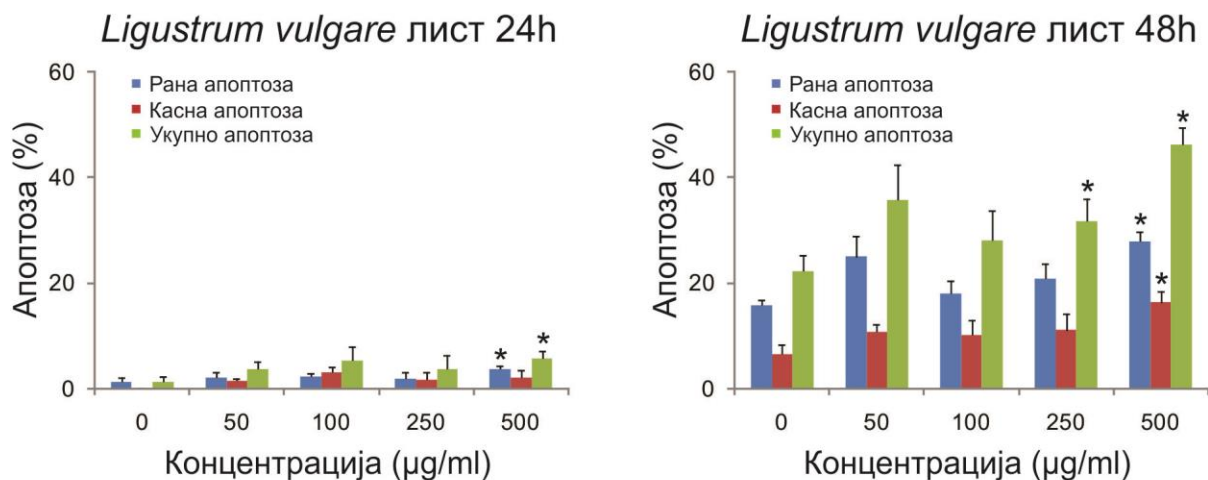
#### 4.2.2. Метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије

Након 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* концентрације  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  и  $250 \mu\text{g/ml}$ , није дошло до статистички значајне промене укупног процента апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на проценат свих апоптотичних нетретираних лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Такође, при овим концентрацијама метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare*, ни удео ћелија које су се налазиле у било којој фази апоптозе, није био статистички значајно

промењен у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита који нису култивисани у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* ( $p > 0,05$ ). При концентрацији екстракта од 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ). При овој концентрацији екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare*, уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у фази ране апоптозе ( $p < 0,05$ ), док проценат ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе није статистички значајно промењен у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Наиме, укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита при концентрацији метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500  $\mu\text{g/ml}$  је износио  $5,83 \pm 1,24\%$ , а проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $3,74 \pm 0,57\%$ , од укупне популације ХЛЛ лимфоцита третираних испитиваним екстрактом концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$ , док је укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита контролне групе ћелија био  $1,4 \pm 0,81\%$ , а проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $1,35 \pm 0,79\%$  од укупне популације нетретираних ХЛЛ лимфоцита.

После 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$ , није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на исту групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Поред тога, при овим концентрацијама екстракта, ни проценат ћелија које су се налазиле било којој од фаза апоптозе, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита који нису третирани испитиваним екстрактом ( $p > 0,05$ ). Култивацијом ХЛЛ лимфоцита у присуству концентрација метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ) на  $31,8 \pm 5,03\%$  и  $44,22 \pm 6,12\%$  од укупне популације испитиване групе ћелија. Уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у фази ране апоптозе, као и процента ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе приликом култивације ХЛЛ лимфоцита концентрацијама метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500  $\mu\text{g/ml}$  у односу на контролну групу нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ), док за концентрацију екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$ , разлика

није била статистички значајна ( $p>0,05$ ). Процент ћелија у раној фази апоптозе при концентрацији метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500  $\mu\text{g/ml}$  је износио  $27,91 \pm 1,88\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе је био  $16,3 \pm 2,16\%$  док је проценат ћелија у раној фази апоптозе нетретираних ћелија износио  $15,74 \pm 1,17\%$ , а у касној фази апоптозе нетретираних ћелија  $6,44 \pm 1,92\%$  од укупне популације одговарајуће групе ћелија (Графикон 34.).



**Графикон 34.** Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на апоптозу ХЛЛ лимфоцита.

#### 4.2.3. Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије

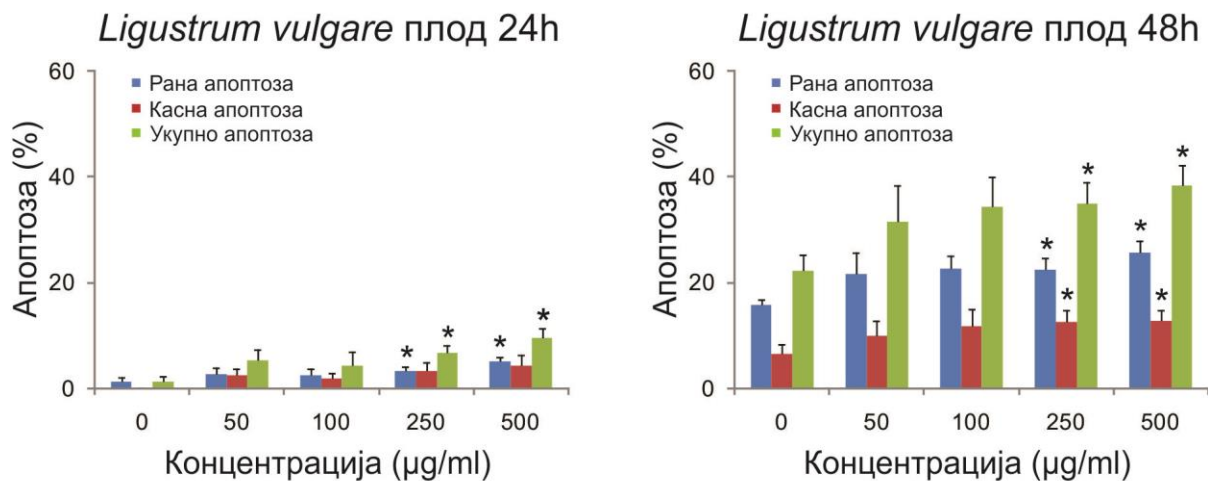
После 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$ , није дошло до статистички значајне промене укупног процента апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на проценат свих апоптотичних нетретираних лимфоцита ( $p>0,05$ ). Такође, при овим концентрацијама метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare*, ни удео ћелија које су се налазиле у било којој од фаза апоптозе, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита који нису култивисани у присуству метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* ( $p>0,05$ ). Ипак, при концентрацији екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног

повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ). При овој концентрацији екстракта, уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у фази ране апоптозе ( $p < 0,05$ ), док проценат ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе није статистички значајно промењен у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Сумарно, укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  је износио  $6,76 \pm 1,42\%$  и  $9,54 \pm 1,88\%$ , а проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $3,36 \pm 0,71\%$  и  $5,14 \pm 0,95\%$ , од укупне популације ХЛЛ лимфоцита третираним испитиваним екстрактом концентрације 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ . С друге стране, укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита контролне групе ћелија био  $1,4 \pm 0,81\%$ , а проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $1,35 \pm 0,79\%$  од укупне популације нетретираних ХЛЛ лимфоцита.

У случају када је третман ХЛЛ лимфоцита метанолским екстрактом плода биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$  трајао 48 часова, није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на исту групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Такође, при овим концентрацијама екстракта, проценат ћелија које су се налазиле у некој од фаза апоптозе, раној или касној, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита који нису култивисани у присуству испитиваног екстракта ( $p > 0,05$ ). Насупрот томе, култивација ХЛЛ лимфоцита метанолским екстрактом плода биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , изазвала је статистички значајно повећање укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ) на  $35,04 \pm 4,99\%$  и  $38,45 \pm 4,72\%$  од укупне популације испитиване групе ћелија. Уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у фази ране апоптозе, као и процента ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе приликом третмана ХЛЛ лимфоцита концентрацијама метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  у односу на контролну групу нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ). Процент ћелија у раној фази апоптозе при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  је износио  $22,51 \pm 2,16\%$  и  $25,65 \pm 2,22\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе при овим концентрацијама екстракта је био  $12,54 \pm 2,31\%$  и  $12,75 \pm 2,03\%$



од укупне популације одговарајуће групе култивисаних ћелија. Процент ћелија у раној фази апоптозе нетретираних ћелија је износио  $15,74 \pm 1,17\%$ , а у касној фази апоптозе нетретираних ћелија  $6,44 \pm 1,92\%$  од укупне популације контролне групе ћелија (Графикон 35.).



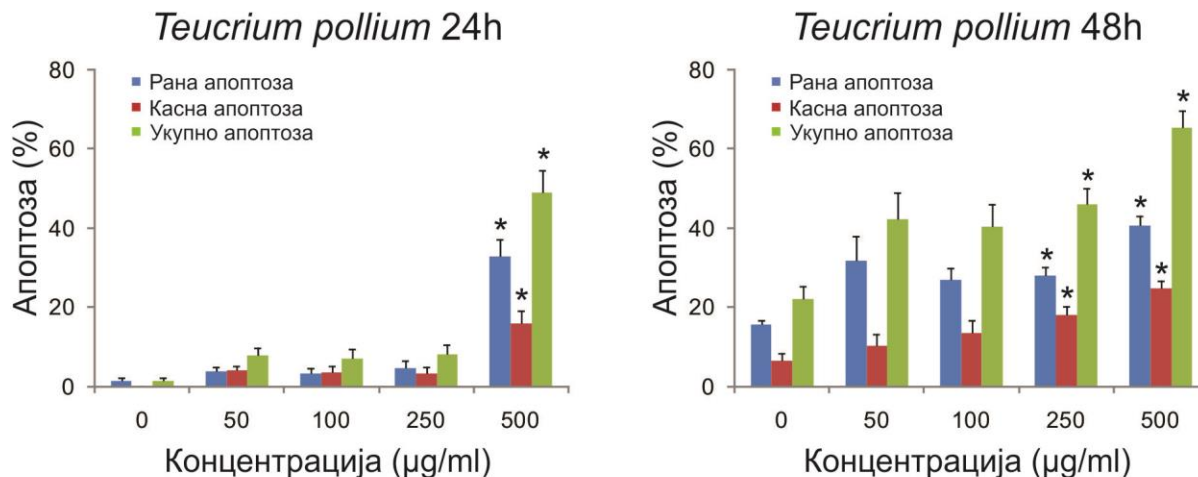
**Графикон 35.** Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на апоптозу ХЛЛ лимфоцита.

#### 4.2.4. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије

После 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 50 µg/ml, 100 µg/ml и 250 µg/ml, није дошло до статистички значајне промене процента апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на проценат апоптотичних нетретираних лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Такође, при овим концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, проценат ћелија које су се налазиле у некој од фаза апоптозе, раној или касној, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). При концентрацији екстракта од 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ). При овој концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, уочено је и статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у

фази ране апоптозе, као и процента ћелија које су се налазиле у фази касне апоптозе ( $p < 0,05$ ). Процент свих апоптотичних ХЛЛ лимфоцита при концентрацији испитиваног екстракта од 500  $\mu\text{g/ml}$  је износио  $48,99 \pm 5,72\%$ , проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $32,89 \pm 4,34\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе је износио  $16,1 \pm 3,09\%$  од укупне популације ХЛЛ лимфоцита третираним екстрактом концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$ . Насупрот томе, укупни проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита контролне групе ћелија је био  $1,4 \pm 0,81\%$ , проценат ћелија у раној фази апоптозе је био  $1,35 \pm 0,79\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе  $0,06 \pm 0,04\%$  од укупне популације нетретираних ХЛЛ лимфоцита.

Након 48 часова култивације ХЛЛ лимфоцита метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium* концентрације 50  $\mu\text{g/ml}$  и 100  $\mu\text{g/ml}$ , није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних ХЛЛ лимфоцита у односу на исту групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Осим тога, при овим концентрацијама екстракта, проценат ћелија које су се налазиле у било којој од фаза апоптозе, раној или касној, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације ХЛЛ лимфоцита ( $p > 0,05$ ). Култивацијом ХЛЛ лимфоцита у присуству концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ) на  $46,21 \pm 5,18\%$  и  $65,36 \pm 5,51\%$  од укупне популације испитиване групе ћелија. Приликом култивације ХЛЛ лимфоцита у трајању од 48 часова метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium* концентрације 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$ , јавља се статистички значајно повећање процента ћелија у фази ране апоптозе, као и процента ћелија у фази касне апоптозе, у односу на контролну групу нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ). Процент ћелија у раној фази апоптозе при концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  је износио  $28,11 \pm 3,14\%$  и  $40,63 \pm 3,56\%$ , а проценат ћелија у касној фази апоптозе при овим концентрацијама екстракта је био  $18,1 \pm 2,73\%$  и  $24,73 \pm 2,15\%$  од укупне популације одговарајуће групе култивисаних ћелија. Процент ћелија у раној фази апоптозе нетретираних ћелија износио  $15,74 \pm 1,17\%$ , а у касној фази апоптозе нетретираних ћелија  $6,44 \pm 1,92\%$  од укупне популације контролне групе ћелија (Графикон 36.).



**Графикон 36.** Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на апоптозу ХЛЛ лимфоцита.

### 4.3. Испитивање механизма индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије дејством хризина и метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*

Биоактивне супстанце које су индуковале апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије су хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*. Обзиром да, од претходно наведених супстанци, највећи проценат апоптотичних ћелија индукују хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, следећи корак је био утврђивање механизма апоптозе којим ове супстанце смањују вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.

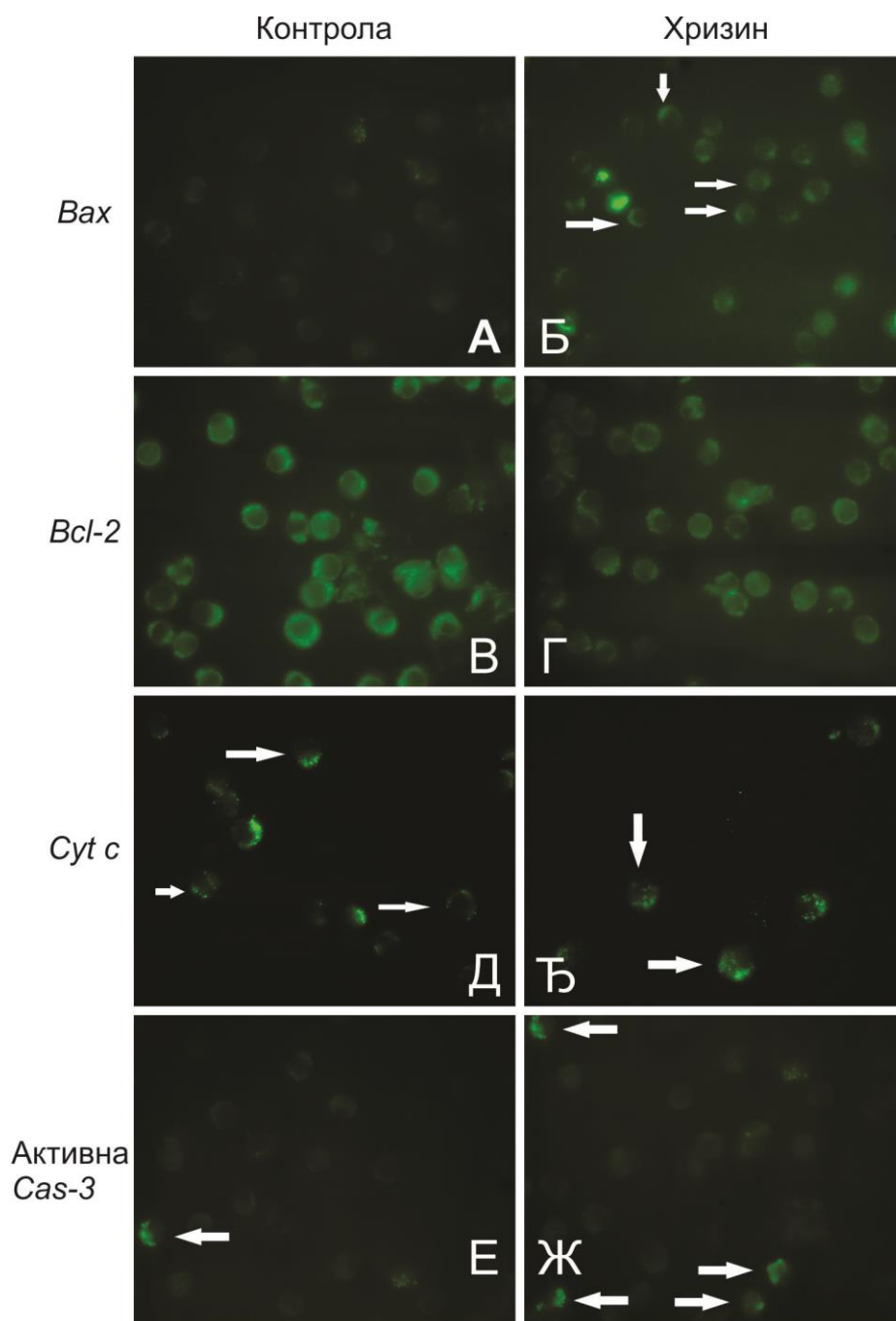
Механизам индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије дејством хризина и метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* је испитан методама имуноцитохемије, којом је испитана промена локализације протеина који имају важну улогу у процесу апоптозе, и методом проточне цитометрије, којом су ове промене квантификоване. Испитивана је промена локализације и степена експресије активне форме

проапоптотичног протеина *Bax*, антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе 3.

#### **4.3.1. Хризин повећава однос *Bax/Bcl-2* и индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије каспаза зависним, митохондријалним сигналним путем**

Методом флуоресцентне микроскопије смо поредили ХЛЛ лимфоците култивисане 24 часа у присуству хризина концентрације 40  $\mu\text{M}$  и контролну групу ХЛЛ лимфоцита нетретираних хризином (слика 2.).

Под дејством хризина концентрације 40  $\mu\text{M}$ , долази до транслокације проапоптотичног протеина *Bax* из цитоплазме у митохондрије ХЛЛ лимфоцита, као и до смањења количине антиапоптотичног протеина *Bcl-2* у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита. Да бисмо испитали да ли хризин индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије митохондријалним сигналним путем, анализирана је локализација цитохрома *c* код обе групе посматраних ћелија. Утврђено је да у групи ћелија култивисаних у присуству хризина концентрације 40  $\mu\text{M}$  долази до повећане транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму у односу на групу контролних ХЛЛ лимфоцита. Такође је утврђено да долази до повећања броја ћелија код којих је присутна активна каспаза-3 у групи ћелија инкубираних у присуству хризина у односу на контролну групу ХЛЛ лимфоцита.

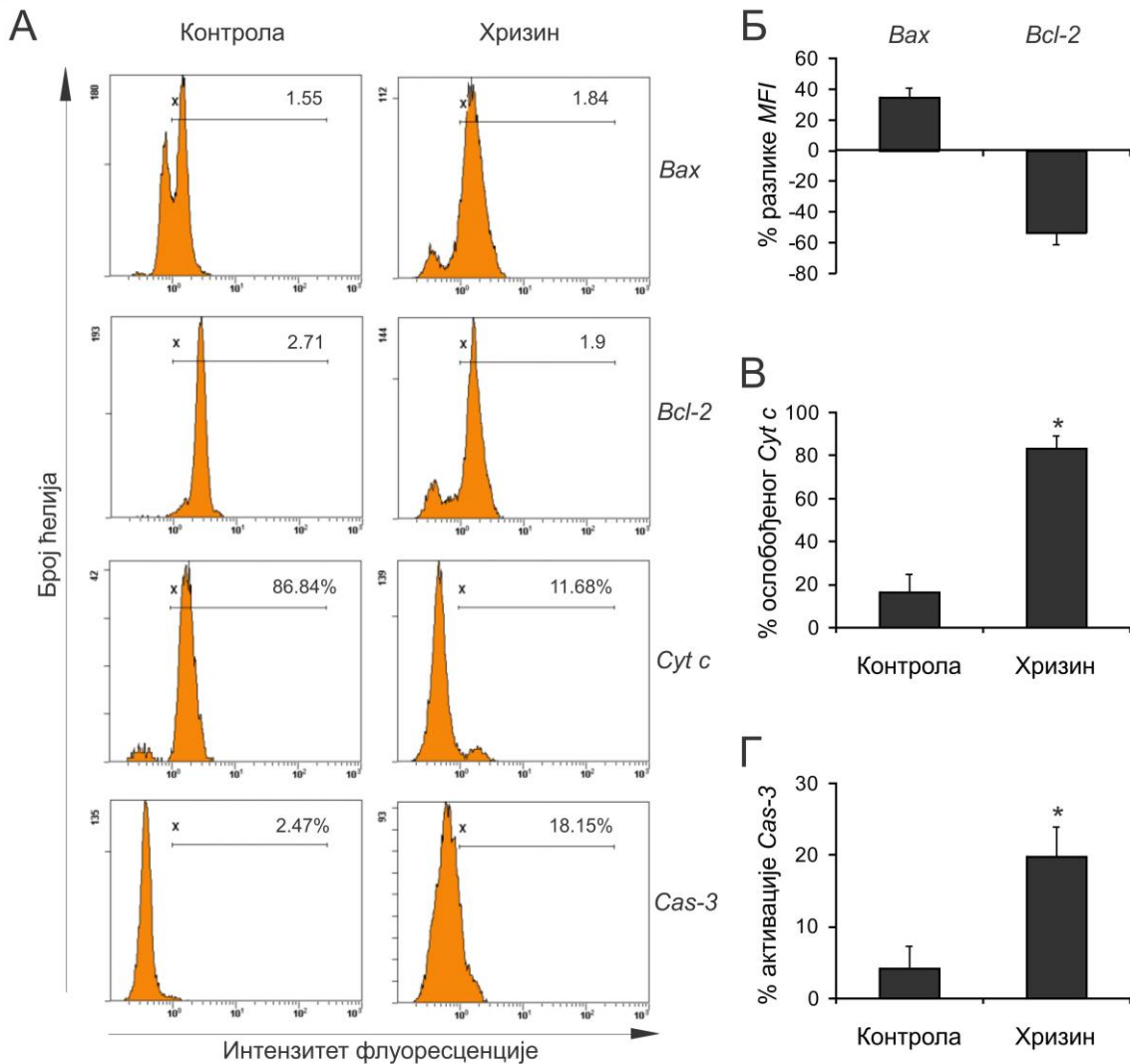


**Слика 2.** Хризин индукује транслокацију протеина *Bax*, смањење количине *Bcl-2* протеина, ослобађање цитохрома *c* у цитоплазму и активацију каспазе-3. (А) Проапоптотични *Bax* је локализован у цитоплазми, а у групи ХЛЛ лимфоцита третираним хризином (Б) протеин *Bax* се повезује са митохондријалном мембраном. Третирани ХЛЛ лимфоцити (Г), експримирају мању флуоресценцију у односу на контролну групу (В), што сугерише да је дошло до смањења експресије антиапоптотичног протеина *Bcl-2*. Хризин

индукује и веће ослобађање цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму (**Б**), у поређењу са нетретираним ћелијама (**Д**). Поред тога, повећава се број ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 у групи ХЛЛ лимфоцита третираним хризином (**Ж**) у поређењу са контролном групом ХЛЛ лимфоцита (**Е**).

Да бисмо промене код ХЛЛ лимфоцита узроковане хризином и уочене имуноцитохемијским бојењем квантификовали, испитали смо просечан интензитет флуоресценције или проценат ћелија које емитују флуоресценцију за одговарајући протеин, методом проточне цитометрије (слика 3.).

Резултати добијени на овај начин, су показали да код ХЛЛ лимфоцита култивисаних 24 часа у присуству хризина концентрације 40  $\mu\text{M}$ , долази до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за проапоптотични протеин *Bax* за  $34,25 \pm 6,29\%$  у односу на контролну групу нетретираних лимфоцита ( $p < 0,05$ ). Истовремено, код ћелија третираних хризином се јавља статистички значајно смањење просечног интензитета флуоресценције за антиапоптотични протеин *Bcl-2* за  $53,71 \pm 7,56\%$  у односу на контролну групу нетретираних лимфоцита ( $p < 0,05$ ). Поред тога, код ћелија култивисаних у присуству хризина концентрације 40  $\mu\text{M}$ , дошло је до статистички значајног повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију за цитохром *c* са  $16,58 \pm 8,36\%$  код контролне групе нетретираних ћелија на  $83,25 \pm 6,21\%$ , ( $p < 0,05$ ). Такође, дошло је до статистички значајног пораста процента ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 у групи ХЛЛ лимфоцита култивисаних у присуству хризина концентрације 40  $\mu\text{M}$  на  $19,68 \pm 4,21\%$ , у односу на контролну групу ХЛЛ лимфоцита код којих је проценат тих ћелија износио  $4,17 \pm 3,08\%$ , ( $p < 0,05$ ).



**Слика 3.** Хризин повећава количину активног протеина *Baх* и снижава количину протеина *Bcl-2*, што индукује ослобађање цитохрома *c* из митохондрија, активацију каспазе-3 и последично индукује апоптозу ХЛЛ лимфоцита. (А) Репрезентативни хистограми који показују *MFI* вредности протеина *Baх* и *Bcl-2* и проценте ћелија које емитују флуоресценцију за цитохром *c* и активну каспазу-3. (Б) Процент повећања или смањења *MFI* вредности за протеине *Baх* и *Bcl-2* у поређењу са нетретираним ћелијама је израчунат по формули  $(Chr-C)*100/C$ , где је *Chr* вредност *MFI* за ћелије третиране хризином, а *C* за контролне ћелије. (В) Транслокација цитохрома *c* је одређена селективном пермеабилizацијом ћелијске мембране, након које је извршено мерење проточном цитометријом. Приказан је проценат ћелија које емитују ниску флуоресценцију (100% - %ћелија које емитују флуоресценцију), код којих је цитохром *c* транслоциран

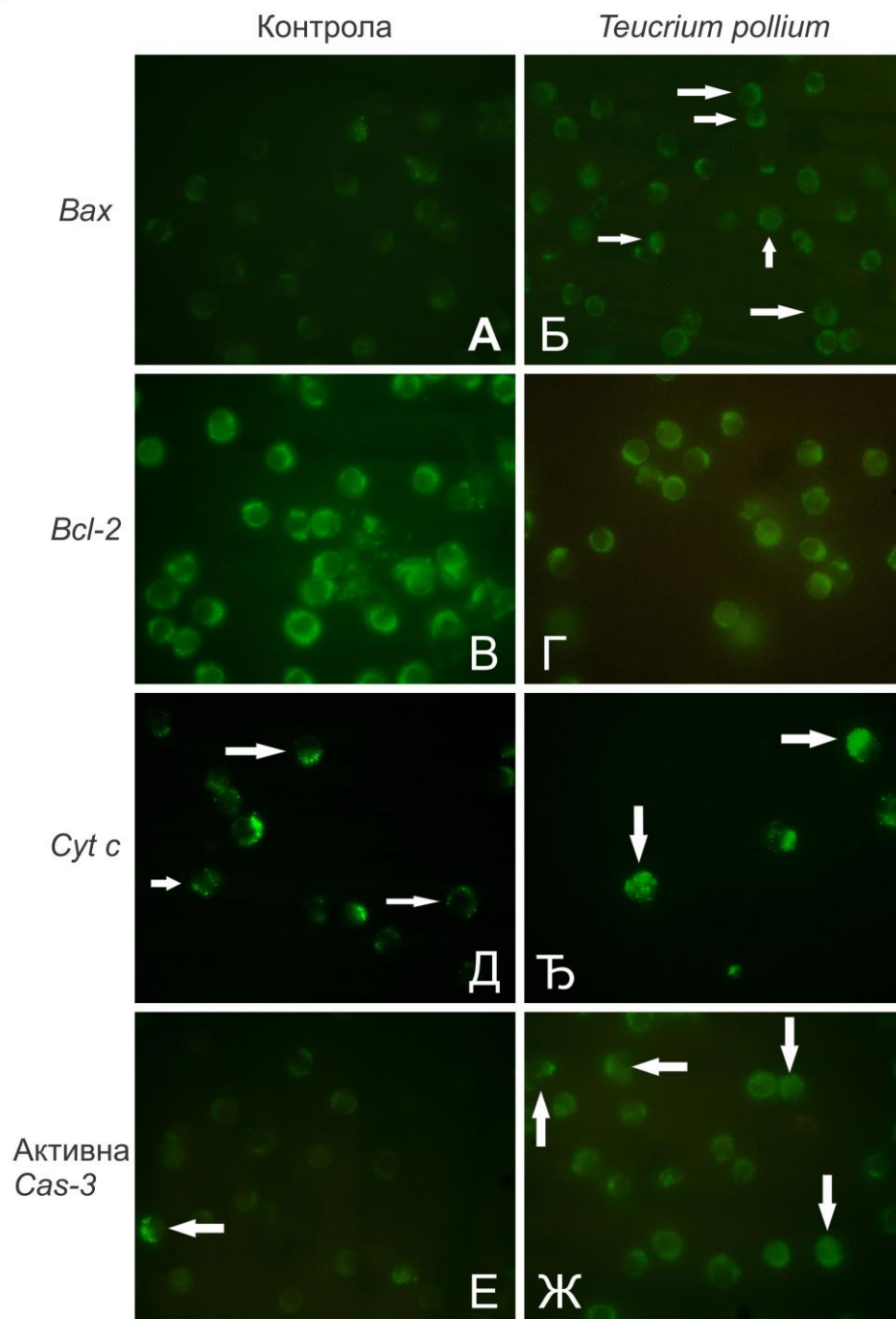
током апоптозе. (Г) Процент ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3. \* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама.

#### **4.3.2. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећава однос *Bax/Bcl-2* и индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије каспаза зависним, митохондријалним сигналним путем**

Методом флуоресцентне микроскопије смо, такође, поредили и ХЛЛ лимфоците култивисане 24 часа у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$  и контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита (слика 4.).

Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$ , делује на ХЛЛ лимфоците тако што код ових ћелија долази до транслокације проапоптотичног протеина *Bax* из цитоплазме у митохондрије, као и до смањења количине антиапоптотичног протеина *Bcl-2* у односу на контролну групу нетретираних ХЛЛ лимфоцита. У циљу испитивања да ли овај екстракт индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије митохондријалним сигналним путем, анализирана је локализација цитохрома *c* код обе групе посматраних ћелија. Утврђено је да у групи ћелија култивисаних у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$  долази до повећане транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму у односу на групу контролних ХЛЛ лимфоцита. Такође је утврђено да долази до повећања броја ћелија код којих је присутна активна каспаза-3 у групи ћелија инкубираних у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* у односу на контролну групу ХЛЛ лимфоцита.



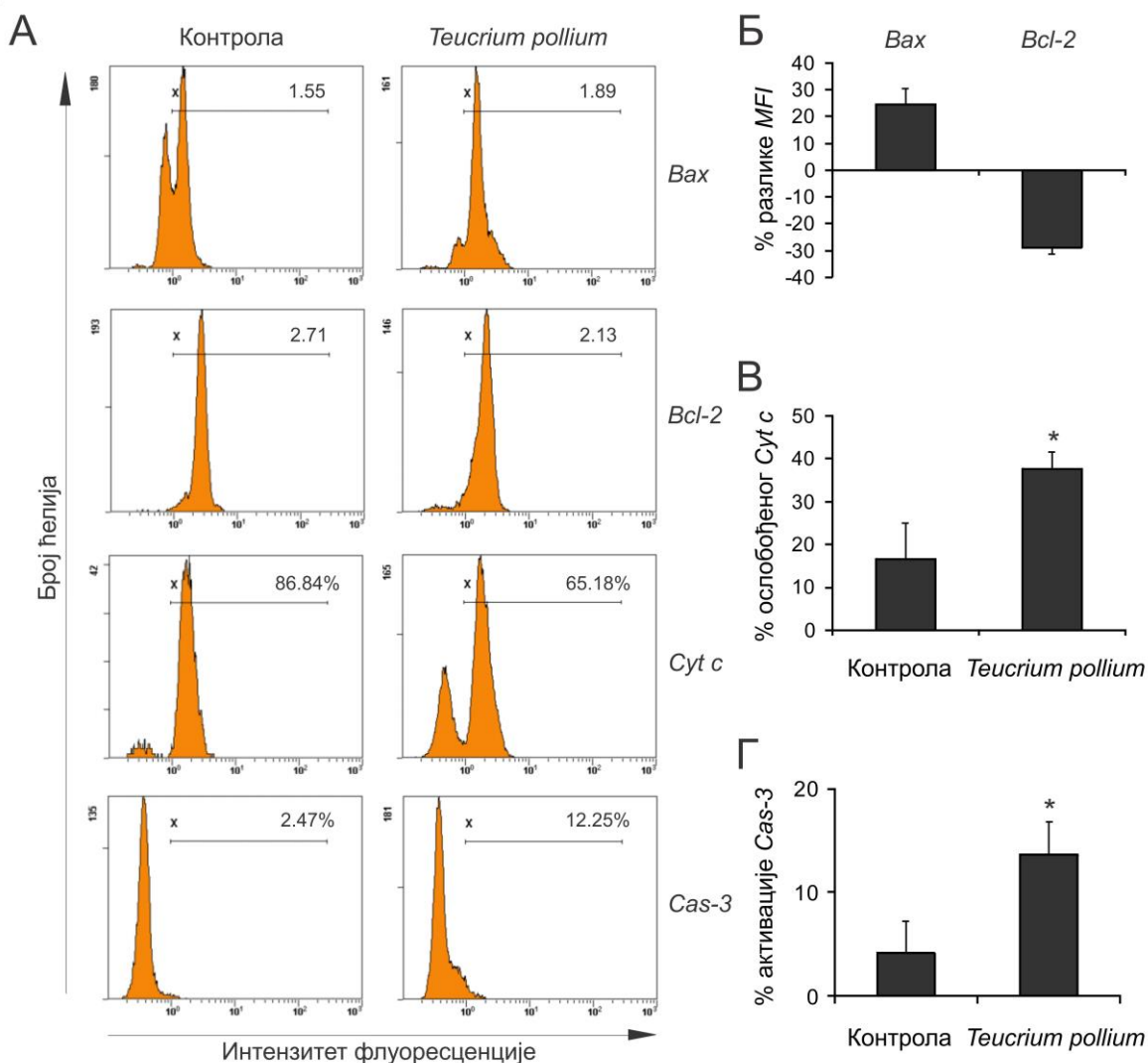


Слика 4. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује транслокацију протеина *Bax*, смањење количине *Bcl-2* протеина, ослобађање цитохрома *c* у цитоплазму и активацију каспазе-3. (А) Проапоптотични *Bax* је локализован у цитоплазми, а у групи ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium* (Б) протеин *Bax* се повезује са митохондријалном мембраном. Третирани

ХЛЛ лимфоцити (Г), емитују мању флуоресценцију у односу на контролну групу (В), што сугерише да је дошло до смањења количине антиапоптоличног протеина *Bcl-2*. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује и веће ослобађање цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму (Ђ), у поређењу са нетретираним ћелијама (Д). Поред тога, повећава се број ћелија са активном каспазом-3 у групи ХЛЛ лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium* (Ж) у поређењу са контролном групом ХЛЛ лимфоцита (Е).

На сличан начин као у случају хризина, и код дејства метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на лимфоците хроничне лимфоцитне леукемије су методом проточне цитометрије квантификоване промене просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) или процента ћелија које емитују флуоресценцију за одговарајући протеин (слика 5.).

Код ХЛЛ лимфоцита култивисаних 24 часа у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$ , долази до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције за проапоптоични протеин *Bax* за  $8,4 \pm 1,07\%$  у односу на контролну групу нетретираних лимфоцита ( $p < 0,05$ ). Поред тога, код ХЛЛ лимфоцита култивисаним овим екстрактом се јавља смањење просечног интензитета флуоресценције антиапоптоличног протеина *Bcl-2* за  $8,3 \pm 1,95\%$  у односу на контролну групу нетретираних лимфоцита ( $p < 0,05$ ). Такође, код ћелија култивисаних у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$ , дошло је до статистички значајног повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију за цитохром *c* за  $47,59 \pm 3,59\%$  у односу на контролну групу нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ ). Осим тога, дошло је и до статистички значајног пораста процента ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 у групи ХЛЛ лимфоцита култивисаних у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$  за  $20,16 \pm 3,27\%$ , у односу на контролну групу ХЛЛ лимфоцита ( $p < 0,05$ ).



**Слика 5.** Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећава количину активног протеина *Bacl-2* и снижава количину протеина *Bcl-2*, што индукује ослобађање цитохрома *c* из митохондрија, активацију каспазе-3 и последично индукује апоптозу ХЛЛ лимфоцита. (А) Репрезентативни хистограми који показују *MFI* вредности протеина *Bacl-2* и *Bcl-2* и процене ћелија које емитују флуоресценцију за цитохром *c* и активну каспазу-3. (Б) Процент повећања или смањења *MFI* вредности за протеине *Bacl-2* и *Bcl-2* у поређењу са нетретираним ћелијама је израчунат по формули  $(TP-C)*100/C$ , где је *TP* вредност *MFI* за ћелије третиране метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium*, а *C* за контролне ћелије. (В) Транслокација цитохрома *c* је одређена селективном пермеабилizацијом ћелијске мембране, након које је извршено мерење проточном

цитометријом. Приказан је проценат ћелија које емитују ниску флуоресценцију (100% - %ћелија које емитују флуоресценцију), код којих је цитохром *c* транслоциран током апоптозе. (Г) Процент ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3. \* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама.

## 5. Дискусија

Терапијске опције за пацијенте оболеле од хроничне лимфоцитне леукемије веома варирају и зависе од старости пацијента, ризичне групе којој пацијент припада и самих разлога за терапију, односно озбиљности симптома које болест узрокује. Велики број пацијената дуго живи са хроничном лимфоцитном леукемијом, али је, генерално, само обољење компликовано за лечење, а рана примена терапије се није показала ефикасном у продужавању животног века пацијената који овакву терапију примају. Због ове чињенице, као и због тога што сама терапија може изазвати бројне нежељене ефекте, саветује се да се са терапијом хроничне лимфоцитне леукемије сачека, док болест не почне да прогредира или док се не појаве неки озбиљнији симптоми. Уколико се процени да је терапија неопходна, потребно је узети у обзир чиниоце као што су старост пацијента, опште здравствено стање пацијента као и присуство неких прогностичких фактора попут делеције 17. или 11. хромозома или високог степена експресије *ZAP-70* и *CD38*.

Велики број нових лекова за потенцијалну примену у терапији хроничне лимфоцитне леукемије се данас налази у фази испитивања. Многи од ових лекова циљају специфичне делове туморских ћелија, док други имају механизам деловања као уобичајени цитостатици. И поред тога што последњих година постоји напредак у лечењу, уобичајени проблеми су и даље присутни. Тако се применом ибрутиниба, инхибитора који се ковалентно везује за Брутонову тирозин киназу и поред тога што долази до сјајног одговора код пацијената са рефракторном хроничном лимфоцитном леукемијом, код 5,3% пацијената јавља прогресија болести (172). Стога је потребно пронаћи агенсе који ће ефикасније лечити хроничну лимфоцитну леукемију и са мање нежељених дејстава.

У нашем истраживању, испитивали смо ефекат 8 различитих биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије. Испитиване су две врсте прополиса различитог географског порекла и последично различитог састава, хризин, флавоноид присутан у прополису и неким врстама биљака, метанолски екстракти листа и плода биљака *Ligustrum vulgare*, метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* и метанолски екстракти гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis*, код којих је већ претходно регистрована антитуморска активност на хуманим туморским ћелијским

линијама (91, 97, 125, 130, 149, 152, 153). Циљ нам је био да утврдимо које од наведених супстанци смањују вијабилност леукемијских ћелија, а не утичу на проценат вијабилних мононуклеарних леукоцита здравих испитаника као и да испитамо њихово дејство на леукемијским ћелијским културама *MOLT-4* и *JVM-13*.

У нашем истраживању, показано је да примена прополиса 1 након 24 и 48 часова инкубације смањује вијабилност ћелија обе испитиване леукемијске ћелијске линије. Прецизније, смањује се вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија већ при концентрацији од 50 µg/ml после 24 часа, а при концентрацији од 10 µg/ml после 48 часова инкубације. Након 24 часа инкубације, прополис 1 смањује проценат вијабилних *JVM-13* ћелија у концентрацији од 50 µg/ml, а после 48 часова при нешто већој концентрацији од 100 µg/ml. При вишим концентрацијама од наведених, прополис 1 такође смањује проценат вијабилних ћелија у односу на нетретиране ћелије код обе леукемијске ћелијске линије. Поред тога, долази и до смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита, али само при концентрацији прополиса 1 од 250 µg/ml након 24 часа инкубације, а продужење инкубационог периода на 48 сати је довело до смањења процента вијабилних ХЛЛ лимфоцита при концентрацији прополиса 1 од 250 µg/ml и 500 µg/ml. Култивацијом здравих мононуклеарних леукоцита од 24 часа у присуству прополиса 1 концентрације 500 µg/ml смањен је проценат вијабилних ћелија, што сугерише да је прополис 1 неселективно токсичан и према здравим и према леукемијским ћелијама.

Култивацијом *MOLT-4* ћелија у присуству растућих концентрација прополиса 2, изазвано је смањење вијабилности испитиваних ћелија при концентрацији од 50 µg/ml након 24 часа, односно 10 µg/ml након 48 часова. Култивацијом *JVM-13* ћелија у присуству прополиса 2 концентрације 50 µg/ml и вишим, дошло је до смањења вијабилности *JVM-13* ћелија након 24 и 48 часова у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије. Култивацијом ХЛЛ лимфоцита у присуству прополиса 2 концентрације 250 µg/ml је смањена вијабилност ХЛЛ лимфоцита након 24 и 48 часова. На жалост, прополис 2 је утицао на смањење вијабилности и здравих мононуклеарних леукоцита након 24 и 48 часова, при релативно високој концентрацији од 500 µg/ml. Међутим, јасно је да и прополис 2, као и прополис 1, неселективно токсично делују и према здравим и према леукемијским ћелијама што значајно умањује њихову потенцијалну улогу у терапији леукемија.

Иако наши резултати указују да прополис 1 и прополис 2 смањују вијабилност *MOLT-4* ћелија, *JVM-13* ћелија и ХЛЛ лимфоцита, али и здравих мононуклеарних леукоцита, постоје студије у којима је показано да прополиси испољавају антитуморски ефекат и при другачијим концентрацијама у односу на оне које су испитиване у нашем истраживању. Тако су Асо и сарадници показали да прополис смањује вијабилност *U937* ћелија хистиоцитног лимфома и то при концентрацијама прополиса од 0,015-0.5  $\mu\text{l/ml}$  (173). Такође, друга врста прополиса је снизила проценат вијабилних ћелија хумане Т акутне лимфобластне леукемије, односно ћелија *CCFR-CEM* ћелијске линије после 24 и 48 часова инкубације (174). Поред тога, и на лимфоцитима изолованим из костне сржи пацијената оболелих од леукемије је показано смањење процента вијабилних ћелија при концентрацији прополиса од 60  $\text{ng/ml}$  након 24, 48 и 72 часа инкубације (175) што се разликује од наших резултата где је исти ефекат постигнут тек при вишим концентрацијама прополиса 1 и прополиса 2. Разлика у резултатима наше и наведених студија би могла бити последица разлике у пореклу испитиваних прополиса и последично другачијег хемијског састава у односу на прополисе наше студије. Јасно је да прополиси из наведених студија испољавају снажније антитуморско дејство, али није показан утицај ових прополиса на вијабилност здравих ћелија, па самим тим њихов терапијски потенцијал није довољно испитан. Сличне резултате као у нашој студији, добили су Мотомура и сарадници. Они су испитивали ефекат прополиса на вијабилност ћелијске линије *U937* ћелија хистиоцитног лимфома после 24 часа инкубације. Резултати њиховог истраживања (176) су показали да прополис смањује вијабилност испитиваних ћелија после 24 часа култивације у концентрацијама већим од 100  $\mu\text{g/ml}$ , а да при концентрацији од 1-100  $\mu\text{g/ml}$  не утиче на вијабилност испитиваних ћелија, што је у сагласности са резултатима наше студије добијеним на леукемијским ћелијским линијама, *MOLT-4* и *JVM-13*.

За прополис 1 и прополис 2 је *LDH* тестом показано да делују цитотоксично на ХЛЛ лимфоците након 48 часова што је у складу са резултатима *MTT* теста. Ипак, резултати *LDH* теста показују да прополиси делују токсично на ХЛЛ лимфоците у свим испитиваним концентрацијама од 50  $\mu\text{g/ml}$  до 500  $\mu\text{g/ml}$ , а не само при концентрацијама од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  као што је показано *MTT* тестом. Могуће је да током тих 48 часова третмана, један део ћелија постаје метаболички активнији услед уласка у апоптозу

па се због тога јавља разлика у резултатима ова два теста. Прецизније, могуће је да се због тога привидно не смањује вијабилност ћелија детектована *MTT* тестом. О утицају прополиса на ослобађање лактат-дехидрогеназе, односно на промену њене активности у супернатанту третираних ћелија, нема литературних података везаних за леукемијске ћелије. Ипак, показано је да повећање концентрације прополиса из Пољске (177) утиче на повећање активност лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних ћелија карцинома простате, што је у складу са резултатима овог истраживања, где су слични ефекти прополиса 1 и прополиса 2 показани на ХЛЛ лимфоцитима.

Један од флавоноида који је нормално присутан у прополису и који се сматра главним „кривцем“ за антитуморски ефекат прополиса и појединих врста биљака је хризин (97). Наше истраживање је показало да хризин смањује вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија, *JVM-13* ћелија и ХЛЛ лимфоцита, а не утиче на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита при испитиваним концентрацијама након 24 и 48 часова инкубације. Прецизније, хризин је смањивао вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија после 24 часа инкубације при концентрацији од 40  $\mu\text{M}$ , а после 48 часова при концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  и 40  $\mu\text{M}$  хризина у односу на нетретиране *MOLT-4* леукемијске ћелије. Такође, хризин је смањивао вијабилност и *JVM-13* леукемијских ћелија после култивације у трајању од 24 и 48 часова при концентрацијама већим од 10  $\mu\text{M}$  у односу на нетретиране ћелије. Поред тога, најснажнији ефекат, хризин је испољио управо на ХЛЛ лимфоцитима, где је смањивао вијабилност ћелија после 24 часа и 48 часова инкубације при свим испитиваним концентрацијама хризина већим од 5  $\mu\text{M}$ . Веома важан резултат је и одсуство било какве промене вијабилности здравих моноклеарних леукоцита након 24 и 48 часова инкубације ових ћелија у присуству хризина у концентрацијама од 1,25  $\mu\text{M}$  до 40  $\mu\text{M}$ , у односу на нетретиране здраве моноклеарне леукоците. Обзиром да је постојала разлика у осетљивости *MOLT-4* леукемијских ћелија, *JVM-13* ћелија и ХЛЛ лимфоцита са једне стране и здравих моноклеарних леукоцита са друге, на цитотоксичност индуковану хризином, односно да је хризин деловао селективно цитотоксично на леукемијске а не на здраве ћелије, следећи корак је био испитивање типа и механизма ћелијске смрти индуковане хризином који је довео до смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита.



Резултати *LDH* теста су показали да хризин делује цитотоксично на ХЛЛ лимфоците након 48 часова култивације у свим испитиваним концентрацијама од 5  $\mu\text{M}$  до 40  $\mu\text{M}$ . Резултати везани за активност лактат-дехидрогеназе у супернатанту ХЛЛ лимфоцита након третмана хризином који су добијени овим истраживањем су у потпуности у сагласности са резултатима *MTT* теста као и резултатима сличних студија, које су испитивале ефекат хризина на другим типовима леукемијских ћелија. Тако је показано да хризин смањује вијабилност *U937* ћелија хистиоцитног лимфома, при чему је доза хризина која је смањивала вијабилност ћелија на 50% била око 16  $\mu\text{M}$  и као такав, показао се као најефикаснији флавоноид у смислу смањења вијабилности овог типа ћелија од 22 испитивана флавоноида (111). Поред тога, хризин у концентрацији од 5  $\mu\text{M}$  је смањио вијабилност и *MO7e* ћелија, ћелијске линије хумане мегакариобластне леукемије, после 24 и 48 часова инкубације (114). Такође, хризин је смањивао вијабилност још две леукемијске ћелијске линије, акутне моноцитне леукемије *THP-1* и хумане промијелоцитне леукемије *HL-60* (115).

У сагласности са резултатима нашег истраживања, су и резултати добијени на *HL-60* ћелијској линији хумане промијелоцитне леукемије. Зуо и сарадници су показали да са повећањем концентрације хризина, долази до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту *HL-60* ћелија (178). Слични резултати су добијени и на ћелијским линијама карцинома простате, плућа и дојке, где је са повећањем концентрације хризина такође долазило до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту испитиваних ћелија (177, 179, 180). Резултати нашег истраживања су показали идентичан ефекат на ћелијама ХЛЛ лимфоцита, где после 48 часова инкубације ових ћелија у присуству растућих концентрација хризина, долази до скока активности лактат-дехидрогеназе у односу на нетретирание ХЛЛ лимфоците што показује да хризин делује цитотоксично на ХЛЛ лимфоците након 48 часова култивације.

Резултати нашег истраживања су показали да је метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* смањио вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија при концентрацијама екстракта већим од 100  $\mu\text{g/ml}$  након 24 часа инкубације, а до смањења вијабилности ових ћелија у односу на нетретирание ћелије је дошло већ при концентрацији екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50  $\mu\text{g/ml}$  и већим, након 48 часова инкубације. Метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* је такође смањивао вијабилност и *JVM-13* ћелија

након 24 часа, при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$ , и након 48 часова инкубације при концентрацији екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и вишим. Сличан ефекат, овај екстракт је испољио и на ХЛЛ лимфоцитима где је смањивао вијабилност ових ћелија након 24 часа при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$ , односно након 48 часова већ при концентрацији од 250  $\mu\text{g/ml}$  у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците. Ни након 24 часа, ни након 48 часова култивације здравих моноклеарних леукоцита у присуству испитиваних концентрација екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 10  $\mu\text{g/ml}$  до 500  $\mu\text{g/ml}$ , није постојала статистички значајна разлика између вредности вијабилности третираних и нетретираних ћелија. На тај начин, наше истраживање је показало да метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* селективно смањује вијабилност леукемијских ћелија, а не утиче на вијабилност здравих ћелија и да може имати обећавајућу антитуморску улогу у даљим истраживањима.

Наше истраживање је, даље, показало да су растуће концентрације метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* деловале на сличан начин на сва 4 типа испитиваних ћелија као и екстракти листа биљке *Ligustrum vulgare*. Наиме, метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* је нешто слабије деловао на *MOLT-4* леукемијске ћелије у односу на екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare*, јер је до смањивања вијабилности ових ћелија доводио при концентрацији од 250  $\mu\text{g/ml}$  и после 24 часа и после 48 часова инкубације. Снажније антилеукемијско дејство у односу на лист биљке *Ligustrum vulgare* је испољио метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* према *JVM-13* ћелијама. Резултати нашег истраживања су показали да је екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* смањивао вијабилност *JVM-13* ћелија након 24 часа при концентрацији од 500  $\mu\text{g/ml}$ , а након 48 часова при концентрацији од 100  $\mu\text{g/ml}$ . Показано је и да метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* делује нешто снажније у односу на екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* на ХЛЛ лимфоците, јер је доводио до смањивања вијабилности ових ћелија при концентрацији екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и након 24 и након 48 часова инкубације. Резултати наше студије су показали да као ни екстракт листа, ни екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* није смањивао вијабилност здравих моноклеарних леукоцита. На тај начин, показано је да метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* селективно смањује вијабилност леукемијских ћелија, а не утиче на

вијабилност здравих ћелија и да може имати обећавајућу антитуморску улогу у даљим истраживањима.

Екстракти биљке *Ligustrum vulgare* још увек нису довољно испитани. Показано је да се у екстрактима могу наћи бројне супстанце попут флавоноида, фенилпропаноида, хидроксицинамата и секоиридоида (181). Иако је за неке од ових супстанци, као што су рецимо флавоноиди, показано да могу испољити антитуморско дејство, још увек нема пуно студија у којима је испитиван ефекат екстраката биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност туморских ћелија. Једна од ретких студија у којој је испитиван антитуморски ефекат екстраката листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* је и студија изведена на ћелијској линији карцинома колоне, односно *HCT-116* ћелијама (125). Резултати ове студије су показали да метанолски екстракт и листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност *HCT-116* ћелија након 24 часа инкубације и да је то смањење вијабилности дозно-зависно, што је у корелацији са резултатима нашег истраживања. Као и у нашој студији, и у истраживању Ђурчића и сарадника је показано да након 24 часа инкубације, екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* ефикасно смањује вијабилност испитиваних ћелија као и екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare*. Ипак, за разлику од нашег истраживања, до смањења вијабилности *HCT-116* ћелија је дошло већ при концентрацији оба екстракта од 10 µg/ml што је знатно мање од вредности екстракта и листа и плода које су биле потребне да смање вијабилност испитиваних леукемијских ћелија у нашем истраживању. Овај податак сугерише на специфичност антитуморског дејства екстраката листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* према одређеном типу туморских ћелија.

Резултати *LDH* тестова у којима је испитан ефекат листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* на ХЛЛ лимфоците након 48 часова су показали да и лист и плод биљке *Ligustrum vulgare* делују цитотоксично на ХЛЛ лимфоците у концентрацијама од 50 µg/ml до 500 µg/ml, што је у складу са резултатима *MTT* теста. Иако је *LDH* тестом показано да екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* делују цитотоксично и при концентрацијама од 50 µg/ml и 100 µg/ml након 48 часова на ХЛЛ лимфоците за разлику од *MTT* теста, могуће је да то смањење вијабилности није било довољно да би се детектовало *MTT* тестом. Ипак, резултати оба теста указују да метанолски екстракт листа

биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* делују селективно цитотоксично на леукемијске ћелије, а не утичу на здраве ћелије.

Још увек не постоје студије у којима је испитиван утицај екстраката листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* на активност лактат-дехидрогеназе у супернатанту туморских ћелија третираних овим екстрактима. Ипак, добијени пораст активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту ХЛЛ лимфоцита третираних екстрактом листа, односно плода биљке *Ligustrum vulgare*, у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците, је свакако у корелацији са резултатима претходно добијеним *MTT* тестом вијабилности ћелија. Наше истраживање је показало да пораст активности лактат-дехидрогеназе у супернатантима ХЛЛ лимфоцита при вишим концентрацијама ових екстраката одговара смањењу вијабилности ХЛЛ лимфоцита добијеним резултатима *MTT* теста.

Пошто је и у овом случају, као и код хризина, постојала разлика у осетљивости *MOLT-4* леукемијских ћелија, *JVM-13* ћелија и ХЛЛ лимфоцита са једне стране и здравих мононуклеарних леукоцита са друге, на цитотоксичност индуковану метанолским екстрактима листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, следећи корак у истраживању у вези наведених екстраката је био испитивање типа и механизма ћелијске смрти индуковане листом, односно плодом биљке *Ligustrum vulgare*, који је довео до смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита.

Следећи корак у нашем истраживању је било испитивање ефекта метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*. Резултати истраживања су показали да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност *MOLT-4* ћелија после 24 часа и 48 часова инкубације, при концентрацијама од 100 µg/ml и већим, у односу на нетретиране ћелије. Истраживање је показало да је смањење вијабилности *JVM-13* ћелија уочљиво након 24 часа инкубације тек при концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 500 µg/ml, али је, као и код претходне леукемијске ћелијске линије, до смањења вијабилности ћелија након 48 часова, дошло при концентрацији екстракта од 100 µg/ml. Поред тога, показано је и да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност ХЛЛ лимфоцита, након 24 и 48 часова, тек при релативно високим концентрацијама екстракта од 250 µg/ml и 500 µg/ml. Нешто слабије дејство екстракта на ХЛЛ лимфоците је могуће објаснити другачијом природом самих ћелија, прецизније механизмом настанка болести или присуством неких супстанци које делују протективно на

ХЛЛ лимфоците, а које су присутне у аутологом серуму који је коришћен за култивацију ових ћелија. Ипак, иако је била потребна нешто већа концентрација екстракта у односу на леукемијске ћелијске линије, *MOLT-4* и *JVM-13*, ипак је дошло до смањења вијабилности и ХЛЛ лимфоцита. Веома значајан резултат нашег истраживања је и одсуство промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на нетретиране здраве мононуклеарне леукоците, након 24 и 48 часова култивације ових ћелија у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*.

Резултати нашег истраживања везани за антитуморски ефекат метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* су у корелацији са резултатима претходних истраживања на ћелијским линијама тумора простате, колона, плућа, коже и меланома (126, 127, 130, 136). И код ових туморских ћелијских линија, као и у нашој студији, примена екстракта биљке *Teucrium pollium* је смањивала вијабилност испитиваних ћелија и то смањење је било повезано са порастом концентрације екстракта, односно, било је дозно-зависно. Станковић и сарадници су показали да су концентрације метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* које су биле потребне да смање вијабилност различитих туморских ћелијских линија након 72 часа инкубације на 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија, биле између 100  $\mu\text{g/ml}$  и 200  $\mu\text{g/ml}$  што је упоредиво са резултатима нашег истраживања. Конкретно, концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* потребна за смањење вијабилности након 72 часа на 50% од почетне вијабилности ћелија је за *HeLa* ћелије аденокарцинома цервикса износила  $148.02 \pm 4.99 \mu\text{g/ml}$ , за *Fem-x* ћелије хуманог меланома је била  $199,79 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$ , а за *K562* ћелије хроничне мијелоидне леукемије ова концентрација је износила  $116.75 \pm 24.40 \mu\text{g/ml}$  (182).

Резултати нашег истраживања су показали да до пораста активности лактат-деhidрогеназе у супернатантима ХЛЛ лимфоцита третираних растућим концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, долази при концентрацијама екстракта од 250  $\mu\text{g/ml}$  и 500  $\mu\text{g/ml}$  након 48 часова инкубације. Ови резултати су у корелацији са резултатима добијеним *MTT* тестом где са порастом концентрације метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* долази до смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита. Слични резултати су добијени и на *HEp-2* ћелијама епителијалног карцинома, где је до скока активности лактат-деhidрогеназе долазило при концентрацијама екстракта биљке *Teucrium pollium* од 500  $\mu\text{g/ml}$ , 750  $\mu\text{g/ml}$  и 1000  $\mu\text{g/ml}$  након 24 часа инкубације ових

ћелија (183). На основу резултата *MTT* теста и *LDH* теста можемо закључити да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* делује цитотоксично на ХЛЛ лимфоците.

Слично као и код хризина и метанолских екстраката листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, и приликом третмана ћелија растућим концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* постојала је разлика у сензитивности *MOLT-4* леукемијских ћелија, *JVM-13* ћелија и ХЛЛ лимфоцита са једне и здравих мононуклеарних леукоцита са друге стране, на цитотоксичност индуковану метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium*. Сходно томе, наредни корак везан за испитивање ефекта метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* је био испитивање типа и механизма ћелијске смрти индуковане овим екстрактом, који је довео до смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита.

Даље, истраживање је обухватало и испитивање утицаја метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на леукемијске ћелије. Почетни резултати који су се односили на ефекат метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на леукемијске лимфоците су били обећавајући. Наиме, резултати истраживања су показали да метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија након 24 часа инкубације већ при концентрацији екстракта од 100 µg/ml и то смањење је било дозно зависно, а након 48 часова инкубације ових ћелија у присуству испитиваног екстракта, до смањења вијабилности је долазило чак при концентрацији од 50 µg/ml. Метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* је већ при концентрацији од 50 µg/ml смањивао вијабилност *JVM-13* ћелија након 24 и 48 часова у односу на нетретиране *JVM-13* ћелије. Међутим, резултати нашег истраживања су показали да метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* испољава дијаметрално супротан ефекат ка ХЛЛ лимфоцитима и здравим мононуклеарним леукоцитима. Прецизније, приликом инкубације ХЛЛ лимфоцита у трајању од 24 и 48 часова у присуству метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* концентрације 100 µg/ml, 250 µg/ml и 500 µg/ml, долазило је до повећања вијабилности ових ћелија. Метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* је повећавао вијабилност и здравих мононуклеарних леукоцита након 24 часа култивације у концентрацији од 500 µg/ml и 48 часова култивације у концентрацији од 250 µg/ml и 500 µg/ml. Наши резултати на ХЛЛ лимфоцитима и здравим мононуклеарним леукоцитима су тако били у супротности и са очекивањима на основу претходно добијених резултата на ћелијским линијама и са резултатима претходних студија (150, 151). Једна од претходно

публикованих студија је показала да алкохолни екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност и индукује апоптозу више ћелијских линија хуманог карцинома колона (*CT26*, *HT-29*, *B16BL6*, *colon 26-M3.1* и *SW480*) (145, 146). Такође је показано да алкохолни екстракт гљиве *Phellinus linteus* концентрације 10 µg/ml смањује вијабилност *K562* ћелија хумане еритроидне леукемије након 24 часа (151). Резултат наведеног истраживања, које су спровели *Shnyreva* и сарадници је сличан резултатима нашег истраживања добијеним на леукемијским ћелијским линијама, *MOLT-4* и *JVM-13*, али је у потпуној супротности са резултатима који су добијени на ХЛЛ лимфоцитима и здравим моноклеарним леукоцитима. Да би се објаснио овакав резултат, потребно је спровести додатна испитивања, али нека од могућих објашњења би могла да буду присуство специфичних молекула у аутологом серуму коришћеног при култивацији ХЛЛ лимфоцита и здравих моноклеарних леукоцита који модификују дејство испитиваног екстракта, као и другачији механизам настанка хроничне лимфоцитне леукемије у односу на друге типове леукемија и друге типове тумора.

Резултати испитивања ефекта метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на ХЛЛ лимфоцитима добијени *MTT* тестом су у корелацији са резултатима нашег истраживања добијеним мерењем активност лактат-дехидрогеназе у супернатантима третираних ХЛЛ лимфоцита. Показано је да је дошло до пада активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту ХЛЛ лимфоцита што одговара повећању вијабилности ХЛЛ лимфоцита које је показано коришћењем *MTT* теста. На тај начин, услед спонтане апоптозе нетретираних ХЛЛ лимфоцита *in vitro* (32) јавља се смањење активности *LDH* у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита у односу на нетретиране ХЛЛ лимфоците. На основу резултата *MTT* теста и *LDH* теста можемо закључити да метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* највероватније инхибира спонтану апоптозу ХЛЛ лимфоцита.

Због контрадикторних резултата који су добијени испитивањем ефекта метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност леукемијских лимфоцита, даља истраживања везана за механизам деловања овог екстракта нису спроведена током овог истраживања, већ ће бити предмет неког од наредних истраживања.

У нашем истраживању испитиван је и ефекат метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност *MOLT-4* леукемијских ћелија, *JVM-13* леукемијских ћелија и ХЛЛ лимфоцита са једне и здравих моноклеарних леукоцита са друге стране.

Резултати истраживања су показали да култивацијом *MOLT-4* ћелија и *JVM-13* ћелија у присуству метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis*, након 24 часа долази до смањења вијабилности одговарајућих ћелија при концентрацији екстракта од 250 µg/ml, а након 48 часова до смањења вијабилности долази већ при концентрацији екстракта од 100 µg/ml у односу на одговарајуће нетретиране ћелије. Наше истраживање је показало да након 48 часова инкубације ћелија у присуству метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* концентрације 250 µg/ml долази и до смањења вијабилности ХЛЛ лимфоцита. Ипак, показано је и да при концентрацији овог екстракта од 500 µg/ml долази до промене вијабилности и здравих мононуклеарних леукоцита након 24 и 48 часова. На тај начин, доказано је да метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* касније делује на ХЛЛ лимфоците, односно тек после 48 часова али у тестираним концентрацијама ипак мења вијабилност и здравих мононуклеарних леукоцита.

Резултати добијени *MTT* тестом везани за *Cordyceps sinensis* су у складу са резултатима претходних студија, али је током нашег истраживања исти ефекат постигнут са 10 пута већим концентрацијама екстракта. Показано је да је екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* индуковао апоптозу хуманих ћелија промијелоцитне леукемије, *HL-60*, смањењем експресије антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, транслокацијом проапоптотичног протеина *Bax* из цитоплазме у митохондрије, ослобађањем цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму и активацијом каспаза -2, -3 и -9 након 24 часа инкубације при концентрацији екстракта од само 25 µg/ml (160). Резултати који су у корелацији са резултатима нашег истраживања су добијени на хуманој ћелијској линији промијелоцитне леукемије, односно *HL-60* ћелијама (162). Наиме, *Zhang* и сарадници су показали да 48-часовном инкубацијом *HL-60* ћелија у присуству екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* долази до смањења вијабилности испитиваних ћелија већ при концентрацији од 25 µg/ml (162), што је опет скоро 10 пута нижа концентрација екстракта од оне која је нама била потребна да изазове сличан ефекат на леукемијским ћелијама и то нарочито на ХЛЛ лимфоцитима.

Резултати које смо добили мерењем активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту ХЛЛ лимфоцита након 48 часова третмана ових ћелија у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* у потпуности су у складу са резултатима вијабилности ћелија добијеним *MTT* тестом. Тачније, са повећањем концентрације екстракта и смањењем процента вијабилних ћелија који смо одредили *MTT*



тестом, долази до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних ХЛЛ лимфоцита. На тај начин је показано да метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* делује цитотоксично на ХЛЛ лимфоците након 48 часова при концентрацији испитиваног екстракта од 100 µg/ml, 250 µg/ml и 500 µg/ml.

Метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* испољава релативно умерен цитотоксични ефекат на леукемијске ћелијске линије, *MOLT-4* и *JVM-13*, а релативно слаб цитотоксични ефекат на ХЛЛ лимфоците. Ипак, пошто мења вијабилност и здравих мононуклеарних леукоцита, даље испитивање механизма деловања овог екстракта неће бити предмет овог истраживања.

На основу досадашњих резултата нашег истраживања применом *MTT* теста вијабилности ћелија, закључено је да су биоактивне супстанце које испољавају „најпожељнији“ ефекат на леукемијске лимфоците, хризин, метанолски екстракт листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*. Ове супстанце смањују вијабилност ћелија обе леукемијске ћелијске линије, *MOLT-4* и *JVM-13*, као и ХЛЛ лимфоцита, а не делују на здраве мононуклеарне леукоците. Цитотоксично дејство ових супстанци на ХЛЛ лимфоците после 48 часова је потврђено и резултатима *LDH* теста. Стога смо у следећем кораку испитали којим типом ћелијске смрти хризин, метанолски екстракт листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањују вијабилност ХЛЛ лимфоцита.

Истраживање је показало да хризин смањује вијабилност ХЛЛ лимфоцита индукцијом апоптозе. Наиме, показано је да је након 24 часа инкубације ових ћелија у присуству хризина концентрације 40 µM, око 50% популације ХЛЛ лимфоцита у некој од фаза апоптозе, било раној или касној. Након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита у присуству хризина концентрације 40 µM, тај проценат је још већи, чак око 70% популације ћелија чине апоптотичне ћелије. Ови резултати су у складу са резултатима које смо добили *MTT* тестом, где је показано да при концентрацији хризина од 40 µM, после 24 часа постоји  $64,91 \pm 7,3\%$  вијабилних ћелија, а после 48 часова око  $43,91 \pm 8,11\%$  вијабилних ћелија. И студије других аутора су показале да хризин смањује вијабилност леукемијских ћелија индукцијом апоптозе. Претходне студије су показале да хризин индукује апоптозу *U937* ћелија хистиоцитног лимфома и *MO7e* ћелија акутне мегакариобластне леукемије (111-114), што је у складу са резултатима који су добијени у

нашем истраживању. Такође, Рамос и Алер су на *THP-1* ћелијској линији акутне моноцитне леукемије, *HL-60* ћелијама акутне промијелоцитне леукемије и *NB4* ћелијама акутне промијелоцитне леукемије показали да хризин индукује апоптозу ових ћелија у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  након 24 часа (115). Иако су резултати ове студије упоредиви са нашим резултатима, по први пут је у нашем истраживању показано да хризин индукује апоптозу ХЛЛ лимфоцита.

Начин на који екстракти биљке *Ligustrum vulgare* делују на туморске ћелијске линије није испитиван у великом броју студија. Ђурчић и сарадници су показали да екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* делују цитотоксично на *HCT-116* ћелије карцинома колона *in vitro* и да смањују вијабилност ових ћелија (125). Исти аутори су акридин-оранж/етиридијум бромид бојењем показали да екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* у концентрацији од 100  $\mu\text{g/ml}$  индукује апоптозу око 48% популације *HCT-116* ћелија, а екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* исте концентрације, након 24 часа инкубације индукује апоптозу око 46% *HCT-116* ћелија (125). Ови резултати су у складу са резултатима наше студије. Наиме, резултати које смо ми добили су показали да већ након 24 часа култивације ХЛЛ лимфоцита у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 500  $\mu\text{g/ml}$  долази до апоптозе леукемијских лимфоцита, а са порастом периода инкубације са 24 часа на 48 часова, проценат апоптотичних ХЛЛ лимфоцита је износио око 45%. Укупан проценат ХЛЛ лимфоцита који су се налазили у некој од фаза апоптозе након 24 или 48 часова, је одговарао проценту смањења вијабилности ћелија израчунатим *MTT* тестом, па можемо закључити да метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност ХЛЛ лимфоцита тако што индукује апоптозу ових ћелија.

Током истраживања одређивано је и на који начин метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност леукемијских лимфоцита. Резултати су показали да је највећи проценат ћелија које нису вијабилне након 24 часа или 48 часова инкубације, припадао популацији апоптотичних ћелија. Тај резултат је стога у сагласности са резултатима претходне студије у којој је показано да се антитуморски ефекат екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* испољава индукцијом апоптозе туморских ћелија (125). Још једна студија је показала да екстракт плода сличне биљке из рода *Ligustrum*, *Ligustrum lucidum*, индукује апоптозу *Bel-7402* ћелијске линије хуманог хепатоцелуларног

карцинома што се слаже са нашим резултатима (184). И у овом случају, на основу резултата које смо добили, можемо закључити да метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност ХЛЛ лимфоцита тако што индукује њихову апоптозу.

Врсте из рода биљака *Teucrium*, су веома богате фенолима и флавоноидима који су носиоци снажних биолошких активности екстраката ове биљке. Екстракти биљке *Teucrium pollium* су у последње време предмет истраживања све већег броја *in vitro* студија у којима се испитује њихов антитуморски потенцијал. Резултати добијени на *HCT-116* ћелијској линији недвосмислено указују да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност ових ћелија индукцијом апоптозе (130). У студији Ђурчића и сарадника, показано је да је након 24 часа инкубације *HCT-116* ћелија у присуству метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 250 µg/ml, дошло до апоптозе око 85% укупне популације ћелија. Резултати нашег истраживања су такође у складу са резултатима наведене студије јер смо показали да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује апоптозу ХЛЛ лимфоцита. Тако је, у нашем истраживању проценат апоптотичних ћелија након 48 часова инкубације ХЛЛ лимфоцита у присуству екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 250 µg/ml износио око 46%. Иако екстракт биљке *Teucrium pollium* није индуковао апоптозу ХЛЛ лимфоцита тако драматично као у студији Ђурчића и сарадника, смањење вијабилности ХЛЛ лимфоцита које смо претходно добили *MTT* тестом, одговара проценту апоптотичних ћелија који смо одредили проточном цитометријом. Стога, можемо закључити да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност ХЛЛ лимфоцита тако што уводи ХЛЛ лимфоците у процес апоптозе.

Очигледно је да све 4 биоактивне супстанце (хризин, метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare*, метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*), које смо испитивали у овом кораку, смањују вијабилност ХЛЛ лимфоцита, односно делују цитотоксично на ХЛЛ лимфоците, тако што индукују њихову апоптозу. Метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* испољавају нешто снажнију проапоптотичну активност тек после 48 часова инкубације. На основу наших резултата можемо закључити да хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* најбрже и најефикасније уводе ХЛЛ

лимфоците у апоптозу од свих испитиваних супстанци. Стога је следећи корак нашег истраживања био испитивање механизма којим ове супстанце индукују апоптозу леукемијских лимфоцита.

У нашем истраживању, по први пут смо показали да је хризин селективно индуковао оштећење митохондрија и апоптозу ХЛЛ лимфоцита и да је смањила вијабилност ћелија две хумане леукемијске ћелијске линије *in vitro* при релативно ниским  $\mu\text{M}$  концентрацијама. Иако би различити чиниоци могли да доприносе антитуморском дејству хризина, наши резултати су показали да је смањење количине антиапоптотичног *Bcl-2* протеина и активација проапоптотичног *Bax* протеина, директно укључена у процес апоптозе ХЛЛ лимфоцита индуковане хризином.

Митохондрије су ћелијске органеле које су укључене у процес извршења апоптозе. Пермеабиланизација спољашње митохондријалне мембране допушта молекулима као што је цитохром *c* да буду ослобођени у цитоплазму и да последично индукују активацију каспаза и апоптозу. Пермеабиланизација спољашње митохондријалне мембране је углавном регулисана протеинима из *Bcl-2* фамилије протеина, као што су проапоптотични *Bax* и антиапоптотични *Bcl-2* протеин (84). Хризин индукује апоптозу повећањем количине *Bcl-2* протеина и активацијом каспазе-3 код *U937* леукемијских ћелија (112). Поред тога, показано је да хризин доводи до поремећаја функције митохондрија код *THP-1* и *HL-60* леукемијских ћелија (115). Резултати нашег истраживања су показали да хризин индукује апоптозу ХЛЛ лимфоцита која је повезана са активацијом проапоптотичног протеина *Bax*, смањењем количине антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, ослобађањем цитохрома *c* из митохондрија у цитосол и активацијом каспазе-3. Слични резултати су добијени у студији која је публикована око 6 месеци након завршетка наших експеримената, у којој је испитивано дејство хризина на *A549* ћелијској линији епителијалног аденокарцинома плућа. Резултати ове студије су показали да хризин повећава транслокацију *Bax* протеина, смањује количину *Bcl-2* протеина и активира каспазу-3 код *A549* ћелија плућа (185). Показано је и да хризин и други слични природни флавоноиди индукују апоптозу Т леукемијских ћелијских линија, смањењем количине антиапоптотичног *Mcl-1* протеина (186). Поред тога и други ћелијски механизми су можда укључени у процес апоптозе ХЛЛ лимфоцита коју индукује хризин. Динг и сарадници су показали да је хризин индуковао

апоптозу *HTLV-1* ћелија адултне Т ћелијске леукемије/лимфома највероватније смањењем количине *Mcl-1* протеина и повећањем количине *TRAIL-R2* протеина (187).

Резултати нашег истраживања су по први пут показали и да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује селективну апоптозу ХЛЛ лимфоцита, тако што доводи до активације проапоптотичног протеина *Bax*, смањења количине антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, ослобађања цитохрома *c* из митохондрија у цитосол и активације каспазе-3. У резултатима студија које су до данас публиковане, постоје само потврде да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* може индуковати апоптозу неких ћелијских линија, али до данас још увек нису прецизно испитани потенцијални ћелијски механизми који су укључени у овај процес (188). Резултати неких претходних студија потенцирају антиоксидативне способности метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, али та истраживања нису изведена на туморским ћелијским линијама (129, 188). Показано је и да метанолски екстракти неких других биљака из рода *Teucrium*, као што су *Teucrium chamaedris*, *Teucrium montanum*, *Teucrium arduini* и *Teucrium scordium*, могу деловати као антиоксиданти (188). Ипак, потребно је спровести додатна испитивања овог екстракта да би се прецизно дефинисала молекулска компонента, једна или више њих, која је носилац биолошке активности метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*. Досадашњи резултати које смо добили у нашим експериментима, свакако отварају могућности за нека нова истраживања.

Иако су додатна испитивања потребна и да би се прецизно расветлио механизам укључен у процес апоптозе ХЛЛ лимфоцита коју индукује хризин, овај агенс има обећавајућу улогу као могући будући хемотерапеутик. Сличну улогу би могла имати молекулска компонента која је носилац биолошке активности метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*.

## 6. Закључак

Анализом резултата овог истраживања, може се закључити:

1. Хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, смањују вијабилност леукемијских ћелија, а не утичу на вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита *in vitro*.
2. Прополиси и метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањују вијабилност леукемијских ћелија, али утичу на вијабилност и здравих мононуклеарних леукоцита.
3. Метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност ћелија леукемијских ћелијских линија *MOLT-4* и *JVM-13*, али повећава вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије и здравих мононуклеарних леукоцита.
4. Хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.
5. Хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећавају релативни однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.

## 7. Литература

1. Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica*. 2011;96(5):752-61.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
3. Billard C. Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(9):2032-8.
4. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-15.
5. Nabhan C, Rosen ST. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA*. 2014;312(21):2265-76.
6. Eichhorst B, Hallek M, Dreyling M; ESMO Guidelines Working Group. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 5:v162-4.
7. Slager SL, Kay NE. Familial chronic lymphocytic leukemia: what does it mean to me? *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9 Suppl 3:S194-7.
8. Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1999;86(12):2684-92.
9. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18(4):783-94.
10. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 1999;17(1):399-408.

11. Kolb JP, Kern C, Quiney C, Roman V, Billard C. Re-establishment of a normal apoptotic process as a therapeutic approach in B-CLL. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003;3(4):261-86.
12. Chen LS, Balakrishnan K, Gandhi V. Inflammation and survival pathways: chronic lymphocytic leukemia as a model system. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1936-45.
13. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology.* 2005;114(4):441-9.
14. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005;115(3):755-64.
15. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-6.
16. Bieging KT, Attardi LD. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol.* 2012;22(2):97-106.
17. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(12):5413-7.
18. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwänen C, Döhner H, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008;112(8):3322-9.
19. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):995-1004.
20. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, Bühler A, Edelmann J, Bergmann M, Hopfinger G, Hensel M, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. TP53



- mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4473-9.
21. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, Dearden CE, Richards SM, Catovsky D, Morgan GJ. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2223-9
  22. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* 2009;23(1):117-24.
  23. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, Cejkova S, Svitakova M, Skuhrova Francova H, Brychtova Y, Doubek M, Brejcha M, Klabusay M, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood.* 2009;114(26):5307-14.
  24. Chiaretti S, Tavolaro S, Marinelli M, Messina M, Del Giudice I, Mauro FR, Santangelo S, Piciocchi A, Peragine N, Truong S, Patten N, Ghia EM, Torrente I, De Propriis MS, Nanni M, Lawrence J, Guarini A, Foà R. Evaluation of TP53 mutations with the AmpliChip p53 research test in chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical outcome and gene expression profiling. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50(4):263-74.
  25. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan CG, Foà R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med.* 2011;208(7):1389-401.
  26. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona

- CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-5.
27. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Beà S, Pinyol M, Martínez-Trillos A, López-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, Hernández JM, González-Díaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubío JM, Royo R, Gelpí JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vázquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayés M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, López-Guillermo A, Puente XS, Campo E, López-Otín C. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;44(1):47-52.
28. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca DS, Zhang L, Zhang W, Vartanov AR, Fernandes SM, Goldstein NR, Folco EG, Cibulskis K, Tesar B, Sievers QL, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub TR, Lander ES, Neuberger D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-506.
29. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, Cerri M, Cresta S, Deambrogi C, Gargiulo E, Gattei V, Forconi F, Bertoni F, Deaglio S, Rabadan R, Pasqualucci L, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8.
30. Gaidano G, Foà R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3432-8.
31. Zenz T, Benner A, Dührsen U, Dürig J, Döhner H, Siffert W, Stilgenbauer S, Nüchel H. BCL2-938C>A polymorphism and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(11):1837-42.

32. Djurdjevic P, Zelen I, Ristic P, Baskic D, Popovic S, Arsenijevic N. Role of decreased production of interleukin-10 and interferon-gamma in spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes in vitro. *Arch Med Res.* 2009;40(5):357-63.
33. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;139(5):709-16.
34. Hanlon K, Rudin CE, Harries LW. Investigating the targets of MIR-15a and MIR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *PLoS One.* 2009;4(9):e7169.
35. Чоловић М. Хронична лимфоцитна леукемија. у, Чоловић М, Јанковић Г. Малигне болести крви, Београд, Завод за уџбеенике и наставна средства, 1999:195-221
36. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-56.
37. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, Beral HM, Natali JC, Raphael M, Nizet B, Follezou JY. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer.* 1977;40(2):855-64.
38. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219-34.
39. Rai KR, Hollweg A. Fludarabine versus chlorambucil: is the debate over? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11 Suppl 1:S7-9.
40. Rai K, Peterson B, Appelbaum F. Long-term survival analysis of the North American Intergroup Study C9011 comparing fludarabine (F) and chlorambucil (C) in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood.* 2009;114(22):A536
41. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(24):1750-7.
42. Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C; French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Randomized

- comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2001;98(8):2319-25.
43. Zhu Q, Tan DC, Samuel M, Chan ES, Linn YC. Fludarabine in comparison to alkylator-based regimen as induction therapy for chronic lymphocytic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(11):2239-45.
  44. Ghia P, Hallek M. Management of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(6):965-72.
  45. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(6):2188-95.
  46. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2825-33.
  47. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, Kantarjian H. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4079-88.
  48. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, Thomas DA, Cortes J, Lerner S, Keating MJ. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(4):975-80.
  49. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Weirda W, Kantarjian H. Extended follow-up of a chemo-immunotherapy regimen FCR as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2005;106:599a.
  50. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the

- level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. *Blood*. 2003;101(4):1422-9.
51. Buggins AG, Mufti GJ, Salisbury J, Codd J, Westwood N, Arno M, Fishlock K, Pagliuca A, Devereux S. Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. *Blood*. 2002;100(5):1715-20.
52. Lepretre S, Aurran T, Mahé B, Cazin B, Tournilhac O, Maisonneuve H, Casasnovas O, Delmer A, Leblond V, Royer B, Corront B, Chevret S, Delépine R, Vaudaux S, Van Den Neste E, Béné MC, Letestu R, Cymbalista F, Feugier P. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012;119(22):5104-10.
53. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, Byrd JC, Czuczman MS, Fayad L, Forero A, Glenn MJ, Gockerman JP, Gordon LI, Harris NL, Hoppe RT, Horwitz SM, Kaminski MS, Kim YH, Lacasce AS, Mughal TI, Nademanee A, Porcu P, Press O, Prosnitz L, Reddy N, Smith MR, Sokol L, Swinnen L, Vose JM, Wierda WG, Yahalom J, Yunus F. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8(3):288-334.
54. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood*. 2013;122(23):3723-34.
55. Wiestner A. Targeting B-Cell receptor signaling for anticancer therapy: the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib induces impressive responses in B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):128-30.
56. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt AR, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson DM, Miller LL, Li D, Jahn TM, Dansey RD, Hallek M, O'Brien SM. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
57. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, Chagorova T, de la Serna J, Dilhuydy MS, Illmer T, Opat S, Owen CJ, Samoylova O, Kreuzer KA, Stilgenbauer S, Döhner H, Langerak AW, Ritgen M, Kneba M, Asikanius E, Humphrey

- K, Wenger M, Hallek M. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-10.
58. Nabhan C, Kay NE. The emerging role of ofatumumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Clin Med Insights Oncol*. 2011;5:45-53.
59. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukariotic cells; *Infection and Immunity* 2005;73(4):1907-1916
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
61. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res*. 2008;103(4):343-51.
62. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*. 1995;82(3):349-52.
63. Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol*. 1994;153(2):507-16.
64. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012;45(6):487-98.
65. Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubinstein AD, Kimchi A. Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(10):556-64.
66. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):966-75.
67. Wang A, Dean D. Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms. *JAMA*. 2007; 298(18):2203-04
68. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays*. 2003;25(9):888-96.
69. Chamond RR, Añón JC, Aguilar CM, Pasadas FG. Apoptosis and disease. *Alergol Immunol Clin*. 1999;14(6):367-374.
70. Singh N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(2):6-16.
71. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

72. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14:1237-43.
73. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.
74. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-20.
75. Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(8):1173-80.
76. Zhao H. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review in "Apoptosis and Medicine". 2012. ISBN 978-953-51-0701-9.
77. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324-37.
78. Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(1):12-20.
79. Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, Lucas DM, Byrd JC. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2144-50.
80. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C45-51.

81. Orrenius S, Zhivotovsky B. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol.* 2005;1(4):188-9
82. Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2012;45(3):217-24.
83. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4). pii: a026716.
84. Reimann M, Schmitt CA. Molecular Basis in Disease Therapy in “Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases: Molecular Mechanisms. Volume 1”. Humana Press Inc. 2007;303-27
85. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798-811.
86. Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, Walter P, Weber P. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition.* 2009;25(11-12):1202-5.
87. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 9B:71S-88S.
88. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(11):1378-86.
89. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:964149.
90. Premratanachai P, Chanchao C. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4(5):337-44.
91. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Nikliński J. The anticancer activity of propolis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012;50(1):25-37.
92. Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;44(3):262-73.
93. Markiewicz-Żukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:50.



94. Markiewicz-Żukowska R, Car H, Naliwajko SK, Sawicka D, Szynaka B, Chyczewski L, Isidorov V, Borawska MH. Ethanolic extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells. *Adv Med Sci.* 2012;57(2):208-16.
95. Kasala ER, Bodduluru LN, Barua CC, Gogoi R. Chrysin and its emerging role in cancer drug resistance. *Chem Biol Interact.* 2015;236:7-8.
96. van Meeuwen JA, Korthagen N, de Jong PC, Piersma AH, van den Berg M. (Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;221(3):372-83.
97. Khoo BY, Chua SL, Balaram P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 2010;11(5):2188-99.
98. Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, Wang LS. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. *Int J Cancer.* 2007;120(9):2019-27.
99. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett.* 2000;153(1-2):51-6.
100. Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(12):2821-31.
101. Saarinen N, Joshi SC, Ahotupa M, Li X, Ammälä J, Mäkelä S, Santti R. No evidence for the in vivo activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;78(3):231-9.
102. Cho H, Yun CW, Park WK, Kong JY, Kim KS, Park Y, Lee S, Kim BK. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol Res.* 2004;49(1):37-43.
103. Woodman OL, Chan ECh. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(11):786-90.
104. Zhang T, Chen X, Qu L, Wu J, Cui R, Zhao Y. Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(23):6097-105.

105. von Brandenstein MG, Ngum Abety A, Depping R, Roth T, Koehler M, Dienes HP, Fries JW. A p38-p65 transcription complex induced by endothelin-1 mediates signal transduction in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(9):1613-22.
106. Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(6):2042-53.
107. Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol In Vitro*. 2009 Aug;23(5):797-807.
108. Parajuli P, Joshee N, Rimando AM, Mittal S, Yadav AK. In vitro antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med*. 2009;75(1):41-8.
109. Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, Muzi MG, Canini A. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *Int J Oncol*. 2010;37(4):973-81.
110. Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, Canini A. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. *Int J Oncol*. 2011;38(2):473-83.
111. Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, López-Moratalla N, Martínez-Irujo JJ. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr Cancer*. 2004;50(1):90-100.
112. Woo KJ, Jeong YJ, Park JW, Kwon TK. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(4):1215-22.
113. Woo KJ, Yoo YH, Park JW, Kwon TK. Bcl-2 attenuates anticancer agents-induced apoptosis by sustained activation of Akt/protein kinase B in U937 cells. *Apoptosis*. 2005;10(6):1333-43.
114. Lee SJ, Yoon JH, Song KS. Chrysin inhibited stem cell factor (SCF)/c-Kit complex-induced cell proliferation in human myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(2):215-25.

115. Ramos AM, Aller P. Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(10):1912-23.
116. Jovanović, B. *Ligustrum*. In *Flora of Republic of Serbia*, 5th ed.; Josifović, M., Ed.; Serbian Academy of Science and Arts: Belgrade, Serbia, 1973; pp. 456–457.
117. Pieroni A, Pachaly P, Huang Y, Van Poel B, Vlietinck AJ. Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae). *J Ethnopharmacol.* 2000;70(3):213-7.
118. Tanahashi T, Takenaka Y, Okazaki N, Koge M, Nagakura N, Nishi T. Secoiridoid glucosides and unusual recycled secoiridoid aglycones from *Ligustrum vulgare*. *Phytochemistry.* 2009;70(17-18):2072-7.
119. Kiss AK, Mańk M, Melzig MF. Dual inhibition of metallopeptidases ACE and NEP by extracts, and iridoids from *Ligustrum vulgare* L. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(2):220-5.
120. Jia C, Huang W, Rayas-Duarte P, Zou Q, Zhang L, Li Y. Hydration, polymerization and rheological properties of frozen gluten-water dough as influenced by thermostable ice structuring protein extract from Chinese privet (*Ligustrum vulgare*) leaves. *J Cereal Sci.* 2014;59(2):132-136.
121. Nagy M, Spilková J, Vrchovska V, Kontseková Z, Sersen F, Mučaji P, Grancai D. Free radical scavenging activity of different extracts and some constituents from the leaves of *Ligustrum vulgare* and *L. delavayanum*. *Fitoterapia.* 2006;77(5):395-7.
122. Mučaji P, Záhradníková A, Bezáková L, Cupáková M, Rauová D, Nagy M. HPLC determination of antilipoxygenase activity of a water infusion of *Ligustrum vulgare* L. leaves and some of its constituents. *Molecules.* 2011;16(10):8198-208.
123. Pieroni A, Pachaly P. An ethnopharmacological study on common privet (*Ligustrum vulgare*) and phillyrea (*Phillyrea latifolia*). *Fitoterapia.* 2000;71 Suppl 1:S89-94.
124. Jantova S, Nagy M, Ruzeková L, Grancai D. Cytotoxic effects of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother Res.* 2001;15(1):22-5.
125. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Banković DD, Cvetković DM, Dačić DS, Marković SD. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic

- extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):2521-34.
126. Kandouz M, Alachkar A, Zhang L, Dekhil H, Chehna F, Yasmeen A, Al Moustafa AE. *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. *J Ethnopharmacol.* 2010;129(3):410-5.
  127. Menichini F, Conforti F, Rigano D, Formisano C, Piozzi F, Senatore F. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chem.* 2009;115:679-86
  128. Tepe B, Degerli S, Arslan S, Malatyali E, Sarikurku C. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia.* 2011;82(2):237-46.
  129. Stankovic M, Niciforovic N, Mihailovic V, Topuzovic M , Solujic S. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Soc Bot Pol.* 81(2):117-122
  130. Stankovic MS, Curcic MG, Zizic JB, Topuzovic MD, Solujic SR, Markovic SD. *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci.* 2011;12(7):4190-205.
  131. Bahramikia S, Yazdanparast R. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother Res.* 2012;26(11):1581-93.
  132. Pacifico S, D'Abrosca B, Scognamiglio M, D'Angelo G, Gallicchio M, Galasso S, Monaco P, Fiorentino A. NMR-based metabolic profiling and in vitro antioxidant and hepatotoxic assessment of partially purified fractions from Golden germander (*Teucrium polium* L.) methanolic extract. *Food Chem.* 2012;135(3):1957-67.
  133. Kasabri V, Afifi FU, Hamdan I. In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):888-96.
  134. Hamdan II, Afifi FU. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2004;93(1):117-21.

135. Nosrati N, Aghazadeh S, Yazdanparast R. Effects of *Teucrium polium* on Insulin Resistance in Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Acupunct Meridian Stud.* 2010;3(2):104-10.
136. Rajabalian S. Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Exp Oncol.* 2008;30(2):133-138.
137. Reis F, Barreira J, Calhelha R, van Griensven L, Ćirić A, Glamočlija J, Soković M, Ferreira I. Chemical characterization of the medicinal mushroom *Phellinus linteus* (Berkeley & Curtis) Teng and contribution of different fractions to its bioactivity. *LWT - Food Sci Tech.* 2014;58:478e485
138. Kang CM, Han DH, Hwang HK, Choi SH, Lee WJ. Anticancer Effect of *Phellinus linteus*; Potential Clinical Application in Treating Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Carcinogene Mutagene.* 2013;S9:001. doi:10.4172/2157-2518.S9-001
139. Alves MJ, Ferreira IC, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med.* 2012;78(16):1707-18.
140. Hur JM, Yang CH, Han SH, Lee SH, You YO, Park JC, Kim KJ. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2004;75(6):603-5.
141. Mei Y, Zhu H, Hu Q, Liu Y, Zhao S, Peng N, Liang Y. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. *Carbohydr Polym.* 2015;124:90-7.
142. Huang HY, Chieh SY, Tso TK, Chien TY, Lin HT, Tsai YC. Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):460-6.
143. Jung JY, Lee IK, Seok SJ, Lee HJ, Kim YH, Yun BS. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *J Appl Microbiol.* 2008;104(6):1824-32.
144. Min BS, Yun BS, Lee HK, Jung HJ, Jung HA, Choi JS. Two novel furan derivatives from *Phellinus linteus* with anti-complement activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16(12):3255-7.

145. Park HJ. Phellinus linteus grown on germinated brown rice Suppress metastasis and Induce Apoptosis of Colon Cancer Cells by suppressing NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathways. *J Funct Foods*. 2015;14:289-98
146. Li G, Kim DH, Kim TD, Park BJ, Park HD, Park JI, Na MK, Kim HC, Hong ND, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. Protein-bound polysaccharide from Phellinus linteus induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett*. 2004;216(2):175-81.
147. Hsieh MJ, Chien SY, Chou YE, Chen CJ, Chen J, Chen MK. Hispolon from Phellinus linteus possesses mediate caspases activation and induces human nasopharyngeal carcinomas cells apoptosis through ERK1/2, JNK1/2 and p38 MAPK pathway. *Phytomedicine*. 2014;21(12):1746-52.
148. Chen W, He FY, Li YQ. The apoptosis effect of hispolon from Phellinus linteus (Berkeley & Curtis) Teng on human epidermoid KB cells. *J Ethnopharmacol*. 2006;105(1-2):280-5.
149. Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao ZJ, Chen CY. Phellinus linteus sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2006;95(3):282-8.
150. Chen YC, Chang HY, Deng JS, Chen JJ, Huang SS, Lin IH, Kuo WL, Chao W, Huang GJ. Hispolon from Phellinus linteus induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in NB4 human leukaemia cells. *Am J Chin Med*. 2013;41(6):1439-57.
151. Shnyreva AV, Song W, van Griensven LJLD. Extracts of Medicinal Mushrooms Agaricus bisporus and Phellinus linteus Induce Proapoptotic Effects in the Human Leukemia Cell Line K562. *Int J Med Mush*. 2010;12(2):167-75.
152. Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from Phellinus linteus on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*. 1999;41(2):157-64.
153. Yue K, Ye M, Zhou Z, Sun W, Lin X. The genus Cordyceps: a chemical and pharmacological review. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(4):474-93.
154. Kuo CF, Chen CC, Luo YH, Huang RY, Chuang WJ, Sheu CC, Lin YS. Cordyceps sinensis mycelium protects mice from group A streptococcal infection. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 8):795-802.

155. Wang Y, Wang M, Ling Y, Fan W, Wang Y, Yin H. Structural determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Am J Chin Med*. 2009;37(5):977-89.
156. Yan XF, Zhang ZM, Yao HY, Guan Y, Zhu JP, Zhang LH, Jia YL, Wang RW. Cardiovascular protection and antioxidant activity of the extracts from the mycelia of *Cordyceps sinensis* act partially via adenosine receptors. *Phytother Res*. 2013;27(11):1597-604.
157. Lee EJ, Jang KH, Im SY, Lee YK, Farooq M, Farhoudi R, Lee DJ. Physico-chemical properties and cytotoxic potential of *Cordyceps sinensis* metabolites. *Nat Prod Res*. 2015;29(5):455-9.
158. Ji NF, Yao LS, Li Y, He W, Yi KS, Huang M. Polysaccharide of *Cordyceps sinensis* enhances cisplatin cytotoxicity in non-small cell lung cancer H157 cell line. *Integr Cancer Ther*. 2011;10(4):359-67.
159. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF, Shiao MS. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest*. 1994;12(6):611-5.
160. Zhang QX, Wu JY. *Cordyceps sinensis* mycelium extract induces human premyelocytic leukemia cell apoptosis through mitochondrion pathway. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232(1):52-7.
161. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci*. 1997;60(25):2349-59.
162. Zhang Q, Wu J, Hu Z, Li D. Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* fungal mycelium. *Life Sci*. 2004;75(24):2911-9.
163. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-4.
164. Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:51-76.

165. Kennedy L, Reynolds J. Protocol for the removal of adherent macrophages. In: Lefkowitz I. Immunology methods manual. Academic press, Harcourt Brace & Company Publishers; 1996:2091-97
166. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
167. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS One*. 2011;6(11):e26908.
168. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
169. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, et al., Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003;101(6):2125-31.
170. Cicala C, Arthos J, Rubbert A, Selig S, Wildt K, Cohen OJ, Fauci AS. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1178-83
171. Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 2003;10(7):853-5.
172. Furman RR, Cheng S, Lu P, Setty M, Perez AR, Guo A, Racchumi J, Xu G, Wu H, Ma J, Steggerda SM, Coleman M, Leslie C, Wang YL. Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2352-4.
173. Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, Ishikawa M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(5):727-30.
174. Gunduz C, Biray C, Kosova B, Yilmaz B, Eroglu Z, Sahin F, Omay SB, Cogulu O. Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity. *Leuk Res*. 2005;29(11):1343-6.
175. Cogulu O, Biray C, Gunduz C, Karaca E, Aksoylar S, Sorkun K, Salih B, Ozkinay F. Effects of Manisa propolis on telomerase activity in leukemia cells obtained from the bone marrow of leukemia patients. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60(7):601-5.



176. Motomura M, Kwon KM, Suh SJ, Lee YC, Kim YK, Lee IS, Kim MS, Kwon DY, Suzuki I, Kim CH. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008;26(1):61-7.
177. Szliszka E, Sokół-Łętowska A, Kucharska AZ, Jaworska D, Czuba ZP, Król W. Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:757628.
178. HeZuo. Effects of Chrysin on the Proliferation, differentiation and Apoptosis of Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cell Line. PhD Thesis. 2009; Nanhua University.
179. Brechbuhl HM, Kachadourian R, Min E, Chan D, Day BJ. Chrysin enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung epithelial cancer cell lines: the role of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258(1):1-9.
180. Hong TB, Rahumatullah A, Yogarajah T, Ahmad M, Yin KB. Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells. *Int J Mol Sci.* 2010;11(3):1057-69.
181. Czerwińska ME, Granica S, Kiss AK. Effects of an aqueous extract from leaves of *Ligustrum vulgare* on mediators of inflammation in a human neutrophils model. *Planta Med.* 2013;79(11):924-32.
182. Stankovic M, Mitrovic T, Matic I, Topuzovic M Stamenkovic S. New Values of *Teucrium* species: in Vitro Study of Cytotoxic Activities of Secondary Metabolites. *Not Bot Horti Agrobo,* 2015, 43(1). doi:10.15835/nbha4319746
183. Shtukmaster S, Ljubuncic P, Bomzon A. The Effect of an Aqueous Extract of *Teucrium polium* on Glutathione Homeostasis In Vitro: A Possible Mechanism of Its Hepatoprotectant Action. *Adv Pharmacol Sci.* 2010;2010:938324.
184. Hu B, Du Q, Deng S, An HM, Pan CF, Shen KP, Xu L, Wei MM, Wang SS. *Ligustrum lucidum* Ait. fruit extract induces apoptosis and cell senescence in human hepatocellular carcinoma cells through upregulation of p21. *Oncol Rep.* 2014;32(3):1037-42.
185. Samarghandian S, Nezhad MA, Mohammadi G. Role of caspases, Bax and Bcl-2 in chrysin-induced apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(6):901-9.

186. Polier G, Giaisi M, Köhler R, Müller WW, Lutz C, Buss EC, Krammer PH, Li-Weber M. Targeting CDK9 by wogonin and related natural flavones potentiates the anti-cancer efficacy of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263. *Int J Cancer*. 2015;136(3):688-98.
187. Ding J, Polier G, Köhler R, Giaisi M, Krammer PH, Li-Weber M. Wogonin and related natural flavones overcome tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein resistance of tumors by down-regulation of c-FLIP protein and up-regulation of TRAIL receptor 2 expression. *J Biol Chem*. 2012;287(1):641-9.
188. Stankovic MS, Curcic MG, Zizic JB, Topuzovic MD, Solujic SR, Markovic SD. Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci*. 2011;12(7):4190-205.

# ПРИЛОГ

## 8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип документације:**

**ТД**

Монографска публикација

**Тип записа:**

**ТЗ**

Текстуални штампани материјал

**Врста рада:**

**ВР**

Докторска дисертација

**Аутор:**

**АУ**

др Милан М. Зарић

**Ментор/коментор:**

**МН**

Проф. др Иванка Р. Зелен

**Наслов рада:**

**НР**

Ефекат биоактивних супстанци на  
вијабилност лимфоцита хроничне  
лимфоцитне леукемије

<b>Језик публикације:</b> ЈП	Српски (ћирилица)
<b>Језик извода:</b> ЈИ	Српски/енглески
<b>Земља публиковања:</b> ЗП	Србија
<b>Уже географско подручје:</b> УГП	Србија
<b>Година:</b> ГО	2015.
<b>Издавач:</b> ИЗ	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> МС	34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
<b>Физичи опис рада:</b> ФО	Дисертација има 124 стране, садржи 8 поглавља, 3 табеле, 5 слика, 36 графикона и 188 референци
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b> ДИ	Клиничка и експериментална интерна медицина
<b>Предметна одредница/ кључне речи</b> ПО	Биоактивне супстанце, вијабилност, хронична лимфоцитна леукемија, лимфоцити
<b>УДК</b>	
<b>Чува се:</b> ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69

## Важна напомена:

МН

## Извод:

ИД

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) настаје због поремећаја равнотеже између апоптозе и пролиферације Б лимфоцита. Преко 70% супстанци које се користе у лечењу тумора су или супстанце природног порекла или супстанце добијене модификацијом природних супстанци.

Основни циљ овог истраживања био је да се испита ефекат две различите врсте прополиса, хризина и метанолских екстраката биљака *Ligustrum vulgare* и *Teucrium pollium* и гљива *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* на вијабилност ћелија леукемијских ћелијских линија *MOLT-4* и *JVM-13*, на вијабилност лимфоцита добијених из крви пацијената оболелих од ХЛЛ-а, као и на вијабилност мононуклеарних леукоцита изолованих из крви здравих особа (контрола).

Утицај наведених биоактивних супстанци на вијабилност ћелија *MOLT-4* ћелија и *JVM-13* ћелија, ХЛЛ лимфоцита, као и на вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита је испитан *MTT* тестом и *LDH* тестом. Тип ћелијске смрти изазван дејством испитиваних супстанци је одређен *Annexin V/7AAD* тестом. Ћелијска локализација и количина протеина укључених у процес апоптозе *Bax*, *Bcl-2*, цитохрома *c* и каспазе-3 је одређена методама проточне цитометрије и флуоресцентном микроскопијом.

Истраживање је показало да хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и биљке *Teucrium pollium* селективно смањују вијабилност леукемијских ћелија а не утичу на здраве мононуклеарне леукоците. Прополиси и метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањују вијабилност леукемијских ћелија, али утичу на вијабилност и здравих мононуклеарних леукоцита, а метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност ћелија леукемијских ћелијских линија *MOLT-4* и *JVM-13*, али повећава вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије и здравих мононуклеарних леукоцита. Хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије. Хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећавају релативни однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до транслокације цитохрома *c* из

митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.

Хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукују апоптозу ХЛЛ лимфоцита митохондријалним путем *in vitro*. Иако су додатна испитивања потребна да би се прецизно расветлио комплетан механизам укључен у процес апоптозе ХЛЛ лимфоцита коју индукују хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, ови агенси имају обећавајућу улогу као будући хемотерапеутици.

**Датум прихватања теме од стране ННВ:** 25.03.2015.

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

Председник:

Проф. др Марина Митровић, ванредни професор  
Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Биохемија

Члан:

Доц. др Соња Мисирлић Денчић, доцент  
Медицинског факултета Универзитета у Београду  
за ужу научну област Биохемија

Члан:

Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор  
Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина

## 8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Documentation type:**

**DT**

Monographic publication

**Type of record:**

**TR**

Textual printed material

**Contents code:**

**CC**

PhD Thesis

**Author:**

**AU**

dr Milan M. Zarić

**Menthor/co-mentor**

**MN**

Prof. dr Ivanka R. Zelen

**Title:**

**TI**

The Effects of Bioactive Compounds on  
Viability of Chronic Lymphocytic Leukemia  
Lymphocytes

**Language of text:**

**LT**

Serbian (Cyrillic)

**Language of abstract:**

Serbian/English

**Country of publication:**

**CP**

Serbia

**Locality of publication:** Serbia  
**LP**

**Publication year:** 2015.  
**PY**

**Publisher:** Author reprint  
**PU**

**Publication place:** 34000 Kragujevac, Serbia  
**PP** Svetozara Markovića 69

**Physical description** Thesis contains 124 pages, 8 chapters,  
**PD** 3 tables, 5 pictures, 36 figures and 188 citations

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Clinical and experimental internal medicine  
**SD**

**Subject/key words:** Bioactive compounds, viability,  
**SKW** chronic lymphocytic leukemia, lymphocytes

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences,  
34000 Kragujevac, Serbia  
Svetozara Markovića 69

**Note:**  
**N**



**Abstract:****AB**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) develops due to an imbalance between apoptosis and proliferation of B lymphocytes. More than 70% of compounds used in the treatment of different types of cancers are derived from natural compounds or produced by modification of natural compounds.

Therefore, in our investigation we examined the cytotoxicity of two different types of propolis, chrysin, methanol extracts of plants *Ligustrum vulgare* and *Teucrium pollium* and fungi *Phellinus linteus* и *Cordyceps sinensis* against two leukemia cell lines, MOLT-4 and JVM-13, peripheral blood lymphocytes isolated from CLL patients and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals (control) *in vitro*.

The effects of these bioactive compounds on viability of MOLT-4 and JVM-13 cell lines, CLL cells derived from CLL patients and PBMCs from healthy subjects were determined by MTT assay and LDH assay. The type of cell death induced by examined compounds was verified by Annexin V/7AAD assay. Intracellular localization and endogenic expression of apoptotic proteins including Bax, Bcl-2, cytochrome c and caspase-3 were determined by flow cytometry and fluorescent microscopy.

Our results demonstrated that exposure of MOLT-4 and JVM-13 cell lines and CLL cells to chrysin, leaf and fruit methanol extracts of *Ligustrum vulgare* and methanol extract of *Teucrium pollium*, selectively decreased viability of these cells populations, but not in the PBMCs derived from healthy subjects. Both types of propolis and methanol extract of *Cordyceps sinensis* decreased viability of leukemic cells, but also influenced on viability of PBMCs from healthy subjects. Methanol extract of *Phellinus linteus* decreased viability of MOLT-4 and JVM-13 cell lines, but increased viability of CLL cells and PBMCs from healthy subjects. Chrysin, leaf and fruit methanol extracts of *Ligustrum vulgare* and methanol extract of *Teucrium pollium* induced apoptosis of CLL cells. Our findings demonstrated that chrysin and methanol extract of *Teucrium pollium* induced the activation of proapoptotic Bax and decrease in the expression of antiapoptotic Bcl-2 protein, induced the release of cytochrome c from mitochondria into cytosol and cleavage/activation of caspase-3, subsequently leading to the activation of apoptosis of CLL cells.

Together, these findings suggest that chrysin and methanol extract of *Teucrium pollium* selectively induce apoptosis of peripheral blood lymphocytes isolated from human chronic

lymphocytic leukemia patients via mitochondrial pathway *in vitro* and that these compounds might have a promising roles as a potential future antileukemic remedies.

**Accepted by the Scientific Board on:** 25.03.2015.  
**ASB**

**Defended on:**  
**DE**

**Thesis defended board**  
**(Degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

President:	Prof. dr Marina Mitrović, Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Member:	Doc. dr Sonja Misirlić Denčić, Assistant Professor of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Belgrade
Member:	Prof. dr Predrag Djurdjević, Associate Proffesor of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

### **8.3 БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА**

Др Милан Зарић, сарадник у звању асистента за предмет Биохемија, запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу од 2008. године. Аутор је и коаутор 6 радова у часописима са рецензијом од чега су 3 рада публикована у часописима од међународног значаја. На пољу свог континуираног стручног усавршавања др Милан Зарић је био активни учесник на бројним међународним и регионалним конгресима посвећеним тематици у области хематологије и лабораторијских истраживања.

Од 2008. године др Милан Зарић је студент Докторских академских студија-изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, модул хематологија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Поседује активно знање енглеског језика и рада на рачунару.

## 8.4 СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Др Милан Зарић је остварио 17,5 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

1. **Zaric M**, Mitrovic M, Nikolic I, Baskic D, Popovic S, Djurdjevic P, Milosavljevic Z, Zelen I. Chrysin Induces Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes Isolated from Human Chronic Lymphocytic leukemia. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(2):189-95. (M22 - 5 бодова)
2. Conlon JM, Mechkarska M, Prajeep M, Arafat K, **Zaric M**, Lukic ML, Attoub S. Transformation of the naturally occurring frog skin peptide, alyteserin-2a into a potent, non-toxic anti-cancer agent. *Amino Acids.* 2013; 44(2):715-23. (M22 - 5 бодова)
3. Nikolic I, Mitrovic M, Zelen I, **Zaric M**, Kastratovic T, Stanojevic M, et al. Inhibitory role of monovalent ions on rat brain cortex adenylyl cyclase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013; 28(5):1061-6 (M23 - 3 бода)
4. Petrovic A, Nikolic I, **Zaric M**, Zelen I, Jovanovic D, Milosavljevic Z. et al. Serum deprivation induces apoptotic cell death in the THESC cell line. *Ser J Exp Clin Res* 2013; 14 (1): 23-28 (M52 - 1,5 бод)
5. Popovic S, Baskic D, Zelen I, Djurdjevic P, **Zaric M**, Arsenijevic N. The Cytotoxicity of Korbazol Against Murine Cancer Cell Lines, *Ser J Exp Clin Res* 2012; 13 (2): 62-67 (M52 - 1,5 бод)
6. **Zarić M**, Mitrović M, Nikolić I, Popović S, Đurđević P, Baskić D, Zelen I. Ispitivanje aktivnosti superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze u plazmi i lizatima limfocita obolelih od hronične limfocitne leukemije. *Med. čas.* 2011; 45(2): 9-16 (M52 - 1,5 бод)

## 8.5 THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

1. **Zaric M**, Mitrovic M, Nikolic I, Baskic D, Popovic S, Djurdjevic P, Milosavljevic Z, Zelen I. Chrysin Induces Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes Isolated from Human Chronic Lymphocytic leukemia. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(2):189-95.
2. Conlon JM, Mechkarska M, Prajeep M, Arafat K, **Zaric M**, Lukic ML, Attoub S. Transformation of the naturally occurring frog skin peptide, alyteserin-2a into a potent, non-toxic anti-cancer agent. *Amino Acids.* 2013; 44(2):715-23.
3. Nikolic I, Mitrovic M, Zelen I, **Zaric M**, Kastratovic T, Stanojevic M, et al. Inhibitory role of monovalent ions on rat brain cortex adenylyl cyclase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013; 28(5):1061-6
4. Petrovic A, Nikolic I, **Zaric M**, Zelen I, Jovanovic D, Milosavljevic Z. et al. Serum deprivation induces apoptotic cell death in the THESC cell line. *Ser J Exp Clin Res* 2013; 14 (1): 23-28
5. Popovic S, Baskic D, Zelen I, Djurdjevic P, **Zaric M**, Arsenijevic N. The Cytotoxicity of Korbazol Against Murine Cancer Cell Lines, *Ser J Exp Clin Res* 2012; 13 (2): 62-67
6. **Zarić M**, Mitrović M, Nikolić I, Popović S, Đurđević P, Baskić D, Zelen I. Activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in plasma and lysates of chronic lymphocytic leukemia patients. *Med. čas.* 2011; 45(2): 9-16

## 8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>
Име и презиме: Милан Зарић
Датум и место рођења: 27.10.1982. Крагујевац
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Биохемија Факултета медицинских наука у Крагујевцу
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Ефекат биоактивних супстанци на вијабилност лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије
Број страница: 124
Број слика: 44
Број библиографских података: 188
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Иванка Зелен, ванредни професор за ужу научну област Биохемија Факултета медицинских наука у Крагујевцу
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 28.11.2014.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-154/9, 30.03.2015.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Марина Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник;</li><li>2. Проф. др Наташа Петронијевић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан;</li><li>3. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;</li><li>4. Доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;</li><li>5. Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан.</li></ol>
Комисија за оцену докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Марина Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник</li><li>2. Доц. др Соња Мисирлић Денчић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан</li><li>3. Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан</li></ol>

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Марина Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник
2. Доц. др Соња Мисирлић Денчић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан
3. Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

Датум одбране дисертације:

**ОБРАЗАЦ 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Зарић М. Милан  
број уписа \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
ЕФЕКАТ БИОАКТИВНИХ СУПСТАНАЦИ НА ВИЈАБИЛНОСТ  
ЛИМФОЦИТА ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ

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

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 28.09.2015.

Зарић Милан



**ОБРАЗАЦ 2.**

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

Име и презиме аутора Милан Зарић  
Број уписа \_\_\_\_\_  
Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ  
Наслов рада ЕФЕКАТ БИОАКТИВНИХ СУБСТАНЦИ НА ВИЈАБИЛНОСТ ЛИМФОЦИТА ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ  
Ментор Проф. др ИВАНКА Р. ЗЕЛЕН

Потписани МИЛАН М. Зарић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 28. 09. 2015.

Зарић Милан

**ОБРАЗАЦ 3.**

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ЕФЕКАТ БИОАКТИВНИХ СУПСТАНАЦИ НА ВИЈАБИЛНОСТ  
ЛИМФОЦИТА ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ  
која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 28.09.2015.

Зоран Милан