



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Жељко Д. Тодоровић

**АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКТИ АКТИВНИХ ПРИНЦИПА
ИЗОЛОВАНИХ ИЗ *ONOSMA VISIANII* НА
ЛЕУКЕМИЈСКИМ ЛИМФОЦИТИМА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Željko D. Todorović

**ANTITUMOR EFFECTS OF ACTIVE PRINCIPLES ISOLATED
FROM *ONOSMA VISIANII* ON LEUKEMIC LYMPHOCYTES**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

I Аутор
Име и презиме: Жељко Годоровић
Датум и место рођења: 16.11.1987. године, у Крагујевцу
Садашње запошљење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
II Докторска дисертација
Наслов: Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из <i>Onosma visianii</i> на леукемијским лимфоцитима
Број страница: 78
Број слика: 18 графикана, 4 табеле
Број библиографских података: 172
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Експериментална и клиничка интерна медицина
Коментори: Проф. др Предраг Ђурђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве тезе: 10.10.2018. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-182/17, 12.03.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Гордана Радосављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Доц. др Ненад Вуковић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан 3. Доц. др Оливера Тарабар, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академија Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

I Autor
Name and surname: Željko Todorvić
Date and place of birth: 16.11.1987. godine u Kragujevcu
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
II Doctoral Dissertation
Title: Antitumor effects of active principles isolated from <i>Onosma visianii</i> on leukemic lymphocytes
No. of pages: 78
No. of images: 18 figures, 4 tables
No. of bibliographic data: 172
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Experimental and clinical internal medicine
Mentors: Prof. dr Predrag Đurđević, Full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Prof. dr Marija Milovanović, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 10.10.2018.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-182/17, 12.03.2019.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Gordana Radosavljević, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and imunology, president 2. Prof. dr Nenad Vuković, Assistant professor of Faculty of Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Biochemistry, member 3. Prof. dr Olivera Tarabar, Assistant professor of Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defence in Belgrade for the narrower scientific field of Internal medicine, member
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Увод: Хронична лимфоцитна леукемија је хронично лимфопродиферативно обољење које карактерише накупљање морфолошки зрелих али имунски незрелих В лимфоцита у крви, костној сржи и лимфним ткивима. Настаје као последица клонске пролиферације малигно трансформисаних В лимфоцита и њихове резистенције на апоптозу. За разлику од хроничне лимфоцитне леукемије која је најчешћа леукемија у западном свету, В пролимфоцитна леукемија је ретка хронична лимфопродиферативна болест коју карактерише лоша прогноза и значајно краће преживљавање у поређењу са хроничном лимфоцитном леукемијом. Обе болести су, и поред савремене терапије, и даље неизлечиве. *Shikonin* и деривати *shikonin*-а су нафтохинонска једињења која су у бројним истраживањима показала значајно антитуморско дејство. Механизам антитуморског дејства ових супстанци је разнолик и укључује инхибицију више сигналних путева међу којима је и STAT3.

Циљ овог истраживања је испитивање потенцијалног антитуморског дејства два деривата шиконина, добијених из биљке *Onosma visianii*, *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а, *in vitro* коришћењем ВСL1 ћелијске линије мишије леукемије/лимфома и JVM-13 ћелијске линије хумане В-пролимфоцитне леукемије као и *in vivo* коришћењем експерименталног модела хроничне лимфоцитне леукемије.

Материјал и методе: За испитивање цитотоксичког ефекта деривата шиконина коришћен је МТТ тест. Тип ћелијске смрти, пролиферација, ћелијски циклус и експресија молекула који учествују у контроли ових процеса анализирани су проточном цитометријом. Експресија гена који су регулисани STAT3 молекулом испитана је q-RT-PCR (од енг. *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) методом. Антитуморски ефекти деривата шиконина *in vivo* испитани су детекцијом леукемијских ћелија у периферној крви и слезини мишева којима су претходно интравенски инјектоване ВСL1 ћелија проточном цитометријом.

Резултати: *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* изазивају поремећаје ћелијског циклуса и индукују апоптозу, инхибирају пролиферацију и смањују експресију фосфорилисане форме STAT3 и гена чију експресију контролише овај транскрипциони фактор у ВСL1 и JVM-13 ћелијама. Испитивани деривати шиконина смањују проценат леукемијских ћелија у периферној крви и слезини мишева са CLL. Веза између смањења експресије фосфорилисаног STAT3 у ћелијама третираним испитиваним дериватима шиконина и смрти ВСL1 ћелија потврђена је детекцијом појачане смрти ћелија третираних и инхибитором Jak2 киназе.

Закључак: *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* највероватније смањењем фосфорилације STAT3 индукују апоптозу, инхибирају ћелијску пролиферацију и атенуирају матичност леукемијских ћелија. Ови резултати указују да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin*, уз додатна претклиничка испитивања, могу бити потенцијална терапија за хроничну лимфоцитну и В пролимфоцитну леукемију.

Кључне речи: *isobutyrylshikonin*, *α-methylbutyrylshikonin*, STAT3, *Onsoma visanii*

ABSTRACT

Introduction: Chronic lymphocytic leukemia is a chronic lymphoproliferative disease characterized by the accumulation of morphologically mature but immune immature B lymphocytes in the blood, bone marrow and lymphatic tissues. It occurs as a consequence of clonal proliferation of malignantly transformed B lymphocytes and their resistance to apoptosis. Unlike chronic lymphocytic leukemia, which is the most common leukemia in the Western world, B prolymphocytic leukemia is a rare chronic lymphoproliferative disease characterized by poor prognosis and significantly shorter survival compared to chronic lymphocytic leukemia. Both diseases, despite modern therapy, are still incurable.

Shikonin and shikonin derivatives are naphthaquinone compounds that have shown significant antitumor activity in numerous studies. The mechanism of antitumor action of these substances is diverse and includes inhibition of several signaling pathways, including STAT3, induction of endoplasmic reticulum stress, hyperproduction of oxygen free radicals and many others. The final result is apoptosis of the treated cells.

Aim: The main aim of this study was to examine the antitumor activity of two shikonin derivatives derived from the plant *Onosma visianii*, isobutyrylshikonin and α -methylbutyrylshikonin in BCL1, mouse CLL cells and JVM-13, human B-PLL cells

Material and methods: The cytotoxicity of shikonin derivatives was measured by an MTT test. Cell death, proliferation, cell cycle, and expression of molecules that control these processes were analyzed by flow cytometry. Expression of STAT3-regulated genes was analyzed by real-time q-RT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction). The antitumor effects of shikonin derivatives in vivo were analyzed, using flow cytometry, by detection of leukemia cells in the peripheral blood and spleens of mice intravenously injected with BCL1 cells.

Results: Isobutyrylshikonin and α -methylbutyrylshikonin induced cell cycle disturbances and apoptosis, inhibited proliferation, and decreased expression of phospho-STAT3 and downstream-regulated molecules in BCL1 and JVM-13 cells. IBS and MBS decreased the percentage of leukemia cells in vivo. The link between the decrease in phosphorylated STAT3 by MBS and IBS and BCL1 cell death was confirmed by detection of enhanced cell death after addition of AG490, an inhibitor of Jak2 kinase.

Conclusion: It seems that IBS and MBS, by decreasing STAT3 phosphorylation, trigger apoptosis, inhibit cell proliferation, and attenuate leukemia cell stemness. Results suggest that isobutyrylshikonin and α -methylbutyrylshikonin, with additional preclinical studies, may be potential therapies for chronic lymphocytic and B prolymphocytic leukemia.

Key words: *isobutyrylshikonin, α -methylbutyrylshikonin, STAT3, Onosma visianii*

САДРЖАЈ

1. Увод.....	1
1.1. Хронична лимфоцитна леукемија.....	1
1.1.1. Епидемиологија.....	1
1.1.2. Етиологија и патогенеза.....	1
1.1.3. Клиничка слика.....	3
1.1.4. Дијагноза и стадирање болести.....	4
1.1.5. Лечење.....	5
1.2. В пролимфоцитна леукемија.....	7
1.2.1. Дефиниција и епидемиологија.....	7
1.2.2. Патогенеза.....	7
1.2.3. Клиничка слика.....	7
1.2.4. Дијагноза.....	8
1.2.5. Лечење.....	8
1.3. <i>Onosma visianii</i>	9
1.4. <i>Shikonin</i>	9
1.4.1. <i>Shikonin</i> и инфламација.....	10
1.4.2. Неуро- и кардиопротективно дејство <i>shikonin</i> -а.....	10
1.4.3. Антимикробно дејство <i>shikonin</i> -а.....	10
1.4.4. <i>Shikonin</i> и зарастање рана.....	11
1.4.5. Антитуморско дејство <i>shikonin</i> -а.....	12
1.5. Механизми ћелијске смрти.....	13
1.5.1. Апоптоза.....	13
1.6. Циклини и циклин зависне киназе.....	15
1.7. STAT3 сигнални пут.....	15
2. Циљ истраживања.....	17
3. Матријал и методе.....	18
3.1. Врста студије.....	18
3.2. Ћелијске линије.....	18
3.2.1. BCL1 ћелијска линија мишије леукемије.....	18
3.2.2. JVM-13 ћелијска линија хумане В-пролимфоцитне леукемије.....	18
3.3. Биоактивне супстанце.....	18
3.4. МТТ тест.....	19
3.5. ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности.....	20
3.6. Анализа ћелијског циклуса.....	20
3.7. Анализа фенотипа леукемијских ћелија проточном цитометријом.....	20

3.8.	Имунофлуоресценца.....	21
3.9.	Анализа експресије гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену.....	22
3.10.	Испитивање антитуморског дејства деривата shikonin-a in vivo.....	23
4.	Резултати.....	25
4.1.	Утицај екстраката корена биљке <i>Onosma visianii</i> у метанолу и петролу етар метилен хлориду на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	25
4.2.	Утицај <i>isobutyrylshikonin-a</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	25
4.3.	Утицај α -methylbutyrylshikonin-a на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	27
4.4.	Утицај acetylshikonin-a на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	28
4.5.	Утицај <i>deoxyshikonin-a</i> , β -hydroxyisovalerylshikonin-a, 5,8-O-dimethyl <i>isobutyrylshikonin-a</i> , 5,8-O-dimethyl <i>deoxyshikonin-a</i> на вијабилност леукемијских лимфоцита.....	29
4.6.	IC50 вредности екстраката корена биљке <i>Onosma visianii</i> и изолованих деривата шиконина.....	30
4.7.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin индукују апоптозу BCL1 леукемијских лимфоцита.....	31
4.8.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin индукују апоптозу JVM-13 леукемијских лимфоцита.....	32
4.9.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin смањују антиапоптотске а повећавају проапоптотске молекуле.....	33
4.10.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin инхибирају пролиферацију леукемијских лимфоцита.....	38
4.11.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin индукују застој леукемијских лимфоцита у G0/G1, односно G2/M фази ћелијског циклуса.....	41
4.12.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin смањују експресију циклина D, а повећавају експресију p16, p21 и p27.....	42
4.13.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin инхибирају STAT3 сигнални пут и гене које STAT3 регулише.....	45
4.14.	<i>Isobutyrylshikonin</i> и α -methylbutyrylshikonin инхибирају пролиферацију BCL1 ћелија in vivo.....	48

5. Дискусија.....	51
5.1. <i>Isobutyrylshikonin</i> и <i>α-methylbutyrylshikonin</i> изоловани из <i>Onosmae visianii</i> остварују значајан антилеукемијски	51
5.2. <i>Isobutyrylshikonin</i> и <i>α-methylbutyrylshikonin</i> изоловани из <i>Onosmae visianii</i> индукују апоптоску смрт BCL1 и JVM-13 ћелија.....	52
5.3. <i>Isobutyrylshikonin</i> и <i>α-methylbutyrylshikonin</i> изоловани из <i>Onosmae visianii</i> делују антипролиферативно на BCL1 и JVM-13 ћелије.....	52
5.4. <i>Isobutyrylshikonin</i> и <i>α-methylbutyrylshikonin</i> инхибирају експресију pSTAT3 и гена чију експресију регулише STAT3.....	53
6. Закључци.....	55
7. Скраћенице.....	56
8. Литература.....	58

1. Увод

1.1. Хронична лимфоцитна леукемија

Хронична лимфоцитна леукемија, CLL (од енг. *chronic lymphocytic leukemia*) је хронична лимфопролиферативна болест која се карактерише акумулацијом морфолошки зрелих али имунски незрелих В лимфоцита у периферној крви, костној сржи, лимфним ткивима и другим органима (1).

1.1.1. Епидемиологија

CLL је најчешћа леукемија у западном свету са инциденцом од 4.2 на 100 000 особа годишње. Инциденца се повећава на преко 30 на 100 000 особа годишње код старијих од 80 година (2). Медијана старости оболелих у тренутку постављања дијагнозе је 72 године. Око 10% пацијената са CLL је млађе од 55 година. Постоји наследна генска предипозиција за обољевање од CLL. Показано је да је блиска родбина оболелог у 6 до 9 пута већем ризику да оболи од хроничне лимфоцитне леукемије у поређењу са општом популацијом (2).

1.1.2. Етиологија и патогенеза

Тачан разлог појаве хроничне лимфоцитне леукемије ни данас није познат, али зна се да не постоји повезаност између развоја CLL-а и јонизујућег зрачења, хемијских агенаса и вирусних инфекција (3,4).

Дуго се сматрало да је CLL резултат клонске акумулације малигно трансформираних зрелих В лимфоцита који су резистентни на апоптозу, међутим новије студије показују да постоји и значајна пролиферација ћелија CLL и то доминантно у лимфним чворовима и костној сржи у којој се формирају пролиферативне нише, тако да се сада сматра да је CLL болест која настаје због несразмере у апоптози и пролиферацији В лимфоцита (5,6).

Ћелије CLL-а експримирају молекуле CD5, CD19, CD23 и ниске нивое површинских имуноглобулина (7). Овај фенотипски профил се разликује од фенотипа нормалних В лимфоцита. Међутим, Резултати генских студија су показали да ћелије CLL-а вероватно настају од популације CD5+ В лимфоцита који се иначе у малом проценту налазе у крви здравих особа (8). На основу ових студија, сада се верује да ћелије CLL-а чији гени за варијабилни регион тешког ланца имуноглобулина нису прошли процес соматске хипермутације настају из зрелих CD5+, CD27- В лимфоцита, а да ћелије CLL-а у којима се десио процес соматске хипермутације настају из претходно не препознатих CD5+, CD27+ В лимфоцита постгерминативног центра (9).

Крв значајног броја одраслих особа садржи олигоклонске/моноклонске популације В лимфоцита са фенотипом сличним фенотипу CLL лимфоцита. Таква олигоклонска/моноклонска пролиферација В лимфоцита, позната као моноклонска В ћелијска лимфоцитоза идентификована је у крви приближно 13% одраслих браће и сестара пацијената са CLL-ом (10). Моноклонска В ћелијска лимфоцитоза је регистрована код 3.5% здравих одраслих особа старијих од 45 година које немају породичну историју CLL (11). Понекад В лимфоцити у моноклонској В ћелијској лимфоцитози имају хромозомске абнормалности сличне онима које су примећене у CLL-у, што указује да моноклонска В ћелијска лимфоцитоза представља рану фазу у настанку CLL-а. На ризик од развоја

моноклонске В ћелијске лимфоцитозе у CLL могу утицати наслеђене одређене варијанте гена чији су продукти укључени у контролу кључних функција у развоју В лимфоцита. У сваком случају, пошто годишње око 1% одраслих са моноклонском В ћелијском лимфоцитозом развијају CLL или друге В ћелијске лимфоме вероватно је да В лимфоцити очигледно морају да стекну додатне генске или епигенске промене пре него што постану CLL ћелија (12).

Генске и хромозомске абнормалности ћелија CLL су веома хетерогене. Осим што су значајне за патогенезу саме болести, генске абнормалности су добар предиктор и прогнозе исхода оболелог, па је тако показано да пацијенти код којих су присутне леукемијске ћелије које потичу од В лимфоцита који су прошли процес соматске хипермутације у герминативним центрима имају бољу прогнозу од пацијената код леукемијски лимфоцити потичу од В лимфоцита који нису прошли кроз овај процес (13-15).

Од хромозомских абнормалности у CLL најчешће су делеције и то: 11q, 17p, 6q, а најчешћа хромозомска абнормалност је делеција дугог крака 13. хромозома у региону 13q14 која се јавља код 55% пацијената. Делеција 13q14 повезана је са споријим током болести и већим временским интервалом између дијагнозе болести и почетка лечења (16). Такође, делеција 13q14 се повезује са повећањем количине протеина Bcl-2 у ћелијама CLL-е. Разлог томе је што се у исеченом региону налазе гени *miR-15a* и *miR-16-1*. Ови гени кодирају синтезу регулаторне РНК означене као микро РНК (енг. miRNA). Микро РНК инхибирају експресију других гена узрокујући деградацију информационе РНК или блокирајући процес транскрипције. Делеције гена *miRNA15a* и *miRNA16-1* удружене су са повећаном количином антиапоптоличног протеина Bcl-2 у ћелијама (17,18).

Друга по учесталости хромозомска делеција у CLL-и је делеција дугог крака 11. хромозома у региону 11q22.3-q23.1. Ова делеција је повезана са пролимфоцитном морфологијом CLL ћелија и лошом прогнозом и јавља се у око 18% оболелих (16).

Делеција кратког крака 17. хромозома, која се јавља у 7% оболелих, и удружена је са губитком или смањењем функције тумор супресор гена *P53* и повезана је са трансформацијом CLL у пролимфоцитну леукемију и Рихтеровом трансформацијом болести (16).

Делеција дугог крака 6. хромозома је ретка хромозомска абнормалност и често се јавља са другим, чешћим хромозомским абнормалностима. Пацијенти са *6q* делецијом имају лошу прогнозу са великим бројем леукоцита и пролимфоцитном морфологијом ћелија (16).

Осим делеција, у ћелијама CLL су детектоване и тризومیје, и то тризومیја 12. хромозома као најчешћа од њих. Ова тризومیја је повезана са лошом прогнозом оболелих, а сама тризومیја је неједнако заступљена у малигним лимфоцитима, највише је заступљена у ћелијама CLL-а у лимфним чворовима (16).

Осим хромозомских абнормалности, у ћелијама CLL-а откривене су и бројне генске абнормалности у виду губитка гена или њихове мутације. Неке генске абнормалности су уско повезане са хромозомским, као што је губитак тумор супресор гена *P53* који настаје код делеције 17p (17), али такође може доћи и до мутације *P53* и без делеције кратког крака 17. хромозома као и што се могу наћи бројне генске мутације које нису повезане са хромозомским абнормалностима. У ери генског профилисања CLL-е, најчешће помињане мутације су у генима *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* (19-25).

NOTCH1 кодира транскрипциони фактор активиран лигандом који регулише неколико сигналних путева који индукују диференцијацију хематопоетских прогенитора у незреле Т ћелије и диференцијацију зрелих В лимфоцита у ћелије које продукују антитела (26, 27). Мутације су откривене у 10% новодијагностикованих случајева CLL-е, али у 15 до 20% прогресивних и/или релапсних случајева CLL-е. *NOTCH1* мутације су такође чешће у ћелијама CLL-е које експримирају ген за варијабилни регион тешког ланца имуноглобулина који није прошао кроз процес соматских хипермутација и који имају тризомију 12, који сами по себи су лош прогностички маркер (19, 20, 24).

SF3B1 ген кодира сплајсинг фактор 3В подјединицу 1, који је део главног и споредног сплајсозома. Сплајсозоми исецају интроне из прекурсорске РНК, егзони се спајају и формира се зрела информациона РНК. Мутације у *SF3B1* гену уочене су у 10% новодијагностикованих случајева CLL-а и у 17% случајева са прогресивном, узнапредовалом болешћу која захтева терапију (22, 23).

BIRC3 ген кодира протеин који припада фамилији протеина инхибитора апоптозе. Мутација у *BIRC3* гену за последицу има активацију NF-κB (енг. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) сигналног пута и резистенцију ћелија CLL-е које поседују ову мутацију на хемиотерапију, самим тим мутација овог гена је повезана са лошом прогнозом (25).

Активација В ћелијског рецептора (BCR од енг. *B cell receptor*) је још једна значајна карика у патогенези CLL-е. Везивање антигена за BCR за последицу има померања у ћелијској мембрани и фосфорилацију сигналних молекула CD79a и CD79b деловањем LYN киназе. Фосфорилисане ITAM секвенце у склопу молекула CD79a и CD79b регрутују SYK киназу која се активира фосфорилацијом и постаје способна да додаје фосфатне групе (активира) различите адапторске протеине и сигналне молекуле, као што су Брутонова тирозин киназа и фосфатидилинозитол 3-киназа. Брутонову тирозин киназу иначе експримирају незрели В лимфоцити, а у зрелим је њене експресија минимална. Повећање експресије Брутонове тирозин киназе виђа се код малигно трансформисаних лимфоцита као што су лимфоцити CLL-е. Брутонова тирозин киназа нисходно активира сигналне путеве као што су АКТ/mTOR (енг. *Mammalian target of rapamycin*), NF-κB, ERK (енг. *Extracellular signal-regulated kinase*), STAT3 (енг. *Signal transducer and activator of transcription 3*). Крајњи исход активације ових сигналних путева је повећана експресија антиапоптотских протеина, смањене апоптозе и повећање пролиферације ћелија CLL-е (28, 29).

1.1.3. Клиничка слика

Хронична лимфоцитна леукемија најчешће почиње неприметно и често се дијагностикује након анализе крвне слике урађене рутински током редовног прегледа изабраног лекара. Симптоми и знаци болести настају због нагомилавања леукемијских ћелија у костној сржи и лимфним органима, супресије имунског одговора и аутоимунских поремећаја који прате ово обољење (30).

Увећање лимфних чворова у једној или више регија је најчешћи клинички налаз у CLL-и. Лимфни чворови су мекани, безболни и њихово увећање је оно што пацијенти обично прво примете (30).

У крвној слици, осим лимфоцитозе, могу се регистровати анемија и тромбоцитопенија. Анемија и тромбоцитопенија се могу јавити због инфилтрације костне сржи лимфоцитима, хиперспленизма и продукције аутоантитела. Због тромбоцитопеније у одмаклом стадијуму болести, код оболелих се може јавити хеморагијски синдром. Неспецифични симптоми као што су малаксалост и замор, последица су анемије. Жута пребојеност коже и слузница присутни су ако постоји аутоимунска хемолиза еритроцита. Број гранулоцита такође може бити смањен због инфилтрације костне сржи малигним ћелијама и хиперспленизма. Гранулоцитопенија и поремећај хуморалне имуности са хипогамаглобулинемијом узрок су развоја бројних бактеријских и гљивичних инфекција, а честа је и реактивација *Varicella-zoster virus*-а и појава херпес зостера, што може бити и први знак болести (30).

Неспецифична, општа симптоматологија (тзв. Б симптоми) у виду ноћног презнојавања, губитка телесне тежине за више од 10% почетне тежине у периоду краћем од 6 месеци и фебрилности, се јавља код око 10% оболелих (30).

Леукемијски лимфоцити могу инфилтрисати друге органе као што су гастроинтестинални и респираторни систем, кожу, бубреге, срце. На кожи ови инфилтрати се виде као чворови и папуле, најчешће локализовани на лицу (30).

1.1.4. Дијагноза и одређивање клиничког стадијума болести

Да би поставили дијагнозу CLL број моноклонских В лимфоцита у крви мора бити већи од $5 \times 10^9/l$ и тај број мора да перзистира минимум три месеца (31). Клоналност ових В лимфоцита мора бити потврђена проточном цитометријом. У размазу периферне крви ови лимфоцити су карактеристично мали, са великим једром, мало цитоплазме, кондезованим једром и без једарцета. Одређени број атипичних, великих ћелија и пролимфоцита се може наћи, али проценат пролимфоцита не сме прећи 55, у супротном ради се о пролимфоцитној леукемији (31).

CLL ћелије имају специфичан имунофенотип који се користи при дијагностиковању CLL-е проточном цитометријом. Ови лимфоцити експримирају мембрански молекул CD5 заједно са молекулима CD19, CD20 и CD23, карактеристичним за В лимфоците. Експресија CD20 и CD79b је ниска у поређењу са нормалним лимфоцитима. Такође, сваки клон леукемијских лимфоцита експримира један лаки ланац имуноглобулина или κ или λ (31).

За процену клиничког стадијума и дужине преживљавање оболелих у употреби су два система, одређивање клиничког стадијума по *Binet*-у и одређивање клиничког стадијума по *Rai*-у. Обе класификације класификују оболеле у три стадијума. Оригинална *Rai* класификација има пет група али су у оквиру ње на основу дужине преживљавања пацијенти разврстани у три групе, на оне са ниском ризиком, умереним ризиком и пацијенте са високим ризиком. Класификација по *Binet*-у класификује оболеле на *Binet A*, *Binet B* и *Binet C* стадијум (табела 1.) (2).

Стадијум	Клиничке особине	Медијана преживљавања
<i>Binet</i>		
<i>Binet A</i>	хемоглобин \geq 10.0g/dl, тромбоцити \geq 100 \times 10 ⁹ /l, <3 захваћена лимфна региона	>10 година
<i>Binet B</i>	хемоглобин \geq 10.0g/dl, тромбоцити \geq 100 \times 10 ⁹ /l, \geq 3 захваћена лимфна региона	>8 година
<i>Binet C</i>	хемоглобин<10.0g/dl, тромбоцити<100 \times 10 ⁹ /l	6.5 година
<i>Rai</i>		
<i>Низак ризик</i>		
<i>Rai 0</i>	лимфоцитоза >15 \times 10 ⁹ /l лимфоцита	>10 година
<i>Умерени ризик</i>		
<i>Rai I</i>	лимфоцитоза и лимфаденопатија	>8 година
<i>Rai II</i>	лимфоцитоза и хепатомегалија и/или спленомегалија са или без лимфаденопатије	
<i>Висок ризик</i>		
<i>Rai III</i>	лимфоцитоза и хемоглобин<10.0g/dl	6.5 година
<i>Rai IV</i>	лимфоцитоза и тромбоцити<100 \times 10 ⁹ /l	

Табела 1.

1.1.5. Лечење

Савремено лечење оболелих од CLL-е заснива се на примени цитостатика из групе алкилирајућих агенаса и пуринских аналога у комбинацији са анти CD-20 антителима. Задњих неколико година у терапију се уводе и инхибитори тирозин киназа као што је инхибитор Брутонове киназе, инхибитор фосфатидилинозитол 3-киназе и антитела које инхибира антиапоптотски молекул Bcl-2 (2).

Већина пацијената са CLL-ом у тренутку дијагнозе не захтева терапију, већ само клиничко праћење. Пацијенти који захтевају лечење су они који су у стадијуму C по Binet-у или III и IV по Rai-у. Пацијенти који се налазе у стадијуму A и B по Binet-у и стадијуму 0-II по Rai-у захтевају лечење само ако имају симптоматску, активну болест. Активна болест се дефинише на основу следећих клиничка показатеља: постојање општих, неспецифичних симптома (тзв. B симптоми), повећања броја лимфоцита у периферној крви за више од дупло у периоду краћем од 6 месеци или за 50% у периоду краћем од два месеца, налаз масивне или прогресивне лимфаденопатије, хепато и спленомегалије, симптоматско екстранодално ширење болести и појава аутоимунске анемије и тромбоцитопеније која не реагује на стандардну терапију кортикостероидима (2,32).

Иницијална терапија зависи од физичког стања пацијента, статуса гена за варијабилни регион тешког ланца имуноглобулина и присутности *TP53* мутације односно делеције 17p хромозома.

Код пацијената који су физички доброг општег статуса, без значајних коморбидитета са мутираним варијабилним регионом тешког ланца имуноглобулина и без *TP53* мутације односно делеције 17p хромозома, лечење се започиње RFC протоколом (32,33). Лечење RFC протоколом у првој терапијској линији доводи до одговора на терапију (енг. *overall response rate* - ORR) у 90-95% оболелих и до комплетне ремисије (енг. *complet response* – CR) у 40-75% оболелих (33,34). Код пацијената старијих од 65 година треба размотрити отпочињење лечења CLL-а применом BR протокола (bendamustine + rituximab) јер је овај протокол у односу на RFC протокол праћен мањом инциденцом тешких инфекција уз слично време до прогресије (енг. *progression free survival* – PFS) код ове старосне групе пацијената (2,35). Друга опција за ове пацијенте је инхибитор ВТК (енг. *bruton tyrosine kinase*) ибрутиниб узимајући у обзир присутне аритмије, узимање антиаритмика, антиагегационе и антикоагулантне терапије и свеукупног ризика од крварења пацијента (2). За пацијенте из ове групе које не могу да поднесу агресивно лечење, најбоља терапијска опција је комбинација венетоклакса, инхибитора bcl-2 молекула, у комбинацији са анти CD20 антителом, обинитузумабом или у случају да ова терапија није досупна, употреба хлорамбуцила у комбинацији са обинитузумабом или инхибитора ВТК.

За пацијенте са немутираним варијабилним регионом тешког ланца имуноглобулина и без *TP53* мутације односно делеције 17p хромозома најбоље је започети прву терапијску линију са ибрутинибом. Имунохемиотерапија RFC остаје као терапијска опција само за пацијенте којима ибрутиниб није досупан. За пацијенте који због присутних коморбидитета не могу да користе ибрутиниб, комбинација венетоклакса са обинитузумабом или хлорамбуцила са обинитузумабом су добре терапијске опције (2).

Група пацијената са *TP53* мутацијом односно делецијом 17p хромозома је и најзахтевнија за лечење због кратког преживљавања и лошег одговора на имунохемиотерапију па се ова терапија и не препоручује за ову групу пацијената. Лечење ових пацијената се започиње применом ВТК инхибитора, ибрутинибом или акалбрутинибом. У случају коморбидитета који онемогућавају примену ВТК инхибитора, лечење се започиње комбинацијом венетоклакса са обинитузумабом или, ако није могућа примене ни ове терапије, инхибитором фосфоинозитол 3-киназе, иделалисибом у комбинацији са ритуксимабом (2).

С обзиром да је CLL неизлечива болест, пре или касније долази до релапса болести. Пацијенте са релапсом не треба лечити ако су асимптоматски, лечење се започиње тек са настанком активне болести. Пацијенте са релапсом или прогресијом који су настали након више од 36 месеци од иницијалне терапије и није им нађена *TP53* мутација, можемо лечити истим терапијским модалитетом којим смо лечили пацијента у првој терапијској линији. Ако је до релапса дошло унутар 36 месеци од иницијалне терапије или пацијент није имао одговор терапију примењену у првој терапијској линији, мењамо терапијски режим. За лечење релапса или примарно рефракторне болести користи се најпре ибрутиниб или комбинација венетоклакса са ритуксимабом ако постоје кардиваскуларни коморбидитети или ризик од крварења који спречава употребу ибрутиниба. С друге стране, ибрутиниб је боља терапијска опција за пацијенте за оштећеном функцијом бубрега од венетоклакса. Резервна терапијске опције су комбинација иделалисиба са ритуксимабом или примена имунохемиотерапије, али примена имунохемиотерапије је

могућа само код пацијената код којих је релапс наступио после више од 36 месеци и код којих нови ихбитори малих молекула нису доступни или их је немогуће применити (2).

1.2. В пролимфоцитна леукемија

1.2.1. Дефиниција и епидемиологија

В пролимфоцитна леукемија (В-PLL) је ретка лимфопролиферативна болест која чини око 1% свих зрелих В ћелијских неоплазми. Углавном се јавља код особа старијих од 60 година и нешто је чешћа код особа мушког пола. Иницијално се сматрала подтипом CLL-а, али је у класификацији лимфоидних неоплазми Светске здравствене организације из 2008 а потом и из 2016, јасно одвојена као засебна болест (36-38).

1.2.2. Патогенеза

Патогенеза В-PLL-а и даље је непозната. Генске студије су показале одређене хромозомске и генске абнормалности које постоје у пролимфоцитима, али се не зна њихов утицај у патогенези ове болести. Једна од честих карактеристика ове болести је и мутација гена за варијабилни регион тешког ланца имуноглобулина, али за разлику од CLL-а, ова мутација не утиче на преживљавање оболелих (39, 40).

Једна од најчешћих мутација/делеција која је идентификована у чак 53% оболелих од В-PLL-е је мутација/делеција *TP53* гена. Као и CLL-е, ова мутација/делеција је повезана са лошом прогнозом, кратким преживљавањем и резистенцијом на хемиотерапију оболелих (41).

Честе хромозомске абнормалности су делеције 11q и 13q које се откривене у 39, односно 55% оболелих (42).

Мутација у гену *MYC* сматра се једном од кључних у патогенези В-PLL-е. Обзиром да се овај ген налази на 8. хромозому транслокације као што су $t(8;14)(q24.1;q32)$; $t(2,8)(p11;q24)$ и $t(8;22)(q24;q11)$ доводе *MYC* ген у блиски контакт са промоторима гена који су иначе хиперактивни у В лимфоцитима, као што су гени за тешке и лаке ланце имуноглобулина. Осим ових транслокација, други механизам повећане експресије *MYC* гена је његова амплификација која је идентификована код оболелих од В-PLL (43).

1.2.3. Клиничка слика

Спленомегалија представља најчешћу клиничку манифестацију која се виђа у преко 90% оболелих и често је масивна. Лимфаденопатија је знатно ређа и јавља се у око 20% оболелих и ретко је масивна (44). Око трећине пацијената у тренутку дијагнозе има значајну лимфоцитозу са преко $100 \times 10^9/l$ периферне крви. Анемија и тромбоцитопенија се региструју у око 50% оболелих. За разлику од Т пролимфоцитне леукемије, плеурални излив и асцитес су ретки у В-PLL-у као и инфилтрација централног нервног система која је чешћа у релапсу болести. У већини случајева концентрације серумских имуноглобулина су нормалне, мада су код неких пацијената пронађене високе вредности М компоненте. За разлику од CLL-е, хипогамаглобулинемија је ретка појава (44).

1.2.4. Дијагноза

По FAB-у (енг. *French-American-British*) В-PLL леукемија се дефинише као болест код које је број пролимфоцита у периферној крви већи од 55% од укупног броја циркулишућих ћелија (45). У размазу периферне крви оболелих од В-PLL-е уочавају се пролимфоцити као велике округле ћелије (двоструко веће од нормалних лимфоцита) са округлим једром и умерено кондензованим једарним хроматином, округлим, централно постављеним једарцетом и оскудном благо базофилном цитоплазмом (46).

При постављању дијагнозе В-PLL-е треба искључити друге лимфопрлиферативне болести. CLL је болест где доминирају ситни, морфолошки зрели лимфоцити али налаз до 10% пролимфоцита није неуобичајан. Подтип CLL-е код којег се детектује већи проценат пролимфоцита, између 10 и 55%, се класификује као CLL/PLL (47). У овом подтипу CLL-е чест је налаз тризомија 12. хромозома, делеција 13q, немутирани варијабилни регион за тешки ланац имуноглобулина, висока експресија CD38 који сами за себе представљају неповољне прогностичке маркере. Укупно десетогодишње преживљавање пацијената са CLL-ом код којих је проценат пролимфоцита био испод 10 износио је 30%, а пацијената код којих је број пролимфоцита био већи само 3% (47,48).

„*Mantle*“ ћелијски лимфом такође морфолошки може подсећати на В-PLL. У таквим случајевима, доказивањем транслокације t(11;14) и последичне хиперекспресије гена за циклин D1, поставља се дијагноза „*mantle*“ ћелијског лимфома (49,50).

Дефинитивна дијагноза В-PLL-а поставља се проточном цитометријом. Пролимфоцити В-PLL-а експримирају мембрански имуноглобулин М, са или без експримирања мембранског имуноглобулина D, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD79b, FMC7 и, као и CLL, један од два лака ланца имуноглобулина. За разлику од CLL-а, пролимфоцити не експримирају CD5 и CD23. Код једне трећине оболелих, CD5 може бити експримиран на пролимфоцитима и тада је тешко разликовати В-PLL од леукемијске фазе „*mantle*“ ћелијског лимфома. Дефинитивна дијагноза се тада поставља мерењем експресије циклина D1 и детектовањем транслокације t(11;14) (51).

1.2.5. Лечење

Прогноза оболелих од В-PLL-е је лоша, медијана преживљавања износи 3 године. Главни показатељ кратког преживљавања и резистенције на хемиотерапију је, као и у CLL-у, присуство делеције/мутације *TP53* тумор супресор гена. Такође, и број лимфоцита преко $100 \times 10^9/l$ и концентрација хемоглобина мања од 110g/l су предиктори кратког преживљавања (52).

Асимптоматске пацијенте у индолентној фази болести не треба лечити, већ само клинички пратити. Кад се јави знаци и симптоми прогресије болести, треба започети лечење. Око избора терапијског модалитета за лечење В-PLL-е и даље не постоје јединствени ставови јер не постоје ни велике клиничке студије које би доказале предност једне терапије у односу на другу.

У неколико студија коришћена је монотерапија пуринским аналозима али је показано да иако је ORR био око 50%, PFS је био кратак. У студији у којој је 14 пацијената са В-PLL-ом лечено монотерапијом пуринским аналогом, пентостатином, 50% је постигло парцијалну ремисију (енг. *partial remission* – PR), али ниједан CR. PFS био је само 12

месеци (53). Слични резултати су добијени и коришћењем другог пуринског аналога, кладрибина, у монотерапији са PFS од 14 месеци код пацијената који су након терапије постигли CR, и PFS од само 3 месеца код пацијената који су били у PR (54). Овакве студије су показале да су ћелије В-PLL-е резистентне на пуринске аналоге, поготово ако постоји делеције/мутације *TP53*. Значајно бољи резултати су добијени комбинацијом ритуксимаба са флударабином или бендамустином и једним од антрациклина, митоксантроном или епирубицином. Лечењем четири пацијента са В-PLL-ом протоколом ритуксимаб + епирубицин + флударабин, постигнута је CR код сва четири пацијента са PFS у трајању од 61 месец (55). Други аутори су користили комбинацију ритуксимаб + митоксантрон + флударабин у лечењу два пацијента са В-PLL-ом и постигли су CR код оба пацијента (56). Обзиром на претходне резултате и вишегодишњу успешну примену комбинације ритуксимаб + флударабин + циклофосфамид у лечењу CLL-е, ова комбинација са или без антрациклина се препоручује за иницијално лечење пацијената са В-PLL-ом (57).

Посебан проблем представљају пацијенти са делецијом/мутацијом *TP53* код којих постоји значајна резистенција на имунохемотерапију ритуксимаб + флударабин + циклофосфамид. Лечење ових пацијената дуго се заснивало на примени алемтузумаба, анти CD52 моноклонског антитела (58, 59). Одскора, за лечење ових пацијената користе се инхибири киназа који се користе и у лечењу CLL-е, ибрутиниб и иделализиб, који су показали значајне резултате код пацијената са неповољним генским статусом (60, 61).

Алогена трансплантација матичне ћелије хематопоезе може се узети у разматрање код млађих пацијената, доброг физичког стања и без коморбидитета, нарочито ако постоји делеција/мутација *TP53* (58).

1.3. *Onosma visianii*

Род *Onosma* се састоји од око 150 врста које се простиру углавном у медитеранском региону и централној Азији. *Onosma visianii* је једна од врста из овог рода која расте на подручију Балканског полуострва и југоисточне Европе. У Србији је позната под називом „трава са Румије“. Назив је добила по планини Румији на чијим обронцима расте, а корен ове биљке вековима уназад се користи за справљање мелема за опекотине и ране. Фитохемијска анализа ове биљке први пут је урађена 1971. године када је откривено да корен ове биљке садржи *shikonin*-е (62). Прва озбиљнија анализа ове биљке је објављена 2017. године када је описано 7 деривата *shikonin*-а у корену ове биљке као и њихово антимикумно и антитуморско дејство (63).

1.4. *Shikonin*

Shikonin, као и његови деривати, по хемијској структури је нафтохинонско једињење и природни је састојак многих биљака. Први дериват *shikonin*-а изолован 1922. године је *acetylshikonin*. Он је изолован из корена биљке *Lithospermum erythrorhizon* (фамилија *Boraginaceae*) који се вековима користи у кинеској традиционалној медицини. Изоловали су га хемичари *Kuroda* и *Majima* који су наредних година изоловали и сам *shikonin* и још доста његових деривата (64). *Shikonin* и његови деривати могу се наћи и у корену других биљака које припадају фамилији *Boraginaceae*, као што су род *Arnebia* (*A. euchroma*), *Echium* (*E. lycopsis*), *Eritrichium*, *Onosma* (*Onosma visiani*) и друге. Захваљујући

антиинфламацијском дејству екстраката корења, ове биљке се вековима користе у традиционалној медицини. Своја антиинфламацијска својства ови екстракти остварују захваљујући високом проценту *shikonin*-а и деривата који осим антиинфламацијског имају и антибактеријско, неуро- и кардиопротективно, антиоксидативно, антимикумно и антитуморско дејство, а поспешују и зарастање рана (64).

1.4.1. *Shikonin* и инфламација

Антиинфламацијско дејство *shikonin*-а је изучавано годинама и показано је више механизма овог дејства као што су инхибиција синтезе лекотријена В4, смањена дегранулација мастоцита, инхибирања рапидног ослобађања кисеоничних радикала из неутрофила, инхибирање циклооксигеназе 2, инхибирање ERK1 и ERK2 киназа и NF-κВ (64-66).

Shikonin и његови деривати делују терапијски и на инфламацијске болести аутоимунске етиологије. На мишијем моделу артритиса који се индукује имунизацијом осетљивих мишева суспензијом која садржи колаген, показано је да *shikonin* значајно смањује деструкцију зглобне хрскавице смањењем продукције Th1 цитокина, TNF-α (TNF од енг. *Tumor Necrosis Factor*) и IL-12 (IL од енг. *interleukin*), у синовији али и смањењем продукције металопротеиназе матрикса 1. Са друге стране, показана је повећана концентрација антиинфламацијских и Th2 цитокина као што су IL-10 и IL-4 код мишева са реуматоидним артритисом третираним *shikonin*-ом (67, 68).

Слични резултати су добијени и у мишијем моделу инфламацијске болести црева. Орално давање *shikonin*-а редуковало је клиничко испољавање болести. На целуларном нивоу орално дат *shikonin* је у ентероцитима инхибирао циклооксигеназу 2, NF-κВ и STAT3 сигнални пут и смањило ниво IL-6 и TNF-α (69).

1.4.2. Неуро- и кардиопротективно дејство *shikonin*-а

На мишијем моделу исхемије мозга, третирање мишева *shikonin*-ом пре индуковае исхемије мозга, значајно је смањило исхемијску лезију и то индукцијом антиоксидативних ензима, супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион пероксидазе, што указује да неуропротективно дејство шиконина може бити последица његовог антиоксидативног дејства (70).

In vitro на Н9С2 ћелијској култури кардиомиоцита, показано је да претходно третирање кардиомиоцита *shikonin*-ом, смањује апоптозу ћелија након индуковања исхемије. Хиперактивација фосфатидилинозитол 3-киназе је могући механизам овог протективног дејства *shikonin*-а (71).

1.4.3. Антимикумно дејство *shikonin*-а

Сматра се да нека супстанца има клинички значајну антимикумну активност ако јој је MIC₅₀ (енг. MIC – *minimal inhibitory concentration*), који представља минималну концентрацију супстанце која инхибира 50% засејаних изолата неког микроорганизма, мања од 16μg/mL (72). *Shikonin* и његови деривати имају добру антибактеријску активност

према грам-позитивним бактеријама као што су *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* са MIC₅₀ у опсегу 0.30-6.25 µg/mL (64), односно према *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium arborescens*, *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus epidermidis* са MIC₅₀ у опсегу 6.40-12.79µg/mL (63). Иако су неке раније студије показале малу активност *shikonin*-а према грам-негативним бактеријама, новија устраживања показују да деривати *shikonin*-а имају значајно антибактеријско дејство и према грам-негативним бактеријама као што су *Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas proteolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Yersinia intermedia* са MIC₅₀ у опсегу 4.27-8.53 µg/mL за различите сојеве бактерија. У истој студији, добијено је да су најбољу антибактеријску активност имала два деривата *shikonin*-а: *α-methylbutyrylshikonin* и *acetylshikonin* (63). Интересантно је да *shikonin* има антибактеријско дејство и према резистентним сојевима бактерија као што је метицилин резистентан *Staphylococcus aureus* и ванкомицин резистентни *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*. Још веће антибактеријско дејство на метицилин резистентан *Staphylococcus aureus* са MIC₅₀ који је износио 1.56 µg/mL има дериват шиконина *α-methylbutyrylshikonin* (73). Иако се дуго сматрало да *shikonin* и његови деривати имају само бактериостатско дејство, доказано је да они имају и бактерицидна својства (74).

Осим антибактеријског, доста је истраживано и антифунгално дејство *shikonin*-а и деривата *shikonin*-а. Тестирање *shikonin*-а и његовог деривата *deoxyshikonin*-а на гљивама *Saccharomyces sake*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsulans* var. *sulfureum*, *Microsporium gypseum* и *Epidermophyton floccosum* показало је да *deoxyshikonin* има јаче антифунгално дејство од *shikonin*-а и MIC₅₀ је износио мање од 25mg/mL за све испитиване гљиве (74). Друга студија која је поредила антифунгално дејство *shikonin*-а и флуконазола добила је као резултат 4 пута снажније антифунгално дејство *shikonin*-а у односу на флуконазол на гљивици *Candida krusei* и 2 снажније на гљивици *Saccharomyces cerevisiae*, а исто антифунгално дејство као флуконазол на гљивици *Candida glabrata* (75).

Антивирусно дејство *shikonin*-а описано је за више вируса, укључујући аденовирус, HIV и HCV. Показано је да *shikonin* у наномоларним концентрацијама инхибира репликацију ових вируса (76-79).

1.4.4. *Shikonin* и заостање рана

Употреба корена биљке *Lithospermum erythrorhizon* датира још из 2 века нове ере и од тада до данас употребљава се у кинеској традиционалној медицини за справљање мелема за аналне фисуре, хемороиде, повреде коже и опекотине. Тек 70-тих година прошлог века испитана су регенеративна својства *shikonin*-а, активних супстанци корена *Lithospermum erythrorhizon*. Од тада, направљено је више комерцијалних производа у виду масти, као што су *HistoplastinRed*® (*Chropi*), *Epouloderm*® (*Farmalex*), and *Helixderm*® (*PNG Gerolymatos*), који се користе за третман оштећења коже, опекотина, постоперативних ожиљака, хроничних васкуларних улкуса, аналних фисура и декубитуса (80).

1.4.5. Антитуморско дејство *shikonin*-а

Антитуморско дејство *shikonin*-а и његових деривата демонстрирано је на мноштву солидних тумора и леукемија, како *in vitro* тако и *in vivo* у експерименталним животињским моделима. У једној студији показано је да екстракт *Lithospermum erythrorhizon* инхибира раст ћелија меланома, и то мишије В16F10 ћелијске линије, са вредношћу IC_{50} 2.73 μ g/mL. Давање овог екстракта мишевима, којима је претходно имплантиран тумор, у дози од 10mg/kg током 21 дана значајно је смањило величину тумора. Из ове биљке тада је изоловано 5 нафтохинонских једињења, *shikonin* и 4 његових деривата (*deoxyshikonin*, β -*hydroxyisovalerylshikonin*, *acetylshikonin* и *isobutyrylshikonin*) који су одговорни за ову антитуморску активност (81). У другој, сличној студији, описана је антитуморска активност екстракта корена *Onosma paniculata* на 8 туморских ћелијских линија. Из корена ове биљке такође су изоловани деривати *shikonin*-а: β -*hydroxyisovalerylshikonin*, *acetylshikonin*, *dimethylacrylshikonin*, α -*methylbutyrylshikonin* и *isovalerylshikonin* (82).

Међутим, много је више истраживања спроведено са изолованим чистим *shikonin*-ом и његовим дериватима него са екстрактима биљака. Описано је мноштво механизма антитуморског дејства ових нафтохинонских једињења. *Acetylshikonin* смањује пролиферацију ћелија хуманог карцинома панкреаса инхибирањем NF- κ B транскрипционог фактора (83). *Shikonin* супримира активност протеазома у ћелијама мишјег хепатоцелуларног карцинома и хуманог карцинома простате (84). Хиперпродукција кисеоничних слободних радикала је још један механизам антитуморског дејства показан у неколико студија, на ћелијама хуманог остеосаркома, оралног сквамозног карцинома и другим туморима (85, 86). *Shikonin* је инхибирао и тумор специфичну пируват киназу М2 у ћелијама хуманог аденокарцинома дојке и плућа (87). На ћелијама хуманог карцинома грлића материце, показано је да β -*hydroxyisovalerylshikonin* инхибира PI3K/AKT/mTOR сигнални пут (енгл. *Phosphatidylinositol 3 kinase*; AKT-серин/треонин киназа која кад се активира PI3-киназом, активира mTOR) (88).

Осим истраживања антитуморског ефекта *shikonin*-а на солидним туморима спроведено је и више студија на леукемијским ћелијским линијама. На ћелијској линији хумане акутне мијелоидне леукемије, U937, показано је да *shikonin* инхибира експресију протоонкогена c-Myc и то преко сигналног пута ERK/JNK/MAPK (енг. *extracellular signal-regulated kinases/c-Jun-N-terminal kinase/mitogen-activated protein kinase*). Такође, у тој студији је испитано 14 деривата *shikonin*-а и 4 (*isobutyrylshikonin*, *2-methylbutyrylshikonin*, *isovalerylshikonin* и β,β -*dimethylacrylshikonin*) су имала јачу активност од самог *shikonin*-а (89). Инхибиција ERK/JNK/MAPK сигналног пута показана је и на ћелијској линији хроничне мијелоидне леукемије, K562 (90). На ћелијској линији акутне мијелоидне леукемије, HL-60, показано је да *shikonin* може да индукује и стрес ендоплазматског ретикулума што је још један од механизма антитуморског дејства (91).

Иако су механизми антитуморске активности *shikonin*-а и његових деривата врло разнолики, финални исход је исти, а то је смрт туморске ћелије. Ћелијска смрт која је описана у већини ових студија је апоптоза иницирана унутрашњим путем (81,82,84-86,88-91). У прилог овоме говоре и истраживања у којима је измерена смањена вредност антиапоптотских а повећана вредност проапоптотских протеина. Након третирања ћелија хуманог аденокарцинома дојке и плућа и мишјег карцинома плућа *acetylshikonin*-ом, измерена је снижена вредност антиапоптотског Bcl-2 протеина (92). У ћелијама мишјег меланома, након третирања екстрактом корена *Lithospermum erythrorhizon*, измерена је

повишена вредност проапоптотских Bax и Bad протеина, а смањена вредност антиапоптотског Bid протеина (93). Осим апоптозе, *shikonin* је у неким ћелијама индуковао некроптозу. Поједина истраживања су доказала обе врсте ћелијске смрти на ћелијама третираним *shikonin*-ом (89, 94). Ћелије акутне мијелоидне леукемије које су третиране *shikonin*-ом у концентрацији од 1 μ M умирале су апоптозом у много већем проценту у односу на контролу (нетретиране ћелије) уз пораст експресије Noxa и Bid проапоптотских протеина. Када су исте ћелије третиране концентрацијом *shikonin*-а од 10 μ M доминантан тип ћелијске смрти био је некроптоза, а концентрација проапоптотских протеина била је непромењена, што говори у прилог томе да тип ћелијске смрти зависи и од концентрације *shikonin*-а којим се ћелије третирају (94).

1.5. Механизми ћелијске смрти

Ћелијска смрт је пре процес који се физиолошки догађа током раста и развоја организма и диференцијације ћелија као и током развоја и регулације имунског система. У патолошким условима, смрт ћелија подстиичу различите физичке, хемијске и биолошке ноксе, али и недостатак нутриената и стимулуса неопходних за преживљавање ћелије.

Према морфолошким променама које су уочавају на умирућој ћелији, дефинисано је три типа ћелијске смрти: апоптоза (тип 1 ћелијске смрти), аутофагија (тип 2 ћелијске смрти) и некроза (тип 3 ћелијске смрти) (95).

1.5.1. Апоптоза

Апоптоза или тип 1 ћелијске смрти први пут је описана 1972. године (96). Представља тип програмиране ћелијске смрти који се активира спољашњим или унутрашњим путем апоптозе или под дејством перфорина и гранзима А и В. Ова два пута су међусобно повезана и зна се да молекули ангажовани у једном могу да покрену и други сигнални пут (97).

Спољашњи пут апоптозе се активира везивањем специфичних лиганда за рецепторе смрти што има за последицу активацију тих рецептора. У рецепторе смрти спадају TNF-R1 (енг. *tumor necrosis factor receptor 1*), Fas, DR3, TRAIL-R1/2 (DR4/5) и DR6. Сличност ових рецептора је у томе што сви у свом цитоплазматском делу имају домене смрти. Након везивања лиганда за рецепторе смрти дешава се конформациона промена домена смрти и он се везује за прокаспазу -8 и -10 и тако формирају DISC (енг. *Death Inducing Signaling Complex*). У овом комплексу се прокаспазе преводе у каспазе -8 и -10 које потом цепају прокаспазу-3 у активну каспазу-3 (97).

Унутрашњи пут апоптозе се активира дејством различитих екстра- и интраћелијских чинилаца. У екстраћелијске чиниоци спадају физички и хемијски фактори, вируси, недостатак хранљивих материја, фактора раста, хормона и цитокина неопходних за функционисање ћелија. У интраћелијске факторе пре свега спадају оксидативни стрес и оштећење ћелијске ДНК или ендоплазматског ретикулума. Под дејством ових чиниоца стварају се поре у спољашњој мембрани митохондрија и из митохондрија се ослабађају проапоптотски протеини у цитоплазму (97). Прву групу ових протеина чине циторхом С, Smac/DIABLO и серин протеаза HtrA2/Omi . Цитохром С се везује за активирајући фактор-апоптозе 1 (енгл. *apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1*) и прокаспазу-9 формирајући

апоптозом. У апоптозому се активира прокаспаза-9 која прелази у каспазу-9 која потом цепа прокаспазу-3 у активну каспазу-3. Са друге стране Smac/DIABLO и HtrA2/Omi подстичу апоптозу и то инхибицијом антиапоптотских протеина. Другу групу проапоптотских протеина који се ослобађају из митохондрија чине AIF (енгл. *apoptosis inducing factor*), Endo G (енгл. *endonuclease G*) и CAD (енгл. *caspase-activated denase*) који се транслоцирају у једро где су укључени у фрагментацију ДНК (98, 99).

Фамилија Bcl-2 (енгл. *B cell leukemia/lymphoma 2*) протеина представља скуп молекула који регулишу унутрашњи пут апоптозе тако што контролишу перемеабилитацију митохондријалне спољашње мембране (енгл. *mitochondrial outer membrane permeabilization - MOMP*). Ови протеини се деле на анти- и про- апоптотске и од њихове равнотеже зависи да ли ће доћи до активације унутрашњег пута апоптозе. У антиапоптотске протеине спадају Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, Mcl-1, A1 и други. У проапоптотске спадају протеини са неколико Bcl-2 хомологих (BH) домена означених BH1-4: Bax, Bak, Bok и други и протеини који садрже само BH3 домене: Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Bik. Постојање BH домена омогућава члановима Bcl-2 фамилије протеина да формирају хомодимере и хетеродимере, чиме настају конформационе промене одговорне за њихову активност (100, 101). У физиолошким условима антиапоптотски протеини су везани за проапоптотске протеине Bax и Bak држећи их у неактивном облику. Улога протеина који садрже само BH3 домене је двојака. Неки од њих, као што су Puma, Bad, Noxa, Bmf и Bik, инхибирају антиапоптотске Bcl-2 протеине, али немају могућност активације Bax и Bak протеина. Други, као што су Bid и Bim, могу и да инхибирају антиапоптотске протеине и да активирају Bax и Bak (102). Интеракције између протеина који садрже само BH3 домене и антиапоптотских 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 антиапоптотске протеине (100). Под дејством претходно наведених екстра- и интра- ћелијских стимулуса активирају се протеини који садрже само BH3 домене, а они даље секвестрирају антиапоптотске Bcl-2 протеине и активирају Bax и Bak који се уграђују у спољашњу мембрану митохондрија формирајући поре кроз које излази цитохром C и остали претходно поменути протеини (103).

Активација каспаза и морфолошке промене ћелије су последица активације и спољашњег и унутрашњег пута апоптозе. Активирани каспаза -8 и -10 у спољашњем путу апоптозе и каспаза-9 у унутрашњем путу апоптозе се називају иницијаторске каспазе јер оне започињу апоптозу и активирају ефекторске каспазе (каспаза- 3, -6 и -7) које даље протеолитички секу ћелијске супstrate (104).

Активацију апоптозе прате морфолошке промене у ћелији. Прво ћелија губи контакт са околним ћелијама, а потом се кондезују цитоплазматски протеини у ћелији и ћелија се смањује. У једру се хроматин кондезује и започиње пикноза и деградација једра. У ћелијској мембрани долази се фосфатидилсерин транслоцира са унутрашње на спољашњу мембрану. Оваква ћелија се даље распарчава на мала, мембраном обавијена телашца која се називају апоптотска телашца. Свако апоптотско телашце у себи садржи неке од органела првобитне ћелије. Макрофаги препознају фосфатидилсерин на мембрани апоптотских телашца и фагоцитишу их. Током апоптозе нема развоја инфламације у околном ткиву јер се садржај апоптотских телашца не излива у међућелијски простор (95, 105).

1.6. Циклини и циклин зависне киназе

Ћелијски циклус представља серију догађаја у ћелији који као резултат имају дуплицирање ДНК и деобу ћелије. Састоји се од периода између две деоба, који се назива интерфаза и саме деобе ћелије. У оквиру интерфазе разликујемо G1 (енгл. *gap phase 1*), S (енгл. *synthesis*), и G2 (енгл. *gap phase 2*) фазу ћелијског циклуса. Ћелије које се не деле, улазе у G0 фазу или фазу мировања у којој могу остати трајно или привремено. Напредовање ћелије кроз фазе ћелијског циклуса је процес који је регулисан протеинима који се зову циклини и серин/треонин киназама са којима циклини праве комплексе и које се зову циклин зависне киназе (енгл. *cyclin dependent kinases*, CDK). Идентификовано је најмање девет CDK (CDK1- CDK9) и знатан број циклина (циклин А-циклин Т). Различити комплекси циклина и CDK регулишу различите фазе ћелијског циклуса па самим тим и њихова концентрација зависи од фазе ћелијског циклуса у којем се ћелија налази (106-108).

Изоформе циклина D (циклин D1- D3) интерреагују са CDK -4 и -6 и омогућују напредовање кроз G1 фазу ћелијског циклуса тако што започињу фосфорилацију протеина Rb (енгл. *retinoblastoma tumor suppressor gene product*, Rb). У активном стању, Rb је хипофосфорилиран и формира инхибициони комплекс са групом транскрипционих фактора познатих као E2F (E2F -1, -2, и -3). Након почетне фосфорилације комплексом циклин D и CDK -4 и -6 Rb протеин и даље остаје везан за E2F, али сада E2F може да започне транскрипцију неких гена као што је ген за циклин E. Након синтезе циклина E и формирања комплекса са CDK2, Rb протеина се потпуно фосфорилише и ослобађа се E2F који онда заочиње транскрипцију бројних гена одговорних за одвијање S фазе ћелијског циклуса (109, 110). На почетку S фазе синтетише се циклин A који затим формира комплекс са CDK2 што омогућава даљу прогресију кроз ову фазу ћелијског циклуса уз производњу других ензима и протеина укључених у синтезу ДНК (111, 112). Током касне S и током читаве G2 фазе, ћелије се припремају за митозу тако што повећавају ниво циклина A и B. Прелазак ћелије из G2 у фазу митозе омогућују циклин A2 и B1, који се упарују са CDK2 и CDK1 (113).

За разлику од CDK, постоје и негативни регулатори ћелијског циклуса који спречавају ћелију да пређе из једне фазе у другу. Класа инхибитора циклин зависних киназа Ink4, p16, p15, p18 и p19, везују и инхибирају циклин D зависне киназе (CDK -2, -4 и -6). Друга група инхибитора циклин зависних киназа CIP/Kip (енгл. *Kinase inhibitor protein*, KIP), p21, p27 и p57, негативно регулише комплексе циклин E/CDK2 и циклин A/CDK2. У случају настанка оштећења на ДНК, инхибитори циклин зависних киназа могу зауставити даље напредовање ћелије кроз фазе ћелијског циклуса док се оштећење не поправи или, ако то није могуће, док се не активира апоптоза оштећене ћелије (114, 115).

1.7. STAT3 сигнални пут

Интрацелуларни пренос сигнала различитим сигналним путевима омогућава пренос екстрацелуларних стимулуса са површине ћелије, кроз цитоплазму до јетра где се мења експресија различитих гена што има за последицу промену биолошке функције ћелије. *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STATs) представљају породицу цитоплазматских транскрипционих фактора укључених у неколико сигналних путева који на крају симулишу или инхибирају експресију различитих циљних гена чији су производи

укључени у процесе пролиферације ћелија, апоптозу, инфламацијски одговор и ангиогенезу. STAT фамилија транскрипционих фактора се састоји од 7 чланова: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 α , STAT5 β и STAT6. STAT3 је експримиран у свим ћелијама и модулира експресију гена чији су производи укључени у пролиферацију ћелија, преживљавање и диференцијацију (116, 117).

Молекул STAT3 се налази нисходно у сигналном путу који креће са више мембранских рецептора, као што су рецептори за интерлеукине (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11), факторе раста (G-CSF (енгл. *granulocyte-colony stimulating factor*), EGF (енгл. *epidermal growth factor*), PDGF (енгл. *platelet-derived growth factor*)) и хормоне (хормон раста, пролактин, лептин) (118, 119). Активира се након фосфорилације тирозина на позицији 705 у реакцији у којој учествују рецепторске тирозин киназе као што је то случај са рецепторима за EGF и PDGF или цитоплазматских киназа као што је JAK2 (енгл. *Janus kinasa 2*) која се након везивања цитокина за своје рецепторе активира и фосфорилише STAT3. Након активације, молекул STAT3 димеризује и транслоцира се из цитоплазме у нуклеус где обавља своју улогу транскрипционог фактора (120, 121). Осим фосфорилације тирозина на позицији 705, за потпуну активацију STAT3 потребна је и фосфорилација серина на позицији 727 у реакцији која је посредована циклин зависном киназом 1, ERK и другим киназама (122, 123).

Физиолошки, активација STAT3 је краткотрајна и STAT3 се након активације брзо враћа у базално стање. Дуготрајна и неадекватна фосфорилација и активација STAT3 удружена је са експресије многих гена и самим тим утиче на бројне биолошке функције ћелије као што су пролиферација преко експресије циклина D1 и c-Мус, инхибиција апоптозе преко експресије антиапоптотских молекула (Bcl-2, MCL-1, Bcl-xL и др), ангиогенеза преко VEGF (енгл. *vascular endothelial growth factor*) и HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*) а, кад су у питању туморске ћелије, инхибира антитуморски имунски одговор и стимулише инвазију и метастазирање тумора преко експресије виментина и матрикс металопротеиназа (124). Мутација или инхибиција тумор супресор гена P53 доказана је у многим туморским ћелијама. Фосфорилисани STAT3 инхибира P53 ген и супримира његову улогу у заустављању пролиферације и иницирању апоптозе оштећених ћелија (125). Гени као што су NANOG, SOX2 и OCT4 су експримирани у туморским матичним ћелијама и имају улогу у пролиферацији и инхибирању диференцијације туморске матичне ћелије (126). Показано је да активација STAT3 повећава експресију ових гена (127) али и онкогена c-Мус (128) који такође контролише транскрипцију гена експримираних у матичним ћелијама (127).

Неадекватна хиперактивација STAT3 је описана у бројним солидним и хематолошким малигнитетима. STAT3 има важну улогу у трансформацији матичне ћелије хематопоезе у малигну. Неадекватна активност STAT3 пронађена је у ћелијама акутне мијелоидне леукемије (129, 130), акутне лимфобластне леукемије (131), хроничне мијелоидне леукемије (129) и хроничне лимфоцитне леукемије (132, 133). Осим у леукемијама, хиперактивност STAT3 описана је и у лимфомима (134-136) и мултиплом мијелому (137, 138).

2. Циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је да се испита антитуморско дејство два деривата *shikonin*-а, добијених из биљке *Onosma visianii*, *in vitro* коришћењем BCL1 ћелијске линије мишје леукемије/лимфома и JVM-13 ћелијске линије хумане В-пролимфоцитне леукемије, као и *in vivo* коришћењем експерименталног модела CLL-е. У складу са основним циљем постављени су и следећи експериментални задаци:

1. Испитати потенцијалну цитотоксичност наведених биоактивних супстанци МТТ тестом на ћелијској линији BCL1 и ћелијској линији JVM-13.
2. Испитати релативни однос про- и анти-апоптотских молекула и активне каспазе 3 у леукемијским лимфоцитима излаганим дериватима шиконина.
3. Испитати способност деривата шиконина да изазову апоптотску смрт леукемијских лимфоцита.
4. Испитати утицај биоактивних супстанци на ћелијски циклус и митотску активност ћелија BCL1 и JVM-13 ћелијске линије.
5. Испитати утицај биоактивних супстанци на активност сигналног пута STAT3 у ћелијама BCL1 и JVM-13 ћелијске линије.
6. Испитати деловање испитиваних супстанци *in vivo* на анималном моделу CLL код BALB/c мишева мерењем релативне заступљености леукемијских лимфоцита у периферној крви и слезини.

3. Материјал и методе

3.1. Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог и анималног порекла *in vitro* и експериментална студија на животињама *in vivo*. За *in vitro* истраживања коришћење су две ћелијске линије, BCL1 ћелијска линија мишије леукемије и JVM-13 ћелијска линија хумане В-пролимфоцитне леукемије.

Као експерименталне животиње коришћени су мишеви соја BALB/с, оба пола, старости од 8 до 10 недеља.

3.2. Ћелијске линије

3.2.1. BCL1 ћелијска линија мишије леукемије

BCL1 ћелијска линија први пут је описана 1978. године као спонтано настала леукемија код 2 године старих BALB/с мишева (139). Карактерише се инфилтрацијом пре свега слезине а потом и костне сржи и периферне крви малигним лимфоцитима који су мали и подсећају по морфологији на нормалне лимфоците. Због тога је BCL1 леукемија и описана као модел CLL-а миша и као таква се користи у истраживању као пандам хумане CLL-е. По неким карактеристикама мишија BCL1 леукемија се разликује од хумане CLL, пре свега по масивној инфилтрацији слезине и одсуству инфилтрације лимфних жлезда, по чему подсећа и на хуману пролимфоцитну леукемију (139,140). Сматра се да ћелије ове леукемије воде порекло од мишијих В-1а лимфоцита (141).

Ћелијска линија је култивисана на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у комплетном медијуму у чији састав улазе: RPMI-1640 са 2mM глутамина, 0.05mM 2-меркаптоетанола, 100U/mL пеницилина, 100µg/ml стрептомицина и 15% топлотом инактивисаног феталног телећег серума (енг. *FBS, fetal bovine serum*).

3.2.2. JVM-13 ћелијска линија хумане В-пролимфоцитне леукемије

JVM-13 ћелијска линија је добијена од мононукларних ћелија изолованих из пацијента који је боловао од В-PLL. Ове ћелије су имортализоване *Epstein-Barr* вирусном инфекцијом у присуству ТРА (енгл. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) (142).

Ћелијске линије су култивисане на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у комплетном медијуму кога чине: RPMI-1640 са 2mM глутамина, 100U/mL пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина и 10% топлотом инактивисаног FBS.

3.3. Биоактивне супстанце

Биоактивне супстанце које смо испитали су екстракти и деривати *shikonin*-а које је изоловао проф. др Ненад Вуковић (Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу) из корена биљке *Onosma visianii*. Иницијално су направљена два екстракта

корена ове биљке, метанолски и петрол етар метилен хлоридски, а из екстраката изоловано је укупно 7 деривата *shikonin*-а: *deoxyshikonin*, *isobutyrylshikonin*, *α-methylbutyrylshikonin*, *acetylshikonin*, *β-hydroxyisovalerylshikonin*, *5,8-O-dimethyl isobutyrylshikonin*, *5,8-O-dimethyl deoxyshikonin* (63).

3.4. МТТ тест

МТТ тест служи за индиректно одређивање вијабилности ћелија. Коришћењем МТТ теста извршена је квантификација цитотоксичког ефекта биоактивних супстанци на испитиваним ћелијама *in vitro*. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид је жуто обојена тетразолијумова со која због свог позитивног наелектрисања лако улази у ћелије. У живим ћелијама долази до редукције МТТ под дејством NAD(P)H зависне оксидоредуктазе до љубичасто обојеног формазана. С обзиром да је овај ензим активан само у живим ћелијама, редукција МТТ и количина љубичастог формазана је пропорционална броју живих ћелија.

Малигне ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка и од њих је направљен ћелијска суспензија густине 3×10^5 ћелија/ml. За МТТ тест коришћене су микротитар плоче са 96 бунара. У сваки бунар је сипано по 100µl ћелијске суспензије, односно по 30 000 ћелија. Након инкубације од 24 часа у стандардним условима, медијум је одливен, а затим су малигне ћелије излагане екстрактима биљке *Onosma visianii* (метанолски и петрол етар метилен хлоридски) и изолованим дериватима шиконина (*deoxyshikonin*, *isobutyrylshikonin*, *α-methylbutyrylshikonin*, *acetylshikonin*, *β-hydroxyisovalerylshikonin*, *5,8-Odimethylisobutyrylshikonin*, *5,8-O-dimethyldeoxyshikonin*) у опсегу концентрације од 0.1µg/ml до 100µg/ml у различитом временском периоду (24 часа или 48 часова). Све супстанце су прво растворене у DMSO (енгл. *dimethylsulfoxide*) (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). Укупна запремина суспензије ћелија и тестиране супстанце у сваком бунару је била 100 µl. Након третмана туморских ћелија са дериватима шиконина микротитар плоче су центрифугиране 5 минута на 400g, супернатант је пажљиво извучен и у сваки бунар је додато по 100µl радног раствора МТТ (*Sigma–Aldrich, Munich, Germany*). Радни раствор МТТ-а је 15% раствор штока МТТ-а (5 mg/ml PBS-а (енг. *Phosphate Buffer Saline*)) који се разблажује у медијуму. Микротитар плоче су инкубирани још 4 часа на 37°C у атмосфери са 5% CO₂, а потом су поново центрифугиране 5 минута на 400g и супернатант је одливен. У сваки бунар је сипано по 150µl DMSO (*Sigma Aldrich, Немачка*) и 20µl глицинског пуфера (pH-10.5) а онда је читавана апсорбанца на 595nm таласне дужине, на *Microplate multimode detector Zenyth 3100*.

Вијабилност ћелија је израчуната по формули: % вијабилних ћелија = (А-Б)/(В-Б) × 100.

А- апсорбанца ћелија третираних испитиваним супстанцама

Б- апсорбанца празних бунара

В- апсорбанца нетретираних ћелија

Даље тестирање је настављено са два деривата шиконина који су показали највећу цитотоксичност, *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом.

3.5. ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности

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 фосфатидил-серин. У касној фази апоптозе и у некрози, губи се интегритет ћелијске мембране што омогућава пропидијум јодиду (енгл. *propidium iodide*, PI) везивање за ДНК ћелије. На основу експресије *Annexin V* и PI разликују се вијабилне ћелије (*Annexin V* (-)/PI(-)), ћелије у раној апоптози (*Annexin V* (+)/PI (-)), ћелије у касној апоптози (*Annexin V* (+)/PI (+)) и некротичне ћелије (*Annexin V* (-)/PI (+)).

Након третмана *isobutyrilshikonin*-ом и *α-methylbutyrilshikonin*-ом у интервалу од 24 сата, 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. У 100μl такве суспензије додато је по 5μl *Annexin*-а V-FITC (*BD Pharmingen, San Diego, California, USA*) и 5μl PI (50μg/ml PBS-а) (*Sigma Aldrich, Немачка*). После истека 15 минута инкубације на собној температури и у мраку, у сваки узорак је додато по 400μl везујућег пуфера. Анализирано је 20000 догађаја на FACS *Calibur flow cytometer*-у (*BD Biosciences, San Jose, USA*), а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (*Tree Star*).

3.6. Анализа ћелијског циклуса

За одређивање ћелијског циклуса у којем се налазе ћелије BCL1 и JVM-13 ћелијске линије коришћен је кит *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain (ThermoFisherScientific, Inc. USA)*. *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* се користи за анализу садржаја ДНК у живим ћелијама, јер поменута боја лако прође кроз ћелијску мембрану и двоструко се веже за молекулу ДНК, па се на основу интензитета флуоресценције мерене проточном цитометријом може одредити количина молекула ДНК у анализираним ћелијама које се налазе у одређеној фази ћелијског циклуса.

Након третмана *isobutyrilshikonin*-ом и *α-methylbutyrilshikonin*-ом у интервалу од 24 сата (контролне ћелије су биле 24 сата у чистом медијуму), ћелије су опране у комплетном медијуму. Ћелије су након тога ресуспендоване у комплетном медијуму до густине од 5×10^5 ћелија/ml. За даљу анализу је одмерено 0.5ml ћелијске суспензије у коју је додат 1μl Ruby боје. Узорци су након тога инкубирани 30 минута на температури од 37°C, ван домашаја светлости. За анализу ћелијског циклуса коришћен је проточни цитометар FACS *Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA)* а подаци су обрађени у *Flow Jo* програму (*TreeStar*).

3.7. Анализа фенотипа леукемијских ћелија проточном цитометријом

Након третмана *isobutyrilshikonin*-ом и *α-methylbutyrilshikonin*-ом у интервалу од 24 сата (контролне ћелије су биле 24 сата у чистом медијуму), ћелије су опране хладним PBS-ом и ресуспендоване у комплетном медијуму тако да је густина ћелијске суспензије била 2×10^6 ћелија/ml. Леукемијски лимфоцити су затим фиксирани и пермеабелизовани помоћу

кита (*Fixation and Permeabilization Kit, BD Bioscience*). Након инкубације од 20 минута на температури од 4°C, ћелије су опране у *BDPerm/Wash™ Buffer-y (BD Bioscience)* и центрифугиране на 125g, 10 минута. Супернатан је одливан, а BCL1 и JVM-13 ћелије су даље бојене на два начина у зависности да ли су антитела примарно обележена флуорохромом или нису.

Антитела за STAT3 (*sc-8059, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz CA, USA*) и Ki-67 (*11-5698-82, eBioscience, San Diego, USA*) су антитела обележена флуорохромом (FITC), па су леукемијске BCL1 и JVM-13 ћелије инкубиране са овим антителима 20 минута на температури од 4°C. Након тога ћелије су опране у *BDPerm/Wash™ Buffer-y (BD Bioscience)*, центрифугиране и ресуспендоване у 250µl пуфера за бојење.

Други начин бојења је подразумевао коришћење антитела која нису обележена флуорохромом и које су додатно инкубиране секундарним козјим антимишјим (ab6785, *Abcam Cambridge, Велика Британија*) или магарећим зечјим антителом (ab150073, *Abcam Cambridge, Велика Британија*) конјугованим флуоресцентним бојама. Ћелије су инкубиране са примарним антителима за Bcl-2 (11-6992-42, *Thermo Fisher Scientific, Велика Британија*), Ноха (ab13654, *Abcam Cambridge, Велика Британија*), MCL1 (ab32087, *Abcam Cambridge, Велика Британија*), циклин D3 (ab28283, *Abcam Cambridge, Велика Британија*), циклин E (MA5-14336, *Thermo fisher scientific, USA*), p16 (ab211542, *Abcam Cambridge, Велика Британија*), anti-p21 (ab188224, *Abcam Cambridge, Велика Британија*) и p27 (ab215434, *Abcam Cambridge, Велика Британија*) током 20 минута на температури од 4°C. Након тога ћелије су поново опране у *BDPerm/Wash™ Buffer-y* па додатно инкубиране 20 минута на температури од 4°C са секундарним антителом (*goat anti-mouse IgG FITC (ab6785 Abcam Cambridge, United Kingdom)*). Након поновног центрифугирања, ћелијски талог је ресуспендован у 250µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру *FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA)*. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* програма (*Tree Star*).

3.8. Имунофлуоресценца

Имунофлуоресценца је техника која се заснива на везивању антитела претходно обележеног флуоресцентном бојом за антиген. Овом техником се, уз помоћ флуоресцентног микроскопа, визуализују поједини ћелијски молекули. BCL1 ћелије су стављене у микротитар плоче са 6 бунара и третиране *α-methylbutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 2mg/ml током 24 сата. Након тога, ћелије су опране два пута PBS-ом и фиксирани 4% формалдехидом током 20 минута на температури од 25°C. По завршеној фиксацији, ћелије су инкубиране са зечјим поликлонским антителом специфичним за Вах (*sc-493, 100 µg/mL, Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA, коришћено је разблажење 1:1000*) и специфичним за активну/исечену каспазу-3 (*NB100-56113, 250 µL, Novus Biologicals, Abingdon, UK, коришћено је разблажење 1:1000*). По инкубацији ћелије су испране хладним PBS-ом и инкубиране са секундарним антителом, козјим антителом специфичним за зечји IgG конјугованим FITC-ом (*ab6717-1, 1 mg/mL, Abcam, Cambridge, UK, коришћено је разблажење 1:2000*). За фиксирање ћелија покровним љуспицама коришћен је *ProLong Gold antifade reagent with (4',6-diamidino-2-phenylindole) DAPI (Invitrogen)*. Ћелије су анализирани на флуоресцентном микроскопу Olympus BX 51, коришћено је увећање 200 х.

3.9. Анализа експресије гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену

BCL1 и JVM-13 ћелије третиране су *isobutrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом током 24 сата. Контролну групу сачињавале су ћелије које су биле у чистом комплетном медијуму. За изолацију укупне РНК у суспензији туморских ћелија коришћен је тризол реагенс (енгл. *TRIReagent® Solution, Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA*). Ћелијске суспензије и третираних и нетретираних ћелија механички су хомогенизоване у 1ml тризола коришћењем ручног хомогенизатора. Након тога хомогенат је пребачен у епрувете и инкубиран 5 минута на собној температури, а потом центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на 4°C. У супернатант је додато 100µl бромхлорпропана (*SigmaAldrich, Germany*) након чега су узорци вортексовани и инкубирани 15 минута на собној температури а након инкубације центрифугирани 20 минута на 12000 rpm на 4°C. Након центрифугирања, издвојле су се три фракције. У горњој, воденој, фракцији се налази РНК, па је ова фракција пажљиво пребачена у нове епрувете у које је додато и 500µl расхлађеног изопропил алкохола. Узорци су благо вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и затим центрифугирани 8 минута на 12000 rpm на 4°C. После одливања супернатанта талог у којем се налази РНК је опран два пута у трајању од 5 минута на 7500g у 1ml 70% етанола и сушен до испаравања целокупног етанола. Осушени талог је растворен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water, Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност РНК одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280nm помоћу апарата *Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)*.

Након изолације, урађена је реверзна транскрипција изоловане РНК коришћењем кита *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, FosterCity, California, USA)*. У 10µl узорка РНК додато је 10µl главне мешавине (енгл. *Mastermix*). Мастермикс између осталих супстанци садржи и 1µl реверзне транскриптазе (енгл. *Multi Scribe TM Reverse Transcriptase*). Након додавања *Mastermix*-а у узорак РНК, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C. Реакција реверзне транскрипције је заустављена грејањем 5 минута на 85°C, а узорци су затим охлађени на 4°C (*Mastercycler® eprealplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Овако је добијена комплементарна ДНК која је чувана на 4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

Експресија гена мерена је методом ланчане полимеризације у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR*). За реакцију qRT-PCR коришћен је апарат *Mastercycler® eprealplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)*. Узорци у количини од 20µl су стављани у бунаре плоча са 96 места. Сваки узорак се састојао од: 2µl комплементарне ДНК, 10µl *Mastermix*-а, 2µl смеше прајмера за ген који се мери („*forward*“ и „*reverse*“) и 6µl воде која не садржи нуклеазе. Плоче су потом прекривене адхезивном фолијом, центрифугиране 1 минут на 3000rpm и убачене у апарат за qRT-PCR.

Коришћени су следећи прајмери за амплификацију гена приказани на Табели 2.

Табела 2

	Sense (5' to 3')	Antisense (5' to 3')
Mouse Bax	ACACCTGAGCTGACCTTG	AGCCCATGATGGTTCTGATC
Mouse Caspase-3	AAATTCAAGGGACGGGTCAT	ATTGACACAATACACGGGATCTGT
Mouse Cyclin D3	CCGTGATTGCGCACGACTTC	TCTGTGGGAGTGCTGGTCTG
Mouse Nanog	AAGCAGAAGATGCGGACTGT	GTGCTGAGCCCTTCTGAATC
Mouse C-Myc	CGGACACACAACGTCTTGGAA	AGGATGTAGGCGGTGGCTTTT
Mouse Oct4	CAAGGCAAGGGAGGTAGACA	ATGAGTGACAGACAGGCCAG
Mouse β -actin	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT
Human Bax	ATGGACGGGTCCGGGGAGCA	CCCAGTTGAAGTTGCCGTCA3
Human Bcl-2	CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA	GGGCCGTACAGTTCCACAAA
Human Nanog	ACATGCAACCTGAAGACGTGTG	CATGGAAACCAGAACACGTGG
Human c-Myc	AAAGGCCCCCAAGGTAGTTA	GCACAAGAGTTCCGTAGCTG
Human Oct4	ACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAACT	CTGAATACCTTCCCAAATAGAACCC
Human Sox2	GAGCTTTGCAGGAAGTTTGC	GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA
Human β -actin	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

3.10. Испитивање антитуморског дејства деривата *shikonin-a in vivo*

У овом истраживању коришћени су мишеви соја BALB/C оба пола, старости 8-10 недеља. Мишеви су узгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у условима прописаним за узгајање животиња (вода и храна *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла). Истраживање на животињама одобрила је Етичка комисија за екперименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, одобрење број 01-6152 од 22.05.2018.

Мишевима соја BALB/C убризгавано је 1×10^6 BCL1 ћелија у репну вену. Пре убризгавања проверавана је вијабилност ћелија триптан плавим. С обзиром да се мртве ћелије боје триптан плавим, коришћена је супсензија ћелија код које је преко 95% ћелија вијабилно.

Након 20 дана од инокулације BCL1 ћелија, мишевима је узимана крв из репне вене у количини између 50 и 100 μ l. Од те количине крви, узимано је 10 μ l крви. Крв је опрана у PBS-у а потом су ћелије периферне крви фиксирани помоћу кита (*Fixation and Permeabilization Kit, BD Bioscience*). Након инкубације од 20 минута на температури од 4°C, ћелије су опране у *BDPerm/Wash™ Buffer-у (BD Bioscience)* и центрифугиране на

125g, 10 минута. Супернатан је одливан и ћелије су инкубирани са антителима примарно обележеним флуорохромом 20 минута на температури од 4°C. За детекцију BCL1 леукемијских лимфоцита у периферној крви мишева коришћена су CD5 (FITC) и CD19 (PE) антитела. Након инкубације ћелије су опране у *BDPerm/Wash™ Buffer*-у (*BD Bioscience*), центрифугиране и ресуспендоване у 250µl пуфера за бојење. Анализа је урађена на проточном цитометру *FACS Calibur flow cytometer* (*BD Biosciences, SanJose, USA*). Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* програма (*TreeStar*).

Мишеви код којих су регистроване леукемијске ћелије, подељени су 6 експерименталних група насумично. Прва група мишева примала је *isobutyrylshikonin* у дози од 2mg/kg три пута недељно са размаком између доза од најмање једног дана. Друга група примала је и *isobutyrylshikonin* у дози од 4mg/kg три пута недељно са размаком између доза од најмање једног дана. Трећа и четврта група мишева примала је α -*methylbutyrylshikonin* у истим дозама и на исти начин као и прве две групе. Третман мишева у прве четири групе трајао је две недеље, тако да је сваки миш примио укупно 6 доза деривата шиконина. Оба деривата шиконина су растварана у физиолошком раствору до жељене концентрације и апликовани мишевима интраперитонеално. У петој експерименталној групи налазили су се мишеви који су примали циклофосфамид једанпут недељно током 2 узастопне недеље у дози од 100mg/kg која претставља максималну толерабилну дозу за овај сој мишева (143). Циклофосфамид је растваран у физиолошком раствору (0,9% NaCl) до жељене концентрације и апликован интраперитонеално. Шесту експерименталну групу сачињавали су мишеви који су након детекције леукемијских ћелија у периферној крви примали физиолошки раствор.

Два дана након последње примљене дозе деривата шиконина, сви мишеви су жртвовани. Из аорте мишева издвојена је периферна крв. Екстирпирани слезине су пропуштене кроз ћелијско сито (*cell strainer, BD Pharmingen, USA*). Након пропуштања кроз ћелијско сито урађено је лизирање еритроцита и добијена је суспензија појединачних мононуклеарних ћелија. Ћелије периферне крви и мононуклеарне ћелије слезине бојене су на претходно описан за бојење периферне крви ради детекције BCL1 малигних ћелија. Такође, одређена је концентрација аланин аминотрансферазе (ALT), аспартат аминотрансферазе (AST), урее и креатинина у серуму свих мишева фотометријском методом коришћењем *Olympus AU 400* аутоматског биохемијског анализатора (*Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Germany*).

4. Резултати

4.1. Утицај екстраката корена биљке *Onosma visianii* у метанолу и петролу етар метилен хлориду на вијабилност леукемијских лимфоцита

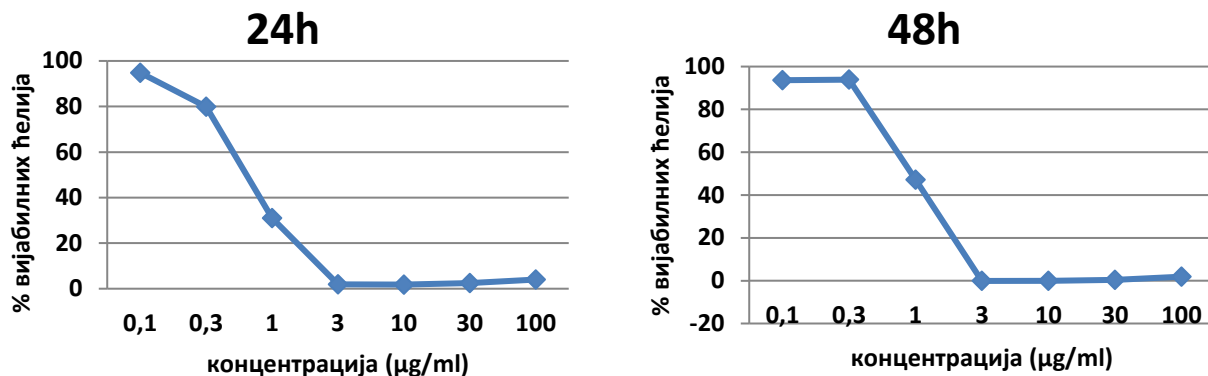
За испитивање антилеукемијског дејства екстраката корена биљке *Onosma visianii* у метанолу и петролу етар метилен хлориду на ВСL1 ћелијској линији мишје хроничне лимфоцитне леукемије и JVM-13 ћелијској линији хумане В пролимфоцитне леукемије, коришћен је МТТ тест. Ћелије обе ћелијске линије излагане су током 24 и 48 сата троструко растућим концентрацијама ова два екстракта. Добијени резултати показују да ни при највећој тестираној концентрацији од 100µg/ml екстракти не смањују проценат вијабилних ВСL1 и JVM-13 ћелија.

У даљем истраживању испитивано је антилеукемијско дејство седам деривата шиконина, изолованих из биљке *Onosma visianii*, на ВСL1 и JVM-13 ћелијској линији.

4.2. Утицај *Isobutyrylshikonin*-а на вијабилност леукемијских лимфоцита.

Ћелије ВСL1 ћелијске линије излагане су током 24 и 48 сата троструко растућим концентрацијама *isobutyrylshikonin*-а, од почетне концентрације 0.1µg/ml до 100µg/ml. Показано је да *isobutyrylshikonin* у току 24-часовног третмана и при ниској концентрацији од само 1µg/ml смањује вијабилност третираних ћелија мишје хроничне лимфоцитне леукемије на само 30%. Вијабилност ВСL1 ћелија је смањена на готово 0% већ при концентрацији *isobutyrylshikonin*-а од 3µg/ml и тако минимална вијабилност се одржава и за остале тестиране концентрације све до 100µg/ml. Концентрација *isobutyrylshikonin*-а од 0.1µg/ml је само минимално смањила вијабилност испитиваних ћелија, док је вијабилност ВСL1 ћелија третираних *isobutyrylshikonin*-ом у дози од 0.3µg/ml смањена на око 80%. Овакви резултати јасно указују на дозну зависност антитуморског дејства *isobutyrylshikonin*-а на ћелије мишје хроничне лимфоцитне леукемије, ВСL1, до концентрације од 10µg/ml, када се дозна зависност губи (Графикон 1).

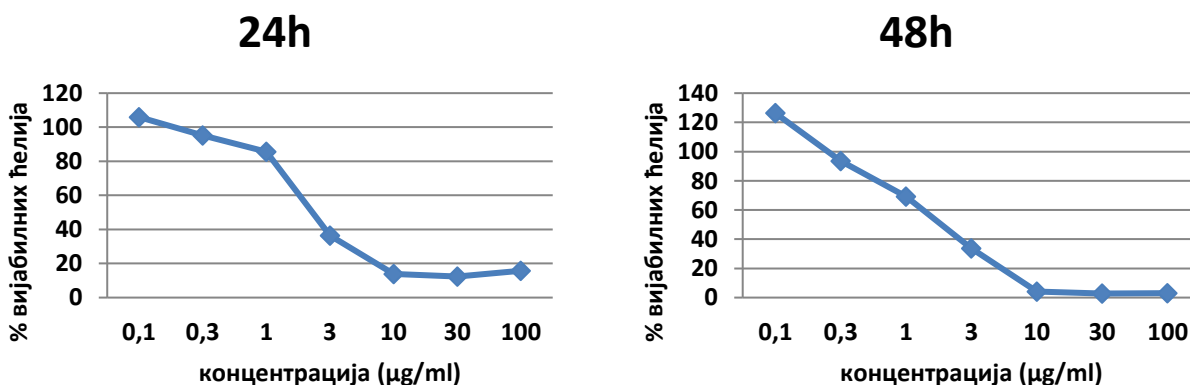
Слични резултати добијени су и при 48-часовном третману ВСL1 ћелијске линије троструко растућим концентрацијама *isobutyrylshikonin*-а. Значајно смањење броја вијабилних ћелија постигнуто је са концентрацијом *isobutyrylshikonin*-а од 1µg/ml до 100µg/ml. Највеће смањење вијабилности леукемијских ВСL1 лимфоцита постигнуто је са концентрацијом од 3µg/ml. И након 48-часовног третмана се уочава јасна дозна зависност антилеукемијског дејства *isobutyrylshikonin*-а (Графикон 1).



Графикон 1. Утицај *isobutyrylshikonin*-а на вијабилност ћелија мишје хроничне лимфоцитне леукемије, BCL1. Вијабилност BCL1 ћелија након 24-часовног и 48-часовног третмана *isobutyrylshikonin*-ом одређена је МТТ тестом. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена независна експеримента а сваки од експеримента је одрађен у трипликату.

Излагање ћелија хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13, троструко растућим концентрацијама *isobutyrylshikonin*-а, такође је смањило вијабилност леукемијских ћелија, на шта указују резултати МТТ теста. Након 24-часовног третмана *isobutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 3µg/ml до 100µg/ml, значајно се смањује вијабилност тертираних JVM-13 лимфоцита. Као и код BCL1 ћелијске линије и на JVM-13 ћелијској линији *isobutyrylshikonin* показује дозно зависно антитуморско дејство, а највећи ефекат постиже са концентрацијом од 30µg/ml. При највећој концентрацији од 100µg/ml примећује се благ пораст у броју вијабилних ћелија и губи се дозно зависни ефекат (Графикон 2).

Слични резултати су добијени и након 48-часовног третмана JVM-13 ћелија *isobutyrylshikonin*-ом. *Isobutyrylshikonin* у концентрацији 1µg/ml смањује вијабилност JVM-13 ћелија на нешто више од 60%, у концентрацији 3µg/ml смањује вијабилност JVM-13 ћелија на око 30%, а већ од концентрације 10µg/ml вијабилност испитиваних ћелија пада готово на нулу (Графикон 2).



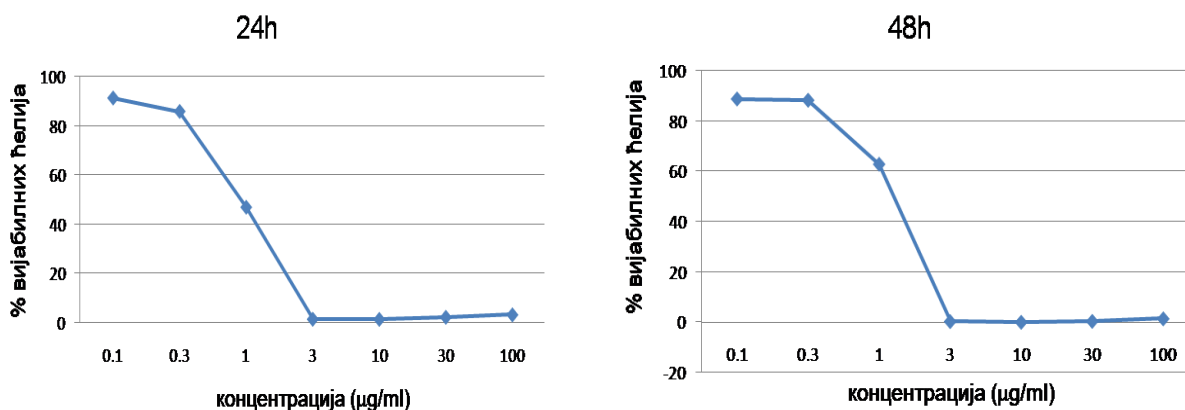
Графикон 2. Утицај *isobutyrylshikonin*-а на вијабилност ћелија хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13. Вијабилност JVM-13 ћелија након 24-часовног и 48-часовног третмана *isobutyrylshikonin*-ом одређена је МТТ тестом. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена независна експеримента а сваки од експеримента је одрађен у трипликату.

4.3. Утицај α -methylbutyrylshikonin-a на вијабилност леукемијских лимфоцита.

Даље је испитиван антитуморски ефекат другог деривата шиконина, α -methylbutyrylshikonin-a на вијабилност BCL1 и JVM-13 ћелија.

Примена α -methylbutyrylshikonin-a у трајању од 24 сата, у концентрацији од 1 $\mu\text{g/ml}$ смањује проценат вијабилних BCL1 леукемијских ћелија на мање од 50. Тај ефекат расте са дозом и при концентрацији од 3 $\mu\text{g/ml}$ постиже максимум, односно вијабилност BCL1 ћелија је 0%. Вијабилност BCL1 ћелија је такође 0% и при излагању α -methylbutyrylshikonin-у у дози од 10 $\mu\text{g/ml}$, док је минималан пораст вијабилности BCL1 лимфоцита (4-5%) забележен при концентрацији α -methylbutyrylshikonin-a од 30 $\mu\text{g/ml}$ и 100 $\mu\text{g/ml}$ (Графикон 3).

Највеће смањење вијабилности BCL1 лимфоцита (на 0%) након 48-часовног третмана α -methylbutyrylshikonin-ом уочава се при концентрацијама од 3 $\mu\text{g/ml}$ до 30 $\mu\text{g/ml}$. Тако значајан антитуморски ефекат α -methylbutyrylshikonin-a након излагања у трајању од 48 сати је забележен и за концентрацију 1 $\mu\text{g/ml}$, проценат вијабилних BCL1 ћелија је смањен на 60% (Графикон 3).

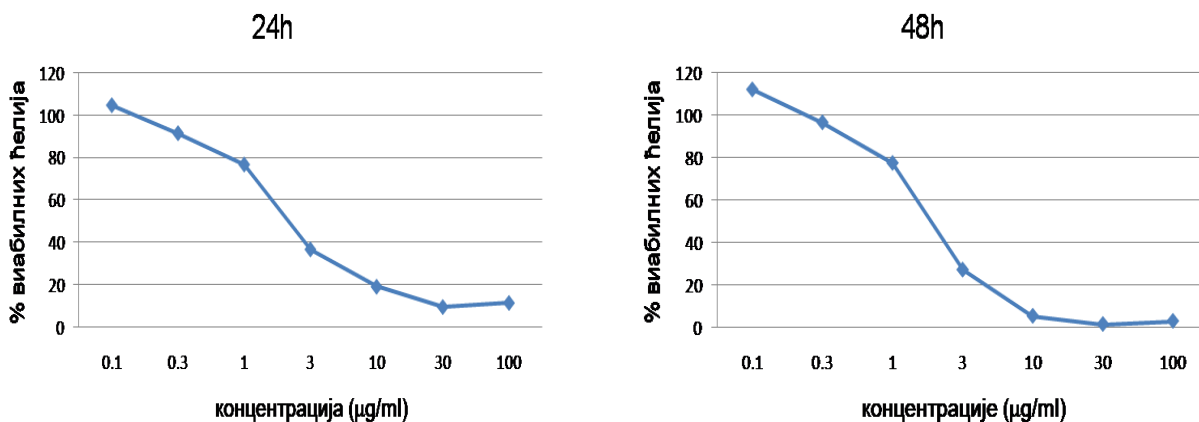


Графикон 3. Утицај α -methylbutyrylshikonin-a на вијабилност ћелија мишје хроничне лимфоцитне леукемије, BCL1. Вијабилност BCL1 ћелија након 24-часовног и 48-часовног третмана α -methylbutyrylshikonin-ом одређена је МТТ тестом. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена независна експеримента а сваки од експеримента је одрађен у трипликату.

Третирање JVM-13 леукемијских ћелија растућим концентрацијама α -methylbutyrylshikonin-a изазвало је дозно зависно смањење вијабилности ових ћелија. Максимални антитуморски ефекат α -methylbutyrylshikonin-a на JVM-13 ћелије уочен је за концентрацију од 30 $\mu\text{g/ml}$, при чему се види јасна дозна зависност дејства α -methylbutyrylshikonin-a до концентрације од 100 $\mu\text{g/ml}$ када се губи и примећује се благ пораст у броју вијабилних ћелија (Графикон 4).

Идентични резултати добијени су и након 48-часовног третмана JVM-13 ћелија α -methylbutyrylshikonin-ом. Значајно смањење вијабилности JVM-13 ћелија добијено је при

концентрацијама *α-methylbutyrylshikonin*-а од 1µg/ml до 100µg/ml, а максималан ефекат је постигнут већ са концентрацијом од 30µg/ml (Графикон 4).

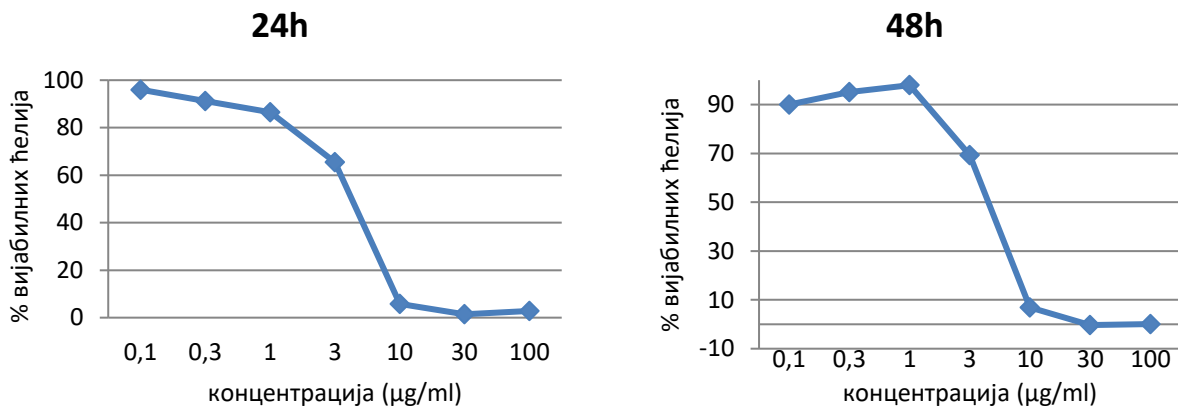


Графикон 4. Утицај *α-methylbutyrylshikonin*-а на вијабилност ћелија хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13. Вијабилност JVM-13 ћелија након 24-часовног и 48-часовног третмана *α-methylbutyrylshikonin*-ом одређена је МТТ тестом. Сви резултати су приказани као средња вредност три поновљена независна експеримента а сваки од експеримента је одрађен у трипликату.

4.4. Утицај *acetylshikonin*-а на вијабилност леукемијских лимфоцита

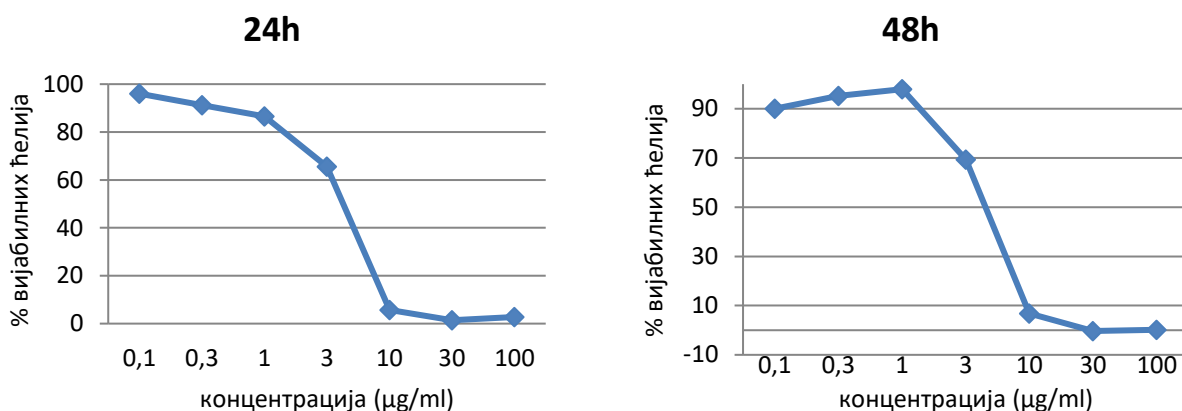
Трећи дериват шиконина чији смо утицај на вијабилност BCL1 и JVM-13 ћелија испитивали МТТ тестом је *acetylshikonin*.

Acetylshikonin је, слично претходно тестираним дериватима шиконина, показао значајно антилеукемијско дејство на BCL1 лимфоцитима. Значајније смањење вијабилности BCL1 ћелија третираних *acetylshikonin*-ом је уочено тек при концентрацији 3µg/ml, и након 24-часовног као и након 48-часовнох третмана. Максималан ефекат *acetylshikonin*-а, смањење вијабилности BCL1 ћелија на 0% постигнут је тек у концентрацији од 30µg/ml у оба временска интервала (Графикон 5).



Графикон 5. Утицај *acetylshikonin*-а на вијабилност ћелија мишје хроничне лимфоцитне леукемије, BCL1. Вијабилност BCL1 ћелија након 24-часовног и 48-часовног третмана *acetylshikonin*-ом одређена је МТТ тестом. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена независна експеримента а сваки од експеримента је одрађен у трипликату.

Излагањем ћелија хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13, троструко растућим концентрацијама *acetylshikonin*-а добијени су слични резултати за оба временска интервала. И након 24-часовног и након 48-часовног третмана статистички значајно смањење вијабилности JVM-13 ћелија примећено је у опсегу концентрација од 3µg/ml до 100µg/ml *acetylshikonin*-а. Максимално смањење вијабилности тетираних ћелија постигнуто је са концентрацијом од 30µg/ml *acetylshikonin*-а, док је вијабилност ћелија третираних *acetylshikonin*-ом у концентрацији 100µg/ml била благо повећана у оба временска интервала. *Acetylshikonin* показује дозно зависан ефекат и на JVM-13 ћелијској линији као и на BCL1 линији до концентрације од 30µg/ml (Графикон 6).



Графикон 6. Утицај *acetylshikonin*-а на вијабилност ћелија хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13. Вијабилност JVM-13 ћелија након 24-часовног и 48-часовног третмана *acetylshikonin*-ом одређена је МТТ тестом. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена независна експеримента а сваки од експеримента је одрађен у трипликату.

4.5. Утицај *deoxyshikonin*-а, β -*hydroxyisovalerylshikonin*-а, 5,8-*O*-*dimethyl isobutyrylshikonin*-а, 5,8-*O*-*dimethyl deoxyshikonin*-а на вијабилност леукемијских лимфоцита

Deoxyshikonin, β -*hydroxyisovalerylshikonin*, 5,8-*O*-*dimethyl isobutyrylshikonin* и 5,8-*O*-*dimethyl deoxyshikonin*, за разлику од претходна три деривата шиконина, нису показали значајан ефекат на смањење вијабилности BCL1 и JVM-13 леукемијских ћелија. Након 24-часовног и 48-часовног третирања обе ћелијске линије није детектовано значајно смањење вијабилности третираних ћелија ни за један од четири поменути деривата шиконина (резултати нису приказани).

4.6. IC50 вредности екстракта корена биљке *Onosma visianii* и изолованих деривата шиконина

Даље су анализиране IC50 вредности (концентрација супстанце ($\mu\text{g/ml}$) која инхибира преживљавање циљаних ћелија за 50%) за оба испитана екстракта и седам деривата шиконина.

У случају BCL1 ћелијске линије, најмању вредност IC50 имали су *isobutyrylshikonin* и *α -methylbutyrylshikonin*, а потом *acetylshikonin*. Добијене IC50 вредности за све испитиване супстанце су готово идентичне за оба времена излагања ћелија и 24 и 48 сати. *Deoxyshikonin*, *β -hydroxyisovalerylshikonin*, *5,8-O-dimethyl isobutyrylshikonin* и *5,8-O-dimethyl deoxyshikonin* и оба екстракта, метанолски и петрол етар метилен хлоридски, нису показали антилеукемијско дејство ни при концентрацији од $100\mu\text{g/ml}$ па је и IC50 вредност била већа од $100\mu\text{g/ml}$ (Табела 3).

IC50 \pm SD, BCL1 ћелијска линија		
	24h	48h
метанолски екстракт	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$
петрол етар метилен хлоридски екстракт	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$
isobutyrylshikonin	0.86 \pm 0.16 $\mu\text{g/ml}$	0.95 \pm 0.15 $\mu\text{g/ml}$
α -methylbutyrylshikonin	1.07 \pm 0.19 $\mu\text{g/ml}$	1.02 \pm 0.2 $\mu\text{g/ml}$
acetylshikonin	3.82 \pm 0.2 $\mu\text{g/ml}$	3.88 \pm 0.2 $\mu\text{g/ml}$
deoxyshikonin	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$
β -hydroxyisovalerylshikonin	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$
5,8-O-dimethyl isobutyrylshikonin	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$
5,8-O-dimethyl deoxyshikonin	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$

Табела 3. Концентрације екстракта корена биљке *Onsoma visianii* и изолованих деривата шиконина које инхибирају преживљавање BCL1 ћелија за 50% након излагања овим супстанцама у трајању од 24 и 48 сати. Вредности IC50 су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна ескперимента.

За JVM-13 ћелијску линију добијени су готово идентични резултати, најмању вредност IC50 имали су *isobutyrylshikonin* и *α -methylbutyrylshikonin* а нешто већу *acetylshikonin*. IC50 вредности за ова три шиконинска деривата нешто су веће у поређењу са IC50 вредностима које су добијене за BCL1 ћелијску линију, указујући на већу осетљивост BCL1 ћелија на поменуте деривате. Екстракти и остали деривати шиконина имали су IC50 вредност већу од $100\mu\text{g/ml}$ (Табела 4).

IC50±SD, JVM-13 ћелијска линија		
	24h	48h
метенолски екстракт	>100µg/ml	>100µg/ml
петрол етар метилен хлоридски екстракт	>100µg/ml	>100µg/ml
<i>isobutyrylshikonin</i>	3.86±0.18ug/ml	2.40±0.18ug/ml
<i>α-methylbutyrylshikonin</i>	3.08±0.17ug/ml	2.51±0.16ug/ml
<i>acetylshikonin</i>	7.30±0.22ug/ml	4.76±0.20ug/ml
<i>deoxyshikonin</i>	>100µg/ml	>100µg/ml
<i>β-hydroxyisovalerylshikonin</i>	>100µg/ml	>100µg/ml
<i>5,8-O-dimethyl isobutyrylshikonin</i>	>100µg/ml	>100µg/ml
<i>5,8-O-dimethyl deoxyshikonin</i>	>100µg/ml	>100µg/ml

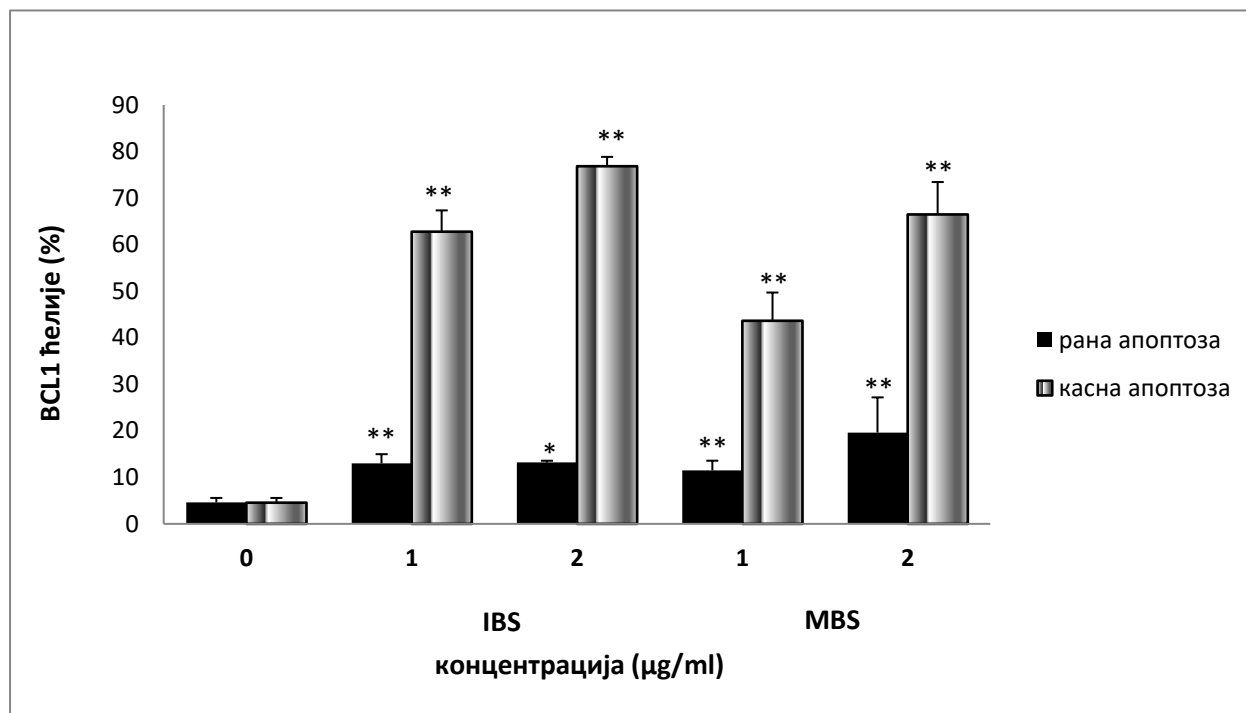
Табела 4. Концентрације екстраката корена биљке *Onsoma visianii* и деривата шиконина изолованих из ове биљке које инхибирају преживљавање JVM-13 ћелија за 50% након инкубације у трајању од 24 и 48 часова. Вредности IC50 су приказане као средња вредност ± стандардна девијација из три независна експеримента.

С' обзиром да су вијабилност BCL1 и JVM-13 леукемијских ћелија у највећем проценту смањили *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin*, у наредним експериментима су детаљније испитивани антилеукемијски ефекти ова два деривата шиконина.

4.7. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* индукују апоптозу BCL1 леукемијских лимфоцита

Обзиром да је механизам већине цитостатика индукција апоптозе малигних ћелија, испитали смо да ли *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* индукују апопторску смрт леукемијских ћелија. Прво смо ћелије BCL1 ћелијске линије изложили *isobutyrylshikonin*-у и *α-methylbutyrylshikonin*-у у концентрацији од 1µg/ml и 2µg/ml током 24 сата, а потом смо тетирание ћелије обележили анексином V конјугованим флуоресцентном бојом и пропиридијум јодидом. Тако обележене ћелије анализирали смо проточном цитометријом и одређивали тип ћелијске смрти третираних ћелија. Добијени резултати указују да је доминантан тип ћелијске смрти BCL1 ћелија након третмана *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом апоптоза. Резултати јасно показују да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* статистички значајно повећавају проценат BCL1 ћелија и у раној и у касној фази апоптозе у односу на нетретиране ћелије, али такође и да је највећи проценат третираних BCL1 ћелија у касној фази апоптозе. Након третмана *isobutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 1µg/ml проценат ћелија у раној апоптози износио је 13.03% а у касној 62.77%. Процент апоптотичних BCL1 ћелија након третмана *isobutyrylshikonin*-ом у већој концентрацији, 2µg/ml је био још већи и износио је 13.2% BCL1 ћелија у раној и 76.83% BCL1 ћелија касној апоптози. Након излагања BCL1 ћелија *α-methylbutyrylshikonin*-у у концентрацији 1µg/ml 11.47% ћелија било је у раној фази, а 43.63% у касној апоптозе.

Након третмана α -methylbutyrylshikonin-у у концентрацији 2 μ g/ml 19.63% BCL1 ћелија је било у раној, а 66.47% у касној фази апоптозе, наспрам 4.63% и 4.55% нетретираних ћелија у раној и касној апоптози. Добијени резултати јасно указују да је апоптоза третираних BCL1 ћелија зависна од концентрације *isobutyrylshikonin*-а, односно α -methylbutyrylshikonin-а и да је највећи проценат третираних ћелија у касној фази апоптозе (Графикон 7).

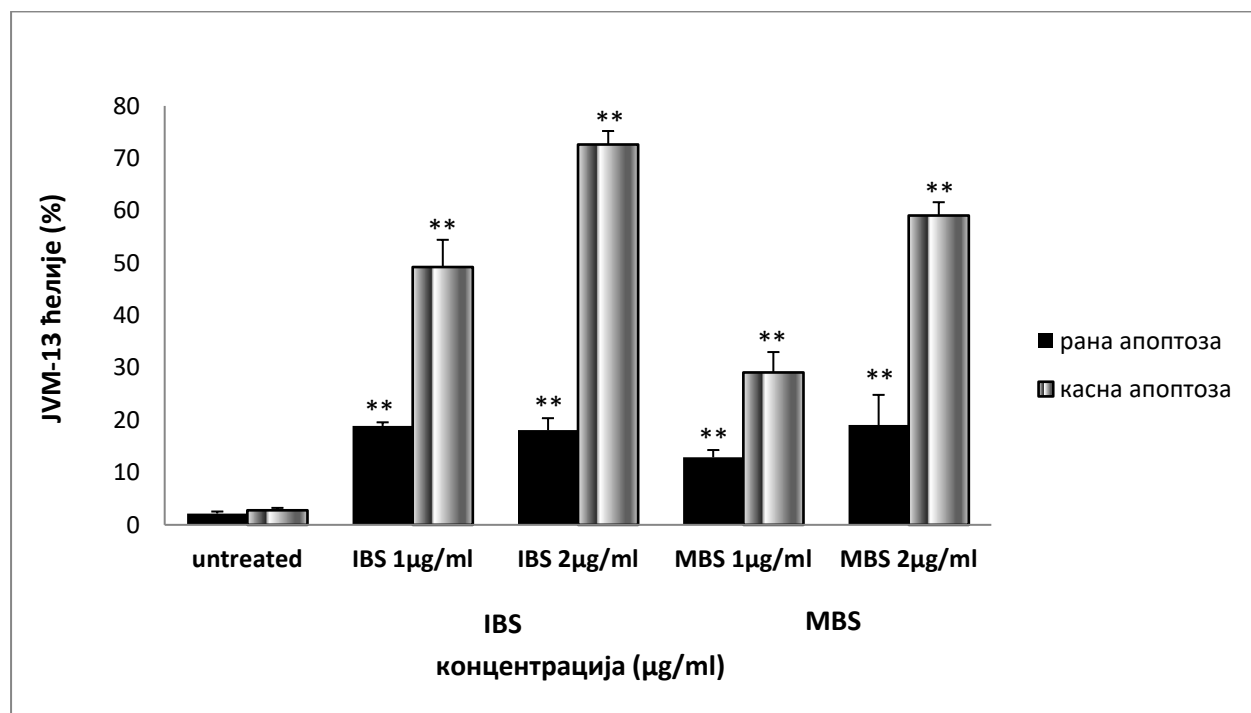


Графикон 7. Анализа процентуалне заступљености ћелија у различитим фазама апоптозе након што су BCL1 ћелије 24 сата третиране *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом у концентрацијама 1 μ g/ml и 2 μ g/ml. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.8. *Isobutyrylshikonin* и α -methylbutyrylshikonin индукују апоптозу JVM-13 леукемијских лимфоцита

На исти начин анализиран је евентуални проапоптотски ефекат *isobutyrylshikonin*-а и α -methylbutyrylshikonin, у концентрацијама 1 μ g/ml и 2 μ g/ml, на JVM-13 ћелијску линију хумане В пролимфоцитне леукемије. Резултати добијени анализом процента рано- и касно-апоптотичних JVM-13 ћелија након третмана селектованим дериватима шиконина су готово идентични резултатима добијеним анализом BCL1 ћелија. Детектован је статистички значајно већи проценат JVM-13 ћелија и у раној и у касној фази апоптозе за обе концентрације *isobutyrylshikonin*-а и α -methylbutyrylshikonin-а у поређењу са нетретираним JVM-13 ћелијама. Највећи проценат третираних JVM-13 ћелија био је у касној апоптози. Након излагања *isobutyrylshikonin*-у у концентрацији 1 μ g/ml проценат JVM-13 ћелија у раној апоптози износио је 18.87% а у касној 49.23%, наспрам 4.63% и 4.55% нетретираних ћелија у раној и касној апоптози. Коришћењем веће концентрације од

2 μ g/ml, проценат JVM-13 ћелија у касној фази апоптозе је порастао на 72.63% док је проценат ћелија у раној апоптози остао исти. Третирање JVM-13 ћелијске линије α -methylbutyrylshikonin-а у концентрацији 1 μ g/ml за резултат је имао 12.9% ћелија у раној, а 29.1% у касној фази апоптозе. И α -methylbutyrylshikonin је показао дозно зависан ефекат па је након третирања са 2 μ g/ml α -methylbutyrylshikonin-а 19.07% ћелија било у раној, а 59.07% у касној фази апоптозе (Графикон 8).



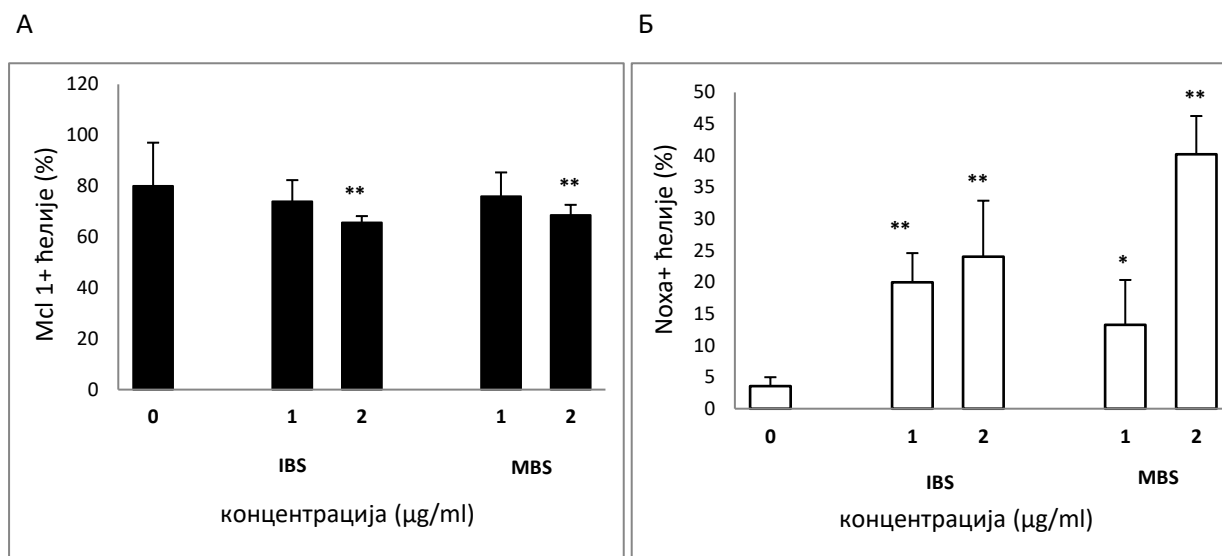
Графикон 8. Анализа процентуалне заступљености ћелија у различитим фазама апоптозе након што су JVM-13 ћелије 24 сата третиране *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом у концентрацији од 1 μ g/ml и 2 μ g/ml. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента (* p<0.05, ** p<0.01)

4.9. *Isobutyrylshikonin* и α -methylbutyrylshikonin смањују антиапоптотске а повећавају проапоптотске молекуле

У циљу бољег разумевања механизма апоптозе, анализиран је утицај *isobutyrylshikonin*-а и α -methylbutyrylshikonin-а на експресију проапоптотских молекула Ноха и Вах, антиапоптотских MCL1 и Bcl-2 као и на експресију каспазе-3 која има централну улогу у започињању унутрашњег пута апоптозе.

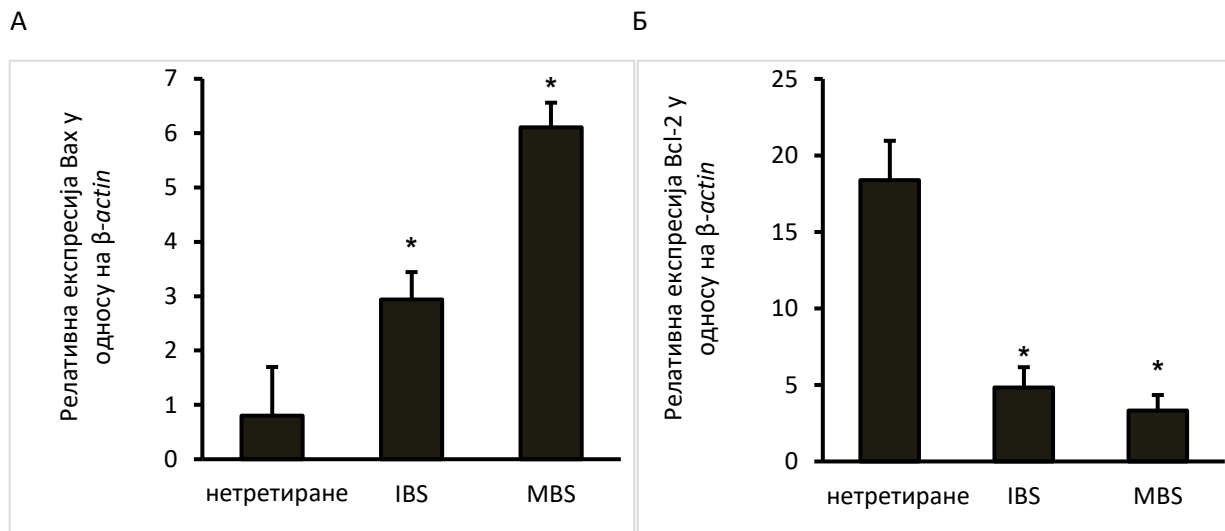
JVM-13 леукемијски лимфоцити третирани *isobutyrylshikonin*-ом и α -methylbutyrylshikonin у концентрацијама 1 μ g/ml и 2 μ g/ml током 24 часа инкубирани су са антителима специфичним за Ноха и MCL1, а затим и секундарним антителима конјугованим са флуоресцентном бојом и анализирани проточном цитометријом. Резултати показују да је проценат JVM-13 ћелија, третираних већом концентрацијом (2 μ g/ml) *isobutyrylshikonin*-а и α -methylbutyrylshikonin-а, које експримирају антиапоптотски протеин MCL1 статистички је значајно мањи у поређењу са процентом MCL1 позитивних

JVM-13 нетретираних ћелија (Графикон 9А). Такође, показано је да је проценат JVM-13 ћелија третираних и мањом и већом концентрацијом *isobutyrylshikonin*-а и α -*methylbutyrylshikonin*-а, које експримирају проапоптотски протеин Ноха статистички значајни већи у поређењу са процентом Ноха позитивних JVM-13 ћелија излаганих само медијуму (Графикон 9Б).



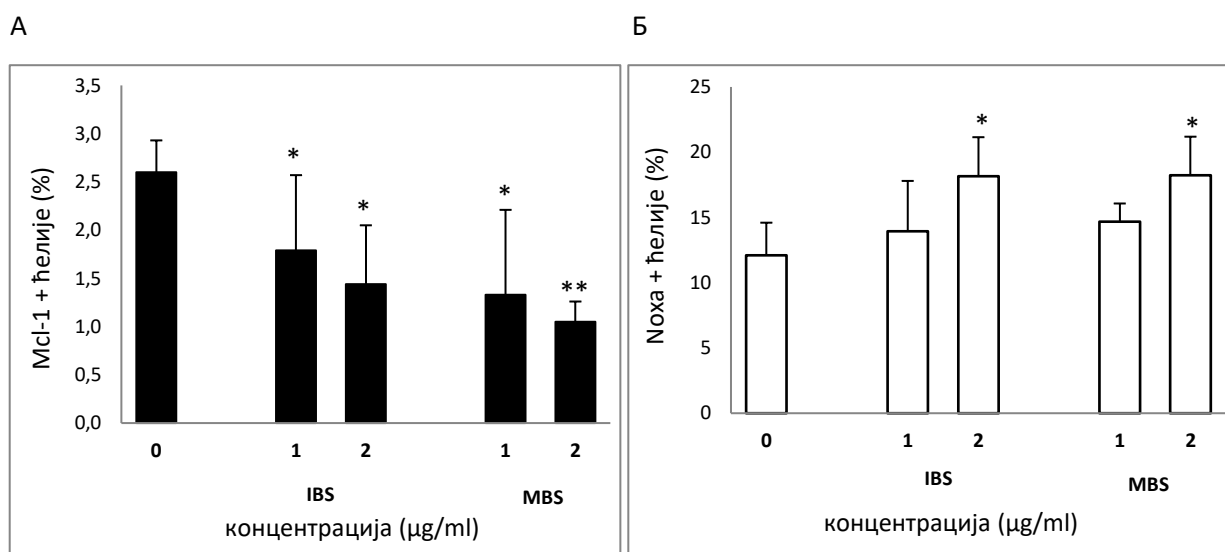
Графикон 9. Процент MCL-1 (А) и Noxa (Б) позитивних JVM-13 ћелија након третирања *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -*methylbutyrylshikonin*(MBS)-ом у трајању од 24 сата. Проценти MCL1 и Noxa позитивних JVM-13 ћелија приказане су као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Методом RT-PCR, анализирана је експресија иРНК за антиапоптоски Bcl-2 и проапоптоски Вах молекула након 24-часовног третирања JVM-13 ћелија *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 2µg/ml. На Графикону 10 се јасно види да је третман дериватима шиконина значајно смањио експресију Bcl-2, а повећао експресију проапоптоског Вах молекула (ниво иРНК). Ови резултати потврђују резултате анализе третираних ћелија које експримирају *Annexin V* и пропиридијум јодид, да *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* индукују апоптозу JVM-13 лимфоцита.



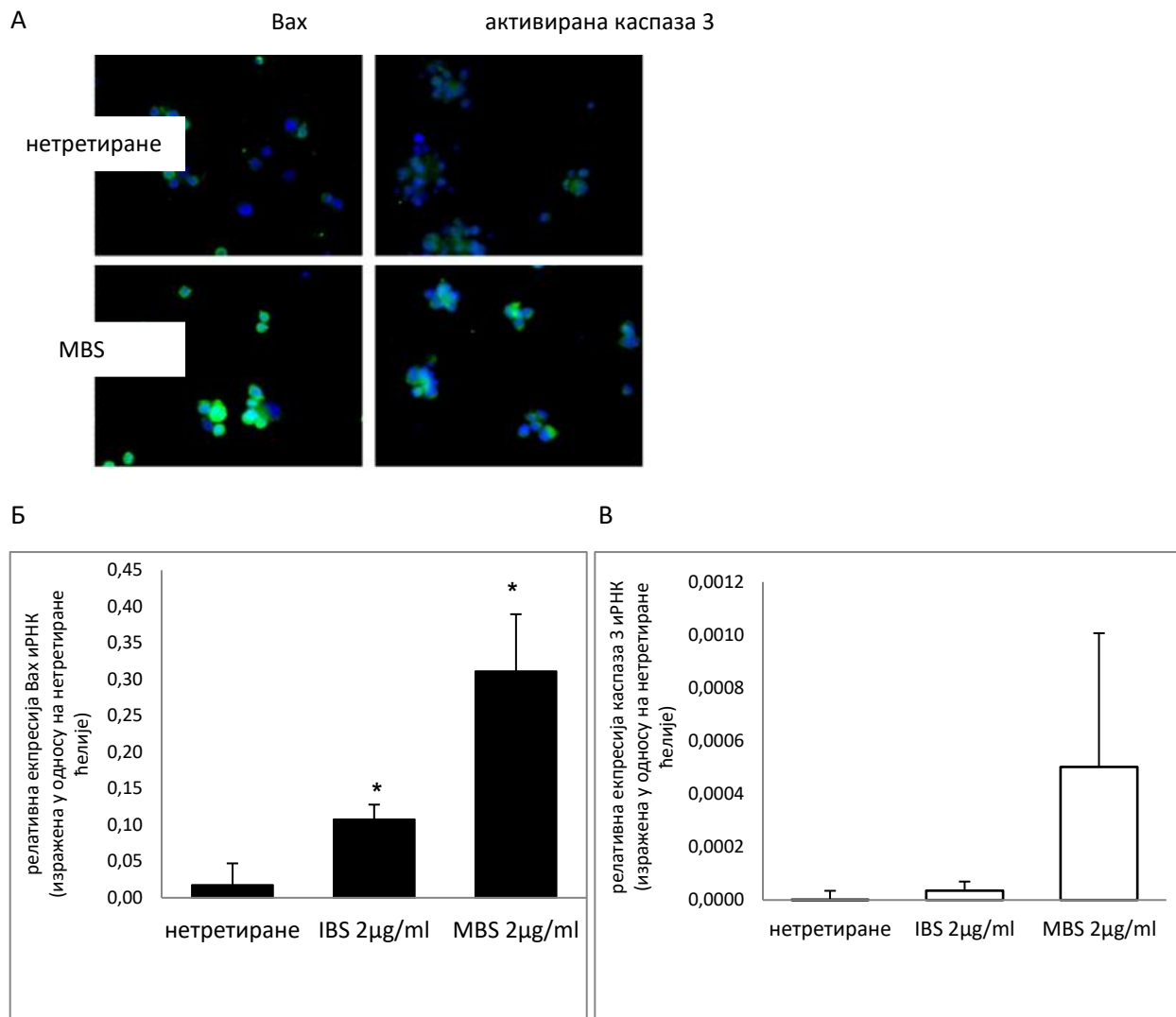
Графикон 10. Експресија Вах и Вcl-2 (иРНК) у JVM-13 ћелијама након 24-часовног третмана α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом и α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом. Приказане су средње вредности \pm стандардна девијација за четири узорка по групи (* $p < 0.05$)

Процент ВCL1 ћелија које експримирају Мcl-1 и Ноха протеине након третмана *isobutyrylshikonin*-ом и α -methylbutyrylshikonin-ом такође је анализиран проточном цитометријом. Слично JVM-13 ћелијској линији, деривати шиконина су деловали и на ВCL1 ћелије, изазвали су дозно зависно смањења процента Мcl-1 позитивних (Графикон 11А) а повећање процента Ноха позитивних ВCL1 ћелија (Графикон 11Б).



Графикон 11. Процент МCL-1 (А) и Ноха (Б) позитивних ВCL1 ћелија након третирања *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом у трајању од 24 сата. Проенти МCL1 и Ноха позитивних ВCL1 ћелија приказани су као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Експресија проапоптотског Вах протеина и активираних каспаза 3 у ВСL1 ћелијама анализирана је прво имунофлуоресценцом. Утврђена повећана експресија и Вах протеина и активираних каспаза 3 у ВСL1 ћелијама третираним *α-methylbutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 2μg/ml у трајању од 24 сата (Графикон 12А). У складу са овим резултатом су и резултати квантитативне RT-PCR анализе којом је показана статистички значајно већа експресија иРНК за Вах молекула у ВСL1 ћелијама третираним *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом за обе тестиране концентрације (1μg/ml и 2μg/ml) у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 12Б). Експресија иРНК за активираних каспаза 3 је већа у ВСL1 ћелијама третираним дериватима шиконина у поређењу са нетретираним ћелијама али та разлика није достигла статистичку значајност (Графикон 12В).

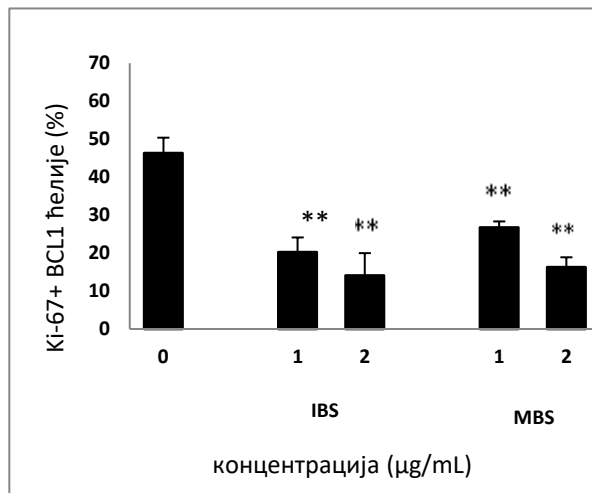


Графикон 12. Деривати шиконина повећавају експресију Вах молекула и активиране каспазе 3 у BCL1 ћелијама. (A) Имунофлуоресцена BCL1 ћелија нетретираних и третираних α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом у дози 2µg/mL (зелено су обојени протеини Вах и активирана каспаза 3, а ДНК је обојена плавом бојом DAPI). Анализа експресије иРНК за Вах (Б) и активирану каспазу 3 (В) након што су BCL1 ћелије 24 сата третиране *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -methylbutyrylshikonin(MBS)-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација за четири узорка (* p<0.05).

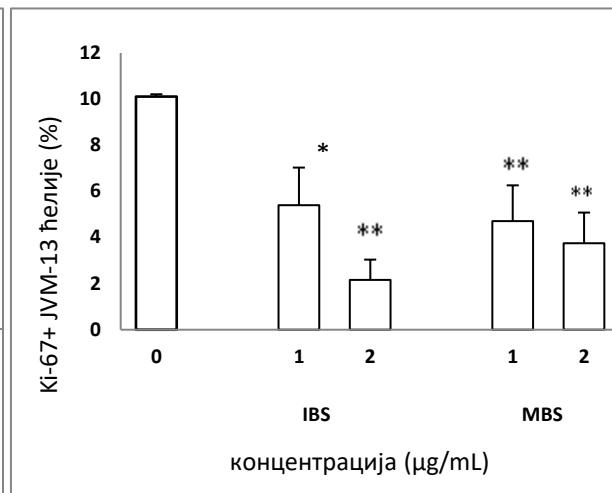
4.10. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* инхибирају пролиферацију леукемијских лимфоцита

Антипролиферативни ефекат *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а анализиран је проточном цитометријом третираних и нетретираних леукемијских ћелија обојених анти Ki-67 антителом конјугованим са флуоресцентном бојом. Процент BCL1 (Графикон 13А) и JVM-13 ћелија (Графикон 13Б) које експримирају Ki-67 значајно је мањи након 24-часовног третирања дериватима шиконина (обе тестиране концентрације 1µg/ml и 2µg/ml) у поређењу са процентом нетретираних ћелија које експримирају Ki-67. Ихбиција пролиферације показује дозну зависност, излагање већој концентрацији *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а праћено је већим смањењем процента леукемијских ћелија које експримирају маркер пролиферације Ki67. Испитивани деривати шиконина смањују на исти начин и експресију Ki67 у BCL1 ћелијама (Графикон 14В).

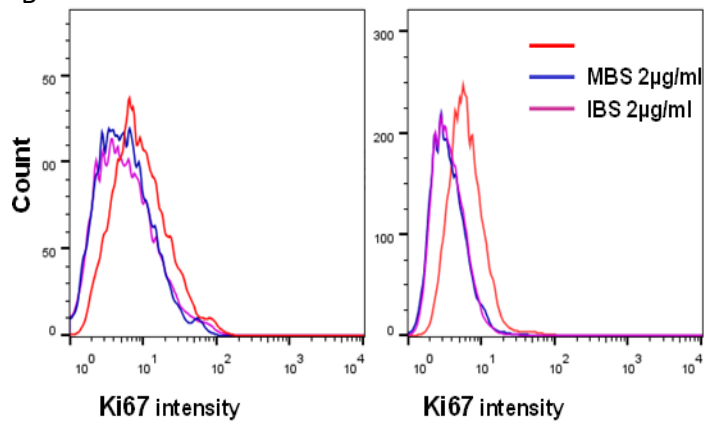
A



Б



B

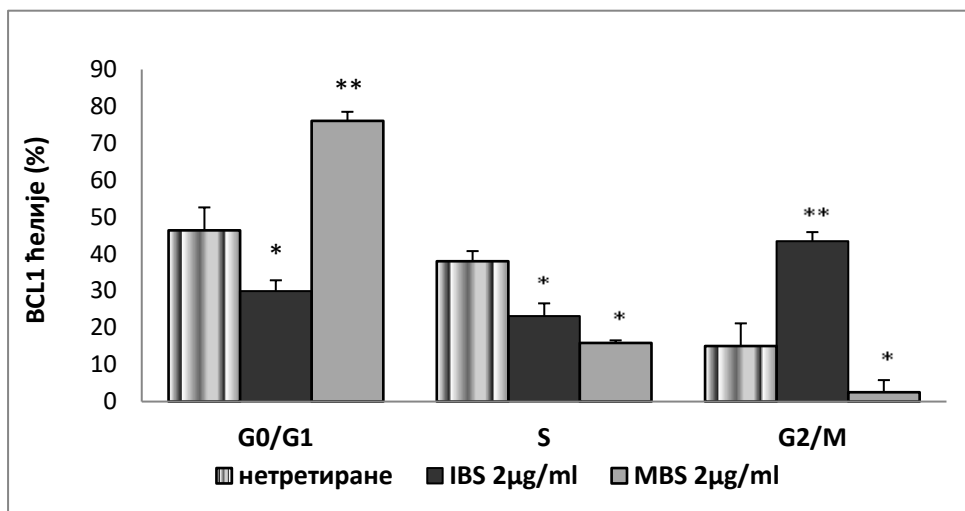


Графикон 13. *Isobutyrylshikonin*(IBS) и *α-methylbutyrylshikonin*(MBS) смањују експресију Ki67 у леукемијским ћелијама. Процент VCL1 (A), односно JVM-13 (Б) ћелија које експримирају Ki-67 након 24-часовног третмана *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и *α-methylbutyrylshikonin*(MBS)-ом. Измерене вредности из три независна експеримента приказане су као средња вредност ± стандардна девијација (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B) Репрезентативни хистограми експресије Ki-67 (*mean fluorescence intensity*) у VCL1 и JVM-13 ћелијама.

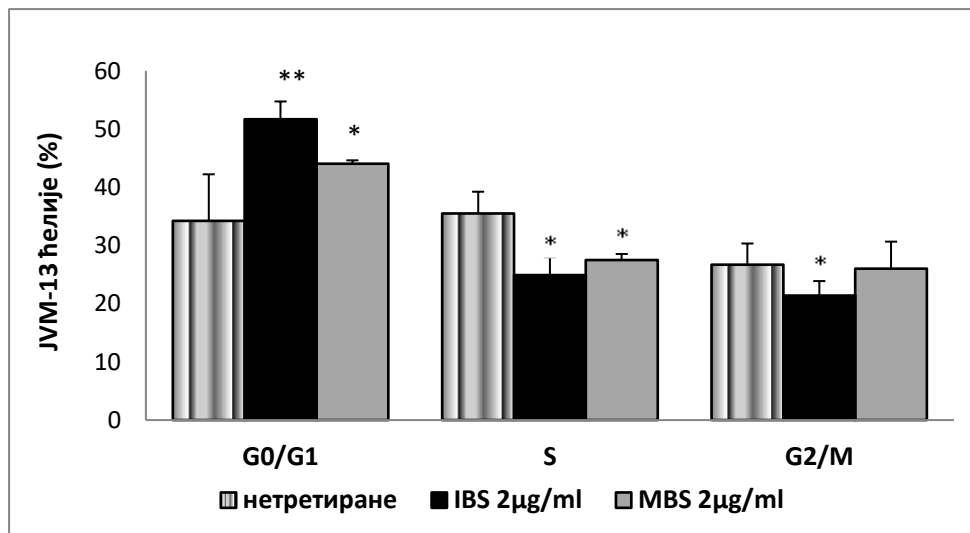
4.11. *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* индукују застој леукемијских лимфоцита у G0/G1, односно G2/M фази ћелијског циклуса

Проточном цитометријом анализирана је процентуална заступљеност леукемијских лимфоцита у појединим фазама ћелијског циклуса након излагања BCL1 и JVM-13 ћелија *isobutyrylshikonin*-у и α -*methylbutyrylshikonin*-и у концентрацији од 2 μ g/ml. Резултати указују да третман *isobutyrylshikonin*-ом повећава проценат BCL1 ћелија у G2/M фази, а смањује проценат ових ћелија у S и G0/G1 фази ћелијског циклуса, док α -*methylbutyrylshikonin* повећава проценат ћелија у G0/G1 фази, а смањује процента ћелија у S и G2/M фази ћелијског циклуса (Графикон 14А). Оба деривата шиконина су изазвала застој JVM-13 ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса и последично смањење процента ових ћелија у S и G2/M фази (Графикон 14Б).

A



Б



Графикон 14. Процентуална заступљеност BCL1(A) и JVM-13 ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса након 24-часовног третмана *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и *α-methylbutyrylshikonin*(MBS)-ом. Измерене вредности из три независна експеримента су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (* p<0.05, ** p<0.01).

4.12. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* смањују експресију циклина D, а повећавају експресију p16, p21 и p27

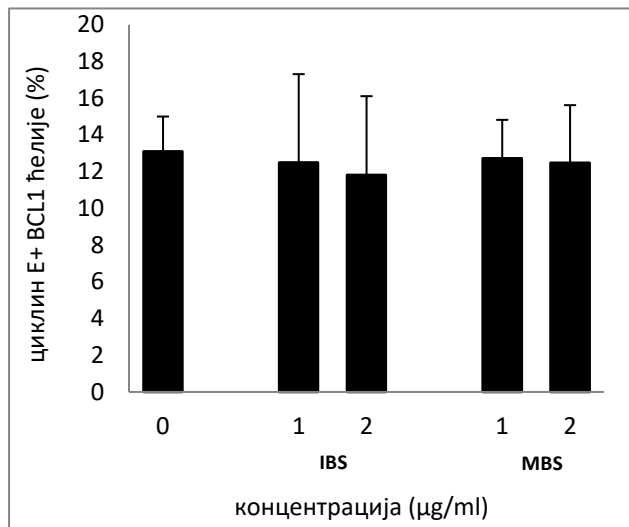
У циљу даљег испитивања утицаја *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а на ћелијски циклус, анализирана је експресија циклина -D3 и -E. Добијени резултати указују да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* не утичу на проценат BCL1 и JVM-13 ћелија које експримирају циклин E (Графикон 15А и 15Б). Са друге стране, показано је да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* у концентрацији од 2µg/ml смањују експресију

циклина D3 (ниво иРНК) у ВСL1 лимфоцитима (Графикон 15В). Проточном цитометријом је даље анализиран и проценат JVM-13 ћелија које експримирају циклин D3 након третмана *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом, а резултати показују да *isobutyrylshikonin* у концентрацији од 2μg/ml и *α-methylbutyrylshikonin* у концентрацији од 1μg/ml и од 2μg/ml значајно смањују проценат циклин D3 позитивних JVM-13 лимфоцита (Графикон 15Г).

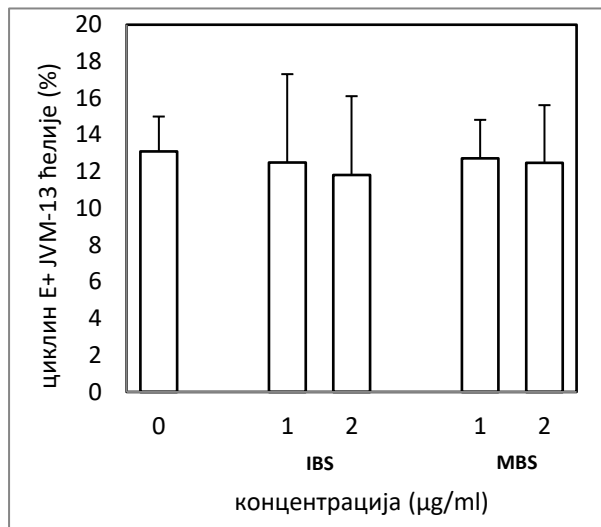
Даље, проточном цитометријом испитивали смо утицај *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а на експресију инхибитора циклин зависних киназа p16, p21, p27, значајних регулатора ћелијског циклуса, у ВСL1 лимфоцитима. Показано је да је статистички значајно већи проценат ВСL1 ћелија које експримирају p16 након третмана *isobutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 2μg/ml у поређењу са нетретираним ћелијама, док је међу ћелијама третираним *α-methylbutyrylshikonin*-ом статистички значајно већи проценат ћелија које експримирају сва три испитивана инхибитора циклин зависних киназа p16, p21 и p27 у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 16).

Добијени резултати указују да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* остварују антипролиферативно дејство на ВСL1 и JVM-13 лимфоците тако што индукују застој ћелија ћелијског циклуса, а што је вероватно последица инхибиције циклина D и повећања експресије инхибитора циклин зависних киназа p16, p21 и p27.

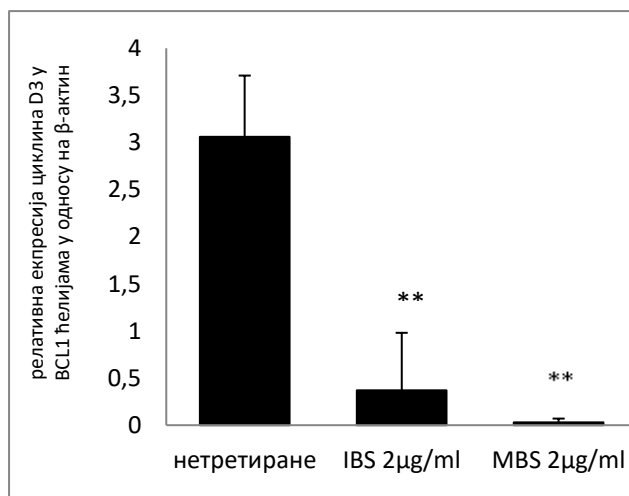
А



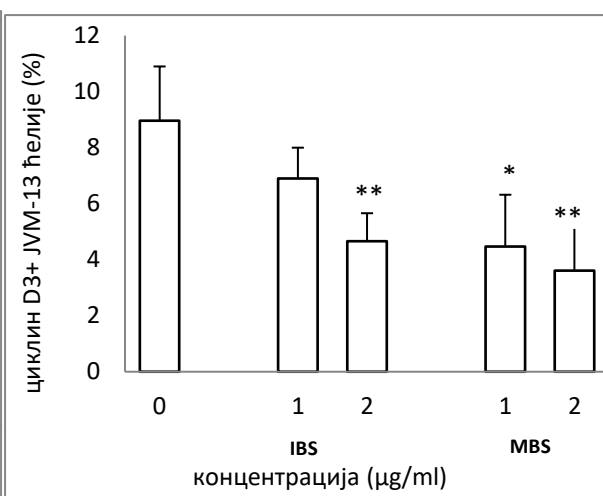
Б



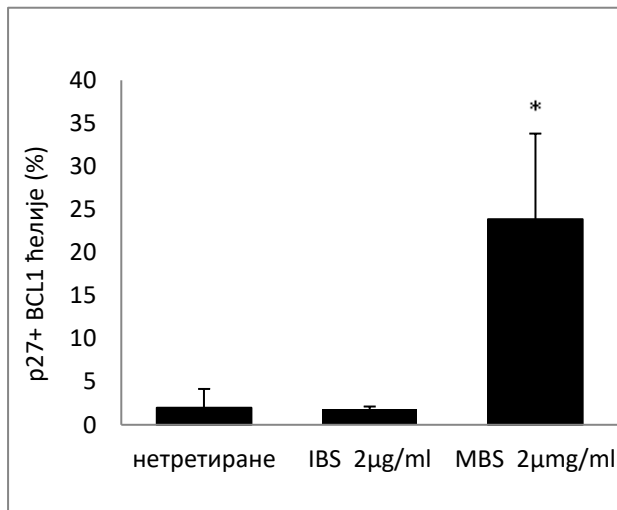
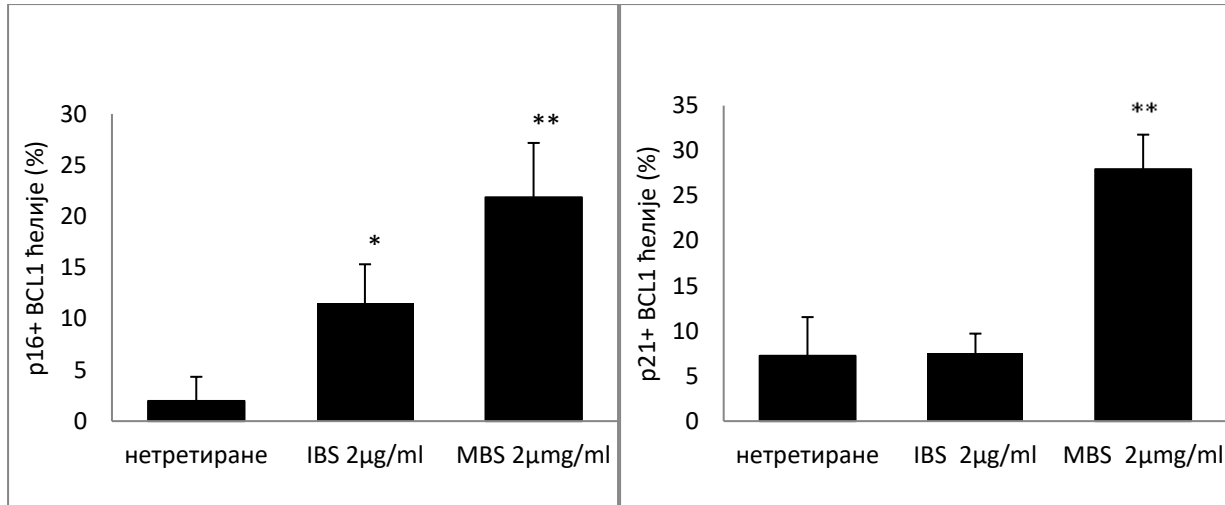
В



Г



Графикон 15. Утицај деривата шиконина на експресију цикллина у леукемијским лимфоцитима. Процент цикллин Е позитивних VCL1 (А) и JVM-13 (Б) ћелија одређен проточном цитометријом након 24-часовног третмана *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и *α-methylbutyrylshikonin*(MBS)-ом. (В) Експресија иРНК цикллина D3 одређена RT-PCR методом након што су VCL1 ћелије 24 сата третирани *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом. (Г) Процент JVM-13 ћелија које експримирају цикллин D3 одређен проточном цитометријом након третмана JVM-13 ћелија *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом у дозама 1µg/mL и 2µg/mL у трајању од 24 сата. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± стандардна девијација, 5 узорака по групи (*p<0.05, ** p<0.01)



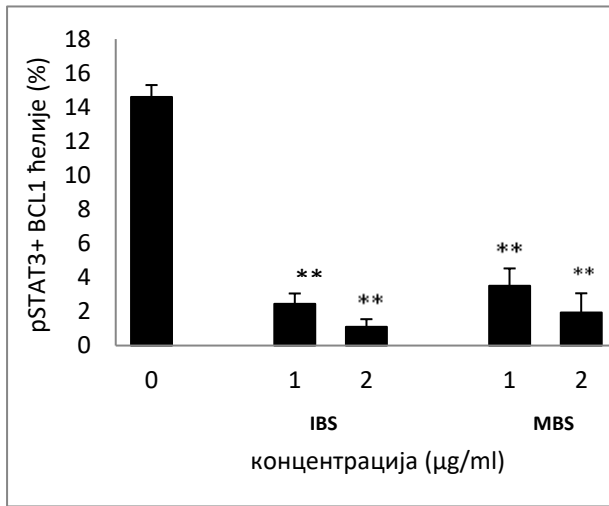
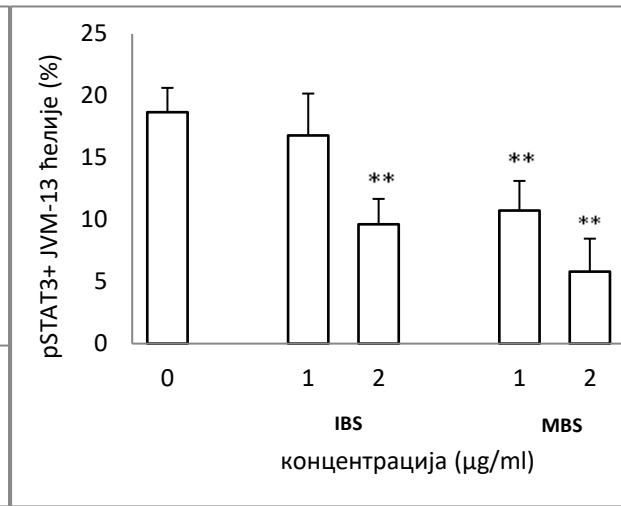
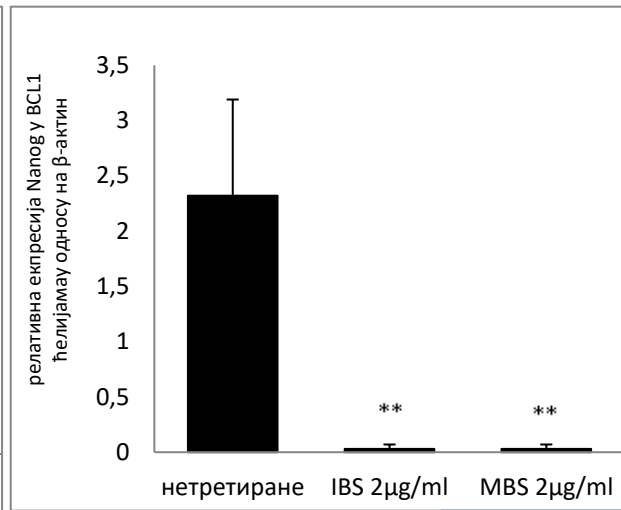
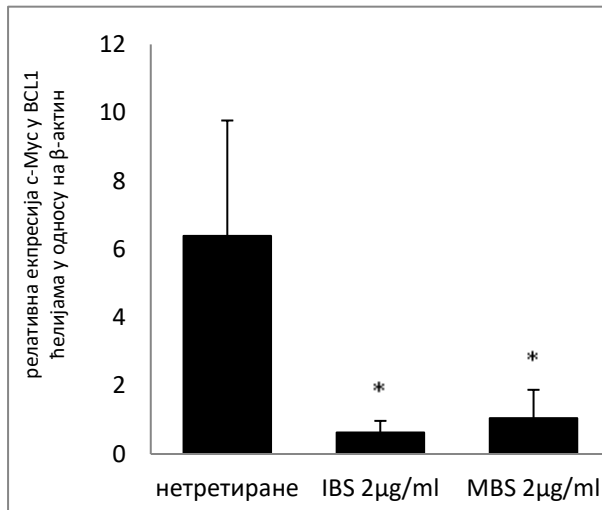
Графикон 16. Утицај деривата шиконина на експресију циклин зависних киназа у BCL1 лимфоцитима. Процент BCL1 ћелија које експримирају инхибиторе циклин зависних киназа, p16, p21 и p27 одређен проточном цитометријом након што су 24 сата третиране *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± стандардна девијација за пет узорка по групи (* p<0.05, ** p<0.01).

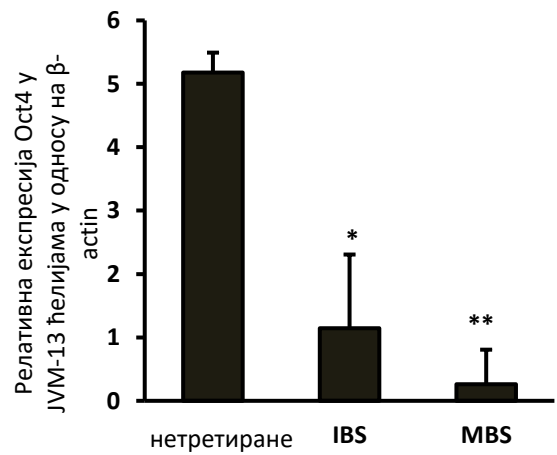
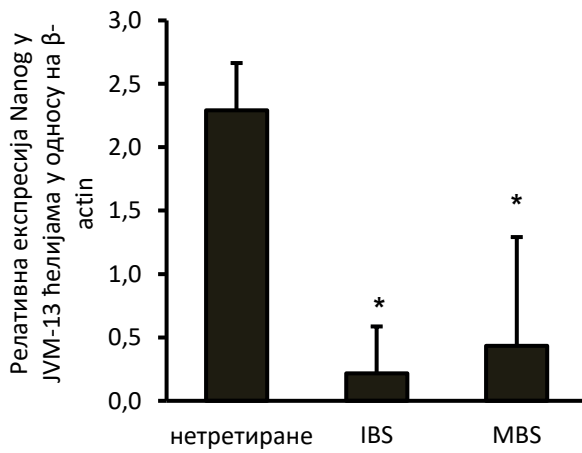
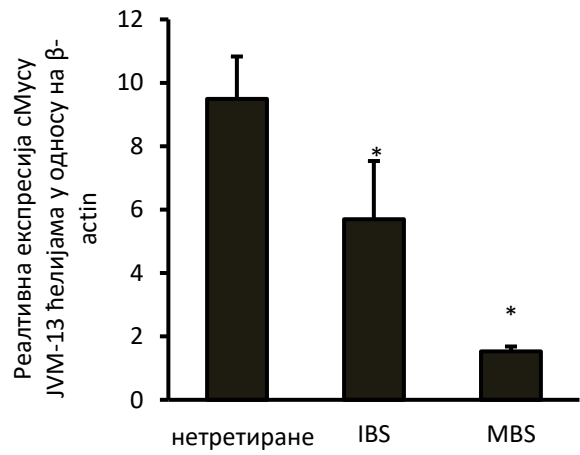
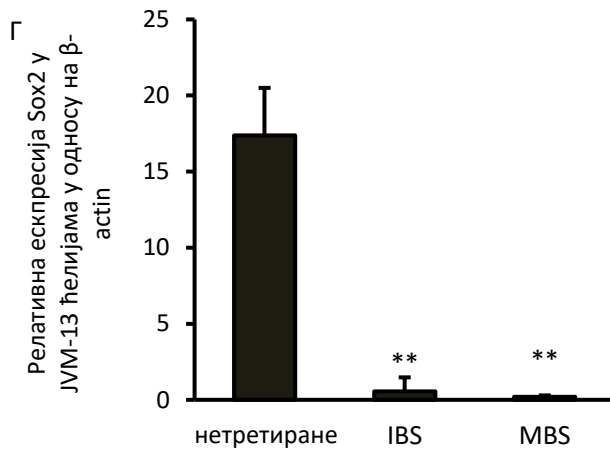
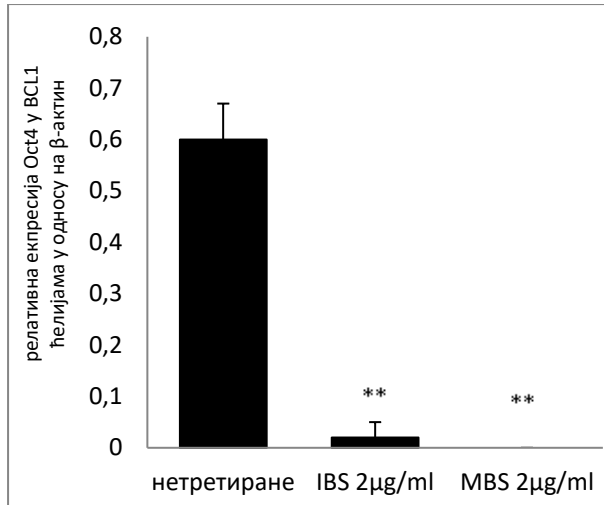
4.13. *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* инхибирају STAT3 сигнални пут и гене које STAT3 регулише

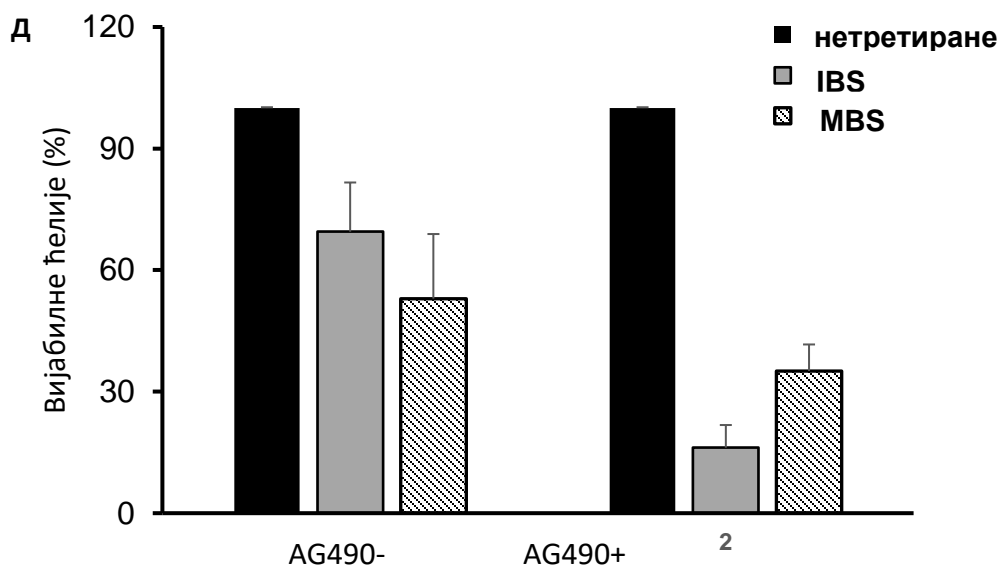
Обзиром да је показано да инхибиција STAT3 сигналног изазива смрт ћелија CLL (144) и да је инхибиција STAT3 један од механизма антитуморског дејства шиконина (145), испитали смо експресију активног, фосфорилисаног, STAT3 (pSTAT3) у BCL1 и JVM-13 лимфоцитима након што су ове ћелије третиране *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом у концентрацији од 1 μ g/ml и од 2 μ g/ml. Подаци добијени проточном цитометријом јасно показују смањење процента и BCL1 (Графикон 17А) и JVM-13 (Графикон 17Б) ћелија које експримирају pSTAT3 након третмана дериватима шиконина.

Након ових резултата, детаљније је анализирана нисходна регулација STAT3 сигналног пута и утицај шиконинских деривата на гене које STAT3 регулише. На Графикону 17 јасно је показано да *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* у концентрацији од 2 μ g/ml смањују експресију иРНК за c-Myc, Nanog и Oct4 у BCL1 ћелијама (Графикон 17В), а иРНК за c-Myc, Nanog, Oct4 и Sox2 у JVM-13 ћелијама (Графикон 17Г).

Како би даље испитали инхибицију STAT3 сигналног пута у индуковању смрти леукемијских лимфоцита, испитали смо цитотоксичност комбинованог третмана *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом са инхибитором Јак2 молекула (AG490). Јак2 је киназа која фосфорилише и активира STAT3 молекул. Резултати добијени МТТ тестом приказани на Графикону 17, јасно показују да појединачни третман ћелија инхибитором Јак2 киназе не изазива смрт BCL1 лимфоцита, али да комбиновани третман инхибитором Јак2 киназе (AG490) и *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом значајно више смањује вијабилност BCL1 лимфоцита у поређењу са процентом вијабилних BCL1 ћелија третираних само *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом (Графикон 17Д).

A**Б****В**



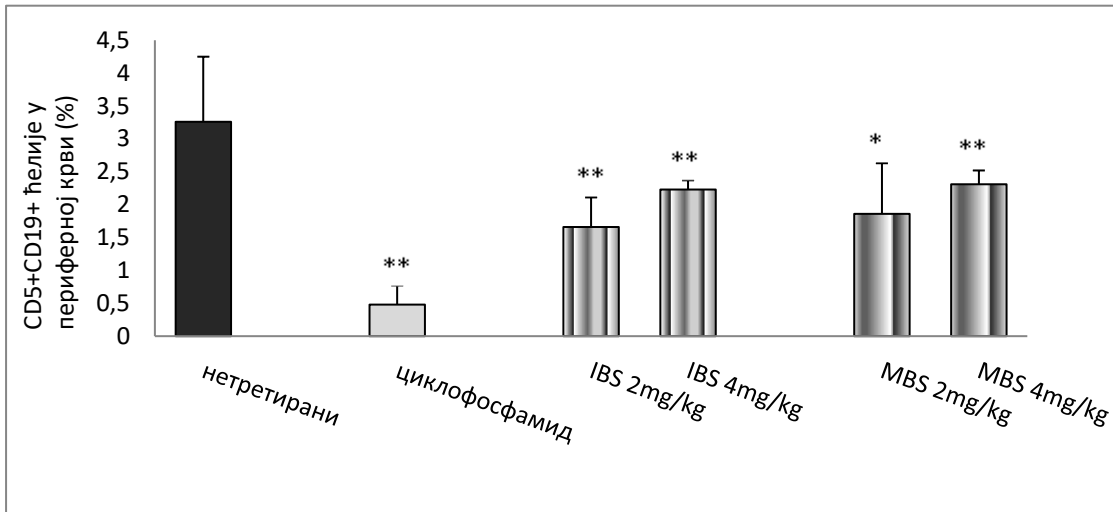


Графикон 17. Третман BCL1 и JVM-13 ћелија *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -*methylbutyrylshikonin*(MBS)-ом смањује експресију pSTAT3 и гена чију експресију регулише STAT3. Процент pSTAT3 у BCL1(A) и JVM-13 (Б) позитивних ћелија одређен проточном цитометријом након 24-часовног третмана *isobutyrylshikonin*(IBS)-ом и α -*methylbutyrylshikonin*(MBS)-ом. Експресија иРНК за с-Мус, Nanog и Oct4 одређена RT-PCR након што су BCL1 (B) и JVM-13 (Г) ћелије 24 сата третиране *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом. (Д) Вијабилност BCL1 ћелија одређена МТТ након 24-часовног третмана *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом са или без додавања Јак2 инхибитора, AG490. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** < 0.001).

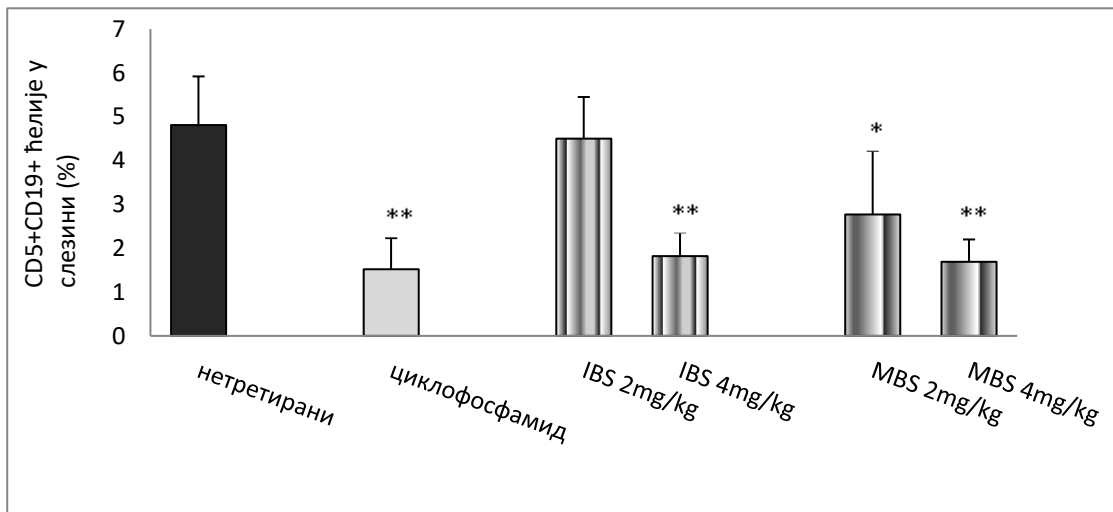
4.14. *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* инхибирају пролиферацију BCL1 ћелија *in vivo*

У складу са претходним резултатима *in vitro*, испитали смо потенцијал *isobutyrylshikonin*-а и α -*methylbutyrylshikonin*-а да *in vivo* инхибирају раст леукемијских BCL1 ћелија које су претходно интравенски инјектоване BALB/с мишевима. Као контролна супстанца за коју је познато да делује на ћелије хроничне лимфоцитне леукемије коришћен је циклофосфамид. Проточном цитометријом је одеђиван проценат леукемијских, CD5+CD19+, BCL1 ћелија у периферној крви и слезини нетретираних мишева и мишева третираних дериватима шиконина и циклофосфамидом. Показано је значајно смањење процента леукемијских ћелија у периферној крви (Графикон 18А) и слезини (Графикон 18Б) мишева третираних *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом (у дозама од 2mg/kg и 4mg/kg апликованих интраперитонеално три пута недељно, укупно 6 доза) у поређењу са групом нетретираних мишева. О ефикасности *isobutyrylshikonin*-а и α -*methylbutyrylshikonin*-а говори и чињеница да је након третмана овим дериватима у дози од 4mg/kg проценат BCL1 ћелија у слезини третираних мишева био сличан као након третмана циклофосфамидом (Графикон 18Б). Такође, деривати шиконина након интраперитонеалне примене нису изазвали значајан пораст концентрације ALT, AST, урее и креатинина у серуму (Графикон 18В).

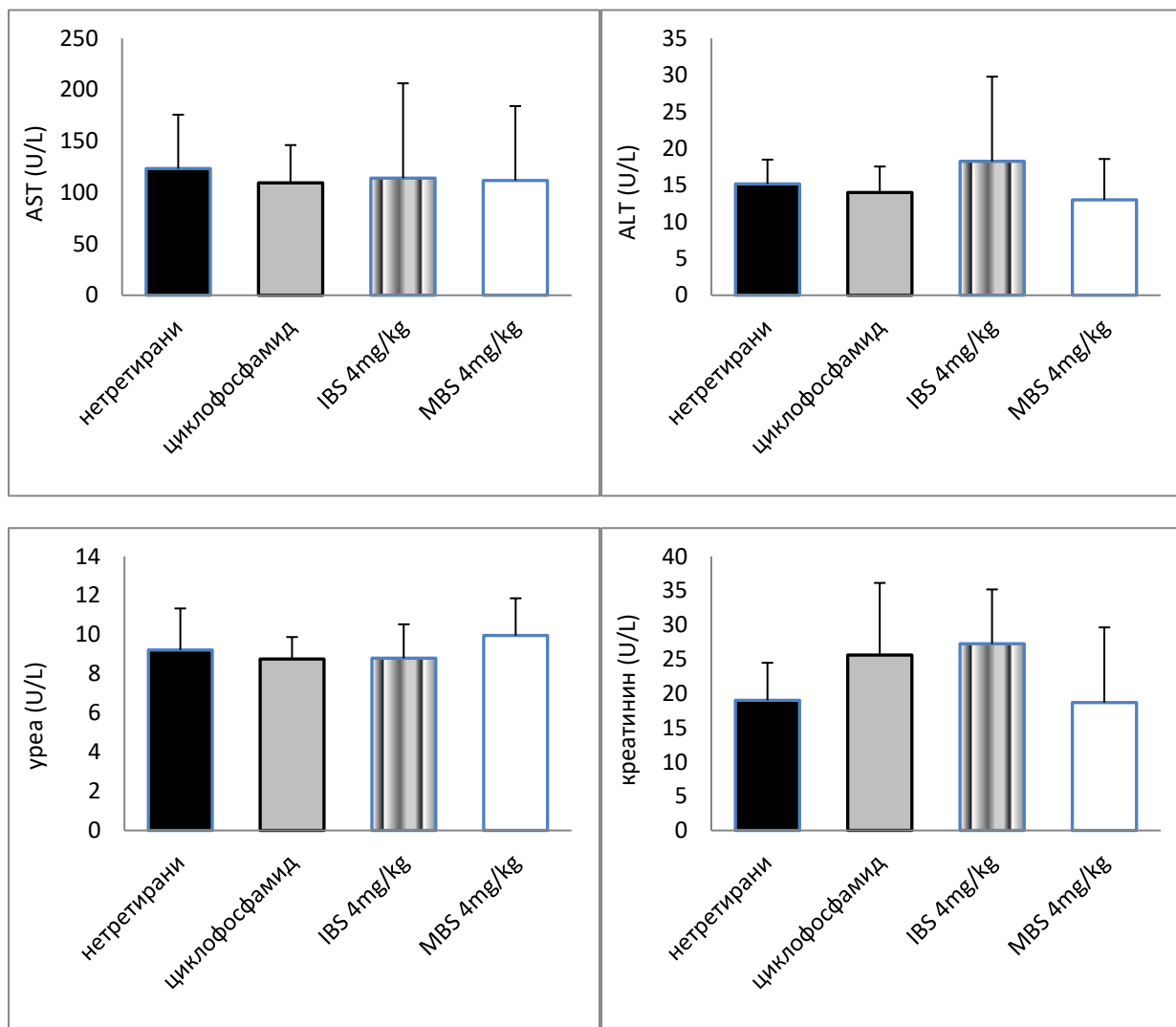
А



Б



В



Графикон 18. Третман *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом инхибира *in vivo* раст BCL1 леукемијских ћелија. Мононуклеарне ћелије изоловане су из периферне крви (А) и слезине (Б) нетретираних мишева и мишева третираних *isobutyrylshikonin*-ом и α -*methylbutyrylshikonin*-ом и циклофосфамидом након интравенске инјекције BCL1 ћелија (1×10^6), и проточном цитометријом је одређиван проценат CD5+CD19+ BCL1 ћелија који је приказан као средња вредност \pm SD. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. (В) Концентрације AST, ALT, уреје и креатинина измерен 90 дана након интравенске примене BCL1 ћелија, приказане као средња вредност \pm SD (8 мишева по групи).

5. Дискусија

CLL је споро прогресивна, али још увек неизлечива болест. Два главна проблема у терапији CLL су сложена онкогенеза са појавом лимфоцита који су отпорни на апоптозу и који пролиферишу у костној сржи и лимфним чворовима (5,6) и висока токсичност постојеће хемиотерапије. Стога је неопходно истраживање нових потенцијалних терапеутика за лечење CLL који би се боље толерисали а који би индуковали апоптозу ћелија CLL.

У овој студији је по први пут показано да *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin*, два нафтохинона који су екстраховани из корена биљке *Onosma visianii*, индукују јак апоптотски, антипролиферативни и STAT3 зависан цитотоксички ефекат у ћелијама мишје хроничне лимфоцитне леукемије, BCL1, и хумане В пролимфоцитне леукемије и *in vivo* антитуморске ефекте у мишјем моделу CLL.

5.1. *Isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin* изоловани из *Onosma visianii* остварују значајан антилеукемијски ефекат

Шиконин је добро позната антитуморска супстанца која своју активност испољава тако што изазива апоптозу у канцерским ћелијама, инхибише пролиферацију ћелија и испољава антиангиогенетски ефекат. Антитуморски ефекти шиконина су описани у различитим туморима укључујући леукемију (90, 146) и Буркитов лимфом (147). Ранија истраживања показују да екстракти корена (61) и неколико деривата шиконина који су изоловани из ендемске биљке Балканског полуострва, *Onosma visianii*, испољавају антитуморске ефекте *in vitro* на неколико туморских ћелијских линија (148), али и добро везују хумани албумин (149), што имплицира да се могу ефикасно транспортовати серумским албумином и да могу да испоље и антитуморске ефекте *in vivo*. Етнофармаколошка употреба *Onosma visianii* може се оправдати присуством ових нафтохинона у различитим деловима ове биљке (150).

У овој студији, потврдили смо да су два деривата шиконина, *isobutyrylshikonin* и α -*methylbutyrylshikonin*, значајно смањили вијабилност, супримирали ћелијску пролиферацију и индуковали апоптотску смрт у BCL1 ћелијама на дозно зависан начин (Графикони 5-8, Табеле 3 и 4). Овај налаз је у складу са налазима из претходних испитивања нафтохинона изолованих из *Onosma visianii* где је показано да је *isobutyrylshikonin* значајно редуковао вијабилност ћелија хуманог колоректалног карцинома, HCT116, док оба деривата утичу на вијабилност хуманих ћелија рака дојке MDA-MB-231 (148). Међутим, до данас су антитуморски ефекти ових једињења *in vivo* и механистички аспекти њихове активности неистражени. У овој студији смо такође показали да је „терапеутска” примена *isobutyrylshikonin*-а и α -*methylbutyrylshikonin*-а код мишева са леукемијом индукованом интравенском апликацијом BCL1 ћелија праћена праћена значајним смањењем заступљености леукемијских BCL1 ћелија у периферној крви (Графикон 18А) и слезини (Графикон 18Б) третираних мишева што указује да ови деривати шиконина испољавају и антитуморску активност *in vivo*. Такође, важно запажање

је да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* смањују проценат леукемијских ћелија у слезини мишева скоро једнако ефикасно као циклофосфамид (Графикон 18Б).

Поред резистенције на хемотерапеутике, главни проблеми који су удружени са применом одобрених антиканцерских лекова су бројни нежељени токсички ефекти. Третман алкилирајућим агенсом, циклофосфамидом, повезан је са нефротоксичношћу и хепатотоксичношћу (151,152). Резултати ове студије показују да се *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* у примењени у концентрацији од 4 mg/kg која остварује терапијски ефекат добро толеришу *in vivo* (Графикон 18В).

5.2. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* изоловани из *Onosma visianii* индукују апоптотску смрт BCL1 и JVM-13 ћелија

Обзиром на чињеницу да је неколико претходних студија открило да различити шиконини изазивају апоптотску смрт у третираним ћелијама (84-88), испитивана је способност два деривата шиконина селектована на основу најбоље цитотоксичности детектоване МТТ тестом, *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а, да индукују апоптозу BCL1 ћелија. Оба деривата шиконина који индукују значајан цитотоксички ефекат, индукују апоптотску смрт у третираним BCL1 ћелијама (Графикон 8). Већина BCL1 ћелија је 24 сата након третмана са обе дозе (1μg/ml и 2μg/ml) *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а била у касној фази апоптотозе, Ann V+PI+ (Графикон 8) што указује да ови деривати веома брзо индукују проапоптотске ефекте. Такође је детектован и значајно већи проценат и BCL1 и JVM-13 ћелија које експримирају проапоптотски молекул Ноха (Графикони 9Б, 11Б) након третмана *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом, а имунофлуоресценцом је детектована и већа експресија молекула који играју важну улогу у апоптотској ћелијској смрти, Вах и активирне каспазе 3 (153) у BCL1 ћелијама третираним *α-methylbutyrylshikonin*-ом (Графикон 12А). У складу са овим налазима показано је и да третман *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом, повећава ниво mRNA Вах-а и каспазе-3 (Графикон 12Б). Раније је неколико студија показало да шиконини изазивају значајно смањење Bcl-2 а повећавају експресију Вах-а, што је праћено појачаном активношћу каспазе 3 и индукцијом апоптотске смрти ћелија (154, 155). У складу са претходним налазима да шиконини индукују апоптозу ћелија хуманог колоректалног карцинома, SW620 и HCT116, која зависи од каспазе 3, (156), и да *isobutyrylshikonin* индукује активацију каспазе и апоптозу ћелија оралног сквамозелуларног карцинома у усној шупљини (157) и наши резултати имплицирају да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* индукују апоптозу у BCL1 ћелијама која зависи од каспазе 3.

5.3. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* изоловани из *Onosma visianii* делују антипролиферативно на BCL1 и JVM-13 ћелије

Недавна студија је показала да шиконини могу да супримирају пролиферацију ћелија заустављањем ћелија у G0/G1 или G2/M фази ћелијског циклуса (158). Узроци овог прекида могу бити појачана регулација инхибитора циклин зависних киназа p16, p21 и p27, као и смањење експресије циклина (114, 159-162). У овој студији је показано да је третман BCL1 ћелија *α-methylbutyrylshikonin*-ом праћен повећањем процента ћелија које се налазе у

G1 фази ћелијског циклуса (Графикон 14А). Циклин D3 се везује за CDK4 и CDK6 и има улогу иницијалног активатора G1 фазе ћелијског циклуса (160). У складу са овим и у складу са детектованим повећањем процента BCL1 третираних *α-methylbutyrylshikonin*-ом у G1 фази ћелијског циклуса је и налаз смањеног нивоа иРНК за циклин D3 у BCL1 ћелијама (Графикон 15В) као и налаз значајно већег процента третираних ћелија које експримирају инхибитор комплекса циклина D и CDK4/CDK6, p16 (114), универзални инхибитор циклин зависних киназа, p21 (161), и инхибитор комплекса циклина E и CDK2, циклина A и CDK2 и циклина D и CDK4, p27 (114, 162) (Графикон 16).

Ki67 је протеин који се везује за ДНК и у директној је корелацији са пролиферацијом ћелија, експримирају га ћелије у пролиферацији, али не и мирне ћелије (163). У овој студији је показано да *α-methylbutyrylshikonin* значајно смањује проценат BCL1 и JVM-13 ћелија које експримирају Ki67 (Графикони 13А, 13Б) и смањује експресију овог молекула у BCL1 и JVM-13 ћелијама (Графикон 13В), али такође значајно смањује проценат BCL1 ћелија у S фази ћелијског циклуса (Графикон 14А). Узимајући у обзир ове резултате, може се претпоставити да *α-methylbutyrylshikonin* инхибира пролиферацију BCL1 и JVM-13 ћелија заустављањем ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса. BCL1 ћелије третиране *isobutyrylshikonin*-ом су се у већем проценту налазиле у G2/M фази ћелијског циклуса, имале су мању експресију циклина D3 и у већем проценту су експримирале p16 у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикони 14А, 15В, 16). Раније је показано да ниске дозе UV зрачења изазивају заустављање ћелијског циклуса у G2 фази, што је праћено повећаном експресијом p16 који остварују везе веће јачине са CDK4 и CDK6 и инхибира комплекс циклин D3 и CDK4 који се иначе активира у касној S и раној G2 фази ћелијског циклуса (164). Наш налаз о мањој експресији циклина D3, већој експресији p16 и непромењеној експресији p21 и p27 (Графикони 15В, 15Д) је у складу са овим налазом. Такође, раније је показано да децитабин, лек који инхибира синтезу нуклеинских киселина, у ћелијским линијама хуманог мијелома и у лимфобластним ћелијским линијама индукује заустављање ћелијског циклуса у G1 и G2/M фазама у зависности од дозе, и да је заустављање ћелијског циклуса у G2 фази независно од активности CDK инхибитора (165). Заустављање BCL1 ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса изазвано различитим дериватима шиконина како је показано у овој студији може да објасни раније пријављене различите ефекте различитих екстраката корена (ацетона или хлороформа) биљке *Onosma visianii* на прогресију ћелијског циклуса, пошто различито добијени екстракти могу да садрже различит проценат активних компоненти (148).

5.4. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* инхибирају експресију pSTAT3 и гена чију експресију регулише STAT3

Трансдуктор сигнала и активатор молекула транскрипције 3 (STAT3) је сигнални молекул који је прекомерно експримиран у многим туморима (166). У ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије STAT3 је конститутивно фосфорилисан и одговоран је за појачано преживљавање CLL ћелија (29), што указује да је његова инхибиција једна од терапијских опција за оболеле од CLL. Резултати *in vitro* студија показују да инхибиција STAT3 сигналног пута повећава однос Вах/Bcl-2 што изазива апоптозу туморских ћелија (167). Такође, STAT3 игра кључну улогу у прелазу G1 у S фазу ћелијског циклуса регулацијом циклина D1, D2, D3 и A, и Cdc25A и истовременом нисходном регулацијом p21 и p27 (168, 169). У овој студији је показано да излагање BCL1 и JVM-13 ћелија *isobutyrylshikonin*-у и

α-methylbutyrylshikonin-у значајно смањује проценат ћелија које експримирају фосфорилисани STAT3 (Графикони 17А, 17Б). Смањена експресија фосфорилисаног STAT3 у третираним леукемијским ћелијама праћена је повећаном експресијом Вах и повећаном апоптозом BCL1 ћелија (Графикон графикони 17А, 12Б, 7), смањеном експресијом циклина D3 и повећаном експресијом инхибитора циклин зависних киназа (Графикони 15В, 15Г, 16) што је у сагласности са резултатима претходних студија (167-169).

Недавно је показано да инхибитор JAK2, AG490, изазива дефосфорилацију STAT3 и појачава цитотоксичку активност конвенционалних хемотерапеутика у леукемијским ћелијама (144). Како би се додатно потврдила веза између смањења експресије фосфорилисаног STAT3 и појачане смрти BCL1 ћелија, ове ћелије су третиране *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом заједно са инхибитором JAK2, AG490. Као што је приказано на Графикону 17Д примећено је значајно смањење вијабилних BCL1 ћелија које су истовремено третиране са AG490 и *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом у поређењу са самим третманом дериватима шиконина, што подржава хипотезу да је цитотоксична активност *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а детектована у BCL1 ћелијама барем делимично посредована регулацијом активности STAT3 сигнализације.

NANOG, Oct4, Sox2 и c-Мус су фактори транскрипције експримирани у ембрионалним матичним ћелијама (126, 127, 170). Аберантна, повећана, експресија NANOG, Oct4, Sox2 и c-Мус детектована је у канцерским матичним ћелијама неколико различитих тумора (126, 170, 171). Ова три молекула су такође продукти гена чију експресију у канцерским ћелијама регулише STAT3 (126, 170, 171) и повезани су са матичношћу ћелија хроничне лимфоцитне леукемије (172). Резултати ове студије показују да третман леукемијских ћелија испитиваним дериватима шиконина значајно смањује ниво иРНК за NANOG, Oct4 и c-Мус у BCL1 ћелијама (Графикон 17В) и ниво иРНК за NANOG, Oct4, Sox2 и c-Мус у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 17Г). Корелација смањеног процента BCL1 и JVM-13 ћелија које експримирају Y705 фосфо-STAT3 (Графикон 17А, 17Б) и смањена експресија NANOG, Oct4, Sox2 и c-Мус (ниво иРНК) (Графикон 17В, 17Г) након третмана *isobutyrylshikonin*-ом и *α-methylbutyrylshikonin*-ом је у складу са резултатима претходне студије у којој је показано да је инхибиција фосфорилације STAT3, удружена са смањеном експресијом Oct-4 и c-Мус у ћелијама карцинома дојке (145).

Сумарно, резултати ове студије показују значајан антитуморски ефекат *isobutyrylshikonin*-а и *α-methylbutyrylshikonin*-а на ћелије хроничне лимфоцитне леукемије и В пролимфоцитне леукемије. Овај ефекат је постигнут смањењем фосфорилације и сигнализације STAT3 молекула и последичном индукцијом апоптотске смрти ових леукемијских ћелија, инхибицијом ћелијске пролиферације и атенуацијом матичности леукемијских ћелија. Ови резултати указују на значај даљих испитивања деривата шиконина као могућих нових антиканцерских агенаса или као помоћних лекова.

6. Закључци

Деривати шиконина изоловани из биљке *Onosma visianii*, *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin*, остварују значајан цитотоксички ефекат на ћелије мишије хроничне лимфоцитне леукемије, BCL1, и хумане В пролимфоцитне леукемије, JVM-13. Ови деривати шиконина остварују значајан антипролиферативни ефекат, смањују активност STAT3 сигналног пута и индукују апоптотску смрт ћелија CLL и B-PLL. И *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* остварују значајан антитуморски ефекат *in vivo*, значајно смањујући проценат леукемијских лимфоцита у периферној крви и слезини третираних мишева, без пратећих значајних токсичних ефеката.

Закључак проистиче из следећих експерименталних налаза:

1. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* значајно смањују вијабилност BCL1 и JVM-13 ћелија.
2. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* смањују експресију антиапоптотских молекула Bcl-2 и MCL1, а повећавају експресију проапоптотских молекула Bax и Noxa и активне форме каспазе 3 што је праћено значајном апоптозом BCL1 и JVM-13 ћелија.
3. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* остварују антипролиферативни ефекат на леукемијске лимфоците. Мања експресија Ki-67 молекула и циклина D3, у BCL1 и JVM-13 ћелијама и мањи проценат ових ћелија у S фази ћелијског циклуса, а већа експресија инхибитора циклин зависних киназа p16, p21 и p27 се детектује у ћелијама третираним дериватима шиконина.
4. Мањи проценат фосфорилисаног STAT3 молекула и смањена експресија молекула чију експресију регулише STAT3, c-Myc, циклина D3, NANOG и Sox2 (ниво РНК), детектују се у BCL1 и JVM-13 ћелијама третираним дериватима шиконина што указује да *isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* инхибирају STAT3 сигнализацију у леукемијским ћелијама.
5. *Isobutyrylshikonin* и *α-methylbutyrylshikonin* значајно смањују заступљеност CD5+CD19+ леукемијских ћелија у периферној крви и слезини у мишијем моделу CLL, без испољавања значајне токсичности.

7. Скраћенице

CLL - *engl. chronic lymphocytic leukemia*, превод: хронична лимфоцитна леукемија
CD - *engl. cluster of differentiation*, превод: кластер диференцијације
miRNK - *engl. micro-ribonucleic acid*, превод: микро-рибонуклеинска киселина
NF-κB - *engl. Nuclear factor kappa B-light-chain-enhancer of activated B cells*, превод: нуклеарни фактор капа B-лаког ланца појачивач активираних B ћелија
BCR - *engl. B cell receptor*, превод: B ћелијски рецептор
mTOR – *engl. Mammalian target of rapamycin*, превод: циљни рецептор за рапамицин код сисара
ERK – *енгл. Extracellular signal–regulated kinase*, превод: екстрацелуларним сигналом регулисана киназа
STAT3 - *engl. Signal transducer and activator of transcription 3*, превод: сигнални преносилац и активатор транскрипције 3
ORR - *engl. overall response rate*, превод: укупни одговор
CR - *engl. complete response*, превод: комплетни одговор
B-ПЛЛ - B пролимфоцитна леукемија
PR - *engl. partial remission*, превод: парцијална ремисија
PFS - *engl. progression free survival*, превод: време до прогресије
TNF - *engl. tumornecrosis factor*, превод: фактор некрозе тумора
IL - *engl. interleukin*, превод: интерлеукин
MIC - *engl. minimal inhibitory concentration*, превод: минимална инхибиторна концентрација
JNK - *engl. c-Jun-N-terminal kinase*, превод: c-Jun-N терминална киназа
МАРК - *engl. mitogen-activated protein kinase*, превод: митогеном активирана протеин киназа
AIF - *engl. apoptosis inducing factor*), превод: фактор који индукује апоптозу
Endo G - *engl. endonuclease G*, превод: ендонуклеаза G
CAD - *engl. caspase-activated denase*, превод: каспазом активирана дееназа
МОМР - *engl. mitochondrial outer membrane permiabilization*, превод: пермеабилизације митохондријалне спољашње мембране
G1 - *engl. gap phase 1*
S - *engl. synthesis*, превод: синтеза
G2 - *engl. gap phase 2*
Cdk - *engl. cyclin dependent kinases*, превод: циклин зависне киназе
ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина
G-CSF - *engl. granulocyte-colony stimulating factor*, превод: стимулишући фактор гранулоцитних колонија
EGF - *engl. epidermal growth factor*, превод: епидермални фактор раста
PDGF - *engl. platelet-derived growth factor*, превод: фактор раста пореклом из тромбоцита
ЈАК2 - *engl. Janus kinasa 2*, превод: јанус киназа
VEGF - *engl. vascular endothelial growth factor*, превод: васкуларни ендотелијални фактор раста
FBS – *engl. fetal bovine serum*, превод: фетални говеђи серум
DMSO – диметилсулфоксид

PBS – *engl. Phosphate Buffer Saline*, превод: раствор фосфатног пуфера

8. 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. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, et al. ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2021;32(1):23-33.
3. 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.
4. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18(4):783-94.
5. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005;115(3):755-64.
6. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-74.
7. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
8. Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, Janossy G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1982;155(2):623-8.
9. Zhang S, Kipps TJ. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:103-18.
10. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*. 2002;100(7):2289-90.
11. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*. 2002;100(2):635-639.
12. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(6):575-83.
13. Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood*. 1997;89(11):4153-60.

14. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1515-25.
15. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003;101(12): 4944–51.
16. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-6.
17. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;139(5):709-16.
18. 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.
19. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of *NOTCH1* mutational activation. *J. Exp. Med.* 2011;208:1389-1401.
20. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475:101-105.
21. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor *SF3B1* gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2012;44:47-52.
22. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, et al. *SF3B1* and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:2497-2506.
23. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, et al. Mutations of the *SF3B1* splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine refractoriness. *Blood.* 2011;118:6904-6908.
24. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, et al. Mutations of *NOTCH1* are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119:521-529.
25. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, et al. Disruption of *BIRC3* associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119:2854–2862.
26. Rothenberg EV. T cell lineage commitment: identity and renunciation. *J. Immunol.* 2011;186:6649–6655.
27. Santos MA, Sarmiento LM, Rebelo M, Doce AA, Maillard I, et al. Notch1 engagement by Deltalike-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104:15454–15459.
28. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* 2013;34(12):592-601.

29. Rozovski U, Wu JY, Harris DM, et al. Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2014;123(24):3797-802.
30. Михаљевић Б, Антић Д, Фекете МД. Хронична лимфоцитна леукемија/лимфом малих ћелија. у, Марисављевић Д, Михаљевић Б, Елезовић И, Поповић С, Вуковић НС, Вујић Д, Јањић Д, Миленковић П, Мостарица М, Богдановић Г. Клиничка хематологија, Београд, Завод за уџбенике, 2012:535-547.
31. Hallek M1, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745-2760.
32. Strati P, Jain N, O'Brien S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(5):651-664.
33. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4079-4088.
34. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, et al; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, openlabel, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-1174.
35. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, et al; German CLL Study Group (GCLLSG). First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, openlabel, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):928-942.
36. Galton DA, Goldman JM, Wiltshaw E, Catovsky D, Henry K, Goldenberg GJ. Prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1974;27(1):7-23.
37. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
38. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
39. Del Giudice I, Davis Z, Matutes E, Osuji N, Parry-Jones N, et al. IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia*. 2006;20(7):1231-7.
40. Davi F, Maloum K, Michel A, Pritsch O, Magnac C, et al. High frequency of somatic mutations in the VH genes expressed in prolymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88(10):3953-61.
41. Lens D, De Schouwer PJ, Hamoudi RA, Abdul-Rauf M, Farahat N, et al. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 1997;89(6):2015-23.

42. Lens D, Matutes E, Catovsky D, Coignet LJ. Frequent deletions at 11q23 and 13q14 in B cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia*. 2000;14(3):427–30.
43. Flatley E, Chen AI, Zhao X, Jaffe ES, Dunlap JB et al. Aberrations of MYC are a common event in B-cell prolymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(3):347-54.
44. Absi A, Hsi E, Kalaycio M. Prolymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2005 May;6(3):197-208.
45. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol*. 1989;42(6):567–84.
46. Melo JV, Catovsky D, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *Br J Haematol*. 1986;63(2):377–87.
47. Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, Mecucci C, Billiet J, et al. Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol*. 1997;97(2):383–91.
48. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016;174(5):767-75.
49. Wong K, So C, Chan JK. Nucleolated variant of mantle cell lymphoma with leukemic manifestations mimicking prolymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(2):246–51.
50. Ruchlemer R, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Attolico I, Wotherspoon AC, et al. B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;125(3):330–6.
51. Collignon A1, Wanquet A, Maitre E2, Cornet E2, Troussard X2, Aurrant-Schleinitz T3. Prolymphocytic Leukemia: New Insights in Diagnosis and in Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2017;19(4):29.
52. Shvidel L, Shtalrid M, Bassous L, Klepfish A, Vorst E, Berrebi A. B-cell prolymphocytic leukemia: a survey of 35 patients emphasizing heterogeneity, prognostic factors and evidence for a group with an indolent course. *Leuk Lymphoma*. 1999;33(1-2):169–79.
53. Döhner H, Ho AD, Thaler J, Stryckmans P, Sonneveld P, de Witte T, et al. Pentostatin in prolymphocytic leukemia: phase II trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Cooperative Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(8):658–62.
54. Saven A, Lee T, Schlutz M, Jacobs A, Ellison D, Longmire R, et al. Major activity of cladribine in patients with de novo B-cell prolymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1997;15(1):37–43.
55. Chow KU, Kim S-Z, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Stilgenbauer S, et al. Clinical efficacy of immunochemotherapy with fludarabine, epirubicin and rituximab in the treatment for chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol*. 2011;87(5):426–33.

56. Tempescul A, Feuerbach J, Ianotto JC, Dalbies F, Marion V, et al. A combination therapy with fludarabine, mitoxantrone and rituximab induces complete immunophenotypical remission in B-cell prolymphocytic leukaemia. *Ann Hematol.* 2009;88(1):85-8.
57. Dearden C. Management of prolymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:361-7.
58. Dearden C. How I treat prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(3):538–51.
59. Chaar BT, Petruska PJ. Complete response to alemtuzumab in a patient with B prolymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 2007;82(5):417.
60. Eyre TA, Fox CP, Shankara P, Went R, Schuh AH. Idelalisib-Rituximab induces clinical remissions in patients with TP53 disrupted B cell prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2017;177(3):486-491.
61. Gordon MJ, Raess PW, Young K, Spurgeon SEF, Danilov AV. Ibrutinib is an effective treatment for B-cell prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2017;179(3):501-503.
62. Shcherbanovskii LR. *Onosma visianii*-A new source of shikonin. *Chem Nat Compd.* 1971;7:491-1.
63. Vukic MD, Vukovic NL, Djelic GT, Popovic SL, Zaric MM et al. Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from *Onosma visianii* Clem. *EXCLI J.* 2017;16:73-88.
64. Andújar I, Ríos JL, Giner RM, Recio MC. Pharmacological properties of shikonin - a review of literature since 2002. *Planta Med.* 2013 Dec;79(18):1685-97.
65. Landa P, Kutil Z, Temml V, Vuorinen A, Malik J, et al. Redox and non-redox mechanism of in vitro cyclooxygenase inhibition by natural quinones. *Planta Med.* 2012; 78:326–333.
66. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor α promoter in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279:5877–5885.
67. Dai Q, Fang J, Zhang FS. Dual role of shikonin in early and late stages of collagen type II arthritis. *Mol Biol Rep.* 2009;36:1597–1604.
68. Kim YO, Hong SJ, Yim SV. The efficacy of shikonin on cartilage protection in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2010;14:199–204.
69. Andújar I, Ríos JL, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Recio MC. Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:271606
70. Wang Z, Liu T, Gan L, Wang T, Yuan X, et al. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *Eur J Pharmacol.* 2010; 643:211–217.
71. Wang S, Zhu Y, Qiu R. Shikonin protects H9C2 cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through activation of PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;104:712-717.
72. Noundou XS, Krause RW, van Vuuren SF, Ndinteh DT, Olivier DK. Antibacterial effects of *Alchornea cordifolia* (Schumacher and Thonn.) Müll. Arg extracts and compounds on

- gastrointestinal, skin, respiratory and urinary tract pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2016;179:76–82.
73. Shen CC, Syu WJ, Li SY, Lin CH, Lee GH, Sun CM. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *J Nat Prod.* 2002;65:1857–1862.
 74. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999;38:270–301.
 75. Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol Pharm Bull.* 2002;25: 669–670.
 76. Li HM, Tang YL, Zhang ZH, Liu CJ, Li HZ, et al. Compounds from *Arnebia euchroma* and their related anti-HCV and antibacterial activities. *Planta Med.* 2012; 78:39–45.
 77. Chen X, Yang L, Zhang N, Turpin JA, Buckheit RW, et al. Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2810–2816.
 78. Min BS, Miyashiro H, Hattori M. Inhibitory effects of quinones on RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *Phytother Res.* 2002; 16:S57–S62.
 79. Gao H, Liu L, Qu ZY, Wei FX, Wang SQ, et al. Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2011;34:197–202.
 80. Papageorgiou VP1, Assimopoulou AN, Ballis AC. Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents. *Curr Med Chem.* 2008;15(30):3248-67.
 81. Rajasekar S, Park da J, Park C, Park S, Park YH, et al. In vitro and in vivo anticancer effects of *Lithospermum erythrorhizon* extract on B16F10 murine melanoma. *J Ethnopharmacol* 2012;144:335–345.
 82. Kretschmer N, Rinner B, Deutsch AJ, Lohberger B, Knausz H, et al. Naphthoquinones from *Onosma paniculata* induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. *J Nat Prod* 2012;75:865–869.
 83. Cho SC, Choi BY. Acetylshikonin Inhibits Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Proliferation by Suppressing the NF- κ B Activity. *Biomol Ther (Seoul).* 2015;23(5):428-33.
 84. Yang H, Zhou P, Huang H, Chen D, Ma N, et al. Shikonin exerts antitumor activity via proteasome inhibition and cell death induction in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2009 May 15;124(10):2450-9.
 85. Chang IC, Huang YJ, Chiang T, Yeh CW, Hsu LS. Shikonin induces apoptosis through reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase pathway in osteosarcoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(5):816-24.
 86. Kim DJ, Lee JH, Park HR, Choi YW. Acetylshikonin inhibits growth of oral squamous cell carcinoma by inducing apoptosis. *Arch Oral Biol.* 2016;70:149-157.
 87. Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, Hu X. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene.* 2011;30:4297–4306.

88. Lu D, Qian J, Li W, Feng Q, Pan S, Zhang S. β -hydroxyisovaleryl-shikonin induces human cervical cancer cell apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling. *Oncol Lett.* 2015;10(6):3434-3442.
89. Zhao Q, Assimopoulou AN, Klauck SM, Damianakos H, Chinou I, et al. Inhibition of c-MYC with involvement of ERK/JNK/MAPK and AKT pathways as a novel mechanism for shikonin and its derivatives in killing leukemia cells. *Oncotarget.* 2015;6(36):38934-51.
90. Mao X, Yu CR, Li WH, Li WX. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. *Cell Res.* 2008;18(8):879-88.
91. Trivedi R, Müller GA, Rathore MS, Mishra DP, Dihazi H. Anti-Leukemic Activity of Shikonin: Role of ERP57 in Shikonin Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(2):604-16.
92. Xiong W, Luo G, Zhou L, Zeng Y, Yang W. In vitro and in vivo antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston (Ruanzicao) cell suspension cultures. *Chin Med.* 2009;4:14.
93. Rajasekar S1, Park DJ, Park C, Park S, Park YH, et al. In vitro and in vivo anticancer effects of *Lithospermum erythrorhizon* extract on B16F10 murine melanoma. *J Ethnopharmacol.* 2012;144(2):335-45.
94. Piao JL, Cui ZG, Furusawa Y, Ahmed K, Rehman MU, et al. The molecular mechanisms and gene expression profiling for shikonin-induced apoptotic and necroptotic cell death in U937 cells. *Chem Biol Interact.* 2013;205(2):119-27.
95. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differ.* 2009;16(1):3-11.
96. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.
97. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487-98.
98. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology.* 2013; 14(1): 32.
99. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2015;1219: 1-9.
100. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324-37.
101. Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(1):12-20.
102. Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem.* 2014; 115: 632-640.
103. Yoshihide T, Shigeomi S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis.* 2007; 12: 835-840.

104. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 1): 1-9.
105. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death & Differentiation.* 2012; 19(5): 735-742.
106. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39:295-312.
107. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 1995;11:211-219.
108. Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell.* 1998;9(9):2545-2560.
109. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:222-231.
110. Elledge SJ, Harper JW. The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1377:M61-M70.
111. Ford HL, Pardee AB. The S-phase: Beginning, middle, and end—A perspective. *J Cell Biochem.* 1998; 30(suppl 31): 1-7.
112. Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene.* 1995; 10(2): 229-236.
113. Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16(3): 311-321.
114. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13(12):1501-1512,
115. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9408-9421.
116. Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F, Rahim F. STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing. *Cell J.* 2015;17(3):395–411.
117. Demaria M, Camporeale A, Poli V. STAT3 and metabolism: How many ways to use a single molecule? *Int. J. Cancer.* 2014;135(9):1997–2003.
118. Rane S.G, Reddy E.P. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* 2002;21(21):3334–3358.
119. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, et al. Targeted disruption of the mouse STAT3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94(8):3801–3804.
120. Hutchins A.P, Diez D, Miranda-Saavedra D. Genomic and computational approaches to dissect the mechanisms of STAT3's universal and cell type-specific functions. *Jakstat.* 2013;2(4):e25097.
121. Mali S.B. Review of STAT3 (signal transducers and activators of transcription) in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2015;51(6):565–569.

122. Andres R.M, Hald A, Johansen C, Kragballe K, Iversen L. Studies of Jak/STAT3 expression and signalling in psoriasis identifies STAT3-Ser727 phosphorylation as a modulator of transcriptional activity. *Exp. Dermatol.* 2013;22(5):323–328.
123. Shi X, Zhang H, Paddon H, Lee G, Cao X, Pelech S. Phosphorylation of STAT3 serine-727 by cyclin-dependent kinase 1 is critical for nocodazole-induced mitotic arrest. *Biochemistry.* 2006;45(18):5857–5867.
124. Carpenter RL1, Lo HW2. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers (Basel).* 2014;6(2):897-925.
125. Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, et al. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol.* 2005;25(17):7432-40.
126. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, et al. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tc11, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anat Cell Biol.* 2014;47(1):1-11.
127. Kidder BL, Yang J, Palmer S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS One.* 2008;3(12):e3932.
128. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med.* 1999;189(1):63-73.
129. Munoz J, Dhillon N, Janku F, Watowich SS, Hong DS. STAT3 inhibitors: Finding a home in lymphoma and leukemia. *Oncologist.* 2014;19(5):536–544.
130. Dong S, Chen SJ, Tweardy DJ. Cross-talk between retinoic acid and STAT3 signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma. Leuk Lymphoma.* 2003;44(12):2023-9.
131. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse J.F, Capiod J.C, et al. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood.* 1996;87(5):1692–1697.
132. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J. Clin. Investig.* 1997;100(12):3140–3148.
133. Rozovski U, Wu JY, Harris DM, Liu Z, Li P, et al. Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2014;123(24):3797-802.
134. Garcia J.F, Camacho F.I, Morente M, Fraga M, Montalban C, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: Analyses using tissue microarrays. *Blood.* 2003;101(2):681–689.
135. Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, et al. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood.* 2001;98(3):762–770.
136. Zhang Q, Yang Z, Jia Z, Liu C, Guo C, et al. ISL-1 is overexpressed in Non-Hodgkin lymphoma and promotes lymphoma cell proliferation by forming a p-STAT3/pc-JUN/ISL-1 complex. *Mol. Cancer.* 2014;13:181.

137. Hu J, Hu WX. Targeting signaling pathways in multiple myeloma: Pathogenesis and implication for treatments. *Cancer Lett.* 2018;414:214–221.
138. Ramakrishnan V, Kimlinger T, Haug J, Timm M, Wellik L, et al. TG101209, a novel JAK2 inhibitor, has significant in vitro activity in multiple myeloma and displays preferential cytotoxicity for CD45+ myeloma cells. *Am. J. Hematol.* 2010;85(9):675–686.
139. Slavin S, Strober S. Spontaneous murine B-cell leukaemia. *Nature.* 1978;272(5654):624-6.
140. Krolick KA, Isakson PC, Uhr JW, Vitetta ES. Murine B cell leukemia (BCL1): organ distribution and kinetics of growth as determined by fluorescence analysis with an anti-idiotypic antibody. *J Immunol.* 1979;123(5):1928-35.
141. Koganei S, Ito M, Yamamoto K, Matsumoto N. B-1a cell origin of the murine B lymphoma line BCL1 characterized by surface markers and bacterial reactivity of its surface IgM. *Immunol Lett.* 2005;98(2):232-44.
142. Melo JV, Foroni L, Brito-Babapulle V, Luzzatto L, Catovsky D. The establishment of cell lines from chronic B cell leukaemias: evidence of leukaemic origin by karyotypic abnormalities and Ig gene rearrangement. *Clin Exp Immunol.* 1988;73(1):23-8.
143. Molyneux G, Andrews M, Sones W, York M, Barnett A, et al. Haemotoxicity of busulphan, doxorubicin, cisplatin and cyclophosphamide in the female BALB/c mouse using a brief regimen of drug administration. *Cell Biol Toxicol.* 2011;27(1):13-40.
144. Severin F, Frezzato F, Visentin A, Martini V, Trimarco V, et al. In Chronic Lymphocytic Leukemia the JAK2/STAT3 Pathway Is Constitutively Activated and Its Inhibition Leads to CLL Cell Death Unaffected by the Protective Bone Marrow Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2019;11(12):1939.
145. Cheng CC, Shi LH, Wang XJ, Wang SX, Wan XQ, et al. Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *Int J Oncol.* 2018;53(1):339-348.
146. Duan D, Zhang, B, Yao, J, Liu, Y, Fang, J. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;70:182–193.
147. Ni F, Huang X, Chen Z, Qian W, Tong X. Shikonin exerts antitumor activity in Burkitt's lymphoma by inhibiting C-MYC and PI3K/AKT/mTOR pathway and acts synergistically with doxorubicin. *Sci Rep.* 2018;8(1):3317.
148. Vukic MD, Vukovic NL, Obradovic AD, Popovic SL, Zaric MM, et al. Naphthoquinone rich *Onosma visianii* Clem (Boraginaceae) root extracts induce apoptosis and cell cycle arrest in HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines. *Nat Prod Res.* 2018;32(22):2712-2716.
149. Vukic MD, Vukovic NL, Obradovic A, Matic M, Djukic M, Avdovic E. Redox status, DNA and HSA binding study of naturally occurring naphthoquinone derivatives. *EXCLI J.* 2020;19:48-70.
150. Sezik E, Yeşilada E, Tabata M, Honda G, Takaishi Y, Fujita T, et al. Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in east anatolia;Erzurum, Erzincan, Agri, Kars, Igdird provinces. *Econ Bot.* 1997;51:195–211.
151. Rehman MU, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Mol Cell Biochem.* 2012;365(1-2):119-127.

152. Mok CC, Wong WM, Shek TW, Ho CT, Lau CS, Lai CL. Cumulative hepatotoxicity induced by continuous low-dose cyclophosphamide therapy. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:845–846.
153. Henkels KM, Turchi JJ. Cisplatin-induced Apoptosis Proceeds by Caspase-3-dependent and -independent Pathways in Cisplatin-resistant and -sensitive Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 1999;59:3077-83.
154. Gara RK, Srivastava VK, Duggal S, Bagga JK, Bhatt M et al. Shikonin selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic pathway. *J Biomed Sci.* 2015;22:26.
155. Jia L, Zhu Z, Li H, Li Y. Shikonin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis in NCI-N87 cells via inhibition of PI3K/AKT signal pathway. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):2662-2669.
156. Zhang N, Peng F, Wang Y, Yang L, Wu F, et al. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis. *Int J Biol Sci.* 2020;16(1):147-161.
157. Park DG, Kim DJ, Woo BH, Kim HJ, Choi YW, Park HR. Isobutyrylshikonin has a potentially stronger cytotoxic effect in oral cancer cells than its analogue shikonin in vitro. *Arch Oral Biol.* 2020;116:104774.
158. Min R, Tong J, Wenjun Y, Wenhui D, Xiaojian Z, et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in human oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cell lines by Shikonin was partly through the inactivation of NF-kappaB pathway. *Phytother Res.* 2008;22(3):407-15.
159. Zhu Y, Zhong Y, Long X, Zhu Z, Zhou Y. Deoxyshikonin isolated from *Arnebia euchroma* inhibits colorectal cancer by down-regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Pharm Biol.* 2019;57(1):412-423
160. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* 2005;24:2909-15.
161. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993;366:701-4.
162. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 2003;13:65-70.
163. Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Lee JT, Nathanson KL, et al. Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels. *Br J Cancer.* 2007;96(3):445-449.
164. Gabrielli BG, Sarcevic B, Sinnamon J, Walker G, Castellano M, et al. A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J Biol Chem.* 1999;274(20):13961-13969.
165. Lavelle D, DeSimone J, Hankewych M, Kousnetzova T, Chen YH. Decitabine induces cell cycle arrest at the G1 phase via p21(WAF1) and the G2/M phase via the p38 MAP kinase pathway. *Leuk Res.* 2003;27(11):999-1007.
166. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:798-809.
167. Maryam A, Mehmood T, Yan Q, Li Y, Khan M, Ma T. Proscillaridin A Promotes Oxidative Stress and ER Stress, Inhibits STAT3 Activation, and Induces Apoptosis in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:3853409.
168. Zhou C, Ma J, Su M, Shao D, Zhao et al. Down-regulation of STAT3 induces the apoptosis and G1 cell cycle arrest in esophageal carcinoma ECA109 cells. *Cancer Cell Int.* 2018;18:53.

169. Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, Shirogane T, Nishida K, et al. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 1998;17(22):6670-7.
170. Wang H, Deng J, Ren HY, Jia P, Zhang W et al. STAT3 influences the characteristics of stem cells in cervical carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;14(2):2131-2136
171. Ling X, Arlinghaus RB. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res.* 2005;65:2532-6.
172. Choi MY, Widhopf GF 2nd, Ghia EM, Kidwell RL, Hasan MK, et al. Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):951-959.e3.

БИОГРАФИЈА

Др Жељко Тодоровић је рођен 16.11.1987. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу “Мулутин и Драгиња Тодоровић” у Крагујевцу, а потом је похађао Прву крагујевачку гимназију. 2007. године уписао је Медицински факултет, Универзитета у Крагујевцу који је завршио 2013. године са просечном оценом 9,89. Докторске академске студије уписао је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2013/2014. године изборно подручје Експериментална и клиничка интерна медицина. Од 2013. године до јануара августа 2017. године волонтирао је на Клиници за хематологију КЦ Крагујевац, а од августа 2017 је запошљен на истој клиници. Од децембра 2014. године је запошљен на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, прво као сарадник у настави а потом као истраживач приправник и истраживач сарадник на Катедри за Интерну медицину. Звање специјалисте интерне медицине је стекао на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу маја 2021. године.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Todorovic Z**, Milovanovic J, Arsenijevic D, Vukovic N, Vukic M, Arsenijevic A, Djurdjevic P, Milovanovic M, Arsenijevic N. Shikonin Derivatives from *Onsoma visianii* Decrease Expression of Phosphorylated STAT3 in Leukemia Cells and Exert Antitumor Activity. *Nutrients*. 2021;13(4):1147.
2. Mihaljevic O, Zivancevic-Simonovic S, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, **Todorovic Z**, Grujicic D, Radovic-Jakovljevic M, Tubic J, Markovic A, Paunovic M, Stanojevic-Pirkovic M, Markovic S. Apoptosis and genome instability in children with autoimmune diseases. *Mutagenesis*. 2018 Dec 31;33(5-6):351-357.
3. Ilic M, **Todorovic Z**, Jovanovic M, Ilic I. Burnout Syndrome Among Medical Students at One University in Serbia: Validity and Reliability of the Maslach Burnout Inventory-Student Survey. *Behav Med*. 2017 Oct-Dec;43(4):323-328.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Жељко Тодоровић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

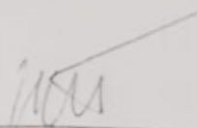
Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *Onosma visianii*
на леукемијским лимфоцитима

која је одбрањена на Факултету медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 12.11.2021. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Жељко Тодоровић

дозвољавам

не дозвољавам

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

Антитуморски ефекти активних принципа изолованих из *Onosma visianii*
на леукемијским лимфоцитима

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

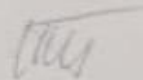
не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 12.11.2021. године,



потпис аутора

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