

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Nevena B. Tišma

**Ispitivanje imunomodulatornog i
citotoksičnog efekta vodenog ekstrakta
bele imele (*Viscum album* L.) *in vitro* i u
pacijentkinja na terapiji antraciklinskim
hemioterapeuticima**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Nevena B. Tišma

**Examination of immunomodulatory and
cytotoxic effects of aqueous extract of
white mistletoe (*Viscum album L.*) *in vitro*
and in patients treated with anthracycline
chemotherapeutics**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

Podaci o mentorima i članovima komisije

Mentori:

dr Biljana Božić

vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Tatjana Srdić-Rajić

viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Članovi komisije:

dr Biljana Božić

vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Tatjana Srdić-Rajić

viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

dr Biljana Drašković Pavlović

docent, Univerzitet odbrane u Beogradu - Medicinski fakultet - VMA

Datum odbrane:

_____2016.

Ova doktorska disertacija urađena je na Odeljenju eksperimentalne onkologije Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Želim da se zahvalim

Dr Tatjani Srdić-Rajić kojoj dugujem neizmernu zahvalnost za sve što je učinila da ovaj naučni rad ugleda svetlost dana. Svojim neiscrpnim znanjem i iskustvom doprinela je osmišljavanju i izvođenju ove doktorske disertacije. Zahvalna sam joj na svemu što sam od nje naučila, na ogromnoj pomoći i podršci.

Dr Biljani Božić na velikom strpljenju, svim sugestijama i savetima kojima je doprinela uobličavanju ove doktorske disertacije.

Dr Biljani Drašković Pavlović na svim korisnim savetima i ispravkama teksta kojima je doprinela uobličavanju ove doktorske disertacije.

Dr Aleksandri Konić-Ristić na nesebičnoj pomoći tokom izvođenja dela eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske disertacije, kao i na neizmernom strpljenju.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije na svim godinama zajedničkog rada, kao i na pruženoj podršci tokom izrade ove disertacije.

Posebno hvala Aleksandru, Emiliji i Nikoli na podršci i strpljenju, kao i mojim pokojnim roditeljima kojima dugujem neizmernu zahvalnost za sve što su učinili za mene tokom svog života.

Ispitivanje imunomodulatornog i citotoksičnog efekta vodenog ekstrakta bele imele (*Viscum album L.*) *in vitro* i u pacijentkinja na terapiji antraciklinskim hemioterapeuticima

Rezime

Uspešnost antitumorske terapije je ograničena pojavom tumorske rezistencije na lekove putem molekularnih mehanizama koji i dalje ostaju nerazjašnjeni. Kako bi se smanjili neželjeni efekti i poboljšala efikasnost standardnih hemioterapija i radioterapija, počeli su da se primenjuju mnogi komplementarni ili alternativni medikamenti. Bela imela (lat. *Viscum album L.*) se tradicionalno koristi u lečenju pojedinih vrsta tumora. Terapijska korist od primene bele imele kada se koristi zajedno sa hemioterapijom ili radioterapijom, odnosno operacijom doprinosi ukupnom poboljšanju kvaliteta života kod pacijenata obolelih od tumora.

Dosadašnja istraživanja na ćelijama u kulturi i na životinjskim modelima, su pokazala da potencijalni mehanizmi delovanja sastojaka bele imele uključuju antitumorsko, antiinflamatorno i imunomodulatorno dejstvo. Uprkos intezivnim ispitivanjima, mehanizam antitumorskog dejstva ekstrakta bele imele je još uvek u velikom obimu nepoznat. Takođe, malo je i naučnih podataka o mehanizmu interakcije bioaktivnih komponenti bele imele i drugih antitumorskih citotoksičnih lekova, koji bi pružili zasnovanost daljem kliničkom ispitivanju.

Cilj ove disertacije je utvrđivanje imunomodulatornog dejstva ekstrakta bele imele na ćelije imunskog sistema u *in vitro* i *in vivo* uslovima, ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakta bele imele *in vitro* i molekularnih mehanizma interakcije bioaktivnih komponenti ekstrakta bele imele sa citotoksičnim agensom iz grupe antraciklina na modelu tumorskih ćelija u kulturi.

Rezultati dobijeni u *in vitro* istraživanjima su pokazali citotoksični i antiproliferativni efekat ekstrakta bele imele, putem indukcije apoptoze tumorskih ćelija unutrašnjim mitohondrijskim putem i indukcijom zastoja u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Kombinovani tretman tumorskih ćelija subterapeutskom koncentracijom doksorubicina i ekstraktom bele imele dovodi do sinergističkog inhibitornog efekta. Apoptotska ćelijska

smrti K562 i MCF 7 ćelija je istovremeno povezana sa smanjenim nakupljanjem ćelija u G₂/M fazi ciklusa, koje se inače dešava pod delovanjem doksorubicina. Eliminacija G₂/M zastoja, praćena povećanjem procenta ćelija u apoptozi, ima za posledicu aktivaciju kaspaze-3 kod K562 ćelija, prekomernu ekspresiju Bax, rani gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala, prekomernu ekspresiju ciklina B1, sniženu ekspresiju ciklina D1, kao i sniženu gensku ekspresiju *p21* i *IGF-1R*. Ekstrakt bele imele je pokazao i značajan inhibicioni efekat na markere aktivacije trombocita u *in vitro* uslovima, na agregaciju trombocita sa monocitima, kao i TNF- α posredovano antitumorsko dejstvo M1 makrofaga.

Rezultati *in vivo* pilot studije nisu pokazali imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele na zastupljenost pojedinih subpopulacija limfocita u perifernoj krvi pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, ali je pokazano poboljšanje kvaliteta života datih pacijentkinja. Iako dizajn studije može da bude ograničen, rezultati pokazuju izvodljivost studije koristeći opisane metode.

U zaključku, naši rezultati ukazuju na to da ekstrakt bele imele dovodi do poboljšanja kvaliteta života pacijentkinja sa karcinomom dojke ako se primeni kao komplementarna terapija, kao i da ekstrakt bele imele može senzibilisati *Bcr-Abl* pozitivne K562 ćelije, kao i MCF7 ćelije na apoptozu pri senescentnim, subapoptotskim koncentracijama doksorubicina. To nadalje znači da ukoliko se ekstrakt bele imele koristi kao komplementarna terapija, moguće je pri znatno nižim, manje toksičnim koncentracijama hemioterapeutika postići željeni efekat na tumorske ćelije, povećati antiproliferativnu aktivnost doksorubicina, suprimirajući terapijom indukovanu senescenciju.

Ključne reči: Bela imela (*Viscum album*), doksorubicin, apoptoza, senescencija, aktivacija trombocita, makrofage, komplementarna terapija imelom, randomizovana klinička studija

Nučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunologija

UDK: 582.728.4:[576.5](0433)

582.728.4:[611.018.52/.01853](0433)

Examination of immunomodulatory and cytotoxic effects of aqueous extract of white mistletoe (*Viscum album L.*) *in vitro* and in patients treated with anthracycline chemotherapeutics

Summary

Success of anticancer treatment has been impeded by resistance to anti-tumor therapy via molecular mechanisms that still remain elusive. To reduce side effects and improve the effectiveness of standard chemoradiation therapy, many complementary or alternative medicines (CAM) have been investigated. Mistletoe (*Viscum album L.*) has been long used as CAM supporting cancer therapy. Therapeutic benefit of mistletoe preparations when utilized along with surgery, chemotherapy or radiotherapy contributes to the overall improvement in the quality of life in cancer patients.

Several lines of evidence have revealed that mistletoe preparations *in vitro* and *in vivo* exert an anti-cancer, anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Despite extensive experimental analyses of their biological properties, many questions regarding the precise mode of action of mistletoe still remain elusive. Also, there is only little information about interactions between mistletoe and anticancer drugs, which would provide validity for further clinical investigations.

The aims of this study are investigation of immunomodulatory effects of mistletoe extracts on immune cells *in vitro* and *in vivo*, examination of cytotoxic effect *in vitro*, as well as molecular mechanisms underlying interactions between mistletoe and anticancer drug from the antraciklenes family on the tumor cells in culture.

Our results from *in vivo* study study have shown cytotoxic and antiproliferative effect of mistletoe extract via induction of apoptosis of cancer cells through intrinsic mitochondrial pathway and induction of G0/G1 arrest. Also, combined treatment of cancer cells with sub-therapeutic concentration of doxorubicine and mistletoe extract led to synergistic inhibitory effect. Increased K562 and MCF7 cells apoptotic death during co-treatment was associated with reduced G2/M accumulation during doxorubicine treatment. The lack of G2/M arrest was accompanied by an increased percentage of apoptotic cells associated with cleavage of caspase-3 in the case of K562 cells, up-regulation of Bax

expression level, early dissipation of mitochondrial membrane potential, up-regulation of cyclin B1, down-regulation of cyclin D1, as well as down-regulation of *p21* and *IGF-1R*. Finally, *in vitro* mistletoe extract showed significant inhibitory effects on both platelet activation and aggregation with monocytes, as well as potential to activate M1 macrophage to produce TNF- α .

In *in vivo* pilot study we reported no immunomodulatory effect of mistletoe extracts on immune cells of patients of breast cancer, but an improvement of quality of life of breast cancer patients was shown. Although the open design may be a limitation, the findings show the feasibility of a confirmatory study using the methods described here.

In conclusion, our results suggest that mistletoe extract improves the quality of life of breast cancer patients if applied as CAM, as well as sensitizes Bcr - Abl positive K562 cells, and MCF7 cells on apoptosis under senescent, subapoptotic concentrations of doxorubicin. This also means that if the white mistletoe extract is used as a complementary therapy, it is possible to by using much lower, less toxic concentrations of chemotherapeutics to achieve the desired effect on tumor cells via increment of the antiproliferative activity of doxorubicin, and suppressing therapy induced senescence.

Key words: White mistletoe (*Viscum album*), doxorubicin, apoptosis, senescence, activation of platelets, macrophages, complementary mistletoe therapy, randomized clinical trial

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunology

UDC number: 582.728.4:[576.5](0433)
582.728.4:[611.018.52/.01853](0433)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Antraciklini	2
1.2. Apoptoza	4
1.2.1. Uloga apoptoze u tumorima	7
1.3. Senescencija	8
1.3.1. Senescencija u tumorima	9
1.4. Trombociti	10
1.4.1. Struktura trombocita	11
1.4.2. Uloga trombocita u patogenezi tumora	13
1.5. Makrofage kao deo tumorskog mikrokruženja	14
1.5.1. Makrofage stimulišu progresiju tumora	16
1.6. Bela imela	18
1.6.1. Aktivne komponente bele imele	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Antitela	23
3.2. Ekstrakt bele imele	24
3.2.1. Bradford-ova metoda	25
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	26
3.3. Čelijske linije	27
3.4. MTT test	28
3.5. Citometrijska analiza ćelija periferne krvi	29
3.6. Citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	30
3.7. Određivanje distribucije ćelija prema različitim tipovima ćelijske smrti	31
3.8. Intraćelijska analiza ciklina	32
3.9. Analiza ulaska/izlaska doksorubicina	33
3.10. Merenje mitohondrijskog membranskog potencijala	34
3.11. β -galaktozidazno bojenje	34
3.12. Test formiranja kolonija	36
3.13. Analiza ekspresije gena metodom Real-time PCR	36
3.14. Citometrijska analiza proteina Bax, Caspasa-3 i p21	37
3.15. Određivanje parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa leukocitima	38
3.15.1. Uzorkovanje krvi	38
3.15.2. Određivanje parametara aktivacije trombocita	39
3.15.3. Određivanje parametara aktivacije trombocita u in vitro eksperimentalnim uslovima	40
3.15.4. Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima	40
3.15.5. Određivanje agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima-in vitro	41
3.16. Određivanje aktivacije monocita u kulturi merenjem produkcije TNF α	42

3.17. Određivanje aktivacije monocita u kokulturi sa trombocitima merenjem produkcije TNF α _____	42
3.18. Određivanje aktivacije monocita u kulturi merenjem nivoa slobodnih kiseoničnih radikala i ekspresije CD11b_____	43
3.18. Protokol kliničke studije_____	43
4. REZULTATI _____	48
4.1. <i>In vitro</i> citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat ekstrakta bele imele_____	48
4.2. Uticaj ekstrakta bele imele na distribuciju K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa_____	53
4.3. Ekspresija ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim K562 ćelijama_____	56
4.4. Antiproliferativna sposobnost ekstrakta bele imele_____	58
4.5. Ispitivanje proapoptotskog devovanja ekstrakta bele imele na K562 ćelije_____	59
4.6. Ispitivanje aktivacije mitohondrijskog apoptotskog puta u K562 ćelijama_____	61
4.7. Ispitivanje ekspresije iRNK za <i>kaspazu-3</i> i <i>Bax</i> u tretiranim K562_____	63
4.8. Ispitivanje uticaja ekstrakta bele imele na ekspresiju proteina kaspaze-3 i <i>Bax</i> u tretiranim K562 ćelijama_____	64
4.9. Efekat tretmana K562 ćelija na gensku ekspresiju iRNK za <i>p21^{WAF1}</i> _____	66
4.10. Efekat tretmana K562 ćelija na proteinsku ekspresiju <i>p21^{WAF1}</i> _____	67
4.11. Efekat tretmana K562 ćelija na gensku ekspresiju iRNK za <i>IGF-1R</i> _____	68
4.12. β -galaktozidazno bojenje senescentnih K562 ćelija_____	69
4.13. Efekat ekstrakta bele imele na ulazak/izlazak doksorubicina u tretiranim ćelijama_____	70
4.14. <i>In vitro</i> citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat ekstrakta bele imele i doksorubicina na MCF7 ćelijama_____	73
4.15. Uticaj ekstrakta bele imele na distribuciju MCF7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa_____	74
4.16. Ekspresija ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim MCF7 ćelijama_____	76
4.17. Ispitivanje proapoptotskog delovanja ekstrakta bele imele na MCF7 ćelije_____	77
4.18. Ispitivanje aktivacije mitohondrijskog apoptotskog puta u MCF7 ćelijama_____	79
4.19. Ispitivanje ekspresije iRNK za <i>Bax</i> u tretiranim MCF7 ćelijama_____	80
4.20. Ispitivanje uticaja ekstrakta bele imele na ekspresiju <i>Bax</i> proteina u tretiranim MCF7 ćelijama_____	81
4.21. Efekat tretmana MCF7 ćelija na gensku i proteinsku ekspresiju <i>p21^{WAF1}</i> _____	82
4.22. Efekat tretmana MCF7 ćelija na ekspresiju iRNK gena za <i>IGF-1R</i> _____	83
4.23. β -galaktozidazno bojenje senescentnih MCF7 ćelija_____	84
4.24. Efekat ekstrakta bele imele na ulazak/izlazak doksorubicina u MCF7 ćelije_____	85
4.25. Uticaj ekstrakta bele imele na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima_____	87
4.25.1. Uticaj ekstrakta bele imele na ekspresiju <i>P-selektina</i> i <i>GPIIb-IIIa</i> _____	87
4.25.2. Uticaj ekstrakta bele imele na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima_____	90
4.26. Imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele na monocitno/makrofagne ćelije u kulturi_____	93
4.26.1. Imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele na monocitno/makrofagne ćelije u kokulturi sa aktiviranim trombocitima_____	95

4.26.2. Ispitivanje efekta ekstrakta bele imele na aktivacioni status monocita u kulturi	97
4.27. Poređenje efekata hemioterapije i hemioterapije u kombinaciji sa komplementarnom terapijom preparatom bele imele na kvalitet života kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke	98
4.28. Poređenje efekata hemioterapije i hemioterapije u kombinaciji sa komplementarnom terapijom preparatom bele imele na leukocite periferne krvi kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke	103
4.28.1. Uticaj komplementarne terapije preparatom bele imele na pojavu leukopenije	103
4.28.2. Uticaj komplementarne terapije preparatom bele imele na imunski status limfocita periferne krvi pacijentkinja	107
5. DISKUSIJA	110
6. ZAKLJUČAK	132
7. LITERATURA	134
8. PRILOG	153

1. UVOD

Hemioterapija je jedan od glavnih načina tretiranja malignih tumora, međutim efikasnost hemioterapije je ograničena pojavom rezistencije na lekove i njihovom toksičnošću. Rezistencija na hemioterapeutike se može podeliti u dve kategorije: primarna i stečena. Primarna rezistencija se odnosi na rezistenciju koja je postojala i pre primene hemioterapije. Stečena rezistencija se razvija u toku lečenja tumora. Ovi tumori su inicijalno bili osetljivi, a rezistencija se razvija kao posledica mutacija koje se dešavaju tokom tretmana i/ili kao posledica drugih adaptivnih mehanizama, kao što su povećana ekspresija ciljnih terapijskih molekula i aktivacija alternativnih kompenzatorskih signalnih puteva (1). Osim toga, tumori mogu da sadrže visok stepen molekulske heterogenosti, tako da rezistencija na lekove može nastati i kao posledica terapijski indukovane selekcije male subpopulacije rezistentnih ćelija koje su inicijalno bile prisutne u tumoru. Različiti molekularni mehanizmi dovode do smanjene osetljivosti tumorskih ćelija. Pre svega su to mehanizmi koji dovode do ubrzanog otpuštanja lekova iz ćelije, do inaktivacije ili promene u njihovom metabolizmu, promene u strukturi ciljnih molekula, promene u mehanizmima popravke oštećenja DNK koju su lekovi načinili, izbegavanje apoptoze (1-4). Poznato je i da su tumori veoma prilagodljivi, tako da aktiviranje signalnih puteva za preživljavanje i inaktiviranje nishodnih signalnih puteva smrti, isto tako može dovesti do rezistencije na lekove (5,6). Epigenomske promene i uticaj lokalnog tumorskog mikrookruženja su takođe važni faktori koji doprinose rezistenciji na hemioterapiju (7-9). U skorije vreme, neuspeh u lečenju metastatskih tumora i tzv. "mirovanje" (period od postizanja kompletne remisije tumora kao posledice primenjene terapije do pojave metastaza) pripisuje se prisustvu tumorskih matičnih ćelija, koje su veoma otporne na mnoge konvencionalne tretmane (10,11).

Kao što je već rečeno, na efikasnost hemioterapije osim rezistencije, utiče i toksičnost samih lekova. Pored antitumorske aktivnosti posredovane višestrukim mehanizmima delovanja, hemioterapeutike karakterišu i neželjena dejstva koja u velikoj meri utiču na podnošljivost terapije i kvalitet života pacijenata, što nameće potrebu za procenom odnosa povoljnih i nepovoljnih ishoda terapije (engl. cost-benefit ratio). Osnovni

uzrok neželjenih dejstava citotoksičnih agenasa je njihova ograničena selektivnost. Naime, ciljno mesto dejstva velikog broja citotoksičnih agenasa uglavnom nije samo nepoželjna maligna ćelija već i normalne ćelije organizma pacijenta. Zavisno od porekla ćelija osetljivih na delovanje hemioterapeutika, manifestacije neželjenih dejstava mogu biti različite. Pokazano je da doksorubicin, antraciklin koji predstavlja lek izbora u terapiji solidnih tumora, ima izraženu kardiotsičnost, dovodi do mijelosupresije, mukozitisa i drugih neželjenih dejstava (12,13).

1.1. Antraciklini

Antraciklini ili antraciklinski antibiotici pripadaju klasu lekova koji su nespecifični u pogledu ćelijskog ciklusa (engl. cell-cycle non-specific). Prvootkriveni iz ove grupe antibiotika je Daunorubicin, izolovan iz bakterije *Streptomyces peucetius var. caesius*, koji je odmah pokazao značajno antitumorsko dejstvo u različitim solidnim tumorima i leukemijama kod dece. Njegova efikasnost je usmerila istraživanja na ovu grupu glikozidnih antibiotika sa ciljem pronalaženja još efikasnijih antraciklina. Iz mutirane linije *Streptomyces peucetius var. caesius*, izolovan je 14-hidroksi derivat daunorubicina koji je nazvan Doksorubicin (u prodaji pod imenom Adriamycin PFS®). Doksorubicin se pokazao kao lek sa višim terapijskim indeksom i širim spektrom dejstva na različite tumore. Danas je to jedan od najčešće korišćenih hemioterapeutskih lekova u lečenju akutnih limfoblastnih i mijeloblastnih leukemija, Wilms-ovog tumora, neuroblastoma, sarkoma kostiju i mekih tkiva, karcinoma dojke, jajnika, mokraćne bešike, štitne žlezde, gastrointestinalnog trakta, bronhija, Hodgkin-ove bolesti i limfoma (12).

Smatra se da citotoksičnost doksorubicina potiče od interkalacije doksorubicina između nukleotidnih baza DNK molekula, kao i usled vezivanja molekula za ćelijsku membranu. Interkalacija doksorubicina u DNK molekul zaustavlja biosintezu. Jedan od mehanizama dejstva doksorubicina je inhibicija funkcije enzima topoizomeraze II, koja opušta namotaje DNK molekula i omogućava transkripciju. Interkalacijom doksorubicin može dovesti i do eliminacije histona iz hromatina. Kao posledica svega dolazi do deregulacije ćelijskog odgovora na DNK oštećenja (13-15).

Vezivanje doksorubicina za ćelijsku membranu dovodi do njegove redukcije od strane različitih oksidaza, reduktaza i dehidrogenaza, pri čemu se oslobađaju visoko reaktivne grupe, pre svega hidroksilni slobodni radikali (OH•). Slobodni radikali su odgovorni za kardiotoksičnost jer dovode do redukcije Cu (II) i Fe (III) na ćelijskom nivou. Ćelije tretirane doksorubicinom pokazuju morfologiju karakterističnu za apoptozu (12,16). Doksorubicin pokazuje znatnu opštu toksičnost za organizam, koja se pre svega ispoljava kroz mijelosupresiju i bolest srčanog mišića, tj. kardiotoksičnost. Međutim, terapija doksorubicinom dovodi i do drugih neželjenih događaja (16).

Kardiotoksičnost doksorubicina može biti akutna i sa odloženim dejstvom. Akutna toksičnost se odnosi na sinusnu tahikardiju i/ili neregularnosti u elektrokardiogramu (EKG). Odložena kardiotoksičnost nastupa kasnije tokom terapije, pa i do nekoliko meseci ili godina nakon njenog završetka. Odložena oštećenja srčanog mišića se manifestuju u smanjenoj ejskcionoj frakciji leve komore i/ili simptomima kongestivne insuficijencije srca (12,17,18). Smatra se da doksorubicin na više načina dovodi do kardiomiopatije; putem oksidativnog stresa, uticaja na regulaciju gena za kontraktilne proteine i p53 posredovanom apoptozom (18).

Hematološka toksičnost je najčešće prisutna akutna toksičnost u terapiji doksorubicinom. Manifestuje se kroz leukopeniju, odnosno neutropeniju, mada se susreću i trombocitopenija i anemija. Leukopenija i neutropenija su dozno zavisne i reverzibilne. Najizraženije manifestacije nastupaju u periodu od 10. do 14. dana od administracije leka, a oporavak se očekuje 21. dana. Kliničke posledice mijelosupresije mogu biti ozbiljne (povišena temperatura, groznica, infekcije, sepsa). U retkim slučajevima može doći do pojave sekundarnih akutnih mijeloblastnih leukemija i mijelodisplastičnih sindroma (12).

Akutna gastrointestinalna toksičnost se pre svega ispoljava kroz pojavu mučnine i povraćanja. Međutim, terapija doksorubicinom može dovesti i do pojave mukozitisa, koji može imati ozbiljne posledice ako dođe do pojave ulceracije (12).

Toksičnost na koži se ispoljava kroz pojavu alopecije, osipa, svraba i fotosenzitivnost (12).

1.2. Apoptoza

Ćelijska smrt je sastavni deo života, tokom razvoja i održavanja homeostaze, ali ima ključnu ulogu i u različitim patološkim stanjima. Postoji više puteva ćelijske smrti. Ćelije mogu imati komponente koje su karakteristične samo za jedan od puteva, mogu imati endogene inhibitore koji onemogućavaju određeni put, ali mogu i različiti putevi koegzistirati u istoj ćeliji i biti aktivirani zavisno od stimulusa. Apoptoza i autofagija su dva osnovna tipa programirane ćelijske smrti (PĆS), dok nekroza predstavlja nefiziološki proces nastao kao posledica infekcije ili povrede. Nekroza je izazvana spoljašnjim faktorima i ima više formi. Međutim, poslednjih godina opisani su različiti tipovi PĆS, neke od njih su: apoptoza, imunogena apoptoza, aktivacijom indukovana PĆS, nekroptoza, autofagija, anoikis, kornifikacija, ekscitotoksičnost, ferroptoza, Valerova degeneracija, senescencija, ishemijska ćelijska smrt (19).

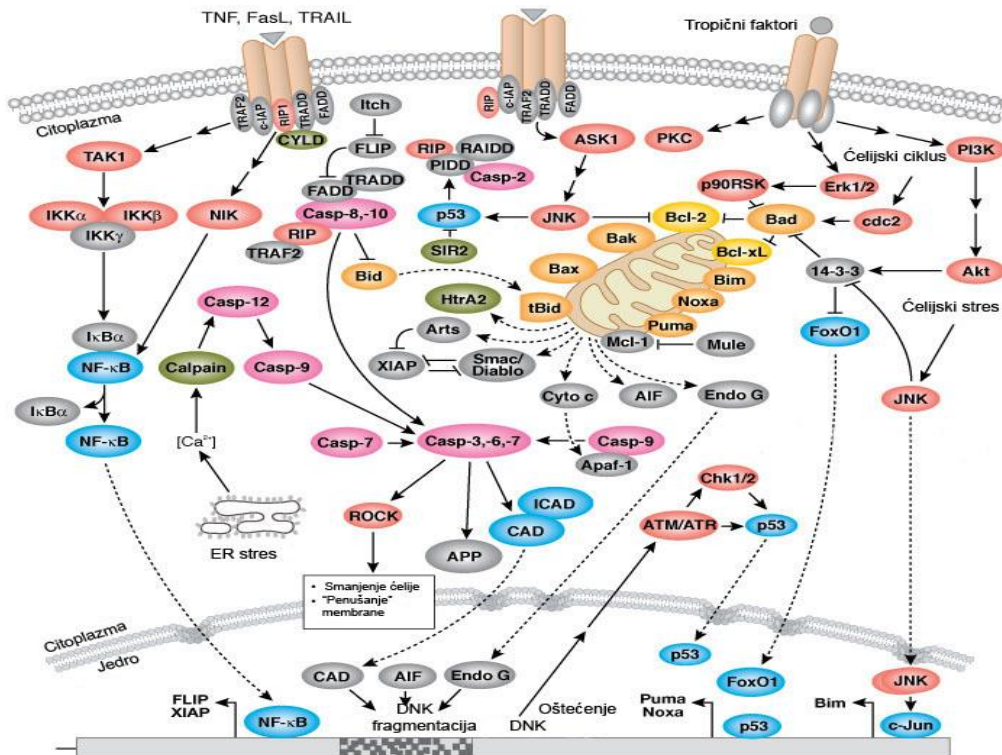
Genetski, aktivno regulisan proces smrti pojedinačne ćelije je kao morfološki fenomen nazvan apoptoza. Apoptoza je očigledan opšti obrazac smrti za tumorske ćelije podvrgnute klinički delotvornim dozama citotoksičnih lekova, odnosno klinički relevantan mehanizam tumorskog odgovora na dejstvo citotoksičnih lekova (20). Tipični događaji u procesu apoptoze su "penušanje" ćelijske mebrane, premeštanje molekula fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, unakrsno povezivanje proteina i smanjenje zapremine ćelija, kondenzacija hromatina, cepanje jedarne DNK, prvo u veće segmente, a zatim u nukleozomalne fragmente, i na kraju formiranje velikih citoplazmatičnih vezikula (apoptotskih tela) koja se otkidaju od ćelijske površine.

Najbolje ispitani putevi aktivacije apoptoze su:

- mitohondrijski (unutrašnji) put; kod koga signali pokreću ćelijsku smrt aktivacijom proapoptotskih članova Bcl-2 familije proteina.
- receptorski (spoljašnji) put; kod koga do apoptoze dolazi nakon vezivanja molekula, kao što je FasL, za receptore na ćelijskoj membrani (21).

Oba puta uključuju aktivaciju proteolitičkih enzima nazvanih kaspaze (citoplazmatske cistein-aspartatno specifične endoproteaze; engl. caspase, cysteine aspartyl proteases) (22,23). U ćelijskoj citoplazmi kaspaze se nalaze u obliku proenzima, a mogu biti

aktivirane autokatalitički ili drugom kaspazom. Danas je poznato 14 članova porodice kaspaza koje se označavaju rednim brojem 1-14, pri čemu prokaspaze 2, 8, 9 i 10 ubrajamo u pokretačke, a prokaspaze 3, 6 i 7 u izvršne kaspaze. U receptorskom putu prva se aktivira kaspaza-8, a u mitohondrijskom kaspaza-9. Navedene kaspaze aktiviraju kaspazu-3 (poznatu kao CPP32, Yama i apopain) koja aktivira endonukleazu CAD (kaspazom aktivirana DNaza; engl. caspase activated DNase) (21). Tokom apoptoze kaspaza-3 je odgovorna, delom ili u potpunosti, za stepenastu razgradnju velikog broja ćelijskih proteina, fragmentaciju DNK i kondenzaciju hromatina (24).



Slika 1.1. Signalni putevi uključeni u apoptozu i njenu regulaciju

Apoptoza je regulisani mehanizam ćelijske smrti za koji je karakteristična kondenzacija hromatina, smanjenje zapremine ćelije, "penušanje" ćelijske membrane i DNK fragmentacija. Kaspaze su centralni regulatori apoptoze. Pokretačke kaspaze (-2, -8, -9, -10, -11, i -12) su usko povezane sa proapoptotskim signalima, cepaju i aktiviraju nizvodne efektorske kaspaze (-3, -6, i -7), koje izvršavaju apoptozu cepanjem ćelijskih proteina. Aktivacija Fas i TNFR, ligandima FasL i TNF, dovodi do aktivacije kaspaza -8 i -10. Oštećenje DNK indukuje ekspresiju PIDD koji se vezuju za RAIDD i kaspazu-2, dovodeći do aktivacije kaspaze-2. Oslobođanje Cyt C iz oštećene mitohondrije je povezano sa aktivacijom kaspaze-9, ali se oslobađaju i drugi proapoptotski molekuli (Smac/Diablo, AIF, HtrA2 i EndoG). Kaspaza-11 indukuje i aktivira patološke zapaljenske i proapoptotske stimulse, i dovodi do aktivacije kaspaze-1, a zatim kaspaze-3. Kaspaze-12 i -7 se aktiviraju u uslovima ER stresa. Antiapoptotski ligandi, uključujući faktore rasta i citokine, aktiviraju Akt i p90RSK. Akt se vezuje za Bad direktnom fosforilacijom i sprečava ekspresiju Bim fosforilišići i aktivirajući Forkhead familiju transkripcionih faktora (FoxO).

U **mitohondrijskom putu aktivacije apoptoze** središnje mesto zauzimaju mitohondrije preko kojih se aktiviraju proapoptotski članovi Bcl-2 familije (engl. B cell lymphoma). Ako je uzrok smrti ćelije oštećenje DNK, ključna je uloga proteina p53, koji je u ćelijama prisutan u inaktivnom obliku. Oštećenja DNK podstiču nakupljanje proteina p53 u ćeliji, što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G₁ fazi, kada dolazi do popravke oštećene DNK ili do pokretanja apoptoze, ako su oštećenja nepopravljiva (25,26). Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako što dovodi do poremećaja u odnosu proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina Bcl-2 familije ili indukcijom gena koji povećavaju produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji su snažni aktivatori apoptoze. Proteini Bcl-2 familije dele se na proapoptotske (Bad, Bax, Bak itd.) i antiapoptotske proteine (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w). Proapoptotski proteini prisutni su u citoplazmi kao senzori ćelijskog oštećenja ili stresa, dok se antiapoptotski proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Odnos proapoptotskih i antiapoptotskih faktora određuje osetljivost ćelija na apoptozu (27). Važno je naglasiti da taj odnos bitno određuje odgovor tumorskih ćelija na zračenje i hemioterapiju (28). Članovi Bcl-2 familije regulišu broj i tip jonskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu Bad i Bax dovode do stvaranja većih jonskih kanala kroz koje izlaze citohrom C (Cyt C) i drugi proapoptotski molekuli. Otpušteni Cyt C se veže uz medijatorski molekul Apaf-1 koji aktivira kaspazu-9 (29). Cyt C, Apaf-1, kaspaza-9 i ATP zajedno čine apoptozom (30). Osim Cyt C, mitohondrije sadrže i druge apoptotske faktore kao što su faktor indukcije apoptoze (engl. Apoptosis-Inducing Factor, AIF) i endonukleaza G. AIF napušta mitohondrije, dovodi do fragmentacije DNK na fragmente veličine 50-300 kb i do kondenzacije hromatina uz jedarnu membranu (31). Endonukleaza G izlazi iz mitohondrija za vreme apoptoze i delimično je odgovorna za internukleozomalno cepanje DNK, koje je takođe nezavisno od kaspaza (32,33).

U ranoj fazi apoptoze spoljašnja membrana mitohondrija postaje propustljiva za proteine, što rezultira otpuštanjem rastvorljivih intermembranskih mitohondrijskih proteina, dok na unutrašnjoj membrani dolazi do slabljenja transmembranskog potencijala što može poslužiti kao pokazatelj ranih apoptotskih promena u *in vivo* uslovima (34).

Poslednjih godina sve više se istražuje indukcija apoptoze koja nije posredovana kaspazama (35). Naime, ugrožena ćelija može aktivirati različite puteve apoptotske ćelijske

smrti kako bi osigurala samouništenje. Smrt ćelije koja je nezavisna od kaspaza odvija se znatno sporije od apoptoze posredovane kaspazama. Apoptoza posredovana kaspazama je najefikasnija i najbrža, ali ukoliko je zbog mutacija, genetskih manipulacija i/ili inhibicija poremećena, ćelija može pokrenuti apoptotsku smrt koja nije posredovana kaspazama (36).

1.2.1. Uloga apoptoze u tumorima

Danas se smatra da su poremećaji u apoptotskim putevima značajni u patogenezi mnogih bolesti, od neurodegenerativnih poremećaja do malignih tumora. Jedna od najvažnijih karakteristika malignih ćelija je preživljavanje ćelije s oštećenom DNK i nakupljanje novonastalih genskih mutacija. Zdrave ćelije imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravljavanja oštećenih mesta na DNK, a aktivacijom apoptoze sprečavaju deobu ćelije i umnožavanje ćelija sa oštećenjima. Nakupljanje tumorskih ćelija može biti posledica aktivacije onkogeni, inaktivacije tumor supresor gena, mutacije gena koji regulišu apoptozu ili poremećaja u procesu popravke DNK (37). Važna uloga apoptoze u tumorogenezi prvi put je uočena zahvaljujući istraživanjima *Bcl-2* familije gena, čija mutacija je otkrivena u ćelijama folikularnog limfoma. U normalnim ćelijama *Bcl-2* protein inhibira apoptozu, a njegovo nakupljanje u citoplazmi tumorskih ćelija sprečava njihovo odumiranje (37).

Gen *p53* prvi je tumor supresorski gen koji je povezan s apoptozom. Mutacija *p53* gena prisutna je u većini tumora i povezana je sa uznapredovalim stadijumom tumora i lošijom prognozom pacijenata. Gubitak funkcije *p53* gena povećava hromozomsku nestabilnost i dovodi do nakupljanja različitih oštećenja u ćeliji, što može dovesti do pojave transformisanog fenotipa (37). Protein *p53* podstiče proapoptotske gene kao što je *Bax* gen i aktivira apoptozu u cilju eliminisanja tumorskih ćelija. Zračenje i hemioterapija uzrokuju oštećenje DNK što aktivira apoptozu preko proteina *p53* u ćelijama tumora. Tumori s mutacijom *p53* gena rezistentniji su na terapiju (21). Tokom poslednje dekade otkriveno je da neki hemioterapeutici, kao npr. doksorubicin, podstiču apoptozu, a da su poremećaji u signalnim putevima apoptoze u tumorskim ćelijama u vezi sa rezistencijom na lekove (38). Apoptoza je prisutna u spontanoj regresiji tumora i u tumorima pacijenata koji su lečeni

hemioterapijom (39). Lekovi koji aktiviraju apoptozu preko "receptora smrti" kao što je Fas, aktiviraju apoptozu isključivo putem stepenaste aktivacije kaspaza (40,41). Međutim, neki faktori, uključujući hemioterapeutike i određene endogene proapoptotske proteine kao što su Bax i Bak, mogu aktivirati apoptozu putevima koji uključuju stepenastu aktivaciju kaspaza, ali i nemoraju (42).

1.3. Senescencija

Senescencija (engl. senescence) je termin koji označava biološko starenje organizma i predstavlja skoro univerzalno svojstvo bioloških organizama. Osnovna karakteristika starenja je gubitak funkcije ili degeneracija na molekularnom, ćelijskom i tkivnom nivou, samim tim i na nivou organizma. Među višećelijskim organizmima koji imaju mogućnost da regenerišu tkiva, starenje se odlikuje pojavom hiperplazije, tj. u ćelijama dolazi do takvih promena koje im omogućavaju da se dele nekarakteristično za dato tkivo. Zajedno sa genetičkom nestabilnošću ove ćelije stiču fenotip koji povećava njihovu sposobnost da proliferišu, migriraju, kolonizuju ektopična mesta i izbegnu odgovor imunskog sistema. Ovo je fenotip karakterističan za ćelije tumora (43-45). Iako su manifestacije vezane za pojavu tumora različite od drugih degenerativnih promena karakterističnih za starije životno doba, postavlja se pitanje da li u njihovoj osnovi leži zajednički proces. Sve je više dokaza da u osnovi degeneracije i hiperplazije leži isti proces nazvan ćelijska senescencija, a javlja se kao odgovor na stres (44,46).

Ćelijska senescencija se odnosi na ireverzibilan proces kojim se zaustavlja ćeliska proliferacija, a dešava se kada ćelija doživi potencijalno onkogeni stres (47). Utvrđeno je postojanje dva glavna puta pomoću kojih tumor supresorski geni uvode ćeliju i održavaju je u stanju senescencije; p53/p21 i p16^{INK4a}/pRB put. Pored zastoja u proliferaciji senescentna ćelija pokazuje promene u organizaciji hromatina i ekspresiji gena. Ove promene uključuju sekreciju brojnih proinflamatornih citokina, hemokina, faktora rasta i proteaza, a definišu se kao sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (engl. senescence-associated secretory phenotype, SASP)(43).

Osnovna karakteristika senescentnih ćelija je prestanak proliferacije. Međutim, ove ćelije karakterišu i druge morfološke i fiziološke osobine koje omogućavaju njihovu identifikaciju, ali koje nisu istovremeno njihova ekskluzivna karakteristika. Odsustvo proliferacionih markera je neophodan uslov da bi ćelija krenula putem senescencije, ali ne i dovoljan. Senescentna ćelija je krupnija, zaravnjene morfologije, često joj se volumen udvostručuje, a citoplazma postaje granulisanija. Histohemijski je pozitivna za β -galaktozidazu povezanu sa senescencijom (engl. senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal), koja je poreklom iz lizozoma, ali se detektuje na skoro neutralnom pH, jer je prekomerno eksprimirana (48). Danas se i p16^{INK4a} i p21 tumor supresorski proteini koriste kao markeri za identifikaciju senescentnih ćelija u tkivima, jer se u normalnim ćelijama praktično ne mogu detektovati. Ekspresija gena za ove proteine se povećava konstantno sa godinama (49,50).

1.3.1. Senescencija u tumorima

Senescentne ćelije se karakterišu pojavom kako degenerativnih, tako i hiperplastičnih promena. Sa starenjem broj senescentnih ćelija se povećava i one formiraju tkivnu mikrosredinu koja omogućava razvoj tumora. Pokazano je da u *in vitro* uslovima, u kulturi ćelija, prisustvo pojedinih SASP komponenti dovodi do indukcije tumora, kao npr. MMP3 (matriksna metaloproteinaza 3; engl. matrix metalloproteinase 3) koja omogućava invaziju tumorskih ćelija i VEGF (faktor rasta vaskularnog endotela; engl. vascular endothelial growth factor) koji omogućava angiogenezu. SASP faktori mogu dovesti do epitelno-mezenhimske tranzicije što ovako transformisanim epitelnim ćelijama omogućava da migriraju i formiraju metastaze. Sekretacija IL-6 i IL-8 od strane senescentnih fibroblasta može da dovede do ove tranzicije u premalignim epitelnim ćelijama neagresivnog karcinoma (51). Inflamacija je karakteristika senescentnog fenotipa, koja može da stimuliše infiltriranje leukocita, koji zatim produkuju reaktivne kiseonične vrste i uzrokuju DNK oštećenja. Postoji određena kontradiktornost u činjenici da senescentne ćelije mogu podstaknuti nastanak malignog fenotipa iako je senescencija nastala kao potreba da se spreči proliferacija oštećenih ćelija. Još veća kontradiktornost se ogleda u tome što senescentne ćelije koje su nastale kao posledica delovanja zračne ili hemioterapije mogu da

oslobađaju faktore koji štite okolno tumorsko tkivo od ćelijske smrti. Ovi protektivni SASP faktori uključuju WNT16B, IL-6, TIMP-1 (tkivni inhibitor metaloproteinaze-1) (51,52). Efekti koje senescentne ćelije proizvode unutar tumora su kompleksni i zavise od fiziološkog konteksta. U kontekstu činjenice da lečenje tumora podrazumeva primenu agenasa koji oštećuju DNK i da njihova primena može uzrokovati pojavu senescentnog fenotipa, potrebno je da primenjena terapija dovodi do smrti senescentnih ćelija, bilo da su one nastale normalnim putem ili su tumorskog porekla. Eliminacijom senescentnih ćelija bi se sprečilo formiranje senescentnih hemiorezistentnih niša, a mogla bi se sprečiti i stimulacija proliferacije zaostalih tumorskih ćelija od strane senescentnih ćelija.

1.4. Trombociti

Danas je poznato, a na osnovu epidemioloških studija i brojnih eksperimenata u *in vitro* uslovima i na animalnim modelima, da trombociti imaju veliki značaj u patogenezi i progresiji tumora. Interakcija trombocita i tumorskih ćelija značajno doprinosi i razvoju malignog procesa i stanjima povećane aktivacije trombocita, hiperkoagulacije i trombocitopenije, kao čestih pratećih simptoma malignih bolesti. O delovanju ekstrakta bele imele na funkciju trombocita nema podataka u dostupnoj literaturi.

Trombociti su krvne ćelije bez jedra koje se formiraju u koštanoj srži iz megakariocita. Predstavljaju najmanje krvne ćelije. U fiziološkim uslovima trombociti imaju ključnu ulogu u jednom od najznačajnijih homeostatskih mehanizama; hemostazi, procesu zaustavljanja krvarenja nakon oštećenja zida krvnog suda i narušavanja njegovog integriteta. U patološkim stanjima, povećana aktivacija trombocita i sklonost ka agregaciji ima važnu ulogu u etiologiji i patogenezi koronarnih, perifernih i cerebralnih vaskularnih bolesti, etiopatogenezi ateroskleroze (53), a najnovija istraživanja ukazuju i na značajnu ulogu trombocita u nastanku i razvoju malignih bolesti (54), hroničnih zapaljenskih bolesti (55), u funkciji imunskog sistema (56), kao i povezanost sa pojedinim neurodegenerativnim (57) i psihijatrijskim bolestima (58).

1.4.1. *Struktura trombocita*

Funkcija trombocita u fiziološkim uslovima i patološkim stanjima zasniva se na njihovim specifičnim morfološkim karakteristikama. Kada napuste kostnu srž i dospeju u cirkulaciju, trombociti cirkulišu u sloju najbližem površini krvnog suda. Ukoliko u cirkulaciji ne dođu u kontakt sa bilo kojim od fizioloških agonista, trombociti završavaju svoj životni vek u neaktiviranom obliku, dospevajući do ćelija retikularno-endotelijalnog sistema (59). U suprotnom, kao odgovor na promenjene uslove sredine kojima su izloženi, trombociti odgovaraju kompleksnim mehanizmima koji rezultuju nizom fenotipskih promena, što podrazumeva ekspresiju specifičnih receptora na površini. S obzirom da ne poseduju jedro i nisu u stanju da se adaptiraju na izmenjene uslove sredine *de novo* sintezom proteina, trombociti sadrže veliki broj presintetisanih molekula i struktura koji svoju funkciju ostvaruju kao odgovor na određene patološke promene u organizmu (60).

Osnovnu strukturu trombocita čine tri zone: periferna zona, „sol–gel“ zona i zona organela (60). Perifernu zonu čine plazma membrana (sastavljena od spoljašnjeg omotača glikokaliksa i unutrašnjeg lipidnog dvosloja) i sub-membranski sloj (u kome su smešteni kontraktilni filament). Na površini glikokaliksa nalaze se receptori za različite fiziološke agoniste trombocita: adenzin difosfat (engl. adenosine diphosphate, ADP), trombin, von Willebrand-ov faktor (vWF), kolagen, fibrinogen, fibrin, fibronektin, epinefrin, trombocitni aktivacioni faktor (engl. platelet activating factor, PFA), trombospondin (TSP), tromboksan A2 (TxA2), epinefrin, serotonin i glikozil transferazu. U nivou submembranskog sloja citoplazmatski domeni ovih receptora stupaju u interakciju sa proteinima uključenim u prenošenje signala tokom procesa aktivacije trombocita i kontraktilnim proteinima citoskeleta koji učestvuju u translokaciji pojedinih receptorskih kompleksa iz unutrašnjosti na površinu trombocita, nakon aktivacije. Periferna zona ima ključnu ulogu u procesu adhezije, aktivacije i agregacije, jer predstavlja mesto prvog kontakta trombocita sa spoljašnjom sredinom i potencijalnim aktivacionim stimulusima (60). U „sol–gel“ zoni nalaze se mikrotubule i mikrofilamenti, kao deo citoskeleta, dok se u zoni organela, pored mitohondrija i lizozoma, nalaze i specifične organele trombocita: α -granule i „guste“ granule, u kojima su smešteni molekuli od ključnog značaja za funkciju trombocita u

fiziološkim i patološkim stanjima. Najbrojnije organele u trombocitima su α -granule u kojima su smešteni adhezivni proteini: P-selektin, vWF, TSP, fibrinogen, integrin α IIb β 3; trombocitni hemokini: trombocitni faktor 4 (engl. platelet factor 4, PF 4), makrofagni inflamatorni protein 1 α (engl. macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α), RANTES molekuli (engl. Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), monocitni hemotaktični protein 3 (engl. monocyte chemotactic protein 3, MCP-3) i interleukin 8; faktori koagulacije V i VIII; faktori fibrinolitičkog puta: plazminogen i inhibitor aktivatora plazminogena (engl. plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) kao i faktori rasta i angiogeneze: trombocitni faktor rasta (engl. platelet-derived growth factor, PDGF), transformišući faktor rasta β (engl. transforming growth factor β , TGF- β); epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, insulinu-sličan faktor rasta-1, faktori rasta vaskularnog endotela A i C. Nakon aktivacije trombocita dolazi do fuzije prethodno odvojenih α -granula i oslobađanja njihovog sadržaja, na površinu trombocita i u cirkulaciju. U „gustim“ granulama smešteni su: ADP, autokrini agonisti trombocitnih receptora; joni kalcijuma i magnezijuma, drugi nukleotidi i serotonin (60, 61).

Interakcija trombocita i spoljašnje sredine ostvaruje se posredstvom velikog broja receptora. Receptori prisutni na površini trombocita razlikuju se po strukturi, funkciji, broju, po tome da li su prisutni na površini „mirujućih“ trombocita ili se eksprimiraju kao odgovor na aktivaciju i funkcionišu kao adhezivni molekuli (62).

Transmembranski receptori za fiziološke agoniste prisutni su na površini „mirujućih“ trombocita. Najveći broj ovih receptora pripada familiji G-protein kuplovanih receptora (engl. G-protein coupled receptors) uključujući receptore koji vezuju trombin (PAR1, PAR2, PAR4), ADP (P2Y1 i P2Y12), prostaglandine (receptori za TXA2 i PGE2), lipide (receptori za PAF i lizo-fosfatidnu kiselinu), hemokine, vazopresin, epinefrin (β 2 adrenergički receptor), serotonin (5-HT2A).

Nakon niza signalnih događaja prouzrokovanih delovanjem agonista i njihovom interakcijom sa odgovarajućim receptorima, na površini aktiviranih trombocita dolazi do ekspimiranja receptora koji imaju direktnu ulogu u hemostatskom procesu, kao odgovoru trombocita na agoniste. Oni mogu biti rezultat konformacionih promena receptorskih kompleksa već prisutnih na površini neaktiviranih trombocita (GPIIb-IIIa) ili predstavljaju

glikoproteine prisutne u granulama neaktiviranih trombocita koji će se naći na površini nakon aktivacije (P-selektin). S obzirom da se nalaze isključivo na površini aktiviranih trombocita, ovi receptori se koriste kao markeri njihove aktivacije.

Glikoprotein α IIb β 3 (GPIIb-IIIa kompleks) pripada porodici integrina i karakterističan je isključivo za trombocite. S obzirom da je prisutan jedino na površini trombocita i megakariocita, i α IIb subjedinica (CD41) i β 3 subjedinica (CD61) ovog integrina koriste se kao pan-trombocitni markeri. Integrin α IIb β 3 ima funkciju receptora. Na “mirujućim” trombocitima integrin α IIb β 3 nalazi se u neaktivnom obliku. Aktivacijom trombocita različitim agonistima (trombin, ADP, kolagen, vWF, TxA2) dolazi do niza signalnih događaja koji dovode do konformacionih promena u α IIb β 3 kompleksu i on prelazi u aktivno stanje, stanje povećanog afiniteta i aviditeta za ligande. Ključna uloga aktivnog oblika GPIIb-IIIa receptora je uloga u agregaciji trombocita vezivanjem za osnovne ekstraćelijske ligande, fibrinogen i vWF (61,62).

P-selektin je glikoprotein konstitutivno prisutan u α -granulama trombocita. Nakon stimulacije trombocita agonistima, P-selektin se oslobađa iz ovih granula i eksprimiran na površini ima funkciju receptora. Osnovni ligand P-selektina je PSGL-1 (engl. P-selectin glycoprotein ligand) prisutan na površini svih leukocita. Aktivna uloga P-selektina u patogenezi tromboze, u koagulaciji i ključna uloga u patogenezi ateroskleroze zasniva se pre svega na učešću u regrutovanju leukocita, pre svega monocita, u okviru inflamatorne komponente aterosklerotskog procesa i posredovana je interakcijom između P-selektina i molekula PSGL-1 (61,62).

1.4.2. Uloga trombocita u patogenezi tumora

Aktivacija trombocita, prisutna u tumorima, posredovana je trombinom koji oslobađaju tumorske ćelije, ADP-om poreklom iz tumorskih ćelija ili trombocita i tromboksanom A2 poreklom iz trombocita. Trombin, prisutan na površini aktiviranih trombocita, stimuliše direktnu agregaciju sa tumorskim ćelijama, koja zavisi od ekspresije GPIIb-IIIa i prisustva fibronektina i vWF. Sekvestracija trombocita omogućava tumorskim ćelijama da izbegnu mehanizme imunske kontrole tumorskog procesa i doprinosi njihovom metastatskom potencijalu. Aktivirani trombociti oslobađaju faktore rasta tumora (PDGF) i

faktore angiogeneze (VEGF i angiopoetin-1). VEGF je najverovatnije odgovoran za povećanje permeabilnosti endotela i ekstravazaciju tumora. Ekstravazacija tumorskih ćelija i njihov metastatski potencijal direktno je srazmeran njihovoj sklonosti da vezuju trombocite, odnosno formiraju agregate. Formiranje agregata tumorskih ćelija i endotelnih ćelija u inicijalnim fazama ovog procesa posredovano je P-selektinom (54, 63).

Značaj uloge trombocita u nastanku i progresiji malignog procesa potvrđen je i antitumorskim efektima trombinskih inhibitora i prostaciklina. Epidemiološke studije takođe pokazuju da acetil-salicilna kiselina smanjuje prevalencu više tipova tumora (64) i potencijalni mehanizmi pored inhibicije ciklooksigenaze, uključuju i direktno delovanje na metastatski proces (65), mada uticaj aspirina na preživljavanje pacijenata nije potvrđeno.

Najnovija saznanja o ulozi trombocita u nastanku i progresiji malignog procesa otvaraju novu oblast istraživanja antitumorskog delovanja sastojaka biljaka, usmerenog na funkciju trombocita (66).

1.5. Makrofage kao deo tumorskog mikrokruženja

Makrofage predstavljaju još jednu veoma značajnu ćelijsku populaciju koja sačinjava tumorsko mikrokruženje. Ova heterogena ćelijska populacija je sposobna da menja svoj fenotip u zavisnosti od okruženja, efekat koji je posebno zapažen kod tumora.

Tumorsko mikrokruženje obuhvata širok spektar različitih ćelijskih populacija, uključujući maligne i nemaligne, ćelije strome i leukocitne infiltrirajuće ćelije. Tumor-infiltrirajuće imunske ćelije su karakteristika solidnih tumora, tako da prisustvo različitih imunskih populacija značajno utiče na klinički ishod kod pacijenata sa karcinomom (67,68). Istorijski, tumor infiltrirajuće imunske ćelije su posmatrane kao ćelije koje suprimiraju progresiju tumora, ali tokom poslednje dekade u naučnim radovima, sve je više prihvaćen stav da hronični imunski odgovor ima važnu ulogu u stimulanju progresije tumora, pojavi metastaza i pojavi rezistencije na citotoksičnu terapiju (67,69). Dakle, razumevanje molekularnih mehanizma pomoću kojih maligne ćelije prevazilaze antitumorski imunski odgovor je od ključnog značaja za identifikuju potencijalnih terapijskih ciljnih molekula i ćelija. Tumor infiltrirajuće makrofage (TIM) čine

dominantnu leukocitnu populaciju ćelija u okviru tumorskog mikrokruženja. TIM učestvuju u obnovi normalne funkcije oštećenog tkiva, ali njihova interakcija sa tumorskim ćelijama u tumorskom mikrokruženju dovodi do promene njihovih svojstava, što rezultira u imunosupresiji i stimulaciji rasta tumora (70). Ove makrofage stimulišu rast tumora, njegovu proliferaciju, prokrvljenost, invazivnost, metastatski potencijal i rezistenciju na hemioterapeutike. Interakcija makrofaga sa tumorskim ćelijama reguliše proces inflamacije povezan sa tumorom i preovladavanje ovih ćelija unutar tumora je u vezi sa lošijom prognozom, što ukazuje na značaj molekularnih mehanizama koji leže u osnovi ovih interakcija. S tim u vezi, TIM mogu predstavljati ciljne ćelije za dalja farmakološka ispitivanja. Razumevanje heterogenosti populacije makrofaga prisutnih u tumorskom mikrokruženju i molekularnih mehanizama pomoću kojih maligne ćelije prevazilaze antitumorski imunski odgovor omogućiće identifikaciju farmakoloških ciljnih molekula kojima bi se moglo manipulirati, u smislu postizanja veće koristi od primenjene terapije. Različiti tipovi tumora sekretuju spektar hemokina i citokina koji imaju sposobnost da stimulišu regrutovanje monocita i makrofaga. Tu spadaju CSF1 (factor stimulacije kolonija makrofaga 1; engl. macrophage colony-stimulating factor 1), CCL2 (engl. C-C motif ligand 2), CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, SDF1 (stromalni ćelijski factor 1; engl. stromal cell-derived factor 1), VEGF, MIP-1 (protein inflamacije makrofaga; engl. macrophage inflammatory protein) i MIF (factor inhibicije migracije makrofafa; engl. macrophage migration inhibitory factor).

Kada se infiltriraju u tumor, makrofage pokazuju heterogenost u odgovoru na tumor, što dovodi do pro- i antitumorskih svojstva makrofaga. Ćelijske funkcije su često zavisne od specifičnosti tkivnog mikrokruženja. Koncept koji je široko rasprostranjen u pokušaju da se objasni fenotipska heterogenost makrofaga je koncept polarizacije makrofaga. Tradicionalno makrofage se dele u dva glavna podtipa, M1 i M2. Prema ovoj klasifikaciji, M1 podtip uključuje klasično aktivirane/antitumorske makrofage, dok su M2 alternativno aktivirane/protumorske makrofage. Ova klasifikacija, iako široko rasprostranjena, ne odgovara uvek *in vivo* makrofagama povezanim sa tumorima. Klasično aktivirane makrofage aktiviraju agonisti receptora sličnih Toll-proteinu (engl. Toll-like receptor), IFN- γ , TNF- α i GM-CSF. M1 makrofage proizvode proinflamatorne citokine,

kao što su TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-2. Osim proinflamatorne aktivnosti, u nekim slučajevima, TIM mogu da igraju važnu ulogu u antigen prezentaciji i održavanju Th1 i citotoksičnog T ćelijskog odgovora putem proizvodnje IL-12. Nažalost, ono što je karakteristika tumora je da je zastupljenost M1 makrofaga značajno manja u odnosu na M2 makrofage u okviru TIM. Terapeutici koji mogu uticati na preraspodelu zastupljenosti M1 u odnosu na M2 makrofage bi bili obećavajući hemioterapeutici u lečenju tumora (67,70).

Postojeće makrofage u tumorskom mikrookruženju mogu izmeniti svoj fenotip inhibicijom NF-kB signalizacije, koja suprimira inflamatorne gene, polarizujući ih ka protumorskom fenotipu. Protumorske makrofage generalno imaju visok nivo ekspresije receptora hvatača (engl. scavenger), kao npr. CD36, manoznih i galaktoznih receptora (71), a niži nivo ekspresije kostimulatornih molekula, kao što su CD80 i CD86. Za razliku od klasično aktiviranih makrofaga, izgleda da većina TIM stimuliše imunosupresiju. Ovo može biti posredovano hemokinima, koji igraju značajnu ulogu u regrutaciji T regulatornih limfocita (72). Takođe, TIM suzbijaju aktivnost antigenske prezentacije i T ćelijski odgovor u tumorima (73). Interesantno je, da se zastupljenost protumorskog u odnosu na antitumorski fenotip može lako reprogramirati. Ovo je veoma bitno za terapijsku intervenciju. Primećeno je da se fenotipovi i funkcije makrofaga menjaju tokom progresije tumora. Na primer, makrofage u ranom neoplastičnom tkivu često imaju proinflamatornu ulogu i stimulišu imunski nadzor, koji može suprimirati razvoj tumora. Međutim, dugoročno ova hronična inflamacija može biti mutagena (74). Nasuprot tome, u uznapredovalim tumorima, mikrookruženje se menja i makrofage mogu stimulisati angiogenezu, poboljšati širenje tumorskih ćelija i suzbijanje antitumorskog imunskog odgovora (75,76). Tako, ishod terapije koja je usmerena na aktivnost makrofaga može zavistiti od gradusa bolesti, odnosno da li je bolest premaligna, maligna ili metastatska. U okviru istog tumora često postoje podgrupe makrofaga različitih fenotipskih karakteristika.

1.5.1. Makrofage stimulišu progresiju tumora

U *in vivo* studijama na mišijim modelima, osobina TIM da stimulišu tumorsku progresiju je dobro proučena (70,77-79). Pokazano je da TIM imaju sposobnost da

stimulišu angiogenezu, invazivnost i imunosupresivnost tumora. TIM mogu da stimulišu angiogenezu sintezom i oslobađanjem različitih hemokina, uključujući IL-8, MIF, VEGF, TNF- α . Pokazano je da ovi hemokini omogućavaju tumorsku prokrvljenost kod karcinoma dojke, jajnika, endometrijuma i maligniteta centralnog nervnog sistema. Tumorska migracija i invazivnost takođe mogu biti stimulisane od strane protumorskih makrofaga. Matriksne metaloproteinaze, koje proizvode protumorske makrofage imaju važnu ulogu u tumorskoj invazivnosti (80-82). Nadalje, nakon infiltriranja u tumor, makrofage povećavaju proizvodnju katepsina-B, lizosomalne proteaze cisteinskog tipa, koji igra važnu ulogu u rastu tumora i pojavi metastaza u plućima (83). Osim dobro poznate uloge protumorskih makrofaga u stimulanju metastaza, mnoge studije su ispitivale ulogu makrofaga prisutnih u jetri u procesu pojave metastaza. Ranije se mislilo da makrofage ili Kupferove ćelije prisutne u jetri pacova imaju zaštitnu ulogu i da mogu da uklone cirkulišuće tumorske ćelije, s obzirom da uklanjanje Kupferovih ćelija dovodi do povećanog rasta tumora (84). Najnoviji dokazi zapravo pokazuju suprotno. Nedavni podaci su pokazali da Kupferove ćelije obezbeđuju esencijalne mitogene u hepatocelularnom karcinomu putem NF-kB-zavisnog signalnog puta (85).

Interakcija između makrofaga i tumorskih ćelija može dovesti do promena u tumorskoj ćelijskoj diferencijaciji uključujući pojavu epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) i fenotipova sličnog tumorskim matičnim ćelijama (engl. cancer stem-like phenotypes). EMT je proces koji omogućava epitelnim ćelijama da se odvoje od njihovih okružujućih ćelija i da migriraju u udaljene regione što ima za posledicu invazivnost i pojavu metastaza (86,87). Pokazano je da se kod nekih tumora EMT posredovana makrofagama može blokirati inhibitorima EGF receptora (receptor epidermalnog faktora rasta, engl. epidermal growth factor receptor) (88). Sva ova svojstva čine makrofage nezavisnim ciljnim ćelijama u okviru tumorskog mikrokruženja. Odabir makrofaga za farmakološki ciljne ćelije najverovatnije može poboljšati odgovor na konvencionalne hemioterapeutike kod solidnih tumora koji su rezistentni na hemioterapiju.

1.6. Bela imela (lat. *Viscum album* L)

Danas je veliki broj istraživanja usmeren na ispitivanje delovanja biološki aktivnih jedinjenja i proizvoda koji ih sadrže kao komplementarnih agenasa u hemioterapiji, sa ciljem da se smanje neželjena dejstava i poveća efikasnost hemioterapeutika prevazilaženjem rezistencije, a time bi se poboljšao i kvalitet života pacijenata obolelih od karcinoma.

Bela imela je poluparazitska biljka iz familije Santalaceae (Viscaceae). Poreklom je iz Evrope, zapadne i južne Azije. Raste u krošnjama različitih vrsta drveća (jabuka, bor, jela, javor, brest, breza) kao zimzeleni žbun sfernog oblika (Slika 1.2). Imela se smatra poluparazitskom biljkom jer je zavisna od domaćina po pitanju snabdevanja vodom i mineralima, ali samostalno sintetiše hlorofil. Imela sama produkuje sopstvene ugljene hidrate. Lekovita svojstva imaju mlade grančice i listovi i to samo tokom određenog perioda u godini. Prvi period branja bele imele je tokom proleća, a drugi od oktobra do sredine decembra. Bobice nisu za ljudsku upotrebu jer su otrovne (89).



Slika 1.2. Bela imela (lat. *Viscum album* L)

Često ovu vrstu dele u više podvrsta ili varijeteta na osnovu vrste domaćina na kome žive.

- *Viscum album* subsp. ***abietis***, na rodu *Abies* (jela).
- *Viscum album* subsp. ***album***, na rodovima *Malus* (jabuka), *Populus* (topola), *Tilia* (lipa), ređe na drugom listopadnom drveću kao što je drveće roda *Quercus* (hrast).
- *Viscum album* subsp. ***austriacum***, na rodovima: *Larix* (ariš), *Pinus* (bor), *Picea* (smreka).
- *Viscum album* subsp. ***meridianum***, na rodovima: *Acer* (javor), *Carpinus* (grab), *Juglans* (orah), *Prunus*, *Sorbus* (oskoruša).
- *Viscum album* subsp. ***creticum***, na vrsti *Pinus brutia*.
- *Viscum album* subsp. ***coloratum***.

1.6.1. Aktivne komponente bele imele

Najznačajnije i najintenzivnije proučavane biološki aktivne komponente bele imele su lektini i viskotoksini. Oba su toksična proteinska jedinjenja, ali se značajno razlikuju po svojoj molekularnoj strukturi, farmakološkoj aktivnosti i po mestu distribucije u samoj biljci. Ova biljka predstavlja značajan biološki izvor i drugih farmakološki aktivnih komponenti, pre svega: drugih proteina malih molekulskih masa, oligo i polisaharida, flavonoida, triterpenskih kiselina i dr. (90-92).

Lektini su heterogena grupa proteina koja na specifičan i reverzibilan način vezuje šećere i složene ugljene hidrate. Biljni lektini omogućavaju prepoznavanje stranih ugljenohidratnih molekula (glikana) i organizama u smislu aktivacije odbrambenog sistema. Do danas su iz ekstrakata imele izolovana četiri različita molekula lektina; ML-1 (engl. mistletoe lectin-1), ML-2, ML-3 i *Viscum album* hitin-vezujući aglutinin. ML-1 pokazuje specifičnost za D-galaktozidazu i najtoksičniji je od lektina. ML-2 je specifičan za D-galaktozidazu i N-acetil D-galaktozamin. ML-3 je specifičan za N-acetil D-galaktozamin (90,91). Lektini intereaguju sa eritrocitima i imunoglobulinima. ML-1 (naziva se i viskumin) je glikoprotein koji pripada grupi heterodimernih proteina. Svojim B lancem vezuje ugljene hidrate i aktivira makrofage, dovodi do oslobađanja citokina iz limfocita, inhibira oslobađanje histamina iz alergenom aktiviranih leukocita, kao i oslobađanje serotoninu iz kolagenom aktiviranih trombocita. A lanac ima enzimsku funkciju i odgovoran je za citotoksičan efekat lektina (90-94). Ovakva dvojna struktura lektina

ubrzava njegovo vezivanje za površinu ćelija sisara i omogućava da u ćeliju putem endocitoze dospe katalitički aktivan polipeptid koji zaustavlja sintezu proteina.

Viskotoksini su polipeptidi koji pokazuju ekstremnu stabilnost u odnosu na denaturaciju proteolizom ili delovanjem toplote. Sastav viskotoksina u ekstraktima imele zavisi od vrste domaćina. Viskotoksini pripadaju grupi tionina, familiji malih proteina prisutnoj samo kod viših biljaka. (91,95). Vezivanje viskotoksina za plazma membranu ćelija dovodi do promena u njenoj propustljivosti i citolize. Sprečavaju ulazak šećera u ćeliju, a omogućavaju „curenje“ kalijuma, fosfatnih jona, proteina i nukleotida iz ćelije. U *in vitro* uslovima tionini zaustavljaju ćelijski rast u koncentracijama sto puta većim od koncentracije lektina. Pokazano je da imaju imunomodulatorno dejstvo na granulocite i da mogu biti agonisti acetilholina (94,96-99).

Uloga **polisaharida** u ekstraktima imele nije u potpunosti razjašnjena (89,90). Uočeno je da primena kompletnog ekstrakta bele imele ima izraženije citotoksično i imunomodulatorno dejstvo od primene prečišćenih ekstrakata koji sadrže samo lektine i viskotoksine. U *in vitro* uslovima polisaharidi ne pokazuju citotoksično dejstvo, ne utiču na metabolizam ćelija u kulturi i ne dovode do povećanja fagocitne aktivnosti granulocita i makrofaga. Iako samostalno ne pokazuju citotoksična i imunomodulatorna svojstva, moguće je da u kompletnim ekstraktima bele imele dolazi do sinergizma sa drugim komponentama. Postoje dokazi koji ukazuju na interakciju između arabinogalaktana i galaktoza specifičnih lektina (ML-1). Aglutinacija ćelija imunskog sistema je pod dejstvom lektina intenzivnija u prisustvu polisaharida (100).

Alkaloidi su nitrogena jedinjenja koja pružaju zaštitu od životinja i parazitskih infekcija. Smatra se da su alkaloidi prisutni u imeli karakteristični za domaćina.

Triterpenske kiseline su velika i raznovrsna grupa organskih jedinjenja, prisutna kod različitih biljnih vrsta. Štite biljku od parazitske infekcije i biljojeda. U *in vitro* uslovima pokazano je da triterpenske kiseline samostalno i u kombinaciji sa lektinima dovode do apoptotske ćelijske smrti tumorskih ćelija, delovanjem kaspaza (101,102).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja istraživanja na ćelijama u kulturi i na životinjskim modelima, su pokazala da potencijalni mehanizmi delovanja sastojaka bele imele uključuju antitumorsko, antiinflamatorno i imunomodulatorno dejstvo. Pored intezivnog ispitivanja, mehanizam antitumorskog dejstva ekstrakata bele imele je još uvek u velikom obimu nepoznat. Malo je i podataka o mehanizmu interakcije bioaktivnih komponenti bele imele i drugih antitumorskih citotoksičnih lekova, koji bi pružili zasnovanost daljem kliničkom ispitivanju.

Shodno prethodno navedenom, formulisali smo dve radne hipoteze:

1. Ekstrakt bele imele senzibilise tumorske ćelijske linije u kulturi pri subterapeutskim koncentracijama doksorubicina.
2. Primena komplementarne terapije ekstaktom bele imele dovodi do poboljšanja kvaliteta života i smanjuje incidencu neutropenije kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke lečenih standardnim hemioterapijskim protokolom.

Na osnovu postavljenih hipoteza definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati citotoksični efekat ekstrakta bele imele i molekularne mehanizme interakcije bioaktivnih komponenti ekstrakta sa doksorubicinom u kulturi ćelijskih linija karcinoma dojke (MDA-MB-231 i MCF7), karcinoma debelog creva (T84), hronične mijeloidne leukemije (K562) i akutne T ćelijske leukemije (Jurkat);
2. Ispitati imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele na ćelije imunskog sistema *in vitro* i *in vivo* kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na terapiji ciklofosamidom, adrijamicinom i 5-fluoro-uracilom (CAF), u trajanju od šest ciklusa.

U skladu sa postavljenim ciljevima definisani su sledeći istraživački zadaci:

1. Ispitati citotoksično/antiproliferativno dejstvo ekstrakta bele imele na tumorske ćelijske linije u prisustvu/odsustvu doksorubicina *in vitro*

2. Ispitati proapoptotsko dejstvo ekstrakta bele imele na tumorske ćelijske linije u prisustvu/odsustvu doksorubicina *in vitro*.
3. Ispitati uticaj ekstrakta bele imele na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa u prisustvu/odsustvu doksorubicina *in vitro*.
4. Ispitati signalne puteve kojima ekstrakt bele imele ispoljava citotoksični/antiproliferativni efekat na tumorske ćelijske linije u prisustvu/odsustvu doksorubicina *in vitro*.
5. Ispitati dejstvo ekstrakta bele imele na aktivacioni status trombocita zdravih osoba *in vitro*.
6. Ispitati dejstvo ekstrakta bele imele na aktivaciju ćelijske linije monocita, THP-1, samih i u prisustvu trombocita *in vitro*.
7. Ispitati dejstvo ekstrakta bele imele na broj i distribuciju subpopulacija leukocita periferne krvi pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, na terapiji ciklofosfamidom, adrijamicinom i 5-fluoro-uracilom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Antitela

1. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD3 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
2. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD4 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
3. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD8 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
4. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD19 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
5. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD56 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
6. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju HLA-DR antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
7. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD61 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
8. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD62P antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
9. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju PAC-1 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
10. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD11b antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
11. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju ćelija koje eksprimiraju CD14 antigen. (BD Biosciences Jose, CA, USA),
12. Mišje monoklonsko anti-humano antitelo za identifikaciju IgM (BD Biosciences Jose, CA, USA),
13. Kozje anti-mišije antitelo za identifikaciju Ig (BD Biosciences Jose, CA, USA),

14. Mišje anti-humano Cyclin B1 antitelo (BD Pharmingen San Diego, CA, USA),
15. Mišje anti-humano Cyclin D1 antitelo (BD Pharmingen San Diego, CA, USA),
16. Mišje monoklonsko antitelo specifično za humani Bax protein (BD Pharmingen San Diego, CA, USA),
17. Mišje monoklonsko antitelo specifično za humanu kaspazu 3 (BD Pharmingen San Diego, CA, USA),
18. Mišje monoklonsko antitelo specifično za humani p21 (Calbiochem, Merck Biosciences, Nemačka).

3.2. Ekstrakt bele imele

1. Komercijalni preparat, Helixor A (Helixor[®] Heilmittel GmbH & Co., Rosenfeld, Germany) je standardizovani vodeni rastvor ekstrakta bele imele (lat. *Viscum album L.*) sa jelinog drveta (lat. *Abies alba*). Ampule su zapremine 1ml i sadrže 1, 5, 10, 20, 30 ili 50 mg svežeg ekstrakta biljke u izotoničnom slanom rastvoru. Proizvodnja podrazumeva specijalne tehnike mešanja, bez fermentacije. Ekstrakt ne sadrži nikakve dodatke, sem natrijum hlorida da bi se dobio slani rastvor i natrijum hidroksida kojim se podešava pH vrednost.

2. Komercijalni preparat Iscador M (IsCADOR[®] M, Weleda AG, Schwabisch Gmund, Germany), dobijen je fermentacijom vodenog rastvora ekstrakta svežeg biljnog materijala bele imele sakupljene sa drveta jabuke (lat. *Malus domestica*). Fermentisani ekstrakt je pakovan u staklene ampule od 1ml u izotoničnom rastvoru, u dozama koje odgovaraju 0.01; 0.1; 1; 2; ili 5 mg sveže biljke. Dva puta godišnje se beru jednogodišnji i dvogodišnji izdanci i listovi. Za fermentaciju se pored svežeg biljnog materijala koriste voda i specijalna kultura Lactobacilli, a nakon tri dana ekstrakcije, presovanjem se uklanja čvrsti biljni material. Nakon ovog perioda postiže se ravnoteža ekstrakta koji je stabilizovan nastalom mlečnom kiselinom. Ekstrakti dobijeni od zimskog i letnjeg branja se spajaju u odnosu 1:1 u posebnim mešalicama.

3. Ekstrakt bele imele (VA ekstrakt) dobijen ultra-zvučnom metodom. Lišće bele imele je brano sa biljke koja raste na drvetu jabuke (*Malus domestica B.*) u zapadnom

regionu Srbije. Vodeni rastvor ekstrakta je dobijen od sveže samlevenog lišća ultrazvučnom ekstrakcijom (20min; 360W), pri čemu je odnos rastvarač:čvrsta masa 20:1(v/w). Dobijena smesa je centrifugirana (2000 rpm/10 min) i profiltrirana kroz membranu čije su pore 0.45 µm (Whatman, UK). Zatim je u triplikatu, analiziran ukupni sadržaj proteina i ukupni sadržaj fenola u dobijenom ekstraktu. Sadržaj ukupnih proteina u ekstraktu određivan je metodom po Bradford-u, pri čemu je goveđi serum albumin korišćen kao standard (100-1000 µg/mL) i iznosio je 404 ± 12 µg/mL. Ukupan sadržaj fenola u ekstraktu je određivan Folin-Ciocalteu metodom, pri čemu je galna kiselina korišćena kao standard (100-1000 µg/ml) i iznosio je 313 ± 9 µg ekvivalenta galne kiseline/mL. U svim *in vitro* eksperimentima koncentracija ekstrakta je izražena u µg/mL ukupnih proteina.

3.2.1. Bradford-ova metoda

Metoda korišćena za određivanje koncentracije proteina je Bradford-ova metoda (103). Zasniva se na merenju pomeranja apsorbancije slobodne boje Comassie Brilliant Blue u odnosu na vezanu, sa 470 nm na 595 nm.

Test je rađen u mikrotitracionim pločicama (F tip), a apsorbancija je očitavana ELISA čitačem Multiskan Ascent Photometric reader (Thermo Labsystems), uz odgovarajući filter. Boja se rastvori u etanolu uz mešanje na magnetnoj mešalici, zatim se dodaju kiselina i voda do potrebne zapremine. Pre upotrebe, boja se razblaži pet puta vodom i filtrira. U 200 µL rastvora boje se odmeri 20 µL uzorka i nakon 5 minuta se očitava apsorbancija, uz filter, na 620 nm.

Rastvor boje:

CBB G-250	250 mg
95% etanol	50 mL
fosforna kiselina, 96%	100 mL
destilovana voda do	200 mL

Za konstruisanje kalibracione prave se koristi rastvor goveđeg serum albumina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) koncentracije 0.1 mg/mL koji se razblaži vodom do finalnih koncentracija 0.075 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.010 mg/mL.

Koncentrat BSA (0.1 mg BSA/mL)

BSA	1 mg
destilovana voda do	10 mL

Pripremanje standardnih rastvora BSA u opsegu koncentracija 0.01-0.1 mg/mL:

štok BSA 0.1mg/mL (μ L)	vode (μ L)	finalna koncentracija BSA (mg/mL)
100	0	0.10
75	25	0.075
50	50	0.05
25	75	0.025
10	90	0.01

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u analiziranom ekstraktu određivan je spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (104,105). Na 0.125 mL ekstrakta dodato je 0.125 mL razblaženog (1:10) FC reagensa i 0.5 mL vode. Posle 6 min, dodato je 1.25 mL 7% Na-karbonata i 0.75 mL vode. Nakon 90 minuta inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 765 nm. U istim eksperimentalnim uslovima izmerena je apsorbancija reakcionih proizvoda serije razblaženja galne kiseline (0-600 μ g/mL) i konstruisana standardna kriva. Slepa proba sadrži vodu umesto ekstrakta. Za standardnu krivu koristi se galna kiselina u destilovanoj vodi po sledećem obrascu:

1. 600 μ g/mL (30mg/50mL)
2. 300 μ g/mL
3. 150 μ g/mL
4. 75 μ g/mL
5. 37.5 μ g/mL
6. 18.75 μ g/mL
7. 9.375 μ g/mL

Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po g ekstrakta. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

3.3. Čelijske linije

Materijal i aparati korišćeni u održavanju ćelijskih linija:

1. Posude za gajenje ćelijskih linija (NUNC)
2. CO₂ inkubator

Supstance i rastvori korišćeni u održavanju ćelijskih linija:

1. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medijum (Sigma Chemicals Co, USA)
2. DMEM medijum (Sigma Chemicals Co, USA)
3. Penicilin (192 U/ml)
4. Streptomycin (200 µg/ml)
5. 4-(2-hidroksietil)-piperazine-1-etansulfonična kiselina (HEPES) (25 mM)
6. L-glutamine (3 mM)
7. 10% inaktivisani teleći fetalni serum-FCS pH 7.2

Sve ćelijske linije korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji dobijene su od American Type Culture Collection (Rockville, MD), a to su: MDA-MB-231 i MCF 7 (karcinom dojke), HT 84 (karcinom debelog creva), K562 (hronična mijeloidna leukemija), Jurkat (akutna T ćelijska leukemija), THP-1 (akutna monocitna leukemija).

Hranljivi RPMI 1640 medijum je rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi, nakon čega su dodati: penicilin (192 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), HEPES (25 mM), L-glutamin (3 mM) i 10% FCS (pH 7.2). Hranljivi DMEM medijum je rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi, nakon čega su dodati: penicilin (192 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), kao i 10% FCS (pH 7.2). Čelije su gajene na 37°C u 5% CO₂ u atmosferi povećane vlažnosti.

Za sve urađene eksperimente u pripremi ćelija za analizu bilo je potrebno koristiti:

1. Ploče sa 6 bunara
2. Vorteks mešalicu

3. CO₂ inkubator

4. centrifugu

3.4. MTT test

Materijal i aparati korišćeni pri izvođenju eseja:

1. Mikrotitar ploče sa ravnim dnom sa 96 bunara

Supstance i rastvori korišćeni pri izvođenju eseja:

1. Tripsin
2. Hranljivi medijum za ćelijske kulture
3. MTT (Sigma-Aldrich, USA)
4. SDS

Tumorske ćelijske linije su sađene u 100µl podloge u mikrotitar ploče sa ravnim dnom sa 96 bunara; MDA-MB-231 (4000 ćelija/otvoru), MCF7 (5000ć/o) i HT84 (15000 ć/o) i 20 h kasnije, posle ćelijske adherencije pet različitih koncentracija ispitivanih agenasa dodate su u bunare ploča. Neadherentne ćelije, K562 (5000 ć/o), Jurkat (7000ć/o), su sađene 2 h pre dodavanja supstanci. Po dodavanju supstanci ćelije su inkubirane 72 h na 37°C u vazduhu zasićenom vodenom parom i 5 % CO₂. Po isteku 72 h u bunare ploča dodato je po 20 µl rastvora MTT-a (5 mg/ml u PBS-u) i ćelije su inkubirane 4h. Redukcija MTT-a u obojeni formazan prekinuta je nakon 4h dodavanjem 100 µl 10 % SDS-a. Apsorbanca je merena na 570 nm 24 h kasnije.

Svaka koncentracija ispitivanih jedinjenja testirana je i primenjena u triplikatu na svakoj ćelijskoj liniji. Citotoksična aktivnost određivana je MTT testom (106). MTT test je kolorimetrijska metoda bazirana na redukciji tetrazolijumskih soli, a koristi se za kvantifikaciju ćelijske proliferacije. Tetrazolijumske soli se u metabolički aktivnim ćelijama brzo redukuju do formazana. S obzirom da su formazani intenzivno obojeni, ove soli mogu biti kolorimetrijski reagens za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija. Kao mera citotoksične aktivnosti izračunata je IC₅₀ vrednost, koja je kasnije predstavljala osnovni polazni parametar u daljem eksperimentalnom dizajnu. IC₅₀ vrednost

predstavlja koncentraciju ispitivanog agensa koja u tretiranoj ćelijskoj populaciji smanjuje broj vijabilnih ćelija na 50%, u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama. Procenat kontrole računat je na sledeći način:

$$\% \text{ kontrole} = [\text{ODt} - \text{ODb}] / [\text{ODc} - \text{ODb}]$$

gde ODt predstavlja srednju vrednost očitane apsorbance tretiranih ćelija, ODb predstavlja srednju vrednost očitane apsorbance blanka, a ODc predstavlja srednju vrednost očitane apsorbance kontrolnih ćelija. IC₅₀ vrednost je izračunata matematičkim modeliranjem korišćenjem sigmoidne krive u GraphPad Prism programu.

3.5. Citometrijska analiza ćelija periferne krvi

Materijal i aparati:

1. BD Vacutainer 3 ml, K2E 5.4 mg,
2. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL,
3. Protočni citometar (Fluorescence Activated Sorting Cells-FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA),

Supstance i rastvori:

1. BD FACS lysing solution (X10), rastvor za liziranje eritrocita
2. BD CellWASH, rastvor za ispiranje ćelija
3. BD CellFIX (X10), rastvor za fiksiranje obeleženih ćelija

Kvantitativno merenje ekspresije antigena na površini limfocita je određivano FACS Calibur protočnim citometrom, analizom ćelija nakon bojenja odgovarajućim antitelima; CD3-FITC/CD8-PE/CD4-PerCP, HLA-DR-FITC/CD-19PE/CD3-PerCP, HLA-DR-FITC/CD56-PE/CD3-PerCP. Tokom izvođenja studije antitela koja su korišćena bila su uvek obeležena istom fluorescentnom bojom i imala su isti LOT broj. Ćelije su obeležavane odgovarajućim antitelima prema uputstvu proizvođača. Analiza je vršena Cell Quest Pro kompjuterskim softverom.

U BD epruvete je sipano po 20 μ L odgovarajućih antitela i u svaku je dodavano po 100 μ L pune krvi. Promešane su blago na vorteksu i inkubirane 15-30 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u BD epruvete je sipano po 2 mL 1X BD FACS lysing solution, blago vorteksirano i ostavljeno da stoji 10 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Zatim su epruvete centrifugirane 5 minuta na 300 x g, supernatant je odstranjen i sipano je po 2 mL BD CellWASH-a i centrifugirane 5 minuta na 200 x g. Odstranjen je supernatant i sipano je po 0.5 mL 1X BD CellFIX. Uzorak spreman za analizu čuvan je na temperaturi od 2° do 8° C najviše do 24 h.

3.6. Citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Materijal i aparati:

1. Protočni citometar (Fluorescence Activated Sorting Cells-FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA),
2. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer-1×PBS (9.1 mM Na_2HPO_4 ; 1.7 mM NaH_2PO_4 ; 150 mM NaCl, pH=7.4)
2. 70% $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
3. RNase A (1mg/ml)
4. Propidijum jodid-PI (400 μ g/ml)

Kvantitativno merenje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je određivano FACS Calibur protočnim citometrom, analizom DNK sadržaja etanolom fiksiranih K562 i MCF7 ćelija, nakon bojenja propidijum jodidom (107). Ćelijski ciklus je analiziran korišćenjem FACSCalibur protočnog citometra i Cell Quest Pro kompjuterskog softvera.

K562 i MCF7 ćelijske linije u eksponencijalnoj fazi rasta, su izložene dejstvu VA ekstrakta u odgovarajućim koncentracijama ukupnih proteina i doksorubicina (Dox), pojedinačno i u kombinaciji. Nakon neprekidnog tretmana u trajanju od 72 sata, ćelije su pokupljene iz bunara i prebačene u BD epruvete, isprane dva puta hladnim, fosfatnim

puferom (PBS) i fiksirane hladnim 70% etanolom, 30 minuta na temperaturi od -20° C. Fiksirane ćelije su isprane PBS-om, inkubirane sa RNase A (1mg/ml) 30 minuta na 37°C. Neposredno pre protočno citometrijske analize ćelije su bojene propidijum jodidom (400 µg/ml), u trajanju od 15 minuta.

3.7. Određivanje distribucije ćelija prema različitim tipovima ćelijske smrti

Materijal i aparati:

1. Protočni citometar (FACSCalibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA)
2. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL,

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer-1×PBS (9.1 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl, pH=7.4)
2. Annexin V-FITC kit za detekciju apoptoze (BD Biosciences, Pharmingen San Diego, CA, USA).
3. Pufer za vezivanje (PV) (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)

Procenat apototičnih K562 i MCF7 ćelija tretiranih ispitivanim supstancama je određivan korišćenjem Annexin V-FITC kita za detekciju apoptoze (prema uputstvu proizvođača). 1×10⁶ ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u odgovarajućoj koncentraciji ukupnih proteina i Dox, pojedinačno i u kombinaciji, tokom 24 h, 48 h i 72 h. Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije, ćelije su prebačene u BD epruvete i isprane dva puta hladnim PBS-om. Zatim su resuspendovane u 200 µl PV i dodato je 5 µl Annexin V-FITC i 5 µl propidijum jodida. Ćelije su blago promućkane i inkubirane 15 minuta na 25°C, u mraku. Nakon toga, 400 µl pufera za vezivanje je dodato u svaku epruvetu i analizirano na BD FACS Calibur protočnom citometru koristeći Cell Quest Pro kompjuterski softver.

3.8. Intraćelijska analiza ciklina

Materijal i aparati:

1. Protočni citometar (FACSCalibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA),
2. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer-1×PBS+ 1% BSA (bovine serum albumin),
2. BD Pharmingen Cyclin B1 Antibody Reagent Set, za detekciju Ciklin B1 proteina,
3. BD Pharmingen Cyclin D1 Antibody Set, za detekciju Ciklin D1 proteina,
4. BD CellFIX (X10) rastvor za fiksiranje ćelija
5. BD FACS Permeabilizing Solution 2 (X10)-BD Perm 2 , rastvor za permeabilizaciju ćelijske membrane
6. 70% CH₃CH₂OH
7. RNase A u PBS-u (1mg/ml)
8. Propidijum jodid-PI u PBS-u(400 µg/ml)

Kvantitativno prisustvo proteina ciklina B1 i ciklina D1 unutar K562 i MCF7 ćelija određivan je upotrebom odgovarajućeg seta antitela za njihovu detekciju (108). 1×10^6 ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u odgovarajućoj koncentraciji ukupnih proteina i Dox, pojedinačno i u kombinaciji, tokom 24 h, 48 h i 72 h. Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije, ćelije su prebačene u BD epruvete i isprane dva puta hladnim PBS-om sa 1% BSA. Na talog ćelija dodato je 500 µL 1X BD CellFIX-a i inkubirano 15 min u mraku na sobnoj temperaturi. Zatim su epruvete centrifugirane 5 minuta na 600 x g. Supernatant je odbačen, a ćelije su oprane sa 1 mL PBS+1% BSA. Nakon ispiranja, na ćelije je sipano kap po kap 2mL hladnog (-20° C) 70% etanola, sve vreme mućkajući na vorteksu. Ćelije su inkubirane 1h u mraku na -20° C, nakon čega su centrifugirane 5 minuta na 600 x g. Supernatant je odbačen, a ćelije su oprane 1mL PBS+1% BSA. Na talog ćelija je sipano 1mL 1X BD Perm 2 i inkubirano 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Epruvete su centrifugirane 5 minuta na 600 x g, odliven je supernatant i oprane su sa 1mL PBS+1%

BSA. Na talog ćelija je sipano 100 μL PBS+1% BSA i podeljeno u dve BD epruvete. U prvu je sipano 20 μL izotipske kontrole, a u drugu 20 μL odgovarajućeg anti-ciklinskog antitela. Ćelije su promućkane na vorteksu i ostavljene da se inkubiraju preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$. Nakon toga isprane su dva puta sa po 1mL PBS+1% BSA, centrifugirane i supernatant je odbačen. Na talog ćelija dodato je 270 μL PBS-a, 80 μL štoka RNA-ze (finalne koncentracije 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i 50 μL štoka PI (finalne koncentracije 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Analiza je rađena odmah po isteku inkubacije na BD FACS Calibur protočnom citometru, koristeći Cell Quest Pro kompjuterski softver.

3.9. Analiza ulaska/izlaska doksorubicina

Materijal i aparati:

1. Protočni citometar FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA),
2. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL

Za analizu ulaska Dox u ćelije, 0.2×10^6 ćelija je sađeno u ploče sa šest otvora i tretirano:

1. VA ekstraktom (K562 ćelije i limfociti sa 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukunih proteina, odnosno MCF7 ćelije sa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox (0.5 μM u K562 ćelije i limfocite, odnosno 0.1 μM u MCF7 ćelije) do 24 sata,
2. VA ekstraktom 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodata VA-Dox kombinacija do 24 sata,
3. Hranjivi medijum 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox do 24 sata
4. VA-Dox kombinacija 24 sata,
5. Dox 24 sata.

Nakon 24 sata tretmana, ćelije su isprane i ulazak Dox u ćelije je meren citometrijski.

Za analizu izlaska Dox iz ćelija, ćelije su isprane nakon 24 sata maksimalnog ulaska Dox u ćelije. Zatim su inkubirane svežim hranjivim medijumom bez Dox ili sa medijumom koji sdraži VA ekstrakt. Nakon 24 sata ćelije su isprane i količina Dox koja je izašla iz ćelija je merena citometrijski (109).

3.10. Merenje mitohondrijskog membranskog potencijala

Materijal i aparati:

3. Protočni citometar FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA),
4. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer, 1×PBS (9.1 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl, pH=7.4)
2. Rodamin-123, Rh-123 (2.5 µg/ml finalna koncentracija) (Sigma-Aldrich, USA)

Mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\psi_m$) je meren korišćenjem katjonske boje Rh123 (110). Rodamin 123 je lipofilna katjonska fluorescentna boja koja se inkorporira u žive metabolički aktivne mitohondrije preko transmembranskih proteina. Može biti vezana za unutrašnju mitohondrijsku membranu ili se nalaziti u matriksu. 5×10^5 K562 i MCF7 ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u odgovarajućim koncentracijama ukupnih proteina i Dox, pojedinačno i u kombinaciji, tokom 24 h, 48 h i 72 h. Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije, ćelije su prebačene u BD epruvete i isprane dva puta hladnim PBS-om. Ćelije su bojene sa 200 µl Rh-123, 30 minuta na 37°C. Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su analizirane na BD FACS Calibur protočnom citometru, koristeći Cell Quest Pro kompjuterski softver.

3.11. β -galaktozidazno bojenje

Materijal i aparati:

1. Suvi inkubator
2. polipropilenske epruvete
3. Svetlosni mikroskop (Olimpus Bx51, Olympus Optical, Tokyo)

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer, 1×PBS (9.1 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl, pH=7.4),
2. N-N-dimetilformamid (DMF)
3. Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling technology, Inc, Danvers, MA, USA)
 - Fixative solution, 10X (20% formaldehid 2% glutaraldehid)
 - X-gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-βD-galaktopiranozid prah)
 - Staining Solution, 10X (400 mM limunska kiselina/natrijum fosfat (pH 6.0), 1.5 M NaCl, 20mM MgCl₂)
 - Staining Solution Supplement A, 100X (500mM kalijum ferocijanid)
 - Staining Solution Supplement B, 100X (500mM kalijum fericijanid)
4. 70% glicerol

Detekcija senescentnih ćelija je vršena pomoću β-galaktozidaze koja je aktivna na pH 6 i karakteristična za senescentne ćelije (111). Nije prisutna u presenescentnim, mirujućim ili proliferišućim ćelijama.

Svi rastvori su napravljeni neposredno pre primene. 20 mg X-gal rastvoreno je u 1mL DMF-a, čime se dobije 20X koncentrovan rastvor. Za svaki bunarčić (35mm) koji je trebalo obojiti, bilo je pripremljeno po 1mL rastvora za bojenje β-galaktozidazom (polipropilenske epruvete) i sadržao je 930 μL 1X Staining Solution, 10 μL Staining Supplement A, 10 μL Staining Supplement B i 50 μL 20mg/mL X-gal u DMF-u. Nakon pripreme rastvora za bojenje proveravana je njegova u pH vrednost koja je morala biti u opsegu 5.9 - 6.1.

1×10⁶ ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u odgovarajućoj koncentraciji ukupnih proteina i Dox, pojedinačno i u kombinaciji, tokom 72 h. Nakon tog perioda hranljivi medijum je uklonjen i ćelije su oprane sa 2 mL PBS-a. Supernatant je uklonjen i na ćelije je sipano 1mL Fixative Solution. Ćelije su ostavljene da se fiksiraju tokom 10-15 minuta na sobnoj temperaturi i oprane dva puta sa po 2mL PBS-a. U svaki od bunarčića (35mm) sipano je po 1mL rastvora za bojenje β-galaktozidazom i ostavljene su u suvom inkubatoru

na 37° C preko noći da se inkubiraju. Za dobijanje trajnih preparata uklanjan je rastvor za bojenje β-galaktozidazom ispiranjem sa PBS-om, ćelije su nanošene na mikroskopske pločice i pokrivane sa 70% glicerolom.

3.12. Test formiranja kolonija

Materijal i aparati:

1. Petri šolje 35 mm (Falcon)
2. Svetlosni mikroskop (Olimpus Bx51, Olympus Optical, Tokyo)

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer, 1×PBS (9.1 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl, pH=7.4),
2. Cell Resuspension Solution (R&D Systems, Minneapolis, USA),
3. Human methylcellulose complete media (R&D Systems), humani metilcelulozni kompletni medijum

1×10⁵ K562 ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u koncentraciji od 0.8 i 1.6 μg/mL ukupnih proteina i Dox u koncentraciji od 0.5 μM, pojedinačno i u kombinaciji, tokom 24 h. Nakon inkubacije, ćelije su oprane PBS-om i resuspendovane u Cell Resuspension rastvoru. Nakon toga 0.5×10⁴ ćelija/mL tretiranih K562 ćelija je pomešano sa humanim metilceluloznim kompletnim medjumom (1mL). Ćelije su zatim prebačene u 35 mm plastične petri šolje. Kolonije K562 (>50 ćelija) su brojane sedmog dana (112). Svi tretmani rađeni su u duplikatu.

3.13. Analiza ekspresije gena metodom Real-time PCR

Materijal i aparati:

1. Kvantitativni Real-time PCR (qRT-PCR) ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA)

Supstance i rastvori:

1. Fosfatni pufer, 1×PBS (9.1 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl, pH=7.4)
2. TRI REAGENT[®] BD kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
3. MultiScribe[™] Reverse Transcriptase, High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (50 U/μL, Applied Biosystems, CA, USA).
4. TaqMan[®] Gene Expression Assays, TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Cat. # 4331182, Cat. # 4331182, Cat. # 4331182, Cat. # 4331182)

Za izolaciju ukupne RNK ćelije su lizirane pomoću TRI REAGENT BD kit. Prevođenje RNK (2 μg) u cDNK je rađeno korišćenjem nasumičnih prajmera i MultiScribe[™] reverzne transkriptaze. Svi ciljni transkripti (Bax, Casp3, p21 i IGF-1R) su detektovani korišćenjem qRT-PCR. Da bi se isključile varijacije koje su posledica dodavanja različite količine iRNK u reakcionu smesu, dobijeni rezultati su normalizovani u odnosu na housekeeping gen, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH). PCR reakcija je izvršena na ABI Prism 7700 Sequence Detection System-u, a fluorescenca je praćena u realnom vremenu. Uslovi termalnih ciklusa su se sastojali od sledećih koraka: denaturacija na 95°C 10 minuta, zatim sledi 40 cilusa denaturacije na 95°C 15 sekundi i hibridizacija prajmera sa matricom i ekstenzija na 60°C 1 minut. Finalna zapremina reakcione smese je bila 20μl. Svaka reakcija je izvođena u dupikatu i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta.

3.14. Citometrijska analiza proteina Bax, Caspasa-3 i p21

Materijal i aparati:

1. Protočni citometar (FACSCalibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA),
2. BD Falcon 12 x 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL

Supstance i rastvori:

1. Hranljivi medijum za ćelijske kulture,
2. Fosfatni pufer-1×PBS+ 1% BSA (bovine serum albumin),

3. Cytotfix/Cytoperm rastvor (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)
4. Perm/Wash pufer (BD Pharmingen, San Diego, USA)

1×10^6 K562, odnosno MCF7 ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u odgovarajućoj koncentraciji ukupnih proteina i Dox, pojedinačno i u kombinaciji, tokom 72 h. Nakon inkubacije, ćelije su prebačene u BD epruvete i isprane dva puta hladnim PBS-om i resuspendovane u Cytotfix/Cytoperm rastvoru 20 minuta na ledu. Oprane su dva puta sa Perm/Wash puferom na sobnoj temperaturi i resuspendovane u Perm/Wash puferu. U ovako pripremljene ćelije dodato je odgovarajuće monoklonsko antitelo (anti-Bax, anti caspasa-3, ili anti-p21) i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi. Zatim su ćelije oprane tri puta sa PBS+1% BSA, resuspendovane u PBS+1% BSA i dodato im je FITC obeleženo anti-mišije antitelo. Inkubirano je 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su ćelije oprane 2 puta u PBS+1% BSA i resuspendovane u PBS-u. Ćelije su pripremljene za analizu prema proceduri proizvođača i analizirane na BD FACS Calibur protočnom citometru, koristeći Cell Quest Pro kompjuterski softver.

3.15. Određivanje parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa leukocitima

3.15.1. Uzorkovanje krvi

Krv zdravih dobrovoljaca uzorkovana je na tašte, nakon najmanje 12h gladovanja, u ranim jutarnjim časovima (8-9h), a uzorkovanju je prethodio period potpunog mirovanja u trajanju od najmanje 20 minuta. Krv je uzorkovana u skladu sa standardnim protokolima za određivanje markera aktivacije trombocita i agregacije trombocita i leukocita metodom protočne citometrije (113,114), koji podrazumevaju venepunkciju bez upotrebe poveske, korišćenje igle sa najmanjim promerom od 21g, netraumatičnu venepunkciju i odbacivanje najmanje 2 mL krvi na početku uzorkovanja. Krv je uzorkovana u *Vacutainer* epruvetama sa natrijum-citratom (0.9%) kao antikoagulansom. Uzorci krvi su korišćeni u daljoj analizi odmah po venepunkciji, uz minimalnu manipulaciju uzoraka, na sobnoj temperaturi.

3.15.2. Određivanje parametara aktivacije trombocita

Kao markeri aktivacije trombocita određivani su površinski antigeni P-selektin i GPIIb-IIIa nakon delovanja agonista. Ekspresija ovih antigena određivana je korišćenjem anti-humanih anti-CD61, anti-CD62P i PAC1 antitela, obeleženih fluorescentnim bojama, primenom protočne citometrije.

Puna krv ispitanika je odmah nakon venepunkcije razblažena HTP rastvorom u odnosu 1:10. Alikvoti razblažene krvi (70 μ L) neposredno po razblaživanju ili nakon inkubacije sa određenim agensima, uključujući i kontrolu, obeleženi su anti-CD61-PerCP, anti-CD62P-PE i PAC-1-FITC antitelima (20 μ L) i odmah nakon toga tretirani rastvorom agonista, adenzin-difosfatom (ADP) u finalnoj koncentraciji od 0.25 μ M. Nakon dodavanja agonista uzorci su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završene inkubacije uzorci su fiksirani dodatkom CellFix rastvora (350 μ L), inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i odmah analizirani na protočnom citometru. Anti-humana IgG1-FITC, IgG2-PE i IgM-FITC antitela korišćena su kao izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezivanja antitela. Ekspresija analiziranih markera aktivacije određivana je u populaciji od 20000 trombocita (CD61 pozitivnih ćelija, CD61⁺) i izražena kao procenat P-selektin i GPIIbIIIa pozitivnih trombocita (CD62P⁺CD61⁺, PAC-1⁺CD61⁺ ćelija) u ukupnoj populaciji analiziranih trombocita i kao geometrijska sredina intenziteta fluorescencije ukupne populacije trombocita (engl. mean fluorescence intensity, MFI), srazmerna prosečnoj gustini aktivacionih markera na pojedinačnom trombocitu. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost dva uzastopna određivanja. Dodatno, pojedini rezultati su prikazani i kao „indeks aktivacije trombocita“ -IAT (engl. index platelet activation, IPA) za svaki od određivanih antigena, kao proizvod udela antigena pozitivnih trombocita u analiziranoj populaciji trombocita i odgovarajuće MFI vrednosti, na osnovu jednačine $MPA = \% \times MFI / 100$, kao pokazatelja relativnog broja antigena na površini antigen-pozitivnih trombocita (115).

3.15.3. Određivanje parametara aktivacije trombocita u in vitro eksperimentalnim uslovima

Za ispitivanje delovanja ekstrakta bele imele u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, prethodno opisana metoda modifikovana u skladu sa metodom Frelingera i saradnika (116). Alikvoti (1 mL) uzoraka krvi ispitanika prethodno razblažene HTP rastvorom u odnosu 1:10. inkubirani su sa različitim koncentracijama (1.0; 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) VA ekstrakta u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije 70 μL krvi tretirane ispitivanim ekstraktom obeleženo je anti-CD61-PerCP, anti-CD62P-PE i PAC1-FITC antitelima i tretirano rastvorom ADP-a, kao agonista aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od 0.25 μM . Dalje su uzorci procesuirani na način kako je to prethodno opisano.

3.15.4. Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima

Agregati trombocita sa monocitima, TMA (engl. platelet-monocyte aggregates, PMA) u ukupnoj populaciji monocita i agregati trombocita sa neutrofilima, TNA (engl. platelet-neutrophil aggregates, PNA) u ukupnoj populaciji neutrofila određivani su nakon delovanja agonista. Heterotipski agregati trombocita određivani su korišćenjem anti-humanih anti-CD61, anti-CD11b i anti-CD14 antitela, obeleženih fluorescentnim bojama, primenom protočne citometrije. U eksperimentalnom radu korišćen je protočni citometar BD FACSCalibur, sa integralnim CellQuest Pro softverom za analizu dobijenih podataka.

Agregati trombocita sa monocitima i neutrofilima određivani su korišćenjem pune krvi ispitanika po prethodno opisanim metodama (114,117) Alikvoti pune krvi ispitanika (65 μL) su odmah nakon venepunkcije ili nakon inkubacije sa određenim agensima, obeleženi anti-CD61-FITC, anti-CD11b-PE i/ili anti-CD14-PerCP antitelima (20 μL) i odmah nakon toga tretirani rastvornom agonista, ADP-om u finalnoj koncentraciji od 0.25 μM . Nakon dodavanja agonista ili HTP-a uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završene inkubacije uzorci su lizirani dodatkom CellLysing rastvora (1mL), inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, ispirani dva puta

rastvorom HTP-a, fiksirani CellFix rastvorom (350 μ L), inkubirani 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi i odmah analizirani na citometru. Anti-humana IgG1-FITC, IgG2-PE i IgG1-PerCP antitela korišćena su kao izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezivanja antitela. Monociti i neutrofilni su identifikovani na osnovu specifičnih karakteristika u pogledu veličine i granularnosti, koje rezultuje karakterističnim položajem na FSC/SSC dijagramu.

U populaciji ćelija na FSC/SSC dijagramu koja po karakteristikama odgovara monocitima procenat agregata trombocita i monocita određivan je na osnovu relativne zastupljenosti (%) $CD61^+CD14^+$ događaja u ukupnoj populaciji monocita ($CD14^+$ događaja). Analiza procenta agregata trombocita i monocita analizirana je u ukupnoj populaciji od 1000 monocita ($CD14^+$ događaja).

U populaciji na FSC/SSC dijagramu koja po karakteristikama odgovara neutrofilima procenat agregata trombocita i neutrofila određivan je na osnovu relativne zastupljenosti (%) $CD61^+CD11b^+$ događaja u ukupnoj populaciji neutrofila ($CD11b^+$ događaja). Analiza procenta agregata trombocita i neutrofila analizirana je u ukupnoj populaciji od najmanje 10000 neutrofila ($CD11b^+$ događaja).

3.15.5. Određivanje agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima - *in vitro*

U ispitivanju delovanja VA ekstrakta u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, puna krv tretirana različitim koncentracijama (1.0, 2.0 i 4.0 μ g/mL ukupnih proteina) ekstrakta bele imele na isti način kao i uzorci razblažene krvi pri analizi markera aktivacije trombocita. Nakon inkubacije 65 μ L krvi tretirane VA ekstraktom obeleženo je anti- $CD61$ -FITC, anti- $CD11b$ -PE i anti- $CD14$ -PerCP antitelima i tretirano rastvorom ADP-a, kao agonista aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od 0.25 μ M. Dalje su uzorci procesuirani na način kako je to prethodno opisano.

3.16. Određivanje aktivacije monocita u kulturi merenjem produkcije TNF α

Diferencijacija THP-1 ćelija. 2.5×10^5 THP-1 ćelija/mL su tretirane vitaminom D₃ pri koncentraciji od 100nM, 72 sata (118,119). Nakon 72 sata tretmana ćelije su isprane dva puta RPMI 1640 medijumom, kako bi se odstranio vitamin D₃, i tako diferencirane ćelije su kasnije polarizovane LPS-om.

Diferencirane THP-1 ćelije su sađene u ploči sa 96 bazena (50000 po bazenu) tretirane u trajanju od 1 h na 37 °C različitim koncentracijama VA ekstrakta (2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{g/mL}$), nakon čega su stimulisane 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS-a u trajanju od četiri sata na 37°C. Kao kontrola korišćene su netretirane nestimulisane THP-1 ćelije i tretirane nestimulisane THP-1 ćelije. Delovanje ekstrakata poređeno je sa netretiranim THP-1 ćelijama stimulisanim delovanjem LPS-a. Nakon isteka četvoročasovne inkubacije nivo produkcije TNF- α u supernatantu određen je komercijalnim ELISA esejem (Biosciences) u skladu sa protokolom proizvođača. Koncentracija TNF- α u supernatantu ćelija tretiranih LPS-om bez prethodnog tretmana i ćelija prethodno tretiranih ispitivanim VA ekstraktom i nakon toga tretiranih LPS-om, određena je na osnovu kalibracione krive zavisnosti izmerenih apsorbananci (450 nm) i koncentracije serije standarda TNF- α (0-1000 pg/ml).

3.17. Određivanje aktivacije monocita u kokulturi sa trombocitima merenjem produkcije TNF α

Diferencirane THP-1 ćelije sađene su u ploči sa 96 bazena (50000 po bazenu) tretirane 1h na 37 °C različitim koncentracijama VA ekstrakta (0.5; 1.0; 2.0 4.0; 8.0 $\mu\text{g/mL}$), nakon čega su dodati trombociti aktivirani sa 100 μM ADP-om (5×10^6 trombocita/bazenu) i inkubirane četiri sata na 37 °C. Kao kontrola korišćene su netretirane nestimulisane THP-1 ćelije i tretirane nestimulisane THP-1 ćelije, netretirane stimulisane ADP-om THP-1 ćelije. Nakon isteka četvoročasovne inkubacije nivo produkcije TNF- α u supernatantu određen je komercijalnim ELISA esejem (Biosciences,) u skladu sa protokolom proizvođača. Koncentracija TNF- α u supernatantu ćelija određena je na osnovu kalibracione krive

zavisnosti izmerenih apsorbanci (450 nm) i koncentracije serije standarda TNF- α (0-1000 pg/ml).

3.18. Određivanje aktivacije monocita u kulturi merenjem nivoa slobodnih kiseoničnih radikala i ekspresije CD11b

Osnova metode za određivanje nivoa slobodnih kiseoničnih radikala je oksidacija nefluorescentnog 2',7'-dihlorofluoresceina (DCFHDA) unutar ćelije u fluorescentni derivat, oksidovani 2',7'-dihlorofluorescein (DCFDA) čiji se intenzitet fluorescence meri. Oksidacija se pripisuje produkciji vodonik peroksida koji je postao od visoko reaktivnog kiseonika delovanjem superoksid dismutaze (120). 5×10^5 THP-1 ćelija/mL je tretirano VA ekstraktom u različitim koncentracijama (2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u trajanju od 1 h na 37 °C, nakon čega je dodato 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS-a i inkubirano 2 sata na 37°C. Ćelije su isprane PBS-om i inkubirane 15 minuta sa 5 μL CD11b monoklonskim antitelom. Nakon ovog vremena dodato je 1 mL PBS-a i 1 μL DCFHDA (dihlorofluorescein diacetat) finalne koncentracije 50 μM i inkubirano 30 minuta na 37 °C. Ćelije su nakon toga isprane sa PBS-om i analizirane na BD FACS Calibur protočnom citometru, koristeći Cell Quest Pro kompjuterski softver.

3.19. Protokol kliničke studije

Dizajn studije. Studija je dizajnirana kao prospektivna, randomizovana pilot studija otvorenog tipa kod pacijentkinja sa karcinomom dojke na hemioterapiji ciklofosamidom, adriamicinom i 5-fluorouracilom (CAF). Pacijentkinje su podeljene u tri interventne grupe, pri čemu je jedna primala samo hemioterapiju (Kontrolna grupa), druga hemioterapiju u kombinaciji sa standardizovanim preparatom ekstrakta bele imele – “Helixor[®] A” (Helixor A grupa), a treća hemioterapiju u kombinaciji sa standardizovanim preparatom ekstrakta bele imele – “Iscador[®] M” (Iscador M grupa) .

Pacijentkinje. Za učešće u studiji regrutovane su pacijentkinje Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije sa dijagnozom karcinoma dojke u stadijumima T₁₋₃N₀₋₂M₀,

(T- veličina tumora, N- širenje tumora u regionalne limfne čvorove, M- metastaze u udaljenim organima) kojima je posle operativnog tretmana indikovano šest ciklusa hemioterapije ciklofosfamidom, adriamicinom i 5-fluorouracilom (CAF), u skladu sa standardnim protokolom.

Dodatni kriterijumi za uključivanje podrazumevali su starost iznad 18 godina; vrednost Karnofsky indeksa ≥ 60 ; broj leukocita $\geq 3000/\text{mm}^3$; broj trombocita $\geq 100000/\text{mm}^3$; nivo kreatinina u serumu $\leq 2 \text{ mg}\%$ i nivo glutamat-oksaloacetat transaminaze (SGOT) i glutamat-piruvat transaminaze (SGPT) u serumu manje od vrednosti koja je 2,5 x veća od gornje granične vrednosti normalnog referentnog raspona.

Kriterijumi za isključivanje iz studije podrazumevali su trudnoću ili dojenje; prisustvo metastaza; planiranu radio- ili hormonsku terapiju u toku šest uzastopnih ciklusa CAF terapije; upotrebu imunostimulatornih ili imunosupresornih agenasa (npr. kortikosteroida) osim u terapiji mučnine i povraćanja; istovremeno uključivanje u drugu kliničku studiju; klinički relevantne fizičke ili mentalne poremećaje, uključujući ozbiljne infekcije, poremećaje funkcije jetre, bubrega ili drugih vitalnih organa, depresivana stanja; zlouotrebu alkohola, oralnu ili parenteralnu zloupotrebu drugih farmakološki aktivnih agenasa, terapiju metadonom.

Od ukupnog broja regrutovanih pacijentkinja u studiju je uključeno 95 koje su zadovoljile sve definisane kriterijume i u skladu sa protokolom raspoređene su u tri interventne grupe, 34 u Helixor A grupu, 30 u Iscador M grupu i 31 u Kontrolnu grupu. Randomizija tretmana urađena je od strane trećeg, nezavisnog lica, po principu blok randomizacije (SPSS® 14.0.1, SPSS Inc., Čikago, SAD) i generisane šifre dostavljene su rukovodiocu istraživanja u zapečaćenim kovertama. Svako od pacijentkinja šifra koja je određivala uključivanje u pojedinu interventnu grupu dodeljivana je nakon uključivanja u studiju. Verovatnoća uključivanja u bilo koju od interventnih grupa bila je jednaka (1:1:1). S obzirom da se radilo o pilot studiji ukupan broj od 90 pacijentkinja (30 u svakoj grupi), definisan pre početka studije, smatran je dovoljnim za potvrdu početne hipoteze.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (3. oktobra 2005.god.) i Agencije za lekove Srbije (1. novembra 2005.god.). S

obzirom da se radilo o pilot studiji, studija nije upisana u Registar kliničkih studija. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, Smernicama dobre kliničke prakse i drugom nacionalnom zakonskom regulativom. Pacijentkinje su detaljno informisane o svim aspektima studije i sve koje su uključene u studiju potpisale su obrazac Informisanog pristanka.

Terapijski protokol. Terapija ciklofosfamidom, adriamicinom i 5-fluorouracilom (CAF) je aplikovana u okviru šest ciklusa, sa periodom od tri nedelje između ciklusa, u jednokratnoj dozi od 500 mg ciklofosfamida, 50 mg adriamicina i 500 mg 5-fluorouracila po 1 m² površine kože. Palijativna terapija je uključivala jednokratnu aplikaciju 8 mg ondasteron hlorida, 8 mg deksametazona i 50 mg ranitidina pre svakog ciklusa hemoterapije.

Pacijentkinje u Helixor A interventnoj grupi pored hemioterapije primale su i terapiju preparatom Helixor A. Preparat Helixor[®] A, proizvođača Helixor Heilmittel GmbH & Co., Rosenfeld, Nemačka, dobijen vodenom ekstrakcijom svežeg biljnog materijala bele imele sakupljene sa drveta jele. Ekstrakt je pakovan u staklene ampule od 1ml u izotoničnom rastvoru, u dozama koje odgovaraju 1; 5; 10; 20; 30 ili 50 mg sveže biljke. Preparat je aplikovan kao subkutana injekcija u gornji deo abdomena tri puta nedeljno od strane pacijentkinja. Detaljne instrukcije za primenu terapije date su pacijentkinjama, a podrazumevale su i postepeno povećanje doze, odnosno aplikovanje redom 3 puta doze od 1 mg, 3 puta doze od 5 mg, 3 puta doze od 10 mg, 3 puta doze od 20 mg, 3 puta doze od 30 mg i do kraja terapije aplikovanje doze od 50 mg. U proseku, aplikovano je 52.3 ± 2.8 injekcija Helixor A, sa prosečnom aplikacijom od 2.813mg (min = 1mg; max = 6.818mg) preparata u toku celokupnog trajanja studije.

Pacijentkinje u Iscador M interventnoj grupi pored hemioterapije primale su i terapiju preparatom Iscador M. Preparat Iscador[®] M, proizvođača Weleda AG, Schwabisch Gmund, Nemačka, dobijen je fermentacijom vodenog ekstrakta svežeg biljnog materijala bele imele sakupljene sa drveta jabuke. Fermentisani ekstrakt je pakovan u staklene ampule od 1ml u izotoničnom rastvoru, u dozama koje odgovaraju 0.01; 0.1; 1; 2; ili 5 mg sveže biljke. Preparat je aplikovan kao subkutana injekcija u gornji deo abdomena tri puta

nedeljno od strane pacijentkinja. Detaljne instrukcije za primenu terapije date pacijentkinjama su podrazumevale i postepeno povećanje doze, odnosno aplikovanje redom 2 puta doze od 0.01 mg, 2 puta doze od 0.1 mg, 11 puta doze od 1 mg, 8 puta doze od 2 mg i do kraja terapije aplikovanje doze od 50 mg. U proseku, aplikovano je 54.1 ± 2.3 injekcija Iscador M, sa prosečnom ukupnom aplikacijom od 174.80 ± 26.34 mg preparata po pacijentu u toku celokupnog trajanja studije.

U grupama pacijentkinja na kombinovanoj terapiji preparatom bele imele i hemioterapiji praćene su dozno zavisne lokalne reakcije na mestu aplikacije (crvenilo, otok, svrab), uz smanjenje doze ili pauzu do povlačenja, ukoliko su reakcije u dijametru bile veće od 5 cm

Uzorkovanje i analizirani parametri:

1. Periferna krv pacijentkinja uzorkovana je jedan dan pre svakog ciklusa hemioterapije i tri nedelje posle poslednjeg ciklusa (ukupno sedam puta). Krv je uzorkovana na tašte, nakon najmanje 12h gladovanja, venepunkcijom antekubitalne vene korišćenjem *Vacutainer* epruveta sa ili bez dodatka odgovarajućih antikoagulanasa. Uzorci krvi su korišćeni u daljoj analizi odmah po venepunkciji, uz minimalnu manipulaciju uzoraka, na sobnoj temperaturi. U uzorcima krvi određivani su:

- osnovni biohemijski parametri;
- osnovni hematološki parametri;
- imunofenotip;

2. Uticaj ekstrakta bele imele kao komplementarne sa hemioterapijom na kvalitet života pacijentkinja praćena je primenom standardizovanog upitnika EORTC QLQ-C30 (European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire) u verziji na srpskom jeziku (primerak u Prilogu), koji su popunjavale pacijentkinje. Upitnik se sastojao od 30 pitanja i ocenjivano je 15 parametara, na osnovu samo procene. Šest od 15 ocenjivanih parametara se odnosilo na funkcionisanje u različitim aspektima života, 8 na karakteristične simptome u odnosu na terapiju i jedno pitanje koje nije imalo veze sa opštim psihofizičkim zdravljem pacijentkinja. Rezultati upitnika o kvalitetu života (EORTC QLQ-C30) analizirani su na sledeći način. Za svaki od parametara

u upitniku srednja vrednost promena u odnosu na bazalne vrednosti u Heliksor A grupi, odnosno Iscador M grupi, poređena je sa srednjom vrednošću promena u Kontrolnoj grupi primenom neparametarskih marginalnih modela. Post-hoc analiza je urađena primenom Dunetovog T3 testa.

4. REZULTATI

Eksperimentalni deo ovog rada podeljen je na dva dela, prvi koji se bavi proučavanjem molekularnih mehanizama koji leže u osnovi citotoksičnog i imunomodulatornog dejstva ekstrakta bele imele, kao i interakcije bioaktivnih komponenti bele imele i citotoksičnog agensa iz grupe antraciklina na modelu tumorskih ćelija u kulturi, dok je drugi deo usmeren na ispitivanje imunomodulatornog dejstva ekstrakta bele imele na ćelije imunskog sistema u *in vivo* uslovima kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke.

4.1. *In vitro* citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat ekstrakta bele imele

Prvi korak u ispitivanju antitumorske aktivnosti VA ekstrakta je bio "skrining" datog ekstrakta na panelu različitih ćelijskih linija u cilju određivanja njegove citotoksične aktivnosti i antiproliferativnog efekta. Citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat VA ekstrakta je određen MTT testom, pri čemu se kao rezultat dobija IC_{50} vrednost, koja je numerički pokazatelj citotoksičnog potencijala i antiproliferativne aktivnosti ispitivanog ekstrakta. IC_{50} vrednost odgovara koncentraciji ispitivanog ekstrakta pri kojoj je u datom vremenskom periodu došlo do 50% pada u ćelijskom preživljavanju i predstavlja polazni parametar u daljem eksperimentalnom dizajnu ispitivanja mehanizma delovanja datog ekstrakta.

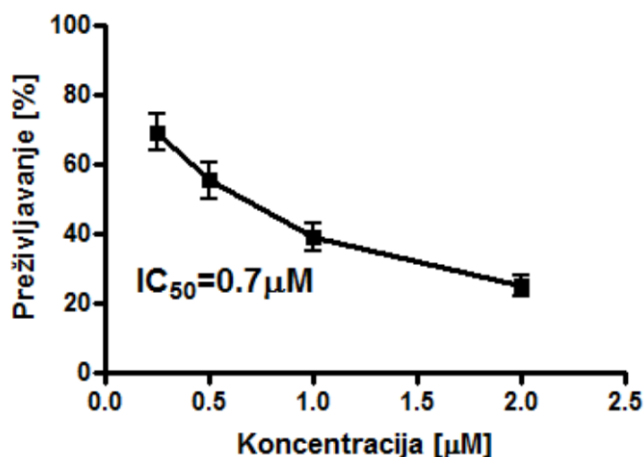
Citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat VA ekstrakta ispitivani su na pet tumorskih ćelijskih linija i to na ćelijskim linijama karcinoma dojke (MDA-MB-231 i MCF7), karcinoma debelog creva (T84), hronične mijeloidne leukemije (K562) i akutne T ćelijske leukemije (Jurkat). Odgovarajuće ćelijske linije tretirane su VA ekstraktom u trajanju od 72 sata, u rasponu koncentracija 0.125-50.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina, pri čemu je IC_{50} vrednost određena iz krive preživljavanja. U Tabeli 4.1. prikazane su IC_{50} vrednosti za ispitivani ekstrakt na svih pet ćelijskih linija nakon 72 sata tretmana.

Tabela 4.1. Tabela IC₅₀ vrednosti (μg/mL ukupnih proteina) nakon 72 sata tretmana

Ćelijska linija	IC ₅₀ vrednosti
K562	0.50 ± 0.08
MDA-MB-231	20.6 ± 2.50
MCF7	9.08 ± 1.17
Jurkat	7.52 ± 0.89
T84	>50

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.1. zaključujemo da su citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat VA ekstrakta dozno zavisni na gotovo svim ćelijskim linijama, osim na liniji karcinoma debelog creva (T84), na kojoj IC₅₀ vrednost nije postignuta nakon 72 sata kontinuiranog tretmana, pri datim koncentracijama. Najveća citotoksična aktivnost, odnosno antiproliferativni efekat je dobijen na ćelijskoj liniji hronične mijeloidne leukemije, K562 ćelijama.

U cilju ispitivanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi antitumorske aktivnosti VA ekstrakta, odabrali smo K562 ćelijsku liniju na kojoj je dati ekstrakt bio najaktivniji. Kako bi smo ispitivali mehanizme interakcije bioaktivnih sastojaka bele imele i drugih antitumorskih citotoksičnih agenasa, citotoksični/antiproliferativni efekat VA ekstrakta je poređen sa efektom doksorubicina (Dox). K562 ćelije su tretirane Dox u trajanju od 72 sata, u rasponu koncentracija 0.25 - 2.0 μM, pri čemu je IC₅₀ vrednost određena iz krive preživljavanja (Grfik 4.1.). Vrednost IC₅₀ za Dox na K562 ćelijama je iznosila 0.7 μM.



Grafik 4.1. Kriva preživljavanja K562 ćelija tretiranih doksorubicinom

Preživljavanje K562 ćelija posle 72 sata kontinuiranog delovanja doksorubicina prikazano je u funkciji rastućih koncentracija (0.25, 0.5, 1.0 i 2.0 µM) ispitivanog jedinjenja.

Na osnovu prethodnih rezultata, a u cilju ispitivanja mehanizma interakcije bioaktivnih sastojaka bele imele i Dox, odabrali smo dve terapijski relevantne koncentracije Dox (2.0 µM i 1.0 µM), odnosno dve koncentracije koje su značajno niže od terapijskih koncentracija (0.5 µM i 0.25 µM), kao i četiri koncentracije VA ekstrakta (4.0, 2.0, 1.0 i 0.5 µg/mL ukupnih proteina) čija je citotoksična aktivnost, odnosno antiproliferativni efekat određen na K562 ćelijama, nakon 72 sata tretmana. Efekat VA-Dox kotretmana na preživljavanje K562 ćelija je prikazan u Tabeli 4.2. i Grafiku 4.2.

Tabela 4.2. Dozno zavisna citotoksičnost ekstrakta bele imele, doksorubicina i njihove kombinacije na K562 ćelijama

Substance	Koncentracija supstance			
	I	II	III	IV
VA	71.52 ± 3.5	69.05 ± 2.45	57.27 ± 2.3	49.34 ± 2.6
Dox	63.60 ± 2.5	53.62 ± 3.7	42.55 ± 2.6	31.50 ± 2.9
VA+Dox	74.31 ± 2.3	72.04 ± 2.8	69.78 ± 1.1	64.33 ± 1.2
CI	1.347	0.838	0.517	0.414
Interakcija	--	+	+++	+++

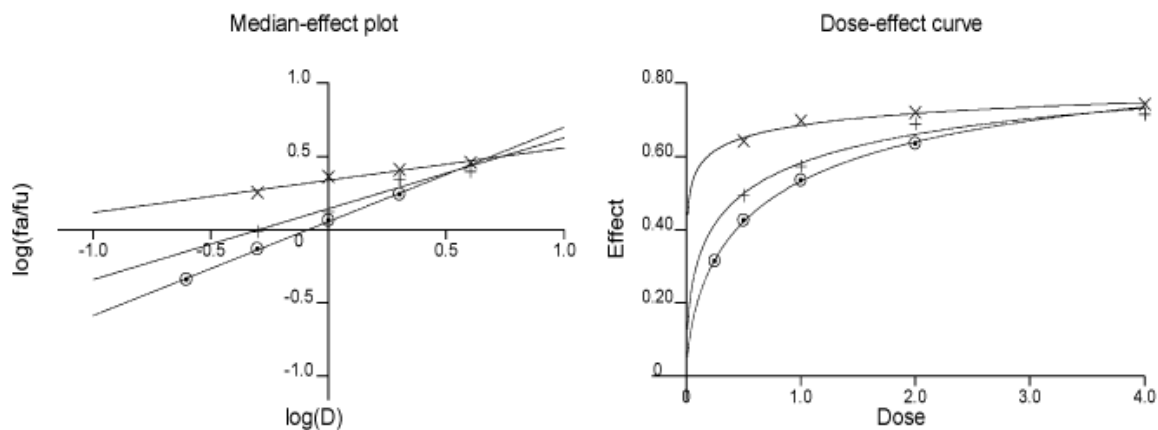
Rezultati su izraženi kao procenat mrtvih ćelija i prikazani kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna merenja.

VA- lat. *Viscum album*, ekstrakt bele imele (µg/mL): I=4; II=2; III=1; IV=0.5

Dox- doksorubicin (µM): I=2; II=1; III=0.5; IV=0.25

CI- kombinacioni indeks

Interakcija: + + +, sinergizam; +, blag sinergizam; --, umereni antagonizam.



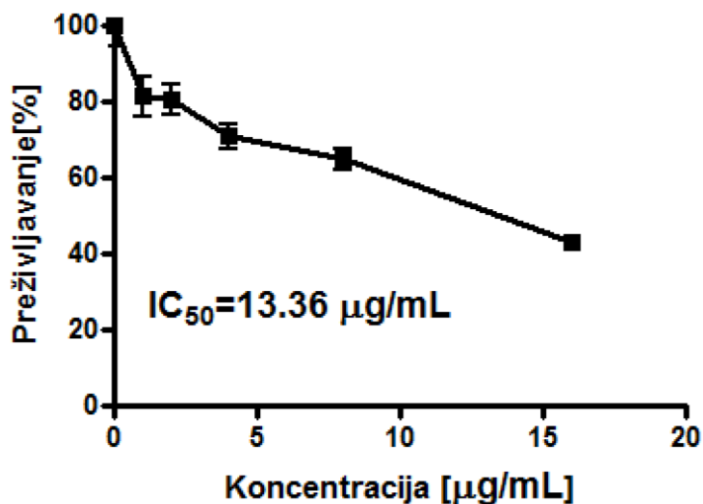
Grafik 4.2. Interakcija između ekstrakta bele imele i doksorubicina

K562 ćelije su tretirane 72 sata različitim koncentracijama VA ekstrakta [+], doksorubicina [⊙] i VA-Dox kombinacijama [×], pri konstantnom odnosu VA ekstrakta i Dox. Median effect plot and dose-effect curve predstavljaju rezultate iz Tabele 4.2.

Dobijeni rezultati pokazuju da tretman K562 ćelija VA ekstraktom na svim koncentracijama pokazuje dozno zavisnu antitumorsku aktivnost. Šta više, toksičnost VA ekstrakta je bila uporediva sa toksičnošću Dox (Tabela 4.2., Grafik 4.2.) U skladu sa literaturnim podacima, K562 ćelije pokazuju značajnu rezistenciju na tretman Dox (121,122), koja se ogleda kroz minimalno povećanje procenta nevijabilnih ćelija pri visokim, terapijskim dozama Dox. Neočekivano je bilo da uprkos dozno zavisnoj toksičnosti dobijenoj nakon tretmana K562 ćelija VA ekstraktom ili Dox, kotretman pri visokim koncentracijama VA ekstrakta i Dox nije pokazao sinergističko, već umereno antagonističko dejstvo. S druge strane, kotretman K562 leukemijskih ćelija VA-Dox kombinacijom pokazuje značajano sinergističko dejstvo pri subterapeutskim koncentracijama Dox (Tabela 4.2., Grafik 4.2.).

U cilju ispitivanja toksičnog efekta VA ekstrakta prema zdravim ćelijama, humane mononuklearne ćelije periferne krvi (MČPK) tretirali smo različitim koncentracijama VA ekstrakta (1.0, 2.0, 4.0, 8.0 i 16.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), uključujući i one koje su dale sinergizam sa nižim koncentracijama Dox. Preživljavanje MČPK je određivano MTT testom. IC_{50} vrednost VA ekstrakta je iznosila $13.36 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (Grafik 4.3.). Aproximativno 80% MČPK tretiranih VA ekstraktom pokazuje vijabilnost pri

koncentracijama (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ili nižim) koje su imale sinergističko dejstvo u kombinaciji sa Dox na K562 ćelije.



Grafik 4.3. Kriva preživljavanja humanih MČPK tretiranih ekstraktom bele imele

Preživljavanje humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (MČPK) posle 72 sata kontinuiranog tretmana VA ekstraktom prikazano je u funkciji rastućih koncentracija (1.0, 2.0, 4.0, 8.0 i 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina) ispitivanog ekstrakta.

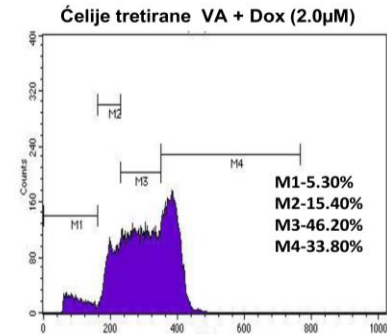
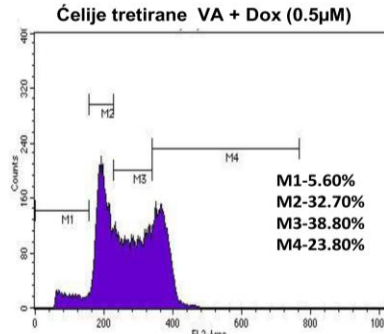
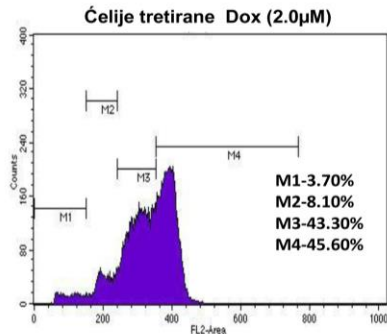
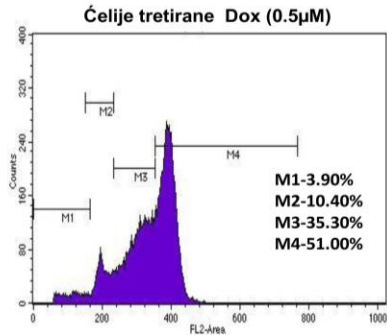
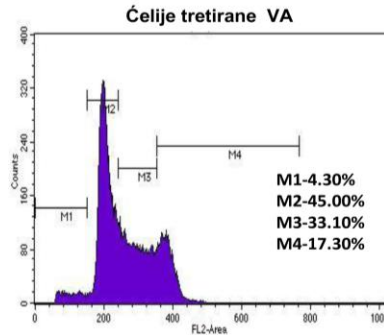
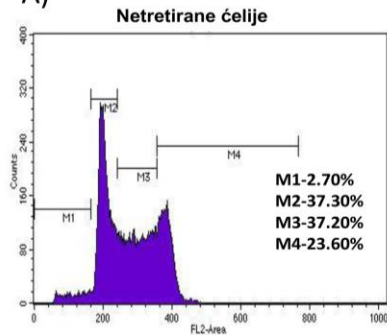
Dobijeni rezultati ukazuju na selektivnu citotoksičnost VA ekstrakta prema K562 ćelijama u poređenju sa normalnim, zdravim ćelijama, sa indeksom selektivnosti $SI=0.036$, izračunatim kao odnos IC_{50} vrednosti za K562 ćelije i MČPK.

Sledeći korak u istraživanjima bio je ispitati da li u osnovi antitumorske aktivnosti VA ekstrakta pojedinačno, kao i u kombinaciji sa Dox leži antiproliferativni efekat i/ili citotoksična aktivnost, jer MTT test daje samo informacije o procentu preživljavanja tumorskih ćelija.

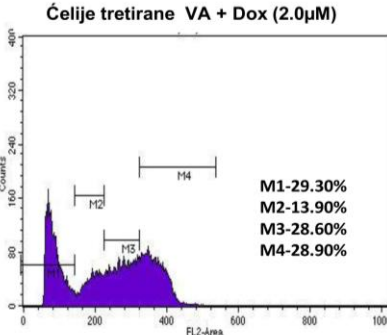
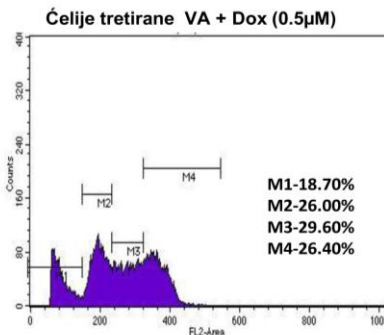
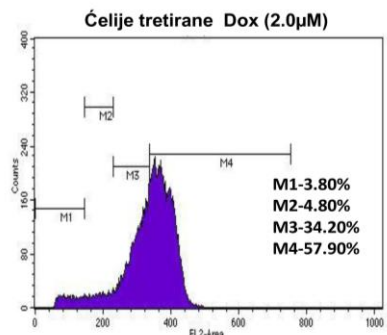
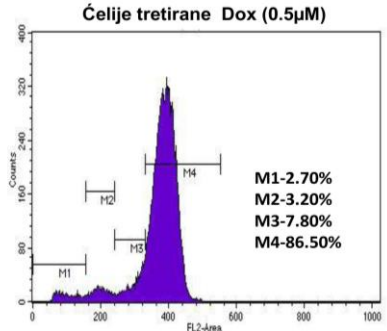
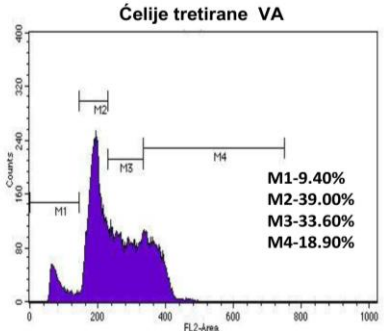
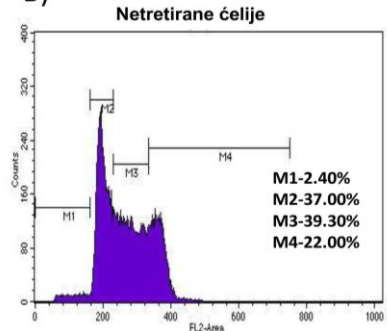
4.2. Uticaj ekstrakta bele imele na distribuciju K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

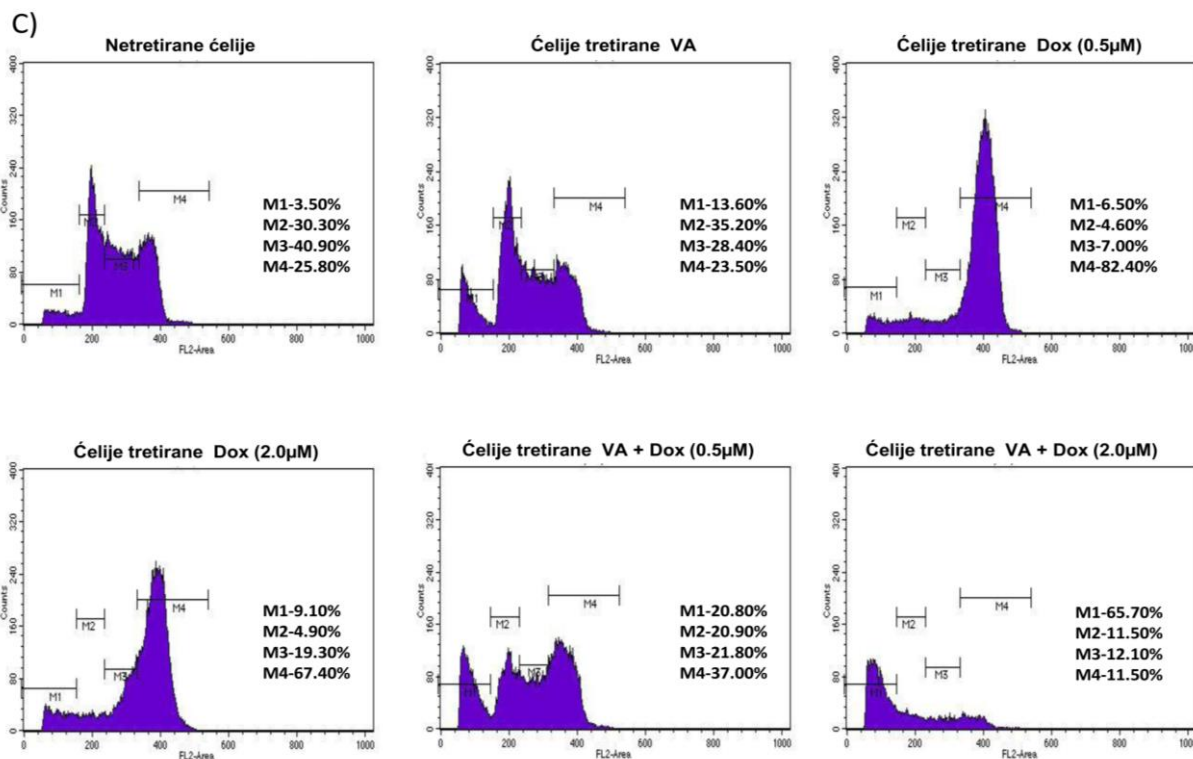
U cilju dobijanja više informacija u vezi sa antiproliferativnim efektom VA ekstrakta, ispitivan je njegov uticaj na promenu distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, korišćenjem citometrijske analize. K562 ćelije su kontinuirano tretirane u trajanju od 24, 48 i 72 sata VA ekstraktom (2.0 µg/mL ukupnih proteina), Dox (0.5 i 2.0 µM) i VA-Dox kombinacijama. Nakon 24 sata kontinuiranog tretmana K562 ćelija VA ekstraktom dolazi do povećanja procenta ćelija u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa, kao i do smanjenja procenta ćelija u G₂/M fazi (Grafik 4.4. A). Sa druge strane, Dox pri obe koncentracije dovodi do značajnog povećanja ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa, kao i smanjenja broja ćelija u G₀/G₁ fazi (Grafik 4.4. A). Nakon 48 sati, kao i 72 sata tretmana K562 ćelija VA ekstraktom dolazi do povećanja procenta ćelija u apoptozi, što je pretstavljeno jasno izdvojenim sub-G₁ pikom na jednoparametarskom dijagramu (histogram) (Grafik 4.4. B i C). Formiranje sub-G₁ pika pri analizi distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa potiče od populacije ćelija sa fragmentisanim DNK molekulima. Ovakav hipodiploidni DNK sadržaj je osnovna karakteristika ćelija koje su ušle u apoptozu, te se populacija ovih ćelija jasno izdvaja u vidu sub-G₁ pika, neposredno ispred G₀/G₁ pika na histogramu. Uvođenje K562 ćelija u apoptozu je vremenski zavisani proces. Blago nakupljanje ćelija u sub-G₁ piku je prisutno samo nakon 72 sata kontinuiranog tretmana višom koncentracijom Dox (2.0 µM) (Grafik 4.4. C). Takođe, značajno povećanje ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa je uočeno i nakon 48 i 72 sata tretmana K562 ćelija pri obe koncentracije Dox (Grafik 4.4. B i C). Nakon tretmana K562 ćelija VA-Dox kombinacijom, *Bcr-Abl* pozitivne ćelije ne pokazuju akumulaciju ćelija u G₂/M fazi u poređenju sa ćelijama tretiranim samo Dox (Grafik 4.4. A-C). Odsustvo G₂/M zastoja je praćeno povećanjem ćelija koje sadrže hipodiploidni DNK sadržaj, sub-G₁ pik. Uvođenje K562 ćelija u apoptozu VA-Dox kombinacijom je vremenski zavisani proces.

A)



B)





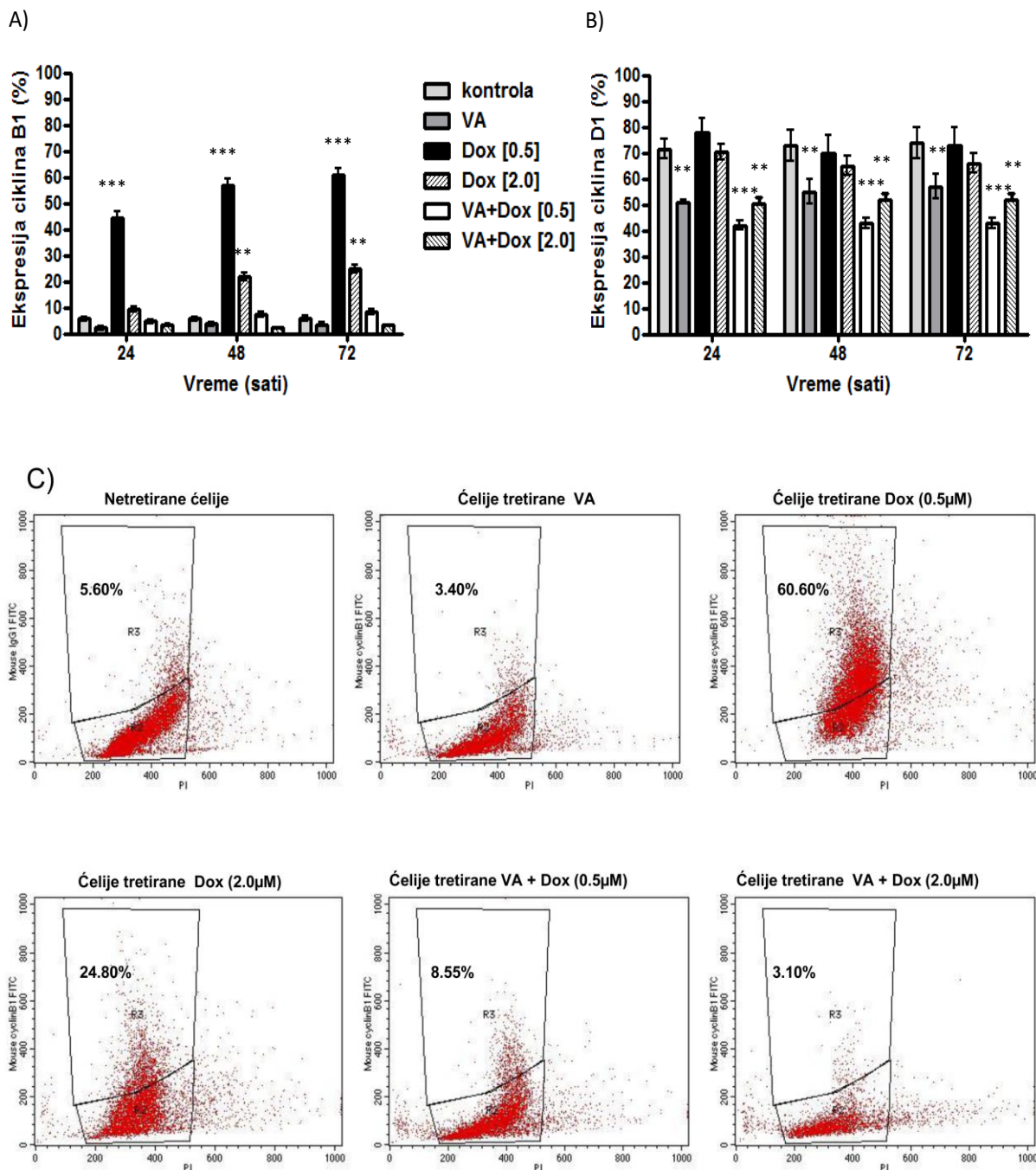
Grifik 4.4. Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana K562

Prikaz promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana K562 ćelija ekstraktom bele imele 2.0 µg/mL (VA), 0.5 i 2.0 µM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijama nakon 24 sata (A), 48 sati (B) i 72 sata (C). Ćelije su bojene propidijum jodidom i citometrijski su merene su promene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Marker M1- predstavlja ćelije u apoptozi sa DNK sadržajem koji odgovara sub-G₁ frakciji; M2- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara G₀/G₁ fazi ciklusa; M3- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara S fazi ciklusa; M4- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara G₂/M fazi ciklusa. Prikazani su reprezentativni jednoparametarski dijagrami (histogrami) tri nezavisna eksperimenta.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da karakteristični G₂/M zastoj dobijen tretmanom K562 ćelija Dox biva u potpunosti eliminisan kada se primeni VA-Dox kotretman. Takođe, odsustvo G₂/M zastoja je praćeno povećanjem broja ćelija u apoptozi, koje sadrže hipodiploidni DNK sadržaj (sub-G₁ pik).

4.3. Ekspresija ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim K562 ćelijama

Da bi smo ispitali molekularni mehanizam koji leži u osnovi reverzibilnog zastoja ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa, analizirali smo ekspresiju ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim K562 ćelijama. Nivo ekspresije ciklina B1 i ciklina D1 određivan je nakon 24, 48 i 72 sata tretmana K562 ćelija, VA ekstraktom (2.0 µg/mL ukupnih proteina), Dox (0.5 i 2.0 µM) i VA-Dox kombinacijama, metodom citometrije. Rezultati prikazani na Grafiku 4.5. A i C pokazuju da se procenat ciklin B1 pozitivnih ćelija smanjuje nakon tretmana rastućim koncentracijama Dox, a da je u pozitivnoj korelaciji sa porastom vremena inkubacije. Porast ekspresije ciklina B1 je povezan sa značajnom akumulacijom ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa (Grafik 4.4. A i C). S druge strane, tretman ćelija VA-Dox kombinacijama značajno smanjuje procenat ciklin B1 pozitivnih ćelija, do nivoa kontrole (Grafik 4.5. A i C). Ovo smanjenje je povezano sa eliminacijom G₂/M zastoja (Grafik 4.4. A i C). Nakon 24, 48 i 72 sata tretmana ćelija Dox ne primećuje se značajna razlika u procentu ciklin D1 pozitivnih K562 ćelija u poređenju sa netretiranim, kontrolnim ćelijama (Grafik 4.5. B). Tretman ćelija VA ekstraktom i VA-Dox kombinacijama značajno smanjuje procenat ciklin D1 pozitivnih ćelija na sva tri vremena (Grafik 4.5. B). Ovo smanjenje je povezano sa eliminacijom G₂/M zastoja i povećanjem procenta ćelija u G₀/G₁ fazi ciklusa (Grafik 4.4. A-C).

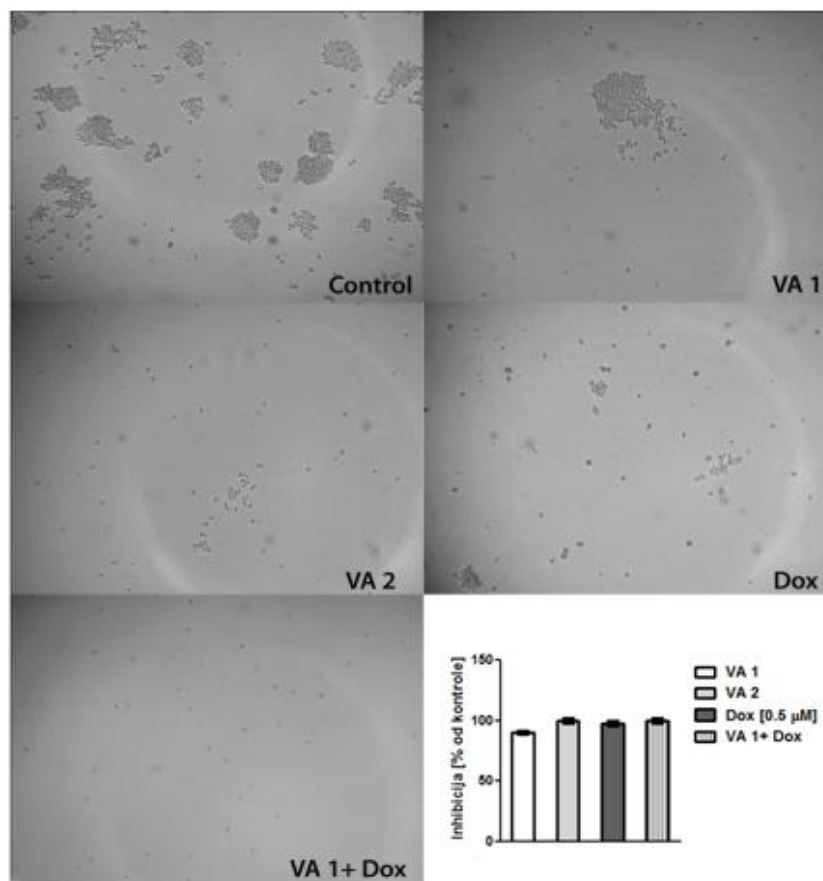


Grafik 4.5. Analiza sadržaja ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim K562 ćelijama

Proteinski nivo ekspresije ciklina B1 (A) i ciklina D1 (B) meren je metodom citometrije, nakon 24, 48 i 72 sata tretmana K562 ćelija ekstraktom bele imele 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (VA), 0.5 i 2.0 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. C) Prikazani su reprezentativni dvoparametarski dijagrami (dot plot) ekspresije ciklina B1 u K562 ćelijama nakon 72 sata kontinuiranog tretmana. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

4.4. Antiproliferativna sposobnost ekstrakta bele imele

Antiproliferativni efekat VA ekstrakta je potvrđen i testom formiranja kolonija u polučvrstoj metilceluloznoj podlozi. VA ekstrakt dozno zavisno inhibira formiranje kolonija K562 ćelija nakon 24 sata tretmana. Inhibitorni efekat na rast ćelija je detektovan već pri koncentraciji VA ekstrakta od 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina. VA ekstrakt pri koncentraciji od 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina je aktivan isto kao i 0.5 μM Dox u smanjenju broja kolonija sposobnih da rastu u metilcelulozi (Slika 4.1.). Inhibicija formiranja kolonija je bila najveća nakon tretmana K562 ćelija VA-Dox kombinacijom (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Antiproliferativni efekat ekstrakta bele imele

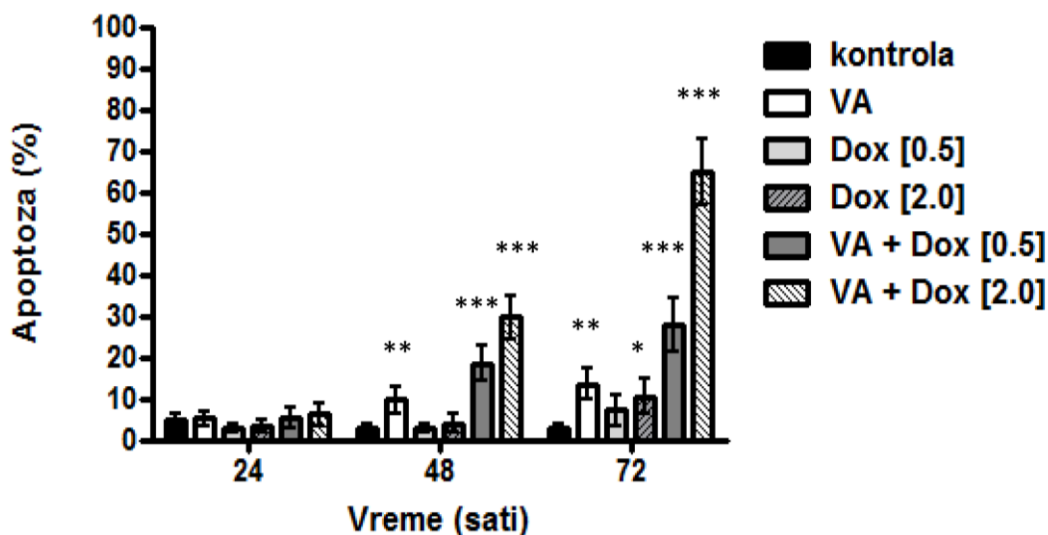
K562 ćelije su gajene u metilceluloznoj podlozi nakon tretmana ekstraktom bele imele 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina (VA1) i 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina (VA2), Dox (0.5 μM) i VA1-Dox kombinacijom. Na slici su prikazane netretirane ćelije i ćelije tretirane 24 sata ispitivanim agensima. Kolonije su brojane nakon 7 dana. Ceo eksperiment je ponovljen dva puta sa ćelijama dobijenim od dve nezavisne ćelijske populacije. Prikazan je reprezentativni eksperiment.

4.5. Ispitivanje proapoptotskog delovanja ekstrakta bele imele na K562 ćelije

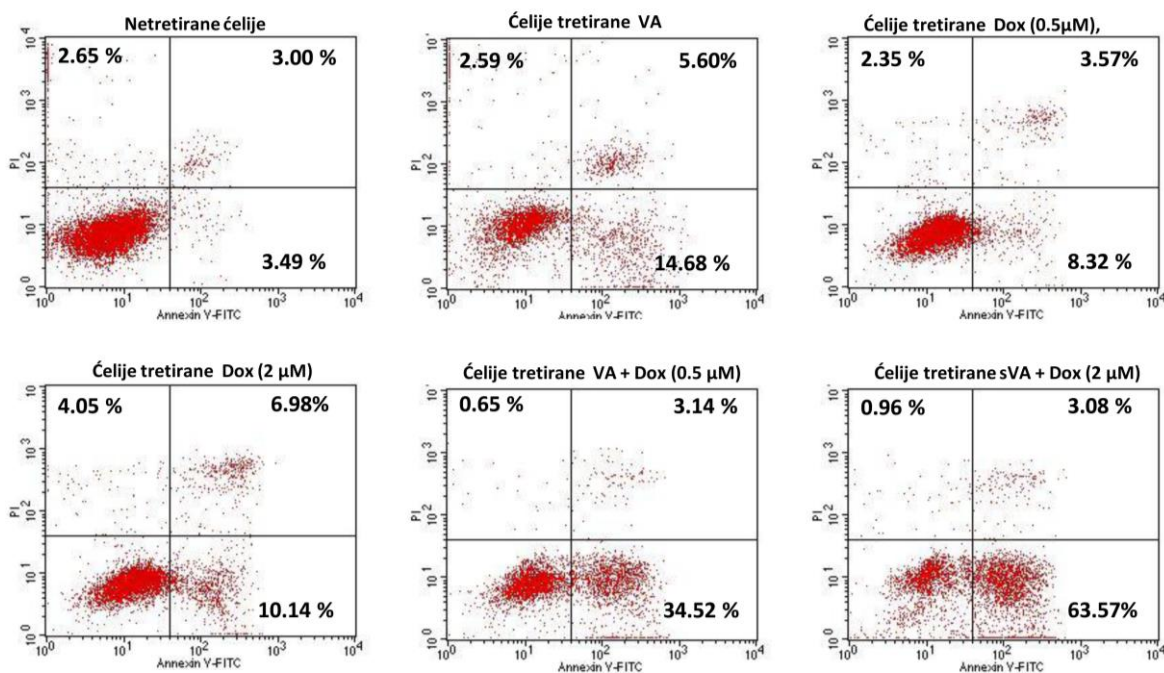
Prethodno dobijeni proapoptotski efekat VA ekstrakta opisan u Poglavlju 4.2. je potvrđen na K562 ćelijama citometrijskom analizom vezivanjem Annexina V. Gubitak asimetrije plazma membrane predstavlja jedan od prvih koraka u procesu apoptotske ćelijske smrti. U ćelijama u apoptozi, membranski fosfolipid, fosfatidil-serin se premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu plazma membrane, čime se omogućava vezivanje Annexina V (kalcijum zavisnog fosfolipid-vezujućeg proteina), koji ima veliki afinitet za fosfatidil-serin. Za Annexin V može biti vezana fluorescentna boja, kao što je fluorescein izotiocijanat (FITC), što omogućava detektovanje njegovog vezivanja za membranski fosfatidil-serin. Korišćenjem dvokolornog bojenja ćelija sa Annexin V-FITC i propidijum jodidom, moguća je detekcija ćelija u ranoj fazi apoptotske ćelijske smrti u odnosu na testove bazirane na određivanju nuklearnih promena, kao što je DNK fragmentacija.

Ispitali smo kinetiku programirane ćelijske smrti u ćelijama tretiranim VA ekstraktom pri koncentraciji od 2.0 µg/mL ukupnih proteina, Dox pri koncentracijama od 0.5 i 2.0 µM, i VA-Dox kombinacijama. Ćelije su tretirane ispitivanim agensima 24, 48 i 72 sata, pre nego što je procenat ćelija u apoptozi određivan citometrijski. Nakon 24 sata kontinuiranog tretmana K562 ćelija ispitivanim agensima (Grafik 4.6.), ni VA ekstrakt, ni Dox ne uvode K562 ćelije u apoptozu. S druge strane, VA ekstrakt pri koncentraciji od 2.0 µg/mL ukupnih proteina dovodi do rane apoptoze K562 ćelija nakon 48 sati tretmana. Ovaj efekat raste tokom vremena (Grafik 4.6. A). Kontinuirani tretmana K562 ćelija Dox, pri obe koncentracije tokom 48 sati, ne dovodi do apoptotske ćelijske smrti (Grafik 4.6. A). Nakon 48 sati tretmana ćelija VA-Dox kombinacijama, primećeno je značajno povećanje procenta K562 ćelija u apoptozi. Ovaj efekat je vremenski zavisian. Najveći procenat ćelija u ranoj apoptozi (65%, $p < 0.001$) primećen je nakon 72 sata tretmana VA-Dox kombinacijom (VA 2.0 µg/mL + Dox 2.0 µM) (Grafik 4.6. A, B). Tretman K562 ćelija većom koncentracijom Dox (2.0 µM) tokom 72 sata, indukuje slabo povećanje procenta ćelija u apoptozi. Reprezentativni dvoparametarski dijagrami (dot plot) su prikazani na Grafiku 4.6. B.

A)



B)



Grafik 4.6. Vremenski zavisna indukcija apoptotske ćelijske smrti tretiranih K562 ćelija

Odnos ćelija u ranoj apoptozi i ćelija u kasnoj apoptozi/nekrozi meren je citometrijski dvokolornim bojenjem Annexin V / PI. A) Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 2.0 μg/mL ukupnih proteina (VA), 0.5 i 2.0 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijama 24, 48 i 72 sata. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. B) Reprerativni dvoparametarski dijagrami (dot plot) K562 ćelija nakon 72 sata kontinuiranog tretmana. * p<0.05; ** <0.01; *** p<0.001; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

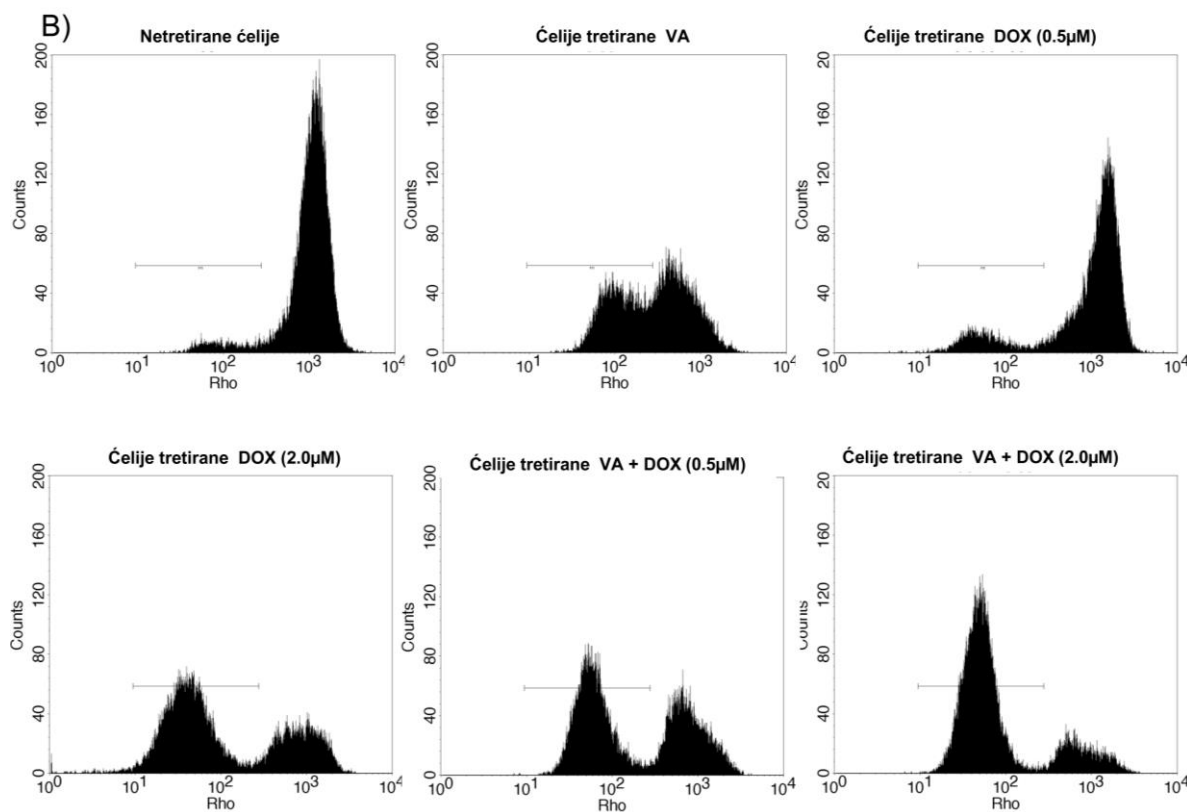
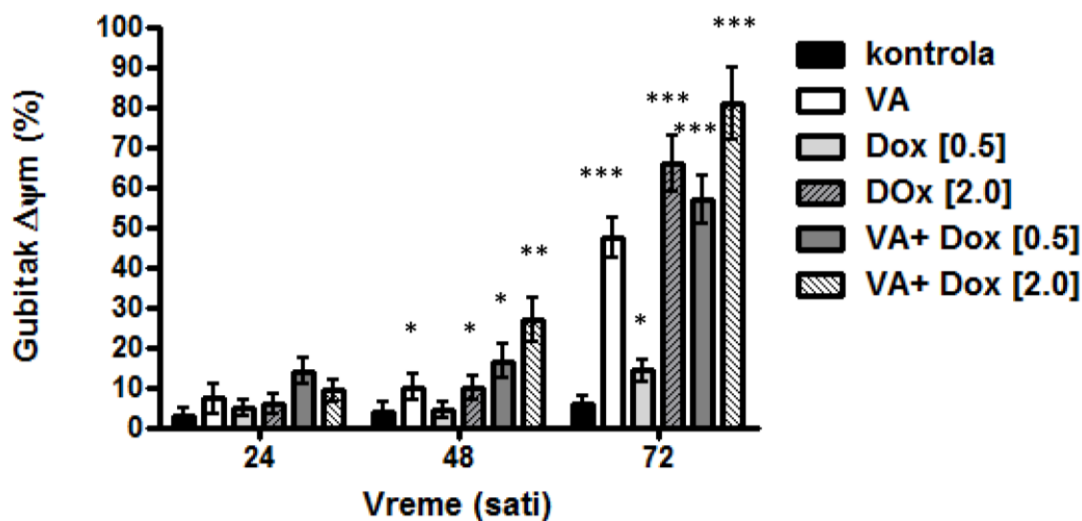
Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da VA ekstrakt uvodi K562 ćelije u apoptozu. Takođe, ono što je još značajnije je da tretman VA ekstraktom u kombinaciji sa subapoptotskom/subterapeutskom koncentracijom Dox uvodi K562 ćelije u apoptozu, za koje se zna da su rezistentne na Dox tretman.

Pitanje koje se dalje nameće je, da li sinergistička aktivnost VA ekstrakta i Dox na K562 ćelijama može dovesti do aktivacije mitohondrijskog apoptotskog puta ćelijske smrti.

4.6. Ispitivanje aktivacije mitohondrijskog apoptotskog puta u K562 ćelijama

Mitohondrije su ključne organele uključene u kontrolu unutrašnjeg apoptotskog puta, indukovano citotoksičnim lekovima. Naš sledeći korak u istraživanju bio je ispitivanje veze između narušavanja mitohondrijske funkcije i apoptoze indukovane VA ekstraktom i VA-Dox kombinacijom. Na Grafiku 4.7. su prikazani rezultati citometrijske analize inkorporacije fluorescentne boje rodamina 123 (Rh 123), koja se koristi prilikom ispitivanja promena u mitohondrijskom membranskom potencijalu ($\Delta\psi_m$). Žive metabolički aktivne ćelije akumuliraju ovu lipofilnu katjonsku boju u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani i matriksu. Promene $\Delta\psi_m$ dovode do njene smanjene inkorporacije. K562 ćelije su tretirane VA ekstraktom (2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), Dox (0.5 i 2.0 μM) i VA-Dox kombinacijama, tokom 24, 48 i 72 sata. Nakon 24 sata kontinuiranog tretmana K562 ćelija ispitivanim agensima (Grafik 4.7. A) ni VA ekstrakt, ni Dox ne dovode do promena u $\Delta\psi_m$ tretiranih ćelija. Nakon 48 sati tretmana ćelija VA ekstraktom, Dox (2.0 μM) i VA-Dox kombinacijama, dolazi do izvesnog smanjenja inkorporacije Rh123 (Grafik 4.7. A). Značajan gubitak $\Delta\psi_m$ je primećen nakon 72 sata tretmana K562 ćelija VA ekstraktom, Dox (2.0 μM) i VA-Dox kombinacijama (Grafik 4.7. A, B).

A)



Grafik 4.7. Smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala

Nakon tretmana K562 ćelija ekstraktom bele imele 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.5 i 2.0 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijama, posle 24, 48 i 72 sata, promene u mitohondrijskom membranskom potencijalu su merene na citometru korišćenjem metode rodaminskog bojenja. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije. B) Prikazani su reprezentativni jednoparametarski dijagrami (histogrami) K562 ćelija nakon 72 sata kontinuiranog tretmana.

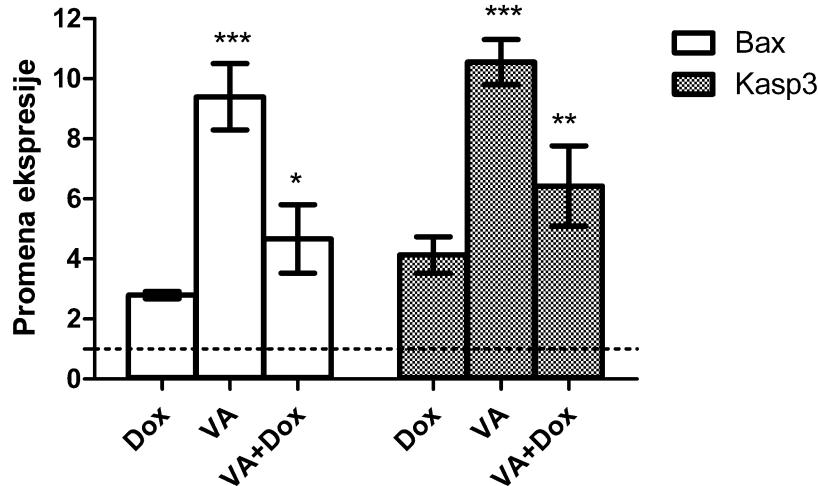
Prikazani rezultati ukazuju da rano smanjenje $\Delta\psi_m$ može imati ulogu u događajima koji dovode do apoptoze K562 ćelija tretiranih VA ekstraktom pojedinačno i u kombinaciji sa Dox.

Prethodni rezultati ukazuju da je moguće delovanjem subapoptotske koncentracije Dox (0.5 μ M) u kombinaciji sa VA ekstraktom uvesti K562 ćelije u ranu apoptozu. Da bi smo detaljnije ispitali molekularne mehanizme koji leže u osnovi interakcije VA ekstrakta i Dox, u svim daljim eksperimentima tumorske ćelije su tretirane subapoptotskom koncentracijom Dox.

4.7. Ispitivanje ekspresije iRNK za *kaspazu-3* i *Bax* u tretiranim K562

S obzirom da smo u prethodnim eksperimentima pokazali da VA ekstrakt i VA-Dox kotretman uvode K562 ćelije u apoptozu, sledeći korak u istraživanju je bio ispitati da li su kaspaza-3 i Bax uključeni u ovaj proces. K562 ćelije su tretirane VA ekstraktom (2.0 μ g/mL ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 μ M) i VA-Dox kombinacijom, tokom 72 sata, nakon čega je određen nivo genske ekspresije kvantitativnom PCR metodom (qPCR). Odlučili smo da pratimo gensku ekspresiju *Bax* i *kaspaze-3* nakon 72 sata kontinuiranog tretmana, jer je na tom vremenu uočen najveći procenat ćelija u ranoj apoptozi, kao i značajan gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala.

Kao što je pokazano na Grafiku 4.8. statistički značajno povećanje nivoa genske ekspresije *kaspaze-3* i *Bax* je primećeno nakon 72 sata tretmana K562 ćelija, pre svega VA ekstraktom, a zatim i VA-Dox kombinacijom.



Grafik 4.8. Efekat tretmana VA ekstraktom na ekspresiju gena za *kaspazu-3* i *Bax* u K562 ćelijama

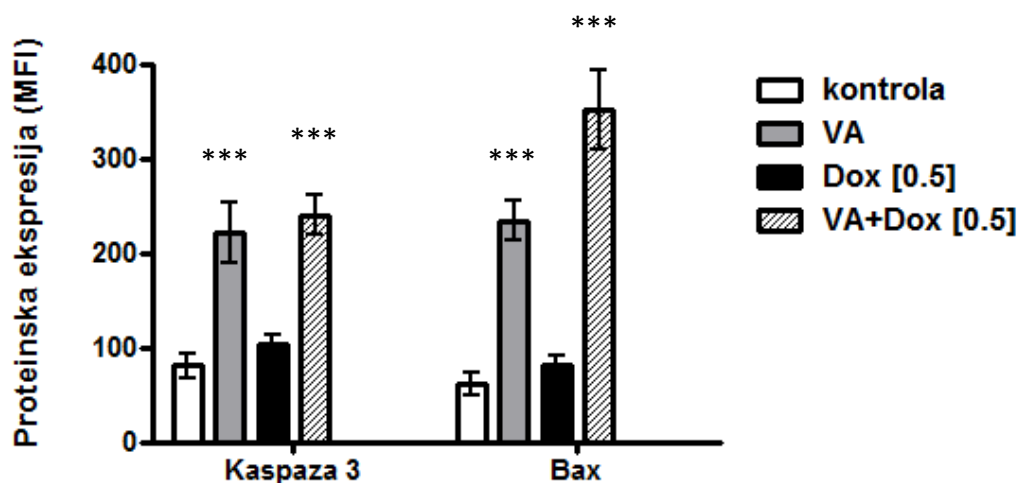
Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.5 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom 72 sata, nakon čega je izolovana iRNK i određivan nivo genske ekspresije *kaspaze-3* i *Bax* qPCR. Nivo iRNK je normalizovan na GAPDH. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije. Bazalni nivo ekspresije gena u netretiranim K562 ćelijama prikazan je isprekidanom linijom.

Dobijeni rezultati ukazuju da je apoptoza K562 ćelija posredovana kaspazama i regulisana Bcl-2 familijom proteina.

4.8. Ispitivanje uticaja ekstrakta bele imele na ekspresiju proteina kaspaze-3 i Bax u tretiranim K562 ćelijama

Da bi smo potvrdili da VA ekstrakt sam i u kombinaciji sa subapoptotskom koncentracijom Dox dovodi do apoptoze posredovane kaspazama K562 ćelija, što je primećeno određivanjem nivoa ekspresije gena za ova dva proteina, nivo proteinske ekspresije kaspaze-3 i Bax meren je citometrijski. Ćelije su tretirane VA ekstraktom (2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 μM) i VA-Dox kombinacijom 72 sata, nakon čega je određen nivo proteina u ćelijama. Kao što je pokazano na Grafiku 4.9. statistički značajno povećanje nivoa aktivne kaspaze-3 i Bax dobijen je nakon tretmana ćelija VA ekstraktom i VA-Dox kombinacijom, pri čemu je najveći efekat dobijen nakon tretmana K562 ćelija kombinacijom agenasa. Prikazani

rezultati potvrđuju da bi apoptoza K562 ćelija posredovana kaspazama mogla biti regulisana proteinima Bcl-2 familije.



Grafik 4.9. Uticaj ekstrakta bele imele na proteinsku ekspresiju kaspaze-3 i Bax u K562 ćelijama

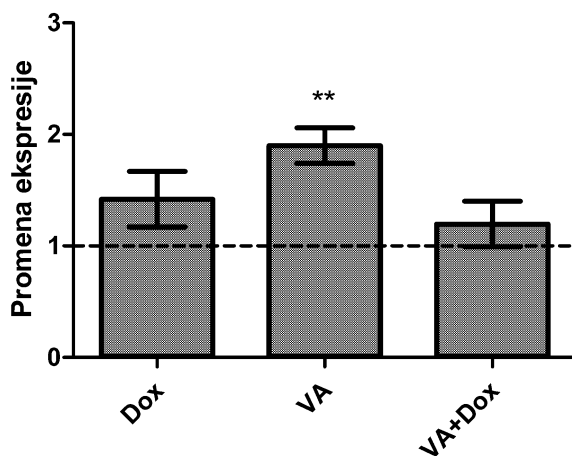
Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 2 µg/mL ukupnih proteina (VA), 0.5µM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je citometrijom određen nivo ekspresije proteina aktivne kaspaze 3 i Bax. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. *** p<0.001; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

Dosadašnji rezultati ukazuju da je moguće indukovati apoptozu K562 ćelija delovanjem subapoptotske koncentracije Dox ukoliko se istovremeno primeni i tretman VA ekstraktom.

Rezultati prikazani u Poglavlju 4.2. pokazuju da se karakteristični G₂/M zastoje dobijen nakon Dox tretmana K562 ćelija u potpunosti eliminiše kada se primeni VA-Dox kombinovani tretman, kao i da tretman VA ekstraktom dovodi do povećanja procenta ćelija u G₀/G₁ fazi. Postavlja se pitanje kakav efekat ispoljava VA ekstrakt na gensku i proteinsku ekspresiju p21^{WAF1}, s obzirom da je ovaj kinazni inhibitor uključen u proces regulacije ćelijskog ciklusa. Takođe, sve je veći broj dokaza koji pokazuju da citotoksični lekovi, naročito pri subapoptotskim koncentracijama, mogu dovesti do zastoja u ćelijskom ciklusu sa senescentnim karakteristikama datih tumorskih ćelija. Ciklin zavisni kinazni inhibitor p21^{WAF1} je jedan od glavnih molekula u ovom procesu (123,124).

4.9. Efekat tretmana K562 ćelija na gensku ekspresiju iRNK za $p21^{WAF1}$

Da bi smo ispitali ulogu $p21^{WAF1}$ u procesu regulacije ćelijskog ciklusa, kao i u procesu senescencije, K562 ćelije su tretirane VA ekstraktom (2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 μM) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je meren nivo genske ekspresije $p21^{WAF1}$ qPCR. Nakon 72 sata tretmana K562 ćelija, jedino VA ekstrakt dovodi do statistički značajnog povećanja nivoa genske ekspresije $p21^{WAF1}$ u poređenju sa kontrolom. S druge strane, VA-Dox kombinovani tretman dovodi do izvesnog smanjenja nivoa genske ekspresije $p21^{WAF1}$ u poređenju sa Dox tretmanom (Grafik 4.10.).



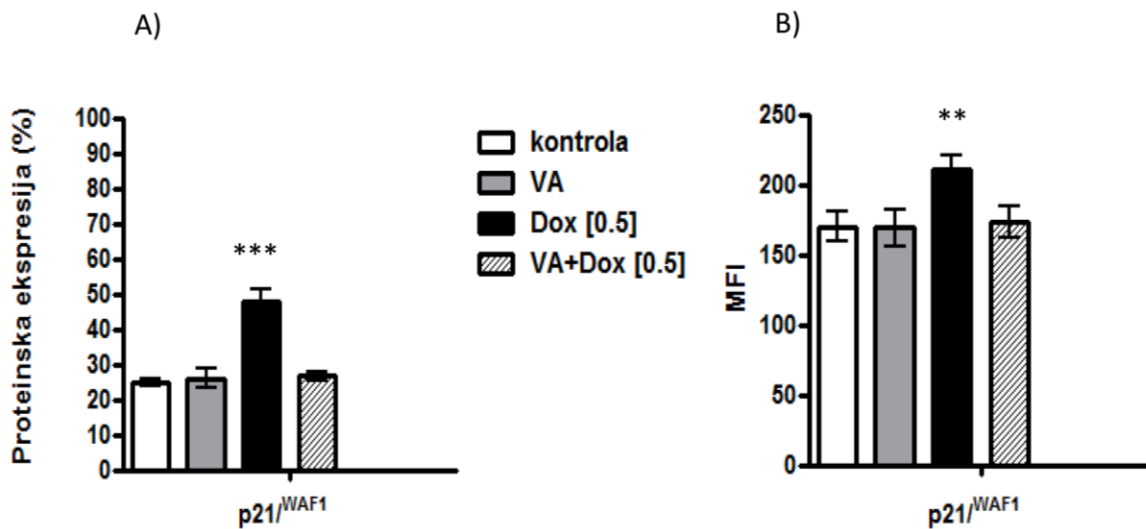
Grafik 4.10. Efekat tretmana K562 ćelija na ekspresiju iRNK za $p21^{WAF1}$

Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.5 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom, 72 sata, nakon čega je izolovana iRNK i određivan nivo genske ekspresije $p21^{WAF1}$ qPCR. Nivo iRNK je normalizovan na GAPDH. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. ** $p < 0.01$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije. Bazalni nivo ekspresije gena u netretiranim K562 ćelijama (iznosi 1) prikazan je isprekidanom linijom.

Dobijeni rezultati ukazuju da tretman K562 ćelija VA ekstraktom dovodi do zastoja u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa, s obzirom da smo dobili smanjenje ekspresije ciklina D1 i povećanje ekspresije gena $p21^{WAF1}$.

4.10. Efekat tretmana K562 ćelija na proteinsku ekspresiju p21^{WAF1}

Da bi smo potvrdili da p21^{WAF1} ima ulogu u G₀/G₁ zastoju u rastu K562 ćelija, sledeći korak je bio ispitati uticaj datog ekstrakta na proteinski nivo p21^{WAF1}. K562 ćelije su tretirane VA ekstraktom (2.0 µg/mL ukupnih proteina), Dox (0.5 µM) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je citometrijski meren nivo ekspresije proteina p21^{WAF1} (Grafik 4.11.). Za razliku od rezultata dobijenih qPCR, rezultati dobijeni merenjem proteinske ekspresije p21^{WAF1} su bili donekle neočekivani. Proteinska ekspresija p21^{WAF1} je bila maksimalna nakon tretmana K562 ćelija 0.5 µM Dox. Tretman K562 ćelija VA-Dox kombinacijom smanjuje nivo ekspresije p21^{WAF1} proteina do nivoa u netretiranim ćelijama, dok se nivo p21^{WAF1} proteina nije menjao nakon tretmana VA ekstraktom u odnosu na netretirane ćelije (Grafik 4.11. A). Takođe, povećanje intenziteta fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, MFI) p21^{WAF1} pozitivnih ćelija koje se uočava kod ćelija tretiranih Dox se kod ćelija tretiranih VA-Dox kombinacijom smanjuje do nivoa netretiranih ćelija (Grafik 4.11. B).



Grafik 4.11. Efekat tretmana K562 ćelija na nivo proteinske ekspresije p21^{WAF1}

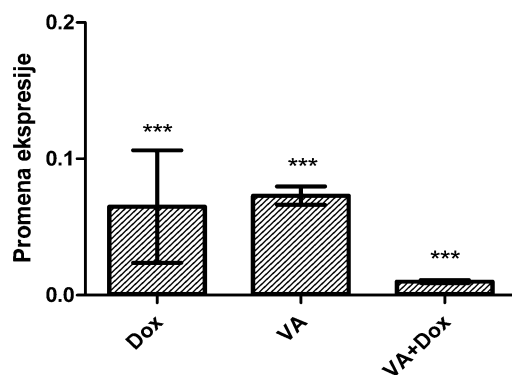
Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 2.0 µg/mL ukupnih proteina (VA), 0.5µM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom, tokom 72 sata, nakon čega je citometrijski određivan nivo proteinske ekspresije p21^{WAF1}. Dobijeni rezultati su predstavljeni kao A) procenat p21^{WAF1} pozitivnih K562 ćelija i B) geometrijska sredina intenziteta fluorescence (MFI). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. ** p<0.01; *** p<0.001; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

Ekspresija p21^{WAF1} molekula nakon tretmana K562 ćelija 0.5 μ M Dox ukazuje na fenotip senescentnih ćelija. Njegovo značajno sniženje nakon tretmana VA-Dox kombinacijom ukazuje da p21^{WAF1} može imati značajnu ulogu u prevođenju ćelija iz senescentnog stanja u apoptotski tip ćelijske smrti. Takođe, odustvo p21^{WAF1} u K562 ćelijama nakon VA-Dox kotretmana može biti posledica aktivnosti kaspaza, s obzirom da je nakon 72 sata kotretmana detektovan značajan procenat ćelija u ranoj apoptozi (Grafik 4.6.), kao i značajno povišen nivo aktivne kapaze-3, kako na genskom tako i na proteinskom nivou (Grafik 4.8. i Grafik 4.9.).

4.11. Efekat tretmana K562 ćelija na gensku ekspresiju iRNK za *IGF-1R*

Dobro je poznato da receptor za insulinu sličan faktor rasta 1 (engl. insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R) ima značajnu ulogu u razvoju i progresiji malignih tumora, kao i da doprinosi terapijskoj rezistenciji (125,126). Međutim, sve je veći broj dokaza koji ukazuju da ima značajnu ulogu i u indukciji senescencije.

Da bi smo ispitali efekat VA-Dox tretmana na gensku ekspresiju *IGF-1R*, u procesu Dox indukovane senescencije, K562 ćelije su tretirane VA ekstraktom (2.0 μ g/mL ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 μ M) i VA-Dox kombinacijom, tokom 72 sata, nakon čega je meren nivo genske ekspresije *IGF-1R* qPCR. Rezultati prikazani na Grafiku 4.12. pokazuju da nakon 72 sata tretmana K562 ćelija dolazi do statistički značajnog smanjenja nivoa genske ekspresije *IGF-1R* u poređenju sa kontrolom, pri čemu je najveće smanjenje uočeno nakon tretmana VA-Dox kombinacijom.



Grafik 4.12. Efekat tretmana K562 ćelija na gensku ekspresiju *IGF-1R*

Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.5 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom, tokom 72 sata, nakon čega je izolovana iRNK i određivan nivo genske ekspresije *IGF-1R* qPCR. Nivo iRNK je normalizovan na GAPDH. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije. Bazalni nivo ekspresije gena iznosi 1 (nije prikazan).

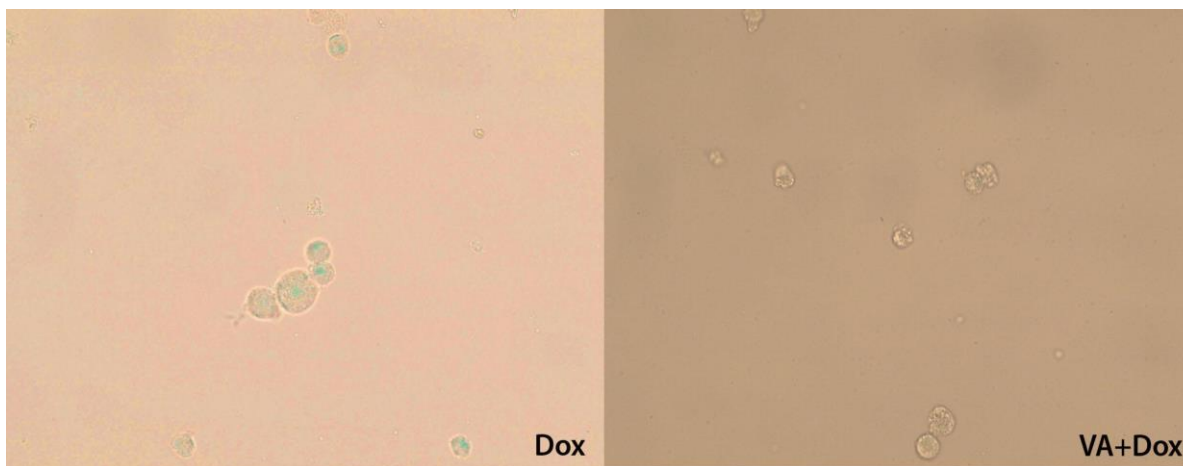
Inhibicija *IGF-1R* dovodi do zaustavljanja ćelijske proliferacije, nezavisno od toga u kojoj kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa je došlo do zastoja. Dobijeni rezultati ukazuju da dodatno sniženje ekspresije *IGF-1R* nakon tretmana VA-Dox kombinacijom može imati ulogu u prevođenju ćelija iz senescentnog stanja u apoptotski tip ćelijske smrti, s obzirom da *IGF-1R* ima značajnu ulogu i u inhibiciji apoptoze.

4.12. β -galaktozidazno bojenje senescentnih K562 ćelija

S obzirom da ni $p21^{\text{WAF1}}$, ni *IGF-1R* nisu molekularni markeri specifični isključivo za senescentno stanje ćelije, da bi smo potvrdili pretpostavku da je istovremenom primenom VA ekstrakta i subapoptotske koncentracije Dox moguće K562 ćelije prevesti iz senescentnog stanja u apoptotsku ćelijsku smrt, bilo je potrebno ispitati prisustvo markera karakterističnog za fenotip senescentnih ćelija.

β galaktozidaza (SA- β -gal) se detektuje X-gal bojenjem i reflektuje povećanu lizosomalnu masu senescentnih ćelija (62,127). U cilju potvrđivanja senescentnog fenotipa K562 ćelija tretiranih subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 μM), ćelije su bojene β -galaktozidazom nakon 72 sata tretmana. Na Slici 4.2. su prikazane senescentne K562 ćelije

tretirane Dox. Osim β -galaktozidazne pozitivnosti, primećuju se morfološke promene, kao što su uvećavanje i slepljivanje ćelija praćeno finom granularnošću i penastom citoplazmom, koje su karakteristične za fenotip senescentnih ćelija. Suprotno tome, ćelije tretirane VA-Dox kombinacijom ne pokazuju fenotip senescentnih ćelija (Slika 4.2.).



Slika 4.2. Bojenje β -galaktozidazom

Postojanje ćelija sa senescentnim fenotipom je potvrđeno korišćenjem senescencijom povezanog β -galaktozidaznog bojenja (SA- β -gal), koje je identifikovano svetlosnim mikroskopom.

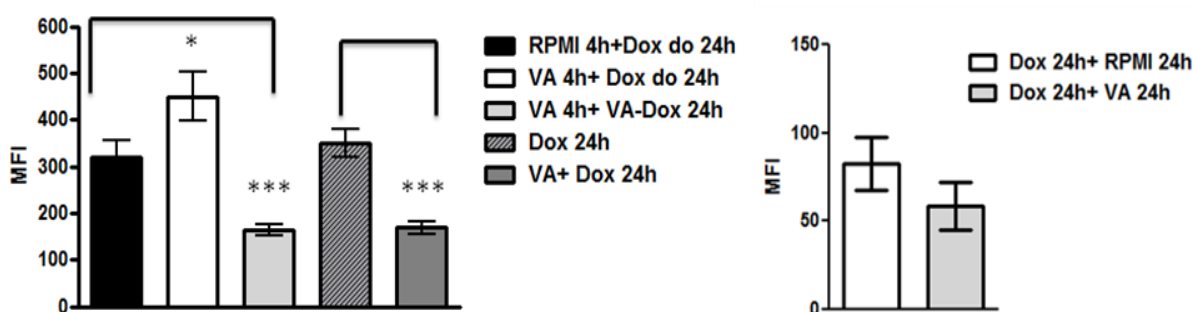
4.13. Efekat ekstrakta bele imele na ulazak/izlazak doksorubicina u tretiranim ćelijama

S obzirom da smo pokazali sinergističko dejstvo VA ekstrakta i subterapeutske koncentracije Dox u indukciji apoptoze, postavlja se pitanje da li je dati efekat posledica povećanog ulaska Dox u ćelije tretirane VA-Dox kombinacijom. Upravo iz tog razloga smo ispitivali nivo Dox u ćelijama tretiranim:

1. VA ekstraktom ($2\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodati Dox ($0.5\mu\text{M}$) do 24 sata,
2. VA ekstraktom 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodata VA-Dox kombinacija do 24 sata,

3. Hranjivi medijum 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox do 24 sata,
4. VA-Dox kombinacija 24 sata,
5. Dox 24 sata.

Nakon 24 sata tretmana ćelije su isprane i merena je količina Dox koja je ušla u ćeliju određivanjem nivoa intraćelijskog Dox (Grafik 4.13.). Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da je količina Dox unutar ćelija pretretiranih VA ekstraktom, a potom Dox bila značajno viša u odnosu na količinu Dox u ćelijama tretiranim samo Dox. S druge strane, količina Dox unutar ćelija tretiranih VA-Dox kombinacijom, bez obzira da li su ćelije bile ili ne pretretitane VA ekstraktom je značajno niža u odnosu na količinu Dox u ćelijama tretiranim samo Dox. Nakon 24 sata maksimalnog ulaska Dox u ćeliju, Dox je uklonjen iz hranjivog medijuma i dodat je novi medijum bez Dox ili medijum koji sadrži VA ekstrakt. Izlazak Dox iz ćelija je meren nakon 24 sata (Grafik 4.13.). Na osnovu prikazanih rezultata, zaključujemo da tretman VA ekstraktom ne utiče značajno na izlazak Dox iz K562 ćelija.



Grafik 4.13. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na ulazak/izlazak doksorubicina iz K562 ćelija

K562 ćelije su tretirane odgovarajućom kombinacijom agenasa tokom 24 sata, nakon čega su isprane, a ulazak doksorubicina u ćelije je meren citometrijski. Za analizu izlaska doksorubicina iz ćelija, K562 ćelije su isprane nakon 24 sata maksimalnog ulaska doksorubicina u ćelije i inkubirane sa svežim RPMI 1640 medijumom bez doksorubicina ili sa medijumom koji sadrži VA ekstrakt. Nakon 24 sata ćelije su isprane i količina doksorubicina koja je izašla iz ćelija je merena citometrijski. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. * $p<0.05$; *** $p<0.001$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

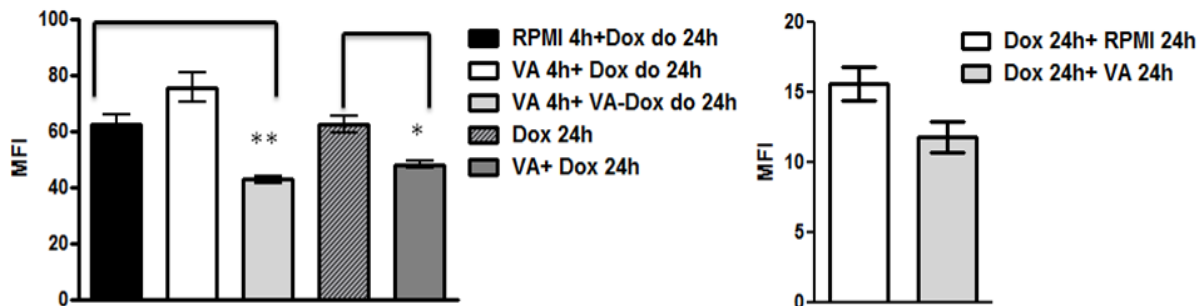
Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da u zavisnosti od toga da li je primenjen prethodni tretman ćelija VA ekstraktom ili ne, količina Dox u ćelijama je različita. Pretretman ćelija samo VA ekstraktom povećava ulazak Dox u ćelije, dok

pretretman ćelija VA ekstraktom, a zatim tretman VA-Dox ili tretman samo VA-Dox kombinacijom značajno smanjuje ulazak Dox u ćelije. Sa druge strane, tretman ćelija VA ekstraktom ne utiče značajno na njegov izlazak.

Pitanje koje se nameće je kakav je uticaj VA ekstrakta na ulazak/izlazak Dox u limfocite, odnosno, u ćelijsku populaciju koja je podložna citotoksičnom delovanju hemioterapeutika, što kompromituje delovanje imunskog sistema domaćina, kao važne komponente izlečenja, dovodi do neželjenih reakcija koje ugrožavaju hemioterapiju i njenu efikasnost, a ne manje bitno utiču na kvalitet života pacijenata. Upravo iz tog razloga izolovali smo limfocite iz krvi šest zdravih kontrola i merili nivo Dox u ćelijama tretiranim:

1. VA ekstraktom ($2\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox ($0.5\mu\text{M}$) do 24 sata,
2. VA ekstraktom 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodata VA-Dox kombinacija do 24 sata,
3. Hranjivi medijum 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox do 24 sata,
4. VA-Dox kombinacija 24 sata,
5. Dox 24 sata.

Na osnovu dobijenih rezultata (Grafik 4.14.) zaključujemo da je količina Dox koja je ušla u limfocite nezavisno od primenjenog tretmana daleko niža u odnosu na količinu Dox koja je ušla u K562 ćelije pri istim eksperimentalnim uslovima. S druge strane, kao i kod K562 ćelija, količina Dox unutar limfocita pretretiranih VA ekstraktom, a potom Dox je bila viša u odnosu na količinu Dox u limfocitima tretiranim samo Dox. Takođe, količina Dox unutar limfocita tretiranih VA-Dox kombinacijom, bez obzira da li su ćelije bile ili ne pretretitane VA ekstraktom, niža je u odnosu na količinu Dox u ćelijama tretiranim samo Dox. Dox je uklonjen iz hranjivog medijuma nakon 24 sata maksimalnog ulaska u limfocite i dodat je novi medijum bez Dox ili medijum sa VA ekstraktom. Izlazak Dox iz limfocita je meren nakon 24 sata (Grafik 4.14.). Rezultati ukazuju da tretman VA ekstraktom ne utiče značajno na izlazak Dox iz limfocita.



Grafik 4.14. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na ulazak/izlazak doxorubicina iz limfocita

Limfociti izolovani iz krvi šest zdravih kontrola su tretirani odgovarajućom kombinacijom agenasa i nakon 24 sata tretmana ćelije su isprane, a ulazak doxorubicina (Dox) u ćelije je meren citometrijski. Za analizu izlaska doxorubicina iz ćelije, limfociti su isprani nakon 24 sata maksimalnog ulaska Dox u ćelije. Zatim su inkubirani u prisustvu svežeg RPMI 1640 medijuma bez Dox ili u prisustvu medijuma koji sadrži ekstrakt bele imele (VA). Nakon 24 sata ćelije su isprane i količina Dox koja je izašla iz ćelija je merena citometrijski. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

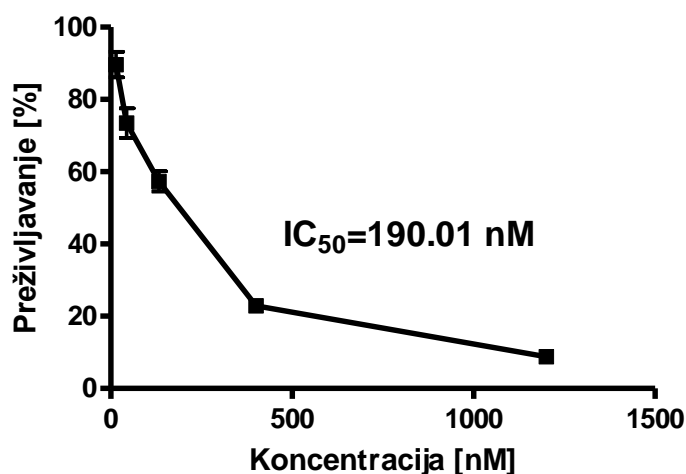
Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da istovremena primena VA ekstrakta i Dox smanjuje ulazak Dox u tretirane limfocite, ali ne utiče značajno na njegov izlazak iz ćelija. Ovi rezultati su prvenstveno značajni za limfocite, jer na taj način VA ekstrakt, u koncentraciji koja je znatno ispod toksične koncentracije, ispoljava svoj citoprotektivni efekat na ovu ćelijsku populaciju.

Kako od devedesetih godina prošlog veka Dox nije terapija izbora u lečenju pacijenata obolelih od hronične mijeloidne leukemije, u daljim istaživanjima smo odlučili da ispitujemo molekularne mehanizme koji leže u osnovi interakcije bioaktivnih komponenti VA ekstrakta sa Dox na ćelijskoj liniji poreklom iz tumora kod kojih se Dox primenjuje kao standardna hemioterapija.

4.14. *In vitro* citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat ekstrakta bele imele i doxorubicina na MCF7 ćelijama

U tretmanu karcinoma dojke danas, Dox se koristi kao deo standardne terapije. Za dalja ispitivanja izabrali smo MCF7 ćelijsku liniju karcinoma dojke, jer je VA ekstrakt na

ovoj ćelijskoj liniji imao veći citotoksični/antiproliferativni efekat u odnosu na MDA-MB-231 (Tabela 4.1.). IC_{50} vrednost VA ekstrakta na ovoj liniji, nakon 72h iznosila je $9.08 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina, dok je vrednost IC_{50} za Dox na MCF7 ćelijama iznosila $0.19 \mu\text{M}$. Citotoksična selektivnost VA ekstrakta na MCF7 ćelijama u odnosu na MČPK izražena kroz indeks selektivnosti (odnos IC_{50} vrednosti) iznosi $SI=0.680$



Grafik 4.15. Kriva preživljavanja MCF7 ćelija tretiranih doksorubicinom

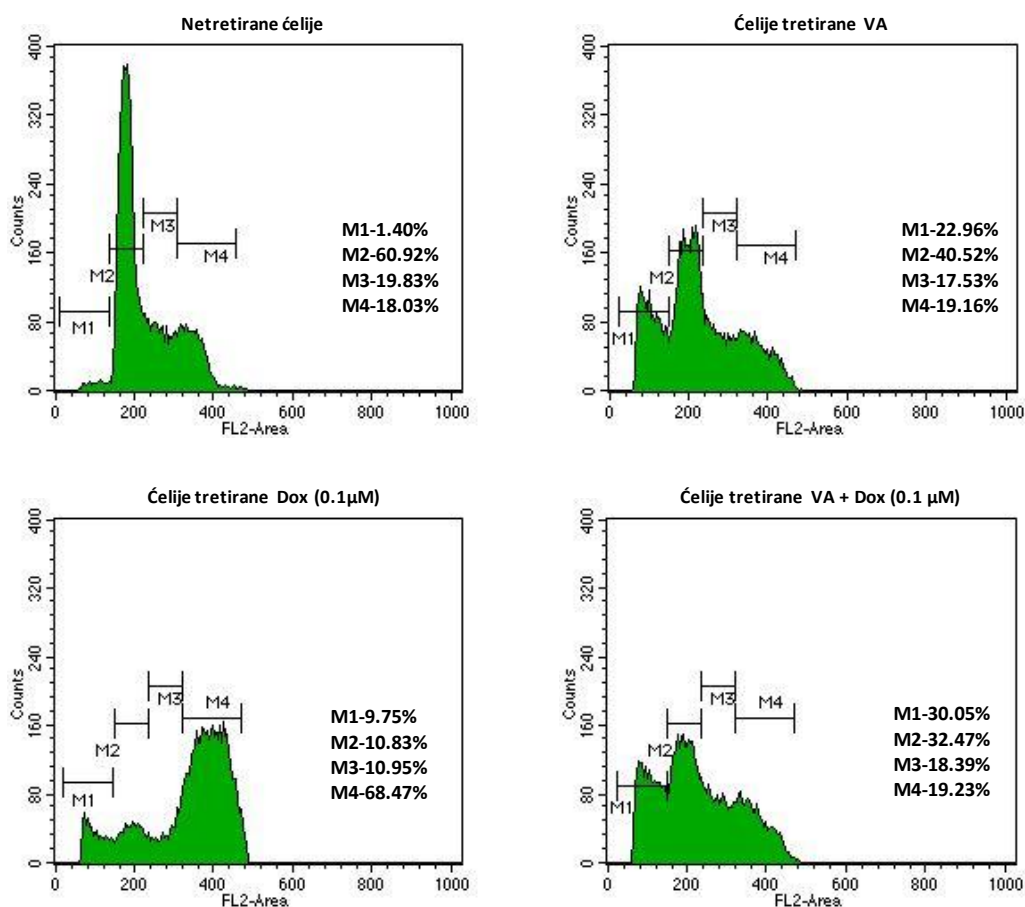
Preživljavanje MCF7 ćelija posle 72 sata kontinuiranog delovanja doksorubicina prikazano je u funkciji rastućih koncentracija (0.015, 0.044, 0.132, 0.400 i 1.20 μM) ispitivanog jedinjenja.

Na osnovu rezultata dobijenih na K562 ćelijskoj liniji, a u cilju ispitivanja mehanizma interakcije bioaktivnih sastojaka bele imele i Dox na MCF7 ćelijama, odabrali smo jednu subterapeutsku koncentraciju Dox ($0.1 \mu\text{M}$) i jednu koncentraciju ekstrakta bele imele ($10.0 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), odnosno njihovu kombinaciju, na kojim će se dalje ispitivati citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat, nakon 72 sata tretmana.

4.15. Uticaj ekstrakta bele imele na distribuciju MCF7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

U sklopu ispitivanja antiproliferativnog efekata VA ekstrakta na MCF7 ćelijskoj liniji, ispitivan je njegov uticaj na promene distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, korišćenjem citometrijske analize. MCF7 ćelije su kontinuirano tretirane tokom 72 sata VA

ekstraktom (10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), Dox (0.1 μM) i VA-Dox kombinacijom. Nakon 72 sata tretmana MCF7 ćelija VA ekstraktom povećava se procent ćelija u apoptozi, što je predstavljeno jasno izdvojenim sub-G1 pikom na jednoparametarskom histogramu (Grafik 4.16.). Minimalno nakupljanje ćelija u sub-G1 piku prisutno je nakon tretmana (0.1 μM) Dox (Grafik 4.16.), ali se značajno povećava broj ćelija u G_2/M fazi ćelijskog ciklusa. Tretman MCF7 ćelija VA-Dox kombinacijom ne dovodi do G_2/M zastoja, ali povećava procenat ćelija u apoptozi, odnosno u sub-G1 piku (Grafik 4.16.).



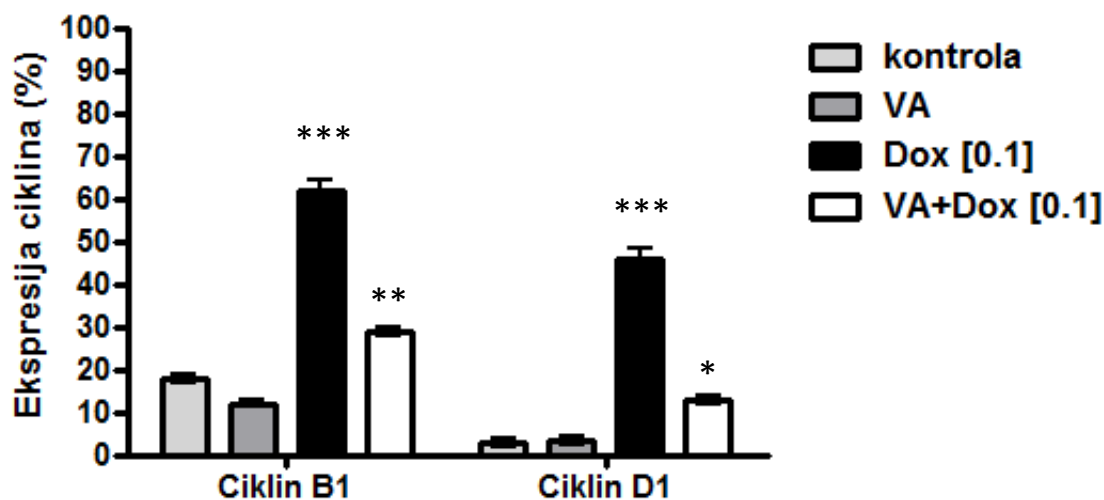
Grafik 4.16. Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana MCF7 ćelija

Prikaz promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana MCF7 ćelija ekstraktom bele imele 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata. Ćelije su bojene propidijum jodidom, a promene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su merene citometrijski. Marker M1- predstavlja ćelije u apoptozi sa DNK sadržajem koji odgovara sub- G_1 frakciji; M2- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara G_0/G_1 fazi ciklusa; M3- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara S fazi ciklusa; M4- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara G_2/M fazi ciklusa. Prikazani su reprezentativni jednoparametarski dijagrami (histogrami) tri nezavisna eksperimenta.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da, kao i u slučaju K562 ćelija, karakteristični G₂/M zastoj dobijen nakon Dox tretmana MCF7 ćelija biva u potpunosti eliminisan nakon kotretmana ćelija VA ekstraktom i Dox. Takođe, odsustvo G₂/M zastoja je praćeno povećanjem procenta ćelija u apoptozi.

4.16. Ekspresija ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim MCF7 ćelijama

Da bi smo ispitali molekularne mehanizme koji leži u osnovi reverzibilnog zastoja ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa, analizirali smo ekspresiju ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim MCF7 ćelijama. Nivo ekspresije ciklina B1 i ciklina D1 određivan je nakon 72 sata tertmana MCF7 ćelija VA ekstraktom (10.0 µg/mL ukupnih proteina), Dox (0.1 µM) i VA-Dox kombinacijom, metodom citometrije. Rezultati prikazani na Grafiku 4.17. pokazuju da je porast ekspresije ciklina B1 povezan sa značajnom akumulacijom ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa nakon tretmana MCF7 ćelija Dox. S druge strane, tretman ćelija VA-Dox kombinacijom značajno smanjuje procenat ciklin B1 pozitivnih ćelija (Grafik 4.17.). Ovo smanjenje povezano je sa eliminacijom G₂/M zastoja (Grafik 4.16.). Tretman ćelija VA ekstraktom ne utiče na ekspersiju ciklina B1 (Grafik 4.17).



Grafik 4.17. Analiza sadržaja ciklina B1 i ciklina D1 u tretiranim MCF7 ćelijama

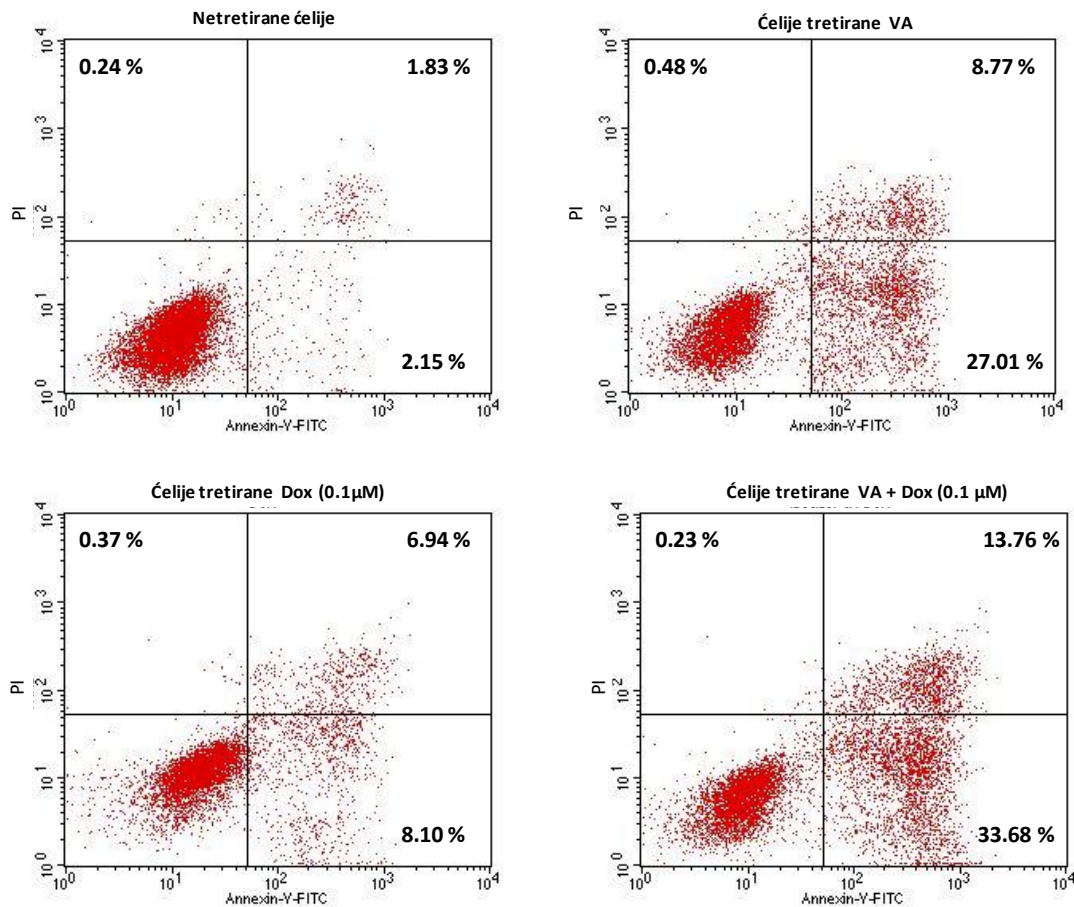
Nivo ekspresije proteina ciklina B1 i ciklina D1 je meren metodom citometrije, nakon 72 sata tretmana MCF7 ćelija ekstraktom bele imele 10.0 µg/mL ukupnih proteina (VA), 0.1 µM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije.

Nakon 72 sata Dox tretmana MCF7 ćelija dolazi do značajnog povećanja procenta ciklina D1 u poređenju sa netretiranim, kontrolnim ćelijama (Grafik 4.17.). Tretman ćelija VA ekstraktom ne utiče na ekspresiju ciklina D1, dok VA-Dox kombinacija značajno smanjuje procenat ciklin D1 pozitivnih ćelija u poređenju sa Dox (Grafik 4.17.). Ovo smanjenje je povezano sa eliminacijom G₂/M zastoja i povećanjem procenta ćelija u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa (Grafik 4.16.).

4.17. Ispitivanje proapoptotskog delovanja ekstrakta bele imele na MCF7 ćelije

Proapoptotski efekat VA ekstrakta, kao i VA-Dox kombinacije opisan u Poglavlju 4.16. je potvrđen dvokolornim bojenjem (Annexin V / PI) tretiranih MCF7 ćelija citometrijskom analizom. MCF7 ćelije su tretirane VA ekstraktom pri koncentraciji od 10.0 µg/mL ukupnih proteina, Dox pri koncentraciji od 0.1 µM, i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata. Nakon 72 sata kontinuiranog tretmana ćelija VA ekstraktom dolazi do apoptotske ćelijske smrti MCF7 ćelija (Grafik 4.18). Najveći procenat ćelija u ranoj apoptozi (35%, p<0.001) primećen je nakon 72 sata tretmana VA-Dox kombinacijom (VA 10.0 µg/mL + Dox 0.1 µM), dok tretman MCF7 ćelija Dox indukuje minimalno povećanje procenta ćelija u apoptozi. Reprezentativni dvoparametarski dijagrami (dot plot) prikazani su na Grafiku 4.18.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da VA ekstrakt može uvesti MCF7 ćelije u apoptozu. Još značajnije je da tretman VA ekstraktom u kombinaciji sa subapoptotskom/subterapeutskom koncentracijom Dox može uvesti MCF7 ćelije u apoptozu.



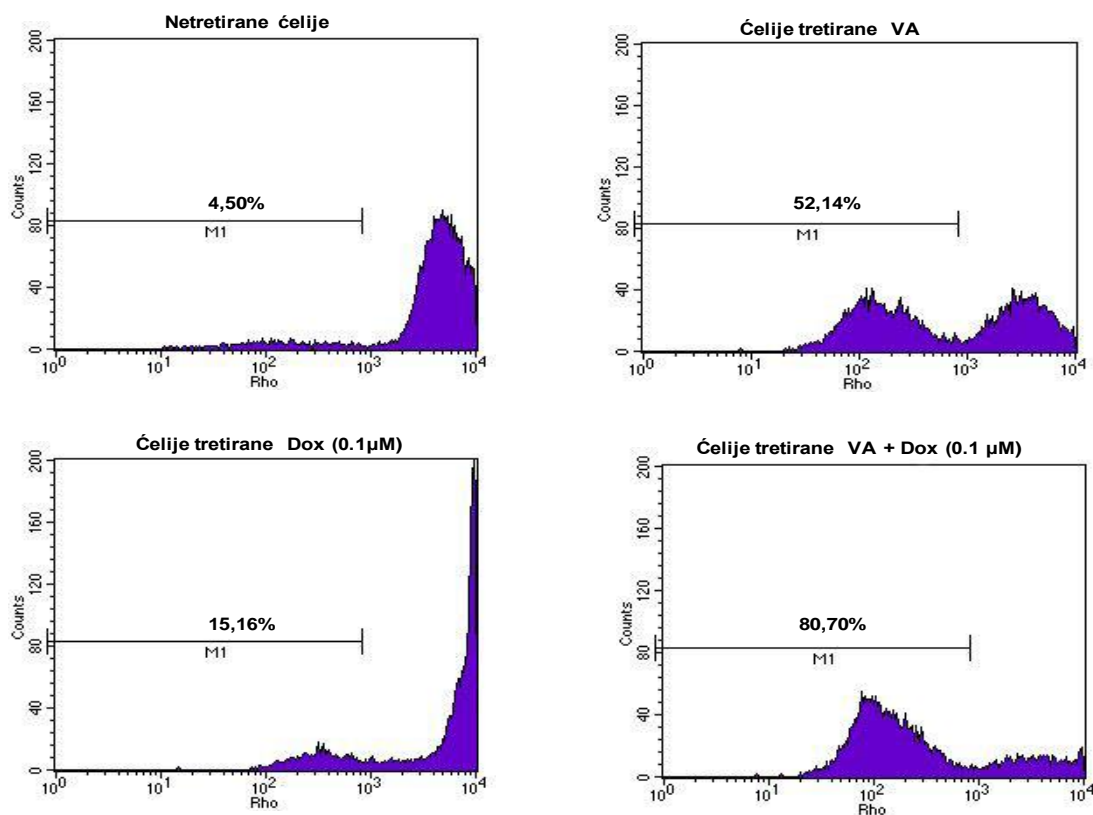
Grafik 4.18. Vremenski zavisna indukcija apoptotske ćelijske smrti tretiranih MCF7 ćelija

Odnos ćelija u ranoj apoptozi i ćelija u kasnoj apoptozi/nekrozi meren je citometrijski dvokolornim bojenjem Annexin V / PI. Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 10.0 μg/mL ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom 72 sata. Rezultati su predstavljeni kao reprezentativni dvoparametarski dijagrami (dot plot-ovi) MCF7 ćelija nakon 72 sata kontinuiranog tretmana.

Pitanje koje se dalje nameće, kao i u slučaju K562 ćelija je, da li VA-Dox kombinovani tretman MCF7 ćelija može dovesti do aktivacije mitohondrijskog apoptotskog puta.

4.18. Ispitivanje aktivacije mitohondrijskog apoptotskog puta u MCF7 ćelijama

Sledeći korak u istraživanju je bio ispitati vezu između narušavanja mitohondrijske funkcije i apoptoze indukovane VA ekstraktom i VA-Dox kombinacijom. Na Grafiku 4.19. su prikazani rezultati citometrijske analize jednokolornog bojenja MCF7 ćelija Rh 123. MCF7 ćelije su tretirane VA ekstraktom (10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), Dox (0.1 μM) i VA-Dox kombinacijom 72 sata. Nakon tretmana ćelija, i Dox i VA ekstrakt dovode do značajnog smanjenja inkorporacije Rh123, odnosno do pada $\Delta\psi\text{m}$. Pad $\Delta\psi\text{m}$ znatno je izraženiji nakon tretmana VA ekstraktom. Najveći gubitak $\Delta\psi\text{m}$ je primećen nakon tretmana MCF7 ćelija VA-Dox kombinacijom.



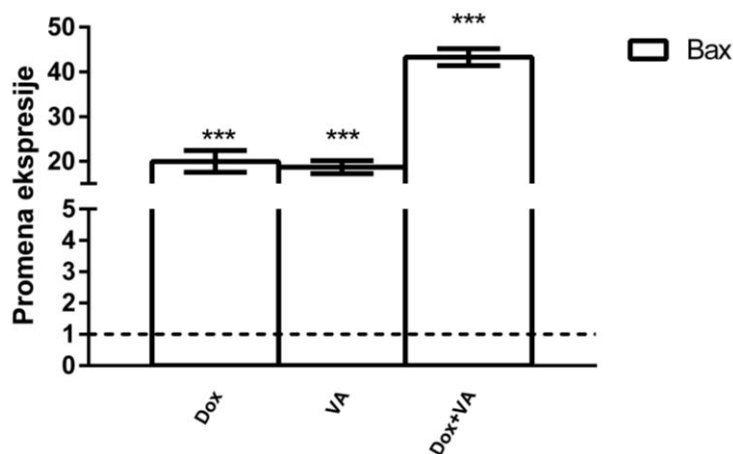
Grafik 4.19. Smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala

Nakon tretmana MCF7 ćelija ekstraktom bele imele 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom posle 72 sata, promene u mitohondrijskom membranskom potencijalu su merene citometrijski korišćenjem metode rodaminskog bojenja. Rezultati su predstavljeni kao reprezentativni jednoparametarski histogrami.

Prikazani rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim tretiranjem K562 ćelija ispitivanim agensima i ukazuju da rano smanjenje $\Delta\psi_m$ može imati ulogu u događajima koji dovode do apoptoze MCF7 ćelija tretiranih VA ekstraktom pojedinačno i u kombinaciji sa Dox.

4.19. Ispitivanje ekspresije iRNK za *Bax* u tretiranim MCF7 ćelijama

S obzirom da smo u prethodnim eksperimentima pokazali da postoji veza između uvođenja MCF7 ćelija, tretiranih VA ekstraktom i VA-Dox kombinacijom, u apoptozu sa smanjenjem $\Delta\psi_m$, sledeći korak u istraživanju je bio ispitati da li je *Bax* uključen u proces apoptotske ćelijske smrti. Apoptoza MCF7 ćelija nije posredovan kaspazom-3, jer je ove ćelije ne ekspimiraju (128,129). Ćelije su tretirane VA ekstraktom (10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.1 μM) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata nakon čega je određivan nivo genske ekspresije kvantitativnom PCR metodom. Kao što je pokazano na Grafiku 4.20. statistički značajno povećanje nivoa genske ekspresije *Bax* je primećeno nakon 72 sata tretmana MCF7 ćelija pre svega VA-Dox kombinacijom, a zatim VA ekstraktom i Dox pojedinačno.



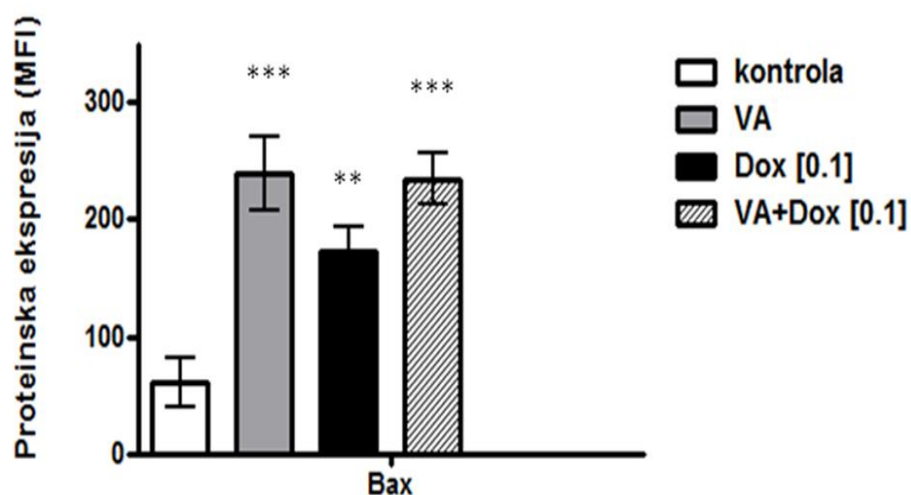
Grafik 4.20. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na ekspresiju *Bax* u MCF7 ćelijama

Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je izolovana iRNK i određivan nivo genske ekspresije *Bax* qPCR. Nivo iRNK je normalizovan na GAPDH. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika tretirane vs netretirane ćelije. Bazalni nivo ekspresije gena u netretiranih MCF7 ćelija (iznosi 1) prikazan je isprekidanom linijom.

Dobijeni rezultati ukazuju da je apoptoza MCF7 ćelija regulisana Bcl-2 familijom proteina.

4.20. Ispitivanje uticaja ekstrakta bele imele na ekspresiju Bax proteina u tretiranim MCF7 ćelijama

Da bi smo potvrdili da VA ekstrakt sam i u kombinaciji sa subapoptotskom koncentracijom Dox dovodi do Bax posredovane apoptoze MCF7 ćelija, što je primećeno određivanjem nivoa ekspresije *Bax* gena, nivo proteinske ekspresije Bax je meren citometrijski. Ćelije su tretirane VA ekstraktom (10.0 µg/mL ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.1 µM) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je određivan nivo Bax proteina u ćelijama. Kao što je pokazano na Grafiku 4.21. najveća ekspresija Bax proteina dobijena je nakon tretmana ćelija VA ekstraktom i VA-Dox kombinacijom. Dobijeni rezultati potvrđuju da bi apoptoza MCF7 ćelija mogla biti regulisana proteinima Bcl-2 familije.



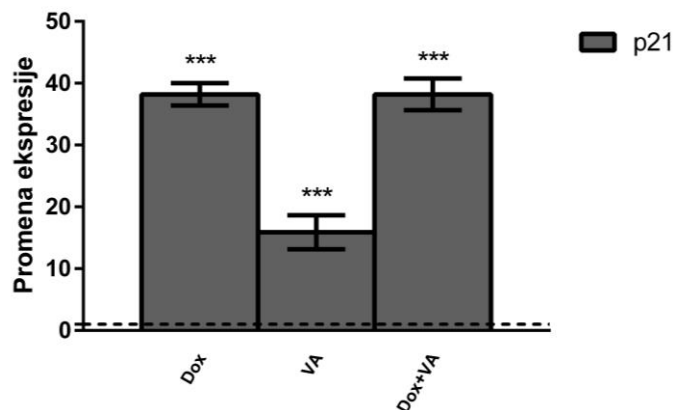
Grafik 4.21. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na proteinsku ekspresiju Bax u MCF7 ćelijama

Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 10.0 µg/mL ukupnih proteina (VA), 0.1µM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je citometrijski određivan nivo ekspresije Bax proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. ** p<0.01, *** p<0.001; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije.

Dosada prikazani rezultati ukazuju da je moguće indukovati apoptozu MCF7 ćelija primenom subapoptotske koncentracije Dox ukoliko se istovremeno primeni i tretman VA ekstraktom.

4.21. Efekat tretmana MCF7 ćelija na gensku i proteinsku ekspresiju $p21^{WAF1}$

Da bi smo ispitali da li $p21^{WAF1}$ ima ulogu u procesu regulacije ćelijskog ciklusa i u procesu Dox indukovane senescencije MCF7 ćelija, što je uočeno na K562 ćelijskoj liniji, MCF7 ćelije su tretirane VA ekstraktom (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina), subapoptotskom koncentracijom Dox (0.1 μM) i VA-Dox kombinacijom, tokom 72 sata, nakon čega je meren nivo genske i proteinske ekspresije $p21^{WAF1}$ qPCR i citometrijom. Nakon 72 sata tretmana MCF7 ćelija dolazi do statistički značajnog povećanja nivoa genske ekspresije $p21^{WAF1}$ u poređenju sa kontrolom (Grafik 4.22.).

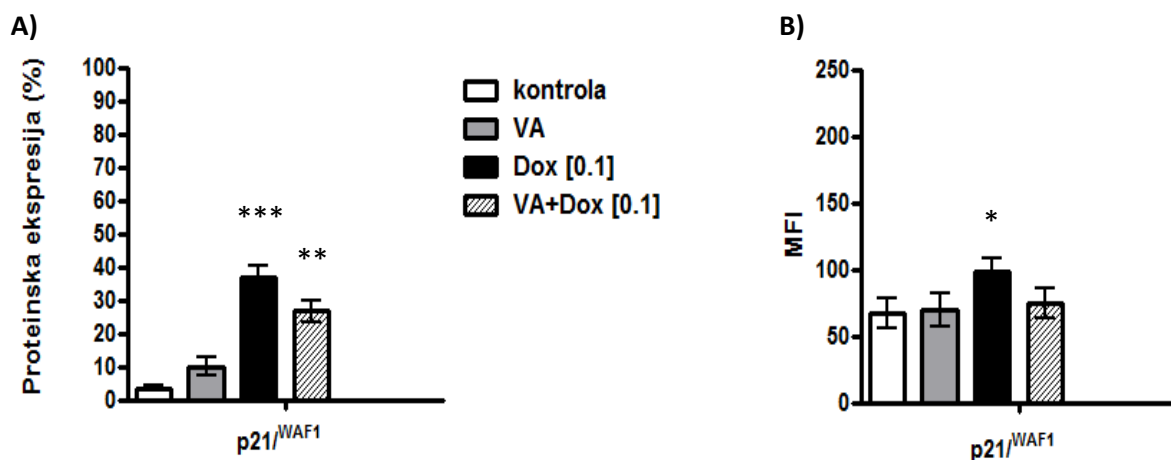


Grafik 4.22. Efekat tretmana MCF7 ćelija na gensku ekspresiju $p21^{WAF1}$

Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je izolovana iRNK i određivan nivo genske ekspresije $p21^{WAF1}$ qPCR. Nivo iRNK je normalizovan na GAPDH. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije. Bazalni nivo ekspresije gena u netretiranih MCF7 ćelija (iznosi 1) prikazan je isprekidanom linijom.

Proteinska ekspresija $p21^{WAF1}$ je bila maksimalna nakon tretmana MCF7 ćelija Dox. Tretman MCF7 ćelija VA-Dox kombinacijom smanjuje nivo $p21^{WAF1}$ proteina, dok

se nivo $p21^{WAF1}$ proteina nije menjao nakon tretmana VA ekstraktom u odnosu na netretirane ćelije (Grafik 4.23.A). Povećanje intenziteta fluorescence $p21^{WAF1}$ kod pozitivnih MCF7 ćelija, koje se uočava pri tretmanu Dox, kod ćelija tretiranih VA-Dox kombinacijom se smanjuje do nivoa netretiranih ćelija (Grafik 4.23. B).



Grafik 4.23. Efekat tretmana MCF7 ćelija na ekspresiju proteina $p21^{WAF1}$

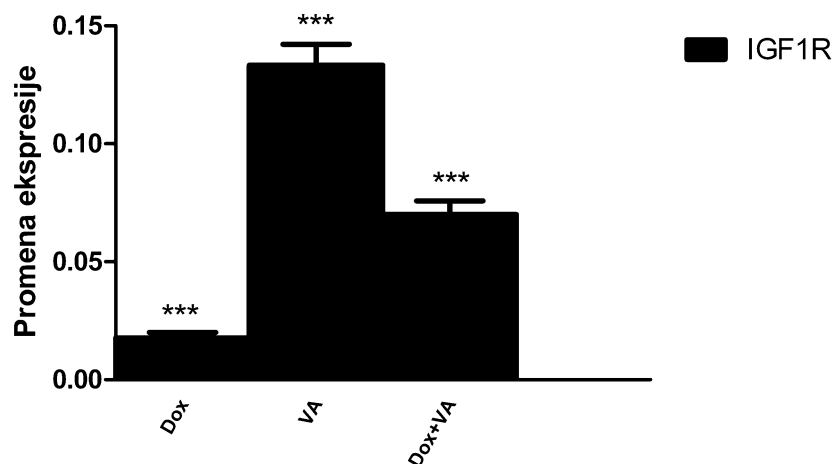
Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je citometrijski određivan nivo ekspresije proteina $p21^{WAF1}$. Rezultati su predstavljeni kao procenat $p21^{WAF1}$ pozitivnih ćelija A) i kao geometrijska sredina intenziteta fluorescence (MFI) B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije.

Dobijeni rezultati ukazuju da tretman MCF7 ćelija VA ekstraktom dovodi do zastoja u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa, s obzirom da je ekspresija ciklina D1 bila minimalna, a povećana ekspresija $p21^{WAF1}$ gena. Snižene ekspresije proteina $p21^{WAF1}$ nakon tretmana VA-Dox kombinacijom ukazuje da $p21^{WAF1}$ može imati značajnu ulogu u prevođenju ćelija iz senescentnog stanja u apoptotski tip ćelijske smrti.

4.22. Efekat tretmana MCF7 ćelija na ekspresiju iRNK gena za *IGF-1R*

Da bi smo ispitali efekat VA-Dox tretmana na gensku ekspresiju *IGF-1R*, MCF7 ćelije su tretirane VA ekstraktom (10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) i subapoptotskom koncentracijom Dox (0.1 μM) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je meren

nivo genske ekspresije *IGF-1R* qPCR. Nakon 72 sata tretmana MCF7 ćelija dolazi do statistički značajnog smanjenja nivoa genske ekspresije *IGF-1R* u poređenju sa kontrolom, pri čemu je najveće smanjenje uočeno nakon tretmana Dox (Grafik 4.24).

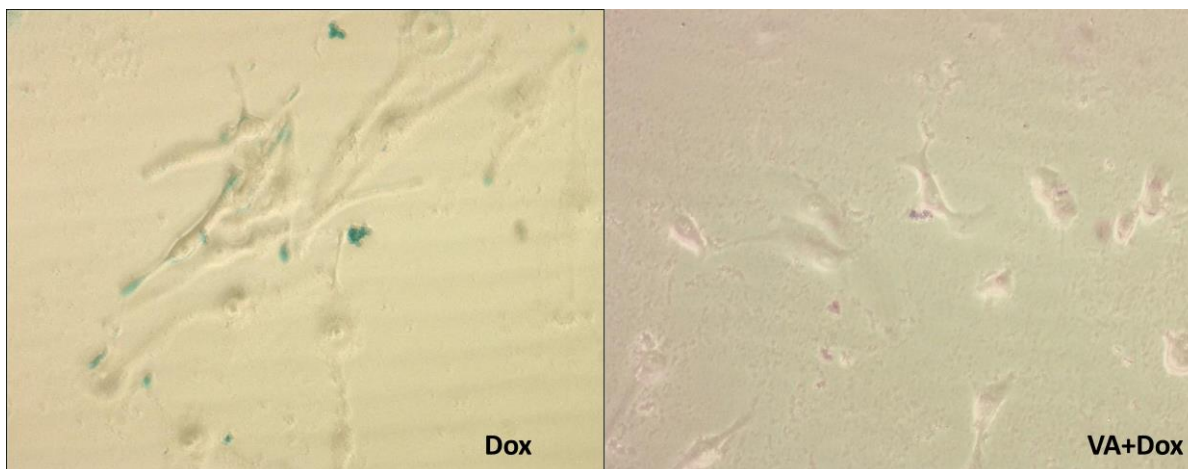


Grafik 4.24. Efekat tretmana MCF7 ćelija na gensku ekspresiju *IGF-1R*

Ćelije su tretirane ekstraktom bele imele 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina (VA), 0.1 μM doksorubicinom (Dox) i VA-Dox kombinacijom tokom 72 sata, nakon čega je izolovana iRNK i određivan nivo genske ekspresije *IGF-1R* qPCR. Nivo iRNK je normalizovan na GAPDH. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije. Bazalni nivo ekspresije iznosi 1 (nije prikazan).

4.23. β -galaktozidazno bojenje senescentnih MCF7 ćelija

U cilju potvrđivanja senescentnog fenotipa MCF7 ćelija tretiranih subapoptotskom koncentracijom Dox (0.1 μM), ćelije su bojene β -galaktozidazom nakon 72 sata tretmana. Na Slici 4.3. su prikazane senescentne MCF7 ćelije tretirane Dox. Osim β -galaktozidazne pozitivnosti, primećuju se morfološke promene, kao što su uvećanje i slepljivanje ćelija praćeno finom granulanošću i penastom citoplazmom, koje su karakteristične za senescentni fenotip. Suprotno tome, ćelije tretirane VA-Dox kombinacijom ne pokazuju fenotip senescentnih ćelija (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Bojenje β -galaktozidazom MCF7 ćelija

Postojanje ćelija sa fenotipom karakterističnim za senescenciju potvrđeno je korišćenjem β -galaktozidaznog bojenja koje je identifikovano svetlosnim mikroskopom.

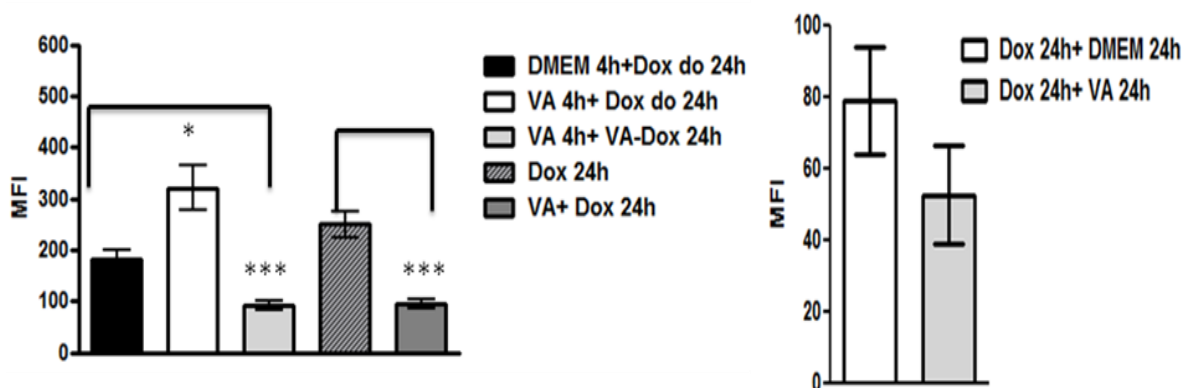
4.24. Efekat ekstrakta bele imele na ulazak/izlazak doksorubicina u MCF7 ćelije

S obzirom da smo i u MCF7 ćelijama indukovali apoptozu delovanjem VA ekstrakta pri subterapeutskim koncentracijam Dox, interesovalo nas je da li je dati efekat i kod ove ćelijske linije posledica sinergističkog delovanja VA-Dox kombinacije kao i kod K562 ćelija. Merili smo nivo Dox u MCF7 ćelijama tretiranim:

1. VA ekstraktom ($10\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox ($0.1\mu\text{M}$) do 24 sata,
2. VA ekstraktom 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodata VA-Dox kombinacija do 24 sata,
3. Hranjivi medijum 4 sata, nakon čega su ćelije isprane i dodat Dox do 24 sata
4. VA-Dox kombinacija 24 sata,
5. Dox 24 sata.

Nakon 24 sata tretmana ćelije su isprane i merena je količina Dox koja je ušla u ćelije određivanjem nivoa intraćelijskog Dox (Grafik 4.25.). Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da je količina Dox unutar ćelija pretretiranih VA ekstraktom, a potom Dox

bila značajno viša u odnosu na količinu Dox u ćelijama tretiranim samo Dox. Količina Dox unutar ćelija tretiranih VA-Dox kombinacijom, bez obzira da li su ćelije bile ili ne pretretirane VA ekstraktom, je značajno niža u odnosu na količinu Dox u ćelijama tretiranim samo Dox. Nakon 24 sata maksimalnog ulaska Dox u ćeliju, Dox je uklonjen iz hranljivog medijuma i dodat je novi medijum bez Dox ili medijum koji sadrži VA ekstrakt. Izlazak Dox iz ćelija je meren nakon 24 sata (Grafik 4.25.). Na osnovu dobijenih rezultata, zaključujemo da tretman VA ekstraktom ne utiče značajno na izlazak Dox iz ćelija.



Grafik 4.25. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na ulazak/izlazak doksorubicina u MCF7 ćelije. MCF7 ćelije su tretirane odgovarajućom kombinacijom agenasa tokom 24 sata, nakon čega su isprane, a ulazak doksorubicina u ćelije meren je citometrijski. Za analizu izlaska doksorubicina (Dox), MCF7 ćelije su isprane nakon 24 sata maksimalnog ulaska Dox u ćelije i inkubirane sa svežim DMEM medijumom bez Dox ili sa medijumom koji sadrži ekstrakt bele imele (VA). Nakon 24 sata ćelije su isprane i količina Dox koja je izašla iz ćelija merena je citometrijski. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije.

Kao i u slučaju K562 ćelija i limfocita periferne krvi, na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da istovremena primena VA ekstrakta i Dox smanjuje ulazak Dox u tretirane ćelije, ali ne utiče značajno na njegov izlazak iz ćelija. Nezavisno od primenjenog tretmana količina Dox koja je ušla u MCF7 ćelije je nešto niža u odnosu na količinu Dox u K562 ćelijama, ali znatno viša u odnosu na limfocite pri istim eksperimentalnim uslovima.

Imajući na umu da je tumorsko mikrookruženje trenutno predmet intenzivnih istraživanja i znajući da ima ključnu ulogu u neoangiogenezi, procesu formiranja metastaza, inflamaciji i modulaciji imunskog sistema (11,130,131), naša dalja istraživanja su usmerena na ispitivanje imunomodulatornog dejstva VA ekstrakta na ćelije imunog sistema u *in vitro* uslovima.

4.25. Uticaj ekstrakta bele imele na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima

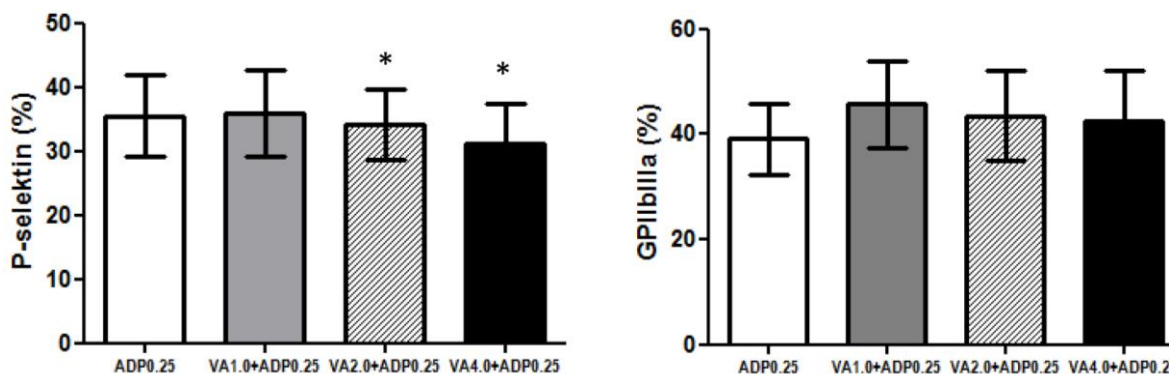
Rezultati epidemioloških studija i brojnih eksperimenata u *in vitro* uslovima i na animalnim modelima pokazuju da trombociti imaju veliki značaj u patogenezi i progresiji malignih bolesti.

Da bismo utvrdili potencijalni efekat bioaktivnih sastojaka bele imele na funkciju trombocita i njima posredovane međućelijske interakcije, ispitivali smo *in vitro* delovanje VA ekstrakta na aktivacioni status trombocita zdravih osoba izloženih delovanju adenozin difosfata (ADP) kao agoniste. Kao specifični markeri aktivacije trombocita praćeni su površinski antigeni (GPIIb-IIIa i P-selektin), koji predstavljaju ujedno i adhezione receptore kojim je posredovana homotipska, odnosno heterotipska agregacija trombocita. Uporedo sa delovanjem na aktivaciju, ispitivan je i uticaj VA ekstrakta na formiranje heterotipskih agregata trombocita sa drugim krvnim ćelijama (monocitima i neutrofilima), koje je posredovano prvenstveno P-selektinom, ključnim molekulom za ulogu trombocita u procesu formiranja metastaza i angiogeneze.

4.25.1. Uticaj ekstrakta bele imele na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa

Uticaj VA ekstrakta na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa u *ex vivo* eksperimentalnim uslovima, ispitivan je u uzorcima krvi 6 zdravih ispitanika, nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 μ M) kao agoniste aktivacije trombocita. Dobijeni rezultati su prikazani na Grafiku 4.26. a izraženi su kao procenat trombocita koji ekspimiraju odgovarajuće aktivacione markere (P-selektin i GPIIbIIIa) u ukupnoj

populaciji trombocita (20000 ispitivanih događaja) tretiranih VA ekstraktom pre delovanja ADP-a, u odnosu na kontrolu tretiranu samo ADP-om.

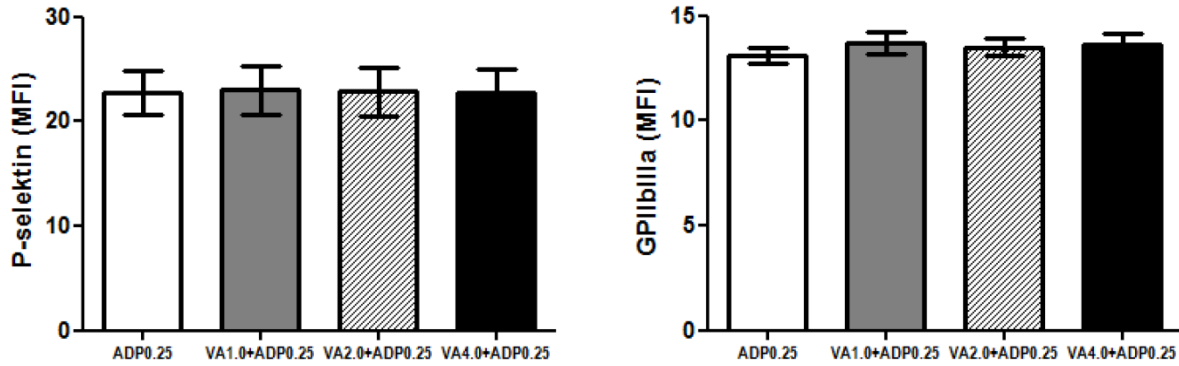


Grafik 4.26. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa aktiviranih trombocita

Procenat P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25\mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (VA) od 1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina u odnosu na kontrolu, određivan je citometrijski. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. * $p \leq 0.05$; Studentov t-test, statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije.

Prikazani rezultati pokazuju da je VA ekstrakt u koncentracijama od 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina doveo do statistički značajnog smanjenja procenta P-selektin pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita zdravih ispitanika, tretiranih suboptimalnom koncentracijom ADP-a. Istovremeno pri ispitivanim koncentracijama ekstrakta nije pokazan efekat na procenat trombocita koji ekspimiraju GPIIb/IIIa aktivacioni marker.

Pored procenta P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita određivana je i gustina ovih receptora na površini trombocita. Dobijeni rezultati, izraženi kao geometrijska sredina intenziteta fluorescence ukupne populacije trombocita (MFI), koja je srazmerna prosečnoj gustini aktivacionih markera na pojedinačnom trombocitu u uzorcima pune krvi tretirane VA ekstraktom pre delovanja ADP-a, u odnosu na kontrolu tretiranu samo ADP-om, prikazani su na Grafiku 4.27.

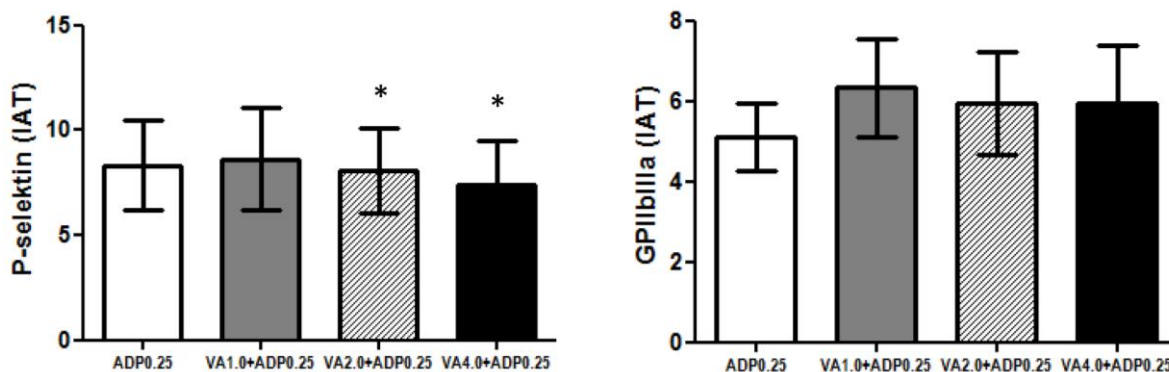


Grafik 4.27. Efekat tretmana ekstraktom bele imele na raspodelu gustine P-selektina i GPIIb-IIIa na aktiviranim trombocitima

Gustina P-selektina i GPIIb-IIIa na pojedinačnim trombocitima nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25 \mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (VA) od 1.0, 2.0 i $4.0 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina u odnosu na kontrolu određivana je metodom citometrije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

Analizom gustine P-selektina na trombocitima, nakon tretmana VA ekstraktom u odnosu na kontrolu, uočeno je da smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita nije bilo praćeno smanjenjem gustine P-selektina. Istovremeno, nije uočeno delovanje VA ekstrakta na gustinu GPIIbIIIa.

Dobijeni rezultati su prikazani i kao „indeks aktivacije trombocita“ (IAT; engl. index of platelet activation, IPA) za svaki od određivanih antigena, kao proizvod udela antigen pozitivnih trombocita u analiziranoj populaciji trombocita i odgovarajuće MFI vrednosti, na osnovu jednačine $\text{IPA} = \% \times \text{MFI} / 100$. Ovaj parametar objedinjuje procenat trombocita na kojima je ekspimiran aktivacioni marker (receptor) i gustinu receptora na trombocitima i predstavlja relativnu meru svih raspoloživih receptora na površini antigen-pozitivnih trombocita (132). Uticaj VA ekstrakta na indeks aktivacije trombocita prikazan je na Grafiku 4.28.



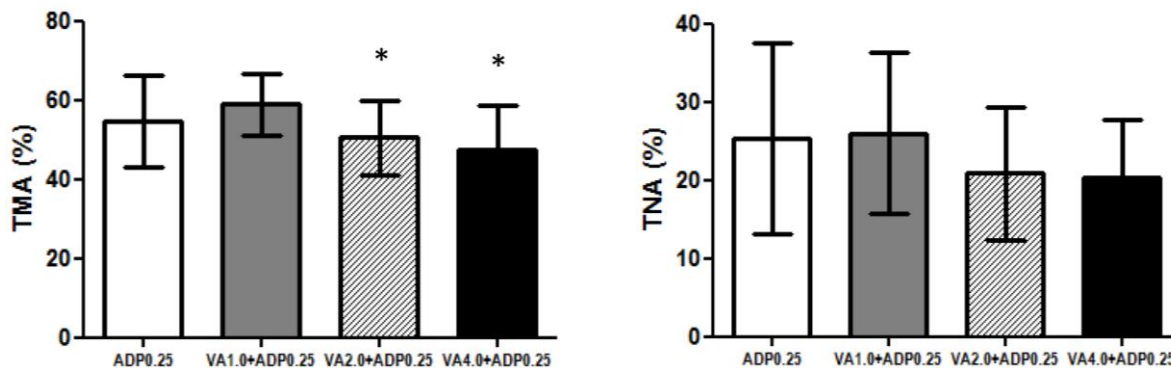
Grafik 4.28. Uticaj ekstrakta bele imele na indeks aktivacije trombocita (IAT) u odnosu na P-selektin i GPIIb/IIIa

IAT u ukupnoj populaciji trombocita nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25 \mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (VA) od 1.0, 2.0 i $4.0 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina u odnosu na kontrolu, određivan je metodom citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. * $p \leq 0.05$; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je delovanje VA ekstrakta na smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita kao odgovora na delovanje ADP-a praćeno i smanjenjem indeksa aktivacije trombocita u odnosu na P-selektin kao markera aktivacije. Nije pokazano delovanje VA ekstrakta na indeks aktivacije u odnosu na GPIIb/IIIa kao aktivacionog markera.

4.25.2. Uticaj ekstrakta bele imele na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima

Kao parametri agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima određivani su procenat agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita (TMA) i procenat agregata trombocita i neutrofila u ukupnoj populaciji neutrofila (TNA) zdravih ispitanika, kao odgovor na delovanje suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25 \mu\text{g/mL}$). Dobijeni rezultati prikazani su na Grafiku 4.29., a izraženi su kao procenat agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji od najmanje 1000 monocita, odnosno trombocita i neutrofila u ukupnoj populaciji od najmanje 10000 neutrofila, u uzorcima tretiranim VA ekstraktom pre delovanja ADP-a, u odnosu na kontrolu tretiranu samo ADP-om.

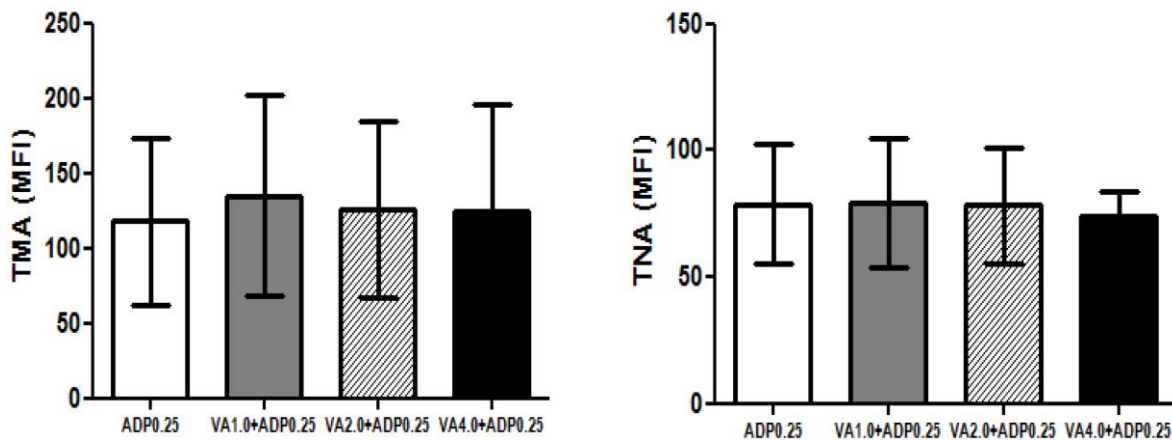


Grafik 4.29. Efekat ekstrakta bele imele na parametre heterotipske agregacije trombocita sa leukocitima

Procenat agregata trombocita i monocita (TMA) i agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji monocita, odnosno neutrofila nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25 \mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (VA) od 1.0, 2.0 i $4.0 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina u odnosu na kontrolu, određivan je metodom citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. * $p \leq 0.05$; statistički značajna razlika, tretirane vs netretirane ćelije.

Analizom uticaja VA ekstrakta na parametre heterotipske agregacije sa leukocitima, pokazano je da je delovanje VA ekstrakta u većim koncentracijama (2.0 i $4.0 \mu\text{g/mL}$) pored uticaja na smanjenje procenta ćelija koje ekspimiraju P-selektin i smanjenje indeksa aktivacije trombocita u pogledu ekspresije P-selektina, praćeno i smanjenjem procenta agregata trombocita sa monocitima u ukupnoj populaciji monocita. Nije uočeno statistički značajno delovanje ispitivanog ekstrakta na agregaciju trombocita sa neutrofilima, najverovatnije kao posledica interindividualnih varijacija u odgovoru ispitanika, ali je uočen pozitivan trend ($p=0.080$ i $p=0.096$, redom).

Uporedo sa uticajem na procenat agregata trombocita i monocita, odnosno trombocita i neutrofila, praćen je i uticaj ekstrakta bele imele na gustinu trombocita na površini monocita, odnosno neutrofila u ukupnoj populaciji monocita i neutrofila nakon delovanja agoniste, na osnovu odgovarajućih srednjih vrednosti intenziteta fluorescence. Dobijeni rezultati, izraženi kao geometrijska sredina intenziteta fluorescence ukupne populacije trombocita, koja je srazmerna prosečnoj gustini trombocita na površini monocita odnosno neutrofila u ukupnoj populaciji monocita i neutrofila, u uzorcima pune krvi tretirane VA ekstraktom pre delovanja ADP-a, u odnosu na kontrolu tretiranu samo ADP-om, prikazani su na Grafiku 4.30.

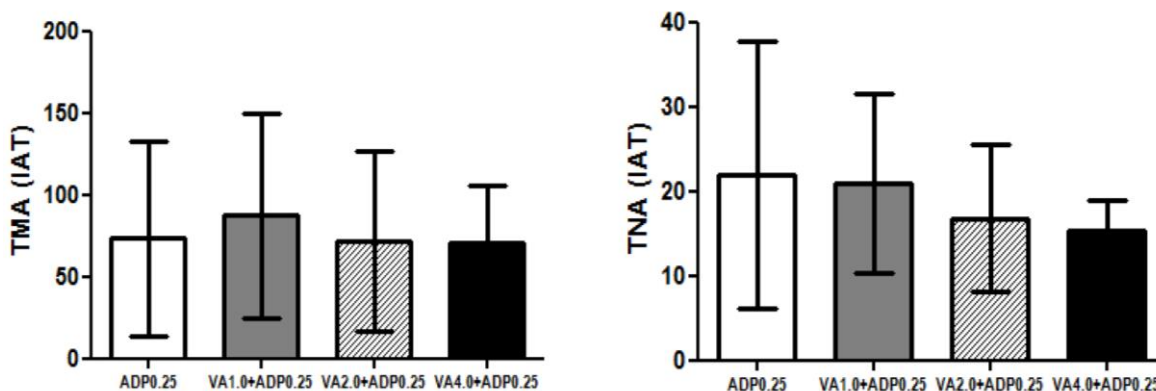


Grafik 4.30. Efekat ekstrakta bele imele na raspodelu gustine trombocita na monocitima i neutrofilima

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

Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da ne postoji statistički značajno delovanje ispitivanog ekstrakta na relativnu gustinu trombocita na površini pojedinačnih monocita i neutrofila u ukupnoj populaciji ovih ćelija.

Dobijeni rezultati prikazani su i kao „indeks agregacije trombocita“, tj. proizvod udela antigen pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji monocita, onosno neutrofila i odgovarajuće MFI vrednosti, na osnovu jednačine $\text{IPA} = \% \times \text{MFI} / 100$ (Grafik 4.31.). Ovaj parametar objedinjuje procenat i gustinu trombocita na monocitima, odnosno neutrofilima i predstavlja relativnu meru svih raspoloživih receptora trombocita na površini monocita, odnosno na površini neutrofila.



Grafik 4.31. Uticaj ekstrakta bele imele na indeks agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima

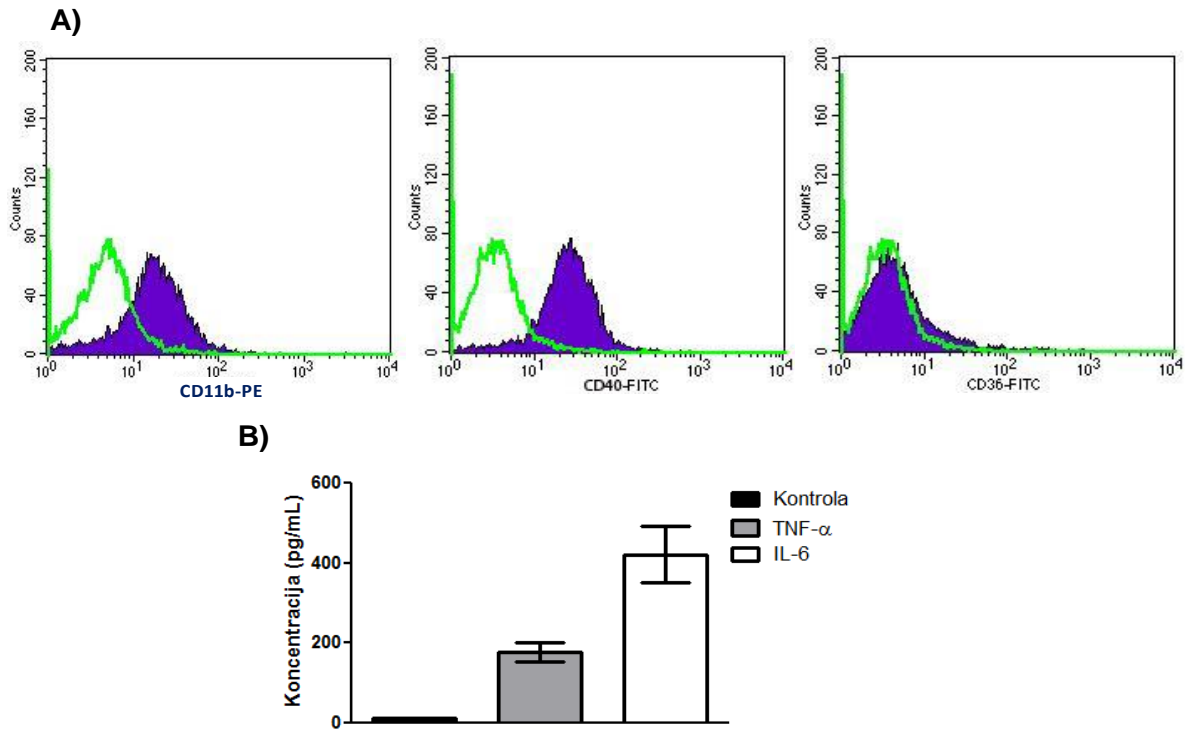
Indeks agregacije trombocita (IAT) sa monocitima, odnosno neutrofilima nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a ($0.25\mu\text{M}$) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (VA) od 1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina u odnosu na kontrolu, određivana je metodom citometrije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD.

Rezultati ispitivanja delovanja VA ekstrakta na indeks agregacije trombocita i monocita, odnosno trombocita i neutrofila, koji teorijski daju prikaz relativnog broja trombocita u agregatima trombocita i monocita, odnosno u agregatima trombocita i neutrofila, nisu pokazali statistički značajno delovanje ekstrakta na ispitivane parametre agregacije.

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

U cilju ispitivanja imunomodulatornog dejstva VA ekstrakta na monocitno/ makrofagne ćelije u kulturi korišćene su THP-1 ćelije. THP-1 ćelije su diferencirane u mirujuće M0 makrofage vitaminom D_3 (100nM) tokom 72 sata. Nakon 72 sata određivana je ekspresija CD11b, kako bi se proverila uspešnost diferencijacije (Grafik 4.32.A). Potom su M0 makrofage stimulisane LPS-om kako bi se dobile M1 polarizovane proinflamatorne makrofage. Da bi smo potvrdili prisustvo M1 makrofaga, određivali smo ekspresiju CD40, kao markera koji je karakterističan za M1 makrofage, CD36 kao markera karakterističnog

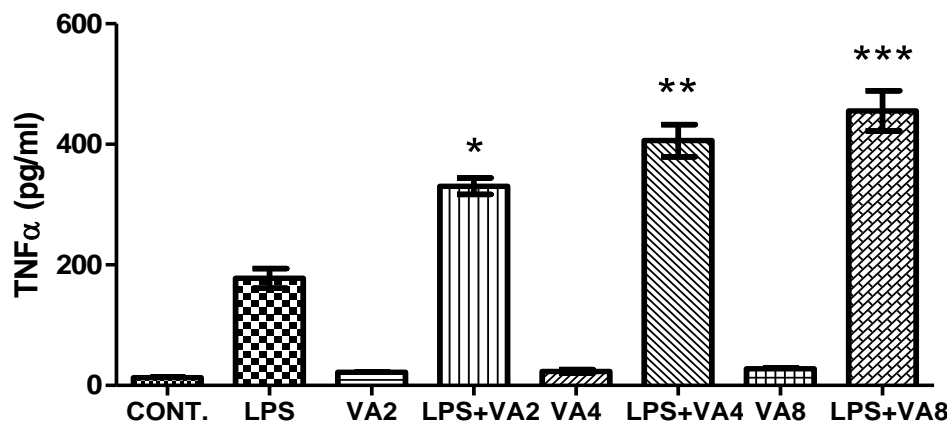
za M2 makrofage i nivo IL-6 i TNF- α u supernatantu, takođe kao markere M1 makrofaga (Grafik 4.32.B) (133,134).



Grafik 4.32. Ekspresija markera aktivacije diferenciranih THP-1 ćelija

THP-1 ćelije su diferencirane vitaminom D₃(100nM) tokom 72 sata. Diferencijacija THP-1 ćelija u M0 makrofage je potvrđena merenjem ekspresije CD11b. Efekat LPS-a na polarizaciju M0 makrofaga u M1 proinflatorne makrofage je praćen određivanjem ekspresije aktivacionih markera CD40 i CD36 A), kao i merenjem nivoa IL-6 i TNF- α u supernatantu B). Zelenom linijom su predstavljene nediferencirane/nepolarizovane THP-1 ćelije. Prikazani su reprezentativni histogrami tri nezavisna eksperimenta.

Diferencirane THP-1 ćelije su tretirane različitim koncentracijama VA ekstrakta (2.0; 4.0; 8.0 μ g/mL ukupnih proteina), a zatim su tako tretirane ćelije stimulisane LPS-om, tokom 4 sata nakon čega je merena produkcija TNF- α u supernatantu. Rezultati prikazani na Grafiku 4.33. pokazuju da VA ekstrakt može da stimuliše oslobađanje TNF- α u hranljivi medijum jedino iz LPS-om stimulisanih proinflamatornih M1 makrofaga i ta stimulacija je dozno-zavisna.



Grafik 4.33. Stimulacija oslobađanja TNF- α ekstraktom bele imele iz proinflamatornih M1 makrofaga

THP-1 ćelije su prethodno tretirane ekstraktom bele imele (VA) u koncentracijama od 2.0, 4.0 i 8.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina, tokom 30 minuta, a zatim su stimulisane LPS-om (1.0 $\mu\text{g/mL}$), 4 sata, nakon čega je merena produkcija TNF- α u supernatantu ELISA testom. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika, tretirane vs ćelije tretirane samo LPS-om.

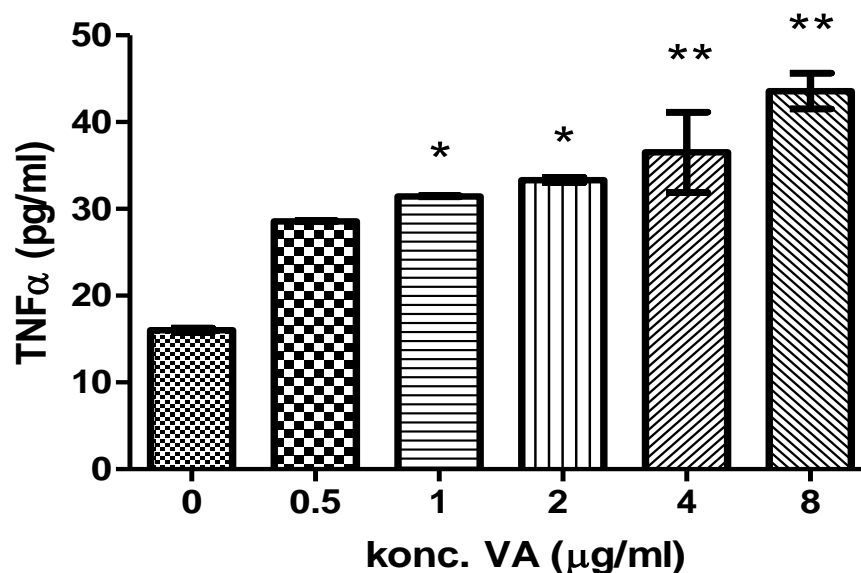
Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da VA ekstrakt aktivira proinflamatorne makrofage da proizvode TNF- α .

4.26.1. Imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele na monocitno/makrofagne ćelije u kokulturi sa aktiviranim trombocitima

S obzirom da smo u Poglavlju 4.26. pokazali da VA ekstrakt može da smanji ekspresiju P-selektina kako i procenat heterotipskih agregata trombocita posredovanih P-selektinom, što je pokazano smanjenjem procenta agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita, narednim eksperimentom smo hteli da ispitamo kakav efekat ispoljava VA ekstrakt na THP-1 ćelije u kokulturi sa aktiviranim trombocitima, mereći produkciju TNF- α .

THP-1 ćelije su prvo tretirane različitim koncentracijama VA ekstrakta (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 i 8.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina), a zatim su tako tretirane ćelije inkubirane u kokulturi sa trombocitima aktiviranim ADP-om, nakon čega je meren nivo produkcije TNF- α u supernatantu. Treba naglasiti da VA ekstrakt ni pri jednoj testiranoj koncentraciji

nije stimulisao oslobađanje TNF- α u hranljivi medijum, ni nakon tretmana nestimuliranih THP-1 ćelija, niti nakon tretmana THP-1 ćelija u prisustvu ADP-a. S druge strane, prethodni tretman VA ekstraktom THP-1 ćelija gajenih u kokulturi sa ADP-om aktiviranim trombocitima, dovodi do oslobađanja TNF- α , na dozno-zavisani način (Grafik 4.34).



Grafik 4.34. Stimulacija oslobađanje TNF- α iz THP-1 ćelija tretiranih ekstraktom bele imele i gajenih u kokulturi sa aktiviranim trombocitima.

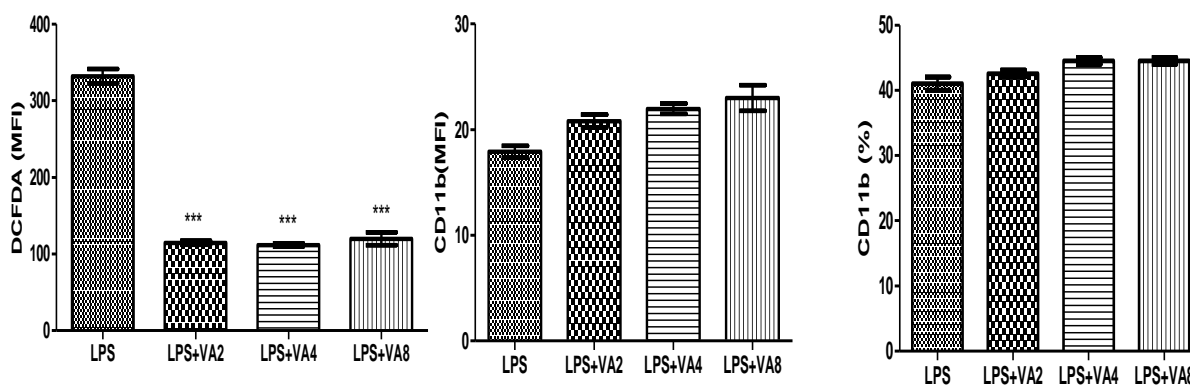
THP-1 ćelije su prethodno tretirane ekstraktom bele imele (VA) pri koncentracijama 0.5, 1, 2, 4 i 8 $\mu\text{g/ml}$ ukupnih proteina, tokom 30 minuta, a zatim su na tako tretirane ćelije dodati trombociti (5×10^6 / bazenu) i ADP (100 μM) tokom 4 sata, nakon čega je merena produkcija TNF- α u supernatantu ELISA testom. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; statistički značajna razlika, tretirane vs ćelije koje nisu tretirane VA ekstraktom.

Iako za dobijene rezultate nemamo adekvatno objašnjenje, možemo da pretpostavimo da u ovom sistemu bioaktivne komponente imele utiču na trombocite da sekretuju aktivirajuće faktore koji su u stanju da stimulišu oslobađanje TNF- α iz THP-1 ćelija u hranljivi medijum. Naravno, ne treba zanemariti ni činjenicu da su THP-1 ćelije poreklom tumorske ćelije tako da ove rezultate treba posmatrati i u tom kontekstu.

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

4.26.2. Ispitivanje efekta ekstrakta bele imele na aktivacioni status monocita u kulturi

Da bi smo ispitali uticaj VA ekstrakta na kompleksni status aktivacije monocita određivali smo ekspresiju CD11b i nivo slobodnih kiseoničnih radikala merenjem intenziteta fluorescence DCFDA (dihlorofluorescein diacetat) unutar ćelija. THP-1 ćelije su prethodno tretirane različitim koncentracijama VA ekstrakta (2.0, 4.0 i 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina), zatim su stimulisane LPS-om, nakon čega je određivan nivo ekspresije CD11b na površini THP-1 ćelija i nivo intenziteta fluorescence DCFDA unutar THP-1 ćelija protočnom citometrijom. Rezultati prikazani na Grafiku 4.35. pokazuju da tretman THP-1 ćelija VA ekstraktom dovodi do sniženja nivoa slobodnih kiseoničnih radikala, dok se procenat CD11b pozitivnih THP-1 ćelija i prosečna gustina CD11b antigena na pojedinačnim THP-1 ćelijama ne menja.



Grafik 4.35. Uticaj ekstrakta bele imele na aktivaciju THP-1 ćelija

THP-1 ćelije su prethodno tretirane ekstraktom bele imele (VA) pri koncentracijama 2.0, 4.0 i 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ukupnih proteina tokom 60 minuta, a zatim su tako tretirane ćelije stimulisane LPS-om (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tokom dva sata, nakon čega je citometrijski određivan nivo ekspresije CD11b i intenzitet fluorescence DCFDA. *** $p < 0.001$; statistički značajna razlika, tretirane vs ćelije tretirane samo LPS-om.

Na osnovu prikazanih rezultata zaključujemo da je aktivacija monocita/makrofaga selektivna i ograničena isključivo na stimulaciju oslobađanja $\text{TNF-}\alpha$. Sve ovo ukazuje da VA ekstrakt ima $\text{TNF-}\alpha$ posredovano antitumorsko dejstvo, pri čemu ne dovodi do nespecifične aktivacije monocita.

Prvi deo ovog rada odnosi se na proučavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi citotoksičnog dejstva ekstrakta bele imele, kao i interakcije bioaktivnih sastojaka bele imele sa citotoksičnim agensom iz grupe antraciklina na modelu tumorskih ćelija u kulturi. Ispitivan je i uticaj ekstrakta bele imele na ćelije imunog sistema koje su deo tumorskog miktookruženja u *in vitro* uslovima.

Drugi deo se odnosi na pilot studiju u koju su bile uključene pacijentkinje obolele od karcinoma dojke, čiji je cilj bio ispitati imunomodulatorno dejstvo ekstrakta bele imele, odnosno utvrditi da li ekstrakt može dovesti do poboljšanja statusa imunskog sistema narušenog usled same bolesti i kao posledice hemioterapije. Narušena imunska antitumorska funkcija je karakteristična za pacijente obolele od malignih tumora i može pomoći u objašnjenju procesa pojave i širenja metastaza. Tretiranje tumora hemioterapeutcima i radioterapijom, generalno vodi daljoj imunosupresiji, te bi prevencija imunosupresije bila veoma korisna za ove pacijente.

4.27. Poređenje efekata hemioterapije i hemioterapije u kombinaciji sa komplementarnom terapijom preparatom bele imele na kvalitet života kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke

Uticaj komplementarne terapije preparatima bele imele (Helixor[®] A, Heilmittel GmbH & Co. Rosenfeld, Nemačka i Iscador[®] M, Weleda AG, Schwabisch Gmund, Nemačka) na kvalitet života, kao i na leukocite periferne krvi ispitivan je kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na terapiji ciklofosfamidom, adriamicinom i 5-fluorouracilom u okviru šest ciklusa, sa periodom od tri nedelje između ciklusa, po opisanom standardnom terapijskom protokolu. Od ukupnog broja odabranih i randomizovanih pacijentkinja (34 u Helixor A, 30 u Iscador M i 31 u Kontrolnoj grupi) studiju je završilo 29 pacijentkinja u Helixor A grupi, 30 u Iscador M i 30 u Kontrolnoj grupi, u pogledu kompletiranja 6 ciklusa hemioterapije sa ili bez komplementarne terapije preparatom bele imele.

Grupe su bile homogene u pogledu starosne dobi pacijentkinja, po kliničkoj i patološkoj Tumor/Nodus/Metastaza (TNM) klasifikaciji, u pogledu histološkog gradusa tumora, menstrualnog statusa, nalaza steroidnih receptora i u pogledu antropometrijskih parametara i vrednosti krvnog pritiska (Tabela 4.3.).

Tabela 4.3. Demografske i kliničke karakteristike pacijentkinja

Karakteristike	HelixorA	IscadorM	Kontrolna	p _{HLxA}	p _{IscM}
Starost u godinama (SV ± SD; t-test)	50.4±6.9	48.4±7.5	50.8±8.0	0.228	0.228
Tumorski status (n; X ² - test)					
Klasifikacija tumora				0.619	0.879
T1	9	7	9		
T2	24	21	19		
T3	1	1	2		
Tx	0	1	1		
Regionalni limfni čvorovi					
N0	16	10	16	0.849	0.343
N1	16	19	14		
N2	2	1	1		
Histološki gradus tumora					
G1	3	1	1	0.474	0.963
G2	28	24	24		
G3	3	5	6		
Menopauzni status (n; Kruskal-Wallis test)					
Premenopauza	18	17	13	0.475	0.349
Perimenopauza	2	2	1		
Postmenopauza	13	11	17		
Nepoznat	1	0	0		
Status receptora za estrogen					
Pozitivan	21	20	17	0.507	0.714
Negativan	9	8	12		
Nepoznat	4	2	2		
Status receptora za progesterone					
Pozitivan	22	18	19	0.620	1.000
Negativan	8	10	10		
Nepoznat	4	2	2		
Indeks telesne mase (SV ± SD; t-test)	26.1±4.6	27.0±6.3	25.6±4.7	0.709	0.709
Karnofski indeks (SV ± SD)	100±0.0	100±0.0	100±0.0		
Vitalni znaci (SV ± SD; t-test)					
krvni pritisak - sistolni (mmHg)	126.1±12.9	130.0±20.0	132.2±19.0	0.139	0.661
krvni pritisak - dijastolni (mmHg)	79.9±9.2	81.7±12.5	83.6±13.6	0.209	0.568
puls (/min)	77.3±13.0	82.3±13.4	77.1±10.1	0.945	0.094
temperatura (°C)	36.6±0.1	36.5±0.1	36.6±0.1	1.000	0.268

SV- srednja vrednost; SD- standardna devijacija

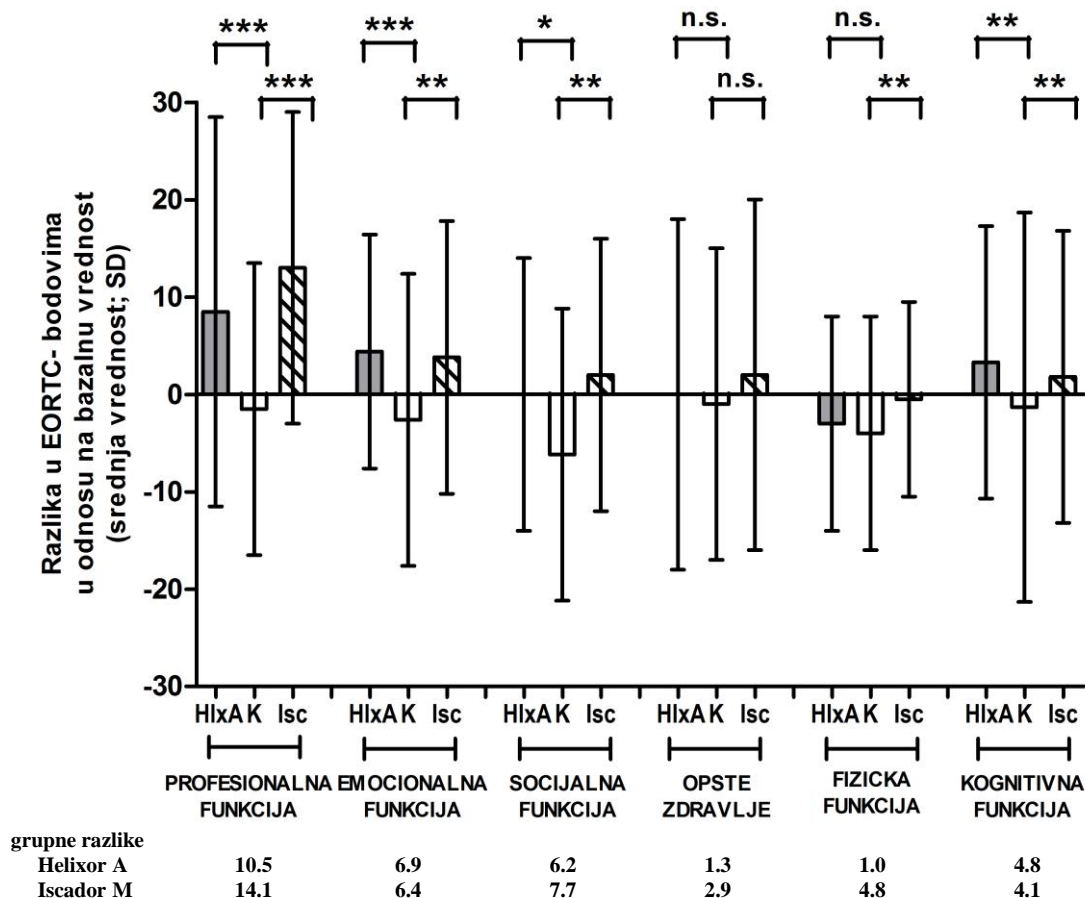
U analizu podataka za procenu kvaliteta života pacijentkinja na hemioterapiji ušli su svi popunjeni EORTC QLQ-C30 upitnici gde je postojao bar jedan izveštaj koji je pratio terapijski ciklus. U odnosu na odabrane pacijentkinje u Helixor A grupi planirano je 238 izveštaja, a popunjeno je 207, u Iscador M od 210 planiranih popunjeno je 209, a u Kontrolnoj od planiranih 217 popunjeno je 211. U Tabeli 4.4. prikazane su bazalne vrednosti za ispitivane parametre i odgovarajuće p-vrednosti koje pokazuju da su grupe bile homogene.

Tabela 4.4. Bazalne vrednosti merenih parametara kvaliteta života (EORTC QLQ-C30)

Karakteristike	Helixor A	Iscador M	Kontrolna	p _{HLxA}	p _{IscM}
EORTC QLQ-C30					
(SV ± SD; Mann-Whitney U-test)					
Opšti zdravstveni status	66.9 ± 21,5	67.8±20.4	68.5 ± 18.3	0.713	0.868
Fizička funkcionalnost	85.6 ± 14.6	86.0±14.2	86.0 ± 12.4	0.872	0.852
Profesionalna funkcionalnost	68.6 ± 23.5	65.5±20.9	73.1 ± 16.9	0.443	0.143
Emocionalna funkcionalnost	69.4 ± 17.9	75.8±20.1	74.1 ± 18.1	0.274	0.623
Kognitivna funkcionalnost	82.8 ± 17.2	85.0±20.7	79.3 ± 23.4	0.230	0.267
Socijalna funkcionalnost	73.5 ± 22.5	76.7±19.4	80.5 ± 18.9	0.226	0.424
Umor	25.5 ± 18.3	22.6±17.2	25.7 ± 19.5	0.894	0.593
Mučnina i povraćanje	7.4 ± 16.0	3.4±9.3	2.9 ± 7.8	0.285	0.959
Bol	21.1 ± 20.2	21.7±21.5	16.1 ± 20.6	0.273	0.210
Dispneja	2.9 ± 9.6	4.6±14.7	3.4 ± 10.3	0.839	0.965
Nesanica	20.6 ± 26.0	16.8±21.1	23.0 ± 31.0	0.902	0.557
Gubitak apetita	14.7 ± 27.5	12.6±22.6	10.3 ± 20.1	0.704	0.625
Konstipacija	8.8 ± 18.9	7.8±14.3	6.9 ± 13.7	0.914	0.808
Dijareja	4.9 ± 14.5	2.2±8.5	2.3 ± 8.6	0.498	0.972
Finansijski problem	20.6 ± 23.2	23.3±23.4	20.7 ± 30.1	0.661	0.358

Tokom primene CAF hemioterapije kod pacijentkinja sa dijagnostikovanom karcinomom dojke došlo je do pogoršanja srednjih vrednosti kvaliteta života u 14 od 15 ispitivanih parametara EORTC QLQ-C30 bodovnog upitnika u Kontrolnoj grupi, od čega je klinički relevantno bilo 4. U Helixor A grupi pogoršanje se desio u 5 od 15 ispitivanih parametara, od čega su 2 klinički relevantna. U Iscador M grupi do pogoršanja je došlo u 4 od 15 ispitivanih parametara, od čega su 2 klinički relevantna.

Klinička relevantnost je definisana kao mala kada je ova razlika veća od 5 bodova na EORTC QLQ-C30 skali, umerena kada je razlika veća od 10 bodova, a nije relevantna ako je manja od 5 bodova.

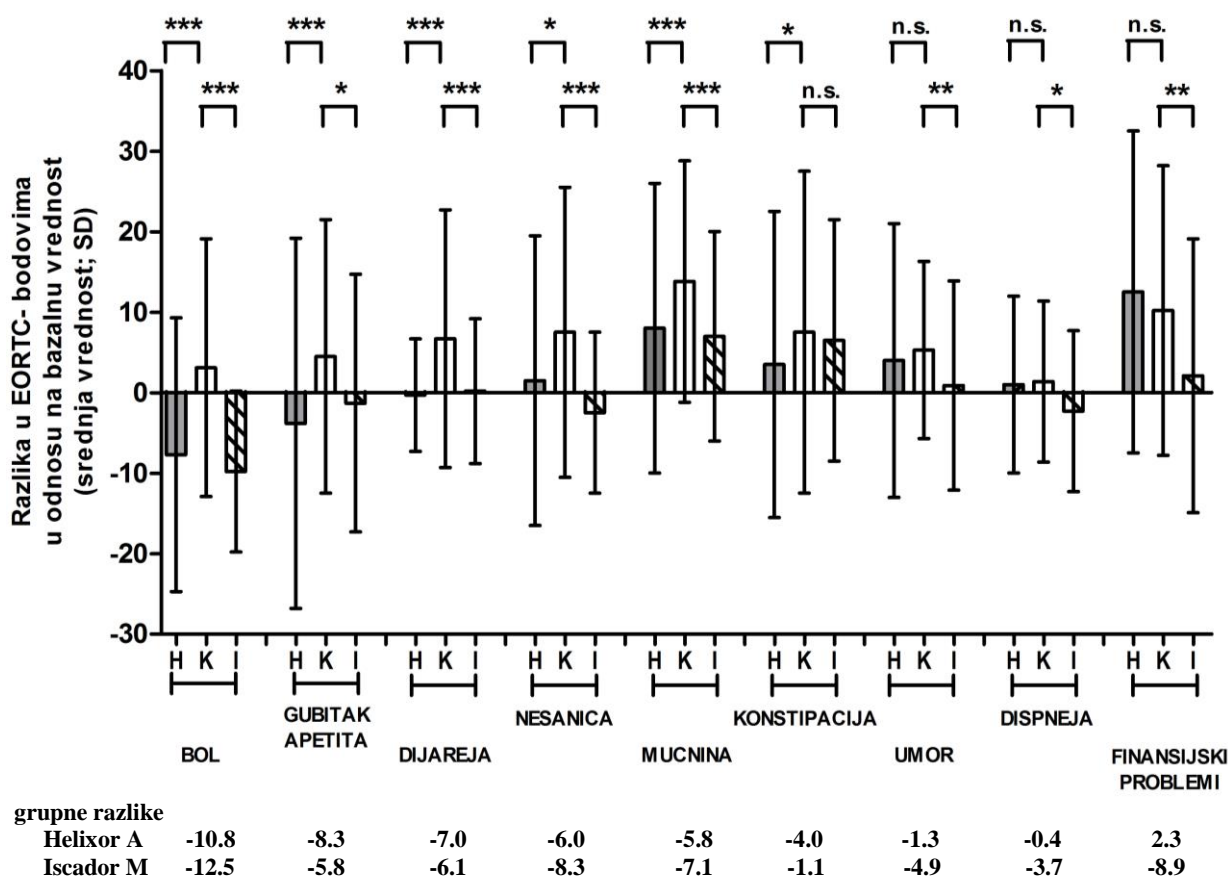


Grafik 4.36. Razlike u kvalitetu života izražene EORTC- bodovima u odnosu na bazalnu vrednost za funkcionalnost u različitim aspektima života

Prikazani rezultati pokazuju grupne razlike između Helixor A grupe (HlxA) koja je uporedo sa CAF hemioterapijom primala i komercijalni preparat bele imele i Kontrolne grupe (K) koja je primala samo CAF hemioterapiju tokom 6 ciklusa, odnosno Iscador M grupe (Isc) koja je uporedo sa CAF hemioterapijom primala i komercijalni preparat bele imele i Kontrolne grupe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; statistička značajnost u poređenju sa bazalnom vrednošću ispitivanog parametra, n.s. odsustvo statističke značajnosti. Grupne razlike su izražene kroz parameter kliničke relevantnosti EORTC QLQ-C30 bodovne skale.

Komparativna analiza srednjih vrednosti svakog od parametara kvaliteta života u odnosu na bazalni nivo pokazala je prednost Helixor A grupe u 14 od 15 parametara, samo u jednom je prednost bila na strani Kontrolne grupe (finansijski problemi). Od 14

parametara koji su prednost davali Helixor A grupi 10 je bilo statistički značajno, a od tih 10 klinički relevantno je bilo 8 parametara. Iscador M grupa pokazala je prednost u svih 15 ispitivanih parametara u odnosu na Kontrolnu grupu, od čega je 12 bilo statistički značajno. Od tih 12 parametara klinički relevantno je bilo 9. Rezultati su prikazani grafički (Grafik 4.36. i Grafik 4.37.).



Grafik 4.37. Razlike u kvalitetu života izražene EORTC- bodovima u odnosu na bazalnu vrednost za karakteristične simptome u toku hemioterapije

Prikazani rezultati pokazuju grupne razlike između Helixor A grupe (H) koja je uporedo sa CAF hemioterapijom primala i komercijalni preparat bele imele i Kontrolne grupe (K) koja je primala samo CAF hemioterapiju tokom 6 ciklusa, odnosno Iscador M grupe (I) koja je uporedo sa CAF hemioterapijom primala i komercijalni preparat bele imele i Kontrolne grupe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; statistička značajnost u poređenju sa bazalnom vrednošću ispitivanog parametra, n.s. odsustvo statističke značajnosti. Grupne razlike su izražene kroz parameter kliničke relevantnosti EORTC QLQ-C30 bodovne skale.

I u Helixor A i u Iscador M grupi bol i profesionalna funkcionalnost su pokazale umerenu kliničku relevantnost, dok su emocionalna i socijalna funkcionalnost, mučnina, dijareja, gubitak apetita i nesanica pokazale malu kliničku relevantnost.

Analiza podataka za svaki od ispitivanih parametara kvaliteta života tokom svih šest ciklusa hemioterapije u odnosu na bazalni nivo, pokazala je da je od ukupno 90 merenja došlo do poboljšanja kvaliteta života u 80 u Helixor A grupi, odnosno 82 merenja u Iscador M grupi. Umerena klinička relevantnost registrovana je u obe grupe tretirane preparatom bele imele bar po jednom u 9 ispitivanih parametara (profesionalna, emocionalna i socijalna funkcionalnost, opšte zdravlje, bol, nesanica, mučnina, gubitak apetita i dijareja), mala klinička relevantnost u 3 ispitivana parametra u Helixor A grupi (kognitivna funkcionalnost, umor i konstipacija), odnosno 4 ispitivana parametra u Iscador M grupi (kognitivna i fizička funkcionalnost, umor i dispneja).

4.28. Poređenje efekata hemioterapije i hemioterapije u kombinaciji sa komplementarnom terapijom preparatom bele imele na leukocite periferne krvi kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke

Uticaj komplementarne terapije preparatom bele imele na leukocite periferne krvi pacijentkinja sa karcinomom dojke na CAF hemioterapiji praćen je u odnosu na incidencu neutropenije i u odnosu na promene u imunskom statusu limfocita periferne krvi, preko uticaja terapije na njihov ukupan broj i procentualnu zastupljenost.

4.28.1. Uticaj komplementarne terapije preparatom bele imele na pojavu leukopenije

Hemioterapija je citotoksična za ćelije koje se ubrzano dele. Citotoksični agensi deluju kako na tumorske ćelije, tako i na druge, normalne ćelije. Opšte je poznato da klasični hemioterapeutici imaju izrazito imunosupresivno dejstvo i zbog toga je neophodno praćenje dejstva terapije na leukocite, a pre svega na populaciju neutrofila kod kojih je citotoksično dejstvo najizraženije. Želeli smo da utvrdimo da li VA ekstrakt ima

protektivno dejstvo na populaciju leukocita, pa je u tu svrhu praćen ukupn broj leukocita u perifernoj krvi pacijentkinja i incidenca neutropenije. Za obradu podataka korišćen je neparametarski-Man Whitney test (statističke analize se nalaze u Prilogu).

Iz dobijenih rezultata jasno se uočava citotoksičnost terapije, odnosno njeno imunosupresivno dejstvo u svim ispitivanim grupama. Statistička analiza je pokazala da grupe pacijentkinja nisu bile uniformne u odnosu na broj leukocita u perifernoj krvi, tj. grupe tretirane preparatima bele imele imale su nešto više bazalne vrednosti. Bazalne vrednosti (T0) ukupnog broja leukocita bile su statistički značajno više u Helixor A grupi ($p=0.014$), dok u Iscador M grupi više vrednosti broja leukocita ukazuju na trend ($p=0.073$) u odnosu na Kontrolnu grupu. Vrednosti dobijene 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6) su za Iscador M grupu u T3 merenju pokazale statistički značajno više vrednosti, a u T4 merenju zadržavaju taj trend ($p=0.088$). U Helixor A grupi se početne statistički više vrednosti ukupnog broja leukocita gube pod uticajem hemioterapije.

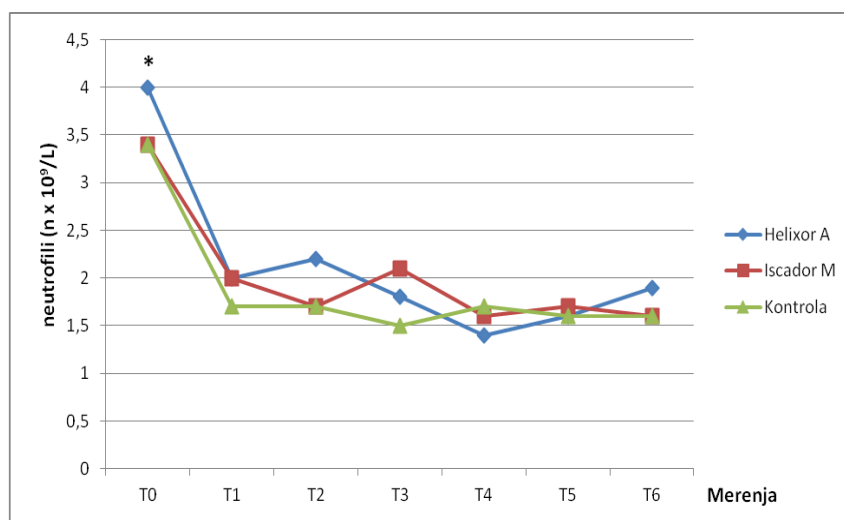
Iako za uočenu razliku nemamo objašnjenje jer su grupe inicijalno bile homogene prema svim ostalim kliničkim parametrima, interesovalo nas je da li je uočena statistički značajna razlika u bazalnim vrednostima leukocita vidljiva i kod njenih pojedinačnih populacija, limfocita, monocita i neutrofila, kao i da li je uočeno imunosupresivno dejstvo podjednako izraženo na svim populacijama.

Bazalne vrednosti (T0) **limfocita** periferne krvi pacijentkinja su u Iscador M grupi bile su statistički značajno više ($p=0.044$) u odnosu na Kontrolnu grupu, dok se u Helixor A grupi uočava ovaj trend ($p=0.061$). U Helixor A grupi nije bilo statistički značajnih razlika u vrednostima određenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6), dok se u Iscador M grupi uočava u T4 studijskoj viziti, nakon četvrtog ciklusa hemioterapije ($p=0.049$). Iako inicijalno grupe pokazuju određeni stepen nehomogenosti, imunosupresivno dejstvo citostatika u svim ispitivanim grupama briše ove razlike.

Rezultati dobijeni za populaciju **monocita** periferne krvi pacijentkinja ukazuju da nije bilo statistički značajne razlike u bazalnim vrednostima Iscador M i Helixor A grupe u odnosu na Kontrolnu grupu (T0), kao ni u vrednostima određenim 3 nedelje nakon svakog

od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6). Za razliku od limfocita u populaciji monocita se ne uočava imunosupresivno dejstvo citostatika.

Bazalne vrednosti (T0) ukupnog broja **neutrofila** su bile statistički značajno više u Helixor A grupi u odnosu na Kontrolnu grupu. Statistički značajne razlike nisu uočene u vrednostima dobijenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije ni u jednoj od grupa koje su tretirane preparatom bele imele u odnosu na Kontrolnu grupu, iako se u Iscador M grupi može govoriti o trendu nešto viših vrednosti nakon prvog i trećeg ciklusa hemioterapije.



Grafik 4.38. Medijana ukupnog broja neutrofila u perifernoj krvi pacijentkinja

Kontrolna grupa - standardna CAF hemioterapija; Helixor A grupa - standardna CAF hemioterapija i preparat imele Helixor A; Iscador M grupa - standardna CAF hemioterapija i preparat imele Iscador M; T0 - merenje pre početka terapije; T1-6 - 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa terapije. * $p < 0.05$; statistički značajna razlika Helixor A grupe vs Kontrolna grupa.

Neutropenija može biti srednja ($1-1.5 \times 10^9/L$), umerena ($0.5-1 \times 10^9/L$) i teška ($< 0.5 \times 10^9/L$). U ovoj studiji incidenca neutropenije je definisana kao broj neutrofila manji od 1000 u μL periferne krvi ($< 1 \times 10^9/L$). Neutropenija je registrovana kod 7 pacijentkinja u Helixor A grupi, kod 3 pacijentkinje u Iscador M grupi i kod 8 u Kontrolnoj grupi, s tim da je u Kontrolnoj grupi kod jedne pacijentkinje registrovana dva puta u toku terapije. U Tabeli 4.5. su prikazane karakteristike pacijentkinja kod kojih je dijagnostikovana neutropenija. Statističkom analizom broja pacijentkinja sa potvrđenom dijagnozom

neutropenije u Helixor A (7/29), Iscador M (3/30) i Kontrolnoj grupi (8/30) primenom dvostranog chi-kvadrat testa pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u incidenci neutropenije (HlxA p= 0.628, IscM p=0.182).

Tabela 4.5. Karakteristike pacijentkinja sa dijagnostikovanom neutropenijom

Interventna grupa	Studijska vizita	Starost	Stadijum	T	N	M	G	Broj leukocita/nL	Broj neutrofila/nL
Helixor A Grupa	T1	43	2	2	1	0	2	10.2	0.6
	T1	50	2	2	0	0	2	2.6	0.9
	T6	47	2	2	1	0	2	1.4	0.5
	T6	44	2	2	1	0	2	1.6	0.4
	T6	64	2	2	1	0	3	1.5	0.3
	T6	37	2	2	0	0	3	2.5	0.7
	T6	55	2	2	0	0	2	3.2	0.9
Iscador M Grupa	T1	51	2	1	0	0	2	6.7	0.6
	T6	60	2	2	1	0	2	2.9	0.9
	T6	44	2	3	1	0	2	1.8	0.4
Kontrolna Grupa	T2	32	2	2	1	0	2	2.8	0.9
	T4	60	2	2	0	0	2	2.4	0.9
	T5	45	2	2	1	0	2	3.3	0.3
	T5	52	2	1	0	0	3	2.6	0.8
	T6	66	2	2	1	0	2	1.3	0.3
	T6	53	2	2	1	0	2	3.5	0.9
	T6	62	2	1	1	0	2	2.5	0.8
	T6	44	1	1	0	0	2	2.4	0.8
T6	52	2	1	0	0	3	2.7	0.9	

U Kontrolnoj grupi tokom hemioterapije kod jedne pacijentkinje neutropenija je registrovana dva puta.

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je citotoksičnost terapije izražena, bez obzira da li je primenjen ili ne tretman preparatom bele imele. Imunosupresivno dejstvo citostatika najizraženije u populaciji neutrofila i nije prisutno u populaciji monocita. Komplementarna terapija preparatom bele imele nije pokazala uticaj na imunosupresivno dejstvo citostatika.

4.28.2. Uticaj komplementarne terapije preparatom bele imele na imunski status limfocita periferne krvi pacijentkinja

Ispitivani parametri imunskog statusa u perifernoj krvi pacijentkinja su ukupni broj i procenat (%) pojedinih subpopulacija limfocita i to: T limfocita ($CD3^+$), $CD4^+$ ili pomoćničkih T limfocita ($CD3^+CD4^+$), $CD8^+$ ili citotoksičnih T limfocita ($CD3^+CD8^+$), B limfocita ($CD19^+$), urođenoubilačkih ili NK (engl. natural killer) ćelija ($CD56^+CD3^-$), HLA-DR⁺ ćelija, aktiviranih T limfocita ($CD3^+HLA-DR^+$), kao i odnos procentualne zastupljenosti $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita ($CD4^+T/CD8^+T$). Periferna krv uzorkovana je jedan dan pre svakog ciklusa hemioterapije i tri nedelje posle poslednjeg ciklusa tj. ukupno sedam puta. Dobijeni rezultati analizirani su primenom neparametarskog testa, Wilcoxon-ovog testa sume rangova. Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je $p \leq 0.05$.

T limfociti

Dobijeni rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u bazalnoj procentualnoj vrednosti T limfocita periferne krvi pacijentkinja u Heloxor A i Iscador M grupi u odnosu na Kontrolnu grupu (T0), kao ni u vrednostima određenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6). Ovo je pokazano i za obe subpopulacije T limfocita ($CD4^+$ i $CD8^+$). Statistički značajne razlike su uočene u bazalnim vrednostima ukupnog broja T limfocita, ali nisu prisutne u vrednostima dobijenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije. U Iscador M grupi veći je ukupan broj ($p=0.031$), kao i broj $CD4^+$ T limfocita ($p=0.044$) pre primene terapijskog tretmana (statističke analize se nalaze u Prilogu).

Tokom terapije broj T limfocita u perifernoj krvi pacijentkinja opada kao posledica delovanja citotoksične terapije, ali se može uočiti povećanje njihove procentualne zastupljenosti. Isto se može uočiti i za obe subpopulacije T limfocita ($CD4^+$ i $CD8^+$). Povećanje procentualne zastupljenosti je najverovatnije posledica imunosupresivnog dejstva hemioterapije na populaciju B limfocita, na kojoj je citotoksično dejstvo terapije najizraženije.

Uparedo sa uticajem primene preparata bele imele na zastupljenost CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u perifernoj krvi pacijentkinja sa karcinomom dojke na hemioterapiji, praćen je i uticaj na procentuali odnos CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita. U skladu sa odsustvom efekata terapije Helixor-om A i Iscador-om M na zastupljenost CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, statistička obrada vrednosti odnosa njihove procentualne zastupljenosti u svakoj od studijskih vizita (T0-T6) je takođe, pokazala odsustvo statistički značajne razlike. Iako se ne uočava statistička značajnost u pogledu odnosa zastupljenosti CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, iz dobijenih rezultata može se uočiti da se ova vrednost smanjuje tokom terapije, što ukazuje na to da je procentualna zastupljenost CD8⁺ T limocita nešto viša, odnosno da je citotoksični efekat terapije izraženiji na subpopulaciji CD4⁺ T-limfocita.

B limfociti

Bazalne vrednosti (T0) procentualne zastupljenosti (p=0.015), kao i ukupnog broja (p=0.007) B limfocita bile su statistički značajno više u Helixor A grupi u odnosu na Kontrolnu grupu. U Iscador M grupi ove vrednosti nemaju statističku značajnost ali pokazuju isti trend (p=0.098 i p=0.086). Statistički značajne razlike nisu uočene u vrednostima dobijenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6), za oba parametra; (statističke analize se nalaze u Prilogu).

Iz dobijenih rezultata može se uočiti da se ukupan broj i procentualna zastupljenost B limfocita značajno smanjuje tokom hemioterapije, odnosno da je imunosupresivno dejstvo citostatika izraženo.

NK ćelije

Bazalne vrednosti (T0) procentualne zastupljenosti NK ćelija u perifernoj krvi pacijentkinja i vrednosti dobijene za ovaj parametar 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6) nisu pokazale statistički značajnu razliku. U Iscador M grupi se uočava trend nešto nižih bazalnih vrednosti (p=0.062). Bazalne vrednosti (T0) ukupnog broja NK ćelija bile su statistički značajno više u Helixor A grupi u odnosu na Kontrolnu grupu (p=0.048), što se ponovilo i u T4 studijskoj viziti (p=0.026) za isti parametar. U svim ostalim studijskim vizitama nije bilo razlika između ispitivanih grupa; (statističke analize se nalaze u Prilogu).

Iako je imunosupresivno dejstvo citostatika očigledno, procentualna zastupljenost NK ćelija se nije bitnije menjala u odnosu na bazalne vrednosti.

HLA-DR⁺ limfociti

Rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u bazalnoj vrednosti (T0) procentualne zastupljenosti i ukupnog broja HLA-DR⁺ limfocita u perifernoj krvi pacijentkinja u Heloxor A i Iscador M grupi u odnosu na Kontrolnu grupu, kao ni u vrednostima određenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6); (statističke analize se nalaze u Prilogu). Iz priloženih rezultata se uočava da ukupan broj i procentualna zastupljenost HLA-DR⁺ ćelija opada tokom terapije u svim grupama.

Tokom terapije praćen je i uticaj primene preparata bele imele na broj aktiviranih T limfocita, odnosno ćelija koje istovremeno ekspimiraju CD3 i HLA-DR antigene. Rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike u bazalnim vrednostima (T0) ukupnog broja i procentualnoj zastupljenosti aktiviranih T limfocita u perifernoj krvi pacijentkinja u sve tri studijske grupe, kao ni u vrednostima određenim 3 nedelje nakon svakog od šest uzastopnih ciklusa hemioterapije (T1-T6); (statističke analize se nalaze u Prilogu).

Iako ukupne vrednosti HLA-DR⁺ ćelija opadaju tokom terapije iz priloženih rezultata se može uočiti da se procentualno broj aktiviranih T limfocita ne smanjuje, već vrednosti tokom terapije ostaju iste ili neznatno rastu. Ovo se može dovesti u vezu sa porastom procentualne zastupljenosti T limfocita u ukupnoj populaciji limfocita periferne krvi. Smanjenje procentualne zastupljenosti HLA-DR⁺ ćelija je najverovatnije posledica eliminacije B limfocita iz periferne krvi pacijentkinja, odnosno posledica citotoksičnog delovanja hemioterapije.

Iz svih priloženih rezultata dobijenih za populaciju limfocita periferne krvi pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na CAF hemioterapiji možemo zaključiti da je imunosupresivno dejstvo citostatika u svim ispitivanim grupama očigledno, a da komplementarna terapija preparatom bele imele nije imala uticaja na zastupljenost limfocita u perifernoj krvi i aktivaciju T-limfocita.

5. DISKUSIJA

Rezistencija tumorskih ćelija na citotoksične lekove predstavlja glavni problem u postizanju efikasnog antitumorskog tretmana. Obično se navodi, da rezistencija na lek nastaje kao rezultat selekcije agresivnijih tumorskih ćelijskih klonova sa stečenim zaštitnim mehanizmima koji im omogućavaju da prežive genotoksični tretman (135-137). Neke tumorske ćelije se odlikuju ekspresijom onkogenih tirozin kinaza, kao što je *Bcr-Abl*. Ove tirozin kinaze su odgovorne za ranu rezistenciju jer aktivacijom različitih signalnih puteva dovode do: prekomerne ekspresije transporternih glikoproteina (MDR1), povećane ekspresije antiapoptotskih proteina, modulacije ćelijskog ciklusa i popravke DNK (138-144). Smatra se da bi aktivacija antiapoptotskih proteina kao što su Bcl-xL i zastoj u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa mogli biti presudni za rezistenciju na lekove u Filadelfija-pozitivnim ćelijama sa *Bcr-Abl* ekspresijom (141,145). Kako bi se smanjili neželjeni efekti i poboljšala efikasnost standardnih hemioterapija i radioterapija, počeli su da se primenjuju mnogi komplementarni ili alternativni medikamenti (KAM).

Komercijalni preparati bele imele su među najčešće propisanim KAM za pacijente obolelele od malignih tumora. Terapeutska korist VA ekstrakta u različitim patološkim stanjima zavisi od postupka pripreme, odnosa različitih bioaktivnih jedinjenja prisutnih unutar ekstrakta, kao i od vrste drveta domaćina na kom je imela rasla.

Veliki broj studija je pokazao da u osnovi antitumorskog dejstva VA ekstrakta leži njena sposobnost da indukuje apoptozu tumorskih ćelija i da inhibira ćelijsku proliferaciju. Takođe, mnogobrojne kliničke studije su pokazale da adjuvantni tretman VA ekstraktom pacijenata obolelih od malignih tumora, kada se koristi zajedno sa hemioterapijom, radioterapijom ili operacijom, doprinosi ukupnom poboljšanju kvaliteta života (146-152). Siegle i saradnici su pokazali da ML-1 u kombinaciji sa Dox, cisplatinom ili taksolom ispoljava aditivni citotoksični efekat na A549 ćelijsku liniju humanog karcinoma pluća (153). Rekombinantni ML-1 značajno pojačava citotoksičnost indukovanu vinkristinom, mafosfamidom, idarubicinom i cisplatinom na humanim leukemijskim ćelijama K562 i KG1a (154). Međutim, i dalje je nepoznat mehanizam antitumorske aktivnosti ekstrakta

bele imele, a takođe je vrlo mali broj podataka koji daju informacije o interakciji ekstrakta bele imele sa antitumorskim lekovima. Upravo iz tog razloga, odlučili smo se da u ovoj doktorskoj disertaciji ispitujemo antitumorske i imunomodulatorne efekte VA ekstrakta, kao i mehanizme koji leže u osnovi ovih efekata, ali i interakciju VA ekstrakta sa Dox u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Prvi deo doktorske disertacije odnosi se na proučavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi citotoksičnog dejstva VA ekstrakta, kao i interakcije bioaktivnih sastojaka bele imele sa citotoksičnim agensom iz grupe antraciklina na modelu tumorskih ćelija u kulturi. "Skrining" eksperimentom na panelu od 5 malignih ćelijskih linija smo pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost VA ekstrakta prema, pre svega humanim leukemijskim ćelijama. Ispitujući interakciju bioaktivnih sastojaka VA ekstrakta sa Dox, antitumorskim citotoksičnim agensom iz grupe antraciklina, pokazali smo da kombinacija agenasa dovodi do sinergizma pri najnižim koncentracijama Dox korišćenim u ovim istaživanjima. Treba naglasiti da su Dox koncentracije korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji u opsegu terapijskih koncentracija.

Testirajući toksičnost VA ekstrakta na mononuklearnim ćelijama periferne krvi pokazano je da je ekstrakt ispoljava 30 puta manju citotoksičnost na datim ćelijama u poređenju sa K562 ćelijama, kao i da je oko 80% ćelija vijabilno pri koncentraciji ekstrakta od 2.0 µg/mL ukupnih proteina, koja je korišćena u svim eksperimentima sa K562 ćelijama. Rezultati testova citotoksične, odnosno antiproliferativne aktivnosti nam daju informacije samo o procentualnom smanjenju broja vijabilnih ćelija unutar populacije tretiranih ćelija, u poređenju sa netretiranom ćelijskom populacijom. Na osnovu IC₅₀ vrednosti, kao rezultata testa citotoksičnosti/citostatičnosti, nije moguće utvrditi da li je uočena antitumorska aktivnost posledica izazvane ćelijske smrti ili inhibicije ćelijske deobe. S obzirom da je apoptoza jedan od ključnih mehanizama kojima hemioterapeutici deluju, u daljem radu smo ispitivali sposobnost VA ekstrakta da indukuje apoptozu K562 ćelija i da dovede do promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Koncentracija VA ekstrakta koju smo koristili u narednim eksperimentima bila je 2.0 µg/mL ukupnih proteina, a koncentracije Dox bile su 0.5 i 2.0 µM.

Pokazali smo da je nakon tretmana K562 ćelija Dox došlo do značajnog povećanja broja ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima vezanim za mehanizme dejstva Dox (155-157). Suprotno tome, tretman K562 ćelija kombinacijom agenasa dovodi do smanjenja broja ćelija u G₂/M fazi. Dati rezultati pokazuju da karakterističan Dox indukovani G₂/M zastoj biva u potpunosti eliminisan nakon tretmana VA ekstraktom. Eliminacija G₂/M zastoja je bila praćena povećanjem broja ćelija u subdiploidnoj frakciji, koja je karakteristična za apoptotske ćelije. Najveći procenat K562 ćelija u ranoj apoptozi detektovan je nakon 72 sata tretmana kombinacijom agenasa (VA 2.0 µg/mL ukupnih proteina + Dox 2.0 µM). Takođe, treba naglasiti da je Dox jedino pri većoj koncentraciji (2.0 µM) uvodio izvestan broj K562 ćelija u apoptozu, nakon 72 sata tretmana. Veoma značajan rezultat dobijen je kombinovanim tretmanom K562 ćelija VA ekstraktom i nižom subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 µM), pri čemu je došlo do indukcije apoptoze.

Naša dalja istraživanja išla su u pravcu ispitivanja molekularnih mehanizama antitumorskog dejstva VA ekstrakta. Pokazano je da VA ekstrakt, sam i u kombinaciji sa Dox dovodi do prekomerne ekspresije gena i proteina kaspaze-3 i Bax. Dobijeni rezultati ukazuju da bi kaspazom posredovana apoptoza K562 ćelija mogla biti regulisana proteinima Bcl-2 familije.

Tirozin kinaza *Bcr-Abl* može da inhibira apoptozu sprečavajući izlazak Cyt C iz mitohondrija, što može da blokira aktivnost kaspaze-3 (142,143,158). Bax, proapoptotski član Bcl-2 familije, u ćelijama u homeostazi prisutan je kao neaktivan monomer u citosolu. Međutim, nakon stimulusa koji vode ćelijskoj smrti dolazi do homooligomerizacije ovog proteina i njegove translokacije u mitohondrije, gde formira kanale kroz koje se oslobađa Cyt C i drugi proapoptotski molekuli, koji dovode do aktivacije kaspaza (159-162). Skorašnji podaci ukazuju na ključnu ulogu mitohondrija u apoptotskom tipu ćelijske smrti, kao centralne organele uključene u signalnu transdukciju i amplifikaciju apoptotskog odgovora. Narušena mitohondrijska funkcija je rani događaj u procesu apoptotske ćelijske smrti izazvane citotoksičnim lekovima i prethodi promenama na nivou jedra i plazma membrane. Karakteriše je povećana propustljivost mitohondrijske membrane i gubitak membranskog potencijala koji je regulisan PT1 proteinskim kompleksom vezanim za pore

mitohondrijske membrane (163,164). Važna uloga mitohondrija u procesu apoptotske ćelijske smrti se ogleda u translokaciji Cyt C iz mitohondrijskog intermembranskog prostora u citosol. Jednom otpušten, Cyt C se vezuje za Apaf-1 u prisustvu ATP ili dATP i formira kompleks koji isecanjem aktivira pokretačku kaspazu-9, što zatim dovodi do aktivacije izvršnih kaspaza, kao što su kaspaze-3 i -7 (163,165). Oslobađanje Cyt C povezano je sa gubitkom mitohondrijskog membranskog potencijala i povećanjem permeabilnosti membrane (164-167). Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da prekomerna proteinska i genska ekspresija kaspaze-3 i Bax može biti u vezi sa ranim smanjenjem $\Delta\psi_m$, jer je značajno smanjenje $\Delta\psi_m$ zabeleženo posle 72 sata tretmana K562 ćelija VA ekstraktom, pojedinačno i u kombinaciji sa Dox. Takođe, dobijeni rezultati potvrđuju da VA ekstrakt sam i u kombinaciji sa Dox svoj citotoksični efekat ostvaruje modulacijom signalnih kaskada unutrašnjeg mitohondrijskog apoptotskog puta.

Kao što je pokazano, VA ekstrakt sam i u kombinaciji sa Dox može uticati na ćelijski ciklus i proliferaciju K562 ćelija. Da bi se stekao detaljniji uvid u sam mehanizam ovih procesa, ispitivali smo efekat VA ekstrakta na nivo ekspresije proteina ciklina B1 i ciklina D1, kao i efekat VA ekstrakta na nivo genske i proteinske ekspresije p21^{WAF1}. Progresija tokom eukariotskog ćelijskog ciklusa je vođena kompleksima protein kinaza, koji se sastoje od ciklina i ciklin-zavisnih kinaza (Cdk). Tokom napredovanja G₁ faze ćelijskog ciklusa, kompleksi ciklin D-Cdk4, ciklin D-Cdk6 i ciklin E-Cdk2 aktiviraju i pomeraju ćelijski ciklus od G₁ do S faze. S druge strane, ciklin B1 formira sa Cdc2 (Cdk1) kompleks koji se naziva “factor pokretanja mitoze” (engl. mitotic promoting factor, MPF) koji je presudan za G₂/M tranziciju (51,52,168). U ovom radu, pokazali smo da VA ekstrakt inhibira proliferaciju K562 ćelija kroz G₀/G₁ zastoje, koja je posredovana regulacijom proteina G₁ faze. Nakon tretmana VA ekstraktom, dolazi do inhibicije ekspresije ciklina D1. S druge strane, nakon Dox tretmana K562 ćelija, nije bilo statistički značajne razlike u procentu ciklin D1 pozitivnih ćelija u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Kombinovani tretman ćelija VA ekstraktom i Dox značajno smanjuje procenat ciklin D1 pozitivnih ćelija. Ovo smanjenje je povezano sa eliminacijom G₂/M zastoja.

Rezultati su takođe pokazali da je zastoje u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa nakon Dox tretmana K562 ćelija povezan sa neočekivanim povećanjem ekspresije ciklina B1. Tretman

ćelija kombinacijom agenasa smanjuje procenat ciklin B1 pozitivnih ćelija do nivoa kontrole. Ovo smanjenje je povezano sa eliminacijom G₂/M zastoja. S obzirom na činjenicu da je ciklin B1-Cdk1 kompleks (MPF) od presudnog značaja za G₂/M tranziciju, nizak nivo ovog kompleksa, na primer, kao rezultat atenuacije ciklin B1 promotera sa p53, povezan je sa zastojem ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa (168,169). Sinteza ciklina B1 u citoplazmi tokom S faze je praćena njegovim transportom u jedro u kasnoj G₂ fazi, a njegovo kasnije uklanjanje tokom anafaze ide preko ubikvitin zavisnog puta (170). Istraživanja Dan i Yamori ukazuju da su promene u nivou ciklina B1 i zastoj u G₂/M fazi u A549 tumorskim ćelijama izloženim delovanju Dox regulisani na način nezavisan od p53, jer slične promene nisu izazvane cisplatinom, dobro poznatim p53 aktivatorom (171). Saglasno sa ovim nalazima, pokazano je da do povećanja nivoa ekspresije ciklina B1 može doći kod nekih tumorskih ćelija koje su u G₂/M zastoj, koje imaju defekt u p53, kao što su K562 ćelije (172). Ovi podaci su takođe u saglasnosti sa istraživanjima Smeets i saradnika, koji ukazuju na veću količinu citoplazmatskog ciklina B1 u ćelijama u G₂ zastoj, koji je posledica oštećenja DNK (173).

p21^{WAF1}, kao ciklin zavisni kinazni inhibitor, može da ometa ćelijski ciklus i utiče na proliferaciju (174). On može da se vezuje i inhibira veliki broj ciklin/Cdk kompleksa i to prevashodno onih koji sadrže Cdk2, Cdk3, Cdk4 i Cdk6 (175,176). p21^{WAF1} ima suštinsku ulogu u zastoj u ćelijskom ciklusu nakon oštećenja DNK (177-179). Njegova prekomerna ekspresija dovodi do zastoja u G₁, G₂/M (180) ili S fazi (181) ciklusa. Na primer, p21^{WAF1} ima važnu ulogu u regulaciji G₁-S tranzicije vezivanjem i inhibicijom kinazne aktivnost Cdk/ciklin kompleksa. Ciklin D1/Cdk 4 i ciklin D1/Cdk6 kinazni kompleksi dovode do hiperfosforilacije Rb proteina, što dovodi do njegove disocijacije od E2F1 faktora transkripcije, koji reguliše ekspresiju gena neophodnih za progresiju kroz ćelijski ciklus (182-184).

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da nakon 72 sata tretmana K562 ćelija VA ekstraktom dolazi do statistički značajnog povećanja nivoa genske ekspresije p21^{WAF1} u poređenju sa kontrolom, dok VA-Dox kombinacija dovodi do smanjenja nivoa genske ekspresije p21^{WAF1} u poređenju sa Dox. Dobijeni rezultati bi mogli da ukažu da tretman K562 ćelija ekstraktom bele imele dovodi do zastoja u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa, s

obzirom da smo dobili smanjenje ekspresije ciklina D1 i povećanje ekspresije gena za $p21^{WAF1}$.

S druge strane, ekspresija $p21^{WAF1}$ na proteinskom nivou je bila maksimalna nakon tretmana K562 ćelija subapoptotskom koncentracijom Dox (0.5 μ M). Tretman K562 ćelija VA-Dox kombinacijom smanjuje nivo $p21^{WAF1}$ proteina do nivoa u kontrolnim, netretiranim ćelijama, dok se nivo $p21^{WAF1}$ proteina nakon tretmana VA ekstraktom nije menjao u odnosu na nivo u kontrolnim ćelijama. Zanimljivo je da je povećana aktivacija proteina kaspaze-3 u korelaciji sa smanjenom ekspresijom $p21^{WAF1}$. Ovaj inverzni odnos ukazuje da kaspaza-3 može da degradira $p21^{WAF1}$, odnosno može da dovede do prevođenja ćelija iz senescencije u apoptozu. Sve je više dokaza koji pokazuju da citotoksični lekovi, kao što je Dox, naročito pri subapoptotskim koncentracijama, mogu dovesti do zastoja u rastu sa karakteristikama senescencije. Cdk inhibitor $p21^{WAF1}$ je jedan od glavnih aktera u ovom procesu (124).

Senescencija K562 ćelija indukovana subapoptotskom koncentracijom Dox je potvrđena bojenjem β -galaktozidazom i citometrijski kao povećanje parametra granularnosti ovih ćelija. Nasuprot tome, K562 ćelije tretirane VA-Dox kombinacijom agenasa gube ove morfološke i metaboličke karakteristike.

Uočena ekspresija $p21^{WAF1}$ nakon tretmana K562 ćelija subapoptotskom koncentracijom Dox može da ukaže na fenotip karakterističan za senescentne ćelije, dok njegovo značajno sniženje nakon tretmana kombinacijom agenasa može da ukaže da $p21^{WAF1}$ ima značajnu ulogu u prevođenju ćelija iz senescencije u apoptotski tip ćelijske smrti.

Poznato je da ekspresija IGF-1R značajno doprinosi razvoju i napredovanju malignih tumora i pojavi terapijske rezistencije (185). IGF-1R ispoljava svoje onkogene efekte preko inhibicije apoptoze i indukcije ćelijske transformacije (186). Dodatno, IGF-1R ima važnu ulogu u regulisanju ćelijske diferencijacije, migracije i u procesu metastaziranja (187-189). Ekspresija *IGF-1R* je povećana u nekim ćelijskim linijama hronične mijeloidne leukemije, uključujući i K562 ćelije (190). Takođe, novija istraživanja ukazuju na njegovu ulogu u procesu senescencije. Prikazani rezultati pokazuju da do značajnog sniženja nivoa genske ekspresije *IGF-1R* dolazi nakon tretmana K562 ćelija. Smanjena ćelijska

proliferacija nakon tretmana K562 ćelija VA-Dox kombinacijom potvrđena je i testom inhibicije formiranja kolonija, što je još jedna od karakteristika procesa senescencije.

S obzirom da smo pokazali sinergističko dejstvo u indukciji apoptoze VA ekstrakta pri subterapeutskim koncentracijama Dox, interesovalo nas je da li je dati efekat posledica povećanog ulaska Dox u ćelije tretirane VA-Dox kombinacijom. Rezultati dobijeni merenjem ulaska, odnosno izlaska Dox u tretirane ćelije su pokazali da u zavisnosti od toga da li je primenjen pretretman K562 ćelija VA ekstraktom ili ne, količina Dox u tumorskim ćelijama je različita. Tako, pretretman ćelija samo VA ekstraktom povećava ulazak Dox u K562 ćelije, dok pretretman ćelija VA ekstraktom, pa zatim tretman VA-Dox ili samo tretman VA-Dox kombinacijom značajno smanjuje ulazak Dox u ćelije. Tretman ćelija VA ekstraktom ne utiče značajno na izlazak Dox iz ćelija.

Ispitali smo i uticaj VA ekstrakta na ulazak/izlazak Dox u ćelije leukocitne populacije, odnosno ćelijske populacije podložne citotoksičnom delovanju hemioterapeutika. Hemioterapeutski tretman malignih tumora kompromituje delovanje imunskog sistema domaćina, kao važne komponente izlečenja, dovodi do neželjenih reakcija koje ugrožavaju hemioterapiju i njenu efikasnost, a ne manje bitno utiču na kvalitet života pacijenata. Merenjem količine Dox unutar tretiranih limfocita pokazali smo da je pre svega količina Dox koja je ušla u limfocite nezavisno od primenjenog tretmana daleko niža u odnosu na količinu Dox koja je ušla u K562 ćelije pri istim eksperimentalnim uslovima. Takođe, istovremena primena VA ekstrakta i Dox smanjuje ulazak Dox u tretirane limfocite, ali ne utiče značajno na njegov izlazak iz ćelija. Dobijeni rezultati su prvenstveno značajni za MČPK, jer na taj način VA ekstrakt, u koncentraciji koja je znatno ispod toksične koncentracije, ispoljava svoj citoprotektivni efekat na ovu ćelijsku populaciju.

Kako od devedesetih godina prošlog veka Dox nije terapija izbora u lečenju pacijenata obolelih od hronične mijeloidne leukemije, u daljim istaživanjima smo se odlučili da ispitujemo molekularne mehanizme koji leže u osnovi interakcije bioaktivnih komponenti bele imele i Dox na ćelijskoj liniji poreklom iz tumora kod kojih se Dox primenjuje kao standardna hemioterapija. Odabrali smo ćelijsku liniju karcinoma dojke, MCF7. IC₅₀ vrednost VA ekstrakta na ovoj ćelijskoj liniji iznosila je $9.08 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina, dok je IC₅₀ vrednost za Dox iznosila $0.19 \mu\text{M}$. Ovi podaci ukazuju da VA

ekstrakt ima manje izraženo toksično dejstvo na MCF7 ćelije u odnosu na K562, ali i da je toksičnost doksorubicina izraženija. Na osnovu rezultata dobijenih na K562 ćelijskoj liniji, prilikom ispitivanja mehanizama interakcije VA ekstrakta i Dox na MCF7 ćelijama, odabrali smo subapoptotsku koncentraciju Dox i vreme tretmana od 72 sata.

Određivanjem distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pokazali smo da nakon tretmana MCF7 ćelija VA ekstraktom dolazi do povećanja procenta ćelija u apoptozi, dok je tretmanom datih ćelija subterapeutskom koncentracijom Dox došlo do značajnog povećanja broja ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa, a procenat ćelija u apoptozi je veoma mali. Suprotno tome, tretman MCF7 ćelija kombinacijom agenasa dovodi do značajnog smanjenja broja ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa i značajnog povećanja procenta ćelija u apoptozi. Takođe smo pokazali kao i u slučaju K562 ćelija, da je apoptoza MCF7 ćelija tretiranih VA ekstraktom pojedinačno i u kombinaciji sa Dox, regulisana proteinima Bcl-2 familije. Prekomerna proteinska i genska ekspresija Bax u MCF7 ćelijama tretiranim VA ekstraktom, može biti povezana sa ranim smanjenjem mitohondrijskog membranskog potencijala, jer je značajano smanjenje $\Delta\psi_m$ zabeleženo posle 72 sata tretmana MCF7 ćelija. Dobijeni rezultati potvrđuju da VA ekstrakt sam i u kombinaciji sa Dox svoj citotoksični efekat ostvaruje modulacijom signalnih kaskada unutrašnjeg mitohondrijskog apoptotskog puta. U slučaju K562 ćelija prekomerna ekspresija Bax dovodi do aktivacije kaspazne kaskade, u slučaju MCF7 ćelija ovaj proces nije posredovan kapazom-3, pošto je MCF 7 ćelije ne ekspimiraju (128,129). Ovo ukazuje da humane ćelije mogu kompenzovati ovaj nedostatak. Naši rezultati su pokazali da nishodni defekti u unutrašnjem apoptotskom signalnom putu posredovani Bax-om nisu dovoljni da blokiraju ćelijsku smrt.

Ukoliko se posmatra nivo ciklina B1 i ciklina D1, i dobijeni rezultati uporede sa rezultatima dobijenim određivanjem distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, zaključujemo da je zastoj u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa nakon tretmana MCF7 ćelija Dox povezan sa povećanjem ekspresije ciklina B1. Tretman ćelija kombinacijom agenasa značajno smanjuje procenat ciklin B1 pozitivnih ćelija gotovo do nivoa kontrolnih ćelija, što se može povezati sa eliminacijom G₂/M zastoja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim rezultatima dobijenim na K562 ćelijama, kao i sa rezultatima Dan i Yamori i samo

potvrđuju pretpostavku da su promene u nivou ekspresije ciklina B1 i zastoje u G₂/M fazi u ćelijama izloženim doksorubicinu regulisani na način nezavisan od p53 (171). Takođe, rezultati dobijeni na MCF7 ćelijama su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na K562 ćelijama u odnosu na merenje nivoa ciklina D1. Nakon tretmana VA ekstraktom, nije bilo statistički značajne razlike u procentu ciklin D1 pozitivnih MCF7 ćelija u poređenju sa kontrolnim ćelijama u kojima je inače nivo ciklina D1 veoma nizak u odnosu na K562 ćelije koje se odlikuju visokom S fazom. Posle Dox tretmana MCF7 ćelija nivo ciklina D1 raste. Kombinovani tretman ćelija VA ekstraktom i Dox značajno smanjuje procenat ciklin D1 pozitivnih ćelija. Ovo smanjenje je povezano sa eliminacijom G₂/M zastoja.

Rezultati dobijeni određivanjem nivoa genske ekspresije *p21^{WAF1}* pokazuju da nakon 72 sata tretmana MCF7 ćelija dolazi do statistički značajnog povećanja nivoa genske ekspresije *p21^{WAF1}* u poređenju sa kontrolom. VA-Dox kombinacija ne dovodi do promena u nivou genske ekspresije *p21^{WAF1}* u poređenju sa Dox. Dobijeni rezultati bi mogli da ukazuju da tretman MCF7 ćelija VA ekstraktom dovodi do zastoja u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa, s obzirom da smo dobili smanjenje ekspresije ciklina D1 i povećanje ekspresije gena za *p21^{WAF1}*. S druge strane, ekspresija *p21^{WAF1}* na proteinskom nivou je bila maksimalna nakon tretmana MCF7 ćelija subterapeutskom koncentracijom Dox. Tretman MCF7 ćelija VA-Dox kombinacijom smanjuje nivo ekspresije *p21^{WAF1}* proteina, dok se nivo ekspresije *p21^{WAF1}* proteina nakon tretmana VA ekstraktom nije menjao u odnosu na kontrolne ćelije. Iako su ove ćelije deficijentne za kaspazu-3, postoji mogućnost da neka druga izvršna kaspaza degradira *p21^{WAF1}*, što bi omogućilo prevođenje ćelija iz senescencije u apoptozu. Senescencija MCF7 ćelija indukovana subapoptotskom koncentracijom Dox je potvrđena i SA-β-gal bojenjem i citometrijski kao povećanje parametra granularnosti ovih ćelija. Nasuprot tome, MCF7 ćelije tretirane kombinacijom agenasa gube ove morfološke i metaboličke karakteristike. Merenjem nivoa genske ekspresije *IGF-1R* pokazano je da VA ekstrakt i Dox, pojedinačno i u kombinaciji dovode do značajnog sniženja nivoa genske ekspresije *IGF-1R* u MCF7 ćelijama.

Rezultati prikazani u ovom radu su pokazali da VA ekstrakt samostalno i u kombinaciji sa Dox deluje proapoptotski i antiproliferativno u obe ispitivane ćelijske linije.

Međutim, apoptoza K562 ćelija posredovana je delovanjem kaspaze-3, dok apoptoza MCF7 ćelija nije posredovana ovom kaspazom.

Rezultati epidemioloških studija i brojnih eksperimenata u *in vitro* uslovima i na animalnim modelima su pokazali da trombociti imaju veliki značaj u patogenezi i progresiji malignih bolesti. Interakcija trombocita sa tumorskim ćelijama značajno doprinosi razvoju malignog procesa i dovodi do stanja povećane aktivacije trombocita, hiperkoagulacije i trombocitopenije, kao čestih pratećih simptoma malignih bolesti. Proces aktivacije trombocita, kao i njihove agregacije sa ćelijama endotela, tumorskim i drugim krvnim ćelijama ima ključnu ulogu u procesima sekvestracije tumora i izbegavanja tumorskog nadzora od strane imunskog sistema, ekstravazacije i metastatskog procesa, kao i u procesu neoangiogeneze u novoformiranom tumorskom tkivu.

Dokazano je da tumorske ćelije imaju sposobnost da formiraju agregate sa trombocitima i da je ova sposobnost u korelaciji sa metastatskim potencijalom tumorskih ćelija (191-197). Kada se tumorska ćelija zaogrne trombocitima, stiče sposobnost da izbegne dejstvo imunskog sistema. Pokazano je da trombociti štite tumore od TNF- α posredovane citotoksičnosti (198,199). Nadalje, trombociti olakšavaju adheziju tumorskih ćelija za vaskularni endotel (200) i oslobađaju brojne faktore rasta koji mogu da stimulišu rast tumorskih ćelija (201,202). Postavlja se pitanje, koji su to molekularni mehanizmi koji kontrolišu agregabilnu sposobnost tumorskih ćelija? Tokom proteklih godina, opisani su brojni stimulatorni i inhibitorni faktori agregacije trombocita indukovane tumorskim ćelijama (engl. tumour cell induced platelet aggregation, TCIPA). Tumorske ćelije imaju sposobnost da stimulišu otpuštanje trombocitnih granula što dovodi do oslobađanja snažnih agenasa agregacije. Adenozin difosfat (ADP), koji se nalazi u trombocitnim granulama je jedan od tih agenasa. ADP doprinosi TCIPA izazvanom od strane sitnoćelijskih tumorskih ćelija pluća (203), melanomskih ćelija (204), ćelija karcinom dojke, MCF7 (205). Pokazano je da ADP oslobođen tokom MCF7 indukovane TCIPA, agregira trombocite putem aktivacije P2Y₁₂ purinergičnog receptora (205). Tromboksan A2, potentni trombocitni-agregatorini eikosanoid, takođe se stvara tokom TCIPA i stimuliše agregaciju trombocita

izazvanu mišijim i humanim tumorskim ćelijskim linijama (206-211) najverovatnije preko aktivacije tromboksanskog receptora na trombocitima.

TCIPA takođe može biti stimulisana od strane serinskih proteinaza (trombin), cistein proteinaza (katepsin B) i matriksnih metaloproteinaza (MMP). Trombin, ključni enzim u koagulacionoj kaskadi je i najmoćniji aktivator trombocita (212-214). Humane ćelije glioblastoma U87MG (215), neuroblastoma (216) i karcinoma pankreasa (217) imaju sposobnost generisanja trombina, čime se povećava TCIPA. Nedavno je pokazano da je oslobađanje MMP-2 iz trombocita i iz tumorskih ćelija uključeno u indukovanu TCIPA kod HT-1080 i MCF7 ćelija (205,218,219). Zanimljivo je da, povećana agregabilnost trombocita prisutna kod pacijenata sa metastatskim karcinomom prostate može biti povezana sa povećanom proizvodnjom MMP-2 (220). Postoje jaki dokazi koji ukazuju na ulogu adhezionih receptora GPIb-IX-V, GPIIb/IIIa i P-selektina u stimulaciji TCIPA (221). Tako na primer, ekspresija GPIb-IX-V je primećena na površini trombocita i MCF7 ćelija tokom TCIPA (205,220,222). Prečišćen von Willebrandov faktor pojačava TCIPA izazvanu od strane HT-1080 ćelija (219), dok inhibicija GPIb-IX-V ili von Willebrandovog faktora blokirajućim antitelima smanjuje interakciju trombocita sa tumorskim ćelijama (222-224). Postoje brojni dokazi o ključnoj ulozi integrin receptora, GPIIb/IIIa u TCIPA izazvanoj tumorskim ćelijama različitog porekla u *in vitro* i *in vivo* uslovima (205,222-231). Drugi integrinski receptor $\alpha v\beta_3$, koji je eksprimiran u malim količinama na površini trombocita, ali je prisutan u izobilju na površini tumorskih ćelija, može imati ulogu u TCIPA, agregirajući ćelije tumora za trombocite putem plazma proteina kao što je fibrinogen (232). P-selektin i njegova veza sa mucinom verovatno posreduje TCIPA u raznim mucinprodukujućim tumorima (233-239). Za prostacikline i azot oksid (NO) je pokazano da su potentni regulatorni agensi trombocita i da kontrolišu TCIPA. Prostaciklin je najpotentniji poznati inhibitor agregacije trombocita (219,240-251). U vaskularnom sistemu, NO uglavnom stvaraju endotelne ćelije, trombociti i leukociti (249).

Dakle, tumorske ćelije imaju izuzetno širok spektar puteva i mehanizma za podsticanje TCIPA. Međutim, uključivanje različitih puteva i mehanizama u tumorsku progresiju zavisi od vrste tumora. Na primer, generisanje MMP i MMP-2 zavisnih TCIPA se detektuje u znatno većoj meri u humanoj HT-1080 ćelijskoj liniji, u odnosu na humane

A549 ćelije adenokarcinoma (218). Osim toga, čak i među ćelijama koje vode poreklo iz istog tumora ili istog pacijenta postoje značajne razlike u njihovoj sposobnosti da formiraju agregate sa trombocitima (197,204).

Razumevanje mehanizama odgovornih za formiranje agregata tumorskih ćelija i trombocita dovelo je do testiranja raznih antitrombocitnih lekova kao potencijalnih inhibitora TCIPA *in vitro* i *in vivo*. Acetil salicilna kiselina (aspirin) smanjuje prevalencu više tipova tumora, a potencijalni mehanizmi pored inhibicije ciklooksigenaze uključuju i direktno delovanje na metastatski proces, ali uticaj aspirina na preživljavanje pacijenata nije potvrđeno (64,65,252,253).

Ispitivanjem delovanja VA ekstrakta na funkciju trombocita u uslovima povećane aktivacije trombocita u *in vitro* uslovima, pri čemu je kao agonist korišćen ADP, kao eksperimentalni model trombocita kod pacijenata sa metastatskim karcinomima, pokazano je da bioaktivne komponente bele imele dovode do smanjenja ekspresije P-selektina, što je pokazano smanjenjem procenta P-selektin pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita izloženih ispitivanom ekstraktu i stimulisanih ADP-om, kao i smanjenjem indeksa aktivacije trombocita u odnosu na ekspresiju P-selektina. Pored značaja za sam tumorski proces, inhibicija ekspresije P-selektina, kao ključnog medijatora u patogenezi ateroskleroze, ukazuje na potencijal bele imele da prevenira dodatne vaskularne komplikacije tumorima posredovane aktivacije trombocita. VA ekstrakt nije uticao na ekspresiju GPIIb/IIIa, receptora koji posreduje u homotipskoj agregaciji i patogenezi tromboze.

Pokazano je takođe da uporedo sa uticajem na ekspresiju P-selektina VA ekstrakt dovodi i do smanjenja heterotipske agregacije trombocita posredovane P-selektinom, što je pokazano smanjenjem procenta agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita izloženih ispitivanom ekstraktu i stimulisanih ADP-om, kao i smanjenjem indeksa agregacije trombocita sa monocitima. Pokazana sposobnost ispitivanog ekstrakta da moduliše heterotipsku interakciju aktiviranih trombocita sa monocitima ukazuje i na mogući uticaj ekstrakta na heterotipsku agregaciju trombocita sa drugim ćelijama, takođe posredovanu P-selektinom, uključujući interakciju aktiviranih trombocita sa malignim ćelijama i potencijalni uticaj na njihovu sekvencijaciju, interakciju sa endotelnim ćelijama i

uticaj na ekstravazaciju sekvestriranih malignih ćelija, kao i delovanje na aktivaciju trombocita i oslobađanje faktora rasta značajnih za proces angiogeneze.

O delovanju ekstrakta imele na funkciju trombocita nema podataka u dostupnoj literaturi.

Makrofage predstavljaju još jednu veoma značajnu ćelijsku populaciju koja sačinjava tumorsko mikrookruženje (254). Ova heterogena ćelijska populacija je sposobna da menja svoj fenotip u zavisnosti od okruženja, efekat koji je posebno zapažen kod tumora (255-257). Upravo iz ovih razloga značajno je bilo ispitati imunomodulatorno dejstvo VA ekstrakta na monocite u kulturi i kokulturi sa trombocitima. U cilju ispitivanja imunomodulatornog dejstva ekstrakta bele imele na monocitno/makrofagne ćelije u kulturi korišćene su THP-1 ćelije. Humana mijeloidno monocitna ćelijska linija, THP-1, je linija koja je korišćena u velikom broju studija i pokazala se kao veoma korisna u proučavanju imunomodulatornog efekta ispitivanih agenasa. THP-1 monociti su hematopoetski CD34⁺ prekursori, koji lako mogu diferencirati u makrofage pomoću različitih stimulusa. Dva glavna tipa makrofaga su klasično aktivirane proinflamatorne M1 i alternativno aktivirane imunosupresivne M2 makrofage. THP-1 ćelije su prvo diferencirane vitaminom D₃, kako bi se dobile mirujuće M0 makrofage, a zatim su stimulisane LPS-om u cilju dobijanja M1 polarizovanih proinflamatornih makrofaga.

Dobijeni rezultati pokazuju da tretiranje proinflamatornih M1 makrofaga VA ekstraktom dovodi do značajnog oslobađanja TNF- α u hranljivi medijum. Poznato je da TNF- α ima dvojaku ulogu u tumorima i obično je povezan sa indukcijom malignih tumora, angiogenezom, proliferacijom i pojavom metastaza (258-260). S druge strane, visok nivo TNF- α ima antitumorsko dejstvo (258). Ovo povećanje produkcije TNF- α može biti posledica prisustva lektina i/ili triterpena, jer su *in vitro* istraživanja vodenih i lipofilnih ekstrakata bele imele takođe pokazala povećanje produkcije TNF- α u M1 makrofagama (261). Rezultati koji su dobijeni u kokulturi THP-1 ćelija i aktiviranih trombocita mogu ukazivati da bioaktivne komponente bele imele, utiču na trombocite da sekretuju aktivirajuće faktore koji su u stanju da stimulišu oslobađanje TNF- α iz THP-1 ćelija u hranljivi medijum. Naravno, ne treba zanemariti ni činjenicu da su THP-1 ćelije poreklom tumorske ćelije tako da ove rezultate treba posmatrati i u tom kontekstu. Na osnovu

prikazanih rezultata efekata VA ekstrakta na monocite, kako primarne, tako i u kulturi, može se zaključiti da ispitivani ekstrakt ima dihotomo delovanje, koje potencijalno ima indirektno antitumorsko delovanje i doprinosi plejotropnom antitumorskom delovanju bele imele. Delovanjem na trombocite inhibira se njihova agregacija sa monocitima i time smanjuje verovatnoća kardiovaskularnih komplikacija. Inhibitorno delovanje na produkciju slobodnih radikala i odsustvo stimulatornog delovanja na ekspresiju CD11b u LPS-om stimulisanim monocitima/makrofagama ukazuje da monociti predstavljaju ciljno mesto delovanja ispitivanog ekstrakta u prevenciji njihove agregacije sa trombocitima. Takođe, stimulacijom oslobođeni TNF- α potencira antitumorsko delovanje ovog citokina. Stimulacijom produkcije TNF- α u LPS-om polarizovanim ćelijama, potencira se uloga makrofaga i njihovih citokina u imunskom odgovoru na tumore.

Imunski odgovor na tumore je kompleksan, uključuje interakcije nekoliko tipova ćelija adaptivnog i urođenog imunskog sistema i ima važnu ulogu u progresiji različiti solidnih tumora (262,263). Imunski sistem stimuliše eliminaciju tumorskih ćelija i kontrolu rasta tumora, međutim, tumore karakteriše visoko imunosupresivno tumorsko mikrookruženje koje ometa T ćelijsku funkciju (262). Razumevanje procesa imunskog nadzora je veoma važno za razvoj efikasnog imunskog tretmana usmerenog protiv tumora. Antitumorski imunski odgovor obuhvata T limfocite, B limfocite, ćelije prirodne ubice (NK), makrofage, dendritske ćelije i granulocite. Ove komponente imunskog sistema, ukoliko su stimulisane, mogu dovesti do eliminacije tumora ili njegovog smanjenja. Narušena imunska antitumorska funkcija, karakteristična za pacijente obolele od malignih tumora, može pomoći u objašnjenju procesa pojave i širenja metastaza. Osim toga, tretiranje tumora hemioterapeutcima i radioterapijom, generalno vodi daljoj imunosupresiji, te bi prevencija imunosupresije bila veoma korisna za ove pacijente. Iz tog razloga drugi deo ovog rada obuhvata pilot studiju sa pacijentkinjama obolelim od karcinoma dojke, čiji je cilj bio ispitati imunomodulatorno dejstvo VA ekstrakta, odnosno utvrditi da li ekstrakt može dovesti do poboljšanja imunskog sistema narušenog usled same bolesti, ali i kao posledice delovanja hemioterapije.

Randomizovana pilot studija, čiji su rezultati prikazani u radu, imala je za cilj ispitivanje imunomodulatornog delovanja bele imele, tj. njen uticaj na pojavu neutropenije i

na kvalitet života tokom primene komplementarne terapije komercijalnim preparatom bele imele kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na standardnom hemioterapijskom režimu. Ključna akutna neželjena dejstava hemioterapije su posledica pre svega supresije hematopoetskog sistema kod pacijenata, nastale usled toksičnog delovanja hemioterapeutika i narušavanja zaštitnih mehanizama imunskog sistema kako u pogledu antitumorskog delovanja, tako i u pogledu zaštite od infekcija. Rezultati brojnih *in vitro* i *in vivo* studija na eksperimentalnim modelima pokazali su da aktivne komponente bele imele, a pre svega lektini i viskotoksini, ispoljavaju imunomodulatorno dejstvo stimulacijom aktivnosti monocita/makrofaga, granulocita, NK ćelija, T ćelija, dendritičnih ćelija, odnosno povećavajući sekreciju brojnih citokina kao što su: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ (264,265). Prikazi slučajeva i preliminarne kliničke studije podržavaju ove eksperimentalne rezultate (266-268). Takođe, pokazano je da VA ekstrakt može da utiče i na proces tumorske angiogeneze (269,270). Tretiranjem životinja, kod kojih su indukovani tumori, VA ekstrakti pokazuju inhibitorni efekat na rast tumora (271,272). Sve ovo je dalo racionalnu osnovu za definisanje parametara imunološkog statusa kao primarnih biomarkera, uključujući populacije odgovorne za antitumorsku zaštitu s jedne strane i zaštitu od infekcija sa druge strane (273). Poznato je da su ove populacije podložne citotoksičnom delovanju hemioterapeutika, što kompromituje delovanje imunskog sistema pacijenata, kao važne komponente izlečenja, dovodi do neželjenih reakcija koje ugrožavaju hemioterapiju i njenu efikasnost, a ne manje bitno utiču na kvalitet života pacijenata. Takođe, neutropenija predstavlja jedan od najznačajnijih toksičnih efekata hemioterapije, koja sa sobom nosi rizik od infekcija koje mogu da budu i životno ugrožavajuće i predstavljaju čest uzrok smanjenja doze hemioterapeutika, čime se remeti efikasnost ili u ozbiljnim slučajevima su uzrok prekida terapije, što ozbiljno ugrožava ishod lečenja. Dodatno, pokazano je da neutropenija izazvana hemioterapijom u značajnoj meri povećava cenu koštanja terapije u odnosu na ishod lečenja. Shodno tome značajna pažnja se posvećuje iznalaženju novih palijativnih i komplementarnih agenasa, koji imaju potencijal da smanje rizik od nastanka neutropenije ili poboljšaju status pacijenata i ishod terapije u slučaju njenog nastanka.

Za kliničku aplikaciju preparati bele imele su pravljene od biljaka koje su rasle na različitim domaćinima i to kao vodeni rastvori dobijeni fermentacijom ili procedurom presovanja. U zavisnosti od vrste drveta domaćina, vremena sakupljanja, procedure ekstrakcije, VA ekstrakti se razlikuju u pogledu njihovih aktivnih supstanci i bioloških osobina. U ovoj studiji ispitivano je imunomodulatorno dejstvo dva komercijalna preparata bele imele od kojih je Iscador M dobijen procesom fermentacije, a Helixor A vodenom ekstrakcijom.

Dobijeni rezultati ukazuju da terapija ispitivanim preparatima bele imele nije značajno uticala na incidencu neutropenije kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na kombinovanoj hemioterapiji (150,151). Rezultati delovanja preparata Iscador M bi mogli ukazati na pozitivan trend u smanju incidence neutropenije. Jedno od mogućih objašnjenja je da se citotoksična svojstva VA ekstrakta (koja prevashodno potiču od ML-1) u velikoj meri gube procesom fermentacije (274).

Rezultati naših *in vitro* eksperimenata dobijeni merenjem količine Dox koja je ušla, odnosno izašla iz limfocita tretiranih VA-Dox kombinacijom ukazuju da bi VA ekstrakt u koncentraciji koja je znatno ispod toksične koncentracije mogao da ispoljava svoj citoprotektivni efekat, kako na ovu ćelijsku populaciju tako i na ostale mononuklearne ćelije periferne krvi, uključujući i populaciju neutrofila.

Iako je do pogoršanja kvaliteta života došlo u svim ispitivanim grupama, najizraženije je bilo u Kontrolnoj grupi. Komparativne analize za svaki od ispitivanih parametara kvaliteta života u odnosu na bazalni nivo su davale prednost grupama koje su tretirane nekim od preparata bele imele. Ispitivanjem delovanja komplementarne terapije preparatom bele imele pokazano je da je do značajnog poboljšanja došlo u 10 od 15 parametara kvaliteta života u Helixor A i u 12 u Iscador M grupi, u odnosu na Kontrolnu grupu. Najznačajniji efekti bili su uočeni u odnosu na profesionalnu funkcionalnost, socijalnu funkcionalnost, emocionalnu stabilnost, bol, mučninu, gubitak apetita, dijareju, kao ključnih faktora na koje hemioterapija deluje nepovoljno.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studija koje su pokazale povoljno delovanje ispitivanog komercijalnog preparata bele imele na kvalitet života pacijenata obolelih od karcinoma dojke, pluća i materice (275-277). Povoljno delovanje preparata bele

imele generalno je potvrđeno kroz dva sistematska revijalna rada (149,278). Posebno je značajno da su efekti pokazani na kvalitet života u odnosu na Kontrolnu grupu bili izraženiji sa vremenom trajanja hemioterapije, što ukazuje na potrebu da se dalja istraživanja usmere na dugoročna delovanja ovog ili sličnih preparata.

Međutim, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da preparat bele imele ne pruža efikasnu zaštitu populaciji leukocita koji čine važne komponente antitumorske zaštite od delovanja citotoksičnih agenasa, što je u saglasnosti sa brojnim kliničkim studijama koje su ispitivale efekat bele imele na imunski status pacijenata obolelih od malignih tumora i koje nisu uspele da pokažu statistički značajno imunomodulatorno dejstvo. Osnovno pitanje koje se nameće je zašto u brojnim sprovedenim kliničkim studijama, uključujući i našu studiju, ne postoje jasni dokazi o efektu VA ekstrakata na imunski status pacijenata obolelih od karcinoma, kada brojne *in vitro* studije, kao i *in vivo* studije na eksperimentalnim modelima pokazuju imunomodulatorno delovanje aktivnih komponenti bele imele.

Očigledno da uspešna imunoterapija usmerena protiv tumorskih ćelija zahteva nove kliničke koncepte.

Uprkos velikom broju značajnih eksperimentalnih podataka, klinički značaj imunskog sistema kod malignih bolesti je često nedovoljno shvaćen, a ispravna procena krajnje složenog imunskog sistema u procesu odbrane od tumora je često kontroverzna. Jasno je da nisu svi imunski mehanizmi narušeni kod malignih bolesti, ali smanjenje određenih funkcija urođenog imunskog sistema podržava hipotezu da one mogu da doprinesu procesu izbegavanja eliminacije tumorskih ćelija od strane imunskog sistema domaćina. Međutim, uobičajena klinička i laboratorijska ispitivanja kod pacijenata obolelih od malignih tumora često nisu u stanju da otkriju bilo kakve znake oslabljenog imunskog sistema, jer najrazvijenije specifične funkcije imunskog sistema pacijenata tokom progresije tumora ostaju unutar normalnog opsega. Uprkos ovim odstupanjima, eksperimentalna istraživanja pronalaze sve više dokaza da je smanjenje brojnih funkcija urođenog imunskog sistema u korelaciji sa progresijom tumora. Na primer, kada je analizirana interakcija između specifičnog imunskog odgovora i nespecifičnih zapaljenskih reakcija i njihova veza sa prognozom pacijenata obolelih od malignih tumora, dobijeni

rezultati su otkrili da iako je postojao značajan specifičan T ćelijski antitumorski odgovor, njihovi efekti na preživljavanje pacijenata i pojavu lokalnog recidiva su bili manje važni u poređenju sa efektima nespecifičnog inflamatornog odgovora (279). Pored toga, poremećaji u ekspresiji antigena glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I su karakteristični za tumore različite histopatologije, što može uticati na efikasnost T limfocita (280).

Brojni eksperimenti su pokušavali da pronađu razloge za smanjenu aktivnost urođenog imunskog sistema kod pacijenata obolelih od malignih tumora. Postoji saglasnost da solubilni faktori proizvedeni ili indukovani od strane maligne ćelije imaju važnu ulogu u ovom procesu (281). Uprkos činjenici da su osnovne funkcije urođenog imunskog sistema suprimirane kod pacijenta obolelih od malignih tumora, njegovo ispitivanje nije trenutna klinička praksa, što ima za posledicu kontinuirani nedostatak svežeg kliničkog iskustva i novih koncepata. Ovaj nedostatak razumevanja u medicini zasnovanoj na dokazima ometa razvoj različitih modaliteta nespecifičnih imunoterapija usmerenih protiv tumora. Takođe, periodična procena supresivne prirode tumorskog mikrokruženja bila bi od pomoći, iako nije praktična, u cilju boljeg razumevanja ove nespecifične imunoterapeutske intervencije. Naravno, ne smemo zaboraviti da zapaljenski proces može izazvati kontroverzne efekte. Može iskoreniti ćelije tumora, ali kada je hroničan može stimulisati rast tumora. Na primer, M1 makrofage i DC1 dendritske ćelije proizvode IL-12, proinflamatorni citokin koji aktivira citotoksične efektorske ćelije, kao što su NK i NKT ćelije, koje su snažni inhibitori rasta tumora. Međutim, ove ćelije su mnogo manje zastupljene u tumoru pacijenata. Dostupne informacije ukazuju na to da tumorom povezane makrofage pripadaju M2 populaciji (282). M2 proizvode IL-4 i IL-10, čime se ubrzava generisanje pomoćničkih Th2 ćelija i inhibiraju pomoćničke Th1 ćelije (283). M2 makrofage utiču na upalni proces i stimulišu ćelijsku proliferaciju proizvodeći faktore rasta i proizvode arginaznog puta, a takođe stimulišu angiogenezu (282). Pacijenti oboleli od malignih tumora mogu imati do 40% više perifernih M2 monocita u poređenju sa zdravim osobama, koji imaju samo 10 % M2 monocita (283). NKT ćelije mogu imati sličan suprotstavljeni efekat. Kod tumora, NKT-1 ćelije imaju zaštitnu ulogu, proizvodeći IFN- γ aktiviraju NK i DC1 dendritične ćelije, koje proizvode IL-12. S druge strane, NKT-2 ćelije prvenstveno inhibiraju tumorsku imunost (284). Ovi nalazi ukazuju na poremećenu ravnotežu urođenog imunskog sistema

kod pacijenata obolelih od malignih tumora. Razumevanje načina manipulacije ovom ravnotežom može biti od ključnog značaja za osmišljavanje uspešne zaštitne terapije usmerene protiv tumora.

U poslednjoj deceniji, kliničke studije koje uključuju komplementarnu imunoterapiju pomoću različitih biljnih ekstrakata su slabo napredovale upravo zbog nedostatka jasnih imunoloških koncepata. U literaturi iz oblasti komplementarne medicine u pogledu tumorske imunologije, često postoje za i protiv argumenti. Pre svega, u velikom broju kliničkih ispitivanja doze u kojima se primenjivao VA ekstrakt nisu prijavljene; takvi izveštaji bi omogućili tačniju i reproduktivniju hemijsku i imunološku definiciju za korišćenjem ove terapije. Štaviše, uprkos opšte prihvaćenom mišljenju da su citotoksični/apoptotski i imunomodulatorni efekti važni za klinički benefit primene VA ekstrakta, imunološki rezultati nedostaju u većini kliničkih izveštaja objavljenih u poslednjih 20 godina. Ovaj nedostatak čudi, jer su dugi niz godina na osnovu rezultata *in vitro* i *in vivo* studija na eksperimentalnim životinjama poznate doze ekstrakta koje dovode do imunoloških efekata (285-289).

Većina kliničkih ispitivanja ne uzima u obzir rezultate imunoloških istraživanja. Visoke doze VA ekstrakta ne dovode ni do kakvog značajnog odgovora urođenog imunskog sistema. Takođe, ne sme se zaboraviti da citotoksični efekti VA ekstrakta mogu nishodno da regulišu imunološke efekte ako nisu dati u optimalnim dozama (287). Shodno tome, odsustvo dokaza o efektu VA ekstrakta na imunski sistem u mnogim kliničkim studijama čini da je procenjivanje njegovog imunomodulatornog potencijala veoma teško.

Sve ovo ukazuje da je neophodno pronaći optimalne doze za klinička ispitivanja.

Dobro je poznato da novi imunoterapijski pristupi, kao što su DNK vakcine, vakcine zasnovane na primeni preparata dendritičnih ćelija, proteina toplotnog šoka i tehnologije transfera gena, pokazuju značajne rezultate u eksperimentalnim životinjama, iako njihova evaluacija u kliničkim ispitivanjima nije pokazala značajniju zaštitu od širenja tumora kod velikog broja pacijenata (290). Sve je više dokaza koji sugerišu da se efektivnost tumor specifične imunske reakcije, izazvane različitim agensima putem vakcinacije, može poboljšati paralelnim aktiviranjem odgovarajućih komponenti urođenog imunskog sistema (290). Ciljanje na urođeni imunski sistem kod pacijenata obolelih od

malignih tumora primenom VA ekstrakta kao komplementarne terapije bi moglo biti od značaja.

Dodatno, s obzirom da se u ovoj pilot studiji radi o pacijentkinjama s dijagnostikovanim solidnim tumorom dojke, važno je istaći da status pojedinih populacija ćelija imunskog sistema u perifernoj krvi ne mora da reflektuje stanje u samom tumoru i da je delovanje na populacije koje infiltriraju sam tumor i posledični efekti nedostajuća karika. Balermas i saradnici su pokazali da su pacijenti oboleli od skvamoznog ćelijskog karcinoma glave i vrata (HNSCC), čiji su tumori gusto infiltrirani $CD3^+CD8^+$ T ćelijama imali znatno duže ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez progresije (PFS), kao i preživljavanje bez pojave udaljenih metastaza (DMFS) u poređenju sa pacijentima čiji su tumori slabo infiltrirani ovom populacijom T limfocita (291). S druge strane, ni $CD3^+CD4^+$ T limfociti, ni Foxp3 ekspresija nije bila značajno povezana sa bilo kojom kliničkom krajnjom tačkom. Prisustvo većeg broja $CD3^+$ limfocita infiltriranih u tumoru je povezano sa boljim ishodom lečenja kod različitih tipova tumora, uključujući kolorektalni, karcinom dojke, ezofagusa, jajnika i rektuma (292-297). $CD8^+$ T ćelije imaju ključnu ulogu u imunološkoj odbrani, jer služe kao koreceptori za T ćelijske receptore (297,298). Simultano vezivanje $CD8$ i T ćelijskog receptora za molekule glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I pojačava citotoksičnu sposobnost T ćelija prema ćelijama tumora (298). Shodno tome, povoljan ishod lečenja je dokazan za tumore sa visokom infiltracijom $CD8^+$ T limfocita kod pacijenata obolelih od karcinoma dojke, jajnika, bubrega, pluća, kolorektalnog karcinoma. Pretscher i saradnici su detektovali manji broj $CD8^+$ ćelija u limfnim čvorovima metastatskog cervikalnog karcinoma (299). Distel i saradnici su prijavili bolje preživljavanje kod pacijenata sa niskim rizikom za HNSCC i visokom $CD8$ ekspresijom, nakon tretmana primarno operacijom, a zatim radioterapijom (300). Ogino i saradnici su pokazali da pacijenti sa tumorom larinksa i niskom infiltracijom $CD8^+$ T ćelija imaju loše preživljavanje (301).

Predloženo je nekoliko mehanizama koji se odnose na interakciju imunskog sistema i tumorskih ćelija u odgovoru na lečenje malignih tumora (294,296,297,302). Pretpostavlja se da bi prethodna stimulacija imunskog odgovora mogla da poveća potencijal antitumorske terapije u cilju eliminacije tumorskih ćelija. Smatra se da bi citotoksični

efekat hemioterapeutika na tumorske ćelije mogao dovesti do oslobađanja tumorskih antigena i hemokina koji bi mogli da stimulišu imunski odgovor protiv tumorskih ćelija, tj. imunski odgovor bi bio mnogo potentniji kod pacijenata imunosenzibilisanih pre početka terapije. Pored toga, značajna korelacija visoke CD3 i CD8 ekspresije sa boljim DMFS može ukazivati na prisustvo sistemskog mehanizma imunskog nadzora koji suzbija razvoj mikrometastaza u udaljenim organima. Milas i saradnici su pokazali smanjeni odgovor tumora na radioterapiju kod miševa kojima nedostaje normalan T ćelijski repertoar (303). U pretkliničkoj studiji, Burnette i saradnici su pokazali da efikasnost radioterapije u velikoj meri zavisi od indukcije interferon zavisnog urođenog i stečenog imuniteta (304). Ovaj efekat je posredovan CD8⁺ T limfocitima, jer uklanjanje CD8⁺ T limfocita drastično smanjuje efikasnost tretmana, dok prisustvo CD4⁺ T limfocita nije uticalo na rast tumora (303). Stoga, upotreba imunoterapije koja podstiče aktivaciju T limfocita u kombinaciji sa hemio i radioterapijom može biti korisna kod pacijenata sa niskom CD8 ekspresijom u uzorcima biopsije uzete pre terapije, kako bi se poboljšao ishod terapije.

Ukratko, bioaktivne komponente bele imele imaju potencijal da poboljšaju kvalitet života, ali ne pružaju efikasnu zaštitu populaciji limfocita koji čine važne komponente antitumorske zaštite od delovanja citotoksičnih agenasa, što može da ukaže da status pojedinih populacija ćelija imunskog sistema u perifernoj krvi ne mora da reflektuje stanje u samom tumoru i da je delovanje na populacije koje infiltriraju sam tumor i posledični efekti nedostajuća karika. Po prvi put je pokazano da VA ekstrakt može senzibilisati *Bcr-Abl* pozitivne K562 ćelije, kao i MCF7 ćelije na apoptozu pri senescentnim, subapoptotskim koncentracijama Dox. To nadalje znači da ukoliko se VA ekstrakt koristi kao komplementarna preoperativna terapija, moguće je pri znatno nižim, manje toksičnim koncentracijama hemioterapeutika postići željeni efekat na tumorske ćelije. Takođe, je po prvi put pokazana sposobnost ispitivanog ekstrakta da moduliše heterotipsku interakciju aktiviranih trombocita sa monocitima u *in vitro* uslovima kao ključnog događaja u patogenezi ateroskleroze, a samim tim i mogućnost prevencije dodatnih vaskularnih komplikacija tumorom posredovane aktivacije trombocita, ali i heterotipsku agregaciju sa drugim ćelijama, takođe posredovanu P-selektinom, uključujući interakciju aktiviranih

trombocita sa malignim ćelijama i potencijalni uticaj na njihovu sekvestraciju, interakciju sa endotelnim ćelijama i uticaj na ekstravazaciju sekvestriranih malignih ćelija, kao i delovanje na aktivaciju trombocita i oslobađanje faktora rasta značajnih za proces angiogeneze. Uzimajući u obzir stimulatorno delovanje VA ekstrakta na monocite i makrofage i time potenciranje njihovog antitumorskog potencijala, smanjenje agregacije monocita sa trombocitima delovanjem direktno na trombocite predstavlja regulatorni protektivni mehanizam u sklopu plejotropnog antitumorskog potencijala ispitivane biljke. Naši *in vitro* i *in vivo* rezultati ukazuju na to da bi bilo neophodno izeminiti dizajn studija koje ispituju efekte bele imele i to pre svega u pogledu načina tretiranja pacijenata. To bi podrazumevalo primenu neoadjuvantne i adjuvantne terapije preparatima bele imele. Odnosno, preoperativno u cilju povećanja citotoksičnog dejstva standardnih hemioterapeutika, pri njihovim nižim koncentracijama, što bi ujedno smanjilo njihovu toksičnost i postoperativno kao komplementranu terapiju hemio i radioterapiji, a sve u cilju smanjenja incidence pojave metastaza, u pogledu pronalaženja optimalne doze, kao i u pogledu odabira adekvatnih ciljnih molekula koji bi bili pouzdani pokazatelji terapijskog odgovora.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, a na osnovu iznetih rezultata mogu se formulirati sledeći zaključci:

1. Ekstrakt bele imele ispoljava dozno zavisnu citotoksičnu aktivnost i antiproliferativni efekat na ćelijske linije karcinoma dojke (MDA-MB-231 i MCF7), hronične mijeloidne leukemije (K562) i akutne T ćelijske leukemije (Jurkat), dok efekat nije ispoljen prema ćelijskoj liniji karcinoma debelog creva (T84).
2. Ekstrakt bele imele ispoljava selektivan citotoksičan efekat prema K562 i MCF7 tumorskim ćelijama u poređenju sa mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih osoba.
3. Ekstrakt bele imele dovodi do povećanja procenta tumorskih ćelija u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa. Eliminira zastoj u G_2/M fazi ciklusa indukovano primenom doksorubicina. Istovremeno povećava broj tumorskih ćelija koje sadrže hipodiploidan DNK sadržaj.
4. Ekstrakt bele imele značajno smanjuje procenat ciklin B1 i ciklin D1 pozitivnih ćelija, što korelira sa eliminacijom G_2/M zastoja i povećanjem procenta tumorskih ćelija u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa.
5. Smanjenje ekspresije ciklina D1 i značajno povećanje nivoa genske ekspresije $p21^{WAF1}$ u tumorskim ćelijama, indukovano ekstraktom bele imele, ukazuje da ispitivani ekstrakt dovodi do zastoja u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa.
6. Ekstrakt bele imele u prisustvu subapoptotske koncentracije doksorubicina uvodi tumorske ćelije u ranu apoptozu, regulisanu proteinima Bcl-2 familije.
7. Ekstrakt bele imele, sam i u kombinaciji sa doksorubicinom, ispoljava citotoksični efekat modulacijom signalnih kaskada unutrašnjeg mitohondrijskog apoptotičkog puta.

8. Kombinovani tretman tumorskih ćelija, ekstraktom bele imele i doksorubicinom, dovodi do povećane aktivacije egzekutorske kaspaze, što korelira sa smanjenom proteinskom ekspresijom p21^{WAF1}. Inverzni odnos sugerise da egzekutorska kaspaza degradira protein p21^{WAF1}, čime se postiže prevođenje tumorskih ćelija iz senescentnog stanja u stanje apoptoze.
9. Ekstrakt bele imele u koncentraciji znatno nižoj od toksične, ispoljava svoj citoprotektivni efekat na populaciju limfocita. Količina doksorubicina koja je ušla u limfocite pri kombinovanom tretmanu znatno je niža u odnosu na količinu doksorubicina koja je ušla u tumorske ćelije. Istovremena primena ekstrakta bele imele i doksorubicina smanjuje ulazak doksorubicina u limfocite i u obe tumorske ćelijske linije, ali ne utiče značajno na njegov izlazak iz ćelija.
10. Ekstrakt bele imele dovodi do smanjenja ekspresije P-selektina, a ne utiče na ekspresiju GPIIbIIIa. Istovremeno dovodi i do smanjenja heterotipske agregacije trombocita i monocita posredovane P-selektinom.
11. Ekstrakt bele imele stimuliše dozno zavisno oslobađanje TNF- α iz proinflamatornih M1 makrofaga. Aktivacija monocita/makrofaga je selektivna i ograničena na stimulaciju oslobađanja TNF- α , što ukazuje da ekstrakt bele imele ima TNF- α posredovano antitumorsko dejstvo, pri čemu ne dovodi do nespecifične aktivacije monocita.
12. Komplementarna terapija komercijalnim preparatom bele imele kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke dovela je do poboljšanja kvaliteta života, ali nije imala efekta na broj neutrofila i limfocita periferne krvi, niti na aktivaciju T limfocita.

7. LITERATURA

1. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005; 205(2):275–292.
2. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* 2012; 72(19): 4875–4882.
3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev Cancer.* 2002; 2:48–58.
4. Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene.* 2003; 22(47):7512–7523.
5. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004; 23:2950–2966.
6. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature.* 2004; 432(7015):307–315.
7. Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenom.* 2005; 5(4):223–232.
8. Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-XL and Bax by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(1):18–23.
9. Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell.* 2005; 7(1):17–23.
10. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Rev Cancer.* 2012; 12(11):767–775.
11. Blaylock RL. Cancer microenvironment, inflammation and cancer stem cells: A hypothesis for a paradigm change and new targets in cancer control. *Surg Neurol Int.* 2015; 6:92.
12. <http://www.rxlist.com/adriamycin-pfs-drug.htm>
13. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013; 65(2):157–70.
14. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol.* 1994; 45(4):649–56.
15. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology.* 2010; 17(5):421–33.
16. Barrett-Lee PJ, Dixon JM, Farrell C, Jones A, Leonard R, Murray N, et al. Expert opinion on the use of anthracyclines in patients with advanced breast cancer at cardiac risk. *Ann Oncol.* 2009; 20(5):816–827.
17. Conway A, McCarthy AL, Lawrence P, Clark RA. The prevention, detection and management of cancer treatment-induced cardiotoxicity: a meta-review. *BMC Cancer.* 2015; 15(1):366.

18. Kanu C, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology*. 2010; 115 (2): 155–162.
19. Kierszenbaum A. *Histology and Cell Biology - An Introduction to Pathology*. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2012.
20. Zunino F, Perego P, Pilotti S, Pratesi G, Supino R, Arcamone F. Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. *Pharmacol Ther*. 1997; 76(1-3): 177-85.
21. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407(6805):770-6.
22. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998; 281(5381):1312-6.
23. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516.
24. Cör A, Pizem J, Gale N. Immunohistochemical analysis of pro- and active-caspase 3 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2004; 444(5):439-46.
25. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 1993; 362(6423):849-52.
26. Komarova EA, Gudkov AV. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2001; 62(6):657-67.
27. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med*. 2000; 108(7):567-74.
28. Labar B. Molekularna genetika-budućnost onkologije. *Medicus*. 2001; 10:141-5.
29. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91(4):479-89.
30. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(4):245-60.
31. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001; 410(6828):549-54.
32. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem*. 2001; 276(51):48404-9.
33. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 2000; 192(4): 571-80.
34. Castedo M, Ferri K, Roumier T, Métivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods*. 2002; 265(1-2):39-47.
35. Qi R, Liu XY. New advance in caspase-independent programmed cell death and its potential in cancer therapy. *Int J Biomed Sci*. 2006; 2(3):211-6.
36. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene*. 2004; 23(16):2766-73.
37. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia. In: Robbins and Cortain. *Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005; 269-343.
38. Mashima T, Tsuruo T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. *Drug Resist Updat*. 2005; 8(6):339-43.

39. Lowe SW and Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; 21:485–495.
40. Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem*. 1995; 270(7):3255-60.
41. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998; 9(2):267-76.
42. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Dec; 93(25):14559-63.
43. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:685-705.
44. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(6):354–9.
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646–74.
46. Balducci L, Ersler WB. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(8):655–62.
47. Campisi J, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(9):729–40.
48. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(20):9363–67.
49. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Investig*. 2004; 51(3-4):146–53.
50. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell non-autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008; 6(12):2853–68.
51. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(21):12072–77.
52. Gilbert LA, Hemann MT. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell*. 2010; 143 (3):355–66.
53. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002; 8(11):1227-34.
54. Nierodzik MN, Karpatkin S. Tumor growth and metastasis. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2007.
55. Bergmeier W, Wagner DD. Inflammation. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2007.
56. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cellular Immunology*. 2005; 238(1):1-9.
57. Li Q-X, Masters CL. Alzheimer’s disease. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2007.
58. Gurguis GNM. Psychiatric disorders. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2007.

59. Hartley PS. Platelet senescence and death. *Clin Lab*. 2007; 53(3-4):157-66.
60. White JG. Platelet structure. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2007.
61. Reed GL. Platelet secretion In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2007.
62. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
63. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *The Lancet Oncology*. 2002; 3(7):425-30.
64. Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res*. 1993; 53(6):1322-7.
65. Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282(3):671-7.
66. Negrao R, Duarte D, Costa R, Soares R. Could platelet-accumulating polyphenols prevent tumour metastasis? *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(9):685.
67. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6):883–99.
68. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646–74.
69. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007; 450(7171):903–7.
70. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141(1):39–51.
71. Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc γ receptors. *J Immunol*. 2001; 166(11):6861–6868.
72. Mantovani A. From phagocyte diversity and activation to probiotics: back to Metchnikoff. *Eur J Immunol*. 2008; 38(12):3269–3273.
73. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(7):533–544.
74. Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(2):652–656.
75. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol*. 2008; 84(3):623–630.
76. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN, Pollard JW. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res*. 2006; 66(23):11238–11246.
77. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(2):231–237.
78. Mantovani A, Garlanda C, Allavena P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. *Ann Med*. 2010; 42(3):161–170.
79. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12(4):253–268.

80. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141(1):52–67.
81. Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(6):427–435.
82. Mason SD, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol*. 2011; 21(4):228–237.
83. Vasiljeva O, Papazoglou A, Kruger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, Augustin N, et al. Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res*. 2006; 66(10):5242–5250.
84. Heuff G, Oldenburg HS, Boutkan H, Visser JJ, Beelen RH, van Rooijen N, Dijkstra CD, Meyer S. Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunol. Immunother*. 1993; 37(2):125–130.
85. Greten FR, Karin M. The IKK/NF- κ B activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*. 2004; 206(2):193–199.
86. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001; 23(10):912–923.
87. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):442–454.
88. Lin CY, Lin CJ, Chen KH, Wu JC, Huang SH, Wang SM. Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherens junction. *FEBS Lett*. 2006; 580(13):3042–3050.
89. Becker H. Botany of European mistletoe (*Viscum album* L.). *Oncology*. 1986; 43(1):2–7.
90. Overstolz A. Mistletoe in cancer treatment. *Ganzheits Medizin*. 1998; 10(7/8):352-6.
91. <http://www.circuitblue.com/mistletoe/>
92. Büssing A. Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L. *Apoptosis*. 1996; 1(1):25-32.
93. Franz H: Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology*. 1986; 43(1):23-34.
94. Büssing, Vervecken W, Wagner M, Wagner B, Pfüller U, Schietzel M. Expression of mitochondrial Apo2. 7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry*. 1999; 37(2):133-139.
95. Romagnoli S, Ugolini R, Fogolari F, Schaller G, Urech K, Giannattasio M, Ragona L, Molinari H. NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. *Biochemical Journal*. 2000; 350(2):569-77.
96. Meyer A, Rypniewski W, Szymański M, Voelter W, Barciszewski J, Betzel C. Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(11):1590-5.
97. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, Abdul Majid FA, Jaganathan SK. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:785479
98. Stein GM. Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer research*. 1999; 19(2A):1037-1042.

99. Stein GM, Schaller G, Pfüller U, Wagner M, Wagner B, Schietzel M, Büssing A. Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat; *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 1426(1):80-90.
100. Jordan E, Wagner H: Structure and Properties of Polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology*. 1986; 43(1):8-15.
101. Jäger S, Winkler K, Pfüller U, Scheffler A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Medica*. 2007; 73(2):157–162.
102. Delebinski C, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ. A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif*. 2012; 45(2):176-87.
103. Walker J. The protein protocols handbook. 2nd ed. Humana Press, New Jersey, USA. 2002.
104. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(3):609-14.
105. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(10):3010-4.
106. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*. 1991; 145(1-2):199-203.
107. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology*. 1975; 66(1):188–193.
108. Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelt B, Traganos F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*. 1996; 25(1):1-13.
109. Friesen C, Roscher M, Hormann I, Fichtner I, Alt A, Hilger RA, Debatin KM, Miltner E. Cell death sensitization of leukemia cells by opioid receptor activation. *Oncotarget*. 2013; 4(5): 677–690.
110. Ludovico P, Sansonetty F, Côte-Real M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*. 2001; 147(12):3335-43
111. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(20): 9363–9367.
112. <http://www.RnDSYSTEMS.com/go/HumanMethylcelluloseProtocol>
113. Krueger LA, Barnard MR, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD. Immunophenotypic analysis of platelets. *Curr Protoc Cytom*. 2002; Ch 6:Unit 6.10.
114. Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD. Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. *Curr Protoc Cytom*. 2003; Ch 6:Unit 6.15.
115. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273(2):565-70.

116. Frelinger AL 3rd, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, Michelson AD. Residual arachidonic acid–induced platelet activation via an adenosine diphosphate–dependent but cyclooxygenase-1– and cyclooxygenase-2–independent pathway. *Circulation*. 2006; 113(25): 2888-96.
117. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 104(13):1533-7.
118. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, and Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leuko Biol*. 1996; 59(4):555-561.
119. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Plos One*. 2010; 5:8668.
120. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol*. 2003; 65(10):1575-82.
121. Blagosklonny MV, Fojo T, Bhalla KN, Kim JS, Trepel JB, Figg, Rivera Y, Neckers LM. The Hsp90 inhibitor geldanamycin selectively sensitizes Bcr-Abl-expressing leukemia cells to cytotoxic chemotherapy. *Leukemia*. 2001; 15(10):1537-1543.
122. Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, Bhalla KN. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood*. 2000; 96:2246-2253.
123. Rebbaa A, Zheng X, Chu F, Mirkin BL. The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2006; 13(11): 1960-7.
124. Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*. 2003; 22(18):2805-11.
125. Samani AA, Chevet E, Fallavollita L, Galipeau J, Brodt P. Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cells expressing the extracellular domain of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res*. 2004; 64(10):3380-5.
126. Huang Z, Fang Z, Zhen H, Zhou L, Amin HM, Shi P. Inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase by picropodophyllin induces apoptosis and cell cycle arrest in T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55(8):1876-83.
127. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000; 113(Pt20):3613-3622.
128. Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(5):1474-80.
129. Jänicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 117(1):219–221.

130. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(1):46-54.
131. Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*. 2005; 7(1):17–23.
132. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273(2):565-70.
133. Estko M, Baumgartner S, Urech K, Kunz M, Regueiro U, Heusser P, Weissenstein U. Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:130.
134. Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HF, Wichers HJ. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct*. 2013; 4(2):266-76.
135. Goldie JH. Modelling the process of drug resistance. *Lung Cancer*. 1994;10(1):91-6.
136. Harrison DJ. Molecular mechanisms of drug resistance in tumours. *J Pathol*. 1995; 175(1):7–12.
137. Hampson R. Selection for genome instability by DNA damage in human cells: unstable microsatellites and their consequences for tumorigenesis. *Radiat Oncol Investig*. 1997; 5(3):111-114.
138. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1994; 9(7):1829–1838.
139. Chen Q, Chen K, Guo G, Li F, Chen C, Wang S, Nalepa G et al. A critical role of CDKN3 in Bcr-Abl-mediated tumorigenesis. *PLoS One*. 2014; 9(10):e111611.
140. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*. 1995; 86(3):1148–58.
141. Nishii K, Kabarowski JH, Gibbons DL, Griffiths SD, Titley I, Wiedemann LM, Greaves MF. BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene*. 1996; 13(10):2225–2234.
142. Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 1998; 16(11):1383–1390.
143. Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, Bhalla K. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome c and activation of caspase-3. *Blood*. 1998; 91(5):1700–1705.
144. Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, Ichikawa M, Saito T, Uozumi K et al. Expression of multidrug transport, P-glycoprotein, in chronic myelogenous leukemia cells in blastcrisis. *Br J Haematol*. 1990; 74(1):24–29.
145. Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene*. 2002; 21(56):8591-604.
146. Klopp R, Schmidt W, Werner E, Werner M, Niemer W, Beuth J. Influence of complementary *Viscum album* (Iscador) administration on microcirculation and

- immune system of ear, nose and throat carcinoma patients treated with radiation and chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005; 25(1B): 601–610.
147. Augustin M, Bock PR, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to highrisk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album L.*) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung.* 2005; 55(1):38–49.
 148. Bussing A, Bischof M, Hatzmann W, Bartsch F, Soto-Vera D, Fronk EM, et al. Prevention of surgery-induced suppression of granulocyte function by intravenous application of a fermented extract from *Viscum album L.* in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2005; 25(6C):4753–4757.
 149. Kienle GS, Kiene H. Review article: Influence of *Viscum album L.* (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integr Cancer Ther.* 2010; 9(2):142–157.
 150. Tröger W, Jezdić S, Zdrale Z, Tišma N, Hamre HJ, Matijašević M. Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone. *Breast Cancer (Auckl).* 2009; 3:35-45.
 151. Tröger W, Zdrale Z, Tišma N, Matijašević M. Additional Therapy with a Mistletoe Product during Adjuvant Chemotherapy of Breast Cancer Patients Improves Quality of Life: An Open Randomized Clinical Pilot Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014; 2014:430518.
 152. Tröger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stanković N, Milićević M. Quality of life of patients with advanced pancreatic cancer during treatment with mistletoe. *Dtsch Arztebl Int.* 2014; 111(29-30):493-502.
 153. Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Mürdter TE. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res.* 2001; 21(4A):2687–2691.
 154. Galm O, Fabry U, Efferth T, Osieka R. Synergism between rViscumin and cisplatin is not dependent on ERCC-1 expression. *Cancer Lett.* 2002; 187(1-2):143–151.
 155. Rathos MJ, Khanwalkar H, Joshi K, Manohar SM, Joshi KS. Potentiation of in vitro and in vivo antitumor efficacy of doxorubicin by cyclin-dependent kinase inhibitor P276-00 in human non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer.* 2013; 13:29.
 156. Kim HS, Lee YS, Kim DK. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and Fas-mediated cell death. *Pharmacology.* 2009; 84(5):300-9.
 157. Vijayaraghavalu S, Dermawan JK, Cheriya V, Labhasetwar V. Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest. *Mol Pharm.* 2013; 10(1):337-52.
 158. Johnson BW, Ceper E, Boise LH. Bcl-xL inhibits cytochrome c release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem.* 2000; 275(40):31546–31553.
 159. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(8):3668–3672.

160. Wolter KG, Hsu Y, Smith CL, Nechushtan A, Xi X, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1281–92.
161. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 1998; 391(6666):496–499.
162. Juergensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(9):4997–5002.
163. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Anticancer Res.* 1998; 281(5381):1309–1312.
164. Petit PX, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B, Kroemer G, Castedo M. Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 174(1-2):185–188.
165. Saleh SM, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999; 274(25):17941–17945.
166. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1997; 399(6735):483–487.
167. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Juergensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prévost MC, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 1998; 281(5385):2027–2031.
168. Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A - associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature.* 1990; 346(6286):760–763.
169. Innocente SA, Abrahamson JLA, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96(5):2147–2152.
170. Halloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell.* 1993; 73(7):1393–1402.
171. Dan S, Yamori T. Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells. *Bioch Biophys Res Commun.* 2001; 280(3):861-7.
172. Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, Muleti A et al. Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. *Endocr Relat Cancer.* 2008; 15(2):623–634.
173. Smeets MF, Mooren EH, Begg AC. The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother Oncol.* 1994; 33(3):217-27.
174. Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 2008; 10:e19.
175. Harper J W, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S et al. Inhibition of cyclin dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell.* 1995; 6(4):387–400.

176. Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell*. 1993; 4(9):897–906.
177. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*. 1994; 76(6):1013–1023.
178. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21^{CIP1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*. 1995; 82(4):675–684.
179. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 1995; 377(6549):552–557.
180. Niculescu AR, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21^{Cip1/Waf1} at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(1):629–643.
181. Ogryzko VV, Wong P, Howard, BH. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(8):4877–4882.
182. Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif*. 2000; 33(5):261–74.
183. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 1998; 35(6):461–78.
184. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001; 20:1803–15.
185. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*. 2007; 28(1):20–47.
186. Baserga R, Sell C, Porcu P, Rubini M. The role of the IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Prolif*. 1994; 27(2):63–71.
187. Lopez T, Hanahan D. Elevated levels of the IGF-I receptor convey invasion and pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2002; 1(4):339–53.
188. Mauro L, Bartucci M, Morelli C, Andò S, Surmacz E. IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. *J Biol Chem*. 2001; 276(43):39892–7.
189. van Golen CM, Schwab TS, Kim B, Soules ME, Su Oh S, Fung K, van Golen KL, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I receptor expression regulates neuroblastoma metastasis to bone. *Cancer Res*. 2006; 66(13):6570–8.
190. Shi P, Chandra J, Sun X, Gergely M, Cortes JE, Garcia-Manero G, Arlinghaus RB et al. Inhibition of IGF-IR tyrosine kinase induces apoptosis and cell cycle arrest in imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia cells. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(6B):1777–1792.
191. Gasic GJ. Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metast Rev*. 1984; 3:99–114.
192. Gasic GJ, Boettiger D, Catalfamo JL, Gasic TB, Stewart GJ. Aggregation of platelets and cell membrane vesiculation by rat cells transformed *in vitro* by Rous sarcoma virus. *Cancer Res*. 1978; 38(9):2950–2955.

193. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968; 61(1):46–52.
194. Gasic GJ, Koch PA, Hsu B, Gasic TB, Neiwiarowski S. Thrombogenic activity of mouse and human tumors: effects on platelets, coagulation, and fibrinolysis, and possible significance for metastases. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*. 1976; 86(3):263–277.
195. Karpatkin S, Pearlstein E. Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann Intern Med*. 1981; 95(5):636-41.
196. Pearlstein E, Ambrogio C, Gasic G, Karpatkin S. Inhibition of the platelet-aggregating activity of two human adenocarcinomas of the colon and an anaplastic murine tumor with a specific thrombin inhibitor, dansylarginine N-(3-ethyl-1,5-pentanediy) amide. *Cancer Res*. 1981; 41(11Pt1):4535-9.
197. Radomski MW, Jenkins DC, Holms L, Moncada S. Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res*. 1991; 51(22):6073–6078.
198. Philippe C, Philippe B, Fouqueray B, Perez J, Lebret M, Baud L. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. *Am J Pathol*. 1993; 143(6):1713-23.
199. Shau H, Roth MD, Golub SH. Regulation of natural killer function by nonlymphoid cells. *Nat Immun*. 1993; 12(4-5):235-49.
200. Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res*. 2001; 102(6):V215-24.
201. Honn KV, Tang DG, Chen YQ. Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon. *Semin Thromb Hemost*. 1992b; 18(4):392-415.
202. Honn KV, Tang D. Hemostasis and malignancy: an overview. *Cancer Metastasis Rev*. 1992; 11(3-4):223-6.
203. Heinmöller E, Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, Müller KM, Zirngibl H. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996; 122(12):735-44.
204. Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Penin F, Tabone E, Lizard G, Bailly M, McGregor JL. Human melanoma cell lines differ in their capacity to release ADP and aggregate platelets. *Br J Haematol*. 1994; 87(4):763-72.
205. Alonso-Escolano D, Strongin AY, Chung AW, Deryugina EI, Radomski MW. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br J Pharmacol*. 2004; 141(2):241-52.
206. Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature*. 1976; 261(5561):558-60.
207. Grignani G, Pacchiarini L, Almasio P, Pagliarino M, Gamba G, Rizzo SC, Ascari E. Characterization of the platelet-aggregating activity of cancer cells with different metastatic potential. *Int J Cancer*. 1986; 38(2):237-44.
208. Grignani G, Pacchiarini L, Ricetti MM, Dionigi P, Jemos V, Zucchella M, Fratino P. Mechanisms of platelet activation by cultured human cancer cells and cells freshly isolated from tumor tissues. *Invasion Metastasis*. 1989; 9(5):298-309.

209. Pacchiarini L, Zucchella M, Milanese G, Tacconi F, Bonomi E, Canevari A, Grignani G. Thromboxane production by platelets during tumor cell-induced platelet activation. *Invasion Metast.* 1991; 11(2):102–109.
210. Tyanakakis GN, Krambovitis E, Tsatsakis AM, Vezeridis MP. The preventive effect of ketoconazole on experimental metastasis from a human pancreatic carcinoma may be related to its effect on prostaglandin synthesis. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002; 32(1):23–30.
211. De Leval X, Benoit V, Delagre J, Julemont F, Masereel B, Pirotte B, Merville MP, David JL, Dogne JM. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 68(1):55–59.
212. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* 1999; 103(6): 879–887.
213. Chung AW, Jurasz P, Hollenberg MD, Radomski, MW. Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(5):1123–1132.
214. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000; 407(6801):258–264.
215. Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Jamieson GA. Morphometric evaluation of thrombogenesis by microvesicles from human tumor cell lines with thrombin-dependent (U87MG) and adenosine diphosphate-dependent (SKNMC) platelet-activating mechanisms. *J Lab Clin Med.* 1986; 108(6):622–627.
216. Esumi N, Todo S, Imashuku S. Platelet aggregating activity mediated by thrombin generation in the NCG human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 1987; 47(8):2129–2135.
217. Heinmoller E, Schropp T, Kisker O, Simon B, Seitz R, Weinel RJ. Tumor cell-induced platelet aggregation in vitro by human pancreatic cancer cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 1995; 30(10): 1008–1016.
218. Jurasz P, Sawicki G, Duszyk M, Sawicka J, Miranda C, Mayers I, Radomski MW. Matrix metalloproteinase 2 in tumor cell-induced platelet aggregation: regulation by nitric oxide. *Cancer Res.* 2001; 61(1):376–382.
219. Jurasz P, Stewart MW, Radomski A, Khadour F, Duszyk M, Radomski MW. Role of von Willebrand factor in tumour cell-induced platelet aggregation: differential regulation by NO and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(5):1104–1112.
220. Jurasz P, North S, Venner P, Radomski MW. Matrix metalloproteinase-2 contributes to increased platelet reactivity in patients with metastatic prostate cancer: a preliminary study. *Thromb Res.* 2003; 112(1-2): 59–64.
221. Oleksowicz L, Dutcher JP. Adhesive receptors expressed by tumor cells and platelets: novel targets for therapeutic anti-metastatic strategies. *Med Oncol.* 1995; 12(2): 95–102.
222. Oleksowicz L, Mrowiec Z, Schwartz E, Khorshidi M, Dutcher JP, Puszkin E. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. *Thromb Res.* 1995; 79(3):261–274.

223. Karpatkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, Collier BS. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest.* 1988; 81(4):1012–1019.
224. Clezardin P, Drouin J, Morel-Kopp MC, Hanss M, Kehrel B, Serre CM, Kaplan C, Delmas PD. Role of platelet membrane glycoproteins Ib/IX and IIb/IIIa, and of platelet alpha-granule proteins in platelet aggregation induced by human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 1993; 53(19):4695–700.
225. Chopra H, Hatfield JS, Chang YS, Grossi IM, Fitzgerald LA, O’Gara CY, Marnett LJ et al. Role of tumor cytoskeleton and membrane glycoprotein IRGpIIb/IIIa in platelet adhesion to tumor cell membrane and tumor cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res.* 1988; 48(13):3787–3800.
226. Grossi IM, Hatfield JS, Fitzgerald LA, Newcombe M, Taylor JD, Honn KV. Role of tumor cell glycoproteins immunologically related to glycoproteins Ib and IIb/IIIa in tumor cell-platelet and tumor cell–matrix interactions. *FASEB J.* 1988;2(8):2385-95.
227. Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Bailly M, Dore JF, Leung LL, Mcgregor JL. A monoclonal antibody (LYP18) directed against the blood platelet glycoprotein IIb/IIIa complex inhibits human melanoma growth in vivo. *Blood.*1989;74(3):909-12.
228. Honn KV, Chen YQ, Timar J, Onoda JM, Hatfield JS, Fligiel SE, Steinert BW et al. Alpha IIb beta 3 integrin expression and function in subpopulations of murine tumors. *Exp Cell Res.* 1992; 201(1):23–32.
229. Cohen SA, Trikha M, Mascelli MA. Potential future clinical applications for the GPIIb/IIIa antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indications. *Pathol Oncol Res.* 2000; 6(3):163–174.
230. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Blaydes S, Desai H, Meyer T, Francis JL. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Throm Haemost.* 2003; 90(3):549–554.
231. Trikha M, Zhou Z, Timar J, Raso E, Kennel M, Emmell E, Nakada MT. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and avb3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 2002; 62(10):2824–2833.
232. Felding-Habermann B, O’Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(4):1853–1858.
233. Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A. Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol.* 1999; 155(2):461–472.
234. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(16):9325–9330.
235. Iwamura T, Caffrey TC, Kitamura N, Yamanari H, Setoguchi T, Hollingsworth MA. P-selectin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line (SUIT-2). *Cancer Res.* 1997; 57(6):1206–1212.
236. Pottratz ST, Hall TD, Scribner WM, Jayaram HN, Natrajan V. P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996; 271(6Pt1):L918–L923.
237. Stone JP, Wagner DD. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J Clin Invest.* 1993; 92(2):804–813.

238. Varki A, Varki NM. P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(6):711–717.
239. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin–mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 2003; 112(6):853–862.
240. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976; 263(5579):663–665.
241. Honn KV, Bockman RS, Marnett LJ. Prostaglandins and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis. *Prostaglandins.* 1981; 21(5):833–864.
242. Honn KV, Cavanaugh P, Evens C, Taylor JD, Sloane BF. Tumor cell-platelet aggregation: induced by cathepsin B-like proteinase and inhibited by prostacyclin. *Science.* 1982; 217(4559):540–542.
243. Honn KV, Meyer J. Thromboxanes and prostacyclin: positive and negative modulators of tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;102(4):1122–29.
244. Lerner WA, Pearlstein E, Ambrogio C, Karpatkin S. A new mechanism for tumor induced platelet aggregation. Comparison with mechanisms shared by other tumor with possible pharmacologic strategy toward prevention of metastases. *Int J Cancer.* 1983; 31(4):463–469.
245. Longenecker GL, Beyers BJ, Bowen RJ, King T. Human rhabdosarcoma cell-induced aggregation of blood platelets. *Cancer Res.* 1989; 49(1):16–19.
246. Menter DG, Harkins C, Onoda J, Riorden W, Sloane BF, Taylor JD, Honn KV. Inhibition of tumor cell induced platelet aggregation by prostacyclin and carbacyclin: an ultrastructural study. *Invasion Metast.* 1987; 7(2):109–128.
247. Menter DG, Onoda JM, Moilanen D, Sloane BF, Taylor JD, Honn KV. Inhibition by prostacyclin of the tumor cell-induced platelet release reaction and platelet aggregation. *J Natl Cancer Inst.* 1987; 78(5):961–969.
248. Menter DG, Onoda JM, Taylor JD, Honn KV. Effects of prostacyclin on tumor cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res.* 1984; 44(2):450–456.
249. Jurasz P, Radomski A, Sawicki G, Mayers I, Radomski MW. Nitric oxide and platelet function. In: *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*, ed Ignarro LJ San Diego/San Francisco/New York/Boston/Sydney/Tokyo: Academic Press. 2000; pp823-840.
250. Schirner M, Schneider MR. The prostacyclin analogue cicaprost inhibits metastasis of tumours of R 3327 MAT Lu prostate carcinoma and SMT 2A mammary carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1992; 118(7):497–501.
251. Schneider MR, Schillinger E, Schirner M, Skuballa W, Sturyebecher S, Witt W. Effects of prostacyclin analogues in in vivo tumor models. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1991; 21B:901–908.
252. Teras LR, Gapstur SM, Patel AV, Thun MJ, Diver WR, Zhai Y, Jacobs EJ. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 22(3):422-8.

253. Yu HG, Huang JA, Yang YN, Huang H, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, et al. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32(11):838-46.
254. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917):860–7.
255. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *TheScientific World Journal.* 2011; 11:2391-402.
256. Bogels M, Braster R, Nijland PG, Gul N, van de Lijstgaarden W, Fijneman RJ et al. Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *Onco Immunol.* 2012; 1(6):798–809.
257. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008; 180(4):2011–7.
258. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014; 2014:149185.
259. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5):1175–83.
260. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006; 66(2):605–12.
261. Estko M, Baumgartner S, Urech K, Kunz M, Regueiro U, Heusser P, Weissenstein U. Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15(1):130.
262. Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5): 1130–1136.
263. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy–revisited. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(8):591–600.
264. Kienle GS, Glockmann A, Schink M, Kiene H. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28:79.
265. Huber R, Klein R, Berg PA, Lüdtkke R, Werner M. Effect of a lectin- and viscotoxin-rich mistletoe preparation on clinical and hematologic parameters: a placebo-controlled evaluation in healthy subjects. *J Altern Complem Med.* 2002; 8(6):857–866.
266. Kovacs E, Hajto T, Hostanska K. Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador). *Eur J Cancer.* 1991;27(12):1672-6.
267. Kirsch A. Successful treatment of metastatic malignant melanoma with *Viscum album* extract (Iscador M). *Journal of Alternative and Complementary Medicine.* 2007; 13(4):443–445.
268. Gardin NE. Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series. *Phytother Res.* 2009; 23(3):407-11.
269. Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, Gaston AT, Michel O, Bruneval P, Kazatchkine MD, Nicoletti A, Kaveri SV: Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum*

- album: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med.* 2002; 8(10):600-606.
270. Park WB, Lyu SY, Kim JH, Choi SH, Chung HK, Ahn SH, Hong SY, Yoon TJ, Choi MJ: Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001; 16(5):439-447.
271. Kienle GS, Grugel R, Kiene H: Safety of higher dosages of *Viscum album* L. in animals and humans - systematic review of immune changes and safety parameters. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11:72.
272. Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U. Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *Br J Cancer.* 2008; 98(1):106-12.
273. Hajtó T, Fodor K, Perjési P, Németh P. Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011:298972.
274. Gilles Ribereau-Gayon, Jung ML, Di Scala D, Beck JP. Comparison of the Effects of Fermented and Unfermented Mistletoe Preparations on Cultured Tumor Cells. *Oncology.* 1986; 43(1):35-41.
275. Piao BK, Wang YX, Xie GR, Mansmann U, Matthes H, Beuth J, Lin HS. Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial. *Anticancer Res.* 2004; 24(1):303-9.
276. Mohsen Marvibaigi, Supriyanto E, Amini N, Abdul Majid FA, Jaganathan SK. Preclinical and Clinical Effects of Mistletoe against Breast Cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:785479.
277. Eisenbraun J, Scheer R, Kröz M, Schad F, Huber R. Quality of life in breast cancer patients during chemotherapy and concurrent therapy with a mistletoe extract. *Phytomedicine.* 2011; 18(2-3):151-7.
278. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2008; (2):CD003297.
279. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde C, van Krieken JH. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect. A histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer.* 2001; 1:7-16.
280. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today.* 1993; 14(10):491-9.
281. Baskic D, Acimovic L, Samardzic G, Vujanovic NL, Arsenijevic NN. Blood monocytes and tumor-associated macrophages in human cancer: differences in activation levels. *Neoplasma.* 2001; 48(3):169-174.
282. Mantovani A. Inflammation and cancer: the macrophage connection. *Medicina.* 2007; 67(2):32-34.
283. Sanchez-Torres C, Garcia-Romo GS, Cornejo-Cortes MA, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate

- in vitro* to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *International Immunology*. 2001; 13(12):1571–1581.
284. Terabe M, Berzofsky JA. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Advances in Cancer Research*. 2008; 101:277–348.
 285. Elluru S, van Huyen JPD, Wootla B, Delignat S, Prost F, Negi VS, Kaveri SV. Tumor regressive effects of *Viscum album* preparations. Exploration of immunomodulatory mechanisms. *Medicina*. 2007; 67(2):85–89.
 286. Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the b-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. *Cancer Research*. 1990; 49(17):4803–4808.
 287. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf K, Gabius HJ. Increased secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 by human mononuclear cells exposed to β -galactoside-specific mistletoe lectin. *Cancer Research*. 1990; 50(11):3322–3326.
 288. Hajto T, Hostanska K, Weber K, Zinke H, Fischer J, Mengs U, Lentzen H Saller R. Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin (rVAA) on secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes *in vitro* and *in vivo*. *Nature Immunology*. 1998; 16(1):34–46.
 289. Hajto T, Hostanska K, Berki T, Boldizsar F, Nemeth P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2005; 2(1):59–67.
 290. Chaudhuri D, Suriano R, Mittelman A, Tiwari RK. Targeting the immune system in cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2009; 10(2):166–184.
 291. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Rödel F, Rödel C, Fokas E. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2014; 110(2):501-9.
 292. Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G. Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(11 Pt1):3355-60.
 293. Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyengaard JR, Nielsen K. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer*. 2007;97(8):1135-8.
 294. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(1):105-13.
 295. Ducray F, De Reynies A, Chinot O, Idbaih A, Figarella-Branger D, Colin C, Karayan-Tapon L et al. An ANOCEF genomic and transcriptomic microarray study of the response to radiotherapy or to alkylating first-line chemotherapy in glioblastoma patients. *Mol Cancer*. 2010; 9:234.
 296. Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B, Stenling R, Oberg A, Rutegard J, Palmqvist R. Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Mod Pathol*. 2011; 24(5):671–682.

297. Gooden MJ, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011; 105(1):93–103.
298. Lieberman J, Shankar P, Manjunath N, Andersson J. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood*. 2001; 98(6):1667–1677.
299. Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2009; 9:292.
300. Distel LV, Fickenscher R, Dietel K, Hung A, Iro H, Zenk J, Nkenke E, Buttner M et al. Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. *Oral Oncol*. 2009; 45(10): e167–e174.
301. Ogino T, Shigyo H, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, Ferrone S. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res*. 2006; 66(18):9281–9289.
302. Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, Vermorken JB. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol*. 2010; 11:19.
303. Stone HB, Peters LJ, Milas L. Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 1979; 63(5):1229-35.
304. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Fu YX, Auh SL. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res*. 2011; 71(7):2488–2496.

8. PRILOG

T limfociti (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	p
T0	70	50 / 88	70	59 / 85	0.597	66.5	48 / 81	0.080
T1	74	50 / 91	76	63 / 88	0.576	70	51 / 87	0.335
T2	77	59 / 90	77	67 / 91	0.379	72	56 / 87	0.305
T3	78	53 / 87	77.5	63 / 89	0.684	75.5	56 / 87	0.252
T4	77	55 / 91	78.5	66 / 90	0.761	78	55 / 89	0.320
T5	78	57 / 89	79	68 / 89	0.917	76.5	61 / 85	0.338
T6	80	47 / 89	80.5	60 / 88	0.936	79.5	59 / 84	0.330

T limfociti (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	p
T0	1280	504/2072	1553	616/2850	0.031	1350	504/2072	0.259
T1	1232	406/2320	1301	630/2464	0.731	1375	406/2320	0.994
T2	1120	472/1920	1158	568/2025	0.463	1198	335/2436	0.633
T3	1035	255/2278	1110	532/1804	0.702	1164	340/2220	0.422
T4	948	330/1596	1054	365/2025	0.924	1066	240/1760	0.275
T5	1020	342/1920	1079	350/1617	0.905	941.5	320/1870	0.994
T6	897	423/1634	1019	240/1633	0.892	954.5	295/2240	0.544

CD4 ⁺ T ly (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	p
T0	70	34 / 56	46.5	32 / 60	0.234	40	20 / 57	0.339
T1	74	34 / 60	48.5	40 / 63	0.133	47	20 / 61	0.970
T2	77	30 / 59	49	38 / 63	0.125	45	25 / 61	0.820
T3	78	29 / 61	48	33 / 65	0.148	46	25 / 60	0.970
T4	77	35 / 60	47.5	32 / 63	0.570	46.5	25 / 61	0.671
T5	78	30 / 61	49	26 / 65	0.654	48.5	28 / 62	0.964
T6	80	34 / 64	49	31 / 61	0.497	47.5	27 / 61	0.964

CD4 ⁺ T ly (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	p
T0	742	380/1568	1009	336/1560	0.044	906	180/1431	0.170
T1	774	296/1300	884	414/1632	0.389	853	140/1566	0.514
T2	722	344/1344	691	368/1425	0.534	772	125/1392	0.371
T3	646	147/1248	654	336/1320	0.661	714	125/1122	0.332
T4	590	240/1045	574	210/1400	0.975	669	100/1260	0.259
T5	624	252/1197	646.5	225/1134	0.892	624	140/1116	0.564
T6	550	294/969	559	164/1150	0.805	597	135/1180	0.272

CD8 ⁺ T ly (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	P	medijana	min/max	p
T0	24	13 / 43	22	13 / 40	0.291	22.5	11 / 38	0.412
T1	26	12 / 39	24.5	16 / 36	0.349	26.5	13 / 39	0.320
T2	27	15 / 45	26	16 / 40	0.270	26.5	14 / 46	0.343
T3	27	11 / 50	27	18 / 48	0.643	26.5	16 / 37	0.543
T4	30	14 / 51	27	18 / 41	0.253	28	16 / 40	0.590
T5	29	14 / 54	28	19 / 44	0.438	28	15 / 40	0.549
T6	31	13 / 48	30.5	19 / 45	0.518	28.5	15 / 44	0.295

CD8 ⁺ T ly (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	P	medijana	min/max	P
T0	484	130/1568	465	336/1560	0.737	459.5	208/1064	0.832
T1	494	96/1300	884	414/1632	0.593	437.5	210/975	0.570
T2	442	120/1344	691	368/1425	0.411	408	185/1288	0.832
T3	390	99/1248	654	336/1320	0.936	393	185/1184	0.677
T4	372	84/1045	574	210/1400	0.528	340	136/800	0.590
T5	390	84/1197	646.5	225/1134	0.684	360	160/920	0.570
T6	364	117/969	559	164/1150	0.786	343.5	145/1232	0.988

CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T ly (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	P	medijana	min/max	P
T0	1.85	0.86/3.53	2.13	0.80/3.87	0.177	1.84	0.59/3.09	0.767
T1	1.73	0.87/3.56	2.04	1.11/3.05	0.112	1.88	0.59/4.08	0.246
T2	1.71	0.80/3.50	1.93	1.00/3.75	0.149	1.74	0.68/3.93	0.660
T3	1.64	0.74/3.64	1.95	0.69/3.00	0.285	1.74	0.68/3.16	0.628
T4	1.68	0.72/3.22	1.80	0.78/3.06	0.311	1.55	0.74/2.90	0.976
T5	1.71	0.56/3.56	1.81	0.59/3.00	0.817	1.72	0.88/3.88	0.844
T6	1.56	0.83/3.35	1.72	0.69/3.00	0.376	1.60	0.89/3.10	0.762

B limfociti (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	P	medijana	min/max	P
T0	7.5	2.3 / 17.2	9.9	3.0/22.0	0.098	10.8	4.6 / 40.3	0.015
T1	3.9	1.2 / 9.4	4.4	1.0/10.2	0.661	4.8	1.0 / 10.5	0.225
T2	2.3	0.2 / 8.2	2.1	0.5/5.8	0.684	2.55	0.5 / 5.3	0.814
T3	1.6	0.3 / 6.4	1.6	0.2/5.1	0.696	1.6	0.5 / 5.2	0.699
T4	1.2	0.1 / 6.8	0.9	0.2/3.0	0.401	1.15	0.4 / 3.4	0.796
T5	1.2	0.3 / 5.9	1.0	0.2/3.1	0.442	1.0	0.3 / 3.5	0.456
T6	1.0	0.2 / 6.9	0.9	0.2/2.8	0.817	0.8	0.2 / 2.7	0.732

B limfociti (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	P	medijana	min/max	P
T0	123	32 / 383	189.3	28.8/638	0.086	201.5	94 /1330	0.007
T1	69	14 / 235	72.4	17.1/250	0.615	79	24 / 176	0.292
T2	35	3 / 197	36.8	7.2/121.8	0.836	44.5	8 / 114	0.564
T3	29	2 / 141	21.8	2.4/87	0.786	24	6 / 65	0.964
T4	14	2 / 129	8.9	1.2/56	0.448	17	4 / 65	0.693
T5	15	3 / 124	12.5	3.2/49.6	0.434	16	3 / 46	0.849
T6	10	2 / 131	9.0	0.8/50.4	0.792	10	2 / 54	0.838

NK ćelije (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	20	7 / 43	17.5	7 / 25	0.062	26	10 / 50	0.137
T1	20	7 / 39	19	7 / 31	0.291	20.5	10 / 45	0.762
T2	20	6 / 38	18.5	10 / 30	0.512	20.5	9 / 40	0.499
T3	21	7 / 42	17	8 / 34	0.303	23.5	9 / 35	0.268
T4	20	6 / 36	19	9 / 35	0.592	25	8 / 43	0.182
T5	22	6 / 35	18	10 / 35	0.266	24.5	10 / 38	0.160
T6	21	6 / 42	21	10 / 35	0.737	25	9 / 41	0.399

NK ćelije (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	357	120/688	380	120/825	0.934	497	160/896	0.048
T1	357	99/750	334.5	91/690	0.632	317	121/897	0.796
T2	288	66/828	263	144/700	0.420	340	81/1188	0.222
T3	272	42/1394	243	72/576	0.474	331.5	108/888	0.187
T4	228	84/720	217	77/700	0.571	339	88/697	0.026
T5	250	112/630	232.5	85/630	0.615	297.5	90/874	0.278
T6	252	78/646	208	48/630	0.497	293	90/1148	0.288

HLA-DR ⁺ ly (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	18	9 / 47	18	9 / 28	0.974	19	13 / 43	0.298
T1	15	7 / 47	14	5 / 23	0.607	14.5	8 / 43	0.964
T2	12	6 / 42	13.5	5 / 25	0.625	13	9 / 30	0.201
T3	12	7 / 44	13	4 / 31	0.847	12	8 / 24	0.249
T4	12	6 / 45	12	6 / 34	0.718	13	7 / 23	0.903
T5	12	7 / 54	14	6 / 35	0.743	11.5	7 / 28	0.709
T6	13	7 / 40	14	6 / 34	0.743	11	7 / 29	0.790

HLA-DR ⁺ ly (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	323	126/672	345	104/750	0.314	385.5	208/550	0.055
T1	240	105/672	240	85 / 576	0.750	256	90/550	0.601
T2	170	72/817	202.5	88 / 462	0.638	239	90/952	0.127
T3	160	88/704	160.5	48 / 558	0.854	202	96/851	0.192
T4	150	66/630	137.5	42 / 680	0.523	176.5	64/360	0.216
T5	168	77/1296	167	50 / 528	0.661	173.5	66/440	0.393
T6	144	56/520	146	36 / 578	1.000	162.5	66/440	0.796

HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ ly (%)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	7.7	2.2 /37.4	6.8	1.8 /22.7	0.503	6.8	3.4/19.6	0.671
T1	6.8	2.5 /33.6	6.2	2.3 /16.6	0.702	6.5	3 /19.7	1.000
T2	6.9	2.5 /33.7	7.6	2.2 /21.2	0.250	6.8	3.6/30.6	0.495
T3	6.8	2.5 /40.9	7.2	2.8 /22.8	0.823	6.6	2.9/15.9	0.688
T4	7.3	3.0 /41.6	7.0	2.8 /23.6	0.994	7.2	3.6/16.2	0.909
T5	8.9	3.2 /49.8	7.6	2.6 /30.5	0.955	7.1	4 /18.8	0.457
T6	7.6	3.5 /37.0	7.7	3.3 /28.6	0.497	7.3	3.3/17.7	0.762

HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ ly (n x 10 ¹² /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	141	33.0/785.5	135.5	39.6/445	0.725	145	50/420	0.500
T1	122	30.5/537.5	120.5	39.1/365	0.774	131.5	28/365	0.826
T2	101.5	29.5/640.5	115.5	46.0/360	0.322	120	37/857	0.150
T3	82.5	33.5/654.5	97.8	34.8/410	0.879	121	35/503	0.137
T4	81	33.0/582.5	97.0	30.1/472	0.968	109	29/318	0.219
T5	94	34.5/1195	104.7	34.0/396	0.768	101	39.5/372	0.585
T6	80.5	32.0/481	102.1	19.0/458	0.678	93	35/387	0.744

leukociti (n x 10 ⁹ /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	5.9	3.9 / 8.9	6.5	4.1 / 15.0	0.073	7.05	3.9 / 10.5	0.014
T1	4.5	1.5 / 8.4	4.9	2.1 / 10.8	0.228	5.0	2.6 / 8.0	0.123
T2	5.1	1.8 / 8.4	4.35	1.9 / 9.9	0.252	4.5	2.0 / 12.4	0.076
T3	4.0	1.6 / 6.8	4.95	2.7 / 8.7	0.013	4.6	2.2 / 9.6	0.112
T4	3.9	1.8 / 6.8	4.1	2.1 / 6.9	0.088	4.1	1.6 / 8.6	0.606
T5	4.1	2.3 / 7.6	3.9	2.2 / 8.4	0.909	4.1	2.3 / 6.9	0.985
T6	3.7	1.4 / 5.6	3.45	1.8 / 6.3	0.351	4.0	1.4 / 6.9	0.672

limfociti (n x 10 ⁹ /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	1.7	1.3 / 3.2	2.1	0.9 / 3.3	0.044	2.2	1.0 / 3.9	0.061
T1	1.7	1.1 / 2.6	1.85	0.7 / 2.9	0.632	1.7	1.2 / 3.3	0.557
T2	1.6	1.1 / 2.5	1.7	0.5 / 3.3	0.308	1.6	1.1 / 2.6	0.751
T3	1.5	0.6 / 3.5	1.5	0.5 / 3.7	0.257	1.5	1.0 / 2.5	0.918
T4	1.2	0.9 / 2.1	1.4	0.4 / 2.1	0.049	1.4	0.8 / 2.6	0.769
T5	1.3	1.0 / 2.5	1.3	0.5 / 2.3	0.681	1.3	0.9 / 2.3	0.989
T6	1.2	0.9 / 2.0	1.3	0.5 / 2.8	0.329	1.3	0.7 / 2.4	0.974

monociti (n x 10 ⁹ /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	0.5	0.2 / 1.7	0.5	0.1 / 1.7	0.658	0.5	0.2 / 1.0	0.441
T1	0.7	0.3 / 1.3	0.7	0.3 / 1.1	0.457	0.7	0.7 / 1.4	0.211
T2	0.8	0.4 / 1.7	0.8	0.4 / 1.5	0.994	0.8	0.8 / 1.3	0.146
T3	0.8	0.2 / 1.5	0.8	0.4 / 2.4	0.076	0.8	0.8 / 1.6	0.169
T4	0.7	0.5 / 1.1	0.75	0.5 / 1.4	0.780	0.7	0.7 / 1.4	0.646
T5	0.8	0.5 / 1.2	0.7	0.5 / 1.7	0.586	0.8	0.8 / 1.8	0.735
T6	0.8	0.2 / 1.1	0.7	0.2 / 1.4	0.969	0.8	0.8 / 1.4	0.554

neutrofili (n x 10 ⁹ /L)	KONTROLA		ISCADOR			HELIXOR		
	medijana	min/max	medijana	min/max	p	medijana	min/max	P
T0	3.4	1.8 / 5.7	3.45	1.9 / 12.5	0.265	4.0	1.5 / 7.1	0.016
T1	1.7	1.0 / 5.5	2.0	0.6 / 6.6	0.091	2.0	0.6 / 4.5	0.114
T2	1.7	0.9 / 4.1	1.7	1.2 / 6.8	0.594	2.2	1.0 / 9.2	0.101
T3	1.5	1.0 / 3.6	2.1	1.1 / 5.5	0.067	1.8	1.0 / 7.3	0.114
T4	1.7	0.9 / 3.8	1.55	1.0 / 4.1	0.471	1.4	1.0 / 5.1	0.846
T5	1.6	0.3 / 5.1	1.7	1.0 / 5.9	0.909	1.6	1.0 / 4.2	1.000
T6	1.6	0.3 / 3.3	1.65	0.4 / 3.6	0.569	1.9	0.3 / 4.3	0.307

Sensitization of K562 Leukemia Cells to Doxorubicin by the *Viscum album* Extract

Tatjana Srdic-Rajic^{1†} Nevena Tisma-Miletic,^{1†} Milena Cavic,¹ Ksenija Kanjer,¹ Katarina Savikin²
Danijel Galun^{3,4} Aleksandra Konic-Ristic⁵ and Tamara Zoranovic^{1,6*}

¹Department of Experimental Pharmacology, Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia

²Institute for Medicinal Plant Research 'Dr Josif Pančić', Belgrade, Serbia

³University Clinic for Digestive Surgery, Clinical center Serbia, Belgrade, Serbia

⁴Belgrade University Medical School, Belgrade, Serbia

⁵Institute for Medical Research, Center of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, Belgrade University, Belgrade, Serbia

⁶Max Plank Institute for Infection Biology, Berlin, Germany

Toxicity of conventional chemotherapeutics highlights the requirement for complementary or alternative medicines that would reduce side effects and improve their anticancer effectiveness. European mistletoe (*Viscum album*) has long been used as a complementary and alternative medicine supporting cancer therapy. The aim of this study was to investigate synergistic antitumor action of *V. album* extract and doxorubicin during co-treatment of chemoresistant chronic myelogenous leukemia K562 cells. Combined treatment of leukemia cells led to inhibitory synergism at sub-apoptotic doxorubicin concentrations and multifold reduction of cytotoxic effects in healthy control cells. Prolonged co-treatment was associated with reduced G2/M accumulation and increased expression of early and late apoptotic markers. Our data indicate that *V. album* extract increases antileukemic effectiveness of doxorubicin against resistant K562 cells by preventing G2/M arrest and inducing apoptosis. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Viscum album*; doxorubicin; K562 leukemia cells; complementary medicines; therapy; apoptosis.

Abbreviations: CAMs, complementary or alternative medicines; CML, chronic myeloid leukemia; Dox, doxorubicin; VAE, *Viscum album* extract; MDR, multidrug resistant; BSA, bovine serum albumin; $\Delta\psi_m$, mitochondrial transmembrane potential.

INTRODUCTION

European mistletoe (*Viscum album*) has been used for centuries in traditional medicine to treat seizures, headaches, and other conditions. Today, mistletoe extract [*V. album* extract (VAE)] therapy is among the most commonly used and thoroughly studied complementary treatments in Europe (Beuth and Schierholz, 2007; Fasching *et al.*, 2007; Molassiotis *et al.*, 2005, 2006a, 2006b). Many kinds of metabolites have been isolated from the European mistletoe, and some are synthesized by the host and incorporated into *V. album* (Cordero *et al.*, 1993; Giudici *et al.*, 2004). Viscotoxins and amphipathic and basic polypeptides (Schaller *et al.*, 1998); tyramine, phenylethylamine, choline, and acetylcholine (Hegnauer, 1966); aminoalkaloids (Amer *et al.*, 2012); phenolic acids and flavonoids (Deliorman *et al.*, 2002; Fukunaga *et al.*, 1987; Luczkiewicz *et al.*, 2001; Vicas *et al.*, 2011); phenylpropanoids (Panossian *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1986); terpenoids (Fukunaga *et al.*, 1987); long-chain fatty acids and hydrocarbons as well as trace amounts of volatile components including *trans*- α -bergamotene, *trans*- β -farnesene, loliolide, and vomifoliol (Cebović *et al.*, 2008); and oligosaccharides and polysaccharides (Arda *et al.*, 2003; Jordan and Wagner, 1986) belong to active metabolites isolated from the mistletoe.

The main group of *V. album* metabolites with described anticancer activity are lectins. Mistletoe lectins (ML-I, ML-II, and ML-III) are classified as type II ribosome-inactivating proteins (Wacker *et al.*, 2004). The European mistletoe obtained from deciduous trees contains mostly ML-I and, when grown on some host such as pine and fir trees, ML-III.

Viscum album extract preparations have been tested in clinical trials as supporting medicines for cancer surgery, chemotherapy, or radiotherapy providing support for their therapeutically beneficial effects (Augustin *et al.*, 2005; Bussing *et al.*, 2005; Kienle *et al.*, 2003; Kienle and Kiene, 2010; Klopp *et al.*, 2005; Melzer *et al.*, 2009; Ostermann *et al.*, 2009; Schink *et al.*, 2007; Troger *et al.*, 2009, 2013, 2014a, 2014b). Functional studies suggest that VAEs, when administered to tumor-bearing animals, display growth-inhibiting and tumor-reducing effects (Büssing, 2000; Duong Van Huyen *et al.*, 2002; Kienle and Kiene, 2003; Park *et al.*, 2001). Furthermore, total VAEs have been reported to have additive inhibitory interactions with anticancer drugs by enhancing their cytostatic and cytotoxic effects (Bantel *et al.*, 1999; Siegle *et al.*, 2001). These effects are, at least in part, attributed to strong cell death-inducing properties of MLs (Bussing and Schietzel, 1999; Eggenschwiler *et al.*, 2007; Elsasser-Beile *et al.*, 1998). This strong proapoptotic activity of VAEs has been suggested to play a role in elimination of multidrug-resistant (MDR) colon cancer cells (e.g., MDR+ colon cancer cells) (Valentiner *et al.*, 2002). Beside extensive experimental analyses of their biological properties, many questions related to the precise mode of action of VAE still remain unanswered.

* Correspondence to: Tamara Zoranovic, Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Infection Biology, Campus Charité Mitte, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin, Germany.
E-mail: zoranovic@mpiib-berlin.mpg.de

†These authors contributed equally to this work.

Despite great advancements in the area of individualized medicine, chemotherapeutics often remain a therapy of choice especially for advanced malignancies (Jackson and Chester, 2015). Because of their unselective mode of action, numerous side effects arise during therapy, significantly contributing to cancer patient fatalities (Dicato, 2012). Therefore, one of the major challenges in cancer chemotherapy today is the need to reduce doses of therapeutics while maintaining their optimal anticancer activity. Effective doses of chemotherapeutics are defined by relative resistance/sensitivity of cancer cells often determined by a set of specific mutations (Marquette and Nabell, 2012; Martin *et al.*, 2014). Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by a reciprocal chromosomal translocation between chromosomes 9 and 22 (t(9; 22) (q34; q11)), giving rise to *Bcr-Abl* oncogene (Johansson *et al.*, 2002). Constitutively activated *Bcr-Abl* tyrosine kinase plays a critical role in the pathogenesis of CML and therapeutic resistance (Daley and Baltimore, 1988; Lugo *et al.*, 1990; Sattler and Salgia, 1997). In order to reduce side effects and improve effectiveness of standard therapeutics, many complementary or alternative medicines (CAMs) have been tested so far with differing effectiveness (Beuth and Schierholz, 2007; Marvibaigi *et al.*, 2014; Son *et al.*, 2010).

The aim of this study was to investigate possible additive antitumor activity of VAE with doxorubicin (Dox) and gain insight into molecular processes underlining these effects.

MATERIALS AND METHODS

Drug. Doxorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in sterile water.

Preparation of mistletoe extract. Leaves of European mistletoe (*V. album* L.) were harvested from plants growing on apple trees (*Malus domestica* B.) in the western regions of Serbia. Voucher specimen no. 3655 HFF is housed in herbarium collection of the University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department for Botany, Serbia.

Water extracts were obtained from milled fresh leaves with a solvent:solid phase ratio of 20:1 (v/w), by ultrasound-assisted extraction (UAE; 20 min; 360 W). Obtained mixture was centrifuged (2000 rpm/10 min) and subsequently filtered through 0.45- μ m pore-sized membrane (Whatman, UK). Obtained extracts were analyzed for total protein and total phenolic content, in triplicates. Total protein content of the extract, determined by the Bradford method (Kruger, 1994), was 404 ± 12 μ g/mL with bovine serum albumin (BSA) used for standard curve calibration (100–1000 μ g/mL). Total phenolic content was 313 ± 9 μ g gallic acid equivalents per milliliter determined by the Folin-Ciocalteu method (Dewanto *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2003) with gallic acid used for standard curve calibration (100–1000 μ g/mL).

Cell line. The culture conditions for human chronic myelogenous leukemia cell line, K562 (American Type

Culture Collection, Rockville, MD, USA), were as described earlier (Eshkourfu *et al.*, 2011).

Cytotoxicity assay. The cytotoxic activity of VAE and Dox on K562 cells was assessed using the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann, 1983; Ohno and Abe, 1991). After treatment in 96-well plates, the MTT solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (20 μ L/well) was added to each well. Samples were incubated for a further 4 h, followed by the addition of 100 μ L of 10% SDS. Absorbance at 570 nm was measured the next day.

Cell survival (S %) was calculated as an absorbance (A570 nm) ratio between treated and control cells multiplied by 100. Half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was defined as the concentration of the agent that inhibited cell survival by 50% compared with the vehicle control.

Flow cytometric analysis of cell cycle phase distribution. Briefly, 2×10^5 cells/Petri dish (dimensions 60 \times 15 mm, NUNC) were treated with investigated compounds as indicated. After collection, cells were fixed with ethanol and stained with propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cell cycle phase distribution was analyzed by FACSCalibur Becton Dickinson flow cytometer using the CELL QUEST computer software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Apoptotic assay. Apoptotic rates were assessed with flow cytometry using the Annexin V–fluorescein isothiocyanate/PI kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Samples were prepared according to manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis was performed using a FACSCalibur cytometer using the CELL QUEST computer software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Quantification of mitochondrial transmembrane potential. Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) was measured using a cationic fluorochrome rhodamine 123 (Rh123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described by Yan *et al.* (2007). Briefly, 1×10^6 cells resuspended in 200 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) were stained with Rh123 (2.5 μ g/mL) for 30 min at 37 °C. After washing, samples were analyzed by flow cytometry using CELL QUEST software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Flow cytometric analysis of cyclins B1 and D1 expression. Cells stained for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis were treated as described earlier. For intracellular cyclin staining, the following antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human cyclin B1 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), FITC-conjugated mouse anti-human cyclin D1 antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), and IgG2a isotype controls (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Briefly, cells were incubated with

antibodies overnight at 4°C and washed twice with PBS containing 1% BSA. Cell pellets were resuspended in PBS/PI/DNase-free RNase A and incubated in the dark at room temperature for 30 min before acquisition. Samples were analyzed on a FACSCalibur cytometer using the CELL QUEST software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Flow cytometric analysis of apoptotic markers. Cells stained for FACS analysis were treated as described earlier. For detection of apoptotic cells, the following antibodies was used: mouse anti-Bax (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, 1:1000), FITC-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, 1:1000). Briefly, cells were incubated with antibodies for 30 min at RT and washed twice with PBS containing 1% BSA. Cell pellets were resuspended in PBS and analyzed on a FACSCalibur cytometer using the CELL QUEST software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Analysis of gene expression by real-time polymerase chain reaction. Total RNA was isolated using a TRI REAGENT® BD kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). cDNA synthesis from total RNA using random primers and MultiScribe™ Reverse Transcriptase from a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All target transcripts (Bax and Casp3) were detected using TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All reactions were performed in duplicate, and the data represent mean ± SEM of three independent experiments. Results were analyzed using the classical delta-delta-Ct method. GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to compare means by two-way analysis of variance and Bonferroni method to adjust the *p*-value for multiple comparisons. Differences were considered significant if *p* < 0.05. *p*-Values for each analysis are indicated in figure legends.

Clonogenic assay for proliferation ability. Briefly, 0.5×10^4 treated K562 cells per milliliter were mixed with 1 mL of Human methylcellulose complete medium (R&D Systems Minneapolis, MN, USA). Cells were then plated in a 35-mm plastic dish (Falcon). Blast-derived colonies (>50 cells) were counted on day 7. All assays were performed in duplicate.

Data analysis. Cytotoxicity of investigated substances was evaluated using Student's *t*-test, with *p* < 0.05 considered as statistically significant. Data obtained from the mistletoe–drug interaction were analyzed by CALCUSYN, a statistical program used for the assessment of drug interaction based on the method of Chou and Talalay (1984). The type of interaction, synergism, antagonism, or additive effect, was assessed based on the obtained combination index (CI).

RESULTS

Viscum album extract treatment affects chronic myeloid leukemia cell viability

For many CML patients, first-line therapy failure leads to the blast phase of the disease where employment of chemotherapeutics such as Dox is indicated. As *Bcr-Abl*-positive K562 leukemia cells are relatively resistant to Dox (Blagosklonny *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000), we have investigated the potential benefit of using VAE as a supporting drug during Dox treatment. A series of treatment and co-treatment experiments were performed on K562 cells using a defined range of concentrations for both Dox and VAE. First, we tested the toxicity of five different VAE concentrations (16.0, 8.0, 4.0, 2.0, and 1.0 µg/mL of total proteins) on healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using the MTT assay (Mosmann, 1983; Ohno and Abe, 1991). Approximately 80% of cells survived the 72-h treatment with VAE concentrations of 4, 2, and 1 µg/mL and IC₅₀ value of 13.36 ± 1.6 µg/mL (data not shown). In addition, VAE IC₅₀ value for K562 cells amounted to 0.5 ± 0.08 µg/mL, revealing approximately 30 times lower VAE toxicity on healthy PBMCs compared with K562 leukemia cells.

Half-maximal inhibitory concentration value for Dox treatment of K562 cells amounted to 0.7 µg/mL. Based on this result, we have selected three more Dox concentrations falling within a therapeutically relevant range (2 and 1 µM) or significantly below it (0.5 and 0.25 µM). Next we have determined K562 cell viability after 72-h treatment with VAE, Dox, or a combination of both using selected concentrations of both agents. We have observed that VAE treatment of K562 cells at all chosen concentrations exhibits antitumor activity in a dose-dependent manner (Table 1). Moreover, VAE treatment-mediated toxicity of K562 cells was comparable with those induced by Dox alone (Table 1). Consistent with previous observations, K562 leukemia cells exhibited pronounced resistance to Dox treatment (Blagosklonny *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000) reflected by only a marginal increase in cell death at high/therapeutic Dox concentrations (Table 1). Surprisingly, despite dose-dependent toxicity observed during single treatments with VAE or Dox, co-treatment of K562 cells with a high concentration of VAE and Dox did not reveal synergistic, but rather mild antagonistic, action (Table 1, columns I and II; Fig. 1A and B). Much to our surprise, co-treatment within low/sub-therapeutic concentrations of both Dox and VAE significantly affected K562 cell survival, revealing a strong synergistic action: CI=0.488, synergism; CI=0.574, synergism (Table 1, columns III and IV; Fig. 1A and B). This synergistic antitumor activity at non-toxic concentrations of Dox and VAE was comparable with that induced by high Dox concentrations (Table 1, columns I and II). The same results were obtained by *in vitro* cell survival assay, or clonogenic assay. The growth inhibitory effect of VAE was already detected at 0.8 µg/mL (Fig. 1C), while VAE at 1.6 µg/mL was as potent as 0.5 µM Dox to reduce the number of colonies capable of growing in methylcellulose (Fig. 1C). Moreover, colony formation of K562 cells was more effectively inhibited by the combination of VAE and Dox (Fig. 1C). Together, our results reveal that co-treatment of K562 leukemia cells with VAE and

Table 1. Dose-dependent cytotoxicity of doxorubicin (Dox), mistletoe extract (VAE), and VAE/Dox combined treatment of K562 leukemia cells (expressed as percentage of killed cells)

Substance	Drug concentration			
	I	II	III	IV
VAE	71.52 ± 3.5	69.05 ± 2.45	57.27 ± 2.3	49.34 ± 2.6
Dox	63.60 ± 2.5	53.62 ± 3.7	42.55 ± 2.6	31.50 ± 2.9
VAE + Dox	74.31 ± 2.3	72.04 ± 2.8	69.78 ± 1.1	64.33 ± 1.2
CI	1.347	0.838	0.517	0.414
Interaction	--	+	+ + +	+ + +

VAE ($\mu\text{g/mL}$): I = 4.0; II = 2.0; III = 1.0; IV = 0.5. Dox (μM): I = 2.0; II = 1.0; III = 0.5; IV = 0.25. The results are presented as mean (from three independent experiments) \pm standard error of the mean. Interaction: + + +, synergism; +, slight synergism; --, moderate antagonism.

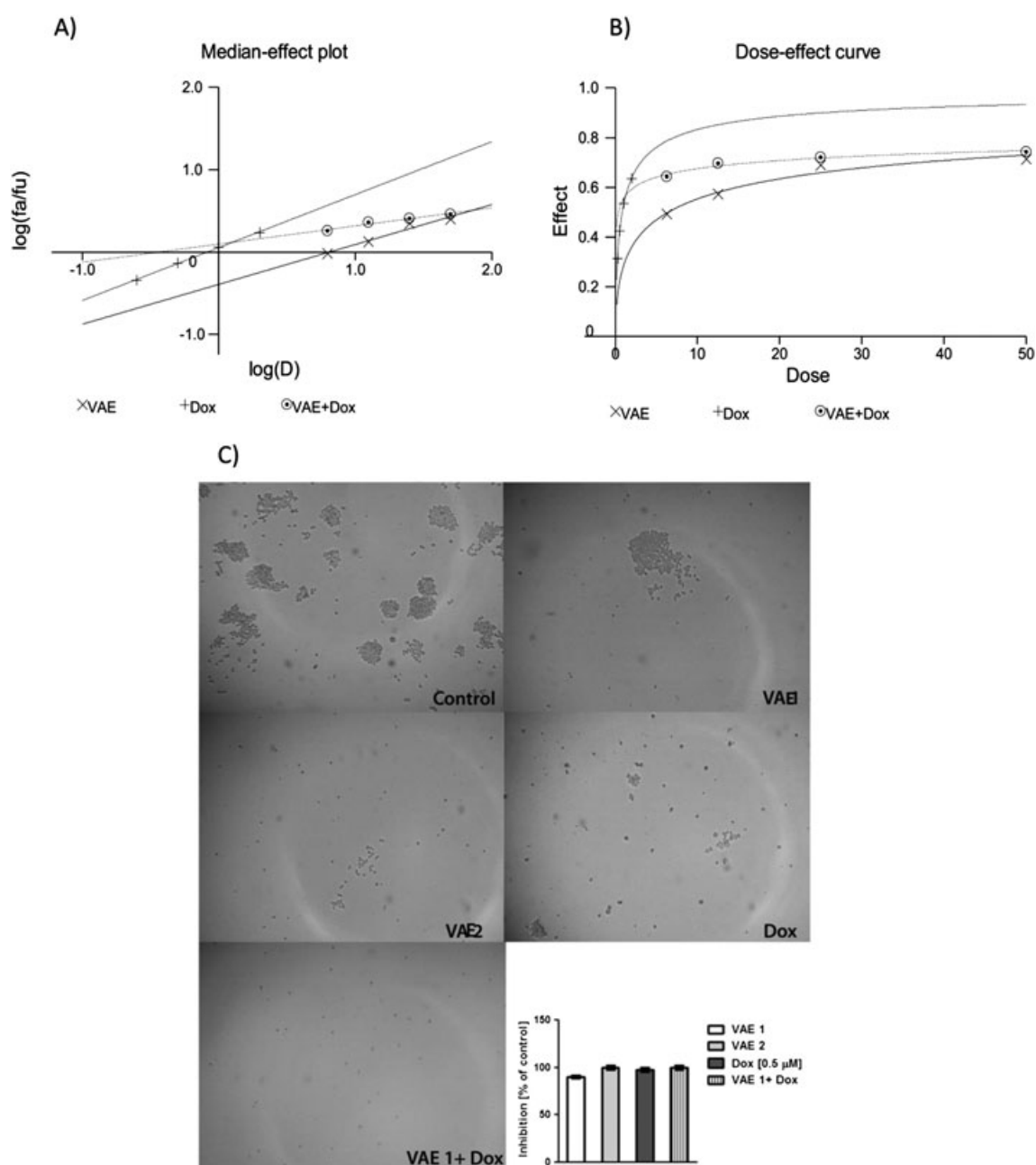


Figure 1. Interaction between mistletoe extract (*Viscum album* (VA) extract) and doxorubicin (Dox). Seventy-two-hour treatment of K562 cells with different concentrations of agents tested: VA extract alone (x); Dox alone (+), or a constant ratio of VA extract and Dox mixture (o). (A) Median effect plot curve and (B) dose-effect curve represent the data from Table 1. (C) Clonogenicity of K562 cells using sub-therapeutic concentration of Dox (0.5 μM) alone or in combination with two VA extract concentrations: VA 1 = 0.8 $\mu\text{g/mL}$ and VA 2 = 1.6 $\mu\text{g/mL}$. Figure displays untreated cells (control) and cells incubated for 24 h with investigated compounds. Colonies were scored after 7 days. Experiment was repeated twice using independently derived cell populations and yielded comparable results. A representative experiment is shown.

Dox has a synergistic inhibitory action in sub-therapeutic Dox concentrations.

Co-treatment of K562 cells with *Viscum album* extract recovers doxorubicin-induced G2/M arrest and reduces expression of cyclins B1 and D1

To address the basis of VAE and Dox co-treatment synergistic action, we have decided to investigate potential changes in K562 cell cycle progression during various treatment conditions. Our dose-effect curve indicates that VAE treatment-induced toxicity above 2.0 µg/mL does not show linear relationship to concentration (Fig. 1B). To account for possible saturation and/or mechanistic crosstalk

between high concentration treatments with VAE and Dox that may result in antagonism observed, we have selected 2.0 µg/mL VAE along with 0.5 µM (low) and 2.0 µM (high) Dox concentrations for cell cycle distribution analysis.

Viscum album extract and Dox mono-treatment and co-treatment exhibited time-dependent effects on K562 cell cycle progression and toxicity. Twenty-four-hour and 48-h co-treatment of K562 cells with VAE and Dox compared with Dox alone resulted in a gradual increase of dying cell population residing in the sub-G1 phase and a reduction of cells in both S and G2/M phases of the cell cycle (Figure S1).

Extending K562 cell line treatment to 72 h with VAE in combination with both concentrations of Dox (0.5 and

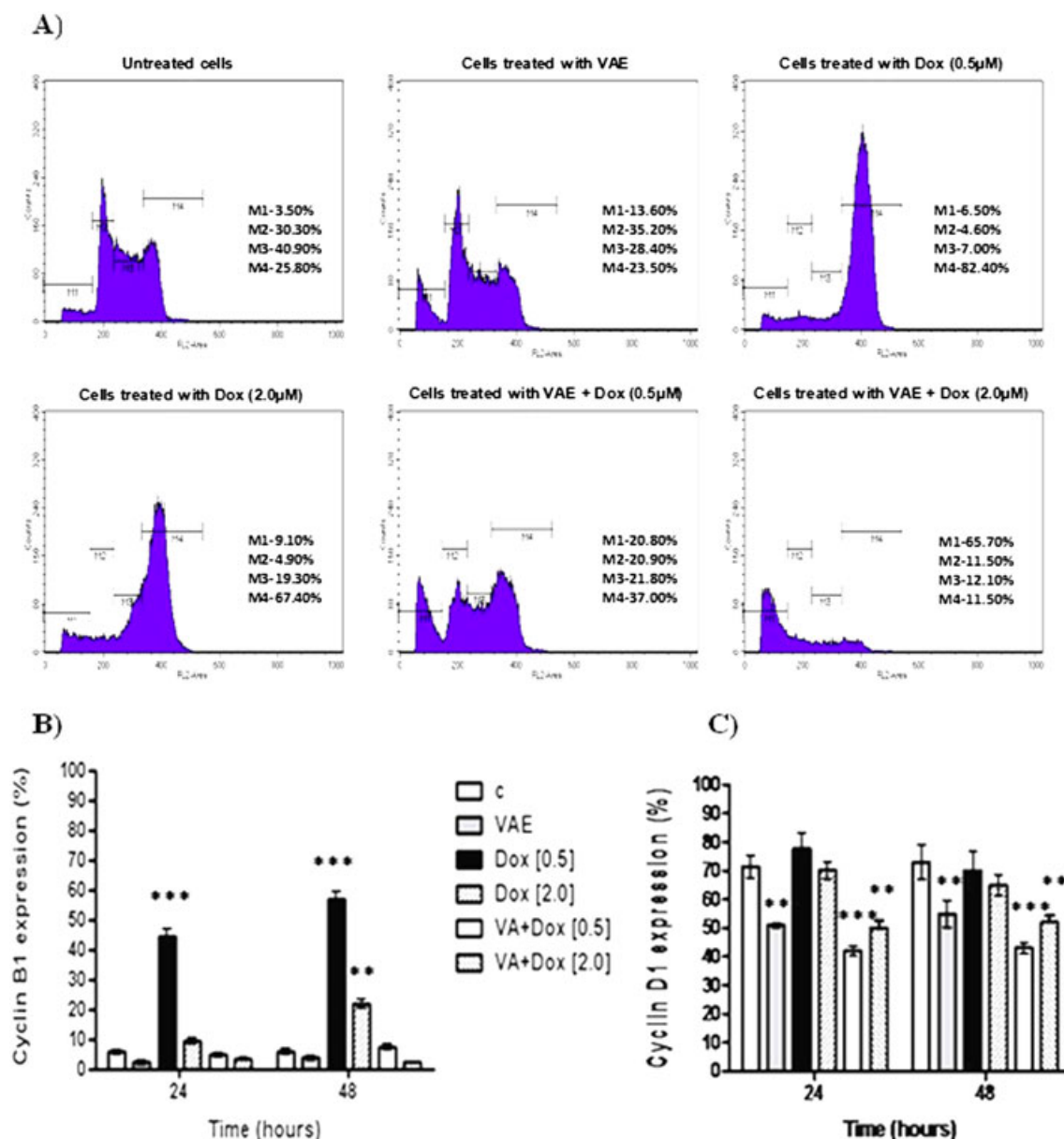


Figure 2. Fluorescence-activated cell sorting analysis of cell cycle distribution and markers of cell cycle arrest in K562-treated leukemia cells. (A) Graphic representation of K562 cell cycle phase distribution upon 72-h treatment with *Viscum album* extract (VAE; 2 µg/mL) and Dox (0.5 and 2 µM) alone or in combination. Cultures were stained with propidium iodide and analyzed for alternations in cell cycle phase distribution by flow cytometry. (B) Expression of cyclin B1 and (C) cyclin D1 upon treatment with indicated concentrations of Dox and VAE for 24 and 48 h. Results are presented as the mean ± standard error of the mean of three independent experiments. Asterisks denote statistical significance compared with control cells (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). M2—Cells with DNA content corresponding to G0/G1 phases. M3—Cells with DNA content corresponding to S phase. M4—Cells with DNA content corresponding to G2/M phases.

2.0 μM) resulted in further cell death increase (sub-G1 phase cells 20.8% and 65.7%, respectively) and dramatic reduction of G2/M cell population (Fig. 2A).

Next, we performed FACS analysis of time-dependent cell death induction in K562 cells using different treatment combinations (Fig. 3A). Cells were incubated with investigated compounds for 24, 48, and 72 h and stained for expression of early apoptotic marker annexin V and PI permeability (Fig. 3A).

In line with cell cycle phase distribution results, short-term treatment (24 and 48 h) with investigated agents alone did not induce significant increase in programmed cell death (Fig. 3A).

Importantly, extending treatment with VAE and Dox to 72 h resulted in the onset of massive cell death at sub-apoptotic Dox concentrations (0.5 μM), sharply contrasting the effects of VAE and Dox single-treatment effects under the same conditions (Fig. 3A). Early apoptosis-inducing effects were dose and time dependent with the highest number of early apoptotic K562 cells (65%, $p < 0.001$) detected 72 h after co-treatment with 2.0 $\mu\text{g/mL}$ VAE and 2.0 μM Dox (Fig. 3A). Interestingly, while percentage of early apoptotic cell population increases after VAE/Dox co-treatment, late apoptotic and necrotic cell populations are almost lost (annexin V-positive/PI-positive and annexin V-negative/PI-positive cells, respectively) (Fig. 3A), probably suggesting a delay in the activation of apoptotic execution machinery.

The G2/M block induced by treatment of K562 cells with Dox alone was completely recovered after

co-treatment with VAE. Moreover, 72 h after co-treatment with VAE and Dox, most cells have accumulated in a sub-G1 phase indicating cell death (Fig. 2A). Previous work shows that p53-deficient cancer cells are resistant to chemotherapeutics (Lowe *et al.*, 1994) and as response to treatment induce G2/M arrest (Meng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009). However, sensitivity of cancer cells to Dox depends on their ability to activate S-phase checkpoint controlled by p53 (Siu *et al.*, 1999). To gain insight into events preceding sub-G1 accumulation of p53 null K562 cells, we measured expression of two major S and M phase checkpoint cyclins, cyclin B1 and cyclin D1 during shorter treatments (24 and 48 h) (Figs. 2B and C). Flow cytometric analysis revealed that sub-therapeutic concentrations of Dox (0.5 μM) induce cyclin B1 expression in a time-dependent manner (Fig. 2B). Increased expression of cyclin B1 observed during extended sub-therapeutic Dox treatment was associated with an accumulation of K562 Dox-treated cells in the G2/M phase and was recovered during VAE and Dox treatment reflected by a size reduction of cyclin B1-positive cell population (Fig. 2B). Twenty-four-hour and 48-h treatment of K562 cells with Dox alone revealed no significant differences in the percentage of cyclin D1-positive cells compared with controls (Fig. 2C). Interestingly, incubation of cells with VAE alone or in combination with Dox significantly reduced the percentage of cyclin D1-positive cells at both time points and at both concentrations (Fig. 2C). These results suggest that VAE/Dox co-treatment of K562 leukemia cells bypasses

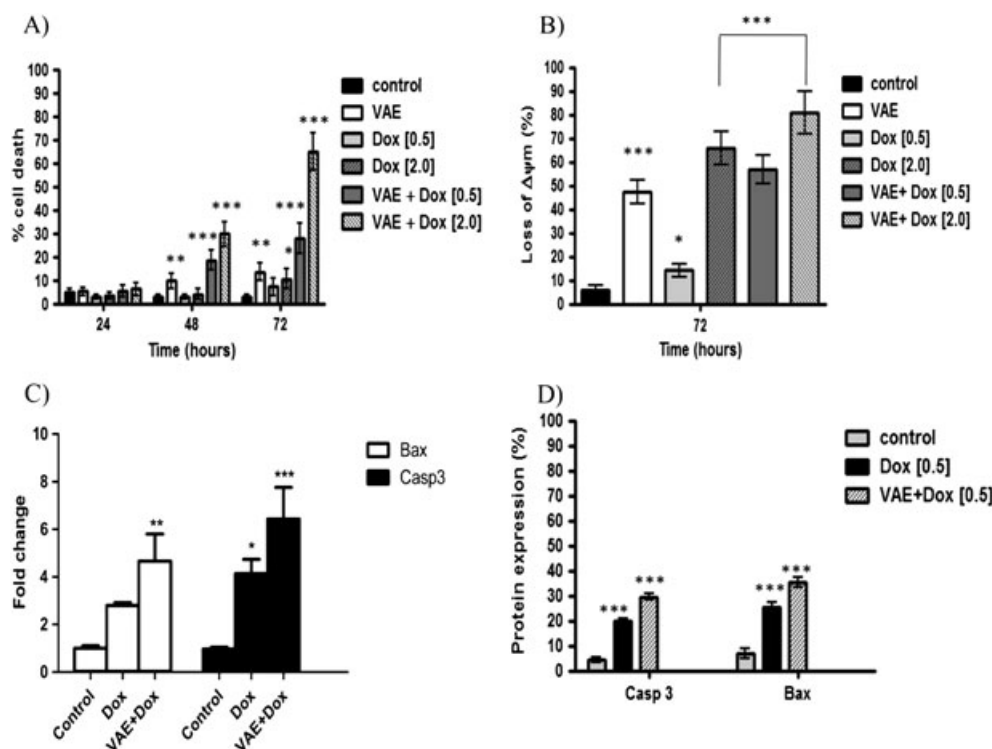


Figure 3. Apoptotic response of K562 doxorubicin (Dox)-resistant cells upon co-treatment with *Viscum album* extract (VAE). Cells were treated with VAE (2.0 $\mu\text{g/mL}$) and Dox (0.5 and 2 μM) alone or in combination for indicated times. (A) Cell death was measured by the bivariate Annexin V/propidium iodide flow cytometry. (B) Dissipation of mitochondrial membrane potential was assessed by flow cytometry using rhodamine 123 staining. Seventy-two-hour treatment of K562 with VAE (2.0 $\mu\text{g/mL}$) and sub-apoptotic concentration of Dox (0.5 μM) alone, or in combination, increases caspase 3 and Bax mRNA expression. (C) Resulting and corresponding increase in protein levels. (D) mRNA levels were normalized to GAPDH. All results are presented as a mean \pm standard error of the mean of three independent experiments. Asterisks denote statistical significance compared with control cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Dox-mediated G2/M arrest by modulating expression of cyclins B1 and D1.

***Viscum album* extract/doxorubicin co-treatment increases apoptotic response in K562 leukemia cells**

Our annexin V/PI FACS analysis data revealed increased population of early apoptotic K562 cells upon co-treatment with Dox and VAE (Fig. 3A). Therefore, we sought to assess whether synergistic action of VAE and Dox on K562 leukemia cells results in increased mitochondrial apoptotic pathway activation and intrinsic apoptotic pathway execution. It has been described that cytotoxic drugs activate intrinsic/mitochondrial apoptotic pathway (Fulda and Debatin, 2004) reflected by measurable changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) (Decaudin *et al.*, 1998; Green and Kroemer, 2004), release of cytochrome C, proapoptotic factor Bax, and effector caspase 3 activation (Marzo *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999).

We performed FACS Rh123 fluorochrome incorporation assay (Yan *et al.*, 2007). K562 cells were incubated with 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of VAE and 0.5 and 2.0 μM Dox for 24, 48, and 72 h. The $\Delta\psi_m$ did not change significantly after 24 and 48 h of K562 cell treatment with either VAE or Dox treatment, single or in combination (Figure S2). In contrast, a dramatic loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in K562 cells was observed upon 72-h co-treatment with VAE, Dox, and a combination of both (Fig. 3B). Induced expression and translocation of proapoptotic Bax protein to mitochondria results in membrane pore assembly and dissipation of the membrane potential (Marzo *et al.*, 1998). If followed by cytochrome C release to cytosol, it initiates a cascade of events resulting in caspase 9-mediated cleavage and activation of caspase 3, one of the key executioner caspases of the intrinsic apoptotic program. Therefore, we decided to evaluate Bax and caspase 3 expression and activation during VAE and Dox co-treatment at single lower concentrations where the strongest synergistic action was observed (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VAE and 0.5 μM Dox, Table 1). As in our previous experiments, cells were treated with VAE (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Dox (0.5 μM) for the period of 72 h. Quantitative polymerase chain reaction analysis of caspase-3 and Bax gene expression after 72-h co-treatment with VAE and Dox revealed increased expression of both genes compared with mono-treated or untreated controls (Fig. 3C). In line with the mRNA expression data, FACS staining for Bax protein and cleaved caspase-3 showed increased protein expression, confirming activation of the intrinsic apoptotic pathway signaling (Fig. 3D). Data presented here indicate that synergistic antileukemic activity of VAE and Dox co-treatment at sub-therapeutic and sub-apoptotic concentrations is achieved by higher activation and execution of the intrinsic apoptotic program.

DISCUSSION

The goal of cancer therapy is to cure the disease, prevent its recurrence, and decrease mortality. Despite great advancements in the area of individualized medicine,

chemotherapeutics often remain a therapy of choice especially for advanced malignancies (Jackson and Chester, 2015). Because of their non-selective mode of action, severe side effects and toxicity still represent a great challenge in oncology (Dicato, 2012). Therefore, identification of medicines that would allow for chemotherapeutic dose reduction, without altering their overall efficacy, remains an important task for cancer researchers today. CML represents 14% of all leukemias diagnosed with median age of patients affected being 60–65 years. Majority of CML patients are successfully treated with *Bcr-Abl* kinase inhibitor imatinib (Valent, 2007). However, patients with blast-phase CML presenting as acute lymphoblastic leukemia will eventually undergo treatment with chemotherapeutics including Dox.

Chronic myelogenous leukemia cells expressing oncogenic tyrosine kinase such as *Bcr-Abl* reveal significant resistance to Dox, warranting use of higher drug concentrations in therapy (Blagosklonny *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000). In order to reduce the side effects and improve effectiveness of standard chemotherapy, many CAMs have been tested so far. Mistletoe extracts are among the commonly prescribed CAMs for cancer patients.

Previous work has described synergistic interactions between *V. album* extract and chemotherapeutics only at high concentrations of chemotherapeutics (Hong *et al.*, 2014; Siegle *et al.*, 2001; Weissenstein *et al.*, 2014). Furthermore, most studies report synergistic antiproliferative but not apoptotic effects of VAE with low concentrations of chemotherapeutics (Weissenstein *et al.*, 2014). We report that optimal synergistic antitumor activity of Dox and *V. album* aqueous extract obtained by UAE is achieved at sub-apoptotic Dox concentrations accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential I ($\Delta\psi_m$) and upregulation of Bax and caspase-3 (Fig. 3), confirming the completion of the apoptotic program. Direct antiproliferative and cytotoxic activity of mistletoe is based mainly on a dose-dependent apoptotic effect of MLs (Janssen *et al.*, 1993). Similar to our results, ML-I antitumor activity was shown to be mediated via 28S ribosomal subunit inactivation, subsequent inhibition of protein synthesis, and induction of intrinsic apoptotic pathway (Bantel *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 1988). These paralleling findings may reflect activity of ML-I in our VAE. Treatment of human peripheral blood lymphocytes, human peripheral blood monocytes, murine thymocytes, and human monocytic THP-1 cells with ML-1/VAA-I exerts cytotoxicity in a dose-dependent and time-dependent manner at concentrations above 10 ng/mL with the onset at 24 h (Hostanska *et al.*, 1996–1997). Our results show that 72-h treatment of PBMCs with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aqueous VAE obtained by UAE does not exert toxic effects with IC_{50} being 13.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, providing support for testing of this VAE formulation *in vivo* and raising the question of other metabolites that may confer high antitumor action. It has been shown that ML addition to cancer therapy using DNA-damaging agents improves efficacy of DNA repair in PBMCs and overall better therapy tolerance (Burkhart *et al.*, 2010). However, clinical trials have not conclusively demonstrated survival advantage or reduced disease progression upon VAE addition to chemotherapy regimen. These results could be reconciled by the assumption that VAE addition to chemotherapy

regimen may improve both DNA repair systems in healthy and tumor cells especially at sub-apoptotic doses of chemotherapeutics. Thus, we have employed a UAE protocol and obtained high anticancer activity mistletoe water extract under the predicament that content of active polypeptides such as MLs responsible for putative tumor DNA repair activity and overt PBMC toxicity will be reduced (Jiménez *et al.*, 2008; Stathopoulos *et al.*, 2004).

Also, it has been previously reported that cancer toxicity of aqueous extracts is more potent than single components such as MLs (Eggenschwiler *et al.*, 2007). Polyphenols are present in rather high concentrations and exhibit specific content profile in different mistletoe preparations (Schramm, 2015). Polyphenols of mistletoe extracts are attractive targets for oncological research as they exert cytotoxic, antiinflammatory, and antihormonal activity and interfere with tumor metabolism (Schramm, 2015; Urech, 2015) but only in concert with other active metabolites (Sak, 2014). Although flavonoids with described synergistic antitumor activity with Dox such as quercetin (Wang *et al.*, 2012) are unlikely to be significantly represented in our preparation, other very polar flavonoids and polyphenolics with as yet uncharacterized anticancer activity are likely represented. It is necessary to determine precise identification and quantification of ML fractions that still retain activity in the extract obtained with this method, as well as activity of flavonoids and other polyphenols that may be responsible for the additive cancer toxicity with low-dose Dox observed.

Prolonged G2/M arrest of chemotherapy-resistant cancer cells is transient and serves to repair DNA damage (Hirose *et al.*, 2001a, 2001b; Shah and Schwartz, 2001).

Cancer cell ability to activate checkpoint signaling in response to DNA damage induced by Dox prevents progression of the cell cycle leading to chemoresistance (Meng *et al.*, 2013). Conversely, previous reports suggest that abrogation of the G2 checkpoint of p53-deficient cancers results in sensitization to chemotherapy (Hirose *et al.*, 2001a, 2001b; Luo *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2013). Our data reveal that VAE sensitizes K562 cells to low-dose Dox treatment by inhibiting Dox-induced G2/M arrest. While VAE alone exhibits only neglectable toxicity on healthy PBMCs (IC₅₀ value at 13.36 µg/mL), co-treatment with low-dose Dox (0.5 µM) enhances K562 apoptosis providing effectiveness comparable with higher Dox concentrations (2 µM) (Table 1, Figs. 2A and 3A, B). Furthermore, our results suggest that the synergistic toxicity of VAE with Dox relies upon abrogation of Dox-induced G2/M arrest (Fig. 2A). G2 checkpoint is maintained by Chk1, Chk2, p53, and MK2-mediated inhibition of CDC25 phosphatases that act as activators of cyclin B/Cdc2 promoting mitosis (Boutros *et al.*, 2007; Donzelli and Draetta, 2003). During G1-phase progression, cyclin D-Cdk4, cyclin D-Cdk6, and cyclin E-Cdk2 complexes are activated, controlling G1/S transition (Quelle *et al.*, 1993). Recent findings suggest that Dox-induced cyclin D1 expression in p53-deficient HC-60 cells may be responsible for treatment survival and perturbations of G1 and G2 checkpoints observed (Zuryn *et al.*, 2012, 2014). On the other hand, cyclin B1 and cdc2 (Cdk1) form a complex named 'mitotic promoting factor' (MPF) crucial for G2/M transition (Pines and Hunter, 1990). In this paper, we show that VAE treatment effectively inhibits expression of cyclin D1 in K562 cells alone or in combination with Dox (Fig. 2C). However, treatment of K562 cells

with Dox alone did not reveal statistically significant difference in percentage of cyclin D1-positive cells compared with controls (Fig. 2C). Absence of Dox treatment effect on cyclin D1 expression may be attributed to relatively high resistance of K562 cells to Dox but also cell type-specific mechanisms being active in different p53 null cancers. Dan and Yamori (2001) suggested that changes in the level of cyclin B1 and G2/M arrest in A549 cells exposed to Dox are regulated in the manner independent of p53 because similar changes were not induced by cisplatin, a well-known p53 activator. In agreement with these results, it was shown that an increased level of cyclin B1 may appear in some G2/M-arrested cancer cells with p53 deficiency such as K562 cells (Cerquetti *et al.*, 2008). Moreover, activation of antiapoptotic proteins such as Bcl-xL and G2/M arrest have been proposed to represent a crucial event conferring drug resistance in p53-deficient Bcr-abl-expressing cancer cells (Amarante-Mendes *et al.*, 1998a; Bedi *et al.*, 1995). Interestingly, expression levels of cyclin B1 seem to be increased only during low-dose Dox treatment (Fig. 2B) and are markedly reduced by addition of VAE (Fig. 2B). Such parallelism of endogenous expression changes observed for cyclins B1 and D1 during co-treatment with low-dose Dox (0.5 µM) and VAE may indeed reflect their requirement for G2/M arrest observed in our experiments.

In summary, our results indicate that VAE sensitizes Bcr-Abl-positive K562 cells to low-dose Dox treatment (0.5 µM) by abrogating G2/M accumulation and inducing apoptosis comparable with highly toxic Dox concentrations (2 µM). These effects may be essential for damaged Bcr-Abl-positive cell recovery upon treatment with sub-apoptotic concentrations of Dox and selection of clones resistant to genotoxic treatment. Further research focusing on identification of VAE anticancer compounds that would allow for standardized treatment with chemotherapeutics in cancer therapy is warranted.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (grant number III41026).

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

T. S.-R., N. T.-M., and M. C. designed the study, performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. K. K. and A. K.-R. participated in the design of the experiments, revised critically the manuscript, and contributed to the discussion. D. G. revised critically the manuscript and added important points to the discussion. K. S. prepared plant extract, revised critically the manuscript, and added important points to the discussion. T. Z. designed the study, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. All the authors approved the final draft of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

REFERENCES

- Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. 1998a. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* **16**: 1383–1390.
- Amer B, Juvika OJ, Dupont B, Francisa GW, Fossena T. 2012. Novel aminoalkaloids from European mistletoe (*Viscum album* L.). *Phytochem Lett* **5**: 677–681.
- Arda N, Onay E, Koz O, Kirmizigül S. 2003. Monosaccharides and polyols from mistletoes (*Viscum album* L.) growing on two different host species. *Biologia (Bratislava)* **58**: 1037–1041.
- Augustin M, Bock PR, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. 2005. Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* **55**: 38–49.
- Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. 1999. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* **59**: 2083–2090.
- Bedi A, Barber JP, Bedi GC, et al. 1995. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* **86**: 1148–1158.
- Beuth J, Schierholz JM. 2007. Evidence-based complementary oncology. Innovative approaches to optimize standard therapy strategies. *In Vivo* **21**: 423–428.
- Blagosklonny MV, Fojo T, Bhalla KN, et al. 2001. The Hsp90 inhibitor geldanamycin selectively sensitizes Bcr-Abl-expressing leukemia cells to cytotoxic chemotherapy. *Leukemia* **15**: 1537–1543.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* **7**: 495–507.
- Burkhart J, Wälchli C, Heusser P, Weissenstein U, Baumgartner S, Andres AC. 2010. *In vitro* investigation into the potential of a mistletoe extract to alleviate adverse effects of cyclophosphamide. *Altern Ther Health Med* **16**: 40–48.
- Büssing A. 2000. Mistletoe: The Genus *Viscum*. Hardwood Academic Publishers: Amsterdam.
- Büssing A, Schietzel M. 1999. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res* **19**: 23–28.
- Büssing A, Bischof M, Hatzmann W, et al. 2005. Prevention of surgery-induced suppression of granulocyte function by intravenous application of a fermented extract from *Viscum album* L. in breast cancer patients. *Anticancer Res* **25**: 4753–4757.
- Cebović T, Spasić S, Popović M. 2008. Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells *in vivo*. *Phytother Res* **22**: 1097–1103.
- Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, et al. 2008. Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. *Endocr Relat Cancer* **15**: 623–634.
- Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27–55.
- Cordero CM, Gil Serrano AM, Ayuso Gonzalez MJ. 1993. Transfer of bipiperidyl and quinolizidine alkaloids to *Viscum cruciatum* Sieber (Loranthaceae) hemiparasitic on *Retama sphaerocarpa* Boissier (Leguminosae). *J Chem Ecol* **19**: 2389–2393.
- Daley GQ, Baltimore D. 1988. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9312–9316.
- Dan S, Yamori T. 2001. Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 861–867.
- Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G. 1998. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review). *Int J Oncol* **12**: 141–152.
- Delormann O, Çalıŝ I, Ergun F. 2002. Two new flavonoid glycosides from *Viscum album* L. ssp. *Album Pharm Biol* **40**: 380–383.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **50**: 3010–3014.
- Dicato MA. 2012. Side effects of medical cancer therapy. In *Prevention and Treatment*. Springer-Verlag: London.
- Donzelli M, Draetta GF. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**: 671–677.
- Duong Van Huyen JP et al. 2002. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med* **8**: 600–606.
- Eggenschwiler U, von Balthazar L, Stritt B, et al. 2007. Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complement Altern Med* **7**: 1–7.
- Elsasser-Beile U, Lusebrink S, Grussenmeyer T, Wetterauer U, Schultze-Seemann W. 1998. Comparison of the effects of various clinically applied mistletoe preparations on peripheral blood leukocytes. *Arzneimittelforschung* **48**: 1185–1189.
- Endo Y, Tsurugi K, Franz H. 1988. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett* **231**: 378–380.
- Eshkourfu R, Cobeljic B, Vujcic M, et al. 2011. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt(III) complex with the condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide. *J Inorg Biochem* **105**: 1196–1203.
- Fang G, Kim CN, Perkins CL, et al. 2000. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* **96**: 2246–2253.
- Fasching PA, Thiel F, Nicolaisen-Murmann K, et al. 2007. Association of complementary methods with quality of life and life satisfaction in patients with gynecologic and breast malignancies. *Support Care Cancer* **15**: 1277–1284.
- Fukunaga T, Kajikawa I, Nishiya K, Watanabe Y, Takeya K, Itokawa H. 1987. Studies on the constituents of the European mistletoe, *Viscum album* L. *Chem Pharm Bull* **35**: 3292–3297.
- Fulda S, Debatin KM. 2004. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 569–576.
- Giudici AM, Regente MC, Villalaín J, Pfüller K, Pfüller U, De La Canal L. 2004. Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. *Physiol Plant* **121**: 2–7.
- Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626–629.
- Hegnauer R. 1966. Aucuba type glucosides. On their distribution and importance as systemic characteristics. *Pharm Acta Helv* **41**: 577–587.
- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. 2001a. Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**: 5843–5849.
- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. 2001b. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**: 1957–1963.
- Hong CE, Park AK, Lyu SY. 2014. Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* **394**: 225–235.
- Hostanska K, Hajto T, Weber K, et al. 1996–1997. A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nat Immun* **15**: 295–311.
- Jackson SE, Chester JD. 2015. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* **137**: 262–266.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. 1993. *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction or programmed cell death (apoptosis). *Arzneim-Forsch/Drug Res* **43**: 1221–1227.
- Jiménez M, André S, Barillari C, et al. 2008. Domain versatility in plant AB-toxins: evidence for a local, pH-dependent rearrangement in the 2gamma lectin site of the mistletoe lectin by applying ligand derivatives and modelling. *FEBS Lett* **582**: 2309–2312.
- Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. 2002. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* **107**: 76–94.
- Jordan E, Wagner H. 1986. Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology* **43**(Suppl 1): 8–15.
- Kienle GS, Kiene H. 2003. Die Mistel in der Onkologie—Fakten und konzeptionelle Grundlagen. Schattauer Verlag: Stuttgart-New York.

- Kienle GS, Kiene H. 2010. Review article: influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integr Cancer Ther* **9**: 142–157.
- Kienle GS, Berrino F, Bussing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H. 2003. Mistletoe in cancer—a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res* **8**: 109–119.
- Klopp R, Schmidt W, Werner E, Werner M, Niemer W, Beuth J. 2005. Influence of complementary *Viscum album* (Iscador) administration on microcirculation and immune system of ear, nose and throat carcinoma patients treated with radiation and chemotherapy. *Anticancer Res* **25**: 601–610.
- Kruger NJ. 1994. The Bradford method for protein quantitation. In *Methods in Molecular Biology*. Basic Protein and Peptide Protocols, Walker JM (ed.). Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. 1994. p53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. *Science* **266**: 807–810.
- Luczkiewicz M, Cisowski W, Kaiser P, Ochocka R, Piotrowski A. 2001. Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Pol Pharm* **58**: 373–379.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-abl oncogene products. *Science* **247**: 1079–1082.
- Luo Y, Rockow-Magnone SK, Joseph MK, et al. 2001. Abrogation of G2 checkpoint specifically sensitizes p53 defective cells to cancer chemotherapeutic agents. *Anticancer Res* **21**: 23–28.
- Marquette C, Nabell L. 2012. Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* **13**: 263–275.
- Martin HL, Smith L, Tomlinson DC. 2014. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. In *Breast Cancer* **6**. Dove Med Press; 1–13.
- Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, Abdul Majid FA, Jaganathan SK. 2014. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res Int* **2014**: 785479.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**: 2027–2031.
- Melzer J, Iten F, Hostanska K, Saller R. 2009. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed* **16**: 217–226.
- Meng X, Dizon DS, Yang S, et al. 2013. Strategies for molecularly enhanced chemotherapy to achieve synthetic lethality in endometrial tumors with mutant p53. *Obstet Gynecol Int* **2013**: 828165.
- Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D, et al. 2005. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Ann Oncol* **16**: 655–663.
- Molassiotis A, Brollow M, Milovics L, Panteli V, Patiraki E, Fernandez-Ortega P. 2006a. Complementary and alternative medicine use in patients with gynecological cancers in Europe. *Int J Gynecol Cancer* **16**(Suppl 1): 219–224.
- Molassiotis A, Scott JA, Kearney N, et al. 2006b. Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients in Europe. *Support Care Cancer* **14**: 260–267.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55–63.
- Ohno M, Abe T. 1991. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods* **145**: 199–203.
- Ostermann T, Raak C, Bussing A. 2009. Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer* **9**: 451.
- Panossian A, Kocharian A, Matinian K, et al. 1998. Pharmacological activity of phenylpropanoids of the mistletoe, *Viscum album* L., host: *Pyrus caucasica* Fed. *Phytomedicine* **5**: 11–17.
- Park WB, Lyu SY, Kim JH, et al. 2001. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* **16**: 439–447.
- Petit PX, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B, Kroemer G, Castedo M. 1997. Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem* **174**: 185–188.
- Pines J, Hunter T. 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**: 760–763.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, et al. 1993. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* **7**: 1559–1571.
- Sak K. 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev* **8**: 122–146.
- Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **274**: 17941–17945.
- Sattler M, Salgia R. 1997. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**: 63–79.
- Schaller G, Urech K, Grazi G, Giannattasio M. 1998. Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. *Planta Med* **64**: 677–678.
- Schink M, Troger W, Dabidian A, et al. 2007. Mistletoe extract reduces the surgical suppression of natural killer cell activity in cancer patients. A randomized phase III trial. *Forsch Komplementmed* **14**: 9–17.
- Schramm HM. 2015. The anti-cancer activity of mistletoe preparations, as related to their polyphenolic profiles. In *Translational Research in Biomedicine*, vol. 4, Zänker KS, Kaveri SV (ed.). Karger AG: Basel, 24–39.
- Shah MA, Schwartz GK. 2001. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* **7**: 2168–2181.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483–487.
- Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Murdter TE. 2001. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res* **21**: 2687–2691.
- Siu WY, Yam CH, Poon RY. 1999. G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse Swiss3T3 cells. *FEBS Lett* **461**: 299–305.
- Son GS, Ryu WS, Kim HY, Woo SU, Park KH, Bae JW. 2010. Immunologic response to mistletoe extract (*Viscum album* L.) after conventional treatment in patients with operable breast cancer. *J Breast Canc* **13**: 14–18.
- Stathopoulos PB, Scholz GA, Hwang YM, Rumpfolt JA, Lepock JR, Meiering EM. 2004. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci* **13**: 3017–3027.
- Troger W, Jezdic S, Zdrle Z, Tisma N, Hamre HJ, Matijasevic M. 2009. Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone. *Breast Cancer (Auckl)* **3**: 35–45.
- Troger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stankovic N, Milicevic M. 2013. *Viscum album* [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a randomized clinical trial on overall survival. *Eur J Cancer* **49**: 3788–3797.
- Troger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stankovic N, Milicevic M. 2014a. Quality of life of patients with advanced pancreatic cancer during treatment with mistletoe: a randomized controlled trial. *Dtsch Arztebl Int* **111**: 493–502, 433 p following 502.
- Troger W, Zdrle Z, Tisma N, Matijasevic M. 2014b. Additional therapy with a mistletoe product during adjuvant chemotherapy of breast cancer patients improves quality of life: an open randomized clinical pilot trial. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**: 430518.
- Urech K. 2015. Chemical constituents of *Viscum album* L.: implications for the pharmaceutical preparation of mistletoe. In *Translation Research in Biomedicine*, Zänker KS, Kaveri SV (ed.). Karger AG: Basel, vol. 4, 11–24.
- Valent P. 2007. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics* **1**: 433–448.
- Valentiner U, Pfuller U, Baum C, Schumacher U. 2002. The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines *in vitro*. *Toxicology* **171**: 187–199.
- Vicas S, Rugina D, Leopold L, Pintea A, Socaciu C. 2011. HPLC fingerprint of bioactive compounds and antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* **39**: 48–57.
- Wacker R, Stoeva S, Pfuller K, Pfuller U, Voelter W. 2004. Complete structure determination of the A chain of mistletoe lectin III from *Viscum album* L. ssp. *album*. *J Pept Sci* **10**: 138–148.
- Wagner H, Jordan E, Feil B. 1986. Studies on the standardization of mistletoe preparations. *Oncology* **43**(Suppl): 16–22.

- Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F, Zhang W. 2009. Centrosome-associated regulators of the G(2)/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol Cancer* **8**: 8.
- Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S, Dong Q. 2012. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *PLoS One* **7**: e51764.
- Weissenstein U, Kunz M, Urech K, Baumgartner S. 2014. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects *in vitro*. *BMC Complement Altern Med* **8**: 14–16.
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* **51**: 609–614.
- Yan M, Zhu P, Liu HM, Zhang HT, Liu L. 2007. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* **13**: 2352–2356.
- Zuryn A, Litwiniec A, Gackowska L, Pawlik A, Grzanka AA, Grzanka A. 2012. Expression of cyclin A, B1 and D1 after induction of cell cycle arrest in the Jurkat cell line exposed to doxorubicin. *Cell Biol Int* **36**: 1129–1135.
- Zuryn A, Litwiniec A, Klimaszewska-Wisniewska A, *et al.* 2014. Expression of cyclin D1 after treatment with doxorubicin in the HL-60 cell line. *Cell Biol Int* **38**: 857–867.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Research Article

Additional Therapy with a Mistletoe Product during Adjuvant Chemotherapy of Breast Cancer Patients Improves Quality of Life: An Open Randomized Clinical Pilot Trial

Wilfried Tröger,¹ Zdravko Ždrale,² Nevena Tišma,² and Miodrag Matijašević²

¹ Clinical Research Dr. Tröger, Zechenweg 6, 79111 Freiburg, Germany

² Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

Correspondence should be addressed to Wilfried Tröger; troeger@crdt.de

Received 10 October 2013; Revised 24 December 2013; Accepted 13 January 2014; Published 20 February 2014

Academic Editor: Matthias Kröz

Copyright © 2014 Wilfried Tröger et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy often experience a loss of quality of life. Moreover chemotherapy may induce neutropenia. Patients report a better quality of life when additionally treated with mistletoe products during chemotherapy. **Methods.** In this prospective randomized open-label pilot study 95 patients were randomized into three groups. All patients were treated with an adjuvant chemotherapy. The primary objective of the study was quality of life, the secondary objective was neutropenia. Here we report the comparison of HxA ($n = 34$) versus untreated control ($n = 31$). **Results.** In the explorative analysis ten of 15 scores of the EORTC QLQ-C30 showed a better quality of life in the HxA group compared to the control group ($P < 0.001$ to $P = 0.038$ in Dunnett-T3 test). The difference was clinically relevant (difference of at least 5 points, range 5.4–12.2) in eight of the ten scores. Neutropenia occurred in 7/34 HxA patients and in 8/31 control patients ($P = 0.628$). **Conclusions.** This pilot study showed an improvement of quality of life by treating breast cancer patients with HxA additionally to CAF. Although the open design may be a limitation, the findings show the feasibility of a confirmatory study using the methods described here.

1. Introduction

Quality of life of cancer patients is frequently reduced during and after chemotherapy [1]. But physicians have reported better quality of life in breast cancer patients additionally treated with mistletoe products during chemotherapy, compared to patients receiving chemotherapy alone or together with a placebo [2–5]. A systematic review of clinical trials in breast cancer patients [6] identified nine studies in which mistletoe products were given additionally to conventional chemotherapy, thereof three retrospective studies [7–9] and six randomized clinical trials (three are open-label [2, 3, 10] and three double-blind [4, 5, 11]). In one study, data on natural killer-cell activity and quality of life assessed by EORTC QLQ-C30 was collected. In all other studies disease- or therapy-related symptoms or quality of life, assessed by different questionnaires, were documented and showed an

improvement favouring the additional therapy with mistletoe.

Because 70% of cancer patients use mistletoe products in Germany, randomized clinical trials are difficult to conduct: low recruitment rates and noncompliance because of therapy preferences are the consequences [11–14]. Therefore, we conducted this trial in Serbia, a country where mistletoe therapy was unknown.

This randomized clinical pilot trial was carried out to assess the effects of two different mistletoe products on quality of life and on neutrophil count when administered during CAF chemotherapy for breast cancer. The aim was to identify promising outcome measures and methods for future studies in Serbia and to use the results for sample size calculation for a following confirmative study. Here we present the results with the mistletoe product Helixor A (HxA).

2. Methods

2.1. Objectives. The objectives of this pilot study were to determine the clinical response (primary: quality of life, and secondary: neutropenia) of breast cancer patients to an additional mistletoe therapy during CAF. Our primary hypotheses were: breast cancer patients receiving mistletoe products during six cycles of consecutive treatment with CAF will show a better quality of life and less neutropenia compared to patients receiving CAF alone.

2.2. Design. We conducted a prospective randomized open-label pilot study with equal-size randomization into three groups. All three groups received six cycles of CAF. In addition, one group received Helixor A (HxA), another group received Iscador M, and a control group had no additional therapy. The study was not placebo-controlled because currently no active placebo is known that can imitate the typical and time-dependent reactions following subcutaneous injections of mistletoe products (reactions at the injection site, increased body temperature, and flu-like symptoms). Here we report the comparison of HxA versus control. The other part of this combined pilot study has been published elsewhere [10].

2.3. Participants. At the Institute of Oncology and Radiology, National Cancer Research Centre of Serbia in Belgrade (IORS), breast cancer patients in the stages $T_{1-3}N_{0-2}M_0$ scheduled to receive six consecutive cycles of CAF after surgery were assessed for eligibility.

Additional inclusion criteria were female gender, age \geq 18 years, Karnofsky-Index \geq 60, leukocytes \geq 3,000/mm³, thrombocytes \geq 100,000/mm³, serum creatinine \leq 2 mg%, serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), and serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) \leq 2.5 \times the upper institutional limits.

Exclusion criteria were pregnancy or lactation, distant metastases, planned radiation or hormone therapy during the CAF treatment period, use of immunostimulant or immunosuppressive agents (e.g., corticosteroids) except for nausea and emesis, current use of other investigational agents, clinically relevant physical or mental illness such as serious infections, hepatic, renal or other organ dysfunction, or major depression, alcohol abuse, alcoholism, oral or parenteral drug abuse, and methadone treatment.

2.4. Randomization. The chance to be allocated to any of the three groups (HxA, other mistletoe product, and control) was 1:1:1, for randomization variable block sizes were used. No stratification took place prior to randomization. The randomization sequence was generated by Clinical Research Dr. Tröger (CRDT), using SPSS (SPSS 14.0.1, SPSS Inc., Chicago, Ill, USA). Allocation concealment was implemented by using sealed envelopes, prepared by CRDT. Patients were enrolled by investigators at the Outpatient Clinic of the IORS, while the sealed randomization envelopes were stored in the Department of Study Coordination of the IORS and released consecutively for each enrolled patient.

2.5. Interventions. CAF was administered in six cycles with a three-week interval between each cycle. The scheduled dosage was 500 mg cyclophosphamide, 50 mg adriamycin, and 500 mg 5 FU per 1 m² skin surface administered at one day. All patients received antiemetic therapy with a single dose of ondansetron chloride 8 mg, dexamethasone 8 mg, and ranitidine 50 mg, respectively, administered prior to each CAF cycle.

No other antineoplastic or immunomodulatory therapies were permitted during the study. Patient compliance was examined by account of the questionnaires and patient diaries and at each visit.

Patients randomly allocated to the first group with additional therapy received Helixor A (HxA; aqueous extract of *Viscum album* from fir tree (*Abies alba*), fresh plant material). HxA was manufactured and provided by Helixor Heilmittel GmbH & Co. KG, Rosenfeld, Germany, and prepared in 1 mL ampoules for injection, each ampoule containing aqueous extract of 1, 5, 10, 20, 30, or 50 mg of fresh mistletoe herb, respectively, in isotonic saline solution. HxA was administered by subcutaneous injection of 1 mL HxA into the upper abdominal region three times per week. The patients were instructed to inject HxA themselves. The dosage of HxA followed the guidelines of the manufacturer with a stepwise increase: 3 \times 1 mg, 3 \times 5 mg, 3 \times 10 mg, 3 \times 20 mg, 3 \times 30 mg, and remaining doses 50 mg. Dose-dependent inflammatory reactions at the injection site (redness and swelling, sometimes accompanied by itching) were monitored. If such reactions exceeded 5 cm in diameter, the dosage was decreased or the therapy was paused until the reactions had ceased. Depending on the beginning of the injections in the first week, 52–54 injections of HxA were planned. An average of 52.3 \pm 2.8 injections with altogether 2,813 mg (min = 1 mg; max = 6,818 mg of HxA per patient) were administered in the HxA group.

2.6. Outcomes. The primary objective of the study was quality of life and the secondary objective neutropenia. Quality of life was documented with the European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire (EORTC QLQ-C30) in the official Serbian translation [15]. The EORTC QLQ-C30 has 30 questions and is analysed in 15 scores: six scores for functioning and nine symptom scores. Before each of the six CAF cycles and at least three weeks after the last CAF cycle, EORTC QLQ-C30 was filled in by the patients and the absolute number of neutrophils in the peripheral blood was determined. Neutropenia was defined as neutrophil count $<$ 1,000/ μ L.

2.7. Assessment of Adverse Events. Adverse events (AE) were assessed by interviewing the patients and by analysing laboratory data at each visit. The Common Terminology Criteria of Adverse Events (v3.0) were used for grading. Local reactions to HxA less than 5 cm in diameter were expected reactions and therefore not classified as adverse events.

Neutropenia was one of the study objectives and was not classified as AE.

2.8. Statistical Methods. Statistical analysis (SPSS 14.0) was performed on the intention-to-treat population, a population consisting of all patients randomised into one of the three groups. Missing data were not replaced. Because of the pilot character of this study, all results of the analysis are explorative and do not have a confirmatory character. Therefore no sample size calculation was performed. A sample size of 90 patients (30 per group) was considered to be sufficient. For calculation of the EORTC QLQ-C30 scores, missing data within one scale were replaced according to the manual [16].

Quality of life (EORTC QLQ-C30) was analysed as follows: for each EORTC QLQ-C30, the mean change from baseline during follow-up in each group was compared among the HxA group, the group with the other mistletoe product, and the control group, using nonparametric marginal models according to Brunner and Langer [17] with therapy as whole-plot factor and time as subplot factor and a possible interaction between these two factors (results not shown). As a sensitivity analysis, a parametric covariance pattern model was also applied and found to qualitatively concur with the nonparametric results. For a more comprehensible presentation, the estimates of this parametric model will be shown: post-hoc analyses of differences between the HxA group and the control group were performed using the Dunnett-T3 test. Clinical relevance of between-group differences of EORTC QLQ-C30 scores was classified according to Osoba et al. [18] as small (5–10 points), moderate (11–20 points), and large (>20 points).

For the incidence of neutropenia, the difference between the HxA and control groups was analysed by chi-square test according to the sequential rejective Holm procedure.

2.9. Adherence to Regulations and Guidelines. The study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Research Centre of Serbia without modifications (date: 3 October 2005) and by the Serbian Drug Agency (date: 01 November 2005). Due to its pilot character, this study was not registered in a public study registry. The study was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice guidelines, and national laws. A patient insurance was provided for all participants. All patients provided signed informed consent prior to inclusion. CRDT was responsible for planning, conduct, monitoring, and analysis of the study. Two audits at the CRDT office and one at the study site were performed by the two sponsors during the study; no violation of Good Clinical Practice was detected.

This publication followed the CONSORT-PRO statement for reporting of randomized trials [19], therefore “standardized mean differences” (effect sizes) are calculated [20].

3. Results

3.1. Recruitment, Participant Flow, Assessment, and Numbers Analysed. From 14 December 2005 to 15 February 2007 a total of 123 breast cancer patients were scheduled for treatment with CAF and assessed for eligibility at the IORS study centre. 28 patients did not fulfil the eligibility criteria

(reasons: see Figure 1), whereas 95 patients were included and randomized into the 3 therapy groups: CAF and HxA ($n = 34$), CAF and another mistletoe product ($n = 30$), and CAF without additional therapy ($n = 31$). One patient in the control group was withdrawn from further CAF therapy after three cycles of CAF because of heart disease (Figure 1).

In the HxA group, 5 patients dropped out; reasons were withdrawal of informed consent ($n = 4$, in one of these patients travel distance to study centre was the reason) and rhinoconjunctivitis with putative relationship to mistletoe therapy ($n = 1$). These dropout patients were replaced to achieve at least 30 in both groups. All other patients in the HxA group and all patients in the control group received the six scheduled CAF cycles.

The EORTC QLQ-C30 was evaluable for 86.9% (207 of 238) of planned visits in the HxA group, and for 97.2% (211 of 217) of planned visits in the control group. None of the expected questionnaires were missing in the follow-up phase of the study (Table 1). The neutrophil count was determined at 88.6% (211 of 238) and 98.2% (213 of 217) of planned visits in the HxA group and control group, respectively.

3.2. Baseline Data of the Patient Groups. The HxA group and the control group did not differ significantly regarding age, tumour stage, body mass index, physical status, vital signs, previous diseases, EORTC QLQ-C30 scores, and neutrophil counts (Table 2).

3.3. Quality of Life during Chemotherapy. During chemotherapy with CAF, a deterioration of the quality of life occurred in 14 of 15 EORTC QLQ-C30 mean scores in the control group of which 4 were clinically relevant; whereas a deterioration occurred in 5 of 15 scores in the HxA group, of which 2 were clinically relevant.

In the adjusted analyses, mean differences from baseline were compared between the two groups for each EORTC QLQ-C30 score: 14 of 15 comparisons favoured the HxA group and one comparison (financial difficulties) favoured the control group. Ten of 14 comparisons favouring the HxA group showed significant differences (Figures 2 and 3). Eight of these 10 significant between-group differences of the EORTC QLQ-C30 scores were clinically relevant (>5 points), of which two (Pain -10.8 points, Role function $+10.5$ points) were moderate and the remaining six were small (5–10, Figures 2 and 3).

In explorative analyses, the differences from baseline for each of the 15 scores at each of the six follow-up assessments were compared between the two groups. 80 out of 90 differences favoured the HxA group, while 10 differences favoured the control group (data not shown). Furthermore, moderate differences of at least 10 points were found once in nine scores (role function, emotional function, social function, and global health: pain, insomnia, nausea/emesis, appetite loss, and diarrhoea), small differences of 5–10 points were found in three scores (cognitive function, fatigue, and constipation), and differences <5 points were found in the remaining three scores.

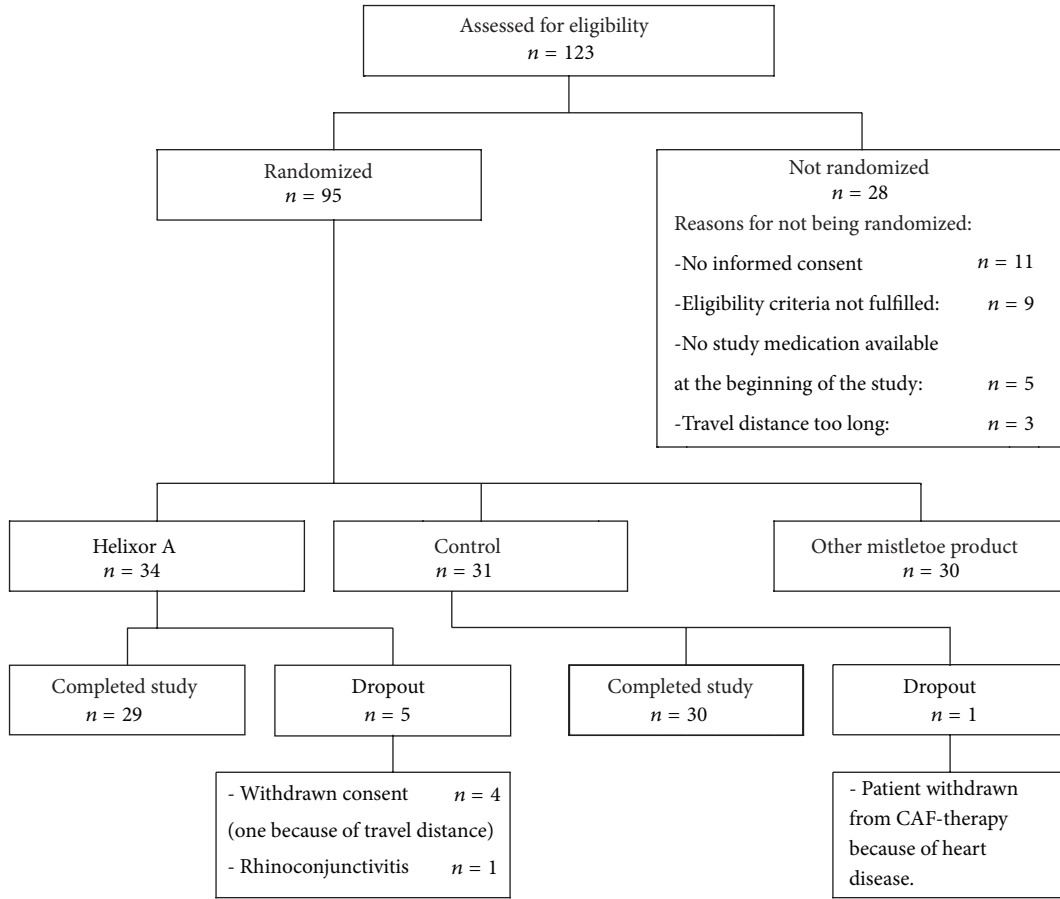


FIGURE 1: Detailed flow chart of the patient disposition.

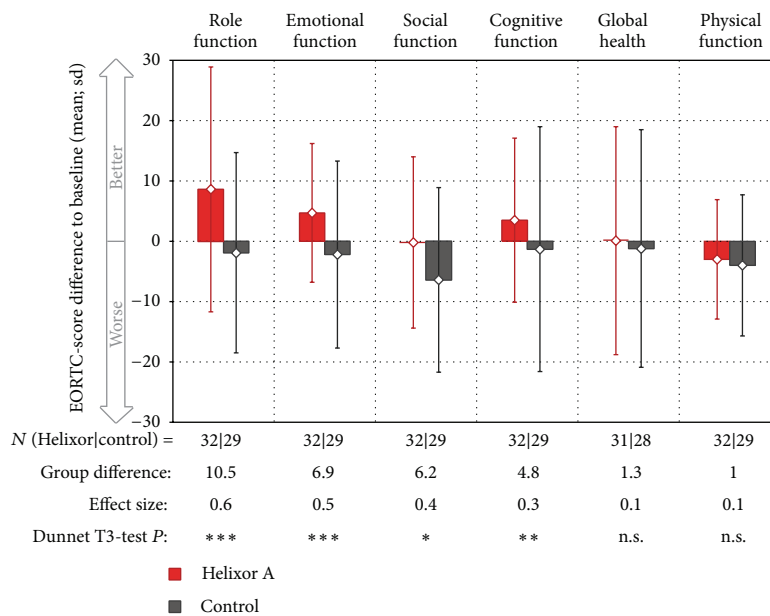


FIGURE 2: Differences of the mean of six follow-up values to baseline values of the EORTC QLQ-C30 function scores (mean ± sd), sorted by between-group group differences. All patients with at least one follow-up visit are displayed. P values are corrected using Bonferroni's method regarding 15 EORTC scores tested and defined as follows: ***P < 0.001 (extremely significant); **P < 0.01 (highly significant); *P < 0.05 (significant); n.s.: not significant.

TABLE 1: Baseline status.

	Group		P values
	HxA (n = 34)	Control (n = 31)	
Age in years (mean ± SD; <i>t</i> -test)	50.4 ± 6.9	50.8 ± 8.0	0.228
Tumor status (<i>n</i> ; Chi square test)			
Tumor classification			0.619
T1	9	9	
T2	24	19	
T3	1	2	
Tx	0	1	
Pos. lymph nodes			0.849
N0	16	16	
N1	16	14	
N2	2	1	
Tumor grade			0.474
G1	3	1	
G2	28	24	
G3	3	6	
Menopause status (<i>n</i> ; Kruskal-Wallis test)			0.475
Premenopausal	18	13	
Perimenopausal	2	1	
Postmenopausal	13	17	
Unknown	1	0	
Receptor status estrogen			0.507
Positive	21	17	
Negative	9	12	
unknown	4	2	
Receptor status progesterone			0.620
Positive	22	19	
Negative	8	10	
Unknown	4	2	
Body Mass Index (mean ± SD; <i>t</i> -test)	26.1 ± 4.3	25.6 ± 4.7	0.709
Karnofsky-Index (mean ± SD)	100 ± 0.0	100 ± 0.0	—
Abnormal findings on physical examination (<i>n</i>)	0	0	—
Vital signs (mean ± SD; <i>t</i> -test)			
Blood pressure systolic (mmHg)	126.1 ± 12.9	132.2 ± 19.0	0.139
Blood pressure diastolic (mmHg)	79.9 ± 9.2	83.6 ± 13.6	0.209
Pulse (/min)	77.3 ± 13.0	77.1 ± 10.1	0.945
Temperature (°C)	36.6 ± 0.1	36.6 ± 0.1	1.000
Primary outcomes			
EORTC QLQ-C30 (mean ± SD; Mann-Whitney <i>U</i> -test)			
Global health status	66.9 ± 21.5	68.5 ± 18.3	0.713
Physical functioning	85.6 ± 14.6	86.0 ± 12.4	0.872
Role functioning	68.6 ± 23.5	73.0 ± 16.9	0.443
Emotional functioning	69.4 ± 17.9	74.1 ± 18.1	0.274
Cognitive functioning	82.8 ± 17.2	79.3 ± 23.4	0.23
Social functioning	73.5 ± 22.5	80.5 ± 18.9	0.226
Fatigue	25.5 ± 18.3	25.7 ± 19.5	0.894
Nausea and vomiting	7.4 ± 16.0	2.9 ± 7.8	0.285
Pain	21.1 ± 20.2	16.1 ± 20.6	0.273
Dyspnea	2.9 ± 9.6	3.4 ± 10.3	0.839
Insomnia	20.6 ± 26.0	23.0 ± 31.0	0.902
Appetite loss	14.7 ± 27.5	10.3 ± 20.1	0.704
Constipation	8.8 ± 18.9	6.9 ± 13.7	0.914
Diarrhoea	4.9 ± 14.5	2.3 ± 8.6	0.498
Financial difficulties	20.6 ± 23.2	20.7 ± 30.1	0.661
Secondary outcomes			
Incidence of neutropenia	0	0	—

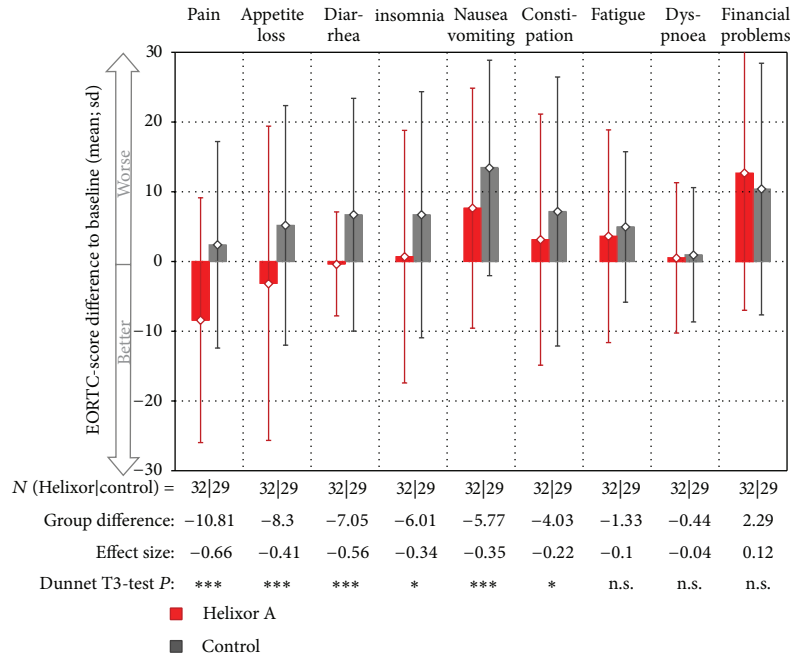


FIGURE 3: Differences of the mean of six follow-up values to baseline of the EORTC QLQ-C30 symptom scores (mean \pm sd) sorted by group differences. All patients with at least one follow-up visit are displayed. P values are corrected using Bonferroni's method regarding 15 EORTC scores tested and defined as follows: *** $P < 0.001$ (extremely significant); ** $P < 0.01$ (highly significant); * $P < 0.05$ (significant); n.s.: not significant.

TABLE 2: Number of patients and compliance in the completion of QoL forms by visit and groups.

Group	Visit	Time schedule (days)	Time window (days)	Dropout	Forms expected	Forms received
Control						
	1	0	0-0	0	31	29 (94%)
	2	21	21-25	0	31	31 (100%)
	3	42	42-49	0	31	31 (100%)
	4	63	63-74	1	30	30 (100%)
	5	84	84-98	1	30	30 (100%)
	6	105	105-122	1	30	30 (100%)
	7	182 $\geq x \geq 26$	126-143	1	30	30 (100%)
Helixor:						
	1	0	0-0	0	34	34 (100%)
	2	21	18-28	2	32	32 (100%)
	3	42	39-51	5	29	29 (100%)
	4	63	63-75	5	29	29 (100%)
	5	84	84-96	5	29	29 (100%)
	6	105	105-117	5	29	29 (100%)
	7	182 $\geq x \geq 126$	126-155	5	29	29 (100%)

3.4. Neutropenia during Chemotherapy. Neutropenia (neutrophil count $< 1,000/\mu\text{L}$) was detected seven times in seven different patients of the HxA group and nine times in eight different patients of the control group (Table 3) ($P = 0.628$).

3.5. Adverse Events. Altogether 1,527 injections of HxA were administered. Twenty of 34 patients (59%) of the HxA group reported altogether 45 adverse events (AE). The 45 AE were: local inflammatory reaction at the injection site > 5 cm, with

definite causal relation to HxA ($n = 42$, representing 2.7% of 1,527 injections); rhinoconjunctivitis at one eye, documented by the investigator to be probably caused by HxA—the patient withdrew informed consent and gave no further information ($n = 1$); and AEs without any causal relationship to the administration of HxA ($n = 2$).

In the control group, 12 AEs and one serious adverse event (SAE: acute hospitalization because of dehydration upon severe emesis; see Table 4) occurred.

TABLE 3: List of patients experiencing a neutropenia.

Group	ID	Visit number	Date (Visit)	Age	Stage	T	N	M	G	Leuco-cytes/nL	Neutro-phils/nL
HxA	18	2	26.04.2006	43	2	2	1	0	2	10.2	0.6
	61	2	18.09.2006	50	2	2	0	0	2	2.6	0.9
	42	7	03.11.2006	47	2	2	1	0	2	1.4	0.5
	53	7	06.12.2006	44	2	2	1	0	2	1.6	0.4
	57	7	22.12.2006	64	2	2	1	0	3	1.5	0.3
	58	7	22.12.2006	37	2	2	0	0	3	2.5	0.7
	75	7	07.03.2007	55	2	2	0	0	2	3.2	0.9
Control	13	3	26.04.2006	32	2	2	1	0	2	2.8	0.9
	33	5	29.08.2006	60	2	2	0	0	2	2.4	0.9
	87	6	26.03.2007	45	2	2	1	0	2	3.3	0.3
	90	6	29.03.2007	52	2	1	0	0	3	2.6	0.8
	51	7	08.12.2006	66	2	2	1	0	2	1.3	0.3
	56	7	21.12.2006	53	2	2	1	0	2	3.5	0.9
	62	7	31.01.2007	62	2	1	1	0	2	2.5	0.8
	66	7	23.01.2007	44	1	1	0	0	2	2.4	0.8
	90	7	19.04.2007	52	2	1	0	0	3	2.7	0.9

Seven patients of the HxA group and eight patients of the control group experienced a neutropenia ($P = 0.628$; 2-sided Chi square test) at day 21 of the respective cycle/visit.

TABLE 4: List adverse events.

Group AE	Code*	Number	Grade**	number	Relation	Duration	Outcome
Helixor A							
Adverse events							
Localized skin reaction at the injection site	10022096	42	Mild	1	Definite	Median 4 days (lq 2–uq 6,5)	Resolved without sequelae
			Moderate	13			
			Severe	27			
Conjunctivitis	10010741	1	Moderate	1	Probable	Unknown	Unknown
Febrile temperature	10021113	1	Severe	1	Unrelated	2 days	Resolved without sequelae
Sting	—	1	Severe	1	Unrelated	Unknown	Unknown
Control							
Adverse events							
Urticaria (localized)	10046749	1	Mild	1	Unrelated	3 days	Resolved without sequelae
Wound infection	10048038	1	Severe	1	Unrelated	6 days	Resolved without sequelae
Nausea/emesis	10028813	3	Severe	3	Unrelated	2 days	Resolved without sequelae
Control							
Serious adverse events:							
Nausea/emesis***	10028813	1	Severe	1	Unrelated	4 days	Resolved without sequelae

* Code according to the Medical Dictionary for Regulatory Activities.

** Grading according to the Common Terminology Criteria of Adverse Events (v3.0).

*** Patient was hospitalized to treat dehydration. According to the ICH 2A Guidelines hospitalization is defined as “serious adverse event”.

Abbreviations: lq: lower quartile; uq: upper quartile; ICH: International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

4. Discussion

In this randomized pilot study quality of life (EORTC QLQ-C30) and incidence of neutropenia were investigated in breast cancer patients undergoing adjuvant CAF chemotherapy. Patients receiving HxA in addition to CAF had significantly better quality of life, compared to patients receiving CAF alone. HxA therapy was well tolerated.

Strengths of this study include a high recruitment rate, detailed assessments of therapy implementation, high therapy compliance, and very low dropout rates.

Due to the open-label design, the study cannot distinguish between direct drug effects on quality of life and possible indirect effects from therapy expectations, therapy administration, and so forth, in the HxA group.

Generally, medication trials are blinded to separate pharmacological effects from placebo effects. However, the lack of blinding may not necessarily have had relevant effects on the results of this study: an updated Cochrane review of randomized trials comparing placebo to no treatment found no significant placebo effects on eight out of ten evaluable indications, small effects on self-reported pain, and

moderate effects on phobia. Even these effects might have been confounded by biases [21–23].

This study was designed as a pilot study, and the limited sample size of 30 patients per group does not allow for hypothesis confirmation. Moreover dropout patients or patients with missing data were more frequent in the HxA-group. As the results were calculated using data from all included patients (ITT), data of two patients in each group were missing. The remaining differences are additional three patients (ITT) in the HxA-group, which may lead to a biased result. Nevertheless, significant differences in 10 of 15 EORTC QLQ-C30 scores favouring the HxA group were found. All of these scores showed a clinically relevant difference of at least 5 points. The latter scores include role function, emotional function, pain, nausea, emesis, appetite loss, and diarrhoea, which are relevant symptoms in patients during chemotherapy with CAF.

These results are consistent with findings from another randomized phase III trial, wherein the administration of HxA to patients undergoing chemotherapy for breast cancer, lung cancer, or ovarian cancer was associated with significant beneficial effects on quality of life [3]. Notably, in the latter study, different methods for assessment of quality of life were used (“Functional Living Index-Cancer” questionnaire filled in by the patients, and Karnofsky performance index classified by the attending physician).

On the other hand, in a trial of early breast cancer patients receiving radiochemotherapy (CMF schedule), no influence of adjunctive therapy with HxA on any of the EORTC QLQ-C30 scores was found [11]. This discrepancy to the present study may be attributed to the fact that in the latter trial, patients did not experience any significant deterioration of the EORTC QLQ-C30 scores during radiochemotherapy. Consequently, a favourable effect of the additive mistletoe therapy could not be achieved.

On the whole, there is some evidence that mistletoe extracts may have an impact on quality of life and reduction of side effects of chemotherapy especially in case of breast cancer patients as concluded in two recent comprehensive systematic reviews [24, 25].

In this pilot study, the effects of HxA on quality of life increased over time with the largest effects observed at the last follow-up visit. A longer follow-up period might show additional long-term benefits of HxA therapy.

5. Conclusions

In this randomized pilot study of patients receiving adjuvant CAF chemotherapy for breast cancer, additional treatment with mistletoe therapy (Helixor A) was associated with significant and clinically relevant improvements of quality of life. Although the open design may be a limitation, the findings show the feasibility and justification of a phase III study using the methods described here.

Abbreviations

5-FU: 5-Fluorouracil
AE: Adverse event

CAF:	Cyclophosphamide, adriamycine, and 5-fluoro-uracil
CRDT:	Clinical Research of Dr. Tröger
EORTC QLQ-C30:	European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire
HxA:	Helixor A
IORS:	Institute of Oncology and Radiology of Serbia
ITT:	Intention to treat
SAE:	Serious adverse event.

Conflict of Interests

The sponsor, Helixor Heilmittel GmbH & Co. KG, had no influence on study design, planning, conduct, or analysis. The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' Contribution

Miodrag Matijašević was the responsible principal investigator. Zdravko Ždrale was the coinvestigator. Nevena Tišma carried out the blood analysis. Wilfried Tröger was principal author of the paper, wrote the study protocol, coordinated the study, had full access to all data, and is guarantor. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank Petra Siemers, Anja Glockmann, and Claudia Bihl for monitoring and data management, Biostatistik Fischer for statistical analyses, and Dusanka Jelesanin for the coordination of patients in the centre. Special thanks go to the study nurses Milijana Sokol and Zorica Radelović and the participating patients. The part of the study that is reported here was financially supported by Helixor Heilmittel GmbH & Co. KG, Rosenfeld, Germany.

References

- [1] P. A. Ganz, L. Kwan, A. L. Stanton et al., “Quality of life at the end of primary treatment of breast cancer: first results from the moving beyond cancer randomized trial,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, no. 5, pp. 376–387, 2004.
- [2] B.-M. Heiny, “Additive therapie mit standardisiertem Mistelextrakt reduziert die Leukopenie und verbessert die Lebensqualität von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom unter palliativer Chemotherapie (VEC-Schema),” *Krebsmedizin*, vol. 12, pp. 1–14, 1991.
- [3] B. K. Piao, Y. X. Wang, G. R. Xie et al., “Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial,” *Anticancer Research*, vol. 24, no. 1, pp. 303–309, 2004.
- [4] V. F. Semiglasov, V. V. Stepula, A. Dudov, W. Lehmacher, and U. Mengs, “The standardised mistletoe extract PS76A2 improves QoL in patients with breast cancer receiving adjuvant CMF chemotherapy: a randomised, placebo-controlled,

- double-blind, multicentre clinical trial,” *Anticancer Research*, vol. 24, no. 2, pp. 1293–1302, 2004.
- [5] V. F. Semiglazov, V. V. Stepula, A. Dudov, J. Schnitker, and U. Mengs, “Quality of life is improved in breast cancer patients by standardised mistletoe extract PS76A2 during chemotherapy and follow-up: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial,” *Anticancer Research*, vol. 26, no. 2, pp. 1519–1529, 2006.
- [6] G. S. Kienle, A. Glockmann, M. Schink, and H. Kiene, “Viscum album L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research,” *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 28, no. 1, article 79, 2009.
- [7] J. Beuth, B. Schneider, and J. M. Schierholz, “Impact of complementary treatment of breast cancer patients with standardized mistletoe extract during aftercare: a controlled multicenter comparative Epidemiological Cohort Study,” *Anticancer Research*, vol. 28, no. 1, pp. 523–527, 2008.
- [8] P. R. Bock, W. E. Friedel, J. Hanisch, M. Karasmann, and B. Schneider, “Efficacy and safety of long-term complementary treatment with standardized european mistletoe extract (*Viscum album L.*) in addition to the conventional adjuvant oncologic therapy in patients with primary non-metastasized mammary carcinoma / results of a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland,” *Drug Research*, vol. 54, no. 8, pp. 456–466, 2004.
- [9] K. Schumacher, B. Schneider, G. Reich et al., “Influence of post-operative complementary treatment with lectin-standardized Mistletoe extract on breast cancer patients. a controlled epidemiological multicentric retrolective cohort study,” *Anticancer Research*, vol. 23, no. 6, pp. 5081–5087, 2003.
- [10] W. Tröger, S. Jezdić, Z. Ždrale, N. Tišma, H. J. Hamre, and M. Matijašević, “Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone,” *Breast Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 35–45, 2009.
- [11] L. Auerbach, V. Dostal, I. Václavik-Fleck et al., “Signifikant höherer Anteil aktivierter NK-Zellen durch additive Misteltherapie bei chemotherapierten Mamma-CA-Patientinnen in einer prospektiven randomisierten doppelblinden Studie,” in *Fortschritte in der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung Und Klinischen Anwendung*, R. Scheer, R. Bauer, H. Becker, V. Fintelmann, F. H. Kemper, and H. Schilcher, Eds., pp. 543–554, KCV, Essen, Germany, 2005.
- [12] I. Gerhard, “Problems of randomised treatment studies in complementary medicine. Forsch Komplementämed,” *Klass Naturheilkd*, vol. 7, pp. 34–35, 2000.
- [13] M. Rostock and R. Huber, “Randomized and double-blind studies—demands and reality as demonstrated by two examples of mistletoe research,” *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde*, vol. 11, no. 1, pp. 18–22, 2004.
- [14] R. Ziegler, “Mistletoe preparation iscador: are there methodological concerns with respect to controlled clinical trials?” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 19–30, 2009.
- [15] N. K. Aaronson, S. Ahmedzai, B. Bergman et al., “The european organization for research and treatment of cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 85, no. 5, pp. 365–376, 1993.
- [16] P. M. Fayers, N. K. Aaronson, K. Bjordal, M. Groenvold, D. Curran, and A. Bottomley, *The EORTC QLQ-C30 Scoring Manual*, EORTC Quality of Life Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer, Brussels, Belgium, 3rd edition, 2001.
- [17] E. Brunner and F. Langer, *Nichtparametrische Analyse Longitudinaler Daten*, Oldenbourg, München, Germany, 1999.
- [18] D. Osoba, A. Bezjak, M. Brundage, B. Zee, D. Tu, and J. Pater, “Analysis and interpretation of health-related quality-of-life data from clinical trials: basic approach of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group,” *European Journal of Cancer*, vol. 41, no. 2, pp. 280–287, 2005.
- [19] M. Calvert, J. Blazeby, D. G. Altman, D. A. Revicki, D. Moher, and M. D. Brundage, “Reporting of patient-reported outcomes in randomized trials: the CONSORT PRO extension,” *The Journal of the American Medical Association*, vol. 309, no. 8, pp. 814–822, 2013.
- [20] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, Routledge Academic, New York, NY, USA, 1988.
- [21] A. Hróbjartsson and P. C. Gøtzsche, “Is the placebo powerless? An analysis of clinical trials comparing placebo with no treatment,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 21, pp. 1594–1602, 2001.
- [22] A. Hróbjartsson and P. C. Gøtzsche, “Is the placebo powerless? Update of a systematic review with 52 new randomized trials comparing placebo with no treatment,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 256, no. 2, pp. 91–100, 2004.
- [23] A. Hróbjartsson and P. C. Gøtzsche, “Placebo interventions for all clinical conditions,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 3, 2004.
- [24] M. A. Horneber, G. Bueschel, R. Huber, K. Linde, and M. Rostock, “Mistletoe therapy in oncology,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 2, p. CD003297, 2008.
- [25] G. S. Kienle and H. Kiene, “Influence of *Viscum album L.* (European Mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies,” *Integrative Cancer Therapies*, vol. 9, no. 2, pp. 142–157, 2010.

OPEN ACCESS

Full open access to this and thousands of other papers at <http://www.la-press.com>.

Quality of Life and Neutropenia in Patients with Early Stage Breast Cancer: A Randomized Pilot Study Comparing Additional Treatment with Mistletoe Extract to Chemotherapy Alone

Wilfried Tröger¹, Svetlana Jezdić², Zdravko Ždrale², Nevena Tišma², Harald J. Hamre³ and Miodrag Matijašević²

¹Clinical Research Dr. Tröger, ²Institute of Oncology and Radiology of Serbia (Belgrade). ³Institute for Applied Epistemology and Medical Methodology. Email: troeger@crdt.de

Abstract

Background: Chemotherapy for breast cancer often deteriorates quality of life, augments fatigue, and induces neutropenia. Mistletoe preparations are frequently used by cancer patients in Central Europe. Physicians have reported better quality of life in breast cancer patients additionally treated with mistletoe preparations during chemotherapy. Mistletoe preparations also have immunostimulant properties and might therefore have protective effects against chemotherapy-induced neutropenia.

Patients and Methods: We conducted a prospective randomized open label pilot study with 95 patients randomized into three groups. Two groups received Iscador[®] M special (IMS) or a different mistletoe preparation, respectively, additionally to chemotherapy with six cycles of cyclophosphamide, adriamycin, and 5-fluoro-uracil (CAF). A control group received CAF with no additional therapy. Here we report the comparison IMS (n = 30) vs. control (n = 31). Quality of life including fatigue was assessed with the European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire (EORTC-QLQ-C30). Neutropenia was defined as neutrophil counts <1,000/ μ l and assessed at baseline and one day before each CAF cycle.

Results: In the descriptive analysis all 15 scores of the EORTC-QLQ-C30 showed better quality of life in the IMS group compared to the control group. In 12 scores the differences were significant ($p < 0.02$) and nine scores showed a clinically relevant and significant difference of at least 5 points. Neutropenia occurred in 3/30 IMS patients and in 8/31 control patients ($p = 0.182$).

Conclusions: This pilot study showed an improvement of quality of life by treating breast cancer patients with IMS additionally to CAF. CAF-induced neutropenia showed a trend to lower frequency in the IMS group.

Keywords: mistletoe therapy, breast cancer, randomized clinical trial, quality of life, neutropenia

Breast Cancer: Basic and Clinical Research 2009;3 35–45

This article is available from <http://www.la-press.com>.

© the authors, licensee Libertas Academica Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by/2.0>) which permits unrestricted use, distribution and reproduction provided the original work is properly cited.



Introduction

Background

Quality of life is frequently deteriorated during and after chemotherapy for cancer.¹ Besides nausea, emesis and pain, fatigue is a frequent complaint, reported by 70%–100% of the patients.² Recent research has shown that fatigue lasts for months after the last cycle of chemotherapy.² Three types of fatigue are distinguished: general, physical, and mental; the latter being related to reduced activity, depression, anxiety, and mood disorders.^{3,4} Fatigue, insomnia and daytime sleepiness are augmented during and after chemotherapy with cyclophosphamide and 5-FU combined with methotrexate (CMF) or anthracyclines (CAF).⁵ One can conclude that fatigue is one of the major concerns for patients with cancer.^{6,7}

Mistletoe therapy

Physicians have reported better quality of life in breast cancer patients additionally treated with mistletoe preparations during chemotherapy, compared to patients receiving chemotherapy alone.^{8–12} Mistletoe preparations also have immunostimulant and DNA-protecting properties^{13,14} and might therefore have protective effects against chemotherapy-induced neutropenia.¹⁵

In Central Europe, mistletoe preparations are widely used for adjuvant cancer therapy, especially by breast cancer patients. In Germany, 70% of cancer patients use unconventional treatments, and randomized trials of mistletoe preparations are difficult to conduct because of non-compliance and low recruitment rates due to therapy preferences.^{16–19} Mistletoe preparations^{10,16} as adjunct to CMF^{12,16} or other chemotherapies for breast cancer and other types of cancer¹⁰ have been examined in a few clinical studies showing a benefit in EORTC-QLQ-C30¹⁶ and other quality of life scores.^{10,12}

This randomised clinical trial assessed mistletoe effects during CAF chemotherapy for breast cancer. The aim was to explore whether the EORTC-QLQ-C30 is a suitable instrument to detect differences between patients with early breast cancer receiving CAF with and without additional mistletoe therapy and whether such study is feasible in Serbia, a country where mistletoe preparations are not available.

Methods

Objectives

The objectives of this pilot study were to determine the clinical response (quality of life including fatigue) and neutropenia in breast cancer patients during CAF. Our hypotheses were: Breast cancer patients receiving mistletoe preparations during six cycles of consecutive treatment with CAF will show a better quality of life including fatigue, and less neutropenia compared to patients receiving CAF alone.

Design

We conducted a prospective randomized open label study with equal-size randomization into three groups. All three groups received six cycles of CAF. In addition, one group received Iscador[®] M special (IMS), another group received a different mistletoe preparation and a control group had no additional therapy. Here we report the comparison IMS vs. control.

Participants

Breast cancer patients in the stages T_{1–3}N_{0–2}M₀ treated at the Institute of Oncology and Radiology, National Cancer Research Centre of Serbia in Belgrade (IORS) and prescribed six consecutive cycles of CAF after surgery were assessed for eligibility.

Additional inclusion criteria were female gender, age ≥ 18 years, Karnofsky-Index ≥ 60 , leucocytes $\geq 3,000/\text{mm}^3$, thrombocytes $\geq 100,000/\text{mm}^3$, serum creatinine $\leq 2 \text{ mg}\%$, serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), and serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) $\leq 2.5 \times$ the upper institutional limits.

Exclusion criteria were pregnancy or lactation, metastases, planned radiation or hormone therapy during six consecutive cycles of CAF, use of immunostimulant or immunosuppressive agents (e.g. corticosteroids) except for nausea and emesis; current use of other investigational agents, clinically relevant physical or mental illness such as serious infections, hepatic, renal or other organ dysfunction or major depression; alcohol abuse, alcoholism, oral or parenteral drug abuse, and methadone treatment.

Randomization

The chance to be allocated to any of the three groups (IMS, other mistletoe preparation, control) was 1:1:1.



For randomization variable block sizes were used. No stratification took place prior to randomization. The randomization sequence was generated by Clinical Research Dr. Tröger (CRDT), using SPSS® (SPSS® 14.0.1, SPSS Inc., Chicago, Ill, USA). Allocation concealment was implemented by using sealed envelopes, prepared by CRDT. Patients were enrolled by investigators at the Outpatient Clinic, IORS, while the sealed randomization envelopes were stored in the Department of Study Coordination, IORS and released consecutively for each enrolled patient.

Interventions

CAF was administered in six cycles with a three-week interval between each cycle. The scheduled dosage was 500 mg Cyclophosphamide, 50 mg Adriamycin, and 500 mg 5-FU per 1 m² skin surface applied at one day. All patients received antiemetic therapy with a single dose of Ondansetron chloride 8 mg, Dexamethasone 8 mg, and Ranitidine 50 mg, respectively, administered prior to each CAF cycle.

One dropout patient in the control group received only three CAF cycles, while all other patients received the six scheduled CAF cycles. The applied dose intensities (DI) of Cyclophosphamide, Adriamycin, and 5-FU (DI in mean mg/m² per week; \pm standard deviation) were 160.8 ± 5.5 mg, 16.1 ± 0.5 mg, and 160.8 ± 5.5 mg, respectively, in the IMS group and 157.1 ± 15.6 mg, 15.7 ± 1.6 mg, and 157.1 ± 15.6 mg, respectively, in the control group. The results correspond to 99% of planned DI in the IMS group and 96% of planned DI in the control group. No other antineoplastic or immunomodulating therapies were applied during the study.

Patients randomly allocated to additional therapy with IMS received Iscador® M special (IMS; fermented aqueous extract of *Viscum album* from apple tree, fresh plant material, ratio of plant to extract = 1:5). IMS was manufactured by Weleda AG, Schwäbisch Gmünd, Germany and prepared in 1 ml ampoules for injection, each ampoule containing the fermented extract of 0.01, 0.1, 1, 2, or 5 mg of fresh mistletoe herb, respectively, in isotonic saline solution. IMS was administered by subcutaneous injections of 1 ml IMS into the upper abdominal region three times per week (i.e. Monday, Wednesday, Friday). The patients were instructed to inject IMS themselves. The dosage of IMS was increased stepwise: 2×0.01 mg,

2×0.1 mg, 11×1 mg, 8×2 mg, remaining doses 5 mg. Dose-dependent inflammatory reactions at the injection site (redness, swelling, sometimes accompanied by itching) were monitored. If such reactions exceeded 5 cm in diameter, the dosage was decreased or the therapy was paused until the reactions had ceased. An average of 54.1 ± 2.3 injections with altogether 174.80 ± 26.34 mg of IMS per patient were administered in the IMS group.

Outcomes

Outcomes were quality of life and neutropenia. Quality of life was assessed using the European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire (EORTC-QLQ-C30) in the official Serbian translation.²⁰ The EORTC-QLQ-C30 has 30 questions and is analysed in 15 scores: six scores for functioning and nine symptom scores (Table 2). The EORTC-QLQ-C30 was documented by the patients at seven visits: before each CAF cycle and three weeks after the 6th CAF cycle. Neutropenia was defined as neutrophil count $<1,000/\mu\text{l}$ in the peripheral blood and assessed one day before each CAF cycle and three weeks after the 6th CAF cycle.

Assessment of adverse events (AE)

Adverse events were assessed by interviewing the patients and by analysing the laboratory results at each visit. Local reactions to IMS less than 5 cm in diameter were not considered as adverse events.

Sample size

A sample size of 90 patients (30 per group) was considered to be sufficient for this pilot study.

Blinding

The study was not placebo controlled because the typical and time-dependent reactions following s.c. injections of mistletoe extracts (reactions at the injection site, increased body temperature, flu-like symptoms) cannot be imitated by a pseudo-placebo.

Statistical methods

Statistical analysis (SPSS® 14.0) was performed on the intention-to-treat-population. An alternative analysis of the per-protocol sample, excluding one dropout patient in the control group, yielded very similar results



(data not shown). All results of the statistical analysis have exclusively hypothesis-generating character.

For each quality of life score (EORTC QLQ-C30), the mean change from baseline during follow-up in each group was compared between the IMS group, the group with the other mistletoe preparation and the control group, using nonparametric marginal models according to Brunner²¹ with therapy as whole-plot factor and time as sub-plot factor and a possible interaction between these two factors (results not shown). As a sensitivity assessment, a parametric covariance pattern model was also applied and found to qualitatively concur with the nonparametric results. For a better representability, the estimates of this parametric model will be shown. Post-hoc analyses of differences between the IMS group and control group were performed using the Dunnett T3-Test.

Neutropenia was assessed by measuring the number of patients with neutrophils $<1,000/\mu\text{l}$ during the study. For neutropenia, the group difference between IMS group and control group was analysed by Fisher's exact test according to the sequential rejective Holm procedure.

Adherence to regulations

The study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Research Center of Serbia without modifications (date: 3 October 2005) and by the Serbian Drug Agency (date: 01 November 2005). Due to its pilot character, this study was not registered in a public study registry. The study was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice guidelines, and national laws. A patient insurance was provided for all participants. All patients provided signed informed consent prior to inclusion. CRDT was responsible for planning, conduct, monitoring, and analysis of the study. Two audits at CRDT and one at the study site were performed by the two sponsors during the study. No violation of Good Clinical Practice was detected.

Results

Recruitment, participant flow, assessment, and numbers analysed

From 14 December 2005 to 15 February 2007 a total of 123 breast cancer patients were prescribed CAF and assessed for eligibility at the study centre IORS. 28 patients were not included and 95 patients were

included and randomized into 3 groups: CAF and IMS ($n = 30$), CAF and another mistletoe preparation ($n = 34$), and CAF without additional therapy ($n = 31$). One patient in the control group was withdrawn from further CAF therapy after three cycles of CAF because of heart disease (Fig. 1).

The EORTC-QLQ-C30 was evaluable for 99.5% (209 of 210) of visits in the IMS group, and for 97.2% (211 of 217) of visits in the control group. The neutrophil count was assessed at 99.5% (209 of 210) of visits in the IMS group and 98.2% (213 of 217) of visits in the control group.

Baseline data of the patient groups

The IMS group and the control group did not differ significantly regarding age, tumour stage, body mass index, physical status, vital signs, previous diseases, EORTC-QLQ-C30 scores (Table 1). No neutropenia was detected at baseline.

Quality of life during chemotherapy

During chemotherapy with CAF a deterioration of quality of life occurred in all 15 EORTC-QLQ-C30 scores in the control group and in six scores in the IMS group. A clinically relevant deterioration of at least 5 points was found in eight scores of the control group and in two scores in the IMS group (Table 3). The most pronounced deteriorations were observed for nausea/emesis (17.2 score points) and fatigue (8.2) after the 2nd cycle of CAF and insomnia (13.1) and diarrhoea (11.9) after the 3rd cycle.

In the adjusted analyses, mean differences from baseline were compared between the two groups for each EORTC-QLQ-C30 score: All 15 comparisons favoured the IMS group, 12 comparisons showed significant differences with p-values ranging from 0.017 to <0.001 . Clinically relevant differences of at least 5 points favouring the IMS group were observed for nine EORTC-QLQ-C30 scores (Table 2).

In descriptive analyses, the differences from baseline for each score at each of the six follow-up assessments were compared between the two groups: 86 out of 90 differences favoured the IMS group, while four differences favoured the control group (Fig. 2). Furthermore, the maximum between-group difference for each EORTC-QLQ-C30 score during follow-up was analysed: All 15 differences favoured the IMS group: maximum differences of at least 15 points

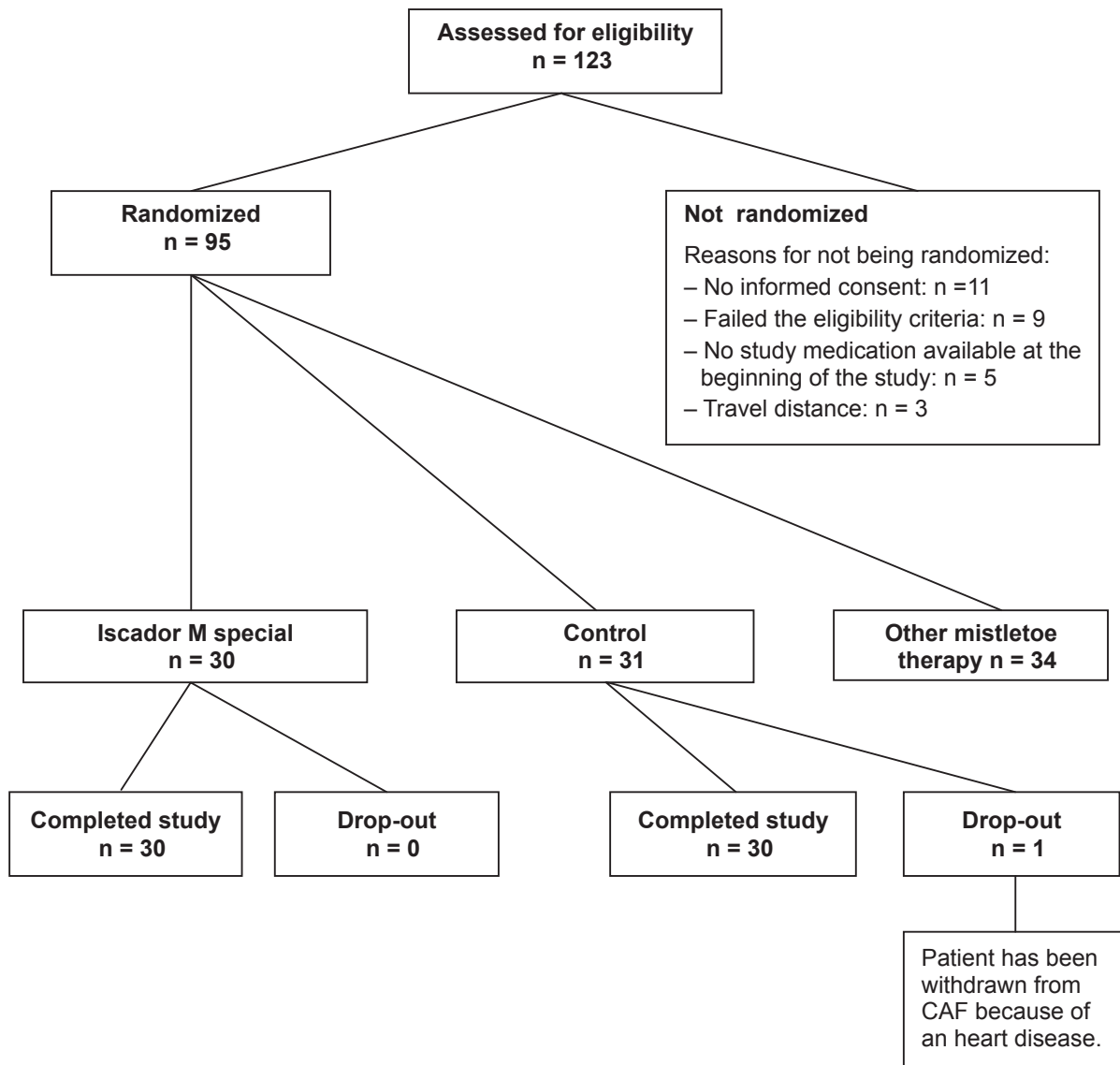


Figure 1. Detailed flow chart of the patient disposition.

were found in four scores (Role Function, Social Function, Pain, and Insomnia), 10–15 point differences were found in five scores (Global Health, Emotional function, Constipation, Diarrhoea, Appetite loss), and differences <10 points were found in the remaining six scores.

Neutropenia during chemotherapy

Neutropenia (<1,000/ μ l) was detected three times in three different patients of the IMS group and nine times in eight different patients of the control group. The patients with neutropenia are comparable across the groups (Table 3). Odds ratio for the proportion of patients with neutropenia in IMS group vs. control group was 0.32 (95% confidence interval 0.08–1.35).

Using Fisher's exact test according to the sequential rejective Holm procedure, a trend ($p = 0.182$) towards less neutropenia in the IMS group was found.

Adverse events related to IMS injections

Localized skin reactions to IMS exceeding 5 cm diameter occurred in six patients. The frequency of these reactions was 0.49% (eight reactions in 1,618 injections). No other adverse events related to IMS occurred.

Discussion

This randomized pilot study assessed quality of life (EORTC-QLQ-C30) and neutropenia in early breast cancer patients undergoing CAF chemotherapy.

**Table 1.** Baseline status.

	Group		p values
	IMS (n = 30)	Control (n = 31)	
Age in years (mean, \pm SD; t-test)	48.4 \pm 7.5	50.8 \pm 8.0	0.228
Tumour status (n; Chi square test)			
Tumour classification			0.879
T1	7	9	
T2	21	19	
T3	1	2	
Tx	1	1	
Pos. lymph nodes			0.343
N0	10	16	
N1	19	14	
N2	1	1	
Tumour grade			0.963
G1	1	1	
G2	24	24	
G3	5	6	
Menopause status (n; Kruskal-Wallis test)			0.349
Premenopausal	17	13	
Perimenopausal	2	1	
Postmenopausal	11	17	
Receptor status estrogen			0.714
+	20	17	
-	8	12	
Unknown	2	2	
Receptor status progesteron			1.000
+	18	19	
-	10	10	
Unknown	2	2	
Body Mass Index (mean, \pm SD; t-test)	27.0 \pm 6.3	25.6 \pm 4.7	0.709
Karnofsky-Index (mean, \pm SD)	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	
Abnormal findings on physical examination (n)	0	0	
Vital signs (mean, \pm SD; t-test)			
Blood pressure systolic mm(Hg)	130.0 \pm 20.0	132.2 \pm 19.0	0.661
Blood pressure diastolic mm(Hg)	81.7 \pm 12.5	83.6 \pm 13.6	0.568
Pulse (/m)	82.3 \pm 13.4	77.1 \pm 10.1	0.094
Temperature ($^{\circ}$ C)	36.5 \pm 0.1	36.6 \pm 0.1	0.268
Previous diseases (n)	0	0	
Primary endpoints			
Neutropenia (n)	0	0	

(Continued)

**Table 1.** (Continued)

	Group		p values
	IMS (n = 30)	Control (n = 31)	
EORTC-QLQ-C30 (mean, \pm SD; Mann-Whitney U-test)			
Global health status	67.8 \pm 20.4	68.5 \pm 18.3	0.868
Physical functioning	86.0 \pm 14.2	86.0 \pm 12.4	0.852
Role functioning	65.5 \pm 20.9	73.0 \pm 16.9	0.143
Emotional functioning	75.8 \pm 20.1	74.1 \pm 18.1	0.623
Cognitive functioning	85.0 \pm 20.7	79.3 \pm 23.4	0.267
Social functioning	76.7 \pm 19.4	80.5 \pm 18.9	0.424
Fatigue	22.6 \pm 17.2	25.7 \pm 19.5	0.593
Nausea and vomiting	3.4 \pm 9.3	2.9 \pm 7.8	0.959
Pain	21.7 \pm 21.5	16.1 \pm 20.6	0.210
Dyspnoea	4.6 \pm 14.7	3.4 \pm 10.3	0.965
Insomnia	16.8 \pm 21.1	23.0 \pm 31.0	0.557
Appetite loss	12.6 \pm 22.6	10.3 \pm 20.1	0.625
Constipation	7.8 \pm 14.3	6.9 \pm 13.7	0.808
Diarrhoea	2.2 \pm 8.5	2.3 \pm 8.6	0.972
Financial difficulties	23.3 \pm 23.4	20.7 \pm 30.1	0.358

Patients receiving IMS in addition to CAF had significantly better quality of life and showed a trend towards less neutropenia, compared to patients receiving CAF alone. IMS therapy was well tolerated.

Strengths of this study include a high recruitment rate, detailed assessments of therapy implementation, high therapy compliance, and very low dropout rates. Since 83% of eligible patients were included and randomized, the results of this study would seem to be generalizable to breast cancer patients (T₁₋₃N₀₋₂M₀) receiving CAF without any other concomitant therapies.

Due to the open-label design, the study cannot distinguish between direct drug effects on quality of life and possible indirect effects from therapy expectations, therapy administration etc. in the IMS group. This is a general limitation to all mistletoe studies: mistletoe injections frequently cause local reactions at the injection site, elevated body temperature and flu-like symptoms. These symptoms cease within hours or days after exposure and may recur on repeated injections. Therefore, patients and physicians can easily guess if mistletoe extracts are administered. This was confirmed in a double-blind

study, where all patients in the mistletoe group as well as their physicians were unblinded.¹⁶ A pseudo-placebo causing the same combination of time-limited symptoms—without specific effects on quality of life—has not yet been constructed.

Generally, medication trials are blinded to separate pharmacological effects from placebo effects. However, the lack of blinding may not necessarily have had relevant effects on the results of this study: An updated Cochrane review of randomised trials comparing placebo to no treatment found no significant placebo effects on eight out of ten evaluable indications, small effects on self-reported pain and moderate effects on phobia. Even these effects might have been confounded by biases.²²⁻²⁴

This study was designed as a pilot study, and the limited sample size of 30 patients per group does not allow for hypothesis confirmation. Nevertheless significant differences in 12 of 15 EORTC-QLQ-C30 scores favouring the IMS group were found. Nine of these scores showed a clinically relevant difference of at least 5 points. The latter scores include pain, nausea, emesis and insomnia, which are highly relevant symptoms in patients during chemotherapy with CAF.

**Table 2.** EORTC QLQ-C30 scores: mean change from baseline.

EORTC QLQ-C30 score	Mean change from baseline			95% Confidence interval	p-value
	IMS (n = 30)	Control (n = 31)	Difference		
Quality of life					
Global health status	2.77	-0.15	2.92	-2.15 to 7.98	0.393
Physical functioning	-0.52	-4.08	3.56	0.61 to 6.51	0.014*
Role functioning	12.88	-1.21	14.09	9.02 to 19.16	<0.001*
Emotional functioning	3.73	-2.62	6.35	2.15 to 10.54	0.001*
Cognitive functioning	1.81	-2.28	4.10	-0.33 to 8.53	0.076
Social functioning	2.08	-5.66	7.74	3.37 to 12.12	<0.001*
Fatigue	0.93	5.84	-4.92	-8.78 to -1.05	0.009*
Nausea and vomiting	7.02	14.60	-7.58	-12.25 to -2.91	0.001*
Pain	-9.81	2.66	-12.47	-16.85 to -8.08	<0.001*
Dyspnoea	-2.32	1.38	-3.70	-6.79 to -0.60	0.015*
Insomnia	-2.53	5.72	-8.25	-13.42 to -3.09	0.001*
Appetite loss	-1.35	5.30	-6.64	-12.28 to -1.01	0.017*
Constipation	7.21	8.33	-1.12	-6.53 to 4.29	1.000
Diarrhoea	0.16	6.27	-6.11	-9.47 to -2.75	<0.001*
Financial difficulties	2.10	11.04	-8.94	-14.21 to -3.67	<0.001*

Difference of the mean of all six follow-up assessments from the baseline: better quality of life is indicated by higher values in the first six scores and by lower scores in the following nine symptom scores.

*Significant difference in the post hoc Dunnett test.

Table 3. List of patients experiencing a neutropenia during CAF.

Group	ID	Visit no.	Date (Visit)	Age	Stage	T	N	M	G	Leucocytes/nl	Neutrophils/nl
IMS	37	7	20/10/2006	60	2	2	1	0	2	2.9	0.9
	44	7	03/11/2006	44	2	3	1	0	2	1.8	0.4
	60	2	18/09/2006	51	2	1	0	0	2	6.7	0.6
Control	13	3	26/04/2006	32	2	2	1	0	2	2.8	0.9
	33	5	29/08/2006	60	2	2	0	0	2	2.4	0.9
	51	7	08/12/2006	66	2	2	1	0	2	1.3	0.3
	56	7	21/12/2006	53	2	2	1	0	2	3.5	0.9
	62	7	31/01/2007	62	2	1	1	0	2	2.5	0.8
	66	7	23/01/2007	44	1	1	0	0	2	2.4	0.8
	87	6	26/03/2007	45	2	2	1	0	2	3.3	0.3
	90	6	29/03/2007	52	2	1	0	0	3	2.6	0.8
	90	7	19/04/2007	52	2	1	0	0	3	2.7	0.9

Three patients of the IMS group and eight patients of the control group. Experienced a neutropenia ($p = 0.182$; 2-sided Fishers exact test).

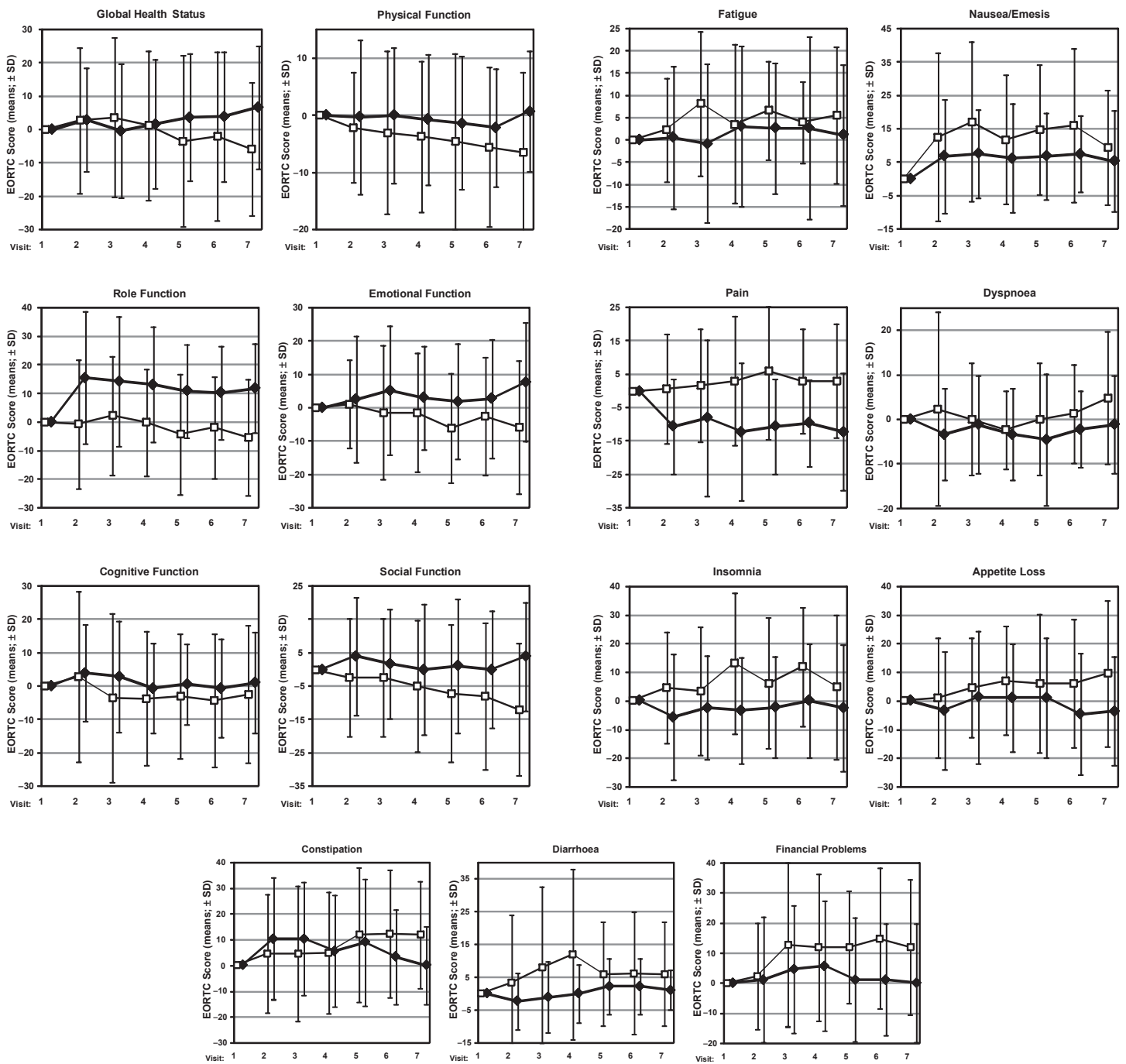


Figure 2. Graphs of the 15 scores of the EORTC-QLQ-C30. The filled markers \blacklozenge represent the IMS group whereas the empty squares \square represent the control group. The mean difference from baseline of the EORTC score (mean; \pm SD) is displayed for each visit. In the 6 function scores a higher quality of life is represented by higher values. In the 9 symptom scores a higher quality of life is represented by lower values.

An important problem which may occur during chemotherapy with CAF is neutropenia. Neutropenia is the limiting factor for a continuing chemotherapy and may be harmful to the patients. This study is the first randomized trial providing data on the incidence of CAF-induced neutropenia during additive therapy with IMS. A trend towards less neutropenia in the IMS

group was found. This should be further investigated in confirmatory studies with adequate sample size. It is recommended to include measurements of neutrophils on day 7, 9 and day 11 after chemotherapy in order to assess the nadir of the neutropenia during CAF therapy.

Future studies of mistletoe effects on quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy



should also include specific instruments to assess cancer-related fatigue and pain. In our study the effects of IMS on quality of life increased over time with the largest effects observed at the last follow-up visit. A longer follow-up period of 6–12 months might show additional long term benefits of IMS therapy.

Conclusions

In this randomized pilot study, additional treatment with mistletoe therapy (Iscador® M special) improved quality of life and showed a trend towards reduction of neutropenia in patients with early breast cancer receiving CAF chemotherapy. These promising results should be confirmed in a larger study.

Abbreviations

CAF, cyclophosphamide; adriamycin, and 5-fluorouracil; CRDT, Clinical Research Dr. Tröger; DI, dose intensity; EORTC-QLQ-C30, European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire; IMS, Iscador® M special; IORS, Institute of Oncology and Radiology; National Cancer Research Centre of Serbia in Belgrade.

Competing Interests

The part of the study that is reported here was financially supported by the Society for Cancer Research, Arlesheim, Switzerland. The sponsor had no influence on study design, planning, conduct or analysis. The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors' Contributions

MM was the responsible principal investigator. SJ and ZZ were investigators. NT carried out the blood analysis. HJH was medical advisor and contributed to manuscript revision. WT was principal author of the paper, wrote the study protocol, coordinated the study, had full access to all data, and is guarantor. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Petra Siemers, Anja Glockmann, and Claudia Bihl for monitoring and data management, Biostatistik Fischer for statistical analyses, and Dušanka Jelecanin for the coordination of the patients on site. Special thanks go to the study

nurses Milijana Sokol and Zorica Randelović and the participating patients.

References

- Ganz PA, Kwan L, Stanton AL, et al. Quality of life at the end of primary treatment of breast cancer: first results from the moving beyond cancer randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2004 March 3;96(5):376–87.
- de Jong N, Candel MJ, Schouten HC, Abu-Saad HH, Courtens AM. Prevalence and course of fatigue in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 2004 June;15(6):896–905.
- de Jong N, Candel MJ, Schouten HC, Abu-Saad HH, Courtens AM. Course of mental fatigue and motivation in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 2005 March;16(3):372–82.
- Goldstein D, Bennett B, Friedlander M, Davenport T, Hickie I, Lloyd A. Fatigue states after cancer treatment occur both in association with, and independent of, mood disorder: a longitudinal study. *BMC Cancer.* 2006 October 9;6:240.
- Kuo HH, Chiu MJ, Liao WC, Hwang SL. Quality of sleep and related factors during chemotherapy in patients with stage I/II breast cancer. *J Formos Med Assoc.* 2006 January;105(1):64–9.
- Butt Z, Rosenbloom SK, Abernethy AP, et al. Fatigue is the most important symptom for advanced cancer patients who have had chemotherapy. *J Natl Compr Canc Netw.* 2008 May;6(5):448–55.
- Mock V, Atkinson A, Barsevick A, et al. NCCN Practice Guidelines for Cancer-Related Fatigue. *Oncology (Williston Park).* 2000 November;14(11A):151–61.
- Heiny BM. Additive Therapie mit standardisiertem Mistelextrakt reduziert die Leukopenie und verbessert die Lebensqualität von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom unter palliativer Chemotherapie (VEC-Schema). *Krebsmedizin.* 1991;12(Sonderdruck):1–14.
- Heusser P, Braun SB, Ziegler R, et al. Palliative in-patient cancer treatment in an anthroposophic hospital: I. Treatment patterns and compliance with anthroposophic medicine. *Forsch Komplementarmed.* 2006 April;13(2):94–100.
- Piao BK, Wang YX, Xie GR, et al. Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial. *Anticancer Res.* 2004 January;24(1):303–9.
- Semiglasov VF, Stepula VV, Dudov A, Lehmacher W, Mengs U. The standardised mistletoe extract PS76A2 improves QoL in patients with breast cancer receiving adjuvant CMF chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial. *Anticancer Res.* 2004 March;24(2C):1293–302.
- Semiglasov VF, Stepula VV, Dudov A, Schnitker J, Mengs U. Quality of life is improved in breast cancer patients by Standardised Mistletoe Extract PS76A2 during chemotherapy and follow-up: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial. *Anticancer Res.* 2006 March;26(2B):1519–29.
- Büssing A, Schietzel M, Regnery A, Schweizer K. The dual role of *Viscum album L.* effects: cytostatic and DNA stabilizing properties. *Eur J Allerg Clin Immun.* 1995;26:9.
- Büssing A, Regnery A, Schweizer K. Effects of *Viscum album L.* on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells in vitro: sister chromatid exchanges and activation/proliferation marker expression. *Cancer Lett.* 1995 August 1;94(2):199–205.
- Büssing A, Jurin M, Zarkovic N, Azhari T, Schweizer K. DNA-stabilisierende Wirkungen von *Viscum album L.*—Sind Mistelextrakte als Adjuvans während der konventionellen Chemotherapie indiziert? *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 1996;3:244–8.
- Auerbach L, Dostal V, Václavik-Fleck I, et al. Signifikant höherer Anteil aktivierter NK-Zellen durch additive Misteltherapie bei chemotherapierten Mamma-CA-Patientinnen in einer prospektiven randomisierten doppelblinden Studie. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Fintelmann V, Kemper FH, Schilcher H, editors. *Fortschritte in der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinischen Anwendung.* Essen: KCV Verlag; 2005. p. 543–54.



17. Gerhard I. Problems of randomised treatment studies in complementary medicine. *Forschende Komplementärmedizin* 7, 34–35. 2000. Ref Type: Abstract.
18. Rostock M, Huber R. Randomized and double-blind studies—demands and reality as demonstrated by two examples of mistletoe research. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2004 August;11(Suppl.1):18–22.
19. Ziegler R. Mistletoe Preparation Iscador: Are there Methodological Concerns with Respect to Controlled Clinical Trials? *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007 October 4; Open Access Article, doi:10.1093/ecam/nem121:1–12. Available at: URL: PM:18955241.
20. Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst*. 1993 March 3;85(5):365–76.
21. Brunner E, Langer F. *Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten*. München: Oldenbourg Verlag; 1999.
22. Hrobjartsson A, Gotzsche PC. Is the placebo powerless? An analysis of clinical trials comparing placebo with no treatment. *N Engl J Med*. 2001 May 24;344(21):1594–602.
23. Hrobjartsson A, Gotzsche PC. Is the placebo powerless? Update of a systematic review with 52 new randomized trials comparing placebo with no treatment. *J Intern Med*. 2004 August;256(2):91–100.
24. Hrobjartsson A, Gotzsche PC. Placebo interventions for all clinical conditions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(3):CD003974.

Publish with Libertas Academica and every scientist working in your field can read your article

“I would like to say that this is the most author-friendly editing process I have experienced in over 150 publications. Thank you most sincerely.”

“The communication between your staff and me has been terrific. Whenever progress is made with the manuscript, I receive notice. Quite honestly, I’ve never had such complete communication with a journal.”

“LA is different, and hopefully represents a kind of scientific publication machinery that removes the hurdles from free flow of scientific thought.”

Your paper will be:

- Available to your entire community free of charge
- Fairly and quickly peer reviewed
- Yours! You retain copyright

<http://www.la-press.com>



Efekti ekstrakta bele imele na markere aktivacije i agregacije trombocita

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

¹Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenje eksperimentalne onkologije

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

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

⁴Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

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

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

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

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

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

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

UVOD

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

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

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

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

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

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

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

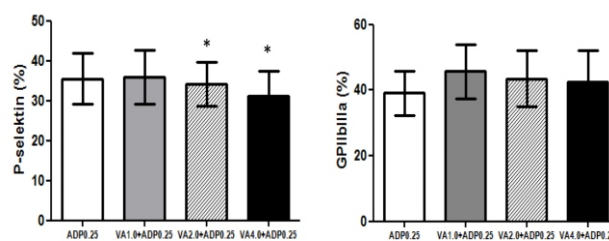
MATERIJAL I METODE

Ekstrakt bele imele

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

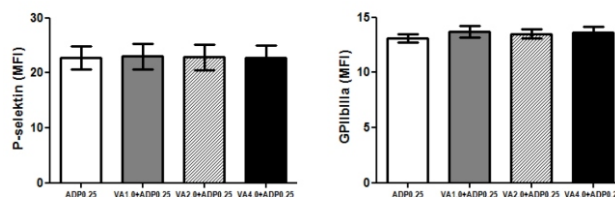
Ćelijske linije u kulturi

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



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

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



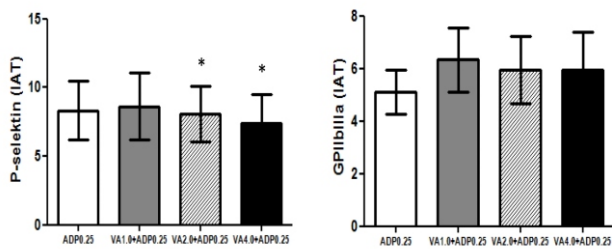
GRAFIKON 2
EFEKAT TRETMANA EKSTRAKTOM BELE IMELE NA RESPODELU GUSTINE P-SELEKTINA I GPIIb-IIIa NA AKTIVIRANIM TROMBOCITIMA.

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

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

Određivanje sadržaja ukupnih protein i fenola

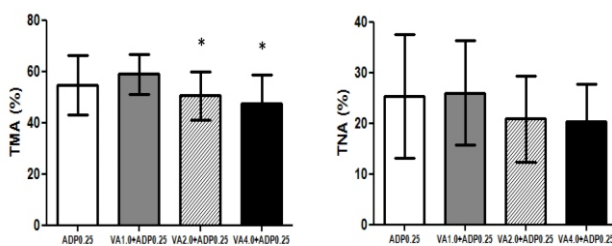
Sadržaj ukupnih proteina u vodenom ekstraktima bele imele određivan je spektrofotometrijski Bradford-ovom mikro metodom⁴⁵, a sadržaj ukupnih fenola reakcijom sa Folin Ciocalteu (FC) reagensom^{46,47}. Rezultati sadržaja fenola su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po gramu vodenog ekstrakta



GRAFIKON 3

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

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



GRAFIKON 4

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

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

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

Uzorkovanje krvi

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

Određivanje parametara aktivacije trombocita u in vitro eksperimentalnim uslovima

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

Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima- in vitro

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

Diferencijacija THP-1 ćelija

2.5x10⁵ THP-1 ćelije/mL su tretirane vitaminom D3 pri koncentraciji od 100 nM, 72 sata. Nakon 72 sata tretmana ćelije su isprane dva puta RPMI 1640 medijumom, kako bi se odstranio vitamin D₃, i tako diferencirane ćelije su kasnije polarizovane LPS-om.

Određivanje aktivacije monocita u kulturi merenjem produkcije TNF α

0.5x10⁵ THP-1 ćelije/otvoru mikrotitar ploče tretirane su u trajanju od 1 h na 37°C različitim koncentracijama ekstrakta bele imele (2.0, 4.0, 8.0 μ g/mL), nakon čega su stimulisane sa 1 μ g/mL LPS-a u trajanju od četiri sata na 37°C. Kao kontrola korišćene su netretirane nestimulisane THP-1 ćelije i tretirane nestimulisane THP-1 ćelije. Delovanje ekstrakata poređeno je sa netretiranim

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

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

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

REZULTATI

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

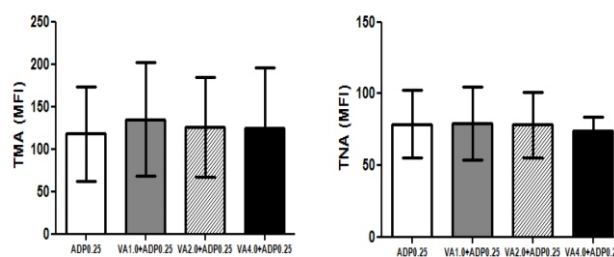
Uticaj ekstrakta bele imele (1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa *in vitro*, ispitivan je u uzorcima krvi 6 zdravih ispitanika, nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 μM). Dobijeni rezultati, u uzorcima pune krvi tretirane ekstraktom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

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

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

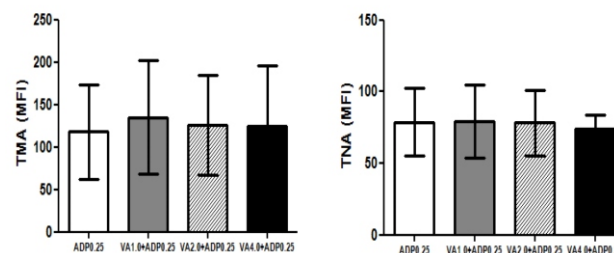
Pokazano je da smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita nije bilo praćeno smanjenjem gustine P-selektina. Istovremeno, nije uočeno delovanje ekstrakta bele imele na gustinu GPIIbIIIa.

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



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

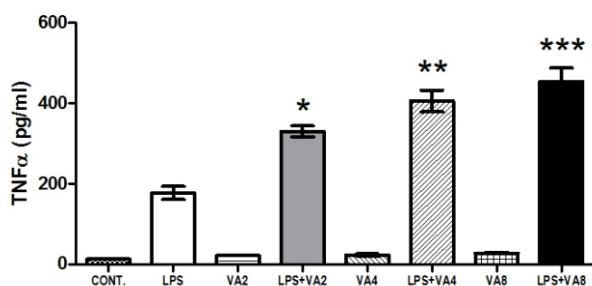
(Gustina trombocita na monocitima i neutrofilima u ukupnoj populaciji monocita, odnosno neutrofila nakon delovanja suboptimalne koncentracije ADP-a (0.25 μM) u uzorcima prethodno tretiranim ekstraktom bele imele (1.0, 2.0 i 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ukupnih proteina) u odnosu na kontrolu, određivana je metodom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



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

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

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



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

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

Uticaj ekstrakta bele imele na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima

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

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

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

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

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

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

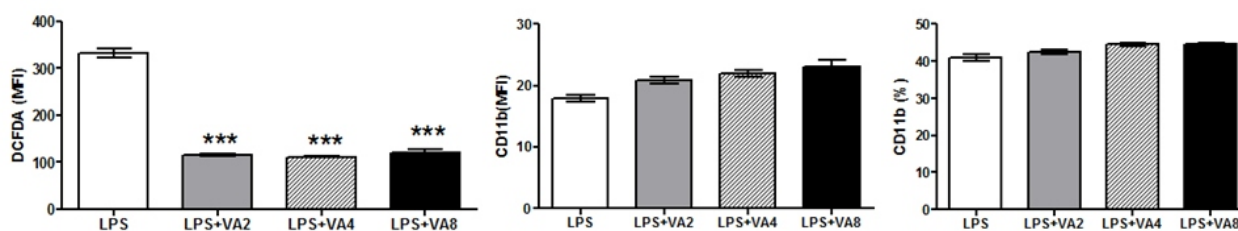
Uticaj ekstrakta bele imele na nivo slobodnih kiseoničnih radikala i ekspresiju CD11b u monocitima/makrofaga u kulturi

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

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

DISKUSIJA

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



GRAFIKON 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZAKLJUČAK

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

SUMMARY

EFFECTS OF MISTLETOE EXTRACT ON MARKERS OF PLATELET ACTIVATION AND AGGREGATION

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

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

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

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

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

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

REFERENCE

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

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

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

Skraćenice

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

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

Biografija

Nevena Tišma rođena je 15. januara 1973. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1991. godine, a diplomirala 1999. godine sa srednjom ocenom 8.51 i time stekla zvanje Diplomiranog biologa. Doktorske studije upisala je februara 2007. godine. Od avgusta 2000. godine zaposlena je na Odeljenju eksperimentalne onkologije Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Učestvovala je u radu jednog projekta koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Autor je jednog rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jednog rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 2 rada u međunarodnim časopisima (M23), 3 saopštenja sa međunarodnih skupova i 3 rada u domaćim časopisima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Невена Тишма _____

Број индекса _____ АВ060141 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање имуномодуlatorног и цитотоксичног ефекта воденог екстракта беле имеле (*Viscum album L.*) *in vitro* и у пацијенткиња на терапији антрациклинским хемиотерапеутицима“

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Невена Тишма

Број индекса: АВ060141

Студијски програм: Имунобиологија

Наслов рада: „Испитивање имуномодуlatorног и цитотоксичног ефекта воденог екстракта беле имеле (*Viscum album L.*) *in vitro* и у пацијенткиња на терапији антрациклинским хемиотерапеутицима“

Ментор: др Биљана Божић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Татјана Срдић-Рајић, виши научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Испитивање имуномодулаторног и цитотоксичног ефекта воденог екстракта беле имеле (*Viscum album* L.) *in vitro* и у пацијенткиња на терапији антрациклинским хемиотерапеутицима“ која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____
