



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

др Милан Зарић

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

Докторска дисертација
Ментор: проф. др Иванка Зелен

Крагујевац, 2015. године

Садржај

1. Увод	1
1.1. Хронична лимфоцитна леукемија	1
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
1.2. Програмирана ћелијска смрт	10
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
1.3. Биоактивне супстанце	16
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
2. Циљеви истраживања	26
3. Материјал и методе	27
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. МТТ тест	31
3.8. Тест за одређивање активности лактат-дехидрогеназе (LDH тест)	32
3.9. ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности	33
3.10. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за Вах, Vcl-2, цитохром с и активну каспазу-3	34
3.11. Флуоресцентна микроскопија	35
3.12. Евалуација проточном цитометријом	35
3.13. Снага студије и величина узорка	35
3.14. Статистичка обрада података	36
4. Резултати	37
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	44

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	64
4.2. Биоактивне супстанце индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије	68
4.2.1. Хризин индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије.....	68
4.2.2. Метанолски екстракт листа биљке <i>Ligustrum vulgare</i> индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије	70
4.2.3. Метанолски екстракт плода биљке <i>Ligustrum vulgare</i> индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије	72
4.2.4. Метанолски екстракт биљке <i>Teucrium pollium</i> индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије	74
4.3. Испитивање механизма индукције апоптозе лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије дејством хризина и метанолског екстракта биљке <i>Teucrium pollium</i>...	76
4.3.1. Хризин повећава однос Вах/Bcl-2 и индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије каспаза зависним, митохондријалним сигналним путем.....	77
4.3.2. Метанолски екстракт биљке <i>Teucrium pollium</i> повећава однос Вах/Bcl-2 и индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије каспаза зависним, митохондријалним сигналним путем	81
5. Дискусија	86
6. Закључак	102
7. Литература	103

1. Увод

1.1. Хронична лимфоцитна леукемија

Хронична лимфоцитна леукемија (HLL) 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). Хронична лимфоцитна леукемија представља болест Б лимфоцита у тренутној класификацији хематолошких малигнитета светске здравствене организације, а болест која је раније била позната као Т-HLL, се данас класификује као Т пролимфоцитна леукемија (2). HLL настаје услед онкогене трансформације и клоналне експанзије субпопулације Б лимфоцита који експримирају антигене за CD5, CD19 и CD23, 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 дијагностикује се 15000 нових случајева, а око 5000 људи премине због хроничне лимфоцитне леукемије само у Сједињеним Америчким Државама (5). Просечан број новооткривених пацијената оболелих од HLL-а је 4,2 на 100000 особа годишње. Чешће се јавља код старијих особа, тако да је просечан број новооткривених пацијената оболелих од HLL-а преко 30 на 100000 особа годишње у популацији особа старијих од 80 година. Медијана старости при дијагностиковању HLL-а је 72 године, али је око 10% пацијената млађе од 55 година (6). HLL је најчешћи тип леукемије код одраслих особа чинећи око 27% свих леукемија (5).

1.1.2. Етиологија и патогенеза

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

Резултати истраживања су показали да не постоји повезаност између појаве HLL-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 HLL 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 HLL заправо болест која настаје услед несразмере између пролиферације и апоптозе лимфоцита (14).

Последњих десетак година, показано је да је HLL изузетно хетерогено обољење (4). Ћелије које се јављају код HLL-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 (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 HLL-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 HLL-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 (FISH) се код 80% пацијената детектују неке хромозомске аномалије (31).

Утврђено је и да је протоонкоген BCL2 и његов антиапоптоични протеин Bcl-2 преекспримиран код HLL лимфоцита (32-34). Интересантно је да генетске абнормалности за које се зна да узрокују прекомерну експресију bcl-2, као што је транслокација 14. и 18. хромозома, нису детектоване код пацијената оболелих од HLL-а. Истраживања су показала да је прекомерна експресија 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 (miRNA). Транскрипти ових гена инхибирају експресију других гена узрокујући деградацију информационе РНК или блокирајући процес транскрипције. Делеције гена *miRNA15a* и *miRNA16-1* доводе до прекомерне експресије антиапоптоичног протеина Bcl-2 услед губитка микро РНК-а. Генетским анализама је утврђено да 70% пацијената који болују од HLL-а имају делецију или неку мутацију на генима *miRNA15a* и *miRNA16-1*, па се претпоставља да је то разлог прекомерне експресије Bcl-2 протеина код лимфоцита HLL-а (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 аутомуних 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 код других болесник преживљава 2-3 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 лимфоцита, 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).

Леукемијски лимфоцити могу инфилтрисати различите делове организма попут гастроинтестиналног тракта, плеуре, коже, бронхија и других органа узрокујући клиничку слику карактеристичну за обољење инфилтрованог органа. Инфилтрата 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

Код хроничне лимфоцитне леукемије, дијагноза 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 $> 5 \times 10^9 / l$ и карактеристичан фенотип лимфоцита који експримирају CD19, CD5 и CD23 (5).

Експресија CD20 је обично слаба и малигним лимфоцитима обично недостаје λ или κ ланац (1, 5). Овакав имунофенотип је карактеристичан за лимфоците хроничне лимфоцитне леукемије и користи се за његово разликовање од других лимфопролиферативних поремећаја код којих је терапијски приступ знатно 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 ипита 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 $> 5 \times 10^9 / l$ као и да се потврди клонални карактер лимфоцита проточном цитометријом. Морфолошки, ћелије у HLL-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).

Класификовање пацијената са хроничном лимфоцитном леукемијом по *Rai* и *Binet* методама са одређивањем степена узнатредовалости болести се и даље користи иако оба начина нису ефикасна у одређивању прогнозе ране прогресије болести (табела 1.) (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).

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

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

Оригинална *Rai* класификација је промењена смањивањем група за прогнозу болести са 5 на 3 групе. Модификована *Rai* класификација дефинише HLL као болест ниског ризика уколико пацијенти имају лимфоцитозу са леукемијским ћелијама присутним у крви и/или костној сржи (лимфоидне ћелије > 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 HLL-а. Код ове групе пацијената, код које је унапредовалост болести претходно означена као *Rai* градус 4, се у лабораторијским анализама детектују вредности хемоглобина < 110 g/l или снижен број тромбоцита испод $100 \times 10^9 / l$ (36).

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 < 100 g/l) или тромбоцитопенија (снижен број тромбоцита испод $100 \times 10^9 / l$) без обзира на број подручја са увећањем лимфоидног ткива (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 повећаног преживљавања пацијената који се лече од хроничне лимфоцитне леукемије (табела 2.). Терапија HLL-а се не започиње док се код пацијената не појаве симптоми или знаци који су индиковани за примену терапије (табела 3.).

Табела 2. Категорије лекова који се користе у терапији HLL-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 HLL-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

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 НЛЛ-а (39). Дугорочни резултати 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 НЛЛ-а је довела до тога да он буде основна компонентна тренутних терапијских модалитета (42, 43).

Алкилирајући агенси доводе до погрешног спаривања нуклеотида између различитих 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 НЛЛ-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 НЛЛ-а (5). Стога је примена циклофосфамида и флударабина постала стандард са којим се пореде сви остали хемотерапеутици у терапији НЛЛ-а (5, 44).

Монотерапија моноклонским анти-CD20 антителом, *rituximab*-ом, је јако ефикасна у терапији индолентних лимфома, али није у терапији НЛЛ-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%. 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 НЛЛ-ом код којих је очувана бубрежна функција (48, 49).

Други терапијски режими који су се касније појавили су подразумевали примену моноклонског антитела у комбинацији са једним или више хемотерапеутика. Код скоро

свих се јавио повећан одговор на терапију, већи проценат пацијената који су ушли у ремисију, и продужено време до појаве прогресивне фазе болести у односу на примену само хемотерапеутика (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 HLL-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).

Стога, примена терапијског режима флударабин + циклофосфамид + ритуксимаб би требало да буде стандард код пацијената у релативно добром физичком стању и са очуваном бубрежном функцијом (5, 53). Насупрот томе, код старијих и фрагилнијих 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 HLL-а. Сви ови водичи прихватају значај прецизног дијагностиковања и свима 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 (NCCI, енг. National Comprehensive Cancer Network) препоручује класификовање пацијената на основу резултата флуоресцентне *in situ* хибридизације (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 HLL-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.

Б ћелијски рецептор је круцијалан за развој и прогресију хроничне лимфоцитне леукемије (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 HLL-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 телашаца се не ослобађа у спољашњу средину а и околне ћелије их брзо фагоцитију (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 телашаца 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. tumor necrosis factor receptor 1, TNF-R1), 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. Fas associated death domain, FADD). 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 екстрацелуларних и интрацелуларних фактора. Екстрацелуларни стимулус за апоптозу може бити недостатак хранљивих материја потребних за функционисање ћелије, радијација, као и физички и хемијски стресни фактори (токсини, хипоксија, хипертермија). Интрацелуларни 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). Сам Bcl-2 протеин је прекомерно експримиран код великог броја канцерских ћелија (78). Чланови ове породице протеина управљају пермеабилитетом митохондријалне мембране и регулишу излазак апоптогенних молекула (нарочито цитохрома *c*) и последичну каскадну активацију каспаза. Саму Bcl-2 фамилију 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 (ВН) домена означених ВН1-4 (*Bax*, *Bak* итд.)
3. протеини који садрже само ВН3 домене (*Bad*, *Bid*, *Bim*, *Puma*, *Noxa* итд.)

Постојање ВН 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 антиапоптотичних 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 потребна прекомерна експресија 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, постоје литературни подаци да 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 хемопротеин који је повезан за спољашњу страну унутрашње митохондријалне мембране 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

формирани поре у спољашњој мембрани митохондрија и ући у цитоплазму (81). Цитохром *c* може потом интераговати са Аraf-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 које врше хидролизу пептидних веза које формирају резидеу аспарагинске киселине супстрата у реакцији која је зависна од цистеинских остатака у активном месту каспаза (83).

Иако деловање каспаза може инактивирати молекуле супстрата, оне такође учествују 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), 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“ интрацелуларних 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). Саме биоактивне супстанце 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 карцинома. 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 карцинома 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 балсмовање кадавера, стари Грци и Римљани су га користили као антисептик, а Инке су користиле прополис као антисептик (89, 91, 92). У кинеској култури, прополис је коришћен као помоћно лековито средство у лечењу инфекција и карцинома. 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

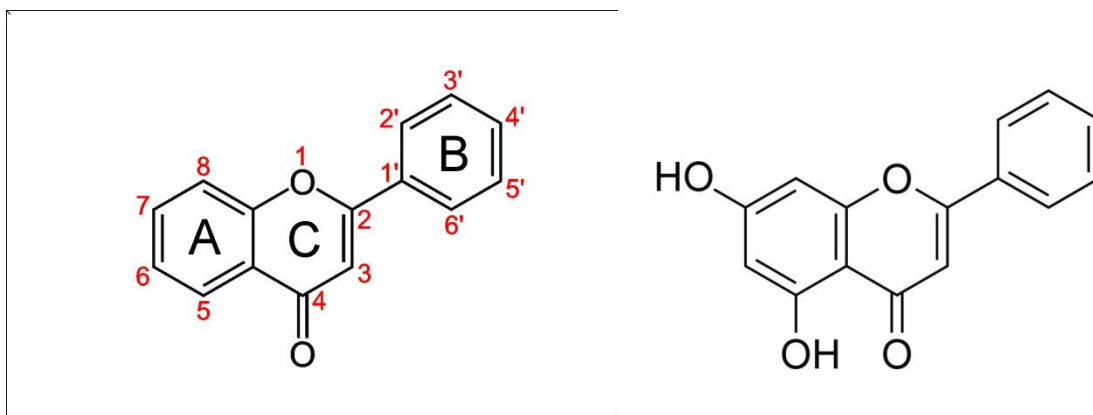
неки есенцијални елементи као што су магнезијум, калцијум, гвожђе, цинк, никл и витамини Б₁, Б₂, Ц и Е (92-94).

Антитуморска својства прополиса су потврђена у великом броју *in vitro* студија у којима су прополиси различитог географског порекла индуковали апоптозу испитиваних канцерских 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 експресије 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 (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 карцинома 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-дихидроксифлаван) 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 флавона (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 гљиви *Pleurotus ostreatus* (94-97, 100). Такође се сматра да је један 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 у *in vitro* условима (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 хуманим канцерским ћелијама, 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) у *in vitro* условима (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 мишјег (B16-F1) и хуманог (A-375) меланома преко каспаза-зависних механизмима (109, 110). Активација

апоптозе ових ћелија била је праћена интрацелуларном 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 MO7е ћелија акутне мегакариобластне леукемије (111-114). Смањење вијабилности U-937 ћелија је било повезано са активацијом каспазе-3 (112). Цитотоксични ефекат хризина је доказан у *in vitro* условима и на ћелијским линијама акутне моноцитне леукемије ТНР-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, лигустрофлавоин 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 карцинома цервикса, наводе на могућност да екстракте биљке *Ligustrum vulgare* треба испитати као потенцијалне антипролиферативне агенсе (124). Различити *in vitro* експерименти 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 на ћелијској линији колоректалног карцинома колоне, HCT-116, после 24 часа у *in vitro* условима. Такође је показано да екстракт листа има израженији антипролиферативни ефекат, него екстракт плода. Комбинација метанолског екстракта листа или плода *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). 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, коњуكتивитиса, а сматра се да поседује антиинфламаторно, антиоксидативно, антимикробно, хипогликемијско, диуретско и аналгетско дејство (127-135).

Показано је да екстракт биљке *Teucrium pollium* инхибира инвазију и смањује покретљивост хуманих ћелија канцера 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, Сасо-2 (127). Такође, метанолски екстракт листа биљке *Teucrium pollium* испољава антипролиферативни и проапоптотични ефекат на ћелијској линији колоректалног карцинома колоне, односно НСТ-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 (КВ ћелије), ендометријалног карцинома (ЕЈ ћелије) и епидермоидног карцинома (А431) (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 *Phellinus linteus*-а, 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 β -D-глюкани 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 карциноме. 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 колоне (СТ26, НТ-29, В16BL6, 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* се 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 имуномолулаторна активност појединих супстанци изолованих из гљиве *Cordyceps sinensis*. Показано је да алкохолни екстракти поспешују фагоцитозу и повећавају активност НК-ћелија код мишева инфицираних стерптококом групе А (154).

Водени екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* садржи полисахарид, који испољава снажну антиоскидатурну 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, *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 *Cordyceps sinensis* инхибирао пролиферацију U937 ћелија хистиоцитног лимфома, а једна ранија студија је потврдила да *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 изолованих из крви пацијената оболелих од HLL-а 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 МТТ тестом и LDH тестом.
2. Утврдити које од ових биоактивних супстанци делују цитотоксично на леукемијске лимфоците 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 HLL 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 узорака крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије који се лече у Клиници за хематологију Клиничког центра „Крагујевац“, као и мононуклеарни леукоцити контролне групе здравих испитаника који су добијени из узорака крви Службе за снабдевање крвљу и крвним продуктима КЦ „Крагујевац“.

3.2. Ћелијске линије

У истраживању су коришћене две хумане леукемијске ћелијске линије и то MOLT-4 (ATCC® CRL-1582™) и JVM 13 (ATCC® CRL-3003™). Обе ћелијске линије су поклон доц. др Соње Денчић (Медицински факултет, Универзитет у Београду, III41025). Ћелијске линије су култивисане на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у комплетном медијуму кога чине: RPMI-1640 са 2mM L-глутамином, 100 IU пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и 10% топлотом инактивисаног феталног телећег серума (енг. *fetal bovine serum*, FBS). 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 HLL-а су били у складу са ревидираним водичима радне групе Националног института за канцер (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, стања или позитивну анамнезу о коришћењу медикамената 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-a (164), а затим је извршено издвајање лимфоцита од моноцита по методи Kennedy и Reynolds-a (165).

3.5. Изолација лимфоцита и моноклеарних леукоцита

У зависности од тога да ли се радило о пацијентима оболелим од HLL-а или о здравим испитаницима, изоловани су лимфоцити или моноклеарни леукоцити из узорак крви. Ујутру је испитаницима узимано 10 ml крви у епрувете обложене антикоагулантним средством (Terumo®, Silicone coated EDTA). Након тога је крв пребачена у стаклене епрувете и 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 теших“ (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 and 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% CO₂ 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

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

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 анти-канцерска 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. dimethyl sulfoxide, DMSO) и разблажени у медијуму при чему финална концентрација диметил-сулфооксида 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 експеримената 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 нетретане ћелије применом МТТ теста (166), као и мерењем активности ослобођене лактат-дехидрогеназе, применом LDH теста (167). Даља истраживања су укључила само оне биоактивне супстанце које нису утицале на вијабилност моноклеара здравих особа, а у испитиваним концентрацијама су деловале цитотоксично на лимфоците леукемијских ћелијских линија MOLT-4 и JVM-13 и

лимфоците изоловане из крви пацијената оболелих од HLL-а. Релативни однос некротичне и апоптотске смрти HLL-лимфоцита изазване испитиваним супстанцама испитан је методом проточне цитометрије бојењем Annexin-ом V и 7-аминоактиномицином D. Имуноцитохемијским бојењем специфичним антителима за Вах, 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 Вах, Bcl-2, цитохром c и активну каспазу-3 прецизно смо одредили просечан ниво експресије Вах-а 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. МТТ тест

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

Принцип: МТТ (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 формазана. Интензитет боје је мерен на ELISA читачу (Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments) читавањем на таласној дужини од 595nm.

Тест се изводи у микротитар плочи са 96 бунара. Сваки узорак је рађен у трипликату. Приликом извођења МТТ теста на лимфоцитима HLL-а или моноклеарним 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 од 1,25 μ M до 40 μ M (1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M и 40 μ M). Концентрације осталих тестираних биоактивних супстанци су биле од 10 μ g/ml до 500 μ g/ml (10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml и 500 μ g/ml). Све супстанце су прво растворене у диметил-сулфоксиду (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 μ l.

Радни раствор МТТ-а се добија из штока МТТ-а (5mg/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 μ l радног раствора МТТ-а и ћелије су инкубирани још 4 часа на 37°C у атмосфери са 5% CO₂. Потом су плоче центрифугиране 5 минута на 400xg, супернатант је пажљиво извучен, а у сваки бунарчић је додато 150 μ 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].

Цитотоксични ефекат биоактивне супстанце смо изразили као LC₅₀ вредност (Lethal Concentration). У том случају, LC₅₀ вредност је концентрација која убија 50% ћелија и она је израчунавана коришћењем Microsoft Office Excel-а 2010.

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

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% CO₂. Након инкубације, плоча се центрифугира 5 минута на 400xg, а супернатант се из сваког бунара пребацује у нову микротитар плочу (167).

Мерење активности лактат-дехидрогеназе (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⁺. 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 (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 реагенса 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 1×10^6 /ml. Након тога, у 100 μ l суспензије ћелија додато је 10 μ l Annexin-V-FITC-а и 20 μ l 7-AAD. Потом су ћелије инкубиране 15 минута у мраку. Затим је садржај епрувета ресуспендован у 400 μ l везујућег пуфера и анализиран на проточном цитометру (The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter) до 20000 догађаја на

популацији лимфоцита. Проценти ране и касне апоптозе и некрозе лимфоцита су одређени коришћењем СХР Cytometer софтвера и Flowing software-a 2.5.

3.10. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за Вах, Bcl-2, цитохром с и активну каспазу-3

Да бисмо објаснили механизам настанка апоптозе, анализирано је присуство проапоптотичног протеина Вах, антиапоптотичног протеина Bcl-2, цитохрома с 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 $2 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$, фиксирани и пермеабилисани (Fixation and Permeabilization Kit, eBioscience). Након тога следи инкубација од 20 минута раствором који садржи 0,2 М глицина, 20 μl козјег серума и 30 μl 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), пермеабилисане ћелије су инкубирани 15 минута на собној температури са антителом за Bcl-2 у разблажењу 1:800 (Bcl-2 fluorescein isothiocyanate primary antibody, mhbc101, Life technologies). Преостале три групе ћелија су инкубирани 30 минута на собној температури са примарним антителима за Вах (N20, sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc), цитохром с (G7421, Promega) и активну каспазу-3 (#9661, Cell signaling Technology). Затим су ћелије опране PBS-ом и инкубирани 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 с и goat to rabbit IgG FITC (Ab6717-1, Abcam) за Вах и каспазу-3 које је добијено од доц. др Ивана Јовановића (Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу). Све четири групе ћелија су потом опране и ресуспендоване у PBS-у и анализирани флуоресцентним микроскопом и на проточном цитометру.

3.11. Флуоресцентна микроскопија

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

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

3.12. Евалуација проточном цитометријом

Проточном цитометријом су квантификовани протеини Вах, Bcl-2, цитохром с 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 (mean fluorescence intensity, MFI) за Вах и Bcl-2 је израчунат као однос флуоресценције одговарајућег протеина (raw mean channel fluorescence) и флуоресценције изотипске контроле. Квантификација цитохрома с 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 (α) 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 (ρ^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 лимфоцита

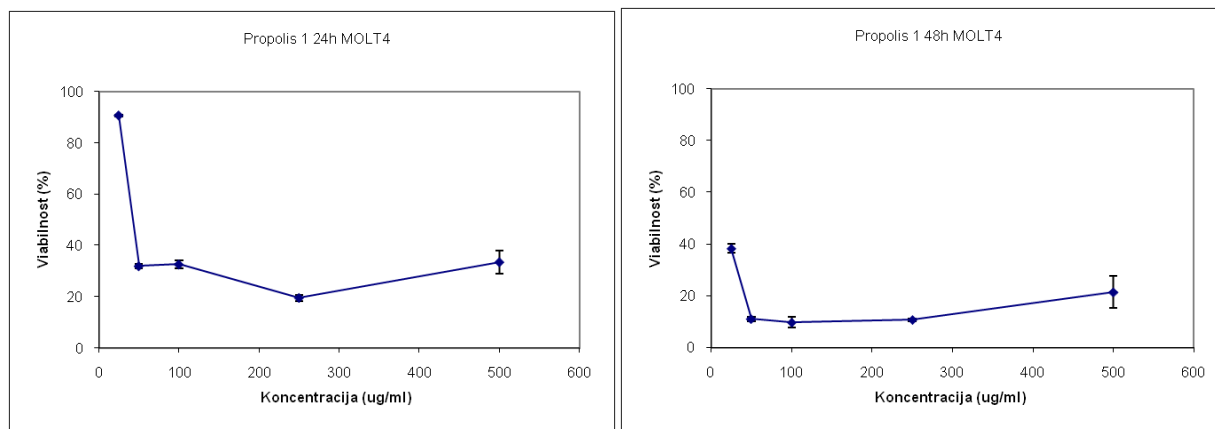
Утицај свих биоактивних супстанци одређиван је после култивације ћелија у присуству испитиваних супстанци у трајању од 24 и 48 часова, применом МТТ теста вијабилности ћелија и LDH теста.

4.1.1. Утицај прополиса 1 на вијабилност леукемијских лимфоцита

Истраживање је показало да примена прополиса 1 статистички значајно смањује вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита већ након култивације од 24 часа у концентрацији од 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 лимфоцита је уочљиво одмах након третмана најмањом испитиваном концентрацијом од 25 $\mu\text{g/ml}$, при којој је вијабилност смањена на $38,26 \pm 1,78 \%$ у односу на вијабилност нетретираних лимфоцита ($p < 0,05$). Такође, и концентрације прополиса 1 од 50 $\mu\text{g/ml}$ до 500 $\mu\text{g/ml}$ статистички значајно смањују вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита ($p < 0,05$). При концентрацијама прополиса 1 од 500 $\mu\text{g/ml}$ уочен је благи пораст вијабилности MOLT-4 леукемијских лимфоцита у односу на вијабилност при

концентрацији од 250 $\mu\text{g/ml}$, али та разлика није статистички значајна ($p>0,05$) (Графикон 1.).

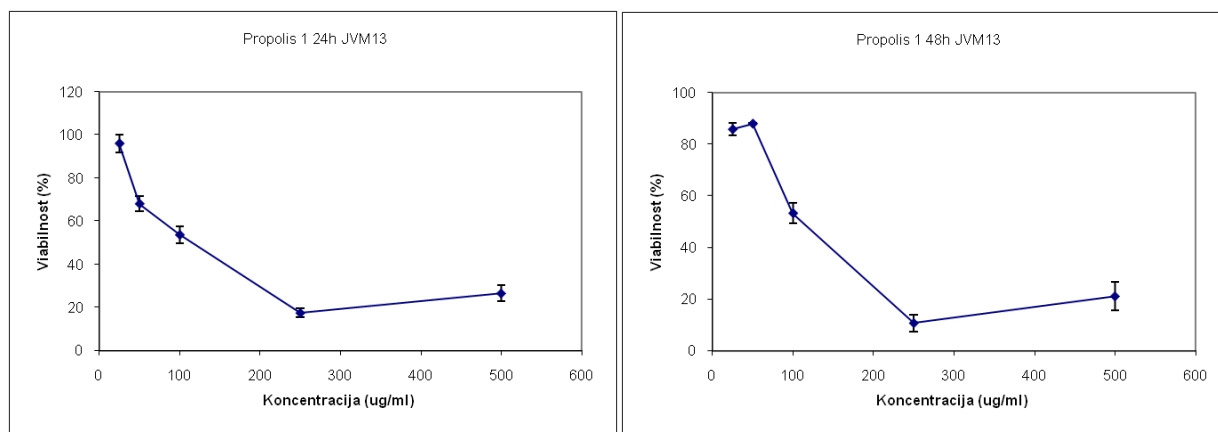


Графикон 1. Утицај прополиса 1 на вијабилност MOLT-4 ћелија.

Култивацијом JVM-13 ћелија у присуству растућих концентрација прополиса 1, такође долази до смањења вијабилности ћелија у односу на нетретиране 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 нетретиране 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 $\mu\text{g/ml}$.

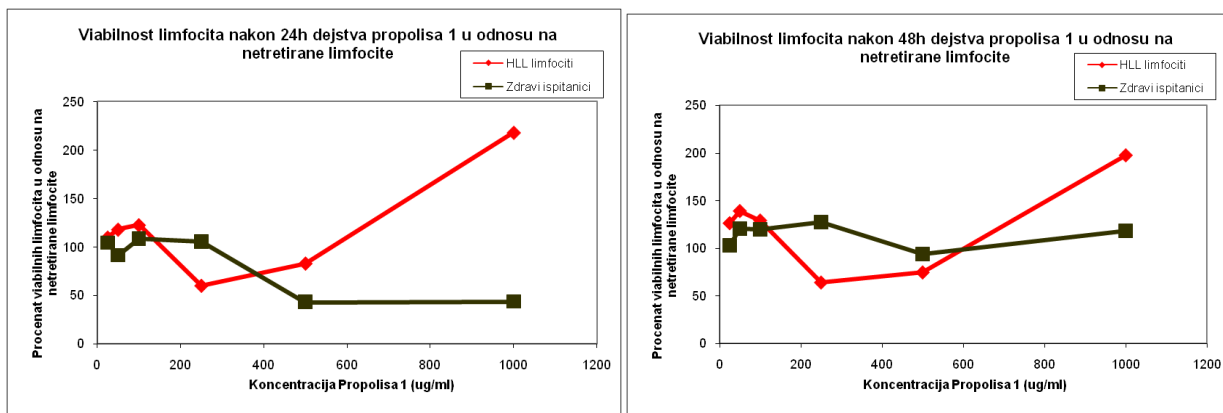
Прополис 1 је најснажније деловао на JVM-13 ћелије при концентрацији од 250 $\mu\text{g/ml}$ где је након 24 часа смањивао вијабилност JVM-13 ћелија на $17,48 \pm 2,16 \%$, а након 48 часова култивације на $10,69 \pm 3,14 \%$ у односу на нетретиране JVM-13 ћелије (Графикон 2.).



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

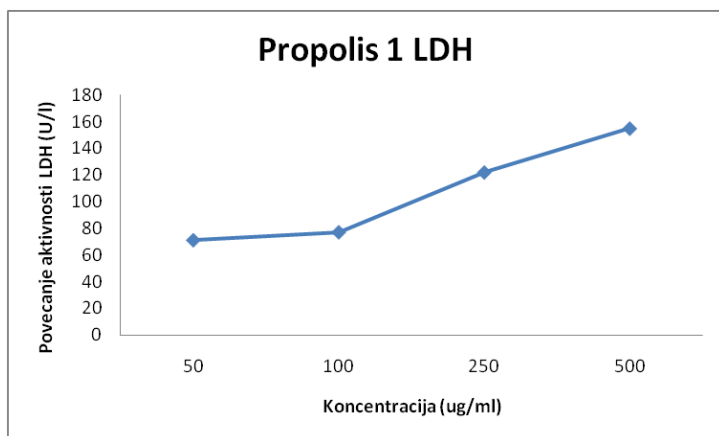
Након 24 часа инкубације лимфоцита изолованих из крви пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије утврђено је да само при вредностима прополиса 1 од 250 µg/ml долази до статистички значајног смањења вијабилности на $59,77 \pm 4,61$ % у односу на нетретиране лимфоците ($p < 0,05$). При концентрацијама прополиса од 1000 µg/ml долази до статистички значајног повећања вијабилности HLL лимфоцита на $218,16 \pm 14,7$ % у односу на нетретиране лимфоците ($p < 0,05$). Након 48 часова инкубације HLL лимфоцита у присуству прополиса 1 при концентрацијама од 250 и 500 µg/ml долази до статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита на $64,38 \pm 7,84$ % и $74,96 \pm 6,24$ %, ($p < 0,05$). При концентрацији од 1000 µg/ml и након 48 часова инкубације долази до статистички значајног повећања вијабилности HLL лимфоцита на $197,76 \pm 18,16$ %.

Након 24 часа инкубације мононуклеарних леукоцита 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 и 1000 µg/ml, дошло је до статистички значајног смањења вијабилности на $42,92 \pm 6,41$ % и $43,58 \pm 7,13$ % 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 HLL лимфоцита и здравих моноклеарних леукоцита.

Анализом активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита након 48 часова инкубације у присуству растућих концентрација прополиса 1, добили смо повећање активности LDH у односу на нетретиране лимфоците које је било дозно зависно. Највећи пораст активности LDH био је при концентрацији прополиса 1 од 500 $\mu\text{g/ml}$ и износио је 155 U/l (Графикон 4.).

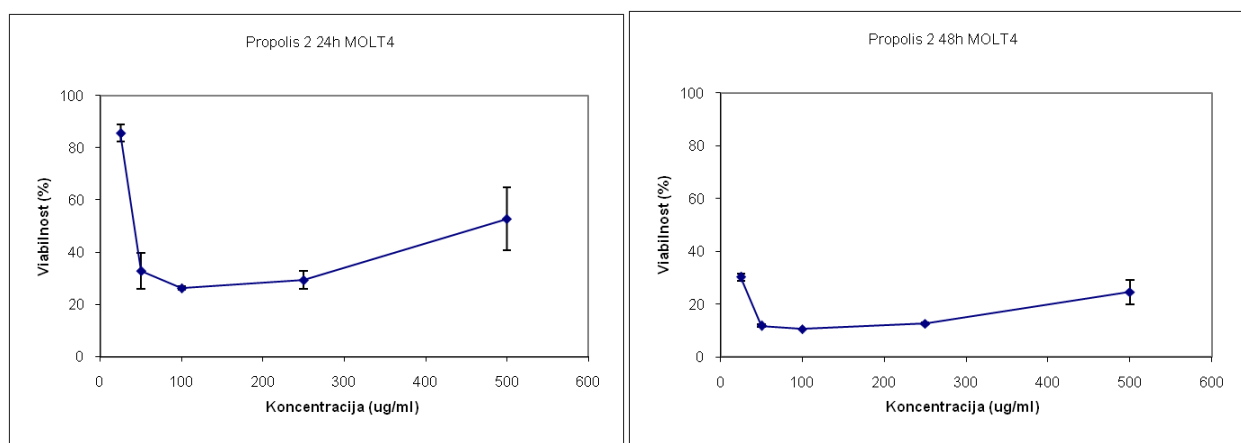


Графикон 4. Апсолутна разлика у активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним прополисом 1.

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 лимфоцита 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 лимфоцита одмах након третмана најнижом испитиваном концентрацијом од 25 $\mu\text{g/ml}$, при којој је вијабилност смањена на $30,21 \pm 1,27 \%$ у односу на вијабилност нетретираних лимфоцита ($p < 0,05$). Највеће смањење вијабилности MOLT-4 леукемијских лимфоцита 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 лимфоцита, уочава се благо повећање вијабилности лимфоцита, али то повећање није статистички значајно у односу на концентрације од 50 $\mu\text{g/ml}$ и 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p > 0,05$) (Графикон 5.).



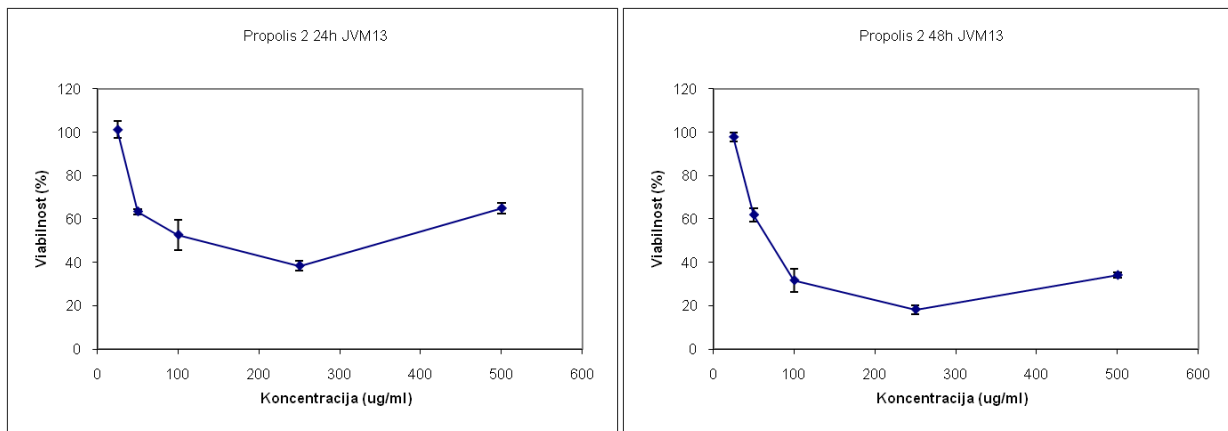
Графикон 5. Утицај прополиса 2 на вијабилност MOLT-4 ћелија.

У присуству растућих концентрација прополиса 2, такође долази до смањења вијабилности JVM-13 леукемијских лимфоцита 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 $26,55 \pm 3,82\%$ 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 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.

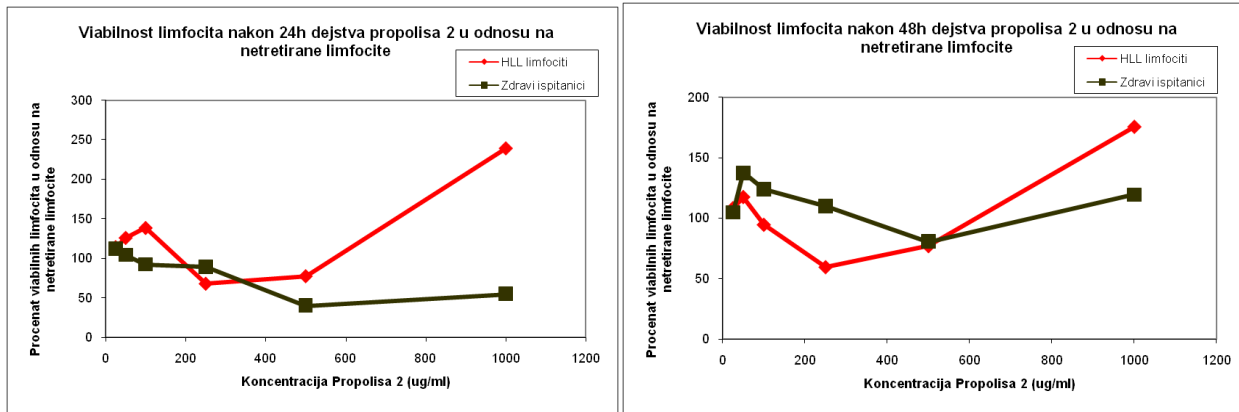
Након 24 часа култивације HLL лимфоцита у присуству прополиса 2 при концентрацији од 250 $\mu\text{g/ml}$ долази до статистички значајног смањења вијабилности HLL

лимфоцита на $67,65 \pm 8,11$ % у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$). При нижим концентрацијама прополиса 2 од 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 HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Ипак, при концентрацији прополиса 2 од 1000 $\mu\text{g/ml}$, долази до статистички значајног повећања вијабилности HLL лимфоцита на $238,84 \pm 15,88$ % у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$).

Након 48 часова култивације HLL лимфоцита у присуству прополиса 2, такође долази до статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита на $59,71 \pm 7,63$ % при концентрацији од 250 $\mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$). Као и после 24 часа инкубације, ни овде не долази до промене вијабилности HLL лимфоцита при концентрацијама прополиса 2 од 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, као ни при концентрацији од 500 $\mu\text{g/ml}$ ($p > 0,05$). Интересантно је да прополис 2 у концентрацији од 1000 $\mu\text{g/ml}$ и после 48 часова статистички значајно повећава вијабилност HLL лимфоцита на $175,61 \pm 16,07$ % у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$).

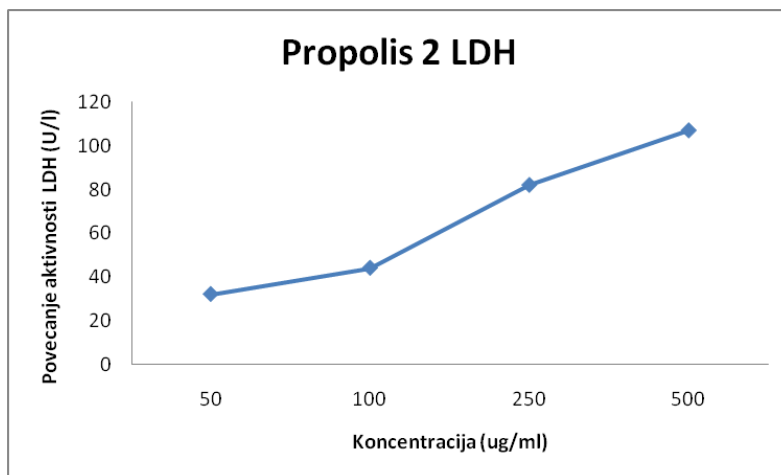
Ефекат прополиса 2 након 24 часа инкубације здравих мононуклеарних леукоцита је нешто другачији у односу на леукемијске лимфоците. Приликом култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 часа, ниске концентрације прополиса 2 од 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 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 $40,05 \pm 6,91$ %, а при концентрацији од 1000 $\mu\text{g/ml}$ износи $54,97 \pm 7,18$ % у односу на нетретиране 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 нетретиране 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 HLL лимфоцита и здравих мононуклеарних леукоцита.

Анализом активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита након 48 часова инкубације у присуству растућих концентрација прополиса 2, дошло је до повећања активности LDH у односу на нетретиране лимфоците које је било дозно зависно. Највеће повећање активности LDH било је при концентрацији прополиса 2 од 500 $\mu\text{g/ml}$ и износило је 107 U/l (Графикон 8.).



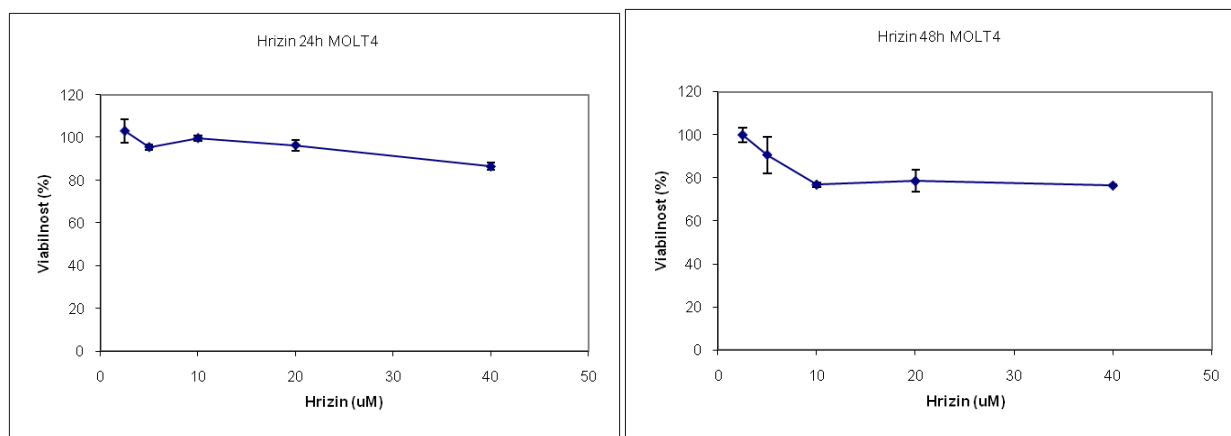
Графикон 8. Апсолутна разлика у активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним прополисом 2

4.1.3. Утицај хризина на вијабилност леукемијских лимфоцита

Ефекат хризина на вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита испитиван је након 24 и 48 часова инкубације у односу на нетретиране ћелије. Након 24 часа

култивације MOLT-4 леукемијских лимфоцита, није дошло до статистички значајног смањења вијабилности при концентрацијама хризина мањим од 40 μM ($p > 0,05$). Тек при концентрацији хризина од 40 μM је дошло до релативно малог, али статистички значајног смањења вијабилности MOLT-4 леукемијских лимфоцита на $86,54 \pm 1,67 \%$ у односу на нетретиране лимфоците ($p < 0,05$).

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

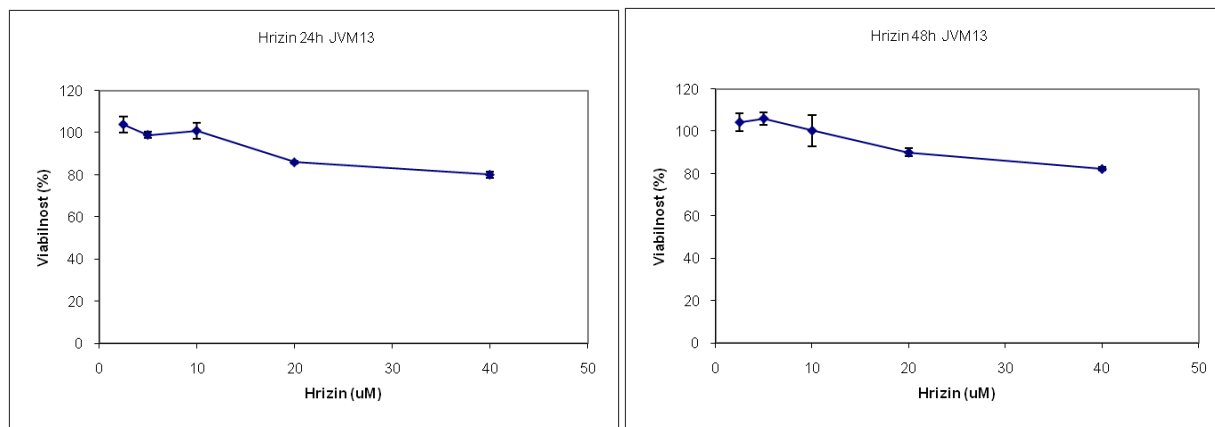


Графикон 9. Утицај хризина на вијабилност MOLT-4 ћелија.

Хризин је такође смањивао вијабилност JVM-13 леукемијских лимфоцита после култивације у трајању од 24 и 48 часова при концентрацијама већим од 10 μM у односу на нетретиране лимфоците. Након 24 часа инкубације у присуству хризина концентрације 20 μM и 40 μM , 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 нетретиране ћелије ($p < 0,05$).

Пред тога, при истим концентрацијама од 20 μM и 40 μM , хризин је и након 48 часова култивације JVM-13 леукемијских лимфоцита доводио до статистички значајног смањења вијабилности ових ћелија на $90,06 \pm 1,95 \%$ и $82,37 \pm 0,78 \%$ у односу на

контролну групу нетретираних ћелија ($p < 0,05$). Хризин у нижим концентрацијама од 2,5 μM , 5 μM и 10 μM није статистички значајно утицао на вијабилност JVM-13 леукемијских лимфоцита након инкубације у трајању од 24 и 48 часова ($p > 0,05$) (Графикон 10.).



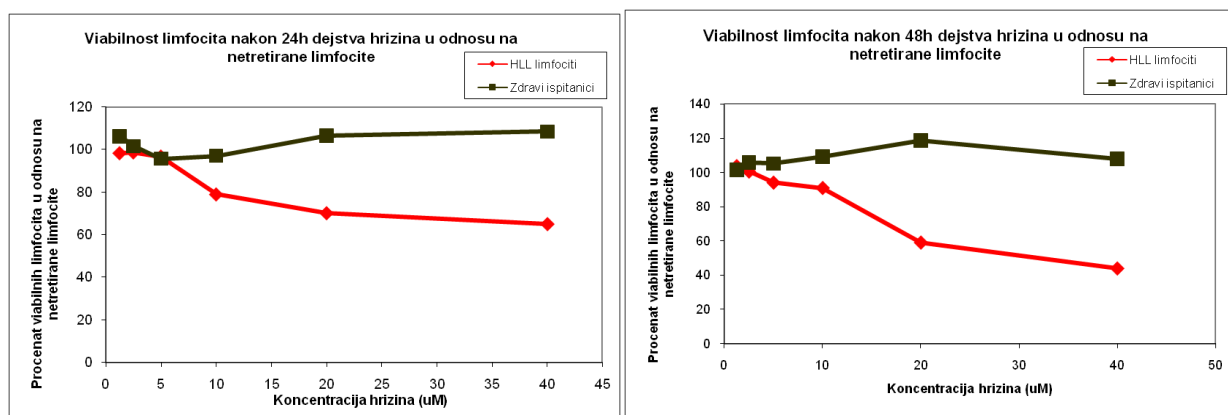
Графикон 10. Утицај хризина на вијабилност JVM-13 ћелија.

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 HLL лимфоцита у присуству хризина концентрације од 10 μM и већим, долазило је до статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$). То смањење вијабилности је било дозно зависно, тако да је при концентрацији хризина од 10 μM , дошло до смањења вијабилности на $78,83 \pm 4,35$ %, а при концентрацији од 40 μM , вијабилност HLL лимфоцита је износила $64,91 \pm 7,3$ % у односу на нетретиране HLL лимфоците. Хризин у концентрацијама од 1,25 μM , 2,5 μM и 5 μM није статистички значајно мењао вијабилност HLL лимфоцита у односу на исте ћелије култивисане без присуства хризина ($p > 0,05$).

Поред тога, после 48 часова култивације HLL лимфоцита у присуству хризина концентрације од 10 μM , 20 μM и 40 μM је дошло до статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране ћелије ($p < 0,05$) које је било дозно зависно. При концентрацији хризина од 10 μM , вијабилност HLL лимфоцита је смањења на $86,04 \pm 6,01$ %, а при концентрацији од 40 μM , вијабилност HLL лимфоцита је износила $43,91 \pm 8,11$ % у односу на нетретиране HLL лимфоците. Хризин у концентрацијама од

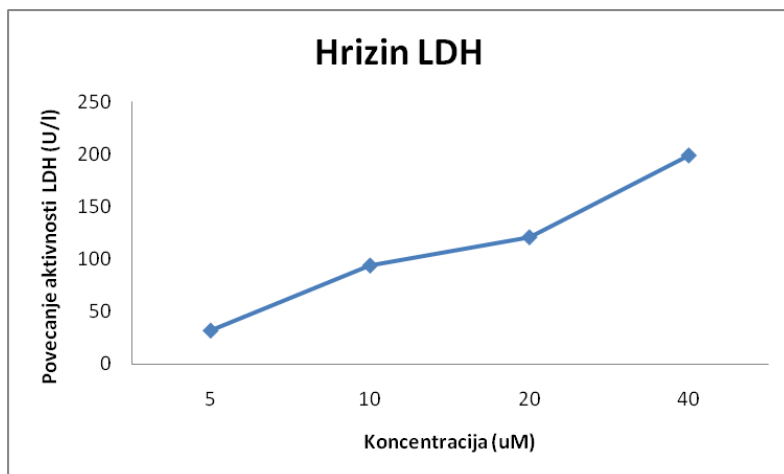
1,25 μM , 2,5 μM и 5 μM није статистички значајно мењао вијабилност HLL лимфоцита у односу на HLL лимфоците култивисане без присуства хризина након култивације од 48 часова ($p>0,05$).

Важан резултат је што ни након 24 часа, ни након 48 часова култивације здравих мононуклеарних леукоцита у присуству испитиваних концентрација хризина од 1,25 μM до 40 μM , хризин није статистички значајно мењао вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита у односу на нетретиране мононуклеарне леукоците ($p>0,05$) (Графикон 11.).



Графикон 11. Утицај хризина на вијабилност HLL лимфоцита и здравих мононуклеарних леукоцита.

Приликом култивације HLL 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 μM и износило је 199 U/l, док је при концентрацији хризина од 5 μM дошло до повећања активности LDH од само 32 U/l (Графикон 12.).

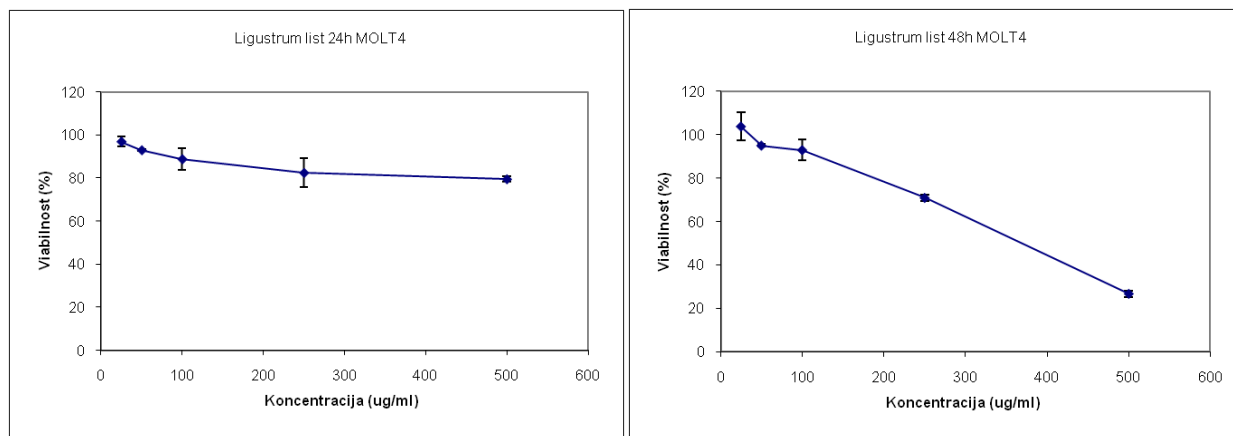


Графикон 12. Апсолутна разлика у активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним хризином.

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 лимфоцита. Након 24 часа дошло је до дозно зависног и статистички значајног смањења вијабилности MOLT-4 леукемијских лимфоцита 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 лимфоцита у односу на нетретиране ћелије ($p > 0,05$).

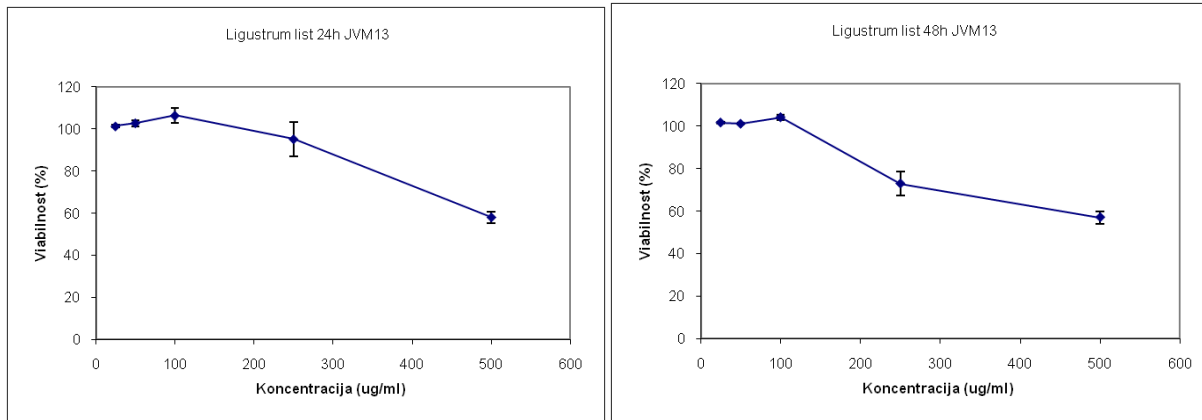
Након 48 часова култивације MOLT-4 леукемијских лимфоцита, вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита се статистички значајно смањила већ при концентрацији екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50 $\mu\text{g/ml}$ и она је износила $93,04 \pm 1,05 \%$ у односу на нетретиране ћелије ($p < 0,05$). 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 лимфоцита износила само $26,75 \pm 1,47 \%$ у односу на нетретиране лимфоците (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.).



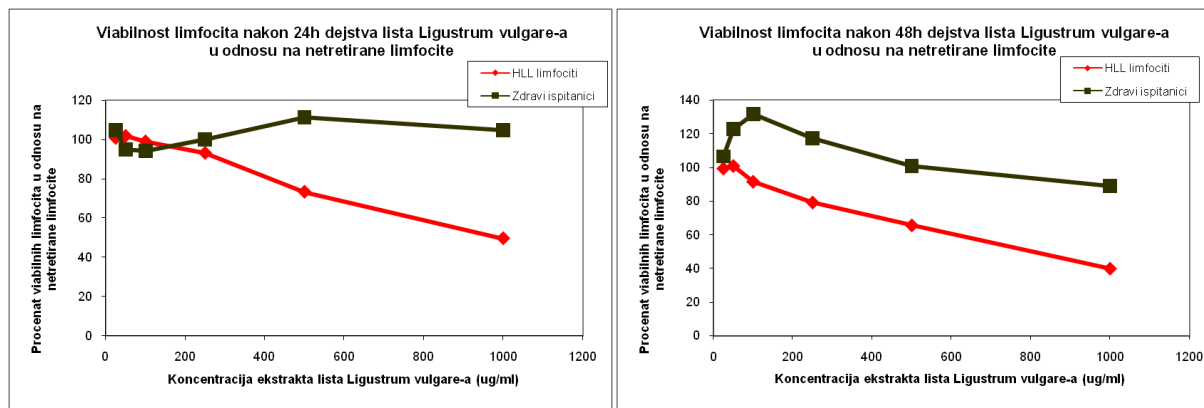
Графикон 14. Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност JVM-13 ћелија.

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

При инкубацији HLL лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности HLL лимфоцита при концентрацијама од 25 $\mu\text{g/ml}$ до 250 $\mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране лимфоците ($p > 0,05$). При концентрацији метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 500 $\mu\text{g/ml}$ и 1000 $\mu\text{g/ml}$, дошло је до дозно зависног и статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита које је износило $73 \pm 3,58 \%$ за 500 $\mu\text{g/ml}$ и $49,62 \pm 7,62 \%$ за 1000 $\mu\text{g/ml}$ у односу на контролну групу нетретираних HLL лимфоцита ($p < 0,05$).

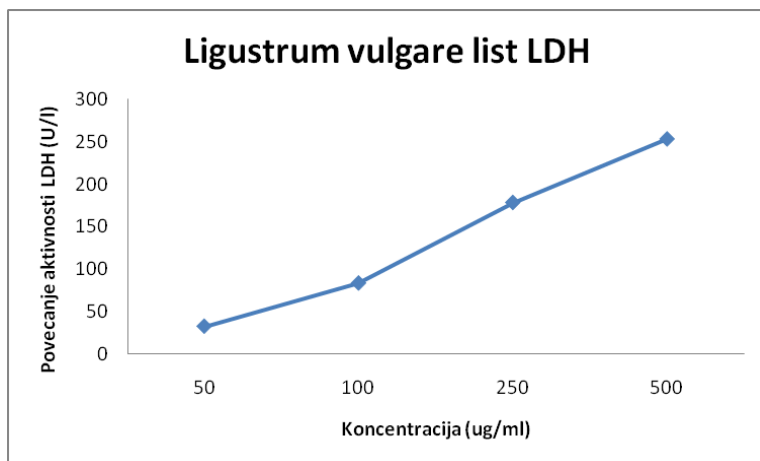
Метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* је већ у концентрацијама од 250 $\mu\text{g/ml}$ након 48 часова инкубације HLL лимфоцита статистички значајно смањило вијабилност ових ћелија на $79,32 \pm 6,18 \%$ у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$). Са даљим повећањем концентрације 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 $\mu\text{g/ml}$ и $40,05 \pm 5,98 \%$ за концентрацију од 1000 $\mu\text{g/ml}$. При нижим концентрацијама екстракта мањим од 250 $\mu\text{g/ml}$, није долазило до статистички значајне промене вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p > 0,05$).

Интересантно је да ни након 24 часа, ни након 48 часова култивације здравих моноклеарних леукоцита у присуству испитиваних концентрација метанолских екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* од 25 µg/ml до 1000 µg/ml, овај екстракт није статистички значајно утицао на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита у односу на контролну групу моноклеарних леукоцита који нису били изложени дејству екстраката ($p > 0,05$) (Графикон 15.).



Графикон 15. Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност HLL лимфоцита и здравих моноклеарних леукоцита.

Приликом култивације HLL лимфоцита у присуству растућих концентрација метанолских екстраката листа биљке *Ligustrum vulgare* јавило се дозно зависно повећање активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних HLL 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 U/l, док је при концентрацији метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50 µg/ml дошло до повећања активности LDH од само 32 U/l (Графикон 16.).



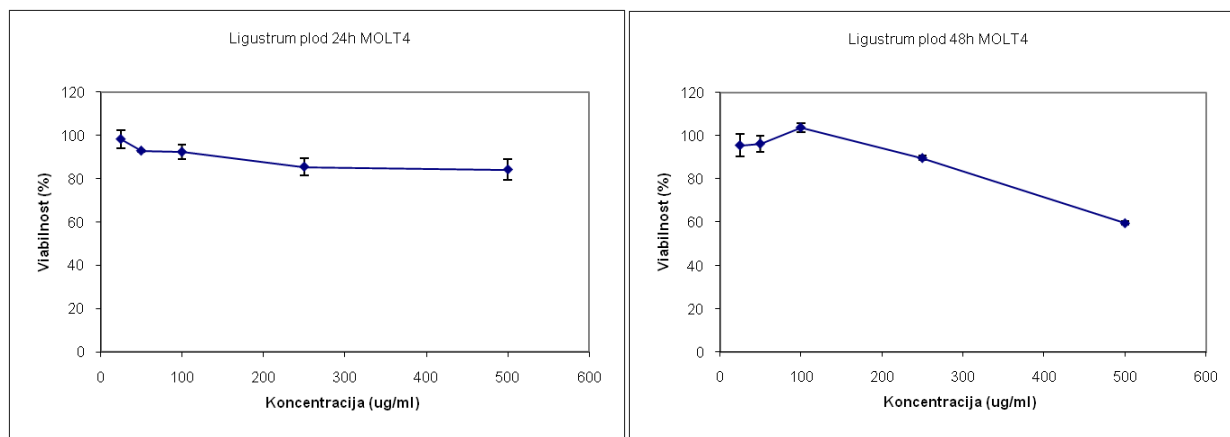
Графикон 16. Апсолутна разлика у активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом листа биљке *Ligustrum vulgare*

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

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 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ и 100 $\mu\text{g/ml}$, не долази до статистички значајне промене вијабилности MOLT-4 леукемијских лимфоцита у односу на нетретиране лимфоците ($p > 0,05$). 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 $\mu\text{g/ml}$ и вијабилност износи $89,77 \pm 1,16 \%$. Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare*

при концентрацији од 500 $\mu\text{g/ml}$, такође изазива статистички значајно смањење вијабилности MOLT-4 лимфоцита на $59,76 \pm 1,91$ % у односу на нетретирани лимфоците ($p < 0,05$). 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.).

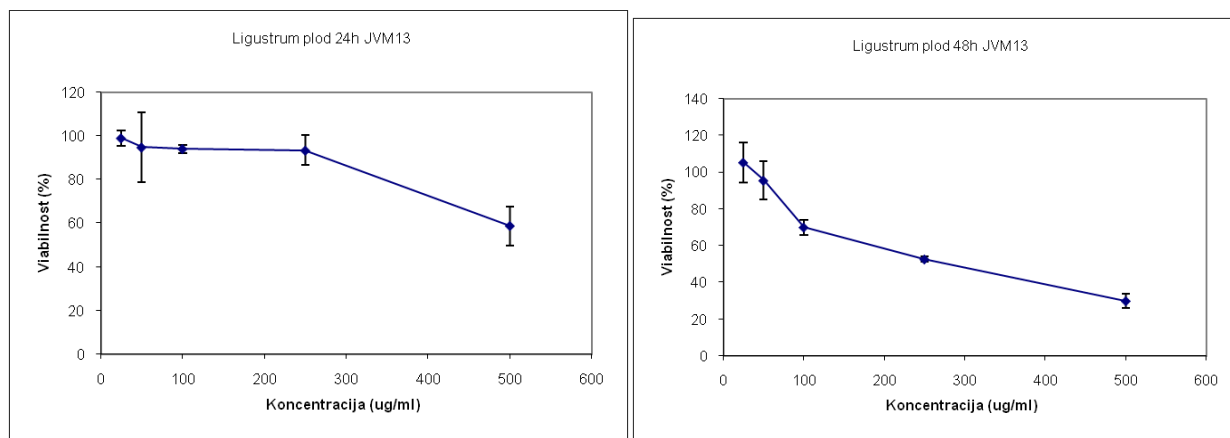


Графикон 17. Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност MOLT-4 ћелија.

Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност JVM-13 ћелија након култивације од 24 часа. При концентрацијама од 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ и 100 $\mu\text{g/ml}$ и 250 $\mu\text{g/ml}$ не долази до статистички значајне промене вијабилности JVM-13 ћелија у односу на нетретирани 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 нетретирани 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 25 $\mu\text{g/ml}$ и 50 $\mu\text{g/ml}$, не долази до статистички значајне промене вијабилности JVM-13 ћелија у односу на нетретирани ћелије ($p > 0,05$). Међутим, после 48 часова култивације до статистички значајног смањења вијабилности долази при концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 100 $\mu\text{g/ml}$ и

вијабилност износи $70,12 \pm 4,12$ % вијабилности нетретираних ћелија. Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* при концентрацијама од $250 \mu\text{g/ml}$ и $500 \mu\text{g/ml}$, такође изазива статистички значајно смањење вијабилности MOLT-4 лимфоцита на $52,76 \pm 1,61$ % и $30,04 \pm 3,92$ % у односу на нетретирани лимфоците ($p < 0,05$). 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 екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* испољава временски зависно смањење вијабилности JVM-13 ћелија (Графикон 18.).



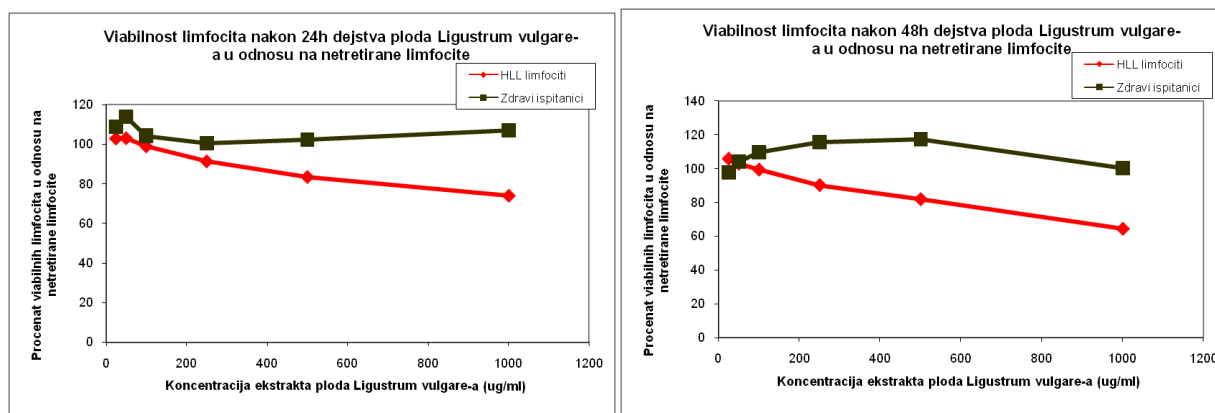
Графикон 18. Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност JVM-13 ћелија.

При култивацији HLL лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности HLL лимфоцита при концентрацијама од $25 \mu\text{g/ml}$ до $250 \mu\text{g/ml}$ у односу на нетретирани лимфоците ($p > 0,05$). При концентрацији метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од $500 \mu\text{g/ml}$ и $1000 \mu\text{g/ml}$, дошло је до статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита које је износило $83,48 \pm 5,08$ % за $500 \mu\text{g/ml}$ и $74,04 \pm 6,22$ % за $1000 \mu\text{g/ml}$ у односу на контролну групу нетретираних HLL лимфоцита ($p < 0,05$).

Метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare*, након 48 часова инкубације, при нижим концентрацијама екстракта од $25 \mu\text{g/ml}$ до $250 \mu\text{g/ml}$, није статистички

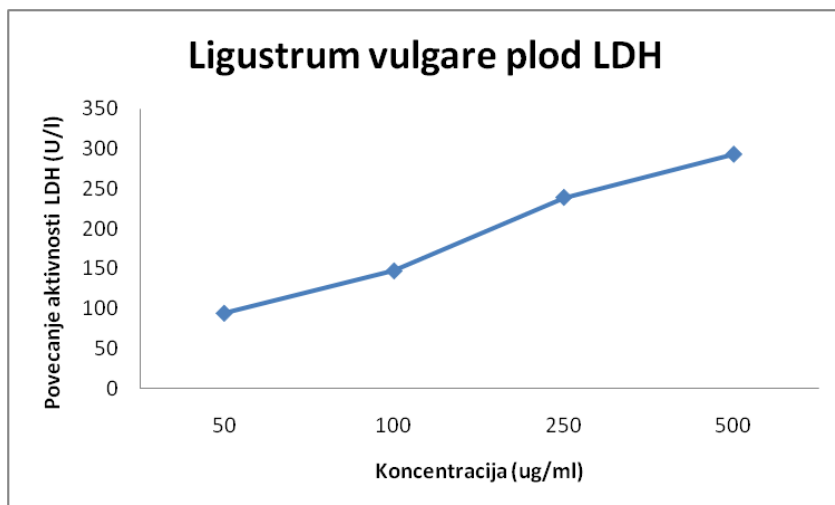
значајно утицао на вредност вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p > 0,05$). Ипак, при концентрацијама екстракта од 500 $\mu\text{g/ml}$ и 1000 $\mu\text{g/ml}$ након 48 часова инкубације HLL лимфоцита, вијабилност испитиваних ћелија се статистички значајно смањивала и износила је $81,93 \pm 5,74 \%$ и $64,52 \pm 7,12 \%$ у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$).

Након култивације здравих моноклеарних леукоцита у трајању од 24 и 48 часова у присуству испитиваних концентрација метанолских екстраката плода биљке *Ligustrum vulgare* од 25 $\mu\text{g/ml}$ до 1000 $\mu\text{g/ml}$, овај екстракт није статистички значајно утицао на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита у односу на контролну групу моноклеарних леукоцита који нису били изложени дејству екстраката ($p > 0,05$) (Графикон 19.).



Графикон 19. Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност HLL лимфоцита и здравих моноклеарних леукоцита.

Након култивације HLL лимфоцита од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолских екстраката плода биљке *Ligustrum vulgare* дошло је до повећања активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту третираних HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL 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 листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50 $\mu\text{g/ml}$ дошло до повећања активности LDH за 94 U/l (Графикон 20.).



Графикон 20. Апсолутна разлика у активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом листа биљке *Ligustrum vulgare*.

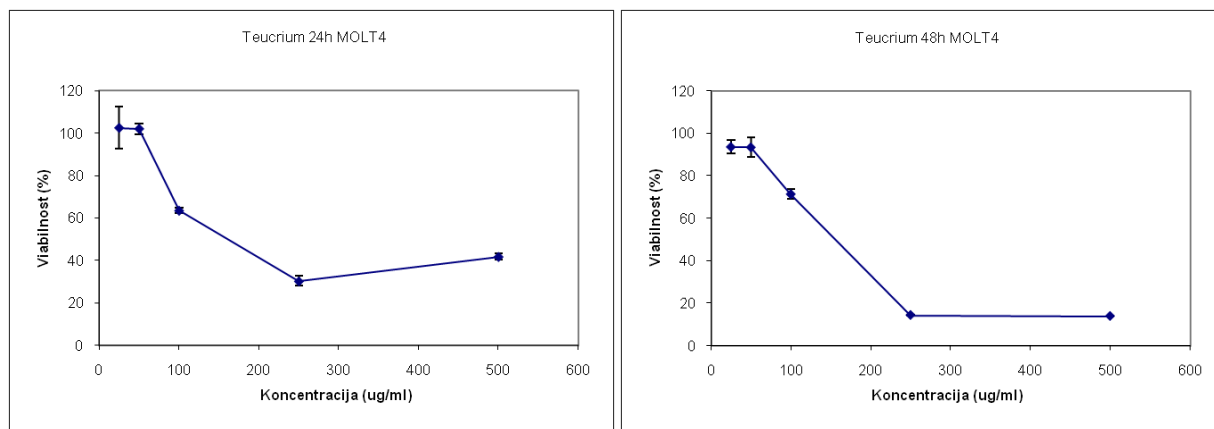
4.1.6. Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност леукемијских лимфоцита

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 лимфоцита при концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 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 лимфоците ($p > 0,05$). 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 лимфоцита 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 лимфоцита, такође не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране MOLT-4 леукемијске лимфоците ($p > 0,05$) при концентрацијама екстракта од 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.).

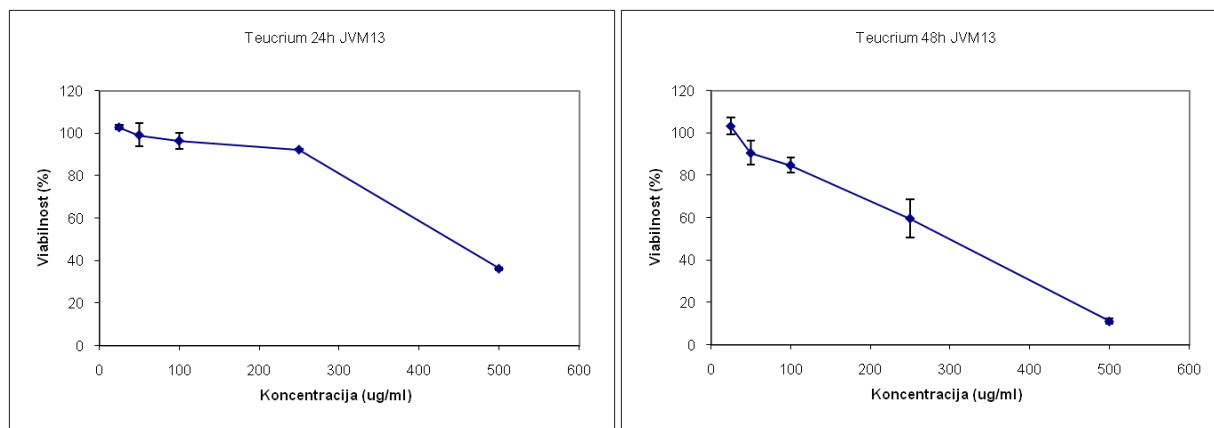


Графикон 21. Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност MOLT-4 ћелија.

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



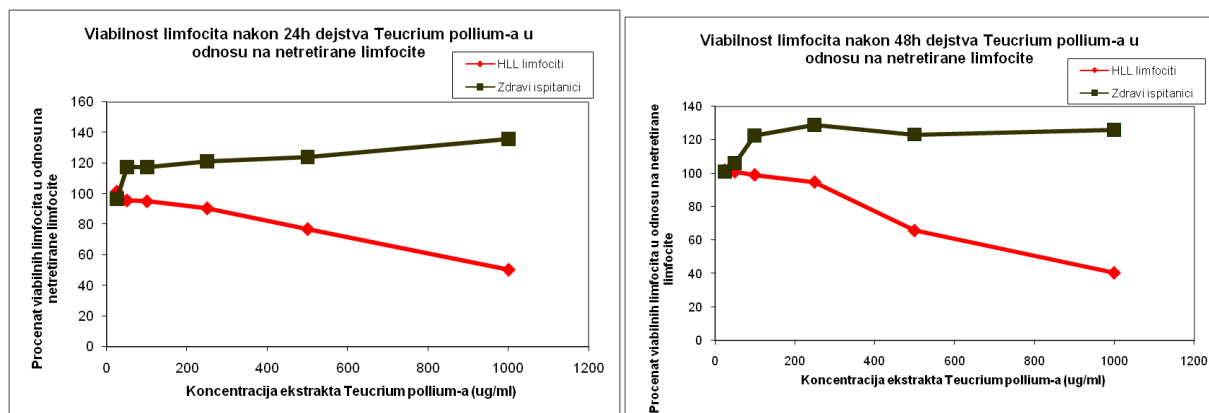
Графикон 22. Утицај метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* на вијабилност JVM-13 ћелија.

При култивацији HLL лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности HLL лимфоцита при концентрацијама од 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ и 250 $\mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране лимфоците ($p > 0,05$). При концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 500 $\mu\text{g/ml}$ и 1000 $\mu\text{g/ml}$, дошло је до статистички значајног смањења вијабилности HLL лимфоцита у односу на контролну групу нетретираних HLL лимфоцита, које је износило $76,85 \pm 7,25 \%$ за 500 $\mu\text{g/ml}$ и $50,27 \pm 9,25 \%$ за 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$).

Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, након 48 часова инкубације, при нижим концентрацијама екстракта од 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ и 250 $\mu\text{g/ml}$, није статистички значајно утицао на вредност вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p > 0,05$). Насупрот томе, при концентрацијама екстракта од 500 $\mu\text{g/ml}$ и 1000 $\mu\text{g/ml}$ након 48 часова инкубације HLL лимфоцита, вијабилност

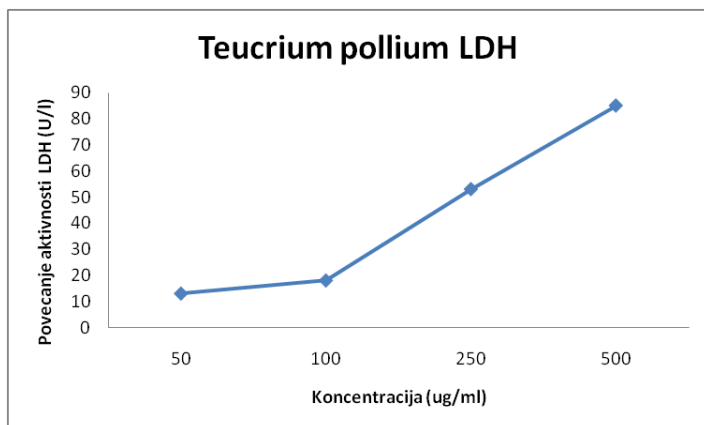
испитиваних ћелија се статистички значајно смањила и износила је $65,63 \pm 8,13$ % за $500 \mu\text{g/ml}$ и $40,39 \pm 6,67$ % за $1000 \mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p < 0,05$).

Након култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 и 48 часова у присуству испитиваних концентрација метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од $25 \mu\text{g/ml}$ до $1000 \mu\text{g/ml}$, овај екстракт није статистички значајно утицао на вијабилност 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 HLL лимфоцита и здравих мононуклеарних 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 HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците. Највеће повећање активности LDH уочено је при концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од $500 \mu\text{g/ml}$ и износило је 85 U/l , док је при концентрацији испитиваног екстракта од $50 \mu\text{g/ml}$ дошло до повећања активности LDH за 13 U/l (Графикон 24.).



Графикон 24. Апсолутна разлика у активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium*.

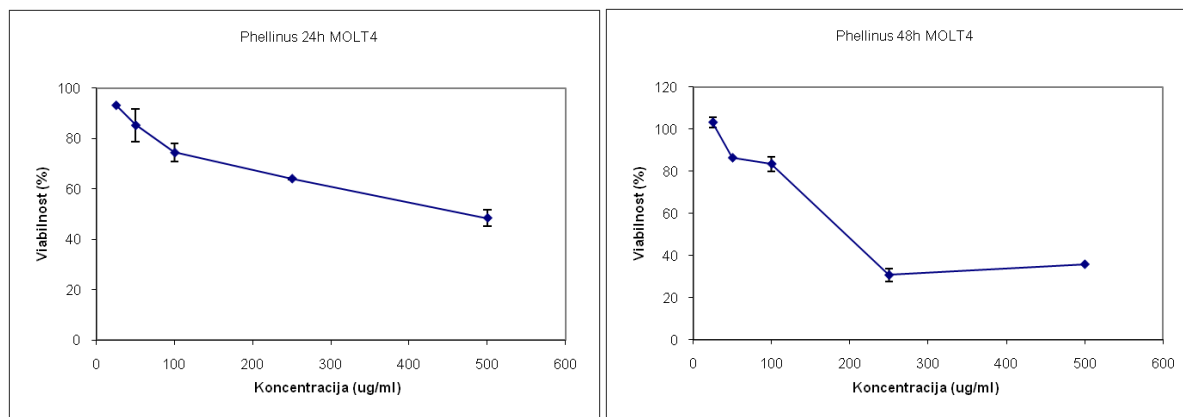
4.1.7. Утицај метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност леукемијских лимфоцита

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 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 лимфоците ($p > 0,05$). 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 леукемијских лимфоцита у односу на нетретиране 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 $48,35 \pm 3,29 \%$.

Након 48 часова инкубације MOLT-4 леукемијских лимфоцита, такође не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретиране MOLT-4 леукемијске лимфоците ($p > 0,05$) при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 25 $\mu\text{g/ml}$. Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретиране ћелије је уочљиво већ при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 50 $\mu\text{g/ml}$, када вијабилност MOLT-4

ћелија износи $86,34 \pm 1,01$ % ($p < 0,05$). Такође, при концентрацијама екстракта од 100 $\mu\text{g/ml}$, 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 $83,45 \pm 3,42$ %, $30,72 \pm 2,94$ % и $35,82 \pm 1,02$ % ($p < 0,05$) (Графикон 25.).

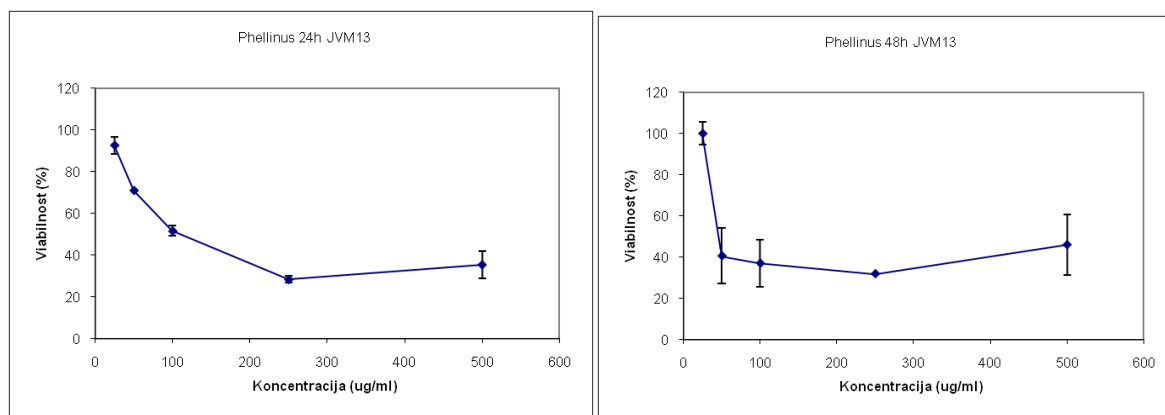


Графикон 25. Утицај метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* на вијабилност MOLT-4 ћелија.

При концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 25 $\mu\text{g/ml}$, након 24 часа инкубације JVM-13 ћелија не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретирание 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 нетретирание ћелије.

Ни после 48 часова култивације JVM-13 ћелија, такође не долази до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретирание ћелије при концентрацијама метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 25 $\mu\text{g/ml}$ ($p > 0,05$). Ипак, статистички значајно смањење вијабилности у односу на нетретирание 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 ± 13,57 % и 37,04 ± 11,43 (p<0,05). Ово смањење вијабилности није дозно зависно, јер са повећањем концентрације екстракта са 250 µg/ml на 500 µg/ml не долази до још већег пада вијабилности JVM-13 ћелија, која за ове концентрације износи 31,9 ± 1,26 % и 46,06 ± 14,71 % (p<0,05) (Графикон 26.).



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

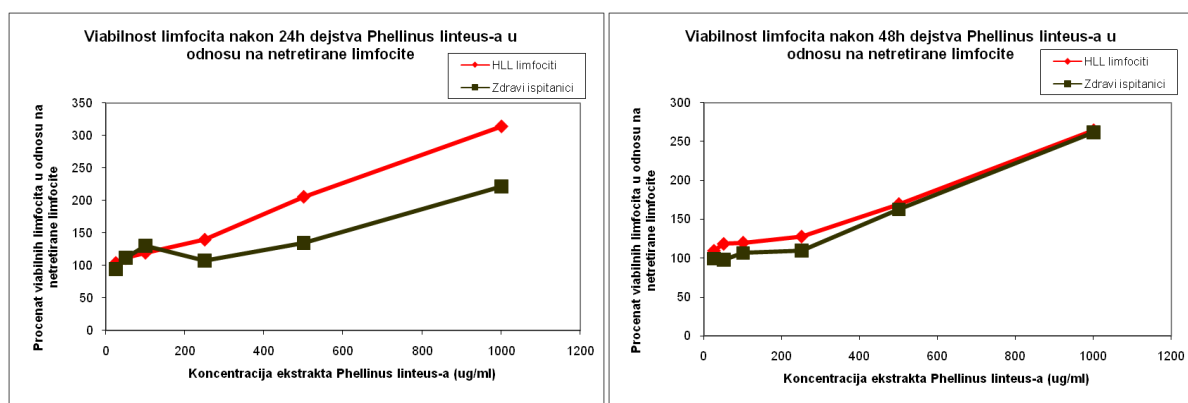
При култивацији HLL лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности HLL лимфоцита при концентрацијама од 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml у односу на нетретиране HLL лимфоците (p>0,05). При концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 250 µg/ml, 500 µg/ml и 1000 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања вијабилности HLL лимфоцита у односу на контролну групу нетретираних HLL лимфоцита, које је износило 139,37 ± 11,17 % за 250 µg/ml, 205,51 ± 28,22 % за 500 µg/ml и 314,04 ± 21,11 % за 1000 µg/ml (p<0,05).

Метанолски екстракт гљиве *Phellinus linteus*, након 48 часова инкубације, при нижим концентрацијама екстракта од 25 µg/ml, 50 µg/ml и 100 µg/ml, није статистички значајно утицао на вредност вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците (p>0,05). С друге стране, при концентрацијама екстракта од 250 µg/ml, 500 µg/ml и 1000 µg/ml након 48 часова инкубације HLL лимфоцита, вијабилност испитиваних ћелија се статистички значајно повећала и износила је 127,91 ± 8,46 % за 250 µg/ml, 169,67

$\pm 20,08 \%$ за $500 \mu\text{g/ml}$ и $264,53 \pm 26,46 \%$ за $1000\mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране HLL 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 $25 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$, $250 \mu\text{g/ml}$ и $500 \mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране ћелије ($p > 0,05$). Ипак, при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од $1000 \mu\text{g/ml}$, дошло је до статистички значајног повећања вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу нетретираних ћелија, које је износило $221,72 \pm 25,14 \%$, ($p < 0,05$).

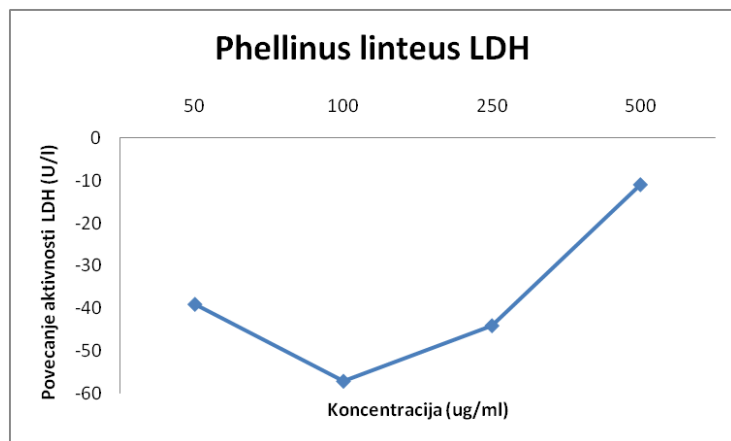
Ни после 48 часова култивације здравих мононуклеарних леукоцита у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, није дошло до статистички значајне промене вијабилности испитиваних ћелија при концентрацијама екстракта од $25 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ и $250 \mu\text{g/ml}$ 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 $500 \mu\text{g/ml}$ и $1000 \mu\text{g/ml}$, 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 HLL лимфоцита и здравих мононуклеарних леукоцита.

Након инкубације HLL лимфоцита у трајању од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus*, дошло је до смањења

активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците при свим испитиваним концентрацијама. Највеће смањење активности LDH уочено је при концентрацији метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* од 100 µg/ml и износило је 57 U/l, док је при концентрацији испитиваног екстракта од 500 µg/ml дошло до смањења активности LDH за 11 U/l у односу на нетретиране HLL лимфоците (Графикон 28.).



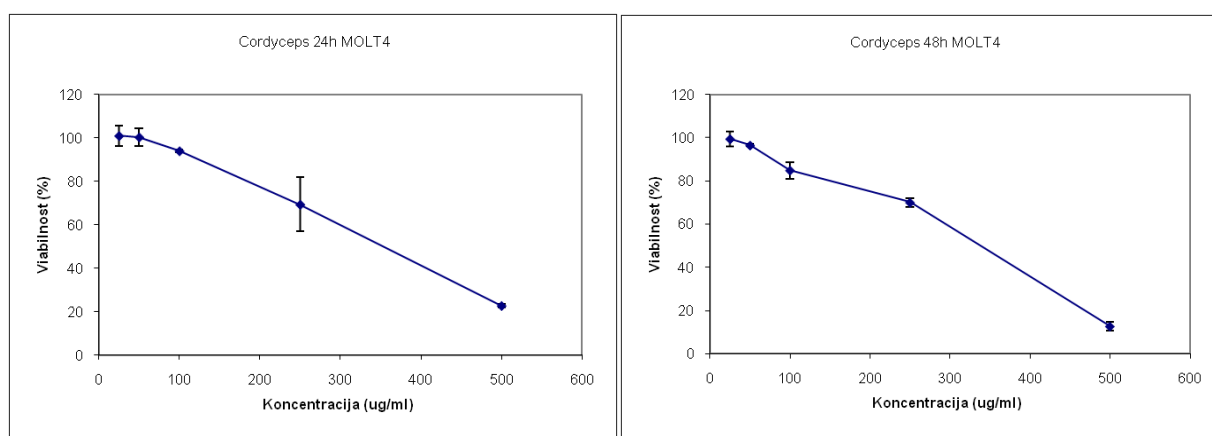
Графикон 28. Апсолутна разлика у активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом гљиве *Phellinus linteus*.

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

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

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

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 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.).

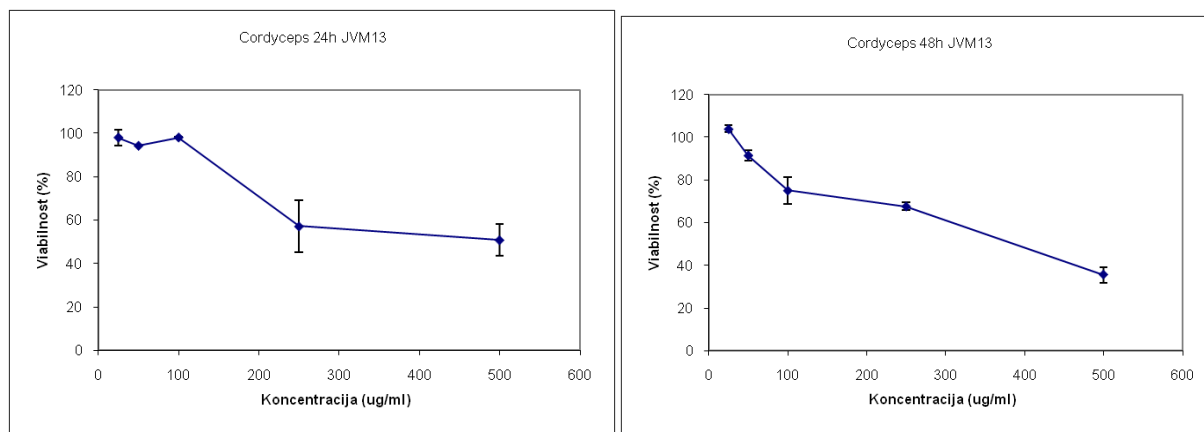


Графикон 29. Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност MOLT-4 ћелија.

Метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањује вијабилност JVM-13 ћелија након култивације од 24 часа. При концентрацијама екстракта од 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 ($p < 0,05$). 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 нижим концентрацијама екстракта од 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 $100 \mu\text{g/ml}$ када вијабилност испитиваних ћелија износи $75,04 \pm 6,28 \%$ у односу на вијабилност нетретираних ћелија. Метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* при концентрацијама од $250 \mu\text{g/ml}$ и $500 \mu\text{g/ml}$, такође изазива статистички значајно смањење вијабилности MOLT-4 лимфоцита на $67,56 \pm 1,81 \%$ и $35,59 \pm 3,63 \%$ у односу на нетретиране лимфоците ($p < 0,05$) (Графикон 30.).



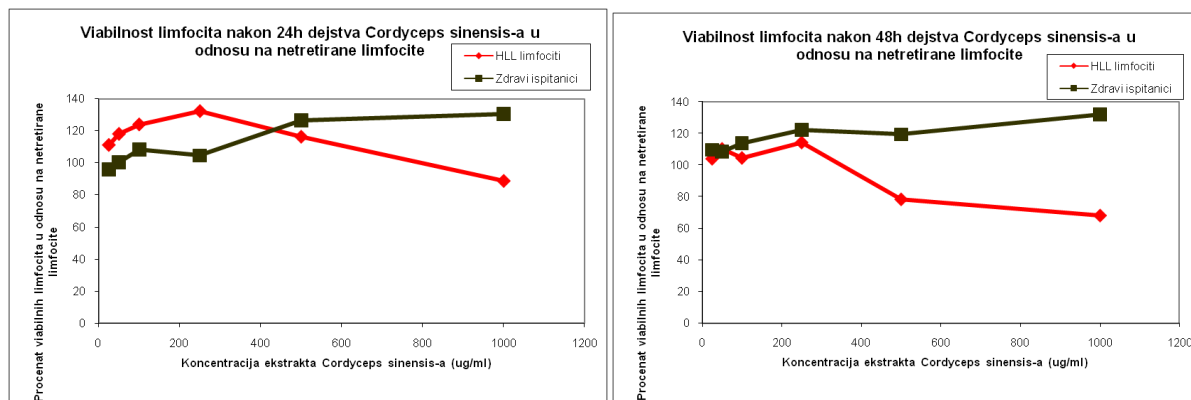
Графикон 30. Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност JVM-13 ћелија.

Након култивације HLL лимфоцита у трајању од 24 часа у присуству испитиваних концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* од $25 \mu\text{g/ml}$ до $1000 \mu\text{g/ml}$, овај екстракт није статистички значајно утицао на вијабилност HLL лимфоцита у односу на контролну групу HLL лимфоцита који нису били изложени његовом дејству ($p > 0,05$). При највећој концентрацији дошло је до незнатног смањења просечне вијабилности HLL лимфоцита на вредност од $88,81 \pm 13,59 \%$ у односу на контролну групу ћелија, али та разлика није била статистички значајна.

Метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis*, након 48 часова инкубације, при нижим концентрацијама екстракта од $25 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ и $250 \mu\text{g/ml}$, није статистички значајно утицао на вредност вијабилности HLL лимфоцита у односу на нетретиране HLL лимфоците ($p > 0,05$). Међутим, при концентрацијама екстракта од $500 \mu\text{g/ml}$ и $1000 \mu\text{g/ml}$ након 48 часова инкубације HLL лимфоцита, вијабилност испитиваних

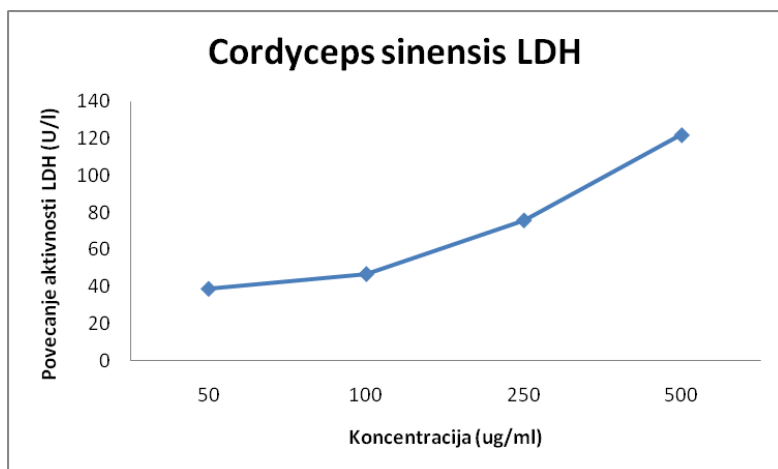
ћелија се статистички значајно смањила и износила је $78,31 \pm 6,37$ % за $500 \mu\text{g/ml}$ и $68,09 \pm 11,13$ % за $1000 \mu\text{g/ml}$ у односу на нетретирание HLL лимфоците ($p < 0,05$).

У присуству испитиваних концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* од $25 \mu\text{g/ml}$ до $500 \mu\text{g/ml}$, након култивације здравих мононуклеарних леукоцита у трајању од 24 и 48 часова, овај екстракт није статистички значајно утицао на вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита у односу на контролну групу мононуклеарних леукоцита који нису били изложени његовом дејству ($p > 0,05$). При концентрацијама од $1000 \mu\text{g/ml}$ 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 нетретирание ћелије ($p < 0,05$) (Графикон 31.).



Графикон 31. Утицај метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* на вијабилност HLL лимфоцита и здравих мононуклеарних леукоцита.

Након инкубације HLL лимфоцита од 48 часова у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis*, дошло је до повећања активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту третираних HLL лимфоцита у односу на нетретирание HLL 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 , док је при концентрацији испитиваног екстракта од $50 \mu\text{g/ml}$ дошло до повећања активности LDH за 39 U/l (Графикон 32.).



Графикон 32. Апсолутна разлика у активности лактат-деhidрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом гљиве *Cordyceps sinensis*.

4.2. Биоактивне супстанце индукују апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије

Пошто су 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 HLL лимфоцита са и без присуства испитиваних биоактивних супстанци.

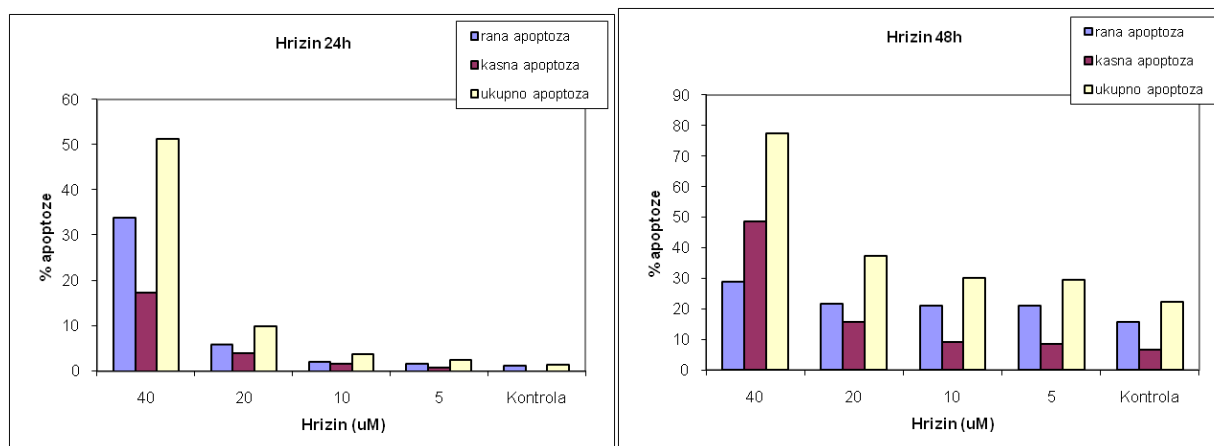
4.2.1. Хризин индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије

Након 24 часа култивације HLL лимфоцита у присуству хризина концентрације 5 μM , 10 μM и 20 μM , 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 HLL 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 HLL 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 HLL лимфоцита. Наиме, укупни проценат апоптотичних HLL 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 HLL лимфоцита третираним хризином концентрације $40 \mu\text{M}$, док је укупни проценат апоптотичних HLL 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 HLL лимфоцита.

После 48 часова инкубације HLL лимфоцита у присуству хризина концентрације $5 \mu\text{M}$ и $10 \mu\text{M}$, није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних HLL лимфоцита у односу на исту групу нетретираних HLL 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 HLL лимфоцита који нису култивисани у присуству хризина ($p > 0,05$). Међутим, култивацијом HLL 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 HLL 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 HLL 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 (Графикон 33.).



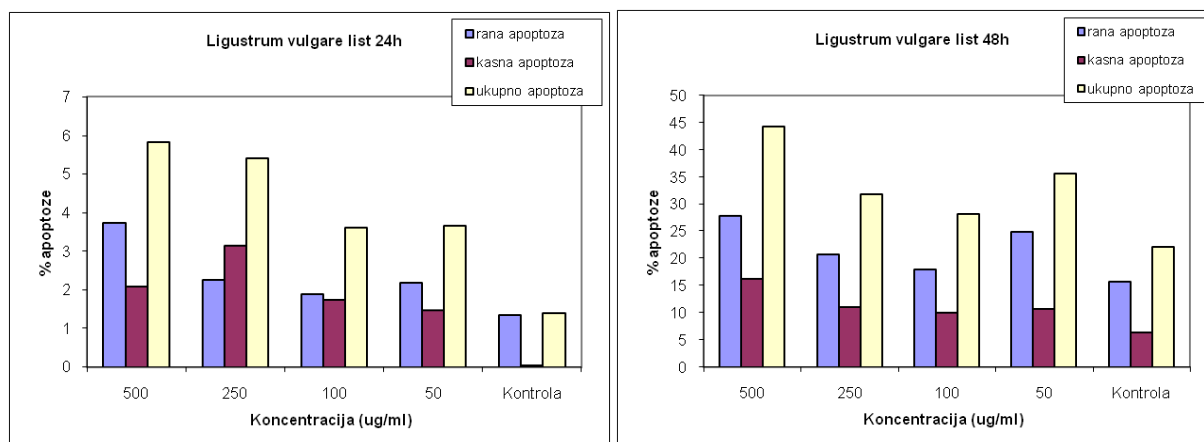
Графикон 33. Утицај хризина на апоптозу HLL лимфоцита.

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

Након 24 часа култивације HLL лимфоцита у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 50 μg/ml, 100 μg/ml и 250 μg/ml, није дошло до статистички значајне промене укупног процента апоптотичних HLL 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 једној од фаза апоптозе, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације HLL лимфоцита који нису култивисани у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* ($p > 0,05$). Ипак, при концентрацији екстракта од 500 μg/ml, дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних HLL 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 HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Наиме, укупни проценат апоптотичних HLL 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 HLL лимфоцита третираним испитиваним екстрактом концентрације 500 $\mu\text{g/ml}$, док је укупни проценат апоптотичних HLL 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 HLL лимфоцита.

После 48 часова инкубације HLL 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 HLL лимфоцита у односу на исту групу нетретираних HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Поред тога, при овим концентрацијама екстракта, ни проценат ћелија које су се налазиле у једној од фаза апоптозе, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације HLL лимфоцита који нису култивисани у присуству испитиваног екстракта ($p > 0,05$). Ипак, култивацијом HLL 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 HLL 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 HLL 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.).



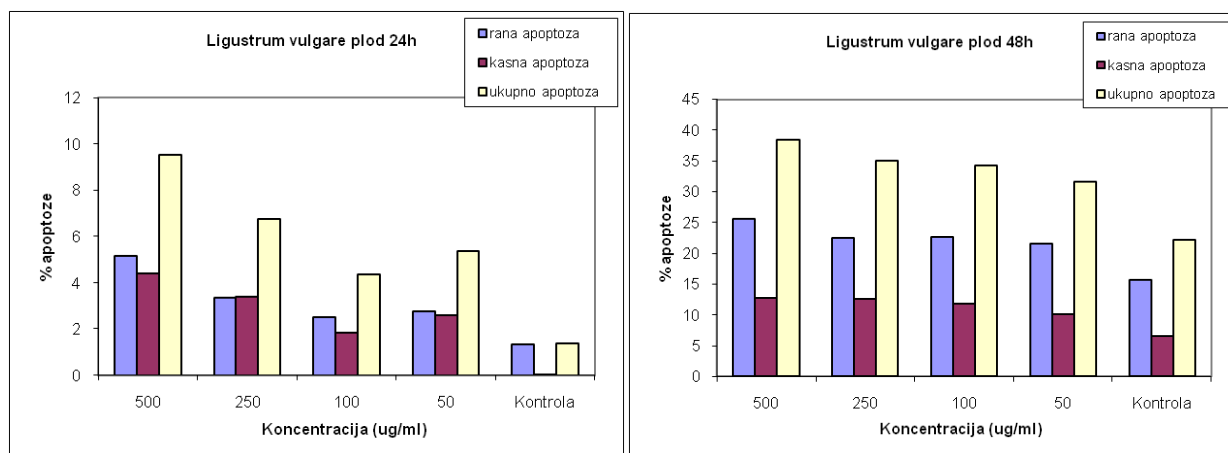
Графикон 34. Утицај метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* на апоптозу HLL лимфоцита.

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

После 24 часа култивације HLL лимфоцита у присуству метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 50 µg/ml и 100 µg/ml, није дошло до статистички значајне промене укупног процента апоптотичних HLL 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 једној од фаза апоптозе, није био статистички значајно промењен у односу на исту групу контролне популације HLL лимфоцита који нису култивисани у присуству метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* ($p > 0,05$). Ипак, при концентрацији екстракта од 250 µg/ml и 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних HLL 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 HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Сумарно, укупни проценат апоптотичних HLL лимфоцита при концентрацији метанолског

екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250 µg/ml и 500 µg/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 HLL лимфоцита третираним испитиваним екстрактом концентрације 250 µg/ml и 500 µg/ml. С друге стране, укупни проценат апоптотичних HLL 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 HLL лимфоцита.

По истеку 48 часова инкубације HLL лимфоцита у присуству метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 50 µg/ml и 100 µg/ml, није дошло до статистички значајне промене у укупном проценту апоптотичних HLL лимфоцита у односу на исту групу нетретираних HLL 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 HLL лимфоцита који нису култивисани у присуству испитиваног екстракта ($p > 0,05$). Насупрот томе, култивацијом HLL лимфоцита у присуству концентрација метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250 µg/ml и 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања укупног процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних HLL 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 култивације HLL лимфоцита концентрацијама метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* од 250 µg/ml и 500 µg/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 µg/ml и 500 µg/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 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.).



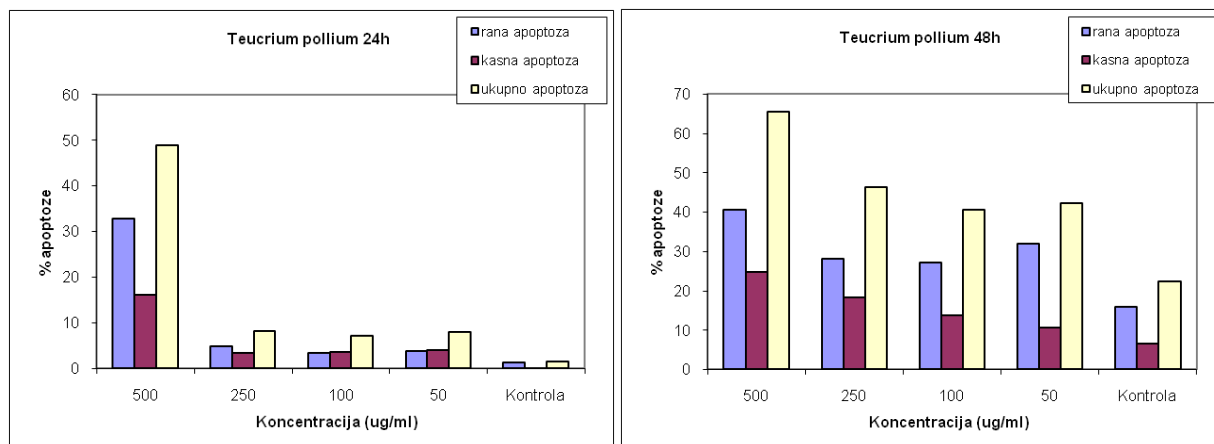
Графикон 35. Утицај метанолског екстракта плода биљке *Ligustrum vulgare* на апоптозу HLL лимфоцита.

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

После 24 часа инкубације HLL 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 HLL лимфоцита у односу на проценат апоптотичних нетретираних лимфоцита ($p > 0,05$). Такође, при овим концентрацијама метанолског екстракта 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 HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Ипак, при концентрацији екстракта од 500 µg/ml, дошло је до статистички значајног повећања процента апоптотичних ћелија у односу на контролну групу нетретираних HLL 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 HLL лимфоцита при концентрацији испитиваног екстракта од 500 µg/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 HLL лимфоцита третираним

екстрактом концентрације 500 $\mu\text{g/ml}$. Насупрот томе, укупни проценат апоптотичних HLL 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 HLL лимфоцита.

Након 48 часова инкубације HLL лимфоцита у присуству метанолског екстракта 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 HLL лимфоцита у односу на исту групу нетретираних HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Осим тога, 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 HLL лимфоцита ($p > 0,05$). Такође, култивацијом HLL 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 HLL лимфоцита ($p < 0,05$) на $46,21 \pm 5,18 \%$ и $65,36 \pm 5,51 \%$ од укупне популације испитиване групе ћелија. Приликом култивације HLL лимфоцита у присуству метанолског екстракта 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 HLL лимфоцита.

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

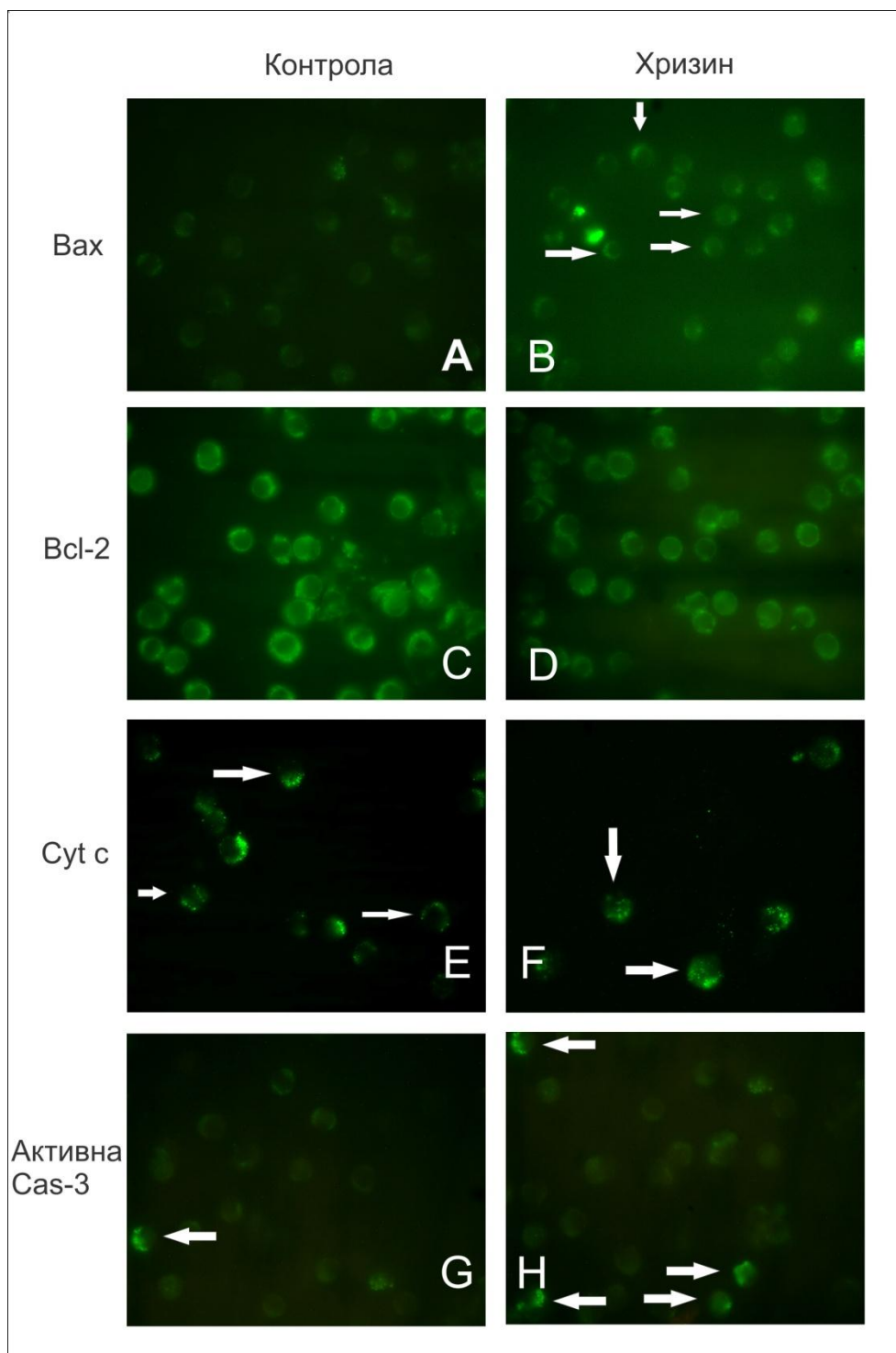
Биоактивне супстанце које су индуковале апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије су хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*. Обзиром да, од претходно наведених супстанци, највећи проценат апоптотичних ћелија индукују 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 Вах, антиапоптотичног протеина Bcl-2, цитохрома c и активне каспазе 3.

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

Методом флуоресцентне микроскопије смо поредили HLL лимфоците култивисане 24 часа у присуству хризина концентрације 40 μM и контролну групу HLL лимфоцита нетретираних хризином (слика 2.).

Под дејством хризина концентрације 40 μM , долази до транслокације проапоптотичног протеина Вах из цитоплазме у митохондрије HLL лимфоцита, као и да долази до смањења експресије антиапоптотичног протеина Bcl-2 у односу на контролну групу нетретираних HLL 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 μM долази до повећане транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму у односу на групу контролних HLL 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 HLL лимфоцита.

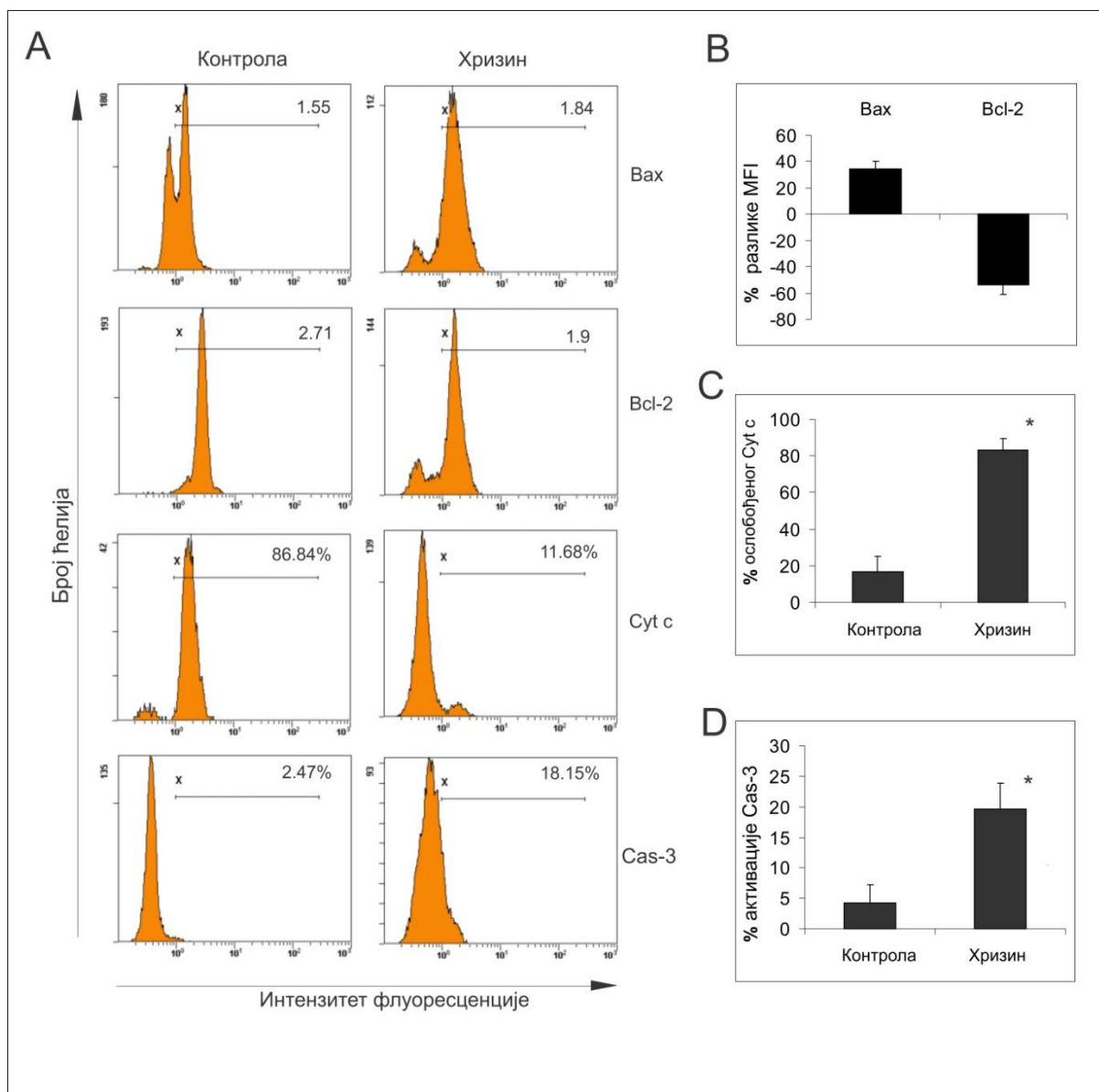


Слика 2. Хризин индукује транслокацију протеина Вах, смањење експресије Bcl-2 протеина, ослобађање цитохрома с у цитоплазму и активацију каспазе-3. (А) Проапоптотични Вах је локализован у цитоплазми, а у групи HLL лимфоцита третираним хризином (В) протеин Вах се повезује са митохондријалном мембраном. Третирани HLL

лимфоцити (D), експримирају мању флуоресценцију у односу на контролну групу (C), што сугерише да је дошло до смањења експресије антиапоптогичног протеина Bcl-2. Хризин индукује и веће ослобађање цитохрома c из митохондрија у цитоплазму (F), у поређењу са нетретираним ћелијама (E). Поред тога, повећава се број ћелија које експримирају активну каспазу-3 у групи HLL лимфоцита третираним хризином (H) у поређењу са контролном групом HLL лимфоцита (G).

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

Резултати добијени на овај начин, су показали да код HLL лимфоцита култивисаних 24 часа у присуству хризина концентрације 40 μM , долази до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције за проапоптогични протеин Вах 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 антиапоптогични 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 μM , дошло је до статистички значајног повећања процента ћелија које експримирају 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 експримирају флуоресценцију за активну каспазу 3 у групи HLL лимфоцита култивисаних у присуству хризина концентрације 40 μM на $19,68 \pm 4,21$ %, у односу на контролну групу HLL лимфоцита код којих је проценат тих ћелија износио $4,17 \pm 3,08$ %, ($p < 0,05$).



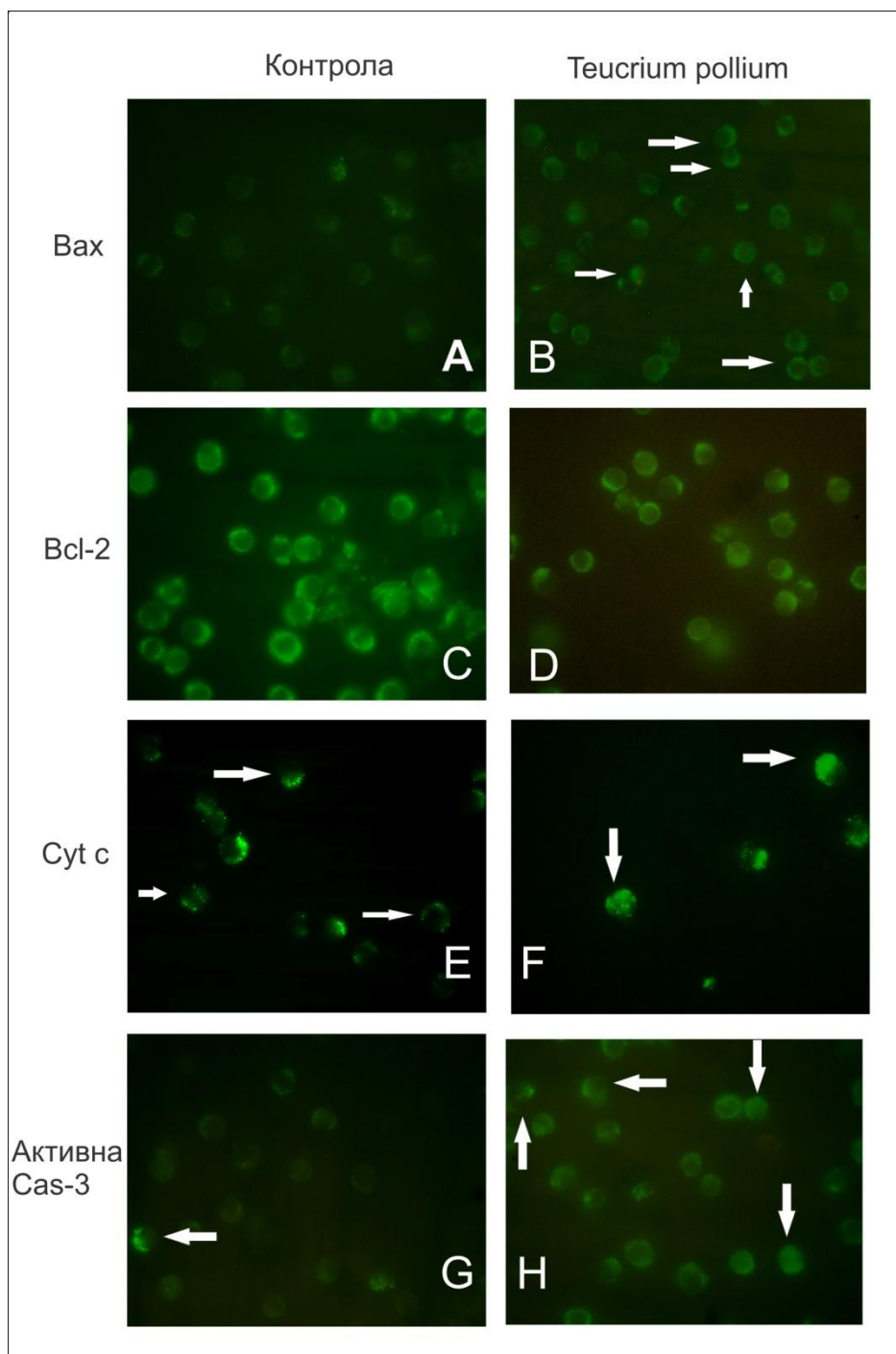
Слика 3. Хризин повећава експресију активног протеина Вах и снижава експресију протеина Вcl-2, што индукује ослобађање цитохрома с из митохондрија, активацију каспазе-3 и последично индукује апоптозу HLL лимфоцита. (А) Репрезентативни хистограми који показују MFI вредности протеина Вах и Вcl-2 и проценте ћелија које експримирају флуоресценцу за цитохром с и активну каспазу-3. (В) Процент повећања или смањења MFI вредности за протеине Вах и Вcl-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. (С) Транслокација цитохрома с је одређена селективном пермеабилizацијом ћелијске мембране, након које је извршено мерење

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

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

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

Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* концентрације 500 $\mu\text{g/ml}$, делује на HLL лимфоците тако што код ових ћелија долази до транслокације проапоптотичног протеина Вах из цитоплазме у митохондрије, као и до смањења експресије антиапоптотичног протеина Bcl-2 у односу на контролну групу нетретираних HLL лимфоцита. У циљу испитивања да ли овај екстракт индукује апоптозу лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије митохондријалним сигналним путем, анализирана је локализација цитохрома с 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 с из митохондрија у цитоплазму у односу на групу контролних HLL 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 HLL лимфоцита.

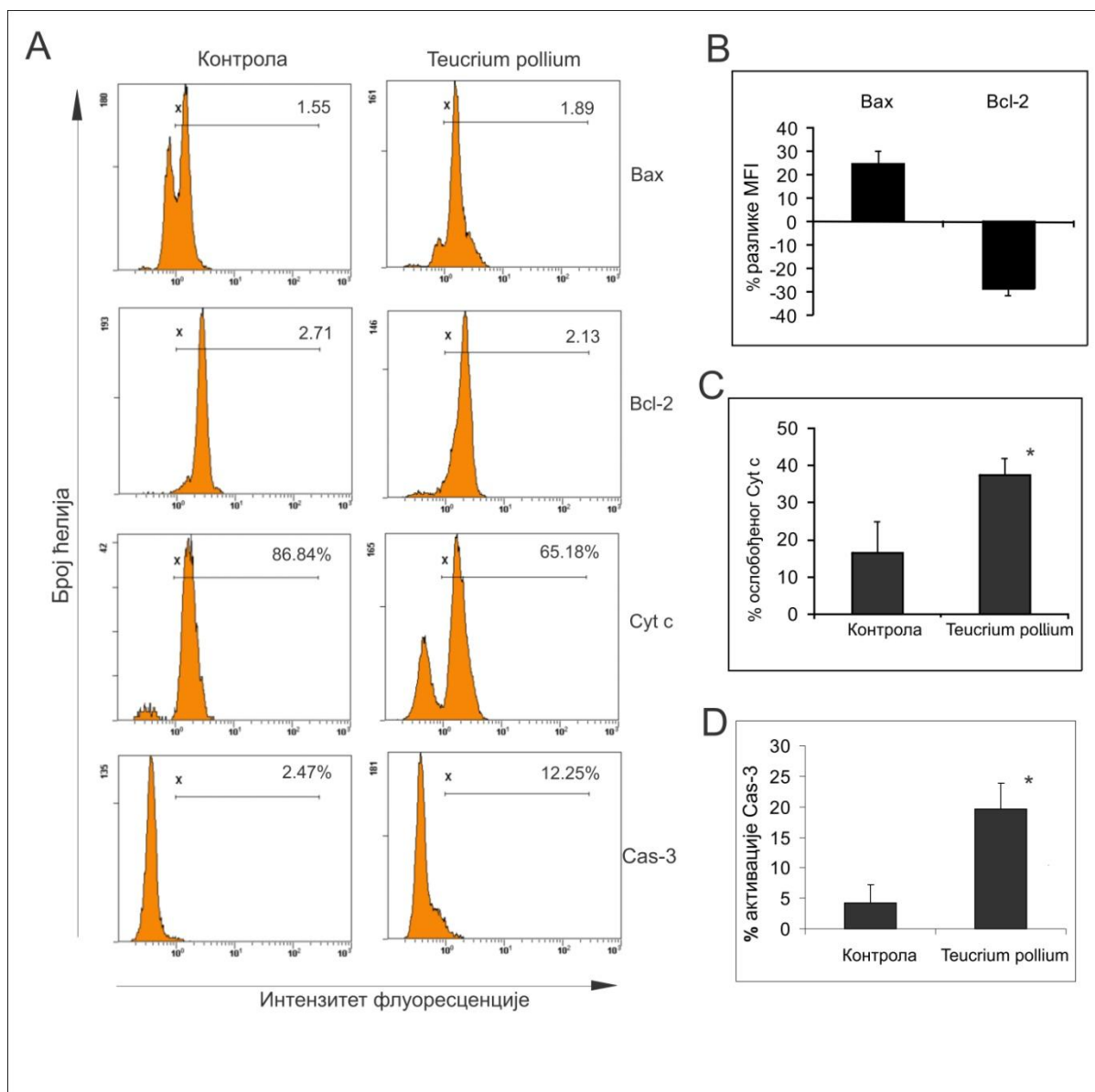


Слика 4. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује транслокацију протеина Bax, смањење експресије Bcl-2 протеина, ослобађање цитохрома c у цитоплазму и активацију каспазе-3. (A) Проапоптотични Bax је локализован у цитоплазми, а у групи HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке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

HLL лимфоцити (**D**), експримирају мању флуоресценцију у односу на контролну групу (**C**), што сугерише да је дошло до смањења експресије антиапоптоличног протеина Bcl-2. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује и веће ослобађање цитохрома c из митохондрија у цитоплазму (**F**), у поређењу са нетретираним ћелијама (**E**). Поред тога, повећава се број ћелија које експримирају активну каспазу-3 у групи HLL лимфоцита третираним метанолским екстрактом биљке *Teucrium pollium* (**H**) у поређењу са контролном групом HLL лимфоцита (**G**).

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 или процента ћелија које експримирају флуоресценцију за одговарајући протеин (слика 5.).

Код HLL 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 Вах за $8,4 \pm 1,07$ % у односу на контролну групу нетретираних лимфоцита ($p < 0,05$). Поред тога, код HLL 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 експримирају 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 експримирају флуоресценцију за активну каспазу 3 у групи HLL 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 HLL лимфоцита ($p < 0,05$).



Слика 5. Метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* повећава експресију активног протеина Вах и снижава експресију протеина Вcl-2, што индукује ослобађање цитохрома с из митохондрија, активацију каспазе-3 и последично индукује апоптозу NLL лимфоцита. (А) Репрезентативни хистограми који показују MFI вредности протеина Вах и Вcl-2 и проценте ћелија које експримирају флуоресценцу за цитохром с и активну каспазу-3. (В) Процент повећања или смањења MFI вредности за протеине Вах и Вcl-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. (С) Транслокација цитохрома с је одређена

селективном пермеабилитацијом ћелијске мембране, након које је извршено мерење проточном цитометријом. Приказан је проценат ћелија које експримирају ниску флуоресценцију (100 % - % ћелија које експримирају флуоресценцију), код којих је цитохром с транслоциран током апоптозе. Процент ћелија које експримирају 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 проузрокује. 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 продужењу 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 делеција 17. или 11. хромозома или високог степена експресије ZAP-70 и CD38.

Велики број нових лекова се данас испитује за терапију хроничне лимфоцитне леукемије. 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 анти-канцерска 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 лимфоцита, а не утичу на проценат вијабилних моноклеарних леукоцита здравих испитаника.

У нашем истраживању, показано је да примена прополиса 1 након 24 и 48 часова инкубације смањује вијабилност ћелија обе леукемијске ћелијске линије. Прецизније, смањује се вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита већ при концентрацији од 50 $\mu\text{g/ml}$ после 24 часа, а при концентрацији од 25 $\mu\text{g/ml}$ после 48 часова инкубације. Након 24 часа инкубације, прополис 1 смањује проценат вијабилних JVM-13 ћелија у концентрацији од 50 $\mu\text{g/ml}$, а после 48 часова при нешто већој концентрацији од 100 $\mu\text{g/ml}$. 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 HLL лимфоцита, али само при концентрацији прополиса 1 од 250 $\mu\text{g/ml}$ након 24 часа инкубације, а продужење инкубационог периода на 48 сати је довело до смањења процента вијабилних HLL лимфоцита при концентрацији прополиса 1 од 250 $\mu\text{g/ml}$ и 500 $\mu\text{g/ml}$. При концентрацији прополиса 1 од 1000 $\mu\text{g/ml}$ и после 24 и после 48 часова култивације ћелија, парадоксално, дошло је до повећања процента вијабилних HLL лимфоцита. Такође, прополис 1 није испољио жељени ефекат ни приликом култивације здравих моноклеарних леукоцита у присуству прополиса 1, јер је након 24 часа култивације смањио проценат вијабилних здравих моноклеарних леукоцита култивисаних у присуству 250 $\mu\text{g/ml}$ и 500 $\mu\text{g/ml}$ прополиса 1.

Инкубација MOLT-4 леукемијских лимфоцита у присуству растућих концентрација прополиса 2, довела је до смањења вијабилности испитиваних ћелија при концентрацији од 50 $\mu\text{g/ml}$ након 24 часа, односно 25 $\mu\text{g/ml}$ након 48 часова. Приликом инкубације JVM-13 ћелија у присуству прополиса 2 концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$ и вишим, дошло је до смањења вијабилности JVM-13 ћелија након 24 и 48 часова у односу на нетретиране JVM-13 ћелије. Инкубација HLL лимфоцита у присуству прополиса 2 концентрације 250 $\mu\text{g/ml}$ је смањила вијабилност HLL лимфоцита након 24 и 48 часова. У оба испитивана временска интервала је дошло до повећања вијабилности HLL лимфоцита при концентрацији прополиса 2 од 1000 $\mu\text{g/ml}$ у односу на нетретиране HLL лимфоците. На жалост, прополис 2 је утицао на смањење вијабилности и здравих моноклеарних леукоцита након 24 и 48 часова, али тек при релативно високим концентрацијама од 500 $\mu\text{g/ml}$ и 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Иако нисмо добили жељени резултат, да прополис 1 и прополис 2 смањују вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита, JVM-13 ћелија и HLL лимфоцита, а не утичу на вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита при испитиваним концентрацијама, постоје студије са другачијим резултатима. Тако су Асо и сарадници показали да прополис смањује вијабилност U937 ћелија хистиоцитног лимфома и то већ при јако ниским 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 долазило до смањења процента вијабилних ћелија при концентрацији прополиса од 60 ng/ml након 24, 48 и 72 часа инкубације што се разликује од наших резултата, јер смо ми исти ефекат постигли тек при вишим концентрацијама прополиса 1 и прополиса 2 (175). 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 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 (176).

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 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 HLL лимфоцитима (177).

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). Истраживање је показало да хризин смањује вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита, JVM-13 ћелија и HLL лимфоцита, а не утиче на вијабилност здравих мононуклеарних леукоцита при испитиваним концентрацијама након 24 и 48 часова инкубације. Прецизније, хризин је смањио вијабилност MOLT-4 леукемијских

лимфоцита после 24 часа инкубације при концентрацији од 40 μM , а после 48 часова при концентрацији од 10 μM , 20 μM и 40 μM хризина у односу на нетретиране MOLT-4 леукемијске лимфоците. Такође, хризин је смањивао вијабилност и JVM-13 леукемијских лимфоцита после култивације у трајању од 24 и 48 часова при концентрацијама већим од 10 μM у односу на нетретиране лимфоците. Поред тога, најснажнији ефекат, хризин је испољио управо на HLL лимфоцитима, где је смањио вијабилност испитиваних ћелија после 24 часа и 48 часова инкубације при свим тестираним концентрацијама хризина већим од 5 μM . Веома важан резултат је и одсуство било какве промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита након 24 и 48 часова инкубације ових ћелија у присуству хризина концентрације од 1,25 μM до 40 μM , у односу на нетретиране здраве мононуклеарне леукоците. Обзиром да је постојала разлика у осетљивости MOLT-4 леукемијских лимфоцита, JVM-13 ћелија и HLL лимфоцита са једне стране и здравих мононуклеарних леукоцита са друге, на цитотоксичност индуковану хризином, следећи корак је био испитивање типа и механизма ћелијске смрти индуковане хризином који је довео до смањења вијабилности HLL лимфоцита.

Резултати везани за активност лактат-деhidрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита који су добијени овим истраживањем су у потпуности у сагласности са 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 μM 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 μM 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-деhidрогеназе 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-деhidрогеназе у супернатанту испитиваних ћелија (177, 179, 180). Резултати нашег истраживања су показали идентичан ефекат на ћелијама HLL лимфоцита, где после 48 часова инкубације ових ћелија у присуству растућих концентрација хризина, долази до скока активности лактат-деhidрогеназе у односу на нетретиране HLL лимфоците.

Резултати истраживања су показали да је метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* смањив вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита при концентрацијама екстракта већим од 100 µg/ml након 24 часа инкубације, а до смањења вијабилности ових ћелија у односу на нетретиране ћелије је дошло већ при концентрацији екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 50 µg/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 µg/ml, и након 48 часова инкубације при концентрацији од екстракта 250 µg/ml и вишим. Сличан ефекат, овај екстракт је испољио и на HLL лимфоцитима где је смањивао вијабилност ових ћелија након 24 часа при концентрацијама од 500 µg/ml и већим, односно, након 48 часова већ при концентрацији од 250 µg/ml, у односу на нетретиране HLL лимфоците. Ни након 24 часа, ни након 48 часова култивације здравих моноклеарних леукоцита у присуству испитиваних концентрација екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* од 25 µg/ml до 1000 µg/ml, овај екстракт није статистички значајно утицао на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита у односу на нетретиране здраве моноклеарне леукоците.

Истраживање је 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 лимфоците у односу на екстракт екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare*, јер је до смањивања вијабилности ових ћелија доводио при концентрацији од 250 µg/ml и после 24 часа и после 48 часова инкубације. Снажнији антипролиферативни ефекат у односу на лист биљке *Ligustrum vulgare* је испољио метанолски екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* на JVM-13 ћелије. Резултати нашег истраживања су показали да је екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* смањивао вијабилност JVM-13 ћелија након 24 часа при концентрацији од 500 µg/ml, а након 48 часова при концентрацији од 100 µg/ml. Показано је и да метанолски екстракт

плода биљке *Ligustrum vulgare* делује нешто слабије у односу на екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* и на HLL лимфоците, јер је доводио до смањивања вијабилности ових ћелија тек при концентрацији екстракта од 500 µg/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 мононуклеарних леукоцита.

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 екстракта биљке *Ligustrum vulgare* на вијабилност туморских ћелија. Једна од ретких студија у којој је испитиван антитуморски ефекат екстракта листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* је и студија изведена на ћелијској линији карцинома колоне, односно НСТ-116 ћелијама (125). Резултати ове студије су показали да метанолски екстракт и листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност НСТ-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* нешто ефикасније смањује вијабилност испитиваних ћелија у односу на екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare*. Ипак, за разлику од нашег истраживања, до смањења вијабилности НСТ-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. Такође, разлика између нашег и претходно наведеног истраживања је и у временској зависности. Наиме, резултати нашег истраживања су показали да је са повећањем времена инкубације са 24 на 48 часова, потребна иста или мања количина екстракта листа, односно плода биљке *Ligustrum vulgare*, да би дошло до смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на нетретираних ћелија. Иако Ђурчић и сарадници нису испитивали вијабилност НСТ-116 ћелија након 48 сати инкубације у присуству екстракта листа и плода биљке *Ligustrum vulgare*, резултати ове студије су показали да са повећањем дужине инкубације са 24 на 72

сата, потребна већа концентрација испитиваних екстраката, да би дошло до смањења вијабилности ћелија што није у складу са резултатима нашег истраживања.

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 HLL лимфоцита третираних екстрактом листа, односно плода биљке *Ligustrum vulgare*, у односу на нетретиране HLL лимфоците, је свакако у корелацији са резултатима претходно добијеним МТТ тестом вијабилности ћелија. Наше истраживање је показало да пораст активности лактат-дехидрогеназе у супернатантима HLL лимфоцита при вишим концентрацијама ових екстраката одговара смањењу вијабилности HLL лимфоцита добијеним резултатима МТТ теста.

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

Резултати нашег истраживања су показали да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност MOLT-4 леукемијских лимфоцита после 24 часа и 48 часова инкубације, при концентрацијама од 100 $\mu\text{g/ml}$ и већим, у односу на нетретиране ћелије. Истраживање је показало да је такво смањење вијабилности JVM-13 ћелија уочљиво након 24 часа инкубације тек при концентрацији метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* од 500 $\mu\text{g/ml}$, али је, као и код претходне леукемијске ћелијске линије, до смањења вијабилности ћелија након 48 часова, дошло при концентрацији екстракта од 100 $\mu\text{g/ml}$. Поред тога, показано је и да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност HLL лимфоцита, након 24 и 48 часова, тек при релативно високим концентрацијама екстракта од 500 $\mu\text{g/ml}$. Нешто слабије дејство екстракта на HLL лимфоците је могуће објаснити другачијом природом самих ћелија, прецизније механизмом настанка болести или присуством неких супстанци које делују протективно на HLL 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 HLL лимфоцита. Веома значајан резултат нашег истраживања је и одсуство промене вијабилности здравих мононуклеарних леукоцита у ондосу 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 µg/ml и 200 µg/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 ± 4.99 µg/ml, за Fem-x ћелије хуманог меланома је била $199,79 \pm 0,30$ µg/ml, а за K562 ћелије хроничне мијелоидне леукемије ова концентрација је износила 116.75 ± 24.40 µg/ml (182).

Резултати нашег истраживања су показали да до пораста активности лактат-дехидрогеназе у супернатантима HLL лимфоцита третираним растућим концентрацијама метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*, долази при концентрацијама екстракта од 250 µg/ml и 500µg/ml након 48 часова инкубације. Ови резултати су у корелацији са резултатима добијеним МТТ тестом где са порастом концентрације метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium* долази до смањења вијабилности HLL лимфоцита. Слични резултати су добијени и на HEp-2 ћелијама епителијалног карцинома, где је до скока активности лактат-дехидрогеназе долазило при концентрацијама екстракта биљке *Teucrium pollium* од 500 µg/ml, 750 µg/ml и 1000 µg/ml након 24 часа инкубације ових ћелија (183).

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 лимфоцита, JVM-13 ћелија и HLL 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 HLL лимфоцита.

Почетни резултати истраживања 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 лимфоцита 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. Иако смањење вијабилности није било дозно зависно, 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 HLL лимфоцитима и здравим мононуклеарним леукоцитима. Прецизније, приликом инкубације обе врсте испитиваних ћелија у трајању од 24 и 48 часова у присуству метанолског екстракта гљиве *Phellinus linteus* концентрације 500 µg/ml и 1000 µg/ml, долазило је до повећања вијабилности ових ћелија што је било у супротности са нашим очекивањима на основу претходно добијених резултата на ћелијским линијама и у супротности са резултатима претходних студија (150, 151). Једна од претходних студија је показала да алкохолни екстракт гљиве *Phellinus linteus* смањује вијабилност и индукује апоптозу више ћелијских линија хуманог карцинома колона (CT26, HT-29, V16BL6, 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 HLL 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 HLL 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 добијени МТТ тестом су у корелацији са резултатима нашег истраживања добијеним мерењем активност лактат-дехидрогеназе у супернатантима третираних HLL лимфоцита. Показано је да је дошло до пада активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита што одговара повећању вијабилности HLL лимфоцита које је показано коришћењем МТТ теста.

На основу 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 лимфоцита, JVM-13 ћелија и HLL лимфоцита са једне и здравих моноклеарних леукоцита са друге стране. Резултати нашег истраживања су показали да култивацијом MOLT-4 леукемијских лимфоцита 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 одговарајућу нетретирану групу ћелија. Наше истраживање је показало да након 48 часова инкубације ћелија у присуству метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* концентрације 500 µg/ml долази и до смањења вијабилности HLL лимфоцита. Ипак, показано је и да при концентрацији овог екстракта од 1000 µg/ml долази до смањења вијабилности и здравих моноклеарних леукоцита након 24 и 48 часова. На тај начин, доказано је да метанолски екстракт гљиве *Cordyceps*

sinensis знатно слабије делује на HLL лимфоците и здраве моноклеарне леукоците, али у тестираним концентрацијама ипак смањује вијабилност и ових ћелија.

Резултати нашег истраживања су у складу са резултатима претходних студија, али је код 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 Вах 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 нашим истраживањем су добијени и на хуманој ћелијској линији промијелоцитне леукемије, односно HL-60 ћелијама (162). 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, 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 HLL лимфоцитима (162).

Резултати које смо добили мерењем активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту HLL лимфоцита након 48 часова третмана ових ћелија у присуству растућих концентрација метанолског екстракта гљиве *Cordyceps sinensis* у потпуности су у негативној корелацији са резултатима вијабилности ћелија добијеним МТТ тестом. Тачније, са повећањем концентрације екстракта и смањењем процента вијабилних ћелија одређеним МТТ тестом, долази до повећања активности лактат-дехидрогеназе у супернатанту третираних HLL лимфоцита.

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 HLL лимфоците. Ипак, пошто делује цитотоксично и на здраве моноклеарне леукоците, даља испитивања механизма деловања овог екстракта ће бити предмет неког од наредних истраживања.

На основу досадашњих резултата нашег истраживања, 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 HLL лимфоцита, а не делују на здраве моноклеарне леукоците. Стога смо у следећем кораку испитали којим типом ћелијске смрти ове супстанце смањују вијабилност HLL лимфоцита.

Истраживање је показало да хризин смањује вијабилност HLL лимфоцита индукцијом апоптозе. Наиме, показано је да након 24 часа инкубације ових ћелија у присуству хризина концентрације 40 μM , око 50% популације HLL лимфоцита је у некој од фаза апоптозе, било раној или касној. Након 48 часова инкубације HLL 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 нашег претходног истраживања МТТ 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 добијеним нашим истраживањем. Такође, Рамос и Алер су на ТНР-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 μM након 24 часа (115). Иако су ови резултати ове студије упоредиви са нашим резултатима, по први пут је у нашем истраживању показано да хризин индукује апоптозу HLL лимфоцита.

Начин на који екстракти биљке *Ligustrum vulgare* делују на туморске ћелијске линије, није испитан у великом броју студија. Ћурчић и сарадници су показали да екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* делују цитотоксично на НСТ-116 ћелијску линију карцинома колоне *in vitro* и да смањују вијабилност ових ћелија (125). Исти аутори су акридин-оранж/етидијум бромид бојењем показали да екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* у концентрацији од 100 $\mu\text{g/ml}$ индукује апоптозу око 48% популације НСТ-116 ћелија, а екстракт плода биљке *Ligustrum vulgare* исте концентрације од 100 $\mu\text{g/ml}$, након 24 часа инкубације индукује апоптозу око 46% НСТ-116 ћелија (125). Ови резултати су сагласни са нашом студијом. Наиме, резултати наше студије су показали

да већ након 24 часа култивације HLL лимфоцита у присуству метанолског екстракта листа биљке *Ligustrum vulgare* концентрације 500 µg/ml долази до апоптозе леукемијских лимфоцита, а са порастом периода инкубације са 24 часа на 48 часова, проценат апоптотичних HLL лимфоцита је износио око 45%. Укупан проценат HLL лимфоцита који су се налазили у некој од фаза апоптозе након 24 или 48 часова, је одговарао проценту смањења вијабилности ћелија израчунатим МТТ тестом, па можемо закључити да метанолски екстракт листа биљке *Ligustrum vulgare* смањује вијабилност HLL 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. Резултати наше студије су стога у сагласности са претходном студијом 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 је у корелацији 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 HLL 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 НСТ-116 ћелијској линији недвосмислено указују да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност ових ћелија индукцијом апоптозе (130). У резултатима студија Ђурчића и сарадника, показано је да је након 24 часа инкубације НСТ-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 HLL лимфоцита. Тако је, у нашем истраживању

процент апоптотичних ћелија након 48 часова инкубације HLL лимфоцита у присуству екстракта биљке *Teucrium pollium* концентрације 250 µg/ml износио око 46%. Иако екстракт биљке *Teucrium pollium* није индуковао апоптозу HLL лимфоцита толико драматично као у студији Турчића и сарадника, резултати смањења вијабилности HLL лимфоцита које смо претходно добили МТТ тестом, одговарају проценту апоптотичних ћелија које смо одредили проточном цитометријом. Стога можемо закључити да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* смањује вијабилност HLL лимфоцита тако што уводи HLL 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 HLL лимфоцита тако што индукују њихову апоптозу. Метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* испољавају нешто снажнију проапоптотичну активност тек после 48 часа инкубације. На основу наших резултата можемо закључити да хризин и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* најбрже и најефикасније уводе HLL 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 митондрија и апоптозу HLL лимфоцита и да је смањио вијабилност ћелија две хумане леукемијске ћелијске линије *in vitro* при релативно ниским µM концентрацијама. Иако би различити чиниоци могли да доприносе антитуморском дејству хризина, наши резултати су показали да је смањење експресије антиапоптотичног Bcl-2 протеина и активација проапоптотичног Вах протеина, директно укључено у процес апоптозе HLL лимфоцита индуковане хризином.

Митохондрије су ћелијске органеле које су укључене у процес извршења апоптозе. Пермеабилизација спољашње митохондријалне мембране допушта молекулима као што је цитохром *c* да буду ослобођени у цитоплазму и да последично индукују активацију каспаза и апоптозу. Та пермеабилизација спољашње митохондријалне мембране је углавном регулисана протеинима из Bcl-2 фамилије протеина, као што су проапоптотични Вах и антиапоптотични Bcl-2 протеин (84). Хризин индукује апоптозу повећањем

експресије Bcl-2 протеина и активацијом каспазе-3 код U937 леукемијских ћелија (112). Поред тога, показано је да хризин доводи до поремећаја функције митохондрија код ТНР-1 и HL-60 леукемијских ћелија (115). Резултати нашег истраживања су показали да хризин индукује апоптозу HLL лимфоцита која је повезана са активацијом проапоптотичног протеина Вах, смањењем експресије 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 и на А549 ћелијској линији епителијалног аденокарцинома плућа. Резултати ове студије су показали да хризин повећава експресију Вах протеина, смањује експресију Bcl-2 протеина и активира каспазу-3 код А549 ћелија плућа (185). Насупрот нашим резултатима, показано је и да хризин и други слични природни флавоноиди индукују апоптозу Т леукемијских ћелијских линија, смањењем експресије антиапоптотичног Mcl-1 протеина (186). Поред тога и други ћелијски механизми су можда укључени у процес апоптозе HLL лимфоцита коју индукује хризин. Динг и сарадници су показали да је хризин индуковао апоптозу HTLV-1 ћелија адултне Т ћелијске леукемије/лимфома највероватније инхибицијом експресије Mcl-1 протеина и повећањем експресије TRAIL-R2 протеина (187).

Резултати нашег истраживања су по први пут показали и да метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium* индукује селективну апоптозу HLL лимфоцита, тако што доводи до активације проапоптотичног протеина Вах, смањења експресије 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 била спровођена 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 смрти HLL лимфоцита коју индукује хризин, овај агенс има обећавајућу улогу као будући хемотерапеутик. Сличну улогу би могла имати молекулска компонента која је носилац биолошке активности метанолског екстракта биљке *Teucrium pollium*.

6. Закључак

Анализом добијених резултата, може се закључити следеће:

1. Хризин, метанолски екстракти листа и плода биљке *Ligustrum vulgare* и метанолски екстракт биљке *Teucrium pollium*, смањују вијабилност леукемијских лимфоцита, а не утичу на вијабилност здравих моноклеарних леукоцита *in vitro*.
2. Прополиси и метанолски екстракт гљиве *Cordyceps sinensis* смањују вијабилност леукемијских лимфоцита, али и здравих моноклеарних 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 моноклеарних 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 Вах/Bcl-2, што доводи до транслокације цитохрома с 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 Jun 15;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 Mar;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 уџбенике 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. Čurčić 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, Sarikurkcü 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, Calhella 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- κ B and Wnt/ β -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.