

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mihajlo N. Bošnjak

**ULOGA AUTOFAGIJE U  
ANTILEUKEMIJSKOM DEJSTVU  
CITARABINA I IDARUBICINA *IN VITRO***

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Mihajlo N. Bošnjak

**THE ROLE OF AUTOPHAGY IN THE *IN VITRO* ANTILEUKEMIC EFFECT OF  
CYTARABINE AND IDARUBICIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTOR:

**Prof. dr Vladimir Bumbaširević**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

KOMENTOR:

**dr Ljubica Harhaji Trajković**, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Aleksandra Isaković**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **dr Gordana Tovilović Kovačević**, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
3. **Prof. dr Dejan Baskić**, vanredni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru programa Molekularna medicina, na doktorskim studijama, na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju, Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i na Institutu za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekata Ministarstva nauke Republike Srbije br. III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković i br. 173053 „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“, čiji je rukovodilac dr Ljubica Harhaji Trajković.

*Zahvaljujem se*

*svom mentoru, akademiku prof. dr Vladimiru Bumbašireviću i svom komentoru, dr Ljubici Harhaji-Trajković na podršci i pomoći u razvoju moje naučno-istraživačke karijere, kao i neposrednom rukovođenju pri izradi i pisanju doktorske disertacije i radova koji su iz nje proistekli, a pre svega na ukazanom velikom poverenju,*

*prof. dr Vladimiru Trajkoviću na izuzetnoj pomoći i dragocnim sugestijama u svim fazama izrade ove doktorske disertacije,*

*poštovanim članovima komisije prof. dr Aleksandri Isaković, dr Gordani Tovilović Kovačević i prof. dr Dejanu Baskiću na uloženom trudu i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije,*

*dr Anđelki Isaković, dr Vladimiru Peroviću i prof. dr Andriji Bogdanoviću na stručnim savetima i iskrenoj podršci pri izradi i pisanju disertacije,*

*svim koleginicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije,*

*Anji, Momčilu i Matiji na bezgraničnoj veri, razumevanju i безусловnoj podršci koju su mi pružili tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*mojoj Bojani*

## Uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina *in vitro*

### Rezime

Autofagija, proces programirane ćelijske razgradnje unutarćelijskog sadržaja, je uključena u regulaciju preživljavanja i smrti ćelija kancera. U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put ispitivana sposobnost antileukemijskih lekova citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju u različitim humanim leukemijskim ćelijskim linijama i mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNPK) pacijenata obolelih od leukemije *in vitro*. Takođe, ispitivani su unutarćelijski mehanizmi odgovorni za indukciju autofagije, kao i uloga autofagije u citotoksičnosti ovih lekova.

Vijabilitet REH, HL-60, K562 leukemijskih ćelijskih linija, MNPK pacijenata obolelih od leukemije i MNPK zdravih kontrola je određivan merenjem aktivnosti kisele fosfataze i mitohondrijalnih dehidrogenaza. Protočna citofluorimetrija je korišćena za detekciju apoptoze i zakišeljavanja citoplazme. Indukcija autofagije je ispitivana fluorescentnom mikroskopijom (detekcija unutarćelijskih kiselih vezikula obojenih akridin oranžom), transmisionom elektronskom mikroskopijom (posmatranje autofagnih vezikula) i imunoblot analizom (konverzija LC3-I u LC3-II, degradacija SQSTM1/p62). Aktivacija signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji autofagije je analizirana imunoblot metodom. Uloga autofagije u citotoksičnosti citarabina i idarubicina je ispitivana primenom farmakološke inhibicije bafilomicinom A1, hlorokinom, vortmaninom i amonijum hloridom, kao i genetske inaktivacije ekspresije beklina-1, LC3 $\beta$  i SQSTM1 transfekcijom odgovarajućim malim interferirajućim RNK.

Citarabin i idarubicin su izazvali povećanje unutarćelijske kiselosti i pojavu autofagnih vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem u leukemijskim ćelijskim linijama. Antileukemijski lekovi su stimulisali razgradnju supstrata autofagije SQSTM1 i povećali konverziju LC3-I u LC3-II formu asociiranu autofagozomima u odsustvu ili prisustvu inhibitora proteolize, ukazujući tako na povećanje autofagnog fluksa. Oba leka su smanjila fosforilaciju mTOR kinaze, glavnog negativnog regulatora autofagije i njegovog supstrata p70S6 kinaze, dok je tretman mTOR aktivatorom leucinom sprečio indukciju autofagije. Idarubicin je suprimirao aktivnost mTOR aktivatora Akt kinaze i stimulisao aktivnost protein kinaze aktivirane adenozin-

monofosfatom (AMPK). Sa druge strane, citarabin je inhibirao Akt, dok je aktivacija AMPK i MAP kinaze ERK zavisila od tipa leukemijskih ćelija. Farmakološka i genetska inhibicija autofagije su značajno povećale oksidativni stres, depolarizaciju mitohondrija, aktivaciju kaspaza, fragmentaciju DNK i izazvale apoptozu u leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom. Sa druge strane, supresija autofagije je smanjila proapoptotske promene u leukemijskim ćelijskim linijama tretiranim idarubicinom. Takođe, citarabin je indukovao citoprotektivnu, dok je idarubicin indukovao citotoksičnu autofagiju u MNPK leukemijskih pacijenata, ali ne i zdravih kontrola.

Ova studija je pokazala da je supresija citarabinom indukovane Akt/mTOR zavisne autofagije stimulisala apoptozu leukemijskih ćelija, sugerišući da bi se inhibitori autofagije mogli koristiti u terapiji za senzitivizaciju leukemijskih ćelija na citarabin, smanjujući tako njegovu efektivnu dozu i neželjene efekte. Sa druge strane, pokazano je da autofagni odgovor pokrenut AMPK/Akt-zavisnom mTOR inhibicijom doprinosi citotoksičnom efektu idarubicina. Kako se klinički odobren inhibitor autofagije hlorokin uveliko razmatra za tretman hematoloških maligniteta u kombinaciji sa različitim hemioterapeuticima, rezultati ove studije ukazuju da treba biti oprezan sa njegovom primenom u terapijskim protokolima koji se baziraju na idarubicinu.

**Ključne reči:** citotoksična/citoprotektiva autofagija; citarabin; idarubicin; leukemija; apoptoza

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

**UDK broj:**



## **The role of autophagy in the *in vitro* antileukemic effect of cytarabine and idarubicin**

### **Abstract**

Autophagy, a process of programmed cellular self-digestion, has been implicated in regulation of cancer cell survival and death. The present study investigated for the first time the ability of antileukemic drugs cytarabine and idarubicin to induce autophagy in different human leukemic cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from leukemia patients *in vitro*. Intracellular mechanisms responsible for the induction of autophagy, as well as the role of autophagy in cytotoxicity of these drugs were also investigated.

Cell viability of REH, HL-60, K562 leukemic cell lines, and PBMC from leukemic patients and healthy controls was determined by measuring the acid phosphatase and mitochondrial succinate dehydrogenase activity. Flow cytometry was used for the detection of apoptosis and intracellular acidification. Autophagy induction was assessed by fluorescent microscopy (detection of acridine orange stained intracellular acidic vesicles), by transmission electron microscopy (observation of autophagic vacuoles), as well as by immunoblot analysis of LC3 conversion and SQSTM1/p62 proteolysis. Activation of autophagy-regulating signaling pathways was analyzed by immunoblotting. Pharmacological inhibition of autophagy with bafilomycin A1, chloroquine, wortmannin, and NH<sub>4</sub>Cl or RNA interference-mediated knockdown of beclin-1, LC3 $\beta$  and SQSTM1 were used to determine the role of the autophagy in cytotoxicity of antileukemic drugs.

Cytarabine and idarubicin induced an increase in intracellular acidification and appearance of autophagic vesicles with partially digested cellular components in leukemic cell lines. Antileukemic drugs stimulated the degradation of autophagic target SQSTM1 and enhanced the conversion of LC3-I to autophagosome-associated LC3-II in the absence or presence of proteolysis inhibitors, thus indicating the increase in autophagic flux. Both drugs reduced the phosphorylation of the major negative regulator of autophagy mammalian target of rapamycin (mTOR), and its downstream target

p70S6 kinase, while the treatment with the mTOR activator leucine prevented autophagy induction. Idarubicin suppressed activity of mTOR activator Akt and stimulated mTOR inhibitor AMP-activated protein kinase (AMPK). On the other hand, cytarabine inhibited Akt, while the activation of AMPK and MAP kinase ERK was leukemic cell type dependent. Pharmacological and genetic inhibition of autophagy markedly increased oxidative stress, mitochondrial depolarization, caspase activation, DNA fragmentation and apoptotic cell death in cytarabine-treated leukemic cells. However, autophagy suppression down-regulated proapoptotic changes in leukemic cell lines treated with idarubicin. Moreover, cytarabine induced cytoprotective, while idarubicin induced cytotoxic autophagy in PBMC from leukemic patients but not healthy controls.

This study demonstrates that the suppression of Akt/mTOR-dependent autophagy stimulates cytarabine-induced apoptotic death of leukemic cells, suggesting that autophagy-inhibiting drugs might be used to sensitize leukemic cells to cytarabine based therapy, thus decreasing its effective dose and ameliorating its side effects. On the other hand, our data indicate that autophagic response triggered by AMPK/Akt-dependent mTOR inhibition might contribute to idarubicin-mediated killing of leukemic cells. As clinically approved autophagy inhibitor chloroquine is currently being considered in the treatment of hematological malignancies in combination with different chemotherapeutics, our results warrant caution when considering its use in idarubicin-based therapeutic protocols.

**Keywords:** cytotoxic/citoprotective autophagy; cytarabine; idarubicin; leukemia; apoptosis

**Research area:** Medicine

**Research field:** Molecular medicine

**UDC number:**

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Leukemije: značaj, podela i terapija .....	1
1.2. Citarabin.....	3
1.3. Idarubicin .....	5
1.4. Apoptoza.....	7
1.5. Autofagija .....	10
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	15
3. MATERIJAL I METODE .....	16
3.1. Reagensi i rastvori .....	16
3.2. Čelije i ćelijske kulture .....	17
3.3. Određivanje ćelijskog vijabiliteta .....	19
3.3.1. Test aktivnosti kisele fosfataze .....	20
3.3.2. MTT test.....	21
3.4. Analiza morfoloških promena ćelija.....	21
3.4.1. Fazno kontrastna mikroskopija .....	21
3.4.2. Invertna fluorescentna mikroskopija.....	22
3.4.3. Konfokalna fluorescentna mikroskopija .....	22
3.4.4. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) .....	23
3.5. Ispitivanje parametara ćelijske smrti i oksidativnog stresa metodom protočne citofluorimetrije.....	23
3.5.1. Detekcija apoptoze i nekroze .....	24
3.5.2. Ispitivanje faza ćelijskog ciklusa i fragmentacije DNK molekula.....	25
3.5.3. Ispitivanje aktivacije kaspaza.....	26
3.5.4. Ispitivanje produkcije superoksidnog anjona.....	27

3.5.5. Ispitivanje promene membranskog potencijala mitohondrija .....	28
3.5.6. Ispitivanje unutarćelijskog zakišeljavanja.....	28
3.6. Imunoblot analiza .....	29
3.7. Transfekcija malom interferirajućom RNK.....	32
3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za Atg4, Atg5, Atg7, Atg12 i p62.....	33
3.8.1. Izolacija RNK.....	33
3.8.2. Reverzna transkripcija.....	34
3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu.....	35
3.9. Statistička analiza podataka .....	36
4. REZULTATI .....	37
4.1. Citarabin indukuje apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza u REH leukemijskim ćelijama .....	37
4.1.1. Citarabin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija.....	37
4.1.2. Citarabin stimuliše premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane REH leukemijskih ćelija.....	38
4.1.3. Citarabin izaziva fragmentaciju DNK molekula u REH leukemijskim ćelijama .....	39
4.1.4. Citarabin aktivira kaspaze u REH leukemijskim ćelijama.....	40
4.1.5. Citarabinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana depolarizacijom mitohondrijalne membrane .....	41
4.1.6. Citarabinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana oksidativnim stresom .....	42
4.2. Citarabin indukuje autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.....	43
4.2.1. Citarabin podstiče unutarćelijsku acidifikaciju REH leukemijskih ćelija...	43
4.2.2. Citarabin indukuje stvaranje autofagnih vezikula u REH leukemijskim ćelijama .....	45

4.2.3. Citarabin stimuliše konverziju LC3 i razgradnju p62, ali ne utiče na ekspresiju beclin-1 proteina u REH leukemijskim ćelijama.....	47
4.2.4. Citarabin stimuliše autofagni fluks u REH leukemijskim ćelijama.....	48
4.2.5. Autofagija indukovana citarabinom u REH leukemijskim ćelijama je posredovana inhibicijom mTOR kinaze i modulacijom aktivnosti Akt i ERK proteina.....	50
4.2.6. Inhibicija mTOR kinaze je ključna u indukciji autofagije citarabinom.....	51
4.2.7. Citarabin indukuje ekspresiju ATG gena u REH leukemijskim ćelijama...	52
4.3. Autofagija štiti leukemijske ćelije od apoptoze indukovane citarabinom.....	53
4.3.1. Citarabin indukuje protektivnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.	53
4.3.2. Autofagija štiti REH ćelije od apoptoze indukovane citarabinom.....	54
4.3.3. Autofagija inhibira aktivaciju kaspaza stimulisanu citarabinom u REH leukemijskim ćelijama .....	55
4.3.4. Autofagija suprimira oksidativni stres i depolarizaciju mitohondrija indukovanu citarabinom u REH leukemijskim ćelijama .....	56
4.3.5. Transfekcija REH ćelija malom interferirajućom RNK za LC3 i p62 smanjuje ekspresiju ovih autofagnih proteina.....	57
4.3.6. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena smanjuje citarabinom indukovano zakišeljavanje citoplazme u REH ćelijama.....	58
4.3.7. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava toksičnost citarabina prema REH leukemijskim ćelijama .....	59
4.3.8. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava apoptozu indukovanu citarabinom u REH leukemijskim ćelijama .....	60
4.3.9. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim citarabinom .....	61
4.3.10. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim citarabinom.....	62

4.3.11. Citarabin stimuliše LC3 konverziju i degradaciju p62 proteina u drugim leukemijskim ćelijama, ali ne i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola .....	63
4.3.12. Autofagija indukovana citarabinom posredovana je inhibicijom mTOR kinaze i modulacijom aktivnosti Akt, AMPK i ERK kinaza u leukemijskim ćelijama .....	65
4.3.13. Supresija autofagije farmakološkim inhibitorima povećava toksičnost citarabina prema različitim leukemijskim ćelijama .....	67
4.4. Idarubicin indukuje apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza u REH leukemijskim ćelijama .....	69
4.4.1. Idarubicin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija .....	69
4.4.2. Idarubicin dovodi do morfoloških promena u REH leukemijskim ćelijama .....	70
4.4.3. Idarubicin dovodi do fragmentacije DNK molekula u REH leukemijskim ćelijama .....	71
4.4.4. Idarubicin stimuliše premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane REH leukemijskih ćelija .....	72
4.4.5. Idarubicin izaziva aktivaciju kaspaza u REH leukemijskim ćelijama .....	73
4.4.6. Idarubicinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana depolarizacijom mitohondrijalne membrane .....	73
4.4.7. Idarubicinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana oksidativnim stresom .....	74
4.5. Idarubicin indukuje autofagiju u REH leukemijskim ćelijama .....	75
4.5.1. Idarubicin podstiče unutarćelijsku acidifikaciju u REH leukemijskim ćelijama .....	75
4.5.2. Idarubicin indukuje stvaranje autofagnih vezikula u REH leukemijskim ćelijama .....	76

4.5.3. Idarubicin stimuliše agregaciju LC3 proteina u REH leukemijskim ćelijama .....	77
4.5.4. Idarubicin stimuliše konverziju LC3 i razgradnju p62 proteina u REH leukemijskim ćelijama .....	78
4.5.5. Idarubicin stimuliše autofagni fluks u REH leukemijskim ćelijama .....	79
4.5.6. Autofagija indukovana idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama je posredovana inhibicijom mTOR kinaze i modulacijom aktivnosti AMPK i Akt proteina.....	81
4.5.7. Inhibicija mTOR kinaze je ključna u indukciji autofagije idarubicinom....	82
4.6. Idarubicin indukuje toksičnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.....	83
4.6.1. Autofagija smanjuje idarubicinom indukovanu apoptozu u REH leukemijskim ćelijama .....	84
4.6.2. Autofagija indukuje aktivaciju kaspaza stimulisanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama .....	85
4.6.3. Autofagija stimuliše oksidativni stres i depolarizaciju mitohondrija indukovanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama .....	86
4.6.4. Transfekcija REH ćelija malom interferirajućom RNK za LC3 i beclin-1 smanjuje ekspresiju ovih autofagnih proteina.....	87
4.6.5. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje zakišeljavanje citoplazme indukovano idarubicinom u REH ćelijama .....	88
4.6.6. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje toksičnost idarubicina prema REH leukemijskim ćelijama .....	89
4.6.7. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje apoptozu indukovanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama .....	90
4.6.8. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim idarubicinom .....	91
4.6.9. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim idarubicinom .....	92

4.6.10. Idarubicin stimuliše LC3 konverziju i degradaciju p62 proteina u drugim leukemijskim ćelijama, ali ne i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola .....	93
4.6.11. Supresija autofagije farmakološkim inhibitorima smanjuje toksičnost idarubicina u različitim leukemijskim ćelijama .....	95
5. DISKUSIJA .....	98
6. ZAKLJUČCI .....	112
7. LITERATURA .....	113



# 1. UVOD

## 1.1. Leukemije: značaj, podela i terapija

Tumori su patološke tvorevine koje nastaju nekontrolisanom deobom maligno transformisanih ćelija. Maligna transformacija podrazumeva postepenu akumulaciju genetskih promena koje omogućavaju novonastaloj neoplastičnoj ćeliji da se neograničeno i nekontrolisano razvija i deli, što joj omogućava selektivnu prednost u odnosu na okolne zdrave ćelije (Coleman, 2015). Tumorske ćelije poseduju sposobnost izbegavanja antitumorskog delovanja imunološkog sistema (Hanahan i Weinberg, 2011). Osim toga, one mogu koristiti faktore rasta i angiogeneze, kao i enzime koji modifikuju ekstraćelijski matriks za promovisanje sopstvenog rasta, angiogeneze, invazivnosti i metastaziranja (DeNardo i sar., 2010). Na osnovu potencijalnog kliničkog ponašanja, tumori se mogu podeliti na benigne i maligne. Benigni tumori rastu lokalno, inkapsulirani su i nemaju tendenciju za metastaziranjem. Maligni tumori, ili kanceri, mogu da metastaziraju, odnosno obrazuju sekundarne tumore u tkivima i organima koji nisu u direktnom kontaktu sa tkivom u kome se razvio primarni tumor (Fidler, 1978). Osnovna podela malignih oboljenja je izvršena na osnovu mesta nastanka, odnosno vrste ćelija i tkiva u kojima je došlo do obrazovanja neoplazije. Hematološke neoplazme, u koje se ubrajaju i leukemije, čine 9% svih vrsta maligniteta i predstavljaju četvrti po redu najčešće dijagnostifikovani oblik karcinoma u ekonomski razvijenim regionima sveta (Smith i sar., 2011).

Leukemije predstavljaju heterogenu grupu progresivnih malignih oboljenja hematopoetskog sistema u kojima dolazi do nekontrolisane i prekomerne proliferacije abnormalno diferenciranih prekursorskih ćelija krvi, opredeljenih za određenu ćelijsku lozu. Prilikom nastanka bolesti, dolazi do supresije hematološke aktivnosti koja rezultuje smanjenom produkcijom normalnih/zdravih krvnih ćelija što vodi anemiji, čestim infekcijama, hemoragiji, uvećanju limfnih organa, jetre i posledičnoj kaheksiji organizma (Hamerschlak, 2008; Seth i Singh, 2015). Na osnovu kliničkih i patoloških svojstava, podela leukemija je izvršena na akutne i hronične. Akutne leukemije se karaktrišu naglim početkom i brzim razvojem bolesti. Nastaju nekontrolisanim

razmnožavanjem i nagomilavanjem nezrelih, nefunkcionalnih leukocita (blasta) u kostnoj srži, krvotoku i limfnim tkivima. Hronične leukemije predstavljaju maligne neoplazije krvi koje se odlikuju zrelijim, odnosno terminarno diferenciranim malignim leukocitima, a u kliničkom smislu sporijim tokom nastanka bolesti. Dalja klasifikacija je izvršena prema hematološkom poreklu, odnosno tipu prekursorskih krvnih ćelija koje su pogođene bolešću, na mijeloidne/mijelogene i limfoblastne/limfocitne leukemije (Vardiman i sar., 2009; Ekiz i sar., 2012; Arber i sar., 2016; Swerdlow i sar., 2016). Različite forme leukemije su karakteristične za određeno doba života. Hronična limfocitna (engl. *chronic lymphocytic leukemia, CLL*) i hronična mijeloidna leukemija (engl. *chronic myeloid leukemia, CML*) pogađaju pretežno odrasle osobe (McClanahan i Gribben, 2014; Alikian i sar., 2017), akutna mijeloidna leukemija (engl. *acute myeloid leukemia, AML*) se razvija kod pacijenata svih životnih dobi (Tallman i sar., 2005), dok od akutne limfocitne leukemije (engl. *acute lymphocytic leukemia, ALL*) najčešće oboljevaju deca (Moorman, 2016). Dijagnostifikovanje leukemije vrši se na osnovu mikroskopske i genetičke analize uzorka biopsije koštane srži, kao i analizom imunofenotipa pomoću protočne citofluorimetrije.

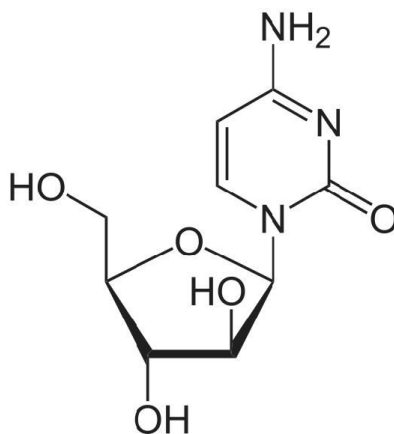
Tretman leukemija zavisi od tipa i stadijuma oboljenja. Bolest se najčešće tretira kombinovanom konvencionalnom hemioterapijom ili terapijskim zračenjem, dok je u određenom broju slučajeva neophodno izvršiti transplantaciju koštane srži (Kharfan-Dabaja i sar., 2007). Hemioterapija predstavlja tretman hemijskim citotoksičnim supstancama, nespecifičnim intraćelijskim otrovima, koji sprečavaju ćelijsku deobu i rast, odnosno deluju antiproliferativno, izazivajući ćelijsku smrt pokretanjem procesa apoptoze. Na osnovu hemijske strukture, mehanizma dejstva i interakcije sa drugim lekovima, hemioterapeutici koji se upotrebljavaju u lečenju hematoloških maligniteta se mogu podeliti u nekoliko grupa: alkilirajući antineoplastični agensi, antimetaboliti, antitumorski antibiotici, agensi koji deluju na mikrotubule i inhibitori tirozin kinaza. Alkilirajući agensi, poput hlorambucila i busulfana, formiraju kovalentne veze sa dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK), izazivajući nastajanje prekida lanca DNK prilikom replikacije ili reparacije, što dovodi do fragmentacije hromozoma i ćelijske smrti (Lind, 2011). Antimetaboliti su sintetički dobijeni analozi nukleobaza ili nukleozida, sa hemijskom strukturom izmenjenom tako da interferira sa normalnim funkcionisanjem ćelije (Parker, 2009). U njih spadaju: metotreksat (Mantadakis i sar.,

2005), tioguanin (Munshi i sar., 2014), merkaptopurin (Schmiegelow i sar., 2014), citarabin (Kantarjian i sar., 2000; Pigneux i sar., 2007), fludarabin (Rai i sar., 2000) i decitabin (Malik i Cashen, 2014). Antitumorski antibiotici kao što su doksorubicin, daunorubicin i idarubicin su najefikasniji hemioterapeutske agensi sa širokim spektrom dejstva koji izazivaju oštećenja DNK molekula i promene na ćelijskoj membrani (Weiss, 1992; Han i sar., 2015; Uchakina i sar., 2016; Zhou i sar., 2016). Agensi koji deluju na mikrotubule (Vinka alkaloidi) su biljne supstance koje sprečavaju normalno funkcionisanje tubulina u mikrotubulama i tako narušavaju bitne ćelijske procese kao što su: mitozu, mejozu, unutarćelijski transport, održavanje ćelijskog oblika (Lind, 2011; Chao i sar., 2015). Inhibitori tirozin kinaza su sintetički medikamenti koji inhibiraju tirozin kinaze, enzime koji imaju ulogu u aktivaciji mnogobrojnih signalnih puteva, presudnih za normalno funkcionisanje ćelije (Lind, 2011). Najpoznatiji među njima, imatinib, selektivno deluje na tumorske ćelije CML sa poremećenim Filadelfija hromozomom, tako što inhibira konstitutivno aktivnu tirozin kinazu nastalu ekspresijom fuzionisanih BCR-ABL1 gena (engl. *Breakpoint Cluster Region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) (Henkes i sar., 2008; Tabarestani i Movafagh, 2016). Radioterapija se ponekad koristi u lečenju leukemije koja se proširila u centralni nervni sistem, spinalnu tečnost ili testise. Takođe, kod obolelih koji su kandidati za alogenu transplantaciju matičnih ćelija, ozračivanje celog tela često predstavlja sastavni deo pripremnog zračenja za ovaj vid transplantacije. Transplantacija matičnih ćelija koštane srži se vrši kod obolelih sa uznapredovalim stadijumom leukemije i veoma je rizična, jer može doći do odbacivanja transplantata i pojave infekcija (Winston i sar., 1979; Bouchlaka i sar., 2010). Postoje dva oblika presađivanja matičnih ćelija krvi: autologna transplantacija, kada je pacijent sam sebi davalac matičnih ćelija krvi i alogena, kada je donor srodan ili delimično srodan (Anasetti i Hansen, 1992).

## 1.2. Citarabin

Citarabin je jedan od najčešće korišćenih hemioterapeutika koji se samostalno ili u kombinaciji sa drugim antineoplastičnim agensima koristi za lečenje akutnih oblika mijeloidne i limfocitne leukemije, CML, ne-Hoćkinovog limfoma, eritroleukemije i meningealne leukemije (Lamba, 2009). Citarabin (citozin arabinozid, arabinofuranozil

citidin, 1- $\beta$ -arabinofuranozilcitozin [Ara-C]) spada u citostatike iz grupe antimetabolita i predstavlja sintetički analog pirimidinskog nukleozida deoksicitidina, pri čemu se po hemijskom sastavu sastoji od aldopentoze arabinoze i azotne baze citozina (Roberts i Dekker, 1967) (slika 1).



**Slika 1. Strukturna formula citozin arabinozida (citozina).** Sistemsko ime (prema engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) citozina glasi 4-amino-1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il] pirimidin-2-jedan. Citarabin predstavlja organsko jedinjenje koje sadrži 9 atoma ugljenika i ima molekulsku masu od 243,217 Da.

Citozin arabinozid je sintetisan od strane Walwick-a, Walden-a i Dekker-a 1959. godine, na Kalifornijskom Univerzitetu u Berkliju (Walwick i sar., 1959). Zbog svoje strukturne sličnosti sa purinima i pirimidinima, antimetabolički agensi poseduju sposobnost sprečavanja ugradnje azotnih baza u DNK molekul tokom S faze ćelijskog ciklusa, zaustavljajući na taj način njihov normalan razvoj i rast. Nakon ulaska u ćeliju, deoksicitidin kinaza vrši fosforilaciju citarabina u svoju aktivnu trifosfatnu formu, citozin arabinozid trifosfat. Ovaj metabolit učestvuje u inhibiciji DNK polimeraze (Shepshelovich i sar., 2015), ispoljavajući tako citotoksičnost koja je visoko specifična za S fazu ćelijskog ciklusa. Citozin arabinozid trifosfat se takođe inkorporira u ćelijsku DNK gde sprečava DNK elongaciju i indukuje prekide DNK lanca, dovodeći do terminacije u DNK replikaciji (Li i sar., 2016), što dalje rezultuje pojavom apoptoze u leukemijskim ćelijama koje poseduju visok proliferativni potencijal (Ketley i sar., 2000). Zbog niskog stepena propustljivosti citarabina kroz ćelijsku membranu, potrebe za biološkom aktivacijom putem fosforilacije i brze deaminacije u neaktivni derivat uracila, 1- $\beta$ -d-arabinofuranoziluracil, potrebno je koristiti visoke doze citarabina da bi se

postigao zadovoljavajući antileukemijski efekat (Novotny i Rauko, 2009). Tretman visokim dozama medikamenta je povezan sa ozbiljnim sporednim efektima uključujući cerebelarnu toksičnost, leukopeniju, trombocitopeniju, anemiju i gastrointestinalne poremećaje (Stentoft, 1990).

### 1.3. Idarubicin

Idarubicin (4-demetoksidaunorubicin, idarubicin hidrohlorid), pored doksorubicina, epirubicina i daunorubicina, spada u klasu antraciklina (Robert, 1993), visoko efektivnih antitumorskih antibiotika koji se dugi niz godina koriste u lečenju širokog spektra maligniteta, uključujući solidne tumore, limfome i leukemije (Vander Heide i L'Ecuyer, 2007). Idarubicin se upotrebljava prilikom lečenja akutnih formi leukemija, pre svega AML, ALL, mijelodisplastičnog sindroma, kao i u slučaju pojave CML u blastnoj krizi (Carella i sar., 1990; Buckley i Lamb, 1997). Lek su 1976. godine sintetisali Arcamone i saradnici u laboratoriji Farmitalia Carlo Erba Research Laboratories, Italija (Arcamone i sar., 1976). Zajedničku karakteristiku svih antraciklina, aromatičnih poliketidnih jedinjenja, čini postojanje aglikonskog prstena uparenog sa aminošećerom (Blasiak i sar., 2002). Idarubicin predstavlja sintetički modifikovan analog antraciklina daunorubicina kod koga je metoksi grupa na C-4 poziciji aglikona zamenjena vodonikom (Wiernik i sar., 1992) (Slika 2) što rezultuje u značajnom povećanju lipofilnosti i posledičnom bržem ćelijskom preuzimanju, superiornijem kapacitetu vezivanja za DNK i povećanoj citotoksičnosti u odnosu na doksorubicin i daunorubicin (Ma i sar., 2009). Za razliku od daunorubicina, kod koga je metabolit daunorubicinol manje aktivan od jedinjenja iz koga nastaje, idarubicinol (4-demetoksi-13-dihidrodaunorubicin), primarni cirkulatorni metabolit idarubicina, je ekvipotentan sa roditeljskim jedinjenjem (Broggini i sar., 1986), što doprinosi superiornom antitumorskom efektu ovog antraciklina (Limonta i sar., 1990). Pokazano je da idarubicin poseduje karakteristične odlike mehanizma dejstva antraciklina, kao što su sposobnost jakog vezivanja za DNK molekul i indukcija prekida lanca DNK u leukemijskim ćelijama (Fukushima i sar., 1993). Citotoksičnost ovog antraciklina posledica je njegovog interkaliranja u molekul DNK i inhibicije katalitičke aktivnosti DNK topoizomeraze II, enzima odgovornog za regulaciju trodimenzionalne strukture



kardiotoksični efekat, uzrokovati dozno-zavisno opterećenje srčanog mišića i obrazovanje sekundarnih tumora (Hollingshead i Faulds, 1991). Da bi se smanjili propratni negativni efekti, hemioterapeutici citarabin i idarubicin se upotrebljavaju u kombinaciji sa agensima koji modulišu njihovu stabilnost, lipofilnost ili apoptotski odgovor leukemijskih ćelija (Hollingshead i Faulds, 1991; Novotny i Rauko, 2009).

## 1.4. Apoptoza

Antimetaboliti i antraciklini ostvaruju svoje antileukemijsko dejstvo indukcijom procesa apoptoze (Heasman i sar., 2011). Apoptoza predstavlja fundamentalni, genetički određen i evolutivno konzerviran biološki proces selektivne i kontrolisane eliminacije ćelija kod eukariotskih organizama (Kruidering i Evan, 2000). Programirana ćelijska smrt tipa I, odnosno apoptoza, se odlikuje specifičnim morfološkim promenama i energetski zavisnim biohemijским mehanizmom koji rezultuju pokretanjem smrti i uklanjanjem/dezintegracijom neželjenih i defektnih ćelija bez prisustva zapaljenskog odgovora organizma, koji se javlja pri umiranju ćelija nekrozom (Pucci i sar., 2000; Elmore, 2007). Apoptoza se javlja kod fizioloških procesa embriogeneze, normalne ćelijske diferencijacije, razvoja i regulacije imunskog sistema, tkivne homeostaze, starenja, kao i u različitim patološkim stanjima (Renehan i sar., 2001). Apoptoza predstavlja ključni mehanizam za odstranjivanje oštećenih, inficiranih ili mutiranih ćelija koje svojim prisustvom ugrožavaju normalno funkcionisanje organizma (Kruidering i Evan, 2000). Kod malignih oboljenja dolazi do narušavanja ravnoteže između ćelijske proliferacije i programirane ćelijske smrti, pri čemu poremećaji u apoptotičnim signalnim putevima omogućavaju preživljavanje genetski izmenjenih ćelija (Sjostrom i Bergh, 2001).

U morfološkom smislu, rana faza procesa apoptoze uključuje kondenzaciju hromatina (piknozu) i citoplazme, uz posledično smanjivanje ćelijskog volumena, sabijanje intaktnih organela i razgradnju citoskeletnih elemenata. Kasnu fazu apoptoze odlikuje obrazovanje citoplazmatskih izvrata na ćelijskoj membrani, tkz. „pupljenje“ ćelijske membrane, segmentacija citoplazme i fragmentacija jedra (karioreksa) (Kerr i sar., 1972; Kerr i sar., 1994). Završnu fazu apoptotske dezintegracije karakteriše obrazovanje apoptotskih tela koja se sastoje od citoplazme

ograničene plazma membranom, sa gusto pakovanim organelama, sa ili bez fragmenata jedra (Elmore, 2007). Razgradnja DNK molekula na fragmente od 50-300 kb, kao i fragmentacija na internukleozomalne jedinice približne dužine 180 baznih parova predstavlja bitnu biohemijsku odliku apoptoze (Nagata i sar., 2003). Osim toga, na spoljašnjoj strani ćelijske membrane dolazi do ekspresije markera apoptoze poput fosfatidilserina, kalretikulina i aneksina I, koji predstavljaju signal za fagocitozu apoptotskih tela (Bratton i sar., 1997; Elmore, 2007). Prepoznavanje i uklanjanje apoptotskih ćelija vrše profesionalni fagociti, makrofagi i dendritske ćelije, ili okolne vijabilne ćelije, bez izazivanja zapaljenske reakcije organizma (Wyllie, 1993). Glavne egzekutore apoptotskog procesa predstavljaju kaspaze, aspartat-specifične cistein-proteaze, koje se u ćeliji sintetišu u neaktivnoj formi zimogena, prokaspaza. Kaspaze se prema svojoj biološkoj funkciji dele na inicijatorne (kaspaza-2,-8,-9,-10), izvršne (kaspaza-3,-6,-7) i inflamatorne (kaspaza-1,-4,-5,) (Fuentes-Prior i Salvesen, 2004; Kumar, 2007). Kaskadna aktivacija kaspaza je pouzdan pokazatelj ulaska ćelije u ireverzibilnu, izvršnu fazu apoptotskog procesa koja uzrokuje kolaps subćelijskih komponenti i posledičnu smrt ćelije.

Razlikuju se dva osnovna molekularna puta apoptoze: spoljašnji, ili put receptora smrti i unutrašnji, ili put mitohondrija. Iako različiti, ovi putevi međusobno konvergiraju (Hotchkiss i sar., 2009). Spoljašnji put se pokreće na nivou plazma membrane, aktivacijom receptora smrti koji pripadaju porodici proteina za faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor, TNFR*) (Choi i Benveniste, 2004). Vezivanjem liganda za receptor smrti, dolazi do konformacione promene u citoplazmatskom domenu smrti (engl. *death domain, DD*) receptora i aktivacije adaptornih proteina, što omogućava grupisanje molekula kaspaze-8 i formiranje signalnog kompleksa indukovano smrti (engl. *death-inducing signalling complex, DISC*). Agregacija DISC kompleksa uzrokuje autokatalitičku aktivaciju kaspaze-8 koja dalje aktivira kaspazu-3 što predstavlja početak izvršne faze apoptoze (Vicencio i sar., 2008). Unutrašnji put apoptoze indukuju različiti stimuli poput zračenja, hipertermije, virusne infekcije, oksidativnog stresa, citotoksičnih antikancerskih lekova (u koje spadaju citarabin i idarubicin), odsustva faktora rasta, koji dovode do stresa i unutrašnjih oštećenja jedra/DNK, mitohondrija i ostalih organela. Dejstvo ovih induktora apoptoze konvergira na mitohondrijama, izazivajući gubitak mitohondrijalnog



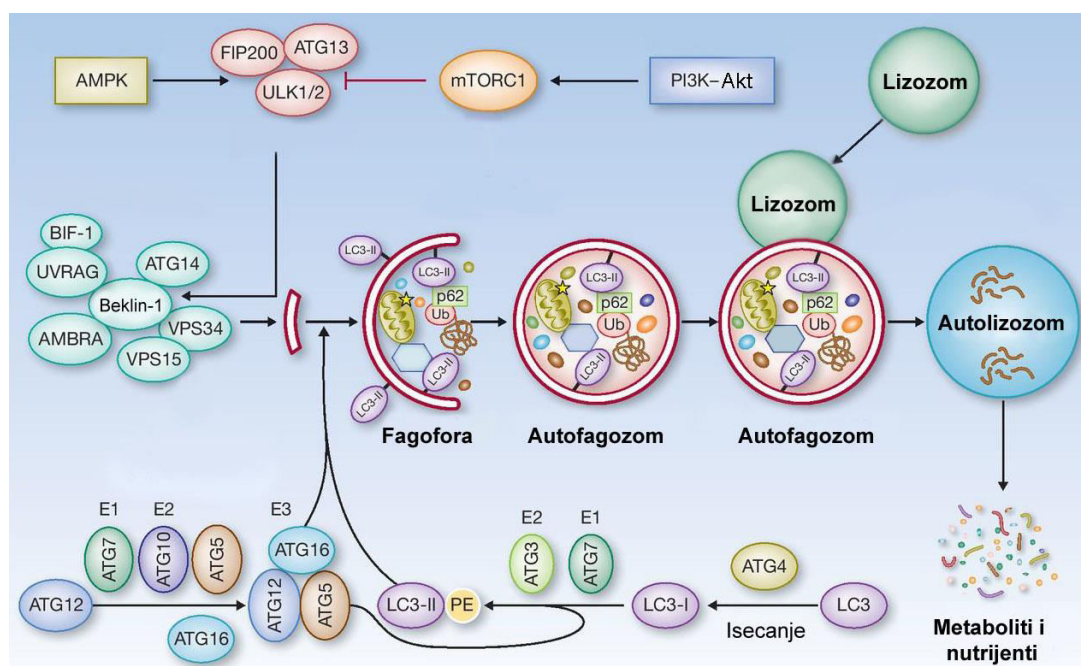
transmembranskog potencijala i permeabilizaciju mitohondrijalne membrane, pri čemu dolazi do otpuštanja različitih regulatora apoptoze, poput citohroma c, u citoplazmu (Saelens i sar., 2004). Oslobođeni citohrom c obrazuje sa Apaf-1 proteinom (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) apoptozom, kompleks u kome se proteolitički aktivira kaspaza-9 koja dalje aktivira efektorsku kaspazu-3 (Salvesen i Renshaw, 2002). Mitohondrijalni put se naziva i Bcl-2 (engl. *B cell lymphoma*) regulisani put, zbog funkcije koje ova familija proteina ima u modulaciji procesa apoptoze (Youle i Strasser, 2008). Tumor supresor protein p53 predstavlja ključni regulator aktivnosti članova Bcl-2 familije (Delbridge i Strasser, 2015), koji su grupisani u tri klase: klasa inhibitora apoptoze, antiapoptotskih proteina, npr. Bcl-2, Bcl-x (engl. *B cell lymphoma-x*), Bcl-w (engl. *B cell lymphoma-w*), Mcl-1 (engl. *Myeloid cell leukemia-1*); klasa aktivatora apoptoze, proapoptotskih proteina, u koju spadaju Bax (engl. *Bcl-2-associated X protein*), Bak (engl. *Bcl-2-antagonist/killer-1*), Bok (engl. *Bcl-2 related ovarian killer*); klasa BH3-only (engl. *Bcl-2 homology-only*) proteina, npr. Bad (engl. *Bcl-2 antagonist of cell death*), Puma (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), Noxa, koji se putem konzerviranog BH3 domena vezuju za Bcl-2 proteine i promovišu ćelijsku smrt. Ovi ključni unutarćelijski modulatori apoptotskog procesa su sposobni da međusobno formiraju homodimere i heterodimere pro-apoptotskih i anti-apoptotskih proteina, regulišući na taj način odgovor ćelije u odnosu na apoptotski stimulus (Youle i Strasser, 2008). Interesantno je da rezistencija leukemijskih ćelija na terapiju citarabinom nastaje kao posledica povećane ekspresije Fas, Bcl-2 i Bcl-xL proteina i prekomerne aktivacije nuklearnog faktora kapa B (NF- $\kappa$ B) (Grant, 1998; Kanno i sar., 2007), a idarubicina kao posledica povećane ekspresije Bcl-2, te nemogućnosti ćelija da uđu u proces apoptoze (Durrieu i sar., 1999). Iz tog razloga se razvijaju novi terapijski pristupi zasnovani na pokretanju drugih formi ćelijskog umiranja, poput nekroze ili autofagije (Galluzzi i sar., 2007).

## 1.5. Autofagija

Autofagija predstavlja bazični katabolički mehanizam ćelijske degradacije sopstvenih nefunkcionalnih ili nepotrebnih citoplazmatskih komponenti u okviru lizozoma koji je uključen u proces homeostaze, ćelijskog razvoja i smrti, eliminacije mikroorganizama, prezentacije antigena i supresije tumora (Mizushima, 2005; He i Klionsky, 2009). Na osnovu selektivnosti, indukcijskih signala i vremenskog aspekta indukcije, mehanizma sekvestracije i tipa sadržaja autofagozoma, razlikuju se tri vida autofagije: makro-, mikro- i autofagija posredovana šaperonima. Mikroautofagija uključuje neselektivnu pinocitozu malih delova citosola direktnom invaginacijom lizosomalne membrane (Cuervo i Wong, 2014). Autofagija posredovana šaperonima, CMA (engl. *Chaperone mediated autophagy*) je striktno selektivan proces degradacije proteina sa konzensusnom peptidnom sekvencom koju prepoznaju šaperoni, hsc70 (engl. *heat shock cognate protein of 70 kDa*), obrazujući tako CMA supstrat/šaperon kompleks koji se razgrađuje u lizozomima. U dinamičnom procesu makroautofagije (termin autofagija se uglavnom koristi za ovaj tip autofagije), dolazi do obuhvatanja ćelijskog sadržaja predodređenog za razlaganje dvostrukom membranom čiji se krajevi nakon toga spajaju, formirajući autofagozom, koji fuzioniše sa lizozomom obrazujući autofagolizozom u kom se pod uticajem kiselih lizosomalnih hidrolaza vrši degradacija (Fimia i Piacentini, 2010; Yang i Klionsky, 2010) (Shema 1).

Ovaj proces zavisi od hijerarhijski uređene aktivnosti Atg (engl. *Autophagy related*) proteina koji regulišu autofagiju. ATG geni su prvo otkriveni kod kvasca, iako je većina ovih faktora evolutivno konzervirana i kod viših eukariota, uključujući čoveka (Lin i Baehrecke, 2015). Autofagija započinje obrazovanjem fagofore, pre-autofagozomalne membrane, koja kod kvasca nastaje u okviru PAS (engl. *phagophore assembly site*) strukture, dok se kod sisara istovremeno stvara na više mesta u omegazomu, delu membrane endoplazmatičnog retikuluma obogaćenom fosfatidilinozitol 3-fosfatom (Hurley i Young, 2017). Kod sisara, ULK (engl. *Unc-51-like kinase*) protein kinazni kompleks (ULK1-mAtg13-mAtg101-FIP200) i PI3KC3 (engl. *class III phosphoinositide 3-kinase*) kompleks (mAtg14-hVps34-p150-beklin-1) iniciraju autofagiju. U uslovima normalnog energetskog statusa, serin-treonin kinaza mTOR (engl. *mechanistic/mammalian target of rapamycin*) fosforiliše mAtg13 i ULK1,

inaktivira njihovu kinaznu aktivnost i sprečava autofagiju. U uslovima gladovanja, mTOR kinaza se odvajava od ULK kompleksa i parcijalno defosforiliše Atg supstrate što aktivira ULK1 koji fosforiliše mAtg13 i FIP200 (engl. *focal adhesion kinase [FAK] family interacting protein of 200 kD*). Tokom nukleacije, ULK1 fosforiliše i komponente PI3K kompleksa: hVps34 (engl. *mammalian vacuolar protein sorting 34*



**Shema 1. Uprošćen shematski prikaz procesa autofagije.** (preuzeto i modifikovano iz Cicchini M, Karantza V, Xia B, 2015. *Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context. Clin Cancer Res* 21, 498-504)

*homologue*), beclin-1 (engl. *autophagy-related bcl2-interacting Atg6 homologue*), i AMBRA1 (engl. *activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy*), što rezultuje aktivacijom i lokalizacijom ovog kompleksa u omegazomu. Lipidna kinaza hVps34 fosforiliše fosfatidilinozitol do fosfatidilinozitol 3-fosfata (PI3P) koji regrutuje mAtg9/Atg9L1 i WIPI-1 (engl. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1*) proteine potrebne za proces rasta fagofore. Elongacija uključuje dva ubikvitinu-slična konjugaciona sistema koja deluju koordinisano u formiranju autofagozoma, Atg12-Atg5-Atg16L1 i LC3 (engl. *microtubule-associated protein 1light chain-3, MAPI-LC3*) - fosfatidiletanolamin (PE) sistem. Proteaza Atg4B vrši katalitičku obradu LC3 proteina pri čemu nastaje slobodna citosolna forma LC3-I, koja se zatim posredstvom Atg7,

Atg3 i Atg12-Atg5-Atg16L1 kompleksa konjuguje sa PE, obrazujući autofagozom-vezanu LC3-II formu, što istovremeno predstavlja i eksperimentalni dokaz prisustva autofagije. Tokom faze sazrevanja autofagozoma, LC3-II protein učestvuje u regrutaciji lipidnih molekula neophodnih za dalju ekspanziju dvoslojne autofagozomalne membrane. Nakon toga, autofagozom prvo fuzioniše sa kasnim endozomom formirajući amfizom, koji se spaja sa lizozomom gradeći autolizozom u kom se vrši razgradnja makromolekula kiselim hidrolazama, nakon čega se monomerne jedinice eksportuju u citosol radi dalje reciklaže (Tanida, 2011; Mehrpour i sar., 2012; Sarkar, 2013; Cicchini i sar., 2015) (Shema 1).

Osim neselektivnog razlaganja tokom nutrijentne deprivacije, autofagija može ciljano vršiti degradaciju ubikvitinom-obeđenih citotoksičnih proteinskih agregata (agrefagija), depolarizovanih mitohondrija (mitofagija) i invazivnih mikroorganizama (ksenofagija). Ključnu ulogu u ovom procesu imaju multifunkcionalni adaptorski proteini, p62 (engl. *sequestosome1, SQSTM1*), NDP52 (engl. *nuclear dot protein 52 kDa*), Optineurin i NBR1 (engl. *neighbor of BRCA1 gene 1*). Protein p62 poseduje UBA (engl. *ubiquitin-associated*) domen kojim se vezuje sa ubikvitiranim proteinima obeđenim za proteozomalnu degradaciju, dok s druge strane, putem LIR (engl. *LC3-interacting region*) domena stupa u kontakt sa LC3-II proteinom koji je integrisan u membranu fagofore. Ovim putem, p62 protein ostvaruje svoju ulogu selektivnog receptora u procesu degradacije ubikvitiranih supstrata, prilikom čega se i sam razlaže, što ga čini specifičnim markerom autofagije (Lin i sar., 2013; Katsuragi i sar., 2015) (Shema 1).

Regulacija autofagije je pod kontrolom mTOR signalnog puta koji se sastoji od dva funkcionalno različita kompleksa: rapamicin-neosetljivog rictor-mTOR (mTORC2) i rapamicin-senzitivnog raptor-mTOR (mTORC1) (Shema 1), koji predstavlja ključni inhibitor autofagije (Zoncu i sar., 2011). U stanju gladovanja/smanjenog energetskeg statusa, dolazi do inhibicije mTORC1 kompleksa i posledične indukcije autofagije, koja je povezana sa smanjenom fosforilacijom p70S6 kinaze (engl. *ribosomal protein S6 kinase, p70 S6K*), nishodnog efektor mTOR-a i regulatora translacije proteina (Klionsky i Emr, 2000). U uslovima odsustva faktora rasta, dolazi do pokretanja PI3KC1 (engl. *class I phosphoinositide 3-kinase*)/Akt (engl. *protein kinase B, PKB*)/TSC (engl. *tuberous sclerosis complex*)/mTORC1 signalnog puta koji aktivira

autofagiju. U normalnim fiziološkim uslovima Akt kinaza vrši aktivaciju mTOR kinaze i inhibira autofagiju (Periyasamy-Thandavan i sar., 2009). Adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza (AMPK) je glavni energetski senzor u ćeliji koji se aktivira povećanjem adenozin monofosfat/adenozin trifosfat (AMP/ATP) odnosa prilikom metaboličkog/oksidativnog stresa. U ovakvim uslovima, AMPK indukuje autofagiju direktnom inhibicijom mTOR kinaze ili putem fosforilacije TSC kompleksa koji posleđično inhibira mTOR kinazu (Alers i sar., 2012). U uslovima hipoksije i gladovanja, kinaza regulisana vanćelijskim signalima, ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) takođe indukuje autofagiju inhibicijom mTOR kinaze, putem aktivacije TSC kompleksa (Roy i sar., 2014).

Autofagija predstavlja visoko konzerviran mehanizam preživljavanja svih eukariota i prevashodno deluje kao adaptivni odgovor na promene u okruženju kao što su nedostatak hranljivih materija, hipoksija, oksidativni i metabolički stres i oštećenje DNK, obezbeđujući energiju za održavanje osnovnog ćelijskog metabolizma razlaganjem intracelularnih komponenti koje nisu neophodne za opstanak (Jain i sar., 2013; Yin i sar., 2016). Na taj način, autofagija može da služi kao mehanizam preživljavanja koji se suprotstavlja apoptotičnoj ili nekrotičnoj smrti indukovanoj različitim hemioterapeuticima (Banerji i Gibson, 2012; Ishdorj i sar., 2012), pa se inhibitori autofagije trenutno klinički ispituju kao adjuvansi u terapiji različitih tumora, uključujući leukemije (Trial #NCT01438177, ISCRTN No. 61568166). S druge strane, u slučajevima kada je preterano aktivirana, autofagija može da indukuje apotozu (Fimia i Piacentini, 2010) ili da funkcioniše kao alternativni način ćelijskog umiranja (programirana ćelijska smrt tipa II) (Notte i sar., 2011) i tako potencira smrt ćelija tumora, uključujući hematološke malignitete.

Pokazano je da antraciklini adriamicin, daunorubicin i epirubicin indukuju autofagiju u kancerogenim i netransformisanim ćelijama, koja može imati citoprotektivnu ili citotoksičnu ulogu u zavisnosti od tipa ćelija i vrste/koncentracije medikamenata (Di i sar., 2009; Sun i sar., 2011; Sishi i sar., 2012). Takođe, određena istraživanja su pokazala da specifični inhibitor BCR-ABL kinaze, imatinib mezilat, i protein visoke mobilnosti B1 (HMGB1) upravo indukcijom autofagije promovišu otpornost leukemijskih ćelija na citarabin (Ohtomo i sar., 2010; Liu i sar., 2011). Međutim, sposobnost samog citarabina i idarubicina da stimulišu autofagiju u

leukemijskim ćelijama, kao i uticaj inhibitora autofagije na terapijsko dejstvo ovih lekova nije do sada istraživana.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Sposobnost široko korišćenih antileukemijskih lekova citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju, koja bi mogla pospešiti ili suprimirati njihovo antitumorsko delovanje, nije do sada ispitivana. U skladu sa tim, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije:

1. Ispitati sposobnost citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*.
2. Ispitati mehanizme odgovorne za indukciju autofagije citarabinom i idarubicinom u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*.
3. Ispitati da li je autofagija indukovana citarabinom i idarubicinom citoprotektivna ili citotoksična u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Reagensi i rastvori

U izradi ove studije su korišćeni sledeći reagensi: medijum za kultivaciju ćelija, *RPMI 1640* (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium, RPMI*), medijum za kultivaciju ćelija sa redukovanim serumom, *Opti-MEM*, lipofilna katjonska boja *JC-1* (5,5',6,6'-tetrahaloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-karbocijanin jodid) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA SAD), pufer *HEPES* (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonska kiselina), goveđi fetalni serum (engl. *fetal bovine serum, FBS*), rastvor antibiotika i antimikotika, L-glutamin (sve od PAA, Pasching, Austrija), citarabin (arabinofuranozil citidin), idarubicin (4-demetoksidaunorubicin), natrijum piruvat, inhibitori autofagije bafilomicin A1, 3-metiladenin, amonijum hlorid (NH<sub>4</sub>Cl), vortmanin i hlorokin, aktivator mTOR kinaze L-leucin, dimetilsulfoksid (DMSO), *p*-nitrofenil fosfat, *Triton X-100* u 0,1 M natrijum acetatnom puferu pH 5,0; 1 M natrijum hidroksid, MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid), puferizovan fiziološki rastvor (engl. *Phosphate-buffered saline, PBS*), akridin oranž, albumin iz govedeg seruma (engl. *bovine serum albumin, BSA*), RNA-aza, metanol, 2-merkaptoetanol, pufer za liziranje (Tris-HCl), natrijum hlorid, deterdžent NP-40, fenilmetilsulfonil fluorid (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF*), glutaraldehid, kakodilatni pufer, osmijum-tetroksid, uranil acetat, paraformaldehid, nespecifični inhibitor RNA-aza *DEPC* (engl. *diethylpyrocarbonate*) (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), aneksin V-fluorescein izotiocijanat (aneksin V-FITC), propidijum jodid (sve od BD Pharmingen, San Diego, SAD), fluorescein izotiocijanat (FITC)-konjugovani pan-kaspazni inhibitor, *ApoStat* (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), Lipofektamin 2000, dihidroetidijum (DHE), sekundarno antitelo *Alexa Fluor 488* kozji anti-zečiji IgG, reagens za ekstrakciju RNK, *TRIZOL*, *M-MuLV* reverzna transkriptaza (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transcriptase*), nasumični heksamerni prajmeri (sve od Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD), *Tris*, *Tween 20*, akrilamid/bisakrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED) (sve od



SERVA, Heidelberg, Nemačka), kristal violet, etanol, glicerol (sve od Zorka, Šabac, Srbija), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, proteazno/fosfatazni inhibitorski koktel, natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, *SDS*), bromfenol plavo, amonijum persulfat, glicin, *Coomassie Brilliant Blue G-250*, odmašćeno mleko u prahu (sve od Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka), primarna zečija antitela protiv fosforilisanih i totalnih formi Akt, AMPK, ERK, p62, beklina-1, Raptor, LC3, mTOR kinaze, p70S6 kinaze, aktina (sve od Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), sekundarno antitelo, kozji anti-zečiji IgG konjugovan sa peroksidazom rena (sve od Jackson IP Laboratories, West Grove, PA, SAD), reagens za detekciju proteina, ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, SAD), medijum za fiksiranje *Fluoromount-G* (SouthernBiotech, Birmingham, AL, SAD), epoksidna smola *Epon 812* (Agar Scientific, Stansted, Velika Britanija), antikoagulans natrijum citrat, *LymphoPrep* (Axis Shield, Oslo, Norveška), *TaqMan Universal Master Mix* i prajmeri za humani Atg4B (Hs00367088 m1), Atg5 (Hs00169468 m1), Atg7 (Hs00197348 m1), Atg12 (Hs00740818 m1), p62 (Hs00177654 m1) i  $\beta 2$  mikroglobulin (Hs00984230 m1) (sve od Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD). Koncentracije agenasa, kao i vremena inkubacije su navedeni na legendama slika ili samim slikama.

### 3.2. Čelije i ćelijske kulture

Dejstvo antileukemijskih lekova, citarabina i idarubicina, ispitivano je na ćelijskim linijama humanih leukemija, kao i na primarnim leukemijskim ćelijama izolovanim iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija i MNPK zdravih kontrola. Čelijska linija humane akutne limfocitne leukemije REH (ATCC CRL-8286) je nabavljena od *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, SAD), dok su ćelijske linije humane akutne promijelocitne leukemije HL-60 (ECACC 9870106) i humane hronične mijelocitne leukemije K562 (ECACC 89121407) kupljene od *European Collection of Animal Cell Cultures* (Salisbury, Velika Britanija). Primarne leukemijske ćelije su izolovane iz venozne krvi

tri pacijenta sa blastnom transformacijom kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija, sa više od  $10^8/l$  leukocita i brojem mijeloblasta/promijelocita većim od 50%. Dijagnoza je postavljena na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu, prema kriterijumima za podelu tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva (Vardiman i sar., 2009). MNPK su izolovane iz krvi tri zdrava dobrovoljca, usklađenih sa grupom obolelih po uzrastu i polu (prosečna starost  $54,7 \pm 12,7$  godina), i upotrebljene u svrhu kontrola. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom Deklaracijom usvojenom 1975. godine, i odobreno od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Srbija. Svi učesnici studije, pacijenti i zdravi dobrovoljci, su dali pristanak u pisanom obliku prilikom uzimanja krvnih uzoraka, nakon što su bili informisani o svim pojedinostima istraživanja. Svi pacijenti su dali dva pristanka u pisanoj formi u učestvovanju u studiji, jedan opšti, koji se odnosio na dijagnostičke procedure, i drugi koji se odnosio na analize u naučne svrhe, jer su uzorci uzimani tokom regularne postavke dijagnoze oboljenja. Krv je uzorkovana špricom sa 10% (v/v) antikoagulansom, tj. 3,8% natrijum citratom. MNPK su izolovane putem gustinskog gradijenta, centrifugiranjem u prisustvu *LymphoPrep*-a i istovremeno upotrebljene u eksperimentima.

Ćelije humanih leukemijskih linija korišćenih u eksperimentima, primarne leukemijske ćelije i MNPK zdravih kontrola su gajene u inkubatoru na temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$ , u vlažnoj atmosferi sa 5%  $\text{CO}_2$ , u RPMI 1640 medijumu za kultivaciju ćelija, puferizovanom *HEPES*-om (20 mM), sa 10% fetalnog govedeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1% rastvora antibiotika/antimikotika (penicilin/streptomycin/amfotericin B).

Pre izvođenja eksperimenata, ćelije humanih leukemijskih linija su po odmrzavanju iz tečnog azota propagirane u Petrijevim šoljama od  $100 \times 20$  mm za ćelije u suspenziji i testirane na prisustvo mikoplazme. Prilikom ispitivanja ćelijskog vijabiliteta, ćelije su zasejavane u mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom za ćelije u suspenziji koje sadrže 96 bunara ( $4 \times 10^4$  ćelija/bunaru u slučaju humanih leukemijskih ćelijskih linija;  $1,2 \times 10^5$  ćelija/bunaru u slučaju primarnih leukemijskih ćelija i MNPK-a zdravih kontrola), dok su za analize vršene fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citofluorimetrijom upotrebljene ploče sa 24 bunara ( $3 \times 10^5$  ćelija/bunaru u slučaju REH

leukemijske ćelijske linije). Za potrebe imunoblot analize i u slučaju ispitivanja ćelija transmisivnom elektronskom mikroskopijom, upotrebene su Petrijeve šolje od 100×20 mm za ćelije u suspenziji ( $2,5 \times 10^7$  ćelija/posudi u slučaju humanih leukemijskih ćelijskih linija;  $1 \times 10^8$  ćelija/posudi u slučaju primarnih leukemijskih ćelija i MNPK-a zdravih kontrola). Za potrebe konfokalne mikroskopije upotrebene su Petrijeve šolje od 60×15 mm za ćelije u suspenziji ( $8 \times 10^6$  ćelija/posudi u slučaju REH leukemijske ćelijske linije).

Dva časa nakon zasejavanja, ćelije su tretirane antileukemijskim lekovima u prisustvu ili odsustvu aktivatora mTOR kinaze, leucina, kao i inhibitora autofagije: vortmanina i 3-metiladenina koji sprečavaju fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)-zavisno formiranje autofagozoma (Arcaro i Wymann, 1993; Wu i sar., 2010); amonijum hlorida koji sprečava lizosomalnu acidifikaciju povećanjem pH (Seguin i sar., 2014; Sun i sar., 2015); bafilomicina A1 koji predstavlja specifični inhibitor vakuolarne  $H^+$  ATP-aze i blokira fuziju autofagozoma i lizozoma (Ohba i sar., 1996); hlorokina koji se selektivno akumulira u lizozomima, zadobija pozitivno naelektrisanje i povećava pH, što dovodi do inhibicije lizosomalne proteinske degradacije (Ohkuma i Poole, 1978; Krogstad i sar., 1992), kao što je opisano u rezultatima i legendama slika. Inhibitori autofagije i leucin su dodavani 30 minuta pre tretmana antileukemijskim lekovima. Citarabin, idarubicin, amonijum hlorid, 3-metiladenin i leucin su direktno rastvoreni u medijumu za kultivaciju ćelija pre nego što su upotrebljeni u eksperimentima, dok su vortmanin, bafilomicin A1 i hlorokin čuvani u vidu štok rastvora u dimetil sulfoksidu, koji su napravljeni prema uputstvu proizvođača. Krajnja koncentracija dimetil sulfoksida u ćelijskim kulturama je iznosila <0,1% i nije imala nikakve efekte na kontrolne, netretirane ćelije u svim esejima gde je korišćen dimetil sulfoksid.

### **3.3. Određivanje ćelijskog vijabiliteta**

Uticaj antileukemijskih lekova na ćelijski vijabilitet, sa i bez farmakološke i genetske inhibicije autofagije, je ispitivan kolorimetrijskim metodama koje se zasnivaju

na merenju aktivnosti kisele fosfataze i mitohondrijalne dehidrogenaze nakon 24 i/ili 48 časova tretmana u humanim leukemijskim ćelijskim linijama, kao i primarnim leukemijskim ćelijama i MNPK zdravih kontrola.

### 3.3.1. Test aktivnosti kisele fosfataze

Esej aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze je upotrebljen prilikom određivanja ćelijskog vijabiliteta (Connolly i sar., 1986; Yang i sar., 1996; Misirlic Dencic i sar., 2012). Ovaj kolorimetrijski test se zasniva na sposobosti kisele fosfataze da u živim ćelijama hidrolizuje bezbojni *p*-nitrofenil fosfat do žutog *p*-nitrofenola. Intenzitet boje, koja se razvija prilikom ove reakcije, odgovara aktivnosti kisele fosfataze, a saglasno s tim, i broju živih ćelija. Ukratko, po završetku inkubacionog perioda (24 ili 48h), tretiranim ćelijama koje su zasađene u mikrotitarske ploče sa 96 bunara je dodato po 50 µl rastvora *p*-nitrofenil fosfata u svaki bunar (30 mM *p*-nitrofenil fosfat i 0,3% *Triton X-100* u 0,3 M natrijum acetatnom puferu, pH 5,5), uzorci su potom inkubirani 2 časa na temperaturi od 37°C u atmosferi obogaćenoj CO<sub>2</sub> nakon čega je reakcija prekinuta dodatkom natrijum hidroksida (50 µl/bunaru; 1,33 M). Intenzitet razvijene boje, koji je proporcionalan broju živih ćelija, je detektovan merenjem apsorbance na talasnoj dužini svetlosti od 405 nm korišćenjem automatskog čitača mikrotitarskih ploča (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Svaka ploča je posedovala slepu probu, koju je predstavljao samo medijum za kultivaciju ćelija, i njena vrednost apsorbance je oduzimana od vrednosti kontrolnih, netretiranih i tretiranih ćelija. Dobijeni rezultati su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije čiji je vijabilitet arbitrarno prikazan kao 100%. Test aktivnosti kisele fosfataze je upotrebljen za izračunavanje IC<sub>50</sub> vredosti ispitivanih supstanci, koncentracije pri kojoj je vijabilitet ćelija smanjen za 50% u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. Za izračunavanje IC<sub>50</sub> vredosti je korišćen *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, SAD) softver.

### 3.3.2. MTT test

Osim eseja aktivnosti kisele fosfataze, za procenu ćelijskog vijabiliteta korišćen je i test aktivnosti mitohondrijalnih sukcinat dehidrogenaza (Mosmann, 1983; Harhaji i sar., 2004). Test je zasnovan na redukciji tetrazolijumske soli MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), dehidrogenazama ćelijskih mitohondrija. Ovi enzimi dovode do cepanja tetrazolijumskog prstena pri čemu se redukcijom bezbojni tetrazolijum prevodi u formazan, karakteristične ljubičaste boje. Redukciju MTT-a vrše isključivo aktivne mitohondrije živih ćelija, pa se upravo zbog ove činjenice MTT test koristi prilikom merenja ćelijskog vijabiliteta. Za potrebe eksperimenta, REH leukemijske ćelije su gajene u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara. Nakon tretmana i odgovarajućeg perioda inkubacije (24h), u svaki bunar je dodato po 50 µl rastvora MTT-a (0,5 mg/ml). Uzorci su potom inkubirani u trajanju od 1 časa. Pošto je supernatant odličen, DMSO je upotrebljen za liziranje ćelija i rastvaranje formazana. Intenzitet ljubičaste boje, koji je odgovarao broju živih ćelija, je detektovan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča na talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Dobijeni rezultati su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije čiji je vijabilitet arbitrarno postavljen na 100%.

## 3.4. Analiza morfoloških promena ćelija

### 3.4.1. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfološke karakteristike leukemijskih ćelija su ispitivane fazno kontrastnom mikroskopijom (Leica Microsystems DMIL, Wetzlar, Nemačka). REH leukemijske ćelije su tretirane antileukemijskim lekom i po isteku tretmana (24h), fotografisane *Leica Microsystems DFC320* kamerom (izabrano je uveličanje od 40×) i analizirane *Leica Application Suite* (version 2.8.1) softverom.

### 3.4.2. Invertna fluorescentna mikroskopija

Kisele vezikule, poput lizozoma i autofagozoma, su vizualizovane supravitalnim bojenjem sa akridin oranž fluorohromom. REH leukemijske ćelije su nakon isteka tretmana citarabinom (3,2  $\mu\text{M}$ ; 16h) inkubirane u prisustvu akridin oranž boje (1  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 37°C. Po isteku inkubacije, ćelije su isprane PBS-om i analizirane invertnom fluorescentnom mikroskopijom, upotrebom *Leica Microsystems DFC320* kamere (izabrano je uveličanje od 40 $\times$ ) i *Leica Application Suite* (version 2.8.1) softvera. Autofagolizozomi i lizozomi su prikazani na odgovarajućim fotografijama kao narandžasto/crveno fluorescentno obojene citoplazmatske vezikule, dok su jedra ćelija obojena fluorescentno zeleno na neutralnom pH.

### 3.4.3. Konfokalna fluorescentna mikroskopija

Konfokalna fluorescentna mikroskopija je primenjena za analizu punktuacije/agregacije LC3 proteina, koji predstavlja marker indukcije autofagije (Taguwa i sar., 2011). REH leukemijske ćelije su nakon isteka tretmana idarubicinom (25 nM, 4h) fiksirane sa 4% paraformaldehidom u periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon fiksiranja, ćelije su permeabilizovane pomoću hladnog metanola u trajanju od 10 minuta i blokirane tokom 1 časa sa 5% normalnim kozjim serumom i 0,3% Tritonom X-100. Ćelije su dalje oprane u PBS-u i inkubirane sa zečijim anti-LC3-II antitelom (1:200 u PBS-u sa 1% goveđim albumin serumom i 0,3% *Triton-om X-100* u trajanju od 90 minuta na sobnoj temperaturi). Ćelije su nakon toga inkubirane 1 čas sa sekundarnim antitelom, *Alexa Fluor 488* kozjim anti-zečijim IgG. Po završetku inkubacije, ćelije su oprane u PBS-u i fiksirane na mikroskopskim pločicama pomoću *Fluoromount-G* medijuma za fiksiranje. Analiza ćelija je izvršena konfokalnom skener mikroskopijom (Leica TCS SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka), upotrebom *PL APO 63 $\times$ 1,3 Glycerol HCX CS* objektiva sa 2,54 digitalnim uveličanjem i *Leica Confocal Software* softvera.

#### **3.4.4. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)**

Ultrastrukturalna analiza ćelija tretiranih antileukemijskim lekovima, citarabinom i idarubicinom, je obavljena transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM). REH leukemijske ćelije su 24 časa inkubirane sa citarabinom ili idarubicinom, nakon čega su sakupljene u odgovarajuće epruvete, centrifugirane u vremenskom periodu od 10 minuta na sobnoj temperaturi pri brzini od 500g, a potom je usledilo trostruko pranje ćelija PBS-om (1 ml). Poslednje pranje ćelija je izvršeno pri manjoj brzini (200g), u toku 10 minuta na sobnoj temperaturi, posle čega je usledila fiksacija ćelija 2,5% glutaraldehydom, a zatim ispiranje u kakodilatnom puferu u vremenskom periodu od 30 minuta. Nakon toga su ćelije fiksirane u 1% rastvoru osmijum-tetroksida tokom 60 minuta. Pošto su ponovo isprane u kakodilatnom puferu, ćelije su kontrastirane tokom noći, na temperaturi od 4°C u 0,5% vodenom rastvoru uranil-acetata. Potom je usledila dehidratacija taloga putem graduisanih koncentracija etanola i propilen-oksida, nakon čega su ćelije kalupljene u epoksidnoj smoli, *EPON 812*. Uzorci su dalje kalupljeni i sušeni 24 časa na temperaturi od 60°C, nakon čega je izvršeno sečenje semi-tankih isečaka na ultramikrotomu koji su potom bojani toluidin-plavim. Odabirom odgovarajućih semi-tankih isečaka, dobijeni su ultratanki isečci koji su postavljeni na bakarne mrežice i kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom, da bi bili analizirali *Morgagni 268D* transmisionim elektronskim mikroskopom (FEI, Hillsboro, OR, SAD).

#### **3.5. Ispitivanje parametara ćelijske smrti i oksidativnog stresa metodom protočne citofluorimetrije**

Protočna citofluorimetrija (engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS*) predstavlja biofizičku tehniku kojom se mogu istovremeno, automatski analizirati višestruke fenotipske odlike ćelija, kao što su relativna granularnost, veličina, interna kompleksnost, intenzitet fluorescence površinskih ili unutarćelijskih fluorohroma.

Protočna citofluorimetrija se upotrebljava prilikom ćelijskog sortiranja, ispitivanja broja ćelija, detekcije biomarkera, analize proteina. Sam aparat se sastoji od fluidne, optičke i elektronske komponente. Fluidna komponenta ima ulogu u transportu ispitivanih čestica u snopu tečnosti do optičke komponente, lasera koji pod različitim uglovima osvetljavaju i pobuđuju fluorescentno obeležene čestice. Fluorescencija ispitivanih uzoraka se zatim sakuplja, filtrira i konvertuje u digitalne signale koji se putem elektronske komponente dalje obrađuju. Statistički značajni podaci koji se putem protočne citofluorimetrije reprodukuju, odnose se na ukupnu populaciju analiziranih ćelija (Brown i Wittwer, 2000). Prilikom ispitivanja parametara ćelijske smrti i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta upotrebljen je protočni citometar, *FACSCalibur* (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka). Ispitivanje svakog uzorka je obuhvatalo 10 000 događaja, odnosno ćelija, za tretmane rađene u duplikatu ili triplikatu. Analiza dobijenih rezultata je izvršena *BD Cell Quest Pro* softverom.

### 3.5.1. Detekcija apoptoze i nekroze

Različiti tipovi ćelijske smrti, apoptoza i nekroza, su analizirani na *FACSCalibur* protočnom citometru (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka), nakon dvostrukog bojenja sa aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (aneksin V-FITC-om) i propidijum jodidom. U početnim fazama apoptoze, fosfolipid fosfatidil serin se premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane. Protein iz grupe aneksina, aneksin V se obeležava fluorescentnom bojom, fluorescein izotiocijanatom dajući aneksin V-fluorescein izotiocijanatom koji emituje zelenu fluorescenciju (FL1). Ovako fluorescentno obeležen protein se specifično vezuje za fosfatidil serin apoptotičnih ćelija, pa se zbog toga koristi prilikom detekcije apoptoze putem protočne citofluorimetrije. PI predstavlja fluorohrom koji ima sposobnost interkaliranja između baza DNK molekula i emituje crvenu fluorescenciju (FL2). Zbog svoje veličine, ovaj molekul nije u mogućnosti da prođe kroz ćelijsku membranu vijabilnih ćelija, ali ulazi u ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane i vezuje se za DNK molekul, pri čemu je intenzitet crvene fluorescence proporcionalan DNK sadržaju ćelije. Zbog ove odlike, PI se koristi



za distinkciju vijabilnih (bez FL2 fluorescence) i mrtvih ćelija (sa FL2 fluorescencom). Ćelije koje se boje dvostrukim bojenjem, aneksin V-fluorescein izotiocijanatom i propidijum jodidom, se mogu razvrstati u četiri različite populacije koje na tačkastom dijagramu mogu biti predstavljene u kvadratnoj raspodeli kao: zdrave ćelije (Aneksin<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), ćelije u ranoj apoptozi (Aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), ćelije u kasnoj apoptozi/ćelije u nekrozi (Aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Bojenje ćelija je izvršeno u skladu sa uputstvima proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD). Po završetku tretmana citarabinom (3,2 μM; 24h) ili idarubicinom (25 nM; 24h) , ćelije su centrifugirane tokom 5 minuta na 500g, na sobnoj temperaturi. Nakon toga je izvršeno ispiranje uzoraka u PBS-u (1 ml), posle čega su ćelije resuspendovane u 100 μl 10× razblaženog aneksin vezujućeg pufera sa aneksin V-FITC-om (0,2 μl). Nakon dodatka 10 μl propidijum jodida, ćelije su dalje inkubirane u periodu od 30 minuta pri temperaturi od 37°C u mraku. Po završetku inkubacionog perioda, uzorcima je dodato po 400 μl aneksin vezujućeg pufera. Analiza zeleno/crvene (FL1/FL2) fluorescence ispitivanih ćelija je izvršena na *FACSCalibur* protočnom citometru (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka), korišćenjem *CellQuest Pro* softvera (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka). Dobijeni rezultati su izraženi kao udeo odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

### **3.5.2. Ispitivanje faza ćelijskog ciklusa i fragmentacije DNK molekula**

Zastupljenost DNK molekula u ćelijama je analizirana protočnom citofluorimetrijom pošto su uzorci prvobitno permeabilizovani i fiksirani u etanolu i obojeni propidijum jodidom, kao što je prethodno pokazano (Nicoletti i sar., 1991; Kaludjerovic i sar., 2005; Riccardi i Nicoletti, 2006). Metoda se zasniva na sposobnosti propidijum jodida da se umeće u DNK molekul i pritom daje crvenu fluorescencu koja odgovara sadržaju DNK u ćeliji. Na ovaj način se može izvršiti analiza različitih faza ćelijskog ciklusa, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> faza rasta ćelija, S faza replikacije DNK molekula, G<sub>2</sub>/M faza ćelijske deobe. Osim toga, ovom analizom se može ispitati kvantifikacija apoptotske fragmentacije DNK molekula ćelija koje se nalaze u subG<sub>0</sub> fazi ćelijskog ciklusa. Tokom kasne faze programirane ćelijske smrti tipa I, DNK molekul se dezintegriše

putem endonukleaza, pri čemu se obrazuju fragmenti veličine 180 baznih parova, koji se nakupljaju u ćeliji. Oni mogu biti uklonjeni fiksiranjem ćelija etanolom i ispiranjem PBS-om, čime se sadržaj DNK molekula smanjuje u ćeliji. Zbog smanjenog sadržaja DNK, ćelije koje se nalaze u apoptozi se nakon bojenja sa propidijum jodidom distribuiraju ispred živih ćelija na histogramu, formirajući hipodiploidni region, odnosno zonu specifičnu za apoptozu koja se naziva sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> segment, koji prethodi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa. Pošto se propidijum jodid sa jednakim afinitetom vezuje i za RNK, upotreba RNA-aza je neophodna za dezintegraciju RNK molekula u ispitivanim ćelijama. Nakon isteka inkubacije sa citarabinom (3,2 μM; 24h) ili idarubicinom (25 nM; 24h), ćelije su dva puta oprane u PBS-u (1 ml) i resuspendovane u 300 μl PBS-a i 700 μl hladnog, apsolutnog etanola. Nakon toga su uzorci resuspendovani i ostavljeni na temperaturi od 4°C preko noći, posle čega je usledilo centrifugiranje na 800g u trajanju od 5 minuta na 22°C. Ćelije su onda oprane u 1 ml PBS-a, pri čemu je talog ćelija finalno resuspendovan u 300 μl PBS-a i 1 mg/ml RNA-aze, uz dodatak 0,1% Triton-a X-100. Ćelije su dalje inkubirane u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 37°C i u svaki uzorak je dodato 0,05 mg/ml propidijum jodida. Po završetku inkubacionog perioda od 30 minuta na temperaturi od 37°C, ćelije su ispitivane protočnom citofluorimetrijom (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka) korišćenjem *CellQuest Pro* softvera (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka). Dobijeni rezultati su iskazani kao % ćelija sa hipodiploidnim sadržajem u subG<sub>0</sub> fazi, u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

### 3.5.3. Ispitivanje aktivacije kaspaza

Jednu od glavnih karakteristika programirane ćelijske smrti tipa I predstavlja aktivacija kaspaza, apoptotsko-egzekutornih enzima. Aktivacija kaspaza je merena putem statmo-apoptotskog eseja u kome je fluorescentno obeleženi kaspazni inhibitor *ApoStat*, koji se vezuje za aktivne kaspaze, upotrebljen za prekidanje procesa apoptoze i ireverzibilno obeležavanje ćelija fluorohromom (Smolewski i sar., 2001). Ćelije su obojene sa ćelijski permeabilnim, FITC-konjugovnim pan-kaspaznim inhibitorom, pri čemu je aktivacija kaspaza izražena kroz povećanje zelene fluorescence (FL1). Ukratko, nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana antileukemijskim lekovima, citarabinom (3,2

$\mu\text{M}$ ) ili idarubicinom (25 nM), leukemijske ćelije su centrifugirane na 500g tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi i isprane u PBS-u. Uzorci su potom resuspendovani u 300  $\mu\text{l}$  medijuma kome je dodato 3  $\mu\text{l}$  FITC-konjugovanog inhibitora kaspaza (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) i dalje inkubirani 30 minuta na temperaturi od 37°C, nakon čega je usledilo pranje ćelija i krajnje resuspendovanje u 500  $\mu\text{l}$  PBS-a. Uzorci su analizirani protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem *CellQuest Pro* softvera (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka) i predstavljeni u vidu histograma raspodele intenziteta zelene fluorescence (FL1) koja odgovara %-u ćelija sa aktiviranim kaspazama u odgovarajućim tretmanima. Pomak histogramskog zapisa tretiranih uzoraka udesno, u odnosu na histogramski zapis kontrolnih, netretiranih uzoraka, korelira sa povećanjem intenziteta zelene fluorescence (FL1), odnosno aktivacijom kaspaza.

#### **3.5.4. Ispitivanje produkcije superoksidnog anjona**

Produkcija superoksidnih anjonskih radikala (superoksid;  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) u mitohondrijama ćelija inkubiranih sa citarabinom ili idarubicinom određivana je protočnom citofluorimetrijom primenom superoksid-selektivne boje dihidroetidijuma (DHE; hidroetidina). DHE fluorohrom slobodno prolazi kroz ćelijsku membranu, reagujući sa superoksidnim anjonskim radikalima u citoplazmi i tom prilikom dolazi do obrazovanja etidijuma, koji se nakon toga umeće u DNK molekul tretiranih ćelija i fluorescira crveno (FL2) (Li i sar., 2003). Leukemijske ćelije su tretirane citarabinom (3,2  $\mu\text{M}$ ; 24h) ili idarubicinom (25 nM; 24h), nakon čega je izvršena inkubacija sa DHE bojom (finalna koncentracija DHE boje je iznosila 20 $\mu\text{M}$ ) u vremenskom periodu od 30 minuta na temperaturi od 37°C. U sledećem koraku, ćelije su dva puta oprane u 1 ml PBS-a i centrifugirane (500g/5 min/22°C), nakon čega su finalno resuspendovane u 500  $\mu\text{l}$  PBS-a. Uzorci su analizirani protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem *CellQuest Pro* softvera (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka). Dobijeni rezultati su predstavljeni u vidu histograma raspodele intenziteta fluorescence, gde pomak histogramskog zapisa tretiranih uzoraka udesno, u odnosu na histogramski zapis kontrolnih, netretiranih uzoraka, korelira sa povećanjem intenziteta crvene fluorescence (FL2). Postignuti pomak neposredno upućuje na povećanje produkcije superoksidnih anjona kod tretiranih ćelija.

### 3.5.5. Ispitivanje promene membranskog potencijala mitohondrija

Prilikom analize membranskog potencijala mitohondrija upotrebljena je lipofilna katjonska boja, JC-1. Boja slobodno prolazi kroz mitohondrijalnu membranu zdravih ćelija, ulazeći u matriks mitohondrija gde u multimernoj formi daje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL2). U apoptotičnim ćelijama dolazi do kolapsa mitohondrijalnog membranskog potencijala, pri čemu JC-1 boja ne prolazi kroz intermembranski prostor, ostajući u svom monomernom obliku koji fluorescira zeleno (FL1). Dobijeni rezultati su predstavljeni međusobnim odnosom zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2), pri čemu je ovaj odnos kod netretiranih, kontrolnih ćelija uzet za jediničnu vrednost. Ukoliko se javlja depolarizacija unutrašnje membrane mitohondrija ovaj odnos raste, a ako se radi o hiperpolarizaciji, dolazi do smanjenja FL1/FL2 vrednosti. Nakon isteka tretmana, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500g posle čega je talog ćelija resuspendovan u 100 µl JC-1 boje (5 µg/ml) rastvorene u medijumu za kultivaciju. Uzorci su zatim inkubirani 30 minuta na temperaturi od 37°C u mraku, oprani u 1 ml PBS-a i finalno resuspendovani u 500 µl PBS-a. Obe forme boje se istovremeno detektuju protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem *CellQuest Pro* softvera (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka).

### 3.5.6. Ispitivanje unutarćelijskog zakišeljavanja

Ispitivanje autofagnog procesa u ćelijama tretiranim antileukemijskim lekovima je izvršeno supravitalnom, pH senzitivnom bojom akridin oranžom (1 µM) koji pri promeni kiselosti sredine menja fluorescencu. U dodiru sa kiselim sadržajem autofagolizozoma, akridin oranž fluorescira narandžasto-crveno (FL3), a pri kontaktu sa neutralnim pH citoplazme i jedra pokazuje zelenu fluorescencu (FL1). Stepen unutarćelijskog zakišeljavanja i zapremina kiselih vezikula u ćeliji su u korelaciji sa intenzitetom narandžasto-crvene fluorescence (Vucicevic i sar., 2014). Uticaj tretmana na povećanje intenziteta FL3 fluorescence, bez promene zelene FL1 fluorescence, upućuje na pojavu autofagnog procesa. Povećanje relativnog odnosa intenziteta narandžasto-crvene (FL3) i zelene (FL1) fluorescence implicira povećanje unutarćelijskog zakišeljavanja, tj. autofagije u tretiranim uzorcima u odnosu na

kontrolne, netretirane ćelije gde je ovaj odnos uzet za jediničnu vrednost. Ukratko, nakon isteka tretmana, ćelije su centrifugirane na 500g tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, posle čega su dva puta oprane u 1 ml PBS-a. Potom je u svaki uzorak dodato 300  $\mu$ l medijuma za kultivaciju u kojem je rastvorena boja akridin oranž (1  $\mu$ M). Nakon 30 minuta inkubacije na temperaturi od 37°C, uzorci su oprani i finalno resuspendovani u 500  $\mu$ l PBS-a. Tretirane ćelije su analizirane protočnom citofluorimetrijom, korišćenjem *CellQuest Pro* softvera (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka).

### 3.6. Imunoblot analiza

Aktivnost i ekspresija različitih signalnih proteina, kao i proteina uključenih u indukciju autofagije su ispitivane imunoblot tehnikom. Razdvajanje proteina je izvršeno prema veličini putem elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, nakon čega je usledila detekcija proteina od interesa koja se zasniva međusobnoj reakciji antigena i antitela.

Po isteku inkubacionog perioda, izvršeno je liziranje ćelija u puferu za lizu kome je dodat koktel inhibitora proteaza i fosfataza (30 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM *PMSF*, 10  $\mu$ l/ml koktela proteaznih inhibitora, 2mM natrijum ortovanadata ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) i 50 mM natrijum fluorida). Liziranje je vršeno na ledu tokom 30 minuta nakon čega su ćelije centrifugirane 15 minuta na 14000g na temperaturi od 4°C, a potom su supernatanti ukupnog ćelijskog lizata prikupljeni i skladišteni na temperaturi od -20°C. Koncentracija analiziranih proteina je ispitana metodom po *Bradford*-u (Bradford, 1976). Princip ovog testa zasniva se na pomeraju apsorbance boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* iz crvene u plavu oblast vidljivog dela spektra nakon vezivanja za proteine u kiseljoj sredini. Intenzitet plave boje koja je tom prilikom nagrađena je direktno srazmeran koncentraciji proteina u uzorku. Test je započet dodavanjem 3  $\mu$ l uzorka u 3 ml Bradfordovog reagensa (0,1 mg/ml *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 5% etanol, 10%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  u destilovanoj vodi), što odgovara razblaženju proteina u srazmeri od 1:1000. Apsorbanca je očitavana na čitaču za mikrotitarske ploče (Sunrise, Tecan, Dorset, Velika Britanija) na talasnoj dužini od 595 nm, dok su koncentracije proteina ispitivanih uzoraka određene na osnovu standardne krive koja je

dobijena korišćenjem rastvora poznatih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine*, *BSA*) u koncentracijama od 5, 10 15 i 20 mg/ml sa bojom.

Sledeći korak se sastojao u kuvanju uzoraka tokom 5 minuta na temperaturi od 100°C. Prilikom ovog postupka je zapremini ukupnog ćelijskog ekstrakta dodata odgovarajuća zapremina redukujućeg pufera za pripremu uzorka. Konačne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su iznosile: 10% glicerol, 2% natrijum dodecil sulfat, 2 mM 2-merkaptioetanol, 62,5 mM Tris-HCl, 0,002% bromfenol plavo, pri pH 6,8. Na ovaj način je izvršena delimična denaturacija ispitivanih proteina, pri čemu je ponovno obrazovanje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima sprečeno dodatkom 2-merkaptioetanol. Analizirani proteini su nakon hidrofobne interakcije sa natrijum dodecil sulfatom zaokruženi negativnim naelektrisanjem. Delimičnom denaturacijom je omogućeno da proteini zadrže svoju primarnu konformaciju i međusobno se razlikuju samo po molekulskoj masi.

Ispitivani proteini su nakon toga razdvajani metodom denaturišuće gel elektroforeze (engl. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*, *SDS-PAGE*) na osnovu razlika u molekulskim masama. Pri analizi Akt, AMPK, ERK, p62, beclin-1, Raptor i aktin proteina korišćen je 10% poliakrilamidni gel, za analizu LC3 proteina upotrebljen je 15% poliakrilamidni gel, dok je za ispitivanje mTOR i p70S6 kinaze korišćen 8% poliakrilamidni gel. Polimerizacija gelova se odvijala između staklene i keramičke ploče postavljene u stegu za pravljenje gela, sa češljem uronjenim u gel za sabijanje proteina (engl. *Stacking gel*) radi obrazovanja bunara u koje su nalivani uzorci. Proteini su nalivani u jednakim količinama u bunare na gelu za sabijanje proteina koga čine: 4% akrilamid/0,14% bisakrilamid; 0,1% SDS; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8. Gel za sabijanje proteina je naliven preko prethodno napravljenog gela za razdvajanje proteina (engl. *Resolving gel*) koji se sastoji od: 8% akrilamida/0,28% bisakrilamida ili 10% akrilamida/0,34% bisakrilamida ili 12% akrilamida/0,41% bisakrilamida, 0,1% SDS-a; 0,375 M Tris-HCl-a, pH 8,8. Amonijumpersulfat (0,05%) i *TEMED* (0,033%) su upotrebljeni kao katalizatori polimerizacije gelova. Elektroforetski pufer su činili sledeći reagensi: 192 mM glicin; 0,1% SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3. Električno polje je primenjeno celom površinom gela, uzrokujući migriranje negativno naelektrisanih proteina ka anodi. Pri prolasku proteina kroz gel za

sabijanje, primenjivan je konstantni napon od 100 V, a pri ulasku proteina u gel za razdvajanje, napon je pojačan na 160 V, na temperaturi od 4°C. Elektroforeza je prekinuta kada je front bromfenol plave boje napustio gel za razdvajanje proteina. Radi lakše vizualizacije razdvajanja proteina, na gel je nalivana i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa koji su služili kao marker za ispitivane uzorke (10 – 250 kDa, *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska).

Nakon završene elektroforeze, proteini su transferisani sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Transfer proteina je izvršen putem aparature za polusuvi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). Nitrocelulozne membrane i filter papir velike upijajuće moći su isečeni tako da odgovaraju površini gela (6×8 cm) i potopljeni u pufer za transfer (192 mM glicin, 20 % metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3) u trajanju od 5 minuta. Nakon toga je na katodu postavljeno 5 filter papira preko kojih je stavljen gel uz koji je prislonjena nitrocelulozna membrana koja je sa svoje anodne strane pokrivena sa još 5 filter papira pri čemu su zaostali vazdušni džepovi između slojeva istisnuti da bi se transfer proteina nesmetano odvijao. Zbog svog negativnog naelektrisanja, proteini su pod dejstvom struje konstantne jačine (0,8 mA/cm<sup>2</sup> nitrocelulozne membrane) transferisani sa gela na membranu koja se nalazila bliže pozitivnoj elektrodi, anodi, u trajanju od 90 minuta.

Nakon transfera, nespecifično vezivanje proteina na membrani je blokirano 5% rastvorom odmašćenog mleka u TBS-T puferu (TRIS pufer: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6; uz dodatak 0,05% Tween 20 deterdženta) u trajanju od 60 minuta. Nakon blokiranja, primarna zečija antitela na humani LC3-II (1:1500), fosfo-Akt (pAkt, 1:1000), Akt (1:2000), fosfo-ERK (1:1000), ERK (1:2000), fosfo-mTOR kinazu (1:500), mTOR kinazu (1:1000), fosfo-p70S6 kinazu (1:1000), p70S6 kinazu (1:1000), fosfo-AMPK (pAMPK, 1:1000), AMPK (1:1000), p62 (1:1000), beclin-1 (1:1000), fosfo-Raptor (p-Raptor, 1:1000), Raptor (1:1000), aktin (1:2000) su inkubirana u TBS-T puferu sa nitroceluloznim membranama, preko noći na temperaturi od 4°C uz blago mešanje. Potom je usledilo ispiranje primarnog antitela u TBS-T puferu (3×10 minuta) i inkubacija sa sekundarnim antitelom, anti-zečijim IgG konjugovanim sa peroksidazom

rena (1:3000) u toku 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga su membrane ponovo ispirane u TBS-T puferu (3×10 minuta) i dalje prelivane sa supstratom za peroksidazu rena, ECL-om (3 minuta). Peroksidaza, koja je konjugovana sa sekundarnim antitelom, je razgrađivala vodonik peroksid iz supstrata do vode i kiseonika. Kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz obrazovanje 3-aminofalata, koji je posledično emitovao foton svetlosti. Na ovaj način produkovana svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija), a intenzitet hemiluminiscence je bio direktno srazmeran količini proteina vezanog za membranu. Ekspresija LC3-II, beclin-1 i p62 proteina je izražena u odnosu na aktin, dok je u slučaju Akt, ERK, mTOR kinaze, p70S6 kinaze, AMPK i Raptor proteina, fosforilisana forma izražena u odnosu na totalnu formu proteina. Ekspresija proteina je kvantifikovana denzitometrijskom analizom, korišćenjem *ImageJ* softvera. Dobijeni rezultati su predstavljeni u odnosu na netretiranu kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena jedinična vrednost.

### 3.7. Transfekcija malom interferirajućom RNK

Prilikom inhibicije ekspresije LC3-II, p62 ili beclina-1, gena koji učestvuju u procesu autofagije, REH leukemijske ćelije su transfektovane malom interferirajućom RNK (engl. *small interfering RNA, siRNA*) za humani LC3-II, p62 i beclin-1 kao i kontrolnom siRNA. Subkonfluentne REH leukemijske ćelije su sađene u mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom za ćelije u suspenziji koje sadrže 96 bunara ili u Petrijeve šolje od 100×20 mm za ćelije u suspenziji i inkubirane preko noći, pri čemu je upotrebljen *RPMI 1640* medijum za kultivaciju ćelija u suspenziji sa FBS-a (10%), bez upotrebe antibiotika. Za rastvaranje oligomera siRNA od interesa, upotrebljen je medijum sa redukovanim serumom, *Opti-MEM*, u odsustvu antibiotika, pri čemu je inkubacija izvršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Radi uvođenja siRNA molekula u ćelije, upotrebljen je reagens za transfekciju, lipofektamin (engl. *Lipofectamine 2000*). Lipofekcija ili lipozom transfekcija predstavlja uvođenje genetskog materijala u ćeliju putem lipozoma čiji fosfolipidni dvosloj, koji je pozitivno naelektrisan, agregira sa negativno naelektrisanim genetskim materijalom, omogućujući na taj način savladavanje elektrostatičkog odbijanja ćelijske membrane. Lipofektamin je inkubiran 5



minuta na sobnoj temperaturi u *Opti-MEM* medijumu bez antibiotika. Potom su jednake zapremine ispitivane siRNA i razblaženog lipofektamina pomešane i inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi da bi se formirali oligomer-lipofektamin kompleksi. U sledećem koraku je ćelijama promenjen medijum, nakon čega je izvršeno dodavanje siRNA-lipofektamin kompleksa, pri čemu je finalna koncentracija siRNA iznosila 100 nM, dok je razblaženje lipofektamina od 600× izvršeno po preporuci proizvođača. Nakon 8 časova inkubacije sa medijumom za transfekciju, na temperaturi od 37°C, medijum je zamenjen dodatkom jednake zapremine normalnog medijuma za kultivaciju (*RPMI 1640* sa 10% FBS-om i antibioticima). Posle 24 časa transfekcije, ćelije su presađene u mikrotitarske ploče sa ravnim dnom za ćelije u suspenziji koje sadrže 96 i 24 bunara ili u Petrijeve šolje od 100×20 mm za ćelije u suspenziji i inkubirane narednih 24 časa. U sledećem koraku ispitivanja je analizirana ekspresija LC3-II, p62 i beclin-1 proteina imunoblot tehnikom. Nakon 24 časa, transfektovane ćelije su tretirane citarabinom (3,2 μM; 24h) ili idarubicinom (25 nM; 24h) posle čega je izvršena analiza ćelijskog vijabiliteta testom aktivnosti kisele fosfataze, indukcije autofagije, aktivacije kaspaza, indukcije apoptoze i nekroze i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta protočnom citofluorimetrijom.

### **3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za Atg4, Atg5, Atg7, Atg12 i p62**

#### **3.8.1. Izolacija RNK**

Proces izolovanja RNK molekula iz REH leukemijskih ćelija je izvršen pomoću reagensa za ekstrakciju RNK, *TRIZOL*-a. Nakon tretmana citarabinom (3,2 μM; 24h), REH leukemijske ćelije su centrifugirane na 500g, 5 minuta na sobnoj temperaturi, posle čega je supernatant odliven a ćelije prelivane sa 250 μl *TRIZOL*-a u kome su resuspendovane. U sledećem koraku analize, ćelije su 5 minuta inkubirane na sobnoj temperaturi nakon čega im je dodavano po 50 μl hloroforma. Uzorci su dalje vorteksirani i inkubirani 10 minuta na temperaturi od 4°C, a zatim centrifugirani 15 minuta na 12000g na temperturi od 4°C. Nakon centrifugiranja, došlo je do obrazovanja gornje vodene faze koja je sadržavala RNK, donje hloroformske faze u kojoj su se

izdvojili proteini i lipidi, i intermedijarne faze sa DNK. Vodena faza sa RNK je ekstrahovana, a zatim joj je dodat izopropanol u odnosu 1:1. Nakon invertovanja (8×) sadržaja epruveta, ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane 15 minuta na 12000g na temperaturi od 4°C. Po završetku centrifugiranja, na dnu epruveta se izdvojio talog RNK. Supernatant je odlivan, a talog opran dva puta po 5 minuta na 7500g u 1 ml hladnog etanola (75%). Etanol je pažljivo sakupljan pipetom dok u epruveti nije ostao samo talog RNK koji je sušen do uparavanja. Dobijeni talog RNK je rastvoren u 20 µl destilovane vode tretirane inhibitorom RNA-aza, *DEPC*-om (engl. *diethylpyrocarbonate*).

### 3.8.2. Reverzna transkripcija

Pošto je na *Gene Quant* kolorimetru izmerena koncentracija RNK, 1 µg RNK je rastvoren u 15 µl vode sa 0,2 µg nasumičnih heksamernih prajmera i dNTP-ova u finalnoj koncentraciji 1 mM. Destilovana voda je upotrebljena u svrhu kontrole pri eventualnoj kontaminaciji umesto RNK. Da bi došlo do nasumičnog vezivanja heksamera za RNK, rastvori su inkubirani 10 minuta na temperaturi 70°C. Uzorci su nakon toga stavljeni 5 minuta na led. U sledećem koraku je dodavano po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (5 x *First Strand Buffer*) i 1 µl *M-MuLV* (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus*) reverzne transkriptaze (200 U/µl), nakon čega su uzorci inkubirani na temperaturi od 25°C tokom 10 minuta. Zatim su uzorci inkubirani 60 minuta na temperaturi reakcije reverzne transkripcije od 42°C. Reverzna transkripcija je prekinuta inkubacijom uzoraka na 70°C u trajanju od 10 minuta. *cDNK* koja se dobija na kraju postupka je skladištena na temperaturi od 4°C, nakon čega je korišćena u reakciji lančanog umnožavanja.

### 3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu

Real-time RT-PCR (engl. *real time reverse transcriptase polymerase chain reaction*) metoda je korišćena prilikom analize ekspresije gena koji učestvuju u autofagnom procesu (Vucicevic i sar., 2014), pri čemu su ispitivani uzorci inkubirani u reakcionim, mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom za ćelije u suspenziji koje sadrže 96 bunara (Applied Biosystems, Cheshire, Velika Britanija), u *Realplex<sup>2</sup> Mastercycle* aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Prilikom ispitivanja je upotrebljen standardni protokol prema preporuci proizvođača za *TaqMan Universal PCR Master Mix* i komercijalno dostupni prajmeri i probe za humani Atg4B (Hs00367088 m1), Atg5 (Hs00169468 m1), Atg7 (Hs00197348 m1), Atg12 (Hs00740818 m1), p62 (Hs00177654 m1) i β2 mikroglobulin (Hs00984230 m1) kao konstitutivno eksprimiran gen (engl. *house-keeping gene*). Početak *Real-time* RT-PCR metode je predstavljala inkubacija uzoraka na temperaturi od 50°C u trajanju od 2 minuta, nakon čega su uzorci inkubirani na temperaturi od 95°C tokom 10 minuta. Nakon toga su uzorci prošli kroz 40 ciklusa (15 sekundi topljenja na temperaturi od 95°C/ 1 minut na temperaturi od 60°C radi vezivanja prajmera za DNK i sinteze DNK lanaca), posle čega je usledio finalni korak inkubacije uzoraka u trajanju od 1 minuta na temperaturi od 60°C. Sve analize su rađene u triplikatu, pri čemu je prag ciklusa (engl. *cycle of threshold, Ct*) kalibrisan na 0,1 relativnih fluorescentnih jedinica. Da bi se izračunao ΔCt, prosečne Ct vrednosti triplikata gena od interesa su umanjene za prosečne Ct vrednosti kontrolnih triplikata konstitutivno eksprimiranog gena, β2 mikroglobulina, dok je relativna ekspresija gena izražena kao  $2^{-\Delta Ct}$ . Dobijeni rezultati su predstavljeni u vidu relativne vrednosti ΔCt u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na jediničnu vrednost.

### **3.9. Statistička analiza podataka**

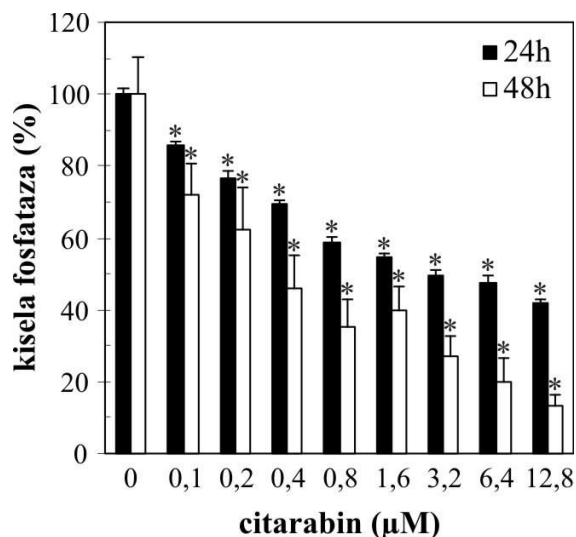
Metode statističke analitike su upotrebljene prilikom statističke obrade dobijenih podataka. Pri analizi statističke značajnosti razlike između tretmana upotrebljena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) za više nezavisnih uzoraka, praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom. Vrednost parametra  $p < 0,05$  se smatrala statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Citarabin indukuje apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza u REH leukemijskim ćelijama

#### 4.1.1. Citarabin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija

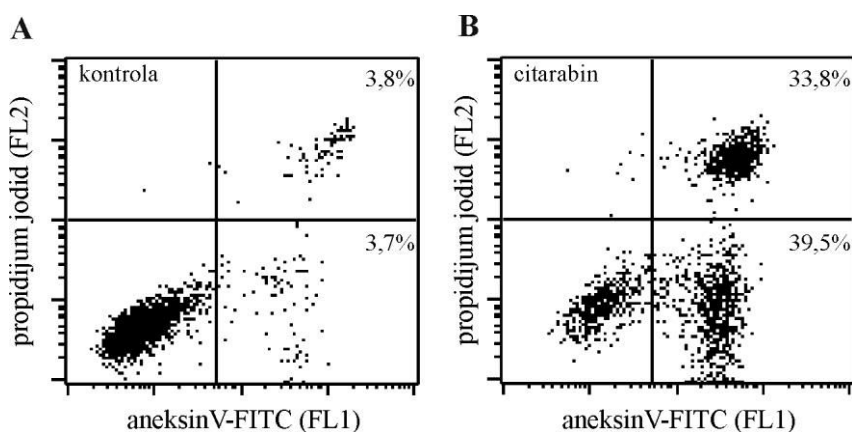
Da bi se potvrdilo antileukemijsko dejstvo citarabina, ćelije humane akutne limfocitne leukemijske linije (REH) tretirane su različitim koncentracijama citarabina u rasponu od 0,1 do 12,8  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 i 48 časova inkubacije, ćelijski vijabilitet je određivan testom aktivnosti kisele fosfataze. Analizom dobijenih rezultata je pokazano da citarabin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija na dozno i vremenski zavisnan način (slika 3). Dobijene  $\text{IC}_{50}$  vrednosti iznosile su 3,2  $\mu\text{M}$  nakon 24 časa i 0,4  $\mu\text{M}$  nakon 48 časova inkubacije. U daljim eksperimentima je korišćena koncentracija citarabina od 3,2  $\mu\text{M}$ . Dobijeni rezultati pokazuju da citarabin ispoljava antileukemijsko dejstvo na REH ćelijama.



**Slika 3. Citarabin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija.** REH ćelije tretirane su 24 i 48 časova (h) različitim koncentracijama citarabina. Testom aktivnosti kisele fosfataze određen je ćelijski vijabilitet. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija triplikata. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije.

#### 4.1.2. Citarabin stimuliše premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane REH leukemijskih ćelija

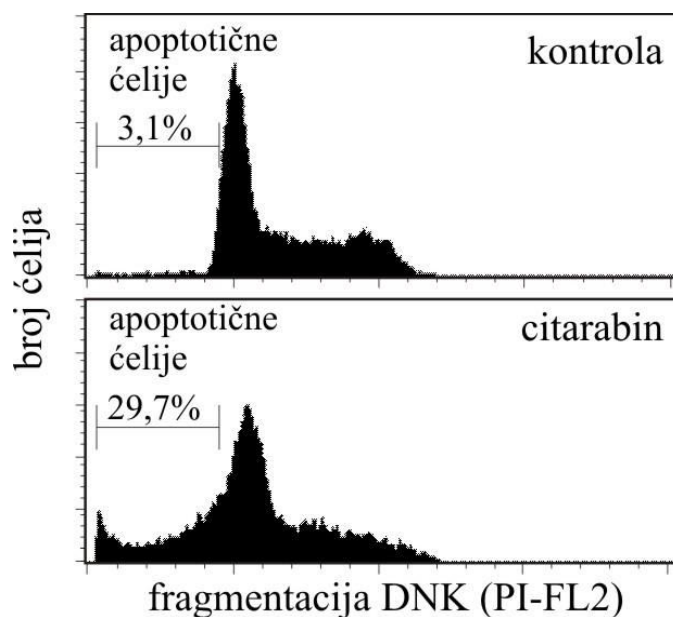
Pošto je pokazano da citarabin smanjuje vijabilitet REH ćelija, u daljem toku istraživanja je ispitivana sposobnost indukcije programirane ćelijske smrti ovog antileukemijskog leka. Nakon 24 časa tretmana citarabinom, ćelije su obojene aneksin V-fluorescin izotiocijanatom (aneksin V-FITC), koji se vezuje za fosfatidilserinske ostatke na površini ćelijske membrane apoptotičnih ćelija čiji je integritet očuvan, i propidijum jodidom (PI) koji ulazi u ćelije sa narušenim integritetom i vezuje se za DNK ovih nekrotičnih ćelija. Analizom rezultata protočne citofluorimetrije je utvrđeno da citarabin indukuje ranu apoptozu-aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (39,5%) i kasnu apoptozu/nekrozu-aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> (33,8%) REH leukemijskih ćelija (slika 4).



**Slika 4. Citarabin stimuliše premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane REH leukemijskih ćelija.** (A, B) REH leukemijske ćelije su tretirane 24 časa citarabinom (3,2  $\mu$ M), nakon čega su obojene aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Tačkasti dijagrami prikazuju kvadratnu distribuciju kontrolnih (A) i tretiranih REH ćelija (B) i predstavljaju reprezentativan prikaz tri različita eksperimenta.

#### 4.1.3. Citarabin izaziva fragmentaciju DNK molekula u REH leukemijskim ćelijama

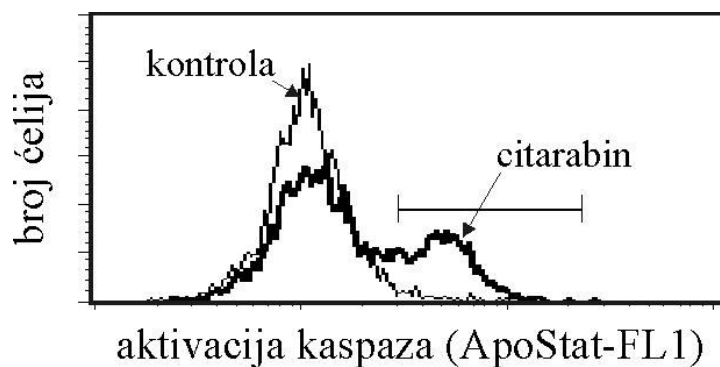
U sledećem eksperimentu je ispitivana sposobnost citarabina da indukuje fragmentaciju DNK molekula, jednu od osnovnih karakteristika umiranja ćelija apoptozom. Nakon 24 časa tretmana citarabinom, ćelije su fiksirane a zatim obojene propidijum jodidom (PI) koji se vezuje za DNK ćelija. Analizom ćelijskog ciklusa protočnom citofluorimetrijom pokazano je da citarabin povećava procenat hipodiploidnih ćelija (sub-G<sub>0</sub> faza), odnosno fragmentaciju DNK molekula (29,7% apoptotičnih ćelija u tretmanu u odnosu na 3,1% u kontroli) (slika 5). Dakle, ovim eksperimentom je potvrđeno da citarabin izaziva apoptozu u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 5. Citarabin indukuje fragmentaciju DNK molekula.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 24 časa sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) i analizirane protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja propidijum jodidom. Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### 4.1.4. Citarabin aktivira kaspaze u REH leukemijskim ćelijama

U narednom koraku analize ćelijske smrti ispitivana je sposobnost citarabina da indukuje aktivaciju kaspaza, enzima koji predstavljaju ključne egzekutore procesa apoptoze (Earnshaw i sar., 1999). U tu svrhu su tretirane ćelije obojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Tretman citarabinom je povećao aktivaciju kaspaza (34,57% u tretiranim ćelijama u odnosu na 3,4% u kontrolnim ćelijama), što sugerira da apoptoza indukovana citarabinom u REH leukemijskim ćelijama zavisi od aktivacije kaspaza. Konačno, aktivacija kaspaza zajedno sa fragmentacijom DNK i eksternalizacijom fosfatidilserina potvrđuje da apoptoza predstavlja osnovni tip smrti tumorskih ćelija tretiranih citarabinom.

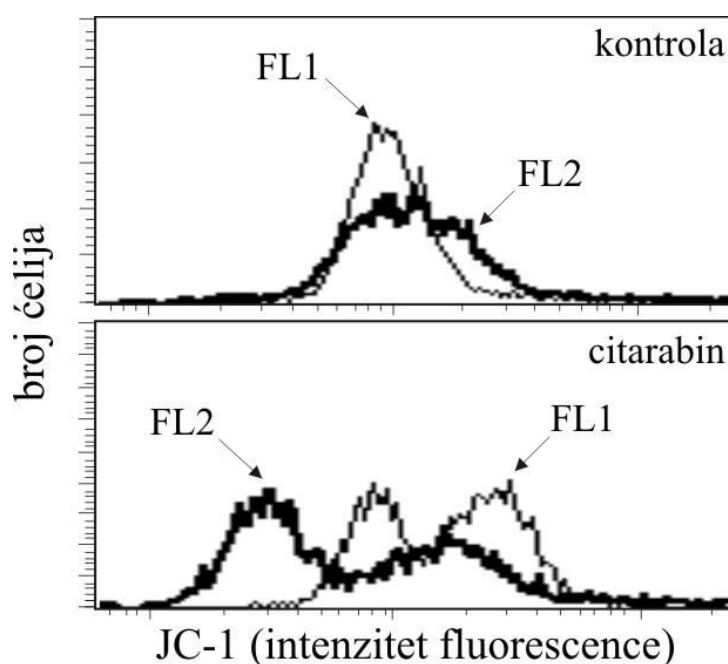


**Slika 6. Citarabin izaziva aktivaciju kaspaza.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 24 časa u prisustvu citarabina (3,2  $\mu\text{M}$ ), nakon čega su obojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazan je reprezentativni rezultat dobijen iz tri nezavisna eksperimenta.



#### 4.1.5. Citarabinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana depolarizacijom mitohondrijalne membrane

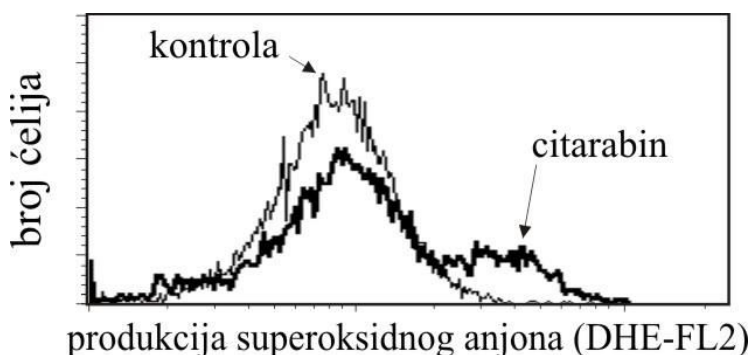
Poznato je da mitohondrije imaju jednu od ključnih uloga u indukciji procesa apoptoze (Green i Reed, 1998; Desagher i Martinou, 2000), pa su u narednom eksperimentu ispitivane promene potencijala mitohondrijalne membrane. Leukemijske ćelije su 24 časa tretirane citarabinom, a potom obojene lipofilnom katjonskom bojom (JC-1) i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Dobijeni rezultati su pokazali izrazit pad membranskog potencijala mitohondrija, što se uočava kao porast intenziteta zelene u odnosu na crvenu fluorescencu (za kontrolu FL1/FL2=1, a za tretman FL1/FL2=1,83) (slika 7). Iz svega navedenog se može izvesti zaključak da antileukemijski lek podstiče depolarizaciju mitohondrijalne membrane u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 7. Citarabin izaziva depolarizaciju mitohondrijalne membrane.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 24 časa sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) i obojene fluorescentnom bojom JC-1, nakon čega je izvršena analiza membranskog mitohondrijalnog potencijala protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### 4.1.6. Citarabinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana oksidativnim stresom

U daljim eksperimentima analiziran je oksidativni stres, koji kao i depolarizacija mitohondrija učestvuje u indukciji apoptoze (Kannan i Jain, 2000). U tu svrhu je upotrebljen fluorohrom dihidroetidijum (DHE) koji se koristi za ispitivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i selektivan je za superoksidni anjonski radikal. Nakon 24 časa inkubacije sa citarabinom, REH leukemijske ćelije su obojene DHE bojom i analizirane protočnom citofluorimetrijom (slika 8). Rezultati su pokazali da tretman citarabinom povećava intenzitet crvene (FL2) fluorescence DHE boje (za kontrolu FL2=1, za tretman FL2=1,37), što ukazuje na povećanu produkciju superoksidnog anjonskog radikala. Dakle, antileukemijski lek izaziva apoptozu u REH leukemijskim ćelijama posredovanu indukcijom oksidativnog stresa.

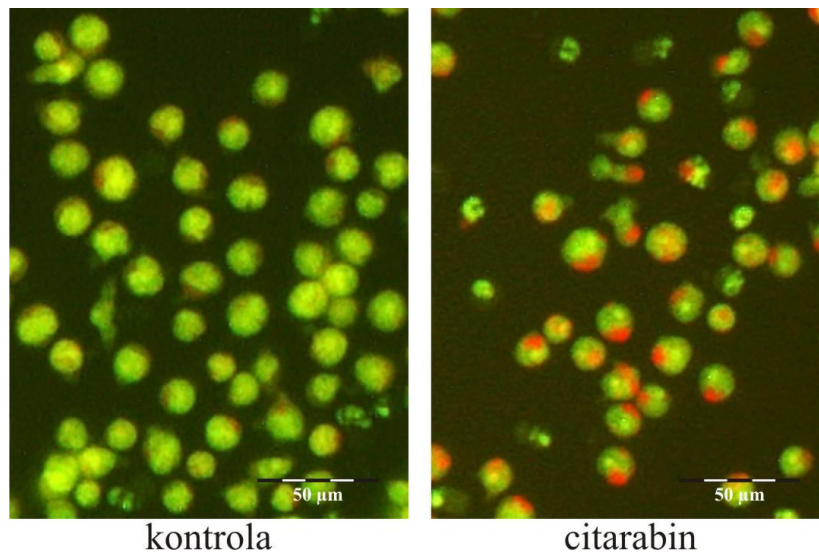


**Slika 8. Citarabin indukuje sintezu superoksid anjonskog radikala.** Nakon 24 časa tretmana citarabinom (3,2  $\mu$ M), REH ćelije su obojene DHE fluorohomom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazani reprezentativni histogram je dobijen iz tri nezavisna eksperimenta.

## 4.2. Citarabin indukuje autofagiju u REH leukemijskim ćelijama

### 4.2.1. Citarabin podstiče unutarćelijsku acidifikaciju REH leukemijskih ćelija

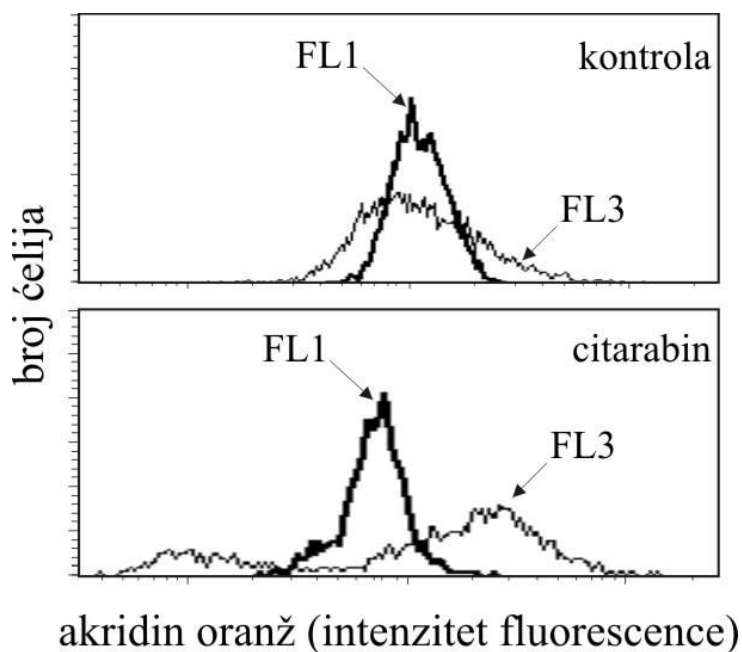
Nakon što je utvrđeno da citarabin izaziva programiranu ćelijsku smrt tipa I u leukemijskim ćelijama, ispitivana je sposobnost hemoterapeutika u indukciji programirane ćelijske smrti tipa II, autofagije. Autofagija predstavlja bazični katabolički mehanizam koji uključuje ćelijsku degradaciju sopstvenih proteina i oštećenih organela u autofagolizozomima posredstvom kiselih lizosomalnih hidrolaza (Glick i sar., 2010). REH leukemijske ćelije su nakon 16 časova inkubacije citarabinom obojene pH senzitivnom bojom akridin oranžom, koja fluorescira zeleno u neutralnom pH citoplazme ćelija (FL1), a narandžasto-crveno u kiselom pH vezikula (FL3). Primenom fluorescentne mikroskopije, uočeno je da je u citoplazmi tretiranih ćelija došlo je do povećanja broja i zapremine narandžasto-crvenih, kiselih vezikula, dok je unutarćelijski sadržaj kontrolnih ćelija bio obojen zeleno (slika 9).



**Slika 9. Citarabin stimuliše stvaranje kiselih vezikula u REH leukemijskim ćelijama.** REH leukemijske ćelije su nakon 16 časova tretmana citarabinom (3,2 µM) obojene akridin oranžom i analizirane fluorescentnom mikroskopijom (skala za procenu veličine 50 µm; uveličanje 40x).

Kvantitativna analiza je izvedena citofluorimetrijskom analizom ćelija obojenih akridin oranžom, gde je utvrđeno da nakon 16 časova tretmana citarabinom u leukemijskim

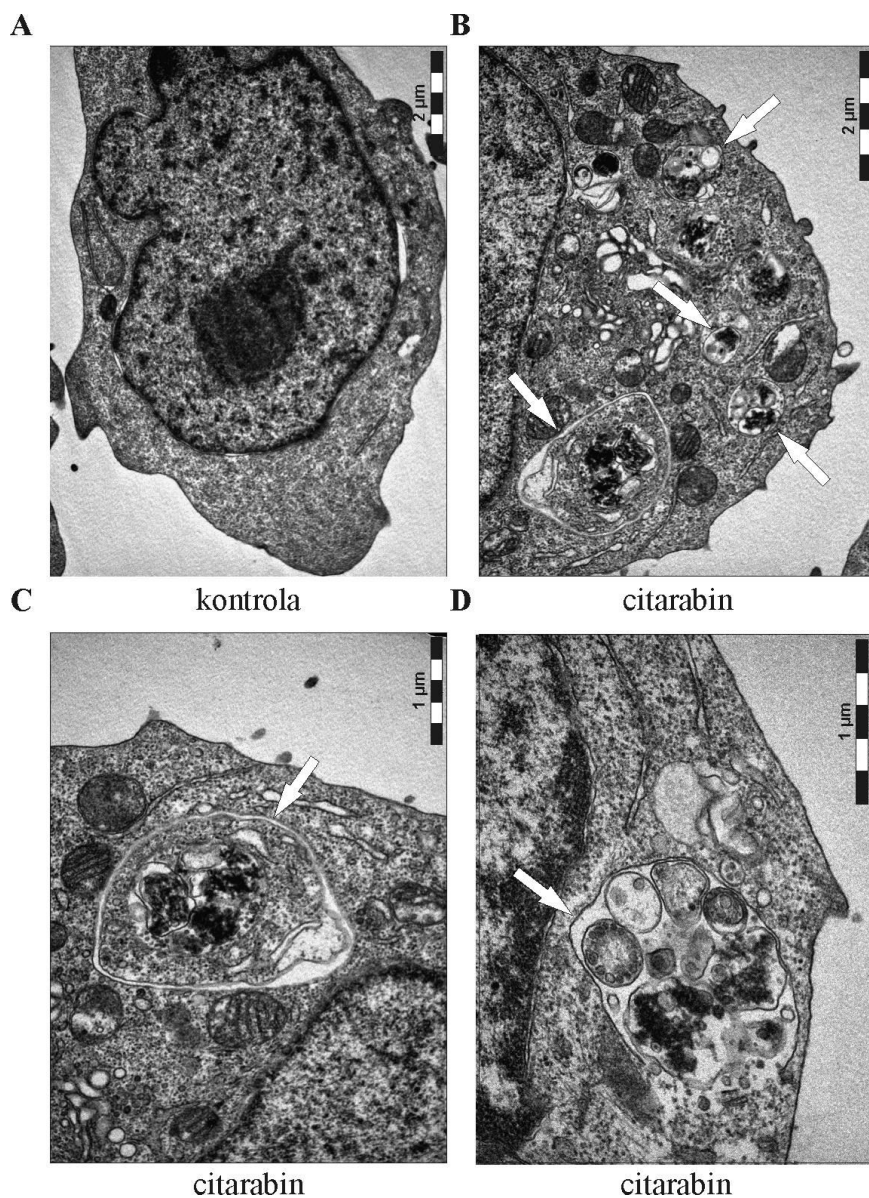
ćelijama dolazi do porasta odnosa intenziteta crvene i zelene fluorescence (za kontrolu FL3/FL1=1, za tretman FL3/FL1=2,4) koji takođe ukazuje na povećanje unutarćelijskog zakišeljavanja (slika 10). Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da antileukemijski lek izaziva unutarćelijsku acidifikaciju, što je povezano sa povećanjem broja kiselih autofagolizozoma, odnosno pojavom autofagije u REH ćelijama.



**Slika 10. Citarabin indukuje unutarćelijsku acidifikaciju.** REH leukemijske ćelije su 16 časova tretirane citarabinom ( $3,2 \mu\text{M}$ ) i potom obojene akridin oranž fluorohromom. Protočnom citofluorimetrijom analiziran je odnos relativnih intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1). Reprezentativni histogrami su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### **4.2.2. Citarabin indukuje stvaranje autofagnih vezikula u REH leukemijskim ćelijama**

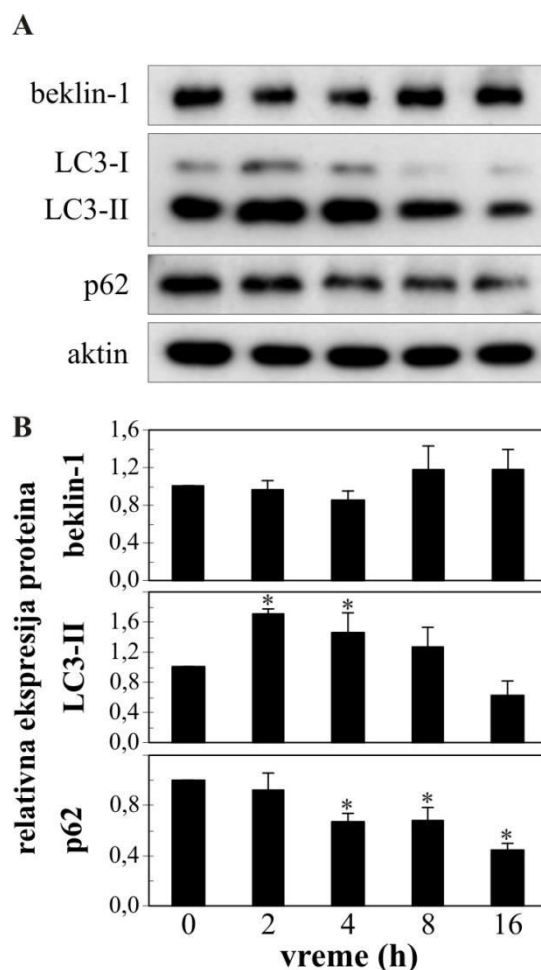
Kako pojava, odnosno povećanje broja kiselih vezikula nije apsolutni dokaz prisustva autofagije, primenom drugih eksperimentalnih metoda izvršena je dalja analiza ovog ćelijskog procesa. Transmisiona elektronska mikroskopija predstavlja jednu od najpreciznijih metoda za detekciju autofagije (Yla-Anttila i sar., 2009). Rezultati ultrastrukturne TEM analize su pokazali da se u citoplazmi kontrolnih ćelija ne uočavaju vezikule koje podsećaju na autofagolizosome (slika 11A) dok citarabin podstiče intenzivnu vakuolizaciju citoplazme REH ćelija (slika 11B). Neke od ovih vezikula poseduju dvostruku membranu koja okružuje citoplazmatski sadržaj, što predstavlja morfološku karakteristiku autofagozoma (slika 11C), dok se u drugima jasno uočavaju degradirane ćelijske organele obavijene jednostrukom membranom, što bi moglo da ukaže na prisustvo autofagolizozoma (slika 11D).



**Slika 11. Citarabin indukuje stvaranje autofagnih vezikula u REH leukemijskim ćelijama – TEM analiza.** Prikazane su reprezentativne elektronske mikrografije dobijene elektronskom mikroskopijom ultratankih isečaka (skala za procenu veličine 2 µm; 1 µm) iz dva različita eksperimenta. U citoplazmi kontrolnih, netretiranih ćelija (A) se ne uočavaju vezikule koje podsećaju na autofagolizosome dok se u citoplazmi REH leukemijskih ćelija inkubiranih sa citarabinom (3,2 µM; 24h) primećuje intenzivna vakuolizacija (označeno strelicama) (B), prisustvo vezikula koje nalikuju autofagozomima (označeno strelicom) (C), i vezikula koje liče na autofagolizosome sa degradiranim ćelijskim sadržajem (označeno strelicom) (D).

#### **4.2.3. Citarabin stimuliše konverziju LC3 i razgradnju p62, ali ne utiče na ekspresiju beclin-1 proteina u REH leukemijskim ćelijama**

Daljim eksperimentima ispitivana je ekspresija proteina koji su karakteristični za indukciju autofagije, poput LC3 proteina, koji Atg4 enzim proteolitički obrađuje nakon translacije, obrazujući na taj način solubilnu LC3-I formu. LC3-I izoforma proteina se prilikom indukcije autofagije, konjugacijom sa PE, konvertuje u LC3-II izoformu, koja se zatim inkorporira u autofagozomalnu membranu zbog čega se LC3-II izoforma proteina koristi kao specifični marker autofagije (Barth i sar., 2010). REH leukemijske ćelije su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije u prisustvu citarabina analizirane imunoblot tehnikom. Kvantifikacija jačine traka dobijenih imunoblotom (slika 12A) izvršena je denzitometrijskom analizom, pri čemu je ekspresija LC3-II forme proteina izražena relativno u odnosu na aktin, koji je upotrebljen kao kontrola ukupne koncentracije proteina u uzorku. Nivo LC3-II proteina u kontroli arbitrarno je podešen na 1 (slika 12B). Pokazano je da citarabin indukuje vremenski zavisnu konverziju LC3-I u LC3-II formu proteina, pri čemu je maksimalna ekspresija LC3 II proteina detektovana već nakon 2 časa, posle čega dolazi do njenog postepenog opadanja (slika 12A, B). Dalje, kako je prikazano na slici 12A i 12B, tretman citarabinom je značajno smanjio nivo p62, multifunkcionalnog adaptorskog proteina, koji promovise degradaciju poliubikvitiranih proteinskih agregata putem interakcije sa LC3 proteinom u autofagozomima (Glick i sar., 2010). Smanjenjem ekspresije p62 proteina, selektivne mete autofagne degradacije, potvrđeno je da tretman citarabinom u REH ćelijama dovodi do porasta autofagne proteolize. Sa druge strane, antileukemijski lek nije povećao ekspresiju proautofagnog proteina beclina-1, koji učestvuje u inicijaciji formiranja autofagozoma (Pattingre i sar., 2008), što navodi na zaključak da je njegova bazalna ekspresija dovoljna da izazove autofagni odgovor u leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom. Dakle, citarabin povećava ekspresiju LC3 i stimuliše njegovu konverziju, smanjuje ekspresiju p62 i povećava njegovu razgradnju, ali ne utiče na ekspresiju beclin-1 proteina u REH leukemijskim ćelijama.



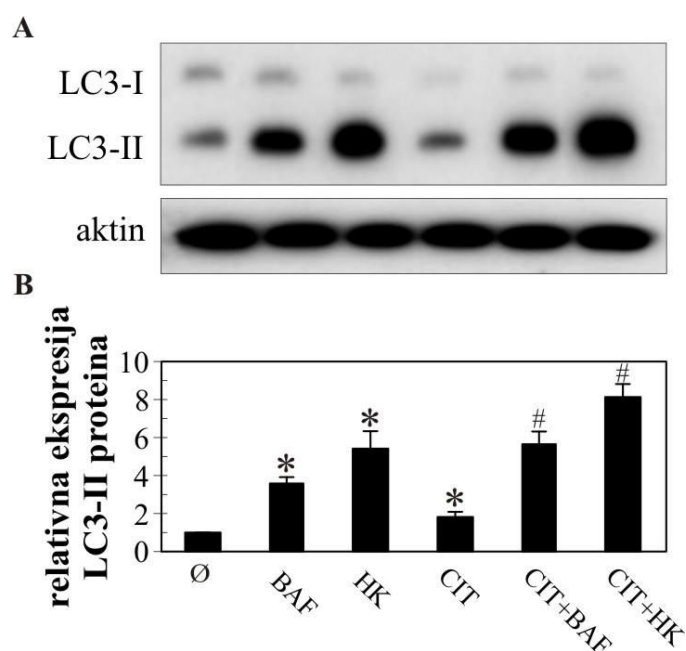
**Slika 12. Citarabin stimuliše konverziju LC3, razgradnju p62, ali ne povećava ekspresiju beclin-1 proteina.** (A) REH leukemijske ćelije su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri nezavisna eksperimenta (A), kao i odgovarajuća denzitometrijska analiza izražena kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (B). \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije.

#### 4.2.4. Citarabin stimuliše autofagni fluks u REH leukemijskim ćelijama

Da bi se utvrdilo da li porast nivoa LC3-II proteina odražava indukciju autofagije tj. formiranje autofagozoma, ili smanjenje autofagne proteolize, odnosno blokadu LC3-II degradacije u autofagolizozomima, izvršena je imunoblot analiza nivoa LC3-II proteina leukemijskih ćelija tretiranih citarabinom u prisustvu inhibitora proteolize bafilomicina A1 i hlorokina (slika 13A). Bafilomicin A1 (BAF) je u eksperimentu primenjen u koncentraciji 10 nM, dok je hlorokin (HK) primenjen u koncentraciji 20  $\mu$ M. Vremenski interval tretmana kod oba proteolizna inhibitora



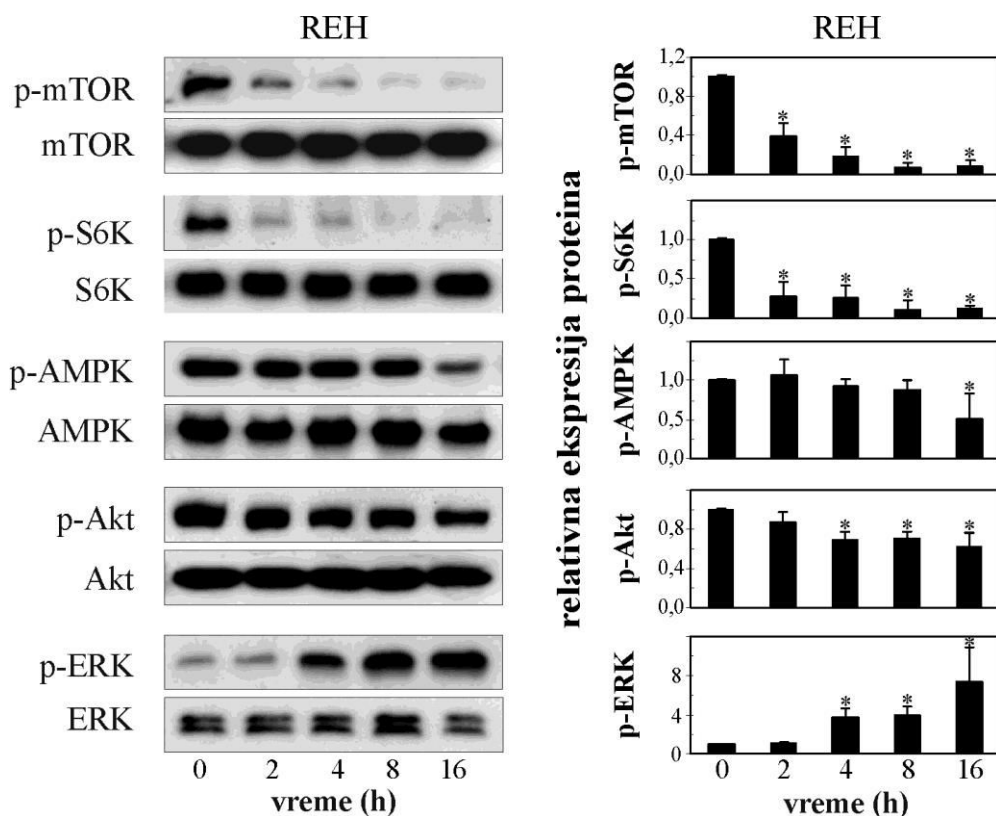
iznosio je 8 časova da bi se izbegli nespecifični efekti dugoročne autofagne blokade (Rubinsztein i sar., 2009). Inhibicijom autofagne proteolize, došlo je do očekivanog povećanja nivoa LC3-II izoforme proteina, dok je citarabin dodatno stimulisao konverziju LC3 proteina. Rezultati prikazani na slici 13A i 13B jasno pokazuju da citarabin indukuje povećanje autofagnog fluksa u REH leukemijskim ćelijama, odnosno da je povećanje ekspresije LC3-II forme proteina zaista posledica njenog povećanog stvaranja, a ne smanjene razgradnje. Sumiranjem prethodnih rezultata se može nedvosmisleno zaključiti da citarabin indukuje autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 13. Citarabin indukuje povećanje autofagnog fluksa.** (A, B) REH leukemijske ćelije su inkubirane sa citarabinom (CIT; 3,2  $\mu$ M) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora proteolize, bafilomicina A1 (BAF; 10 nM) i hlorokina (HK; 20  $\mu$ M). Nakon 8 časova inkubacije izvršena je analiza konverzije LC3 proteina imunoblot tehnikom (A), a rezultati analizirani denzitometrijom (B). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta (A), kao i rezultati denzitometrijske analize prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (B). \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo inhibitorima proteolize i samo citarabinom.

#### **4.2.5. Autofagija indukovana citarabinom u REH leukemijskim ćelijama je posredovana inhibicijom mTOR kinaze i modulacijom aktivnosti Akt i ERK proteina**

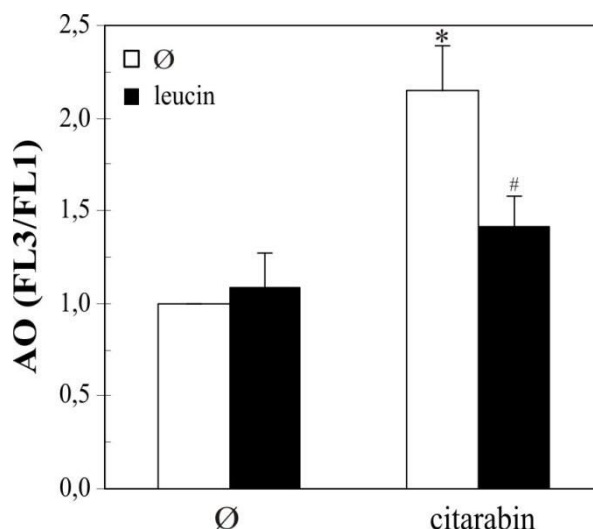
Ključni regulator indukcije autofagije je serin/treonin protein kinaza mTOR (Jung i sar., 2010). U daljim eksperimentima, imunoblot analizom je ispitana vremenska dinamika aktivacije mTOR kinaze, kao i njegovih ushodnih regulatornih proteina AMPK, Akt i ERK. Nakon 2, 4, 8 i 16 časova tretmana REH ćelija citarabinom, pokazano je da je indukcija autofagije povezana sa brzim i snažnim smanjenjem fosforilacije mTOR kinaze, kao i njenog direktnog supstrata, p70S6 kinaze (slika 14). Antileukemijski lek je takođe smanjio fosforilaciju potentnog mTOR stimulatora, protein kinaze Akt, ali je ovo smanjenje uočeno nakon redukcije aktivacije mTOR/p70S6 kinaze i povećanja LC3 konverzije. S druge strane, citarabin u REH ćelijama nije stimulisao fosforilaciju AMPK, glavnog unutarćelijskog energetskog senzornog molekula sa mTOR-inhibirajućim kapacitetom. Interesantno je da je hemoterapeutik stimulisao fosforilaciju ERK proteina, ali je aktivacija ovog proteina takođe kasnila u odnosu na snažnu inhibiciju mTOR kinaze i p70S6 kinaze.



**Slika 14. Citarabin inhibira mTOR kinazu i moduliše ekspresiju Akt i ERK proteina u REH leukemijskim ćelijama.** (A, B) REH leukemijske ćelije su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta (A), kao i rezultati denzitometrijske analize prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (B). \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije.

#### 4.2.6. Inhibicija mTOR kinaze je ključna u indukciji autofagije citarabinom

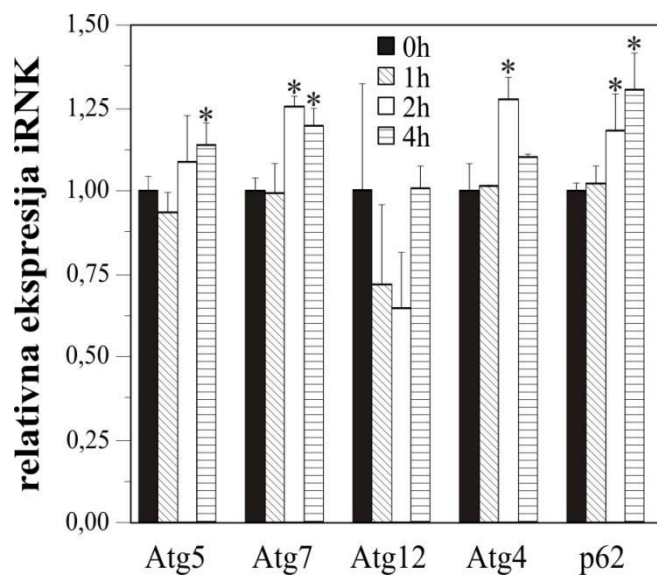
Da bi se ispitala uloga mTOR kinaze u indukciji autofagije citarabinom, upotrebljen je potentni aktivator mTOR-a, leucin (Kimball i sar., 1999). Citofluorimetrijskom analizom REH leukemijskih ćelija obojenih akridin oranžom, utvrđeno je da je leucin delimično sprečio unutarćelijsku acidifikaciju indukovanu citarabinom (slika 15). Dakle, inhibicija mTOR kinaze ima značajnu ulogu u indukciji autofagije antileukemijskim lekom.



**Slika 15. Citarabinom indukovana autofagija posredovana je inhibicijom mTOR kinaze.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 16 časova sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) u odsustvu ili prisustvu leucina (2 mM), nakon čega su obojene akridin oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazan je reprezentativni rezultat dobijen iz tri nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo citarabinom).

#### 4.2.7. Citarabin indukuje ekspresiju ATG gena u REH leukemijskim ćelijama

Iako se ranije smatralo da je indukcija autofagije regulisana na posttranskripcionom nivou, sve više podataka ukazuje na značajnu ulogu transkripcije različitih ATG gena u započinjanju procesa autofagije (Feng i sar., 2014; Feng i sar., 2015). Uticaj citarabina na ekspresiju ATG gena analiziran je *real-time* RT-PCR-om nakon 1, 2 i 4 časa inkubacije. Pokazano je da je antileukemijski lek značajno stimulisao ekspresiju iRNK za Atg4, Atg5, Atg7 i p62, ali ne i Atg12 (slika 16). Dakle, Atg4, Atg5, Atg7 i p62 su značajni za indukciju autofagije citarabinom.

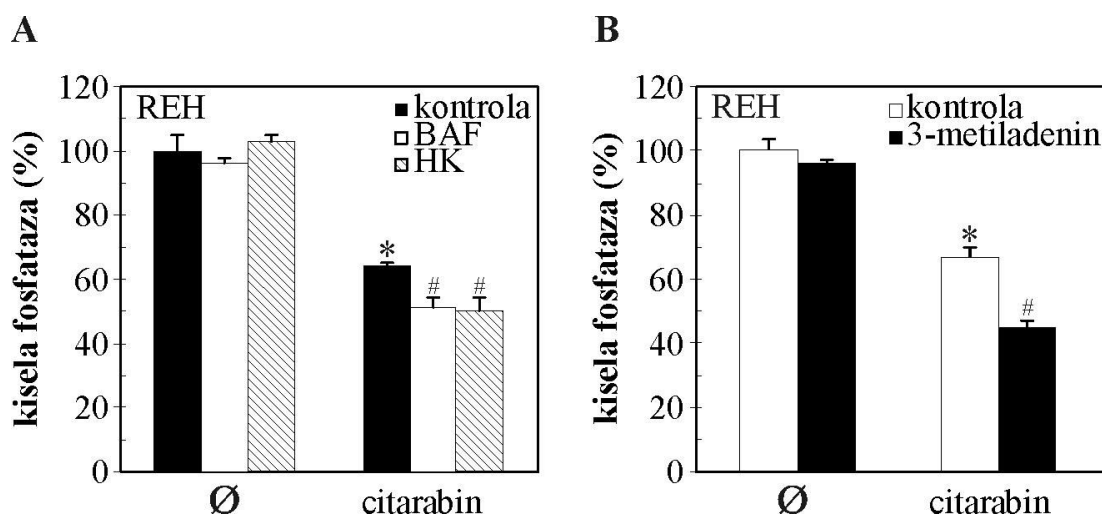


**Slika 16. Citarabin indukuje ekspresiju ATG gena.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 1, 2 i 4 časa sa citarabinom (3,2  $\mu$ M), nakon čega je *real-time* RT-PCR tehnikom analizirana ekspresija Atg4, Atg5, Atg7, Atg12 i p62 informacionih RNK (iRNK). Prikazani su reprezentativni rezultati dobijeni iz triplikata tri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.

### 4.3. Autofagija štiti leukemijske ćelije od apoptoze indukovane citarabinom

#### 4.3.1. Citarabin indukuje protektivnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama

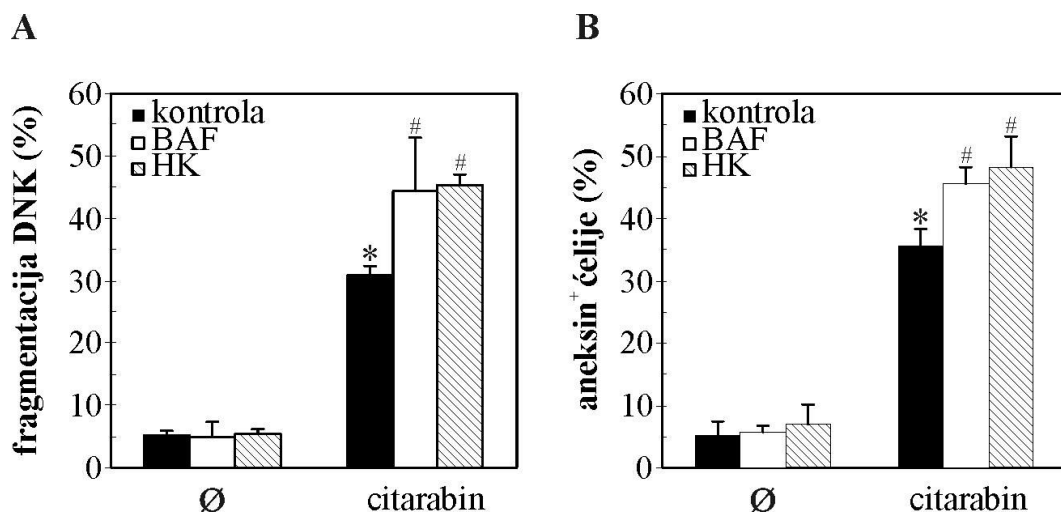
U leukemijskim ćelijama autofagija može biti način preživljavanja, ali i tumor supresorni mehanizam, tj. može biti alternativni način umiranja ćelija rezistentnih na indukciju apoptoze (Hippert i sar., 2006; Jin i White, 2007). Da bi se utvrdila uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina, REH ćelije su inkubirane sa citarabinom u prisustvu farmakoloških inhibitora različitih faza procesa autofagije. Analizom rezultata dobijenih testom aktivnosti kisele fosfataze utvrđeno je da bafilomicin A1 i hlorokin, agensi koji blokiraju autolizozomalnu acidifikaciju i autofagnu proteolizu (Mizushima i sar., 2010), značajno povećavaju smrt REH ćelija indukovanu citarabinom (slika 17A). Osim toga, i 3-metiladenin, koji blokira formiranje autofagozoma (Seglen i sar., 1984), je povećao toksično delovanje citarabina prema tumorskim ćelijama (slika 17B). Dakle, citarabin indukuje protektivnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 17. Citarabin indukuje protektivnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.** (A) REH ćelije su inkubirane sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora autofagije bafilomicina A1 (BAF; 10 nM), hlorokina (HK; 20  $\mu$ M), kao i (B) 3-metiladenina (5 mM). Nakon 24 časa inkubacije, testom aktivnosti kisele fosfataze određen je ćelijski vijabilitet. Prikazani su reprezentativni rezultati tripplikata iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo citarabinom.

#### 4.3.2. Autofagija štiti REH ćelije od apoptoze indukovane citarabinom

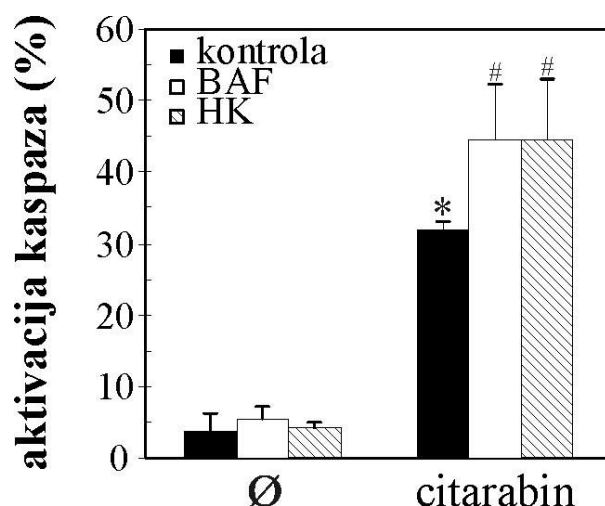
Pošto je prethodno pokazano da apoptoza predstavlja osnovni tip umiranja ćelija tretiranih citarabinom (Slika 4 i 5), dalje je ispitan odnos između autofagije i apoptoze u REH ćelijama. Rezultati dobijeni protočnom citofluorimetrijom su pokazali da inhibitori autofagije bafilomicin A1 i hlorokin povećavaju fragmentaciju DNK (slika 18A) i eksternalizaciju fosfatidilserina (slika 18B) ćelija tretiranih citarabinom. Dakle, autofagija sprečava proapoptotsko delovanje citarabina u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 18. Inhibicija autofagije povećava apoptozu u REH leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom.** REH leukemijske ćelije su inkubirane sa citarabinom (3,2  $\mu\text{M}$ ) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora proteolize, bafilomicina A1 (BAF; 10 nM) i hlorokina (HK; 20  $\mu\text{M}$ ). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana fragmentacija DNK u ćelijama obojenim propidijum jodidom (A) i translokacija fosfatidilserina u ćelijama obojenim aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo citarabinom.

#### 4.3.3. Autofagija inhibira aktivaciju kaspaza stimulisanu citarabinom u REH leukemijskim ćelijama

Daljom analizom mehanizama citoprotektivnog delovanja autofagije pokazano je da bafilomicin A1 i hlorokin povećavaju citarabinom indukovanu aktivnost kaspaza (slika 19) ćelija tretiranih citarabinom, odnosno da sama autofagija sprečava aktivaciju kaspaza.

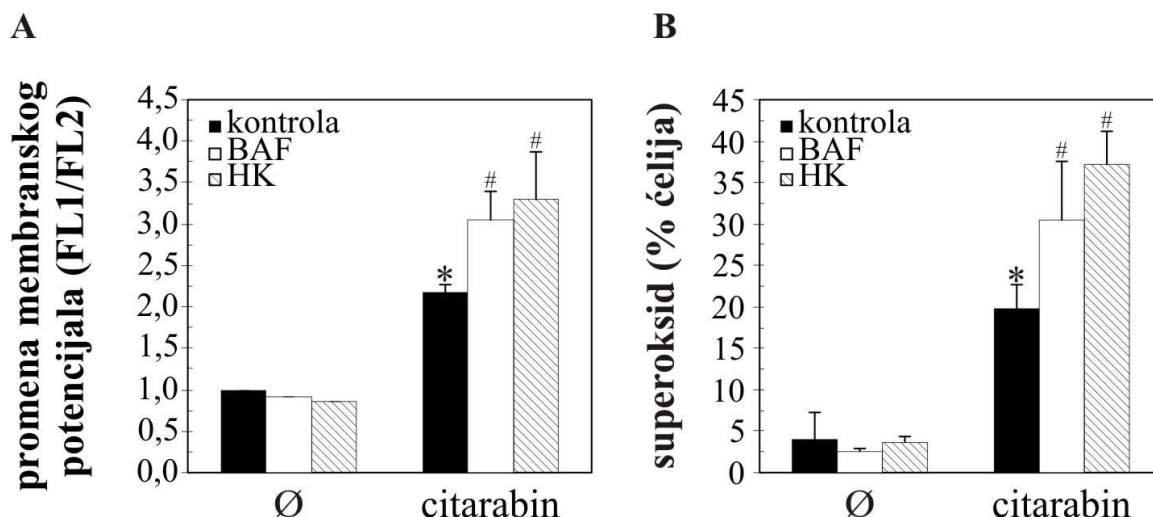


**Slika 19. Inhibicija autofagije izaziva aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim citarabinom.** REH leukemijske ćelije su inkubirane sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora proteolize, bafilomicina A1 (BAF; 10 nM) i hlorokina (HK; 20  $\mu$ M). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana aktivacija kaspaza bojenjem ApoStat-om. Prikazan je reprezentativni rezultat iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo citarabinom.

#### **4.3.4. Autofagija suprimira oksidativni stres i depolarizaciju mitohondrija indukovanu citarabinom u REH leukemijskim ćelijama**

Kako je prethodno pokazano, oksidativni stres i depolarizacija mitohondrija su u osnovi citotoksičnog delovanja citarabina (slika 7 i 8). Analizom na protočnom citofluorimetru je pokazano da inhibitori autofagije stimulišu ove procese u tumorskim ćelijama tretiranim citarabinom (slika 20A i 20B). Dakle, citoprotektivna autofagija sprečava oksidativni stres i depolarizaciju mitohondrija koje indukuje citarabin u REH ćelijskoj liniji.

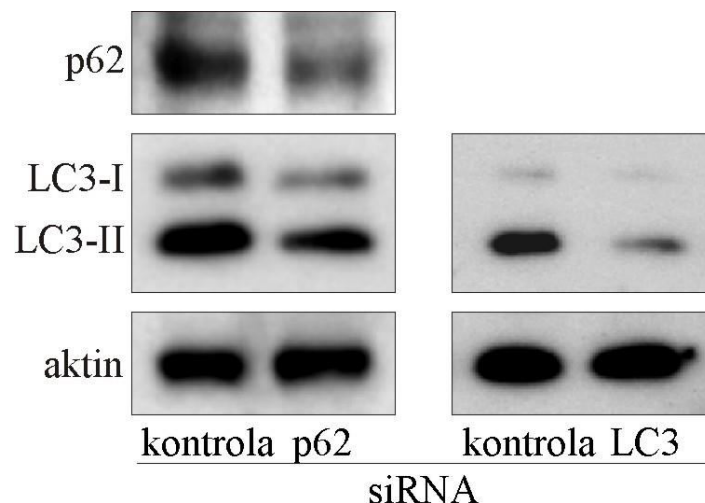




**Slika 20. Inhibicija autofagije izaziva depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim citarabinom.** REH leukemijske ćelije su inkubirane sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora autofagije bafilomicina A1 (BAF; 10 nM) i hlorokina (HK; 20  $\mu$ M). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana promena membranskog potencijala nakon bojenja JC-1 (A) i sinteza superoksidnog anjonskog radikala nakon bojenja ćelija DHE (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo citarabinom.

#### 4.3.5. Transfekcija REH ćelija malom interferirajućom RNK za LC3 i p62 smanjuje ekspresiju ovih autofagnih proteina

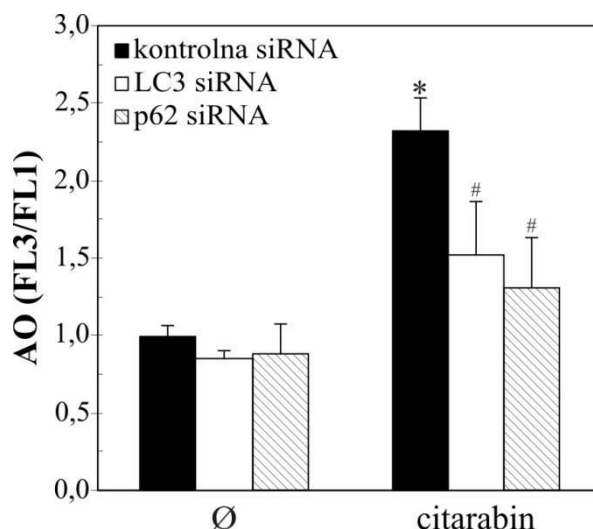
Pošto je korišćenjem farmakoloških inhibitora autofagije pokazano da citarabin indukuje zaštitnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama (slika 17A, B), dalje je ispitivano da li će se citoprotektivna uloga autofagije potvrditi i ako se autofagija suprimira transfekcijom sa malim interferirajućim RNK za LC3 i p62. Prethodno je trebalo utvrditi da li je supresija pomenutih autofagnih gena bila uspešna. Kako je pokazano imunoblot metodom, transfekcija sa siRNA za p62 smanjila je ekspresiju p62 gena, koja je bila praćena očekivanom redukcijom konverzije LC3 proteina u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA (slika 21). Osim toga, transfekcija ćelija malom interferirajućom RNK za LC3 je dovela do smanjenja obe izoforme proteina (slika 21). Dakle, transfekcija siRNA za LC3 i p62 zaista je suprimirala ekspresiju ovih za autofagiju neophodnih gena, u REH ćelijama.



**Slika 21. Transfekcija sa LC3 i p62 siRNA efikasno smanjuje ekspresiju LC3 i p62 gena u REH ćelijama.** REH leukemijske ćelije su transfektovane sa LC3 $\beta$  i p62 i odgovarajućom kontrolnom siRNA, nakon čega je ekspresija odgovarajućih gena ispitivana imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### **4.3.6. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena smanjuje citarabinom indukovano zakišeljavanje citoplazme u REH ćelijama**

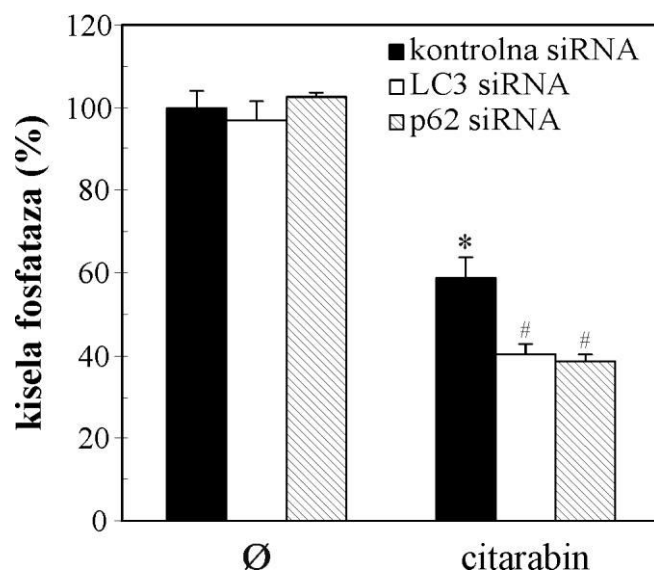
Dalje je ispitivano da li inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena u transfekovanim REH ćelijama zaista inhibira indukciju autofagije citarabinom. Citofluorimetrijskom analizom ovih leukemijskih ćelija obojenih akridin oranžom pokazano je da je kod ćelija sa suprimiranim LC3 i p62 genima acidifikacija citoplazme indukovana citarabinom bila značajno manja nego u kontrolnim ćelijama (slika 22). Ovi rezultati potvrđuju da je transfekcija siRNA za LC3 i p62 zaista inhibirala indukciju autofagije citarabinom u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 22. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena smanjuje acidifikaciju citoplazme indukovanu citarabinom.** REH ćelije su transfektovane sa LC3, p62 i odgovarajućom kontrolnom siRNA nakon čega su 24 časa tretirane citarabinom (3,2  $\mu$ M), a zatim obojene akridin oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na citarabinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### **4.3.7. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava toksičnost citarabina prema REH leukemijskim ćelijama**

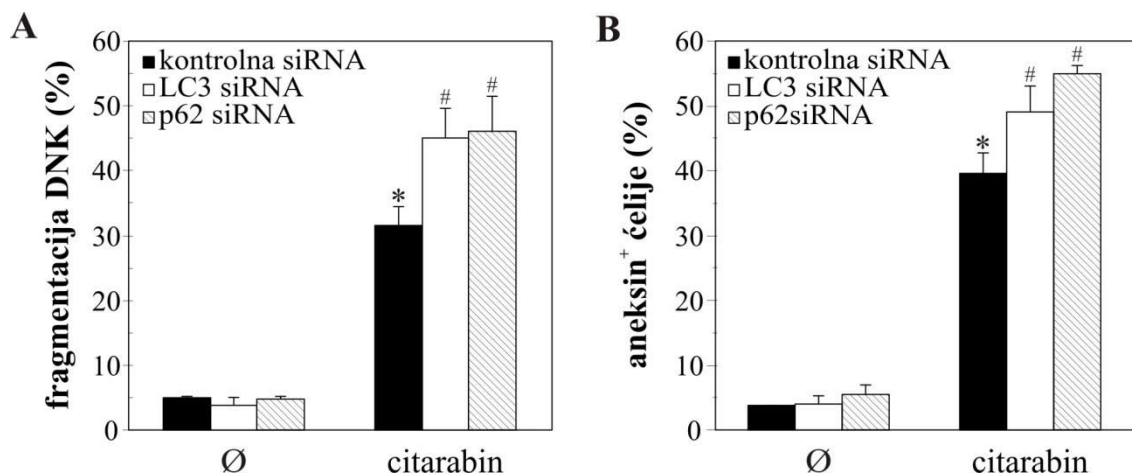
U daljim eksperimentima je ispitivano kako genetska supresija autofagije utiče na citotoksično delovanje citarabina. Testom aktivnosti kisele fosfataze pokazano je da inhibicija autofagije transfekcijom siRNA za LC3 i p62, poput farmakološke inhibicije autofagije, dovodi do povećanja toksičnosti citarabina prema tumorskim ćelijama (slika 23). Dakle, ovim rezultatima je definitivno potvrđeno da citarabin indukuje protektivnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 23. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava toksičnost citarabina prema REH leukemijskim ćelijama.** REH ćelije transfektovane sa LC3, p62 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane sa 3,2  $\mu$ M. Nakon 24 časa njihov vijabilitet je ispitivan testom aktivnosti kisele fosfataze. Prikazani su reprezentativni rezultati tripplikata iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na citarabinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### 4.3.8. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava apoptozu indukovanu citarabinom u REH leukemijskim ćelijama

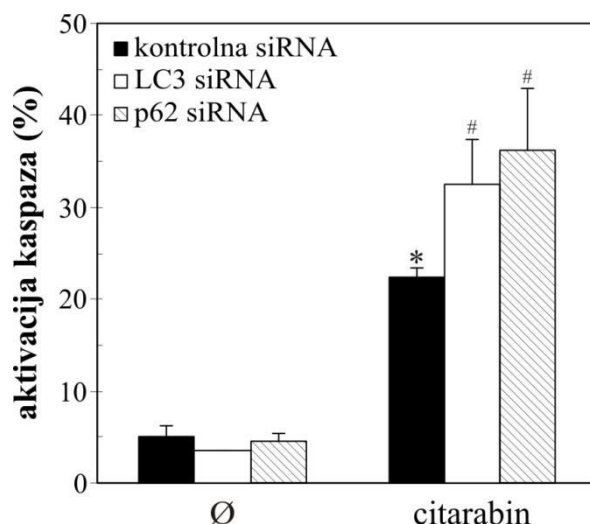
Analizom rezultata dobijenih protočnom citofluorimetrijom je pokazano da se kod REH ćelija transfekovanih sa LC3 i p62 siRNA koje su inkubirane sa citarabinom dodatno povećava fragmentacija DNK (slika 24A) i eksternalizacija fosfatidilserina (slika 24B) u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA. Dakle, genetskom supresijom potvrđena je sposobnost autofagije da inhibira citarabinom indukovanu apoptozu.



**Slika 24. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava apoptozu u REH leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom.** REH leukemijske ćelije su transfektovane sa LC3, p62 i odgovarajućom kontrolnom siRNA, nakon čega su tretirane citarabinom (3,2  $\mu$ M). Posle 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana fragmentacija DNK u ćelijama obojenim propidijum jodidom (A) i translokacija fosfatidilserina u ćelijama obojenim aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na citarabinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### 4.3.9. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim citarabinom

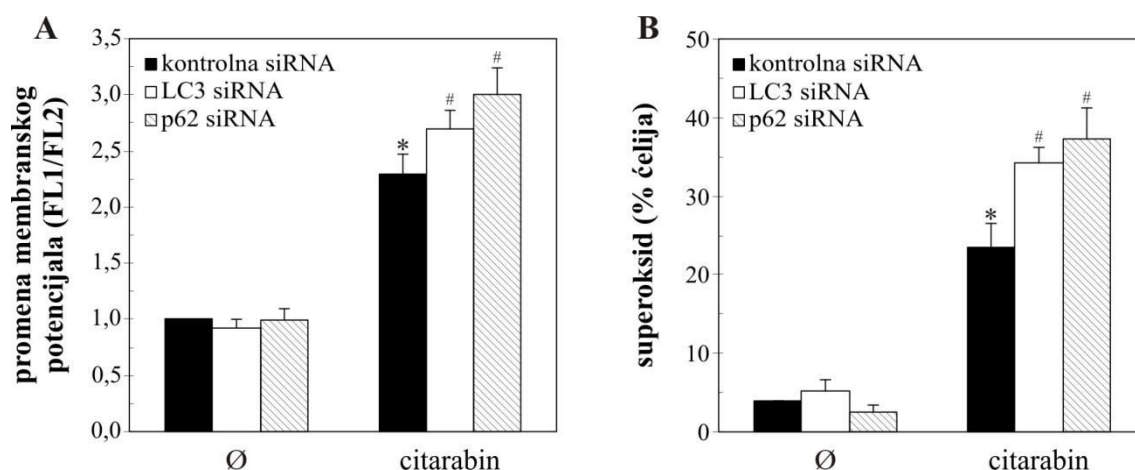
U skladu sa aktivacijom apoptoze, supresija LC3 i p62 gena dodatno je stimulisala aktivaciju kaspaza u REH leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom, kako je pokazano citofluorimetrijskom analizom ćelija obojenih ApoStat-om (slika 25), što dodatno potvrđuje da autofagija REH ćelija koja je indukovana citarabinom štiti ove ćelije od programirane ćelijske smrti tipa I.



**Slika 25. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim citarabinom.** REH leukemijske ćelije transfektovane sa LC3, p62 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane citarabinom (3,2  $\mu$ M). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana aktivacija kaspaza u ćelijama obojenim ApoStat-om. Prikazan je reprezentativni rezultat iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na citarabinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### **4.3.10. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim citarabinom**

Konačno, u skladu sa rezultatima dobijenim korišćenjem farmakoloških inhibitora (slika 20A i B), supresija autofagnih gena dodatno je stimulisala depolarizaciju mitohondrijalne membrane (slika 26A) i produkciju superoksidnog anjonskog radikala (slika 26B). Dakle, prethodnim rezultatima je definitivno potvrđena protektivna uloga autofagije indukovane citarabinom u REH leukemijskim ćelijama, koja proističe iz njene sposobnosti da inhibira apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza.

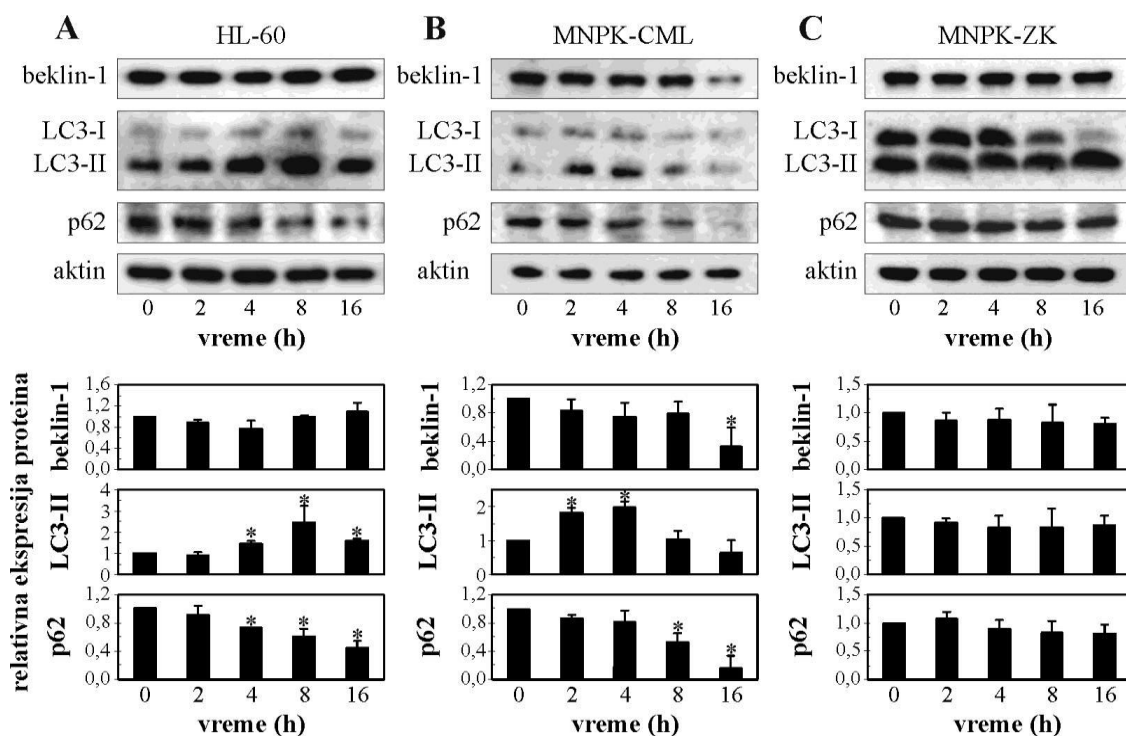


**Slika 26. Inhibicija ekspresije LC3 i p62 gena povećava depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim citarabinom.** REH leukemijske ćelije transfektovane sa LC3, p62 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane citarabinom (3,2  $\mu$ M). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana promena membranskog potencijala u ćelijama obojenim JC-1 (A) i sinteza superoksidnog anjonskog radikala u ćelijama obojenim DHE (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija triplicate. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na citarabinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### 4.3.11. Citarabin stimuliše LC3 konverziju i degradaciju p62 proteina u drugim leukemijskim ćelijama, ali ne i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola

Nakon što je pokazano da citarbin izaziva protektivnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama, u daljim eksperimentima je ispitivano da li se radi o ćelijski specifičnom dejstvu ili antileukemijski lek zadržava sličnu sposobnost i u drugim leukemijskim ćelijama. U tu svrhu su korišćene ćelije humane leukemijske linije HL-60 (akutna promijelocitna leukemija), primarne leukemijske ćelije izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija, kao i MNPK izolovane iz krvi zdravih dobrovoljaca usklađenih sa grupom obolelih po uzrastu i polu, koje su upotrebljene za kontrole. Nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije ćelija sa citarabinom, imunoblot tehnikom su ispitane ekspresije p62 i beclin-1 proteina, kao i konverzija LC3 molekula. Pokazano da antileukemijski lek stimuliše LC3 konverziju i p62 degradaciju u HL-60 i primarnim leukemijskim ćelijama pacijenata, ne

povećavajući pritom ekspresiju beclin-1 molekula (slika 27A, B). Sa druge strane, citarabin nije doveo do promena nivoa LC3-II, p62 i beklina-1 u MNPK zdravih kontrola (slika 27C). Na osnovu prikazanih rezultata se može zaključiti da citarabin indukuje autofagiju u različitim humanim leukemijskim ćelijskim linijama, kao i primarnim leukemijskim ćelijama izolovanim iz krvi pacijenata, ali ne i u MNPK zdravih kontrola.

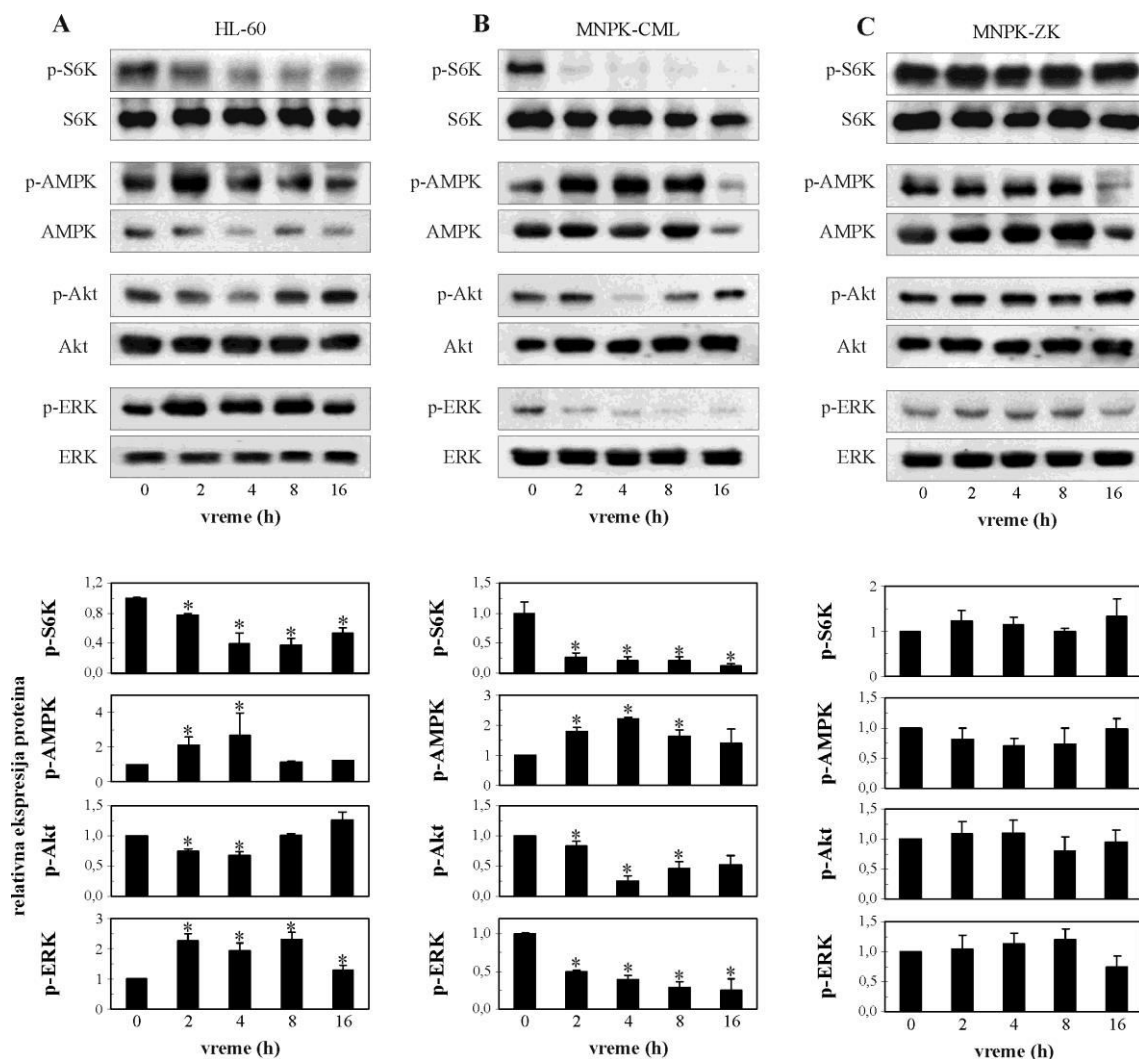


**Slika 27. Citarabin indukuje autofagiju u HL-60 i primarnim leukemijskim ćelijama.** (A-C) HL-60 leukemijske ćelije (A), primarne leukemijske ćelije koje su izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija (MNPK-CML) (B), kao i mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz krvi zdravih kontrola (MNPK-ZK) (C) su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa citarabinom (3,2 μM) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta i srednja srednja vrednost ± standardna devijacija njihove densitometrijske analize. \*p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.



#### **4.3.12. Autofagija indukovana citarabinom posredovana je inhibicijom mTOR kinaze i modulacijom aktivnosti Akt, AMPK i ERK kinaza u leukemijskim ćelijama**

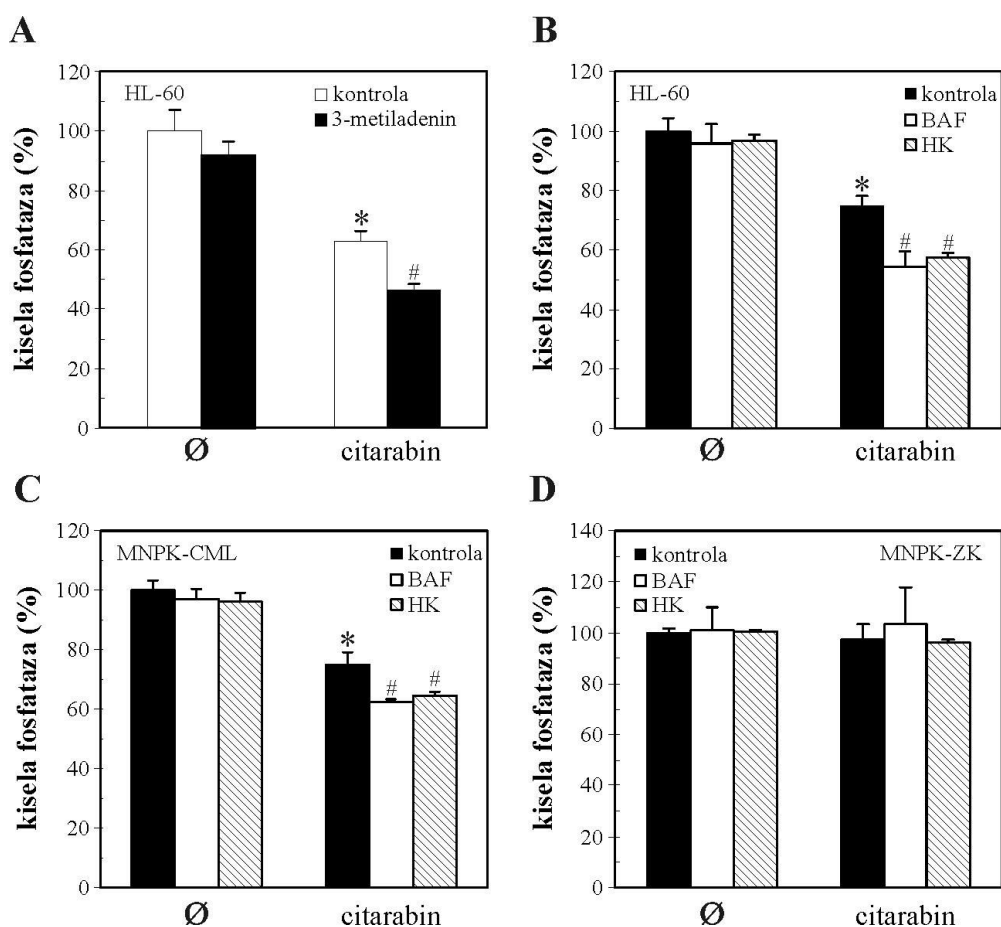
Kako je pokazano imunoblot analizom, a u skladu sa rezultatima dobijenim na REH leukemijskoj liniji, kod HL-60 i primarnih leukemijskih ćelija je nakon tretmana citarabinom došlo do smanjenja fosforilacije p70S6 kinaze (slika 28A, B). Sa druge strane, aktivacioni status ovog supstrata mTOR kinaze se nije promenio nakon tretmana citarabinom kod MNPk zdravih kontrola (slika 28C). Citarabin je kod HL-60 i primarnih leukemijskih ćelija doveo do smanjenja fosforilacije protein kinaze Akt. Antileukemijski lek je doveo i do povećanja aktivnosti AMPK molekula kod HL-60 i primarnih leukemijskih ćelija (slika 28A-C). Interesantno je da je citarabin indukovao povećanje fosforilacije ERK kod HL-60 leukemijskih ćelija, ali i izraženo smanjenje u primarnim leukemijskim ćelijama (slika 28A i 28B). U skladu sa odsustvom autofagije u MNPk zdravih kontrola, antileukemijski lek nije doveo do izmene aktivacionog statusa AMPK, Akt i ERK proteina (slika 28C). Dakle, indukcija autofagije citarabinom u HL-60 leukemijskim ćelijama najverovatnije je posredovana sposobnošću citarabina da stimuliše aktivaciju mTOR-kinaznih inhibitora AMPK i Erk i da inhibira aktivnost mTOR-kinaznog aktivatora Akt. Sa druge strane, sposobnost citarabina da indukuje autofagiju u primarnim leukemijskim ćelijama najverovatnije zavisi od njegove sposobnosti da inhibira aktivnost autofagnog represora mTOR kinaze putem aktivacije AMPK i inhibicije Akt proteina.



**Slika 28. Citarabin inhibira p70S6 kinazu i moduliše ekspresiju AMPK, Akt i ERK proteina u HL-60 i primarnim leukemijskim ćelijama.** (A-C) HL-60 leukemijske ćelije (A), primarne leukemijske ćelije izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija (MNPK-CML) (B) i mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz krvi zdravih kontrola (MNPK-ZK) (C) su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta, kao i srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija njihove denzitometrijske analize. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.

#### **4.3.13. Supresija autofagije farmakološkim inhibitorima povećava toksičnost citarabina prema različitim leukemijskim ćelijama**

Dalje je ispitivana uloga autofagije indukovane citarabinom u HL-60 i primarnim leukemijskim ćelijama korišćenjem farmakoloških inhibitora autofagije. Testom aktivnosti kisele fosfataze je utvrđeno da inhibitori autofagije 3-metiladenin, hlorokin i bafilomicin A1 u primenjenim koncentracijama nisu uticali na ćelijsko preživljavanje (slika 29A-D). Sa druge strane, 3-metiladenin, hlorokin i bafilomicin A1 značajno su stimulisali citotoksično delovanje citarabina u HL-60 leukemijskim ćelijama (slika 29A, B). Takođe, bafilomicin A1 i hlorokin su dodatno smanjili vijabilitet citarabinom tretiranih primarnih leukemijskih ćelija pacijenata (slika 29C). U skladu sa nemogućnošću antileukemijskog leka da indukuje autofagiju u MNPK zdravih kontrola, inhibicija autofagije nije imala uticaja na njihov vijabilitet u prisustvu citarabina (slika 29D). Dakle, citarabin indukuje citoprotektivnu autofagiju u različitim leukemijskim ćelijama (REH, HL-60 i primarnim leukemijskim ćelijama pacijenata), ali ne i u MNPK zdravih kontrola.

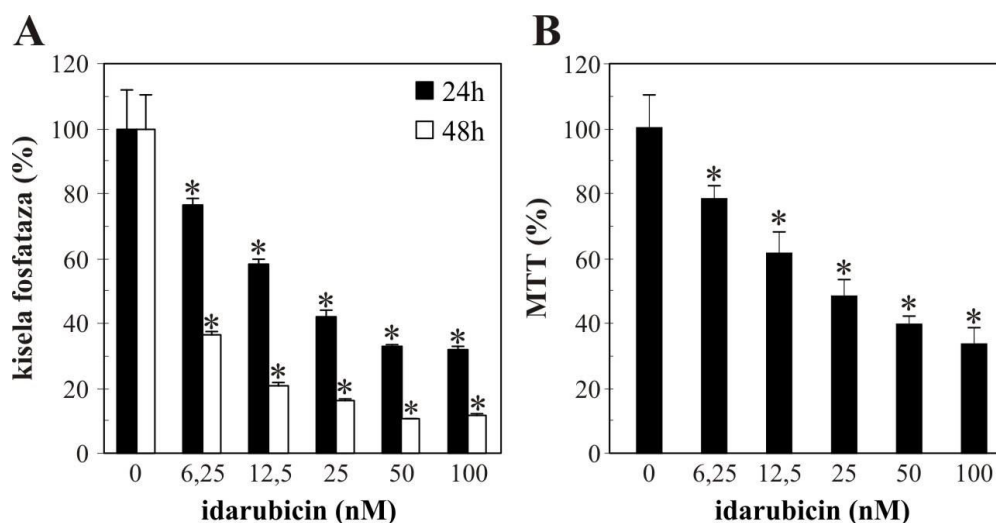


**Slika 29. Farmakološka inhibicija autofagije povećava toksičnost citarabina prema leukemijskim ćelijama.** HL-60 (A, B), primarne leukemijske ćelije koje su izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija (MNPK-CML) (C) i mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz krvi zdravih kontrola (MNPK-ZK) (D) su inkubirane sa citarabinom (3,2  $\mu$ M) u odsustvu i prisustvu 3-metiladenina (5mM) (A) ili bafilomicina A1 (BAF; 10 nM) i hlorokina (HK; 20  $\mu$ M) (B-D). Nakon 24 časa, testom aktivnosti kisele fosfataze određen je ćelijski vijabilitet. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta (A, B) ili tri različita MNPK uzorka (C, D) kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo citarabinom.

## 4.4. Idarubicin indukuje apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza u REH leukemijskim ćelijama

### 4.4.1. Idarubicin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija

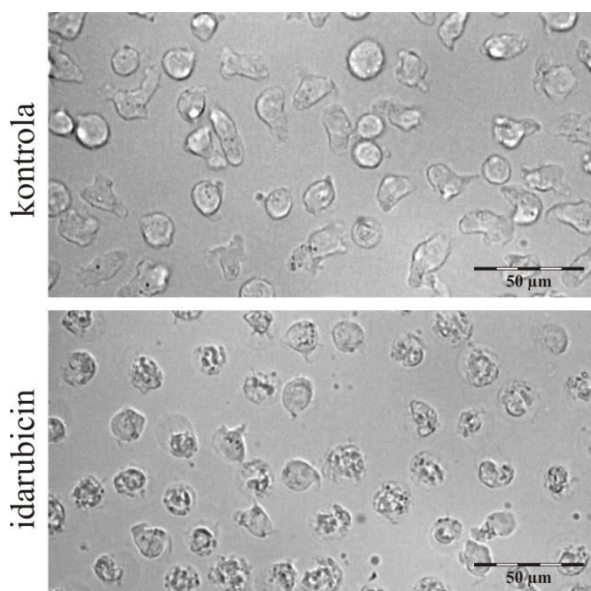
Da bi se proverio antitumorski potencijal idarubicina, REH ćelije su tretirane rastućim koncentracijama ovog antileukemijskog leka. Nakon 24, odnosno 48 časova inkubacije, analizom rezultata MTT i testa aktivnosti kisele fosfataze pokazano je da idarubicin na dozno i vremenski zavisnan način smanjuje vijabilitet REH ćelija (slika 30A, B). Nakon 24 časa, IC<sub>50</sub> vrednost je iznosila približno 25 nM, pa je u daljim eksperimentima korišćena ova koncentracija leka. Dakle, idarubicin ispoljava snažan antitumorski potencijal prema REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 30. Idarubicin smanjuje vijabilitet REH leukemijskih ćelija.** (A, B) REH ćelije su tretirane 24 i 48 časova (h) različitim koncentracijama idarubicina u rasponu od 6,25 do 100 nM. Testom aktivnosti kisele fosfataze (A) i MTT testom (B) određen je ćelijski vijabilitet. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost ± standardna devijacija triplikata. \*p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.

#### 4.4.2. Idarubicin dovodi do morfoloških promena u REH leukemijskim ćelijama

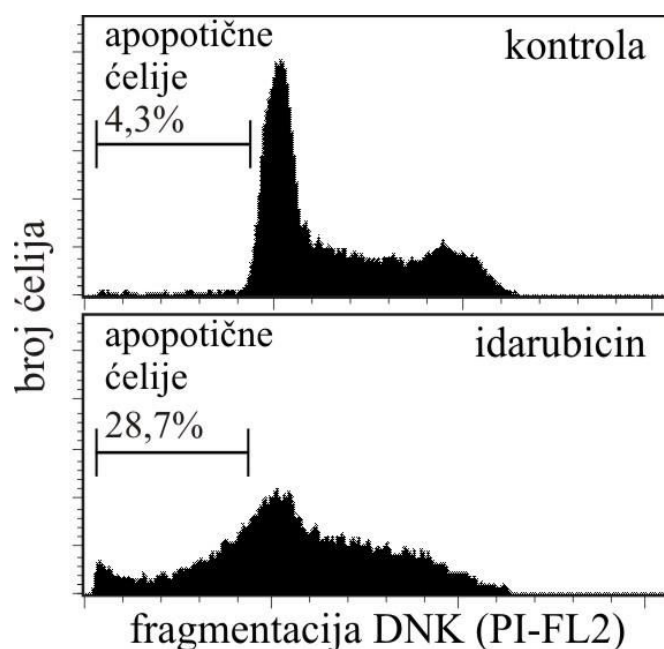
Da bi se utvrdilo dejstvo antileukemijskog leka na broj i morfologiju REH ćelija, ćelije su po isteku dvadesetčetvoročasovnog tretmana idarubicinom analizirane svetlosnom mikroskopijom. Posmatranjem ćelija moglo se uočiti da je tretman idarubicinom doveo do smanjenja gustine tumorskih ćelija i značajnih morfoloških promena. Za razliku od kontrolnih ćelija koje su posedovale veliko, okruglo jedro, ćelije tretirane idarubicinom imale su smanjeni volumen, fragmentisano ili jedro srpastog oblika, što je karakteristično za apoptotski način umiranja ćelija (slika 31).



**Slika 31. Idarubicin izaziva morfološke promene REH leukemijskih ćelija.** REH ćelije su 24 časa inkubirane u prisustvu idarubicina (25 nM) nakon čega su analizirane svetlosnom mikroskopijom (skala za procenu veličine 50 µm; uveličanje 40x).

#### 4.4.3. Idarubicin dovodi do fragmentacije DNK molekula u REH leukemijskim ćelijama

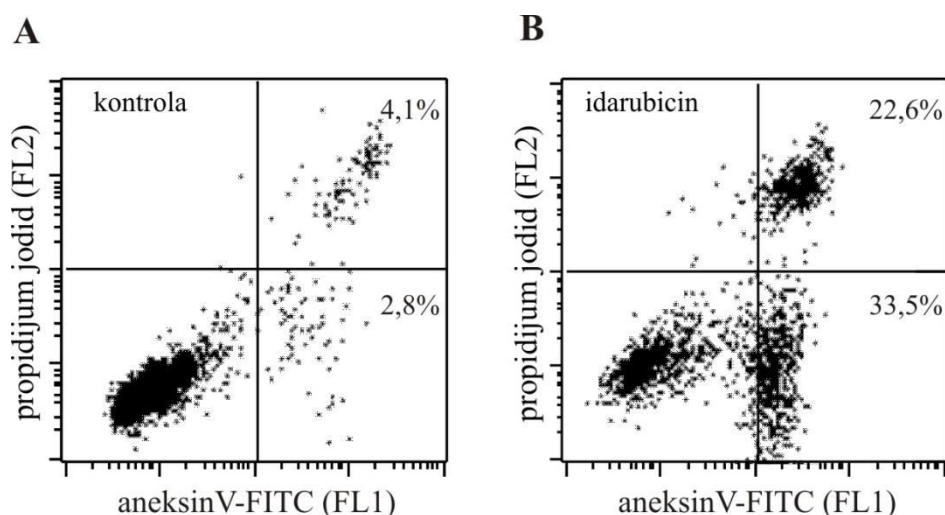
U daljim eksperimentima ispitivan je uticaj idarubicina na fragmentaciju DNK, koja se javlja u kasnim fazama apoptoze. Po isteku 24 časa inkubacije sa idarubicinom, ćelije su fiksirane, a zatim obojene propidijum jodidom. Analiza ćelijskog ciklusa protočnom citofluorimetrijom pokazala je da idarubicin značajno povećava procenat hipodiploidnih ćelija, odnosno fragmentaciju DNK molekula (28,7% apoptotičnih ćelija u tretmanu u odnosu na 4,3% u kontroli) (slika 32). Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da idarubicin izaziva apoptozu u REH ćelijama.



**Slika 32. Idarubicin indukuje fragmentaciju DNK molekula.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 24 časa sa idarubicinom (25 nM) nakon čega su obojene propidijum jodidom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### 4.4.4. Idarubicin stimuliše premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane REH leukemijskih ćelija

Da bi se dalje potvrdila sposobnost idarubicina da indukuje apoptozu, ispitivano je kako antileukemijski lek utiče na premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane, što predstavlja još jedan od parametara apoptoze (Mourdjeva i sar., 2005). Nakon 24 časa inkubacije sa idarubicinom, REH ćelije su dvostruko obojene aneksin V-fluorescin izotiocijanatom koji se vezuje za fosfatidilserin na spoljašnjoj strani membrane ćelija i propidijum jodidom koji se vezuje za DNK ćelija sa oštećenom ćelijskom membranom. Citofluorimetrijska analiza pokazala je da idarubicin dovodi do povećanja broja ćelija kako u ranoj apoptozi- $\text{aneksin}^+/\text{PI}^-$  (33,5%), tako i u kasnoj apoptozi/nekrozi- $\text{aneksin}^+/\text{PI}^+$  (22,6%) (slika 33). Dakle, prikazani rezultati sugerišu da idarubicin stimuliše ranu i kasnu apoptozu REH leukemijskih ćelija.

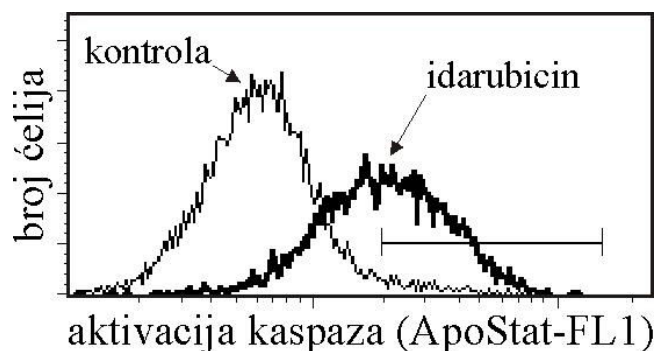


**Slika 33. Idarubicin stimuliše pojavu fosfatidilserina na spoljnoj strani ćelijske membrane REH leukemijskih ćelija.** (A, B) REH leukemijske ćelije su tretirane 24 časa idarubicinom (25 nM) nakon čega su obojene aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Tačkasti dijagrami prikazuju kvadratnu distribuciju kontrolnih (A) i tretiranih REH ćelija (B) i predstavljaju reprezentativan prikaz tri različita eksperimenta.



#### 4.4.5. Idarubicin izaziva aktivaciju kaspaza u REH leukemijskim ćelijama

Jedan od ključnih koraka u procesu apoptoze je i aktivacija kaspaza. Da bi se ispitala uloga idarubicina u aktivaciji kaspaza, REH ćelije su tretirane 24 časa antileukemijskim lekom i nakon toga obojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Rezultati su pokazali da idarubicin dovodi do aktivacije kaspaza (55,49% u tretiranim ćelijama u odnosu na 2,67% u kontrolnim ćelijama) (slika 34). Iz svega što je prethodno pokazano (aktivacija kaspaza, fragmentacija DNK i translokacija fosfatidilserina), može se zaključiti da apoptoza predstavlja osnovni tip smrti tumorskih ćelija tretiranih idarubicinom.

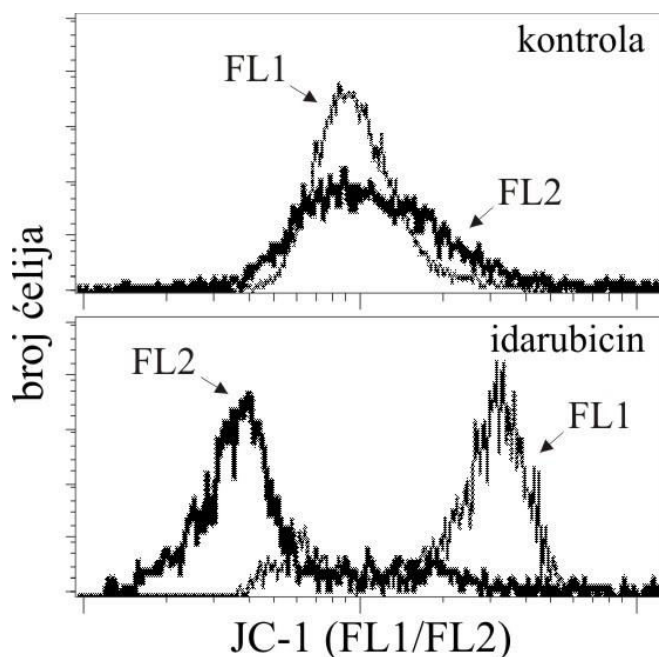


**Slika 34. Idarubicin izaziva aktivaciju kaspaza.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 24 časa u prisustvu idarubicina (25 nM) nakon čega su obojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat-om i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazan je reprezentativni rezultat dobijen iz tri nezavisna eksperimenta.

#### 4.4.6. Idarubicinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana depolarizacijom mitohondrijalne membrane

Procesima aktivacije kaspaza i posledičnoj indukciji apoptoze obično prethodi depolarizacija mitohondrija (Desagher i Martinou, 2000), zbog čega je dalje ispitivana promena potencijala mitohondrijalne membrane pod dejstvom idarubicina. Nakon 24 časa inkubacije sa idarubicinom, leukemijske ćelije su obojene fluorescentnom bojom JC-1 i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Dobijeni rezultati su pokazali da usled dejstva antileukemijskog leka dolazi do porasta odnosa zelene i crvene fluorescence (za

kontrolu FL1/FL2=1, za tretman FL1/FL2=4,2) što ukazuje na smanjenje membranskog potencijala mitohondrija (slika 35). Dakle, idarubicin izaziva depolarizaciju mitohondrijalne membrane u REH ćelijama.

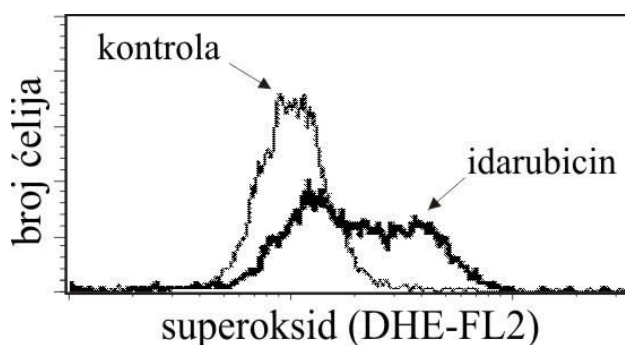


**Slika 35. Idarubicin izaziva depolarizaciju mitohondrijalne membrane.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 24 časa sa idarubicinom (25 nM) i obojene fluorescentnom bojom JC-1, nakon čega je izvršena analiza membranskog mitohondrijalnog potencijala protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### **4.4.7. Idarubicinom indukovana apoptoza u REH leukemijskim ćelijama je posredovana oksidativnim stresom**

U daljim eksperimentima ispitivana je sposobnost idarubicina da indukuje oksidativni stres u leukemijskim ćelijama. U tu svrhu je korišćen fluorohrom dihidroetidijum kojim se meri produkcija superoksidnog anjonskog radikala. Nakon 24 časa inkubacije sa idarubicinom, REH ćelije su obojene fluorescentnom bojom, a potom analizirane protočnom citofluorimetrijom (slika 36). Pokazano je da antileukemijski lek dovodi do povećanja intenziteta crvene fluorescence (za kontrolu FL2=1, za tretman FL2=1,68), što odgovara povećanju produkcije superoksidnog anjonskog radikala.

Dobijeni rezultati pokazuju da idarubicin indukuje oksidativni stres u REH leukemijskim ćelijama.

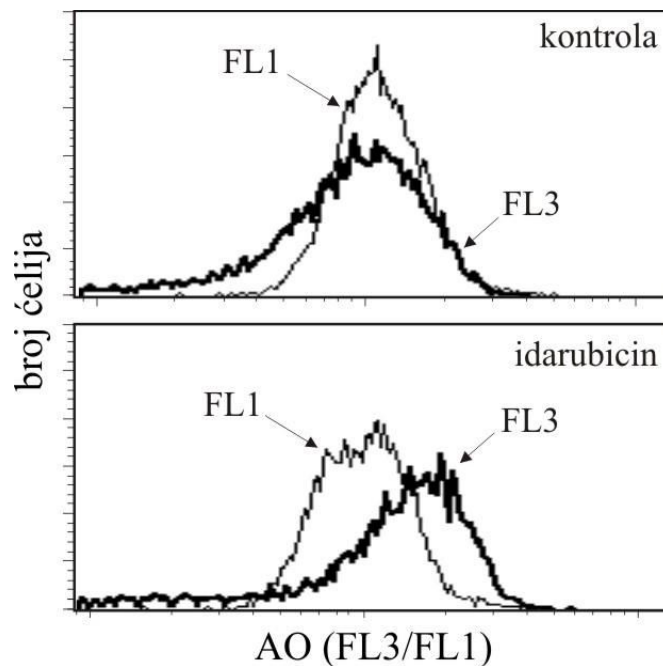


**Slika 36. Idarubicin indukuje sintezu superoksid anjonskog radikala.** Nakon 24 časa tretmana idarubicinom (25 nM), REH ćelije su obojene DHE fluorohomom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazani reprezentativni histogram je dobijen iz tri nezavisna eksperimenta.

## **4.5. Idarubicin indukuje autofagiju u REH leukemijskim ćelijama**

### **4.5.1. Idarubicin podstiče unutarćelijsku acidifikaciju u REH leukemijskim ćelijama**

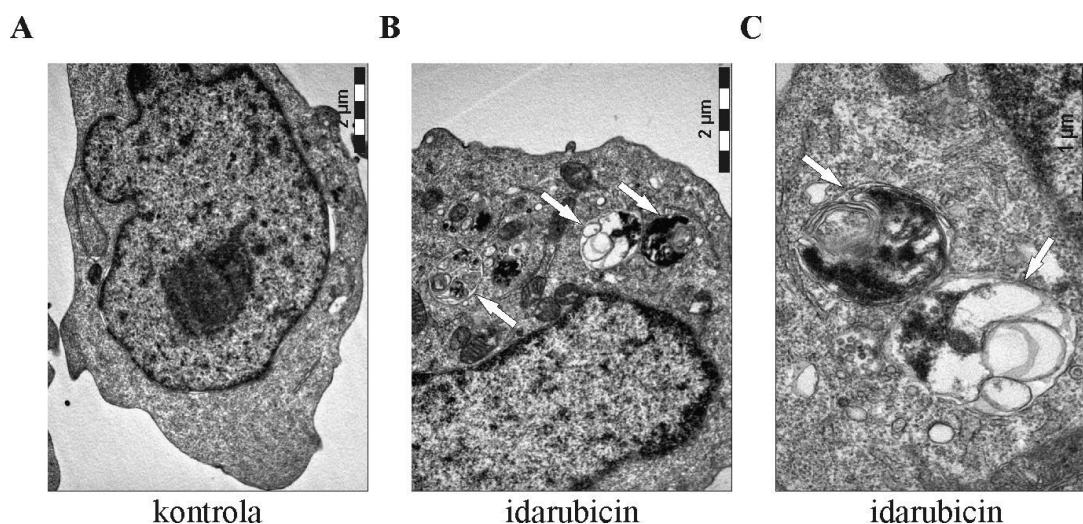
U narednom segmentu istraživanja je analizirana sposobnost antileukemijskog leka da indukuje autofagiju u REH leukemijskoj ćelijskoj liniji. Leukemijske ćelije su nakon 16 časova tretmana idarubicinom obojene fluorescentnom bojom akridin oranž i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Kvantitativnom analizom je utvrđeno da se u tretiranim ćelijama jasno povećao odnos intenziteta crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1), što ukazuje na smanjenje pH vrednosti citoplazme (slika 37). Dakle, idarubicin indukuje unutarćelijsku acidifikaciju, što sugeriše da dolazi do stvaranja kiselih vezikula autofagolizozoma.



**Slika 37. Idarubicin indukuje unutarćelijsku acidifikaciju.** REH leukemijske ćelije su 16 časova tretirane idarubicinom (25 nM) i potom obojene akridin oranž fluorohromom. Protočnom citofluorimetrijom analiziran je odnos relativnih intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1). Reprezentativni histogrami su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### **4.5.2. Idarubicin indukuje stvaranje autofagnih vezikula u REH leukemijskim ćelijama**

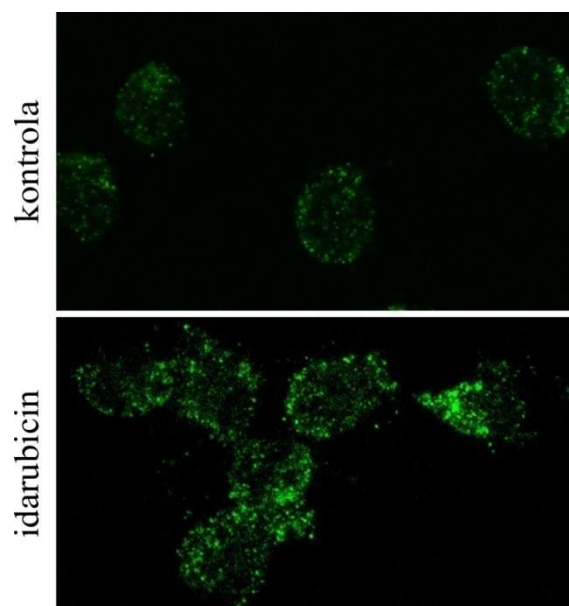
Da bi se ispitalo stvaranje autofagnih vezikula nakon tretmana idarubicinom, ćelije su analizirane ultrastrukturnom transmisionom elektronskom mikroskopijom. Na prikazanim elektronskim mikrografijama može se videti da idarubicin izaziva vakuolizaciju citoplazme leukemijskih ćelija, pri čemu je utvrđeno da dolazi do obrazovanja vezikula sa dvostrukom (slika 38B) i jednostrukom membranom (slika 38C) u kojima se nalazi degradirani ćelijski sadržaj, koje po morfološkim karakteristikama odgovaraju autofagozomima, odnosno autofagolizozomima.



**Slika 38. Idarubicin indukuje stvaranje autofagnih vezikula u REH leukemijskim ćelijama – analiza transmisivnom elektronskom mikroskopijom (TEM).** Prikazane su reprezentativne elektronske mikrografije dobijene elektronskom mikroskopijom ultratankih isečaka (skala za procenu veličine 2  $\mu\text{m}$ ; 1  $\mu\text{m}$ ) iz dva različita eksperimenta. U citoplazmi kontrolnih, netretiranih ćelija (A) se ne uočavaju vezikule koje podsećaju na autofagolizosome, dok se u citoplazmi REH leukemijskih ćelija inkubiranih sa idarubicinom (25 nM; 24h) primećuje intenzivna vakuolizacija (označeno strelicama) (B) i prisustvo autofagnih vezikula sa degradiranim ćelijskim sadržajem (označeno strelicama) (C).

#### 4.5.3. Idarubicin stimuliše agregaciju LC3 proteina u REH leukemijskim ćelijama

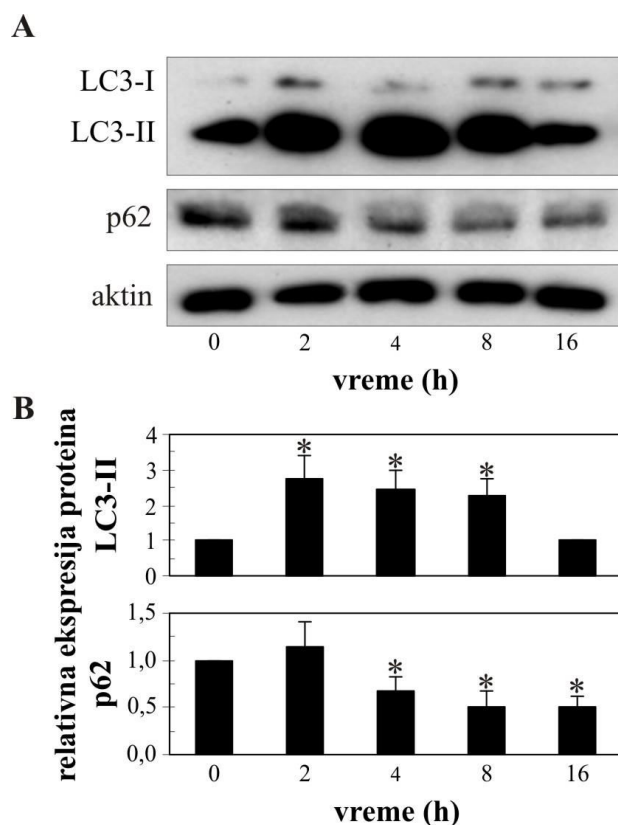
U daljem toku istraživanja je analizirana punktuacija/agregacija LC3 proteina koja karakteriše stvaranje autofagozoma. REH leukemijske ćelije su nakon 4 časa inkubacije u prisustvu idarubicina obojene Alexa Fluor 488 obeleženim anti-LC3 antitelom i posmatrane pod konfokalnim fluorescentnim mikroskopom. Analizom dobijenih rezultata se došlo do zaključka da nakon tretmana leukemijskih ćelija idarubicinom dolazi do značajnog povećanja nivoa zelene fluorescence i punktuacije, odnosno agregacije LC3 proteina, što je u skladu sa povećanom sintezom autofagozoma (slika 39).



**Slika 39. Idarubicin povećava nivo i punktuaciju/agregaciju LC3 proteina u REH leukemijskim ćelijama.** REH leukemijske ćelije su nakon 4 časa tretmana idarubicinom (25 nM) obojene Alexa Fluor 488 obeleženim anti-LC3 antitelom i analizirane konfokalnom fluorescentnom mikroskopijom (uveličanje 160).

#### **4.5.4. Idarubicin stimuliše konverziju LC3 i razgradnju p62 proteina u REH leukemijskim ćelijama**

Da bi se dalje pokazala sposobnost idarubicina da indukuje autofagiju u REH ćelijama, ispitivana je konverzija LC3-I u LC3-II izoformu proteina koja predstavlja specifični marker stvaranja autofagozoma. U tom cilju, leukemijske ćelije su tretirane idarubicinom i nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije ekspresija autofagnih proteina analizirana je imunoblot tehnikom. Dobijeni rezultati su pokazali da je tretman idarubicinom već nakon 2 časa doveo do maksimalnog povećanja ekspresije LC3-II proteina, posle čega dolazi do njenog postepenog pada (slika 40A, B). Pored toga, pod uticajem antileukemijskog leka je došlo i do značajnog smanjenja koncentracije p62 proteina, koji se selektivno razgrađuje u autofagolizozomima (slika 40A, B). Dakle, idarubicin dovodi do konverzije LC3 molekula i razgradnje p62 proteina u REH leukemijskoj ćelijskoj liniji, što ponovo ukazuje na njegovu sposobnost da indukuje autofagiju.

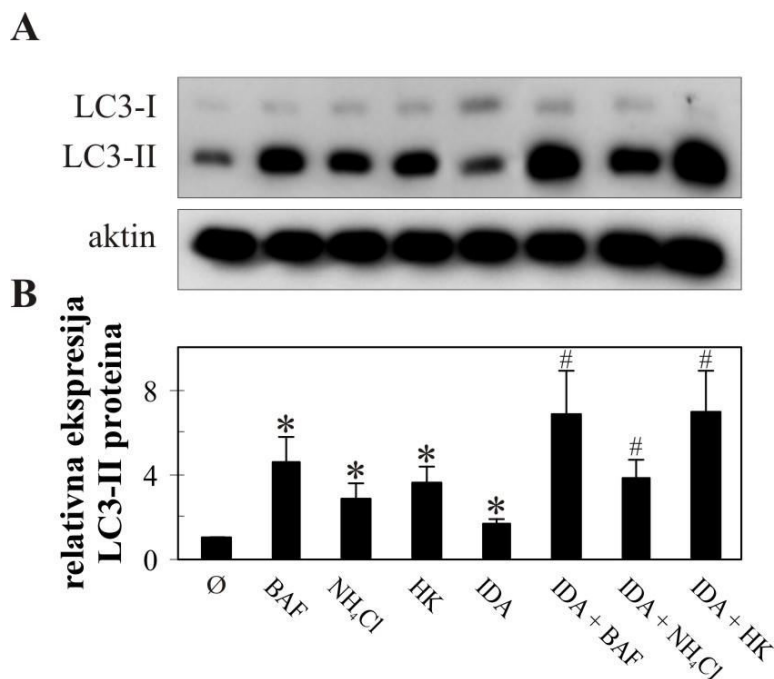


**Slika 40. Idarubicin stimuliše konverziju LC3 i razgradnju p62 proteina.** (A) REH leukemijske ćelije su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa idarubicinom (25 nM) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri nezavisna eksperimenta (A), kao i rezultati denzitometrijske analize prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (B). \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.

#### 4.5.5. Idarubicin stimuliše autofagni fluks u REH leukemijskim ćelijama

Imajući u vidu da do porasta koncentracije LC3-II proteina može doći kako zbog njegovog povećanog stvaranja, tako i usled njegove smanjene razgradnje, u daljem toku istraživanja je analiziran autofagni fluks ovog proteina u REH leukemijskim ćelijama. U tu svrhu je izvršena imunoblot analiza nivoa LC3-II proteina u leukemijskim ćelijama tretiranim idarubicinom u prisustvu proteoliznih inhibitora bafilomicina A1, amonijum hlorida i hlorokina (slika 41). Bafilomicin A1 (BAF) je u eksperimentu primenjen u koncentraciji 10 nM, amonijum hlorid u koncentraciji 10mM, dok je hlorokin (HK) primenjen u koncentraciji 20  $\mu$ M. Ekspresija LC3 proteina analizirana je nakon 8 časova da bi se izbegli nespecifični efekti dugoročne autofagne blokade (Rubinsztein i

sar., 2009). Nakon upotrebe inhibitora proteolize, povećao se nivo LC3-II izoforme, pri čemu je kod ćelija tretiranih idarubicinom u prisustvu inhibitora došlo do dodatnog povećanja konverzije LC3 proteina. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da idarubicin izaziva stvarno povećanje autofagnog fluksa bez blokade u autofagnoj proteolizi, odnosno indukciju kompletnog autofagnog odgovora u REH leukemijskim ćelijama.

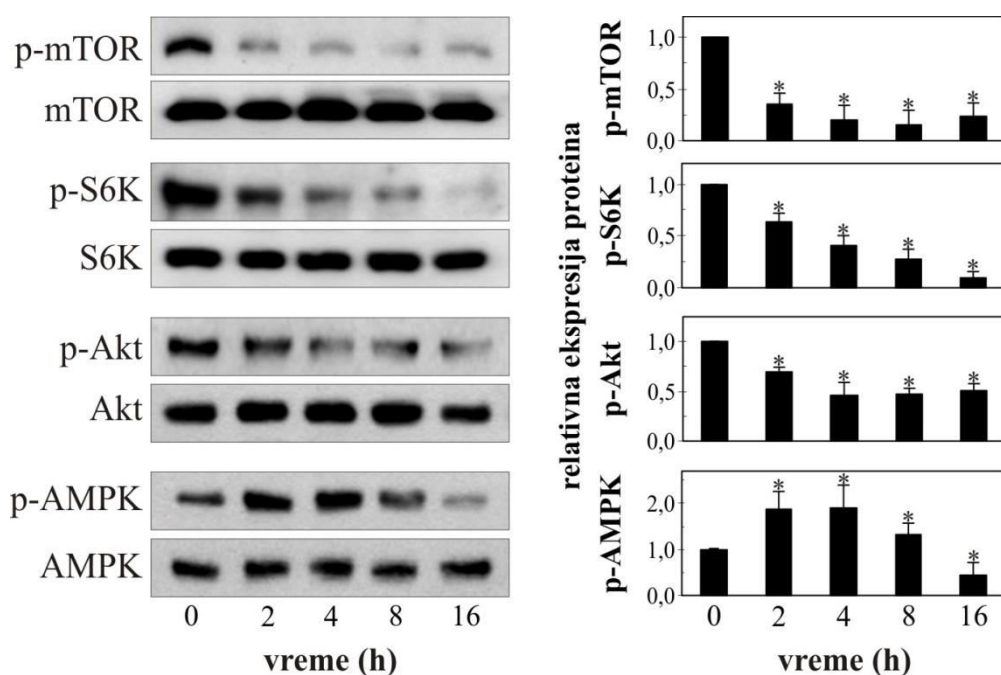


**Slika 41. Idarubicin indukuje povećanje autofagnog fluksa.** (A, B) REH leukemijske ćelije su inkubirane sa idarubicinom (25 nM) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora proteolize, bafilomicina A1 (BAF; 10 nM), amonijum hlorida (NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM) i hlorokina (HK; 20 μM). Nakon 8 časova inkubacije izvršena je analiza konverzije LC3 proteina imunoblot tehnikom (A), a rezultati analizirani denzitometrijom (B). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta (A), kao i rezultati denzitometrijske analize prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (B). \*p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok #p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo inhibitorima proteolize i samo idarubicinom.



#### 4.5.6. Autofagija indukovana idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama je posredovana inhibicijom mTOR kinaze i modulacijom aktivnosti AMPK i Akt proteina

Da bi se ispitala uloga signalnih puteva odgovornih za pokretanje autofagnog procesa indukovano idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama, imunoblot tehnikom je analiziran aktivacioni status glavnog inhibitora autofagije, mTOR kinaze, kao i proteina regulatora ovog molekula, enzima AMPK i Akt. Nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije REH ćelija sa idarubicinom, pokazano je da dolazi do izraženog i vremenski zavisnog smanjenja fosforilacije mTOR kinaze. Takođe, kao što je pokazano imunoblot analizom, već nakon 2 časa tretmana, idarubicin je indukovao i smanjenje fosforilacije njenog direktnog supstrata, p70S6 kinaze (slika 42). Osim toga, idarubicin je doveo do smanjenja fosforilacije aktivatora mTOR kinaze, protein kinaze Akt, kao i do povećanja fosforilacije inhibitora mTOR kinaze, AMPK, što ukazuje na značajnu ulogu ovih kinaza u inaktivaciji mTOR kinaze i posledičnoj indukciji autofagije (slika 42).

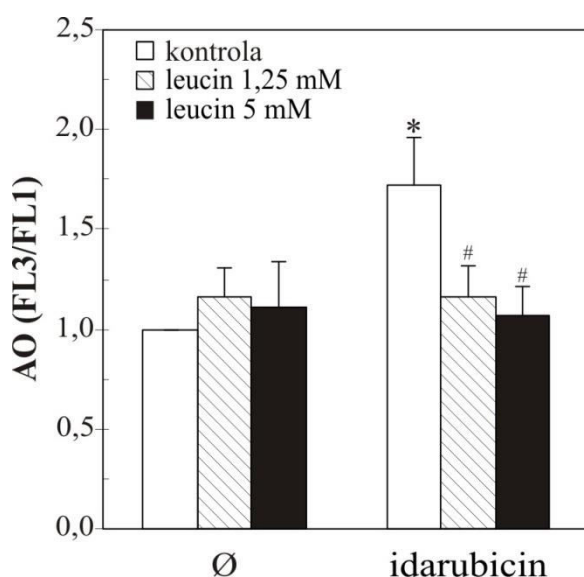


**Slika 42. Idarubicin inhibira mTOR kinazu i modulise ekspresiju AMPK i Akt proteina u REH leukemijskim ćelijama.** (A, B) REH leukemijske ćelije su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa idarubicinom (25 nM) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta (A), kao i rezultati denzitometrijske analize prikazani kao srednja

vrednost  $\pm$  standardna devijacija (B). \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.

#### 4.5.7. Inhibicija mTOR kinaze je ključna u indukciji autofagije idarubicinom

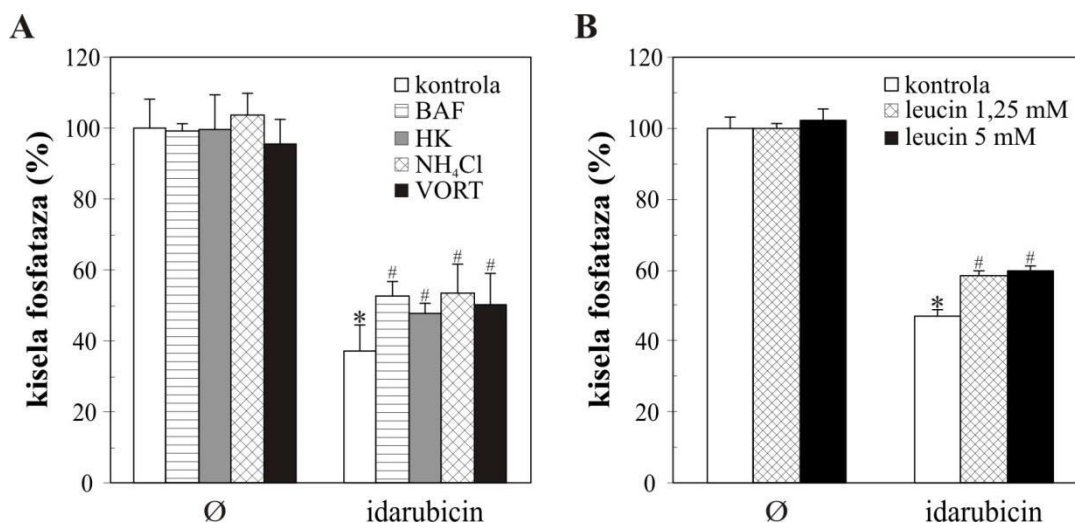
Da bi se potvrdila uloga mTOR kinaze u indukciji autofagije idarubicinom, korišćen je leucin, potentni aktivator mTOR-a (Kimball i sar., 1999). REH leukemijske ćelije tretirane idarubicinom u prisustvu različitih koncentracija leucina su nakon 24 časa obojene akridin oranžom, a potom analizirane protočnom citofluorimetrijom. Tretman leucinom je sprečio unutarćelijsko zakišeljavanje indukovano idarubicinom (slika 43). Dobijeni rezultati ukazuju da inhibicija mTOR kinaze ima ključnu ulogu u indukciji autofagije idarubicinom.



**Slika 43. Idarubicinom indukovana autofagija posredovana je inhibicijom mTOR kinaze.** REH leukemijske ćelije su inkubirane 16 časova sa idarubicinom (25 nM) u odsustvu ili prisustvu različitih koncentracija leucina (1,25 mM i 5 mM), nakon čega su obojene akridin oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazan je reprezentativni rezultat dobijen iz tri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo idarubicinom.

#### 4.6. Idarubicin indukuje toksičnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama

Kao što je ranije navedeno, autofagija može predstavljati kako način preživljavanja, tako i vid ćelijske smrti. Radi utvrđivanja uloge autofagije u antileukemijskom dejstvu idarubicina, leukemijske ćelije su inkubirane sa idarubicinom u prisustvu farmakoloških inhibitora različitih faza autofagnog procesa. Testom aktivnosti kisele fosfataze je utvrđeno da vortmanin, koji blokira formiranje autofagozoma zavisno od fosfoinozimid 3-kinaze klase III, kao i amonijum hlorid, bafilomicin A1 i hlorokin, agensi koji blokiraju fuziju autofagozoma i lizozoma i/ili lizosomalno zakišeljavanje, dovode do značajnog povećanja preživljavanja idarubicinom tretiranih REH ćelija (slika 44A). Osim toga, do delimičnog povećanja vijabiliteta idarubicinom tretiranih leukemijskih ćelija je došlo i pod uticajem prethodno pomenutog aktivatora mTOR kinaze i inhibitora autofagije, leucina (slika 44B). Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da idarubicin izaziva citotoksičnu autofagiju u REH ćelijama.

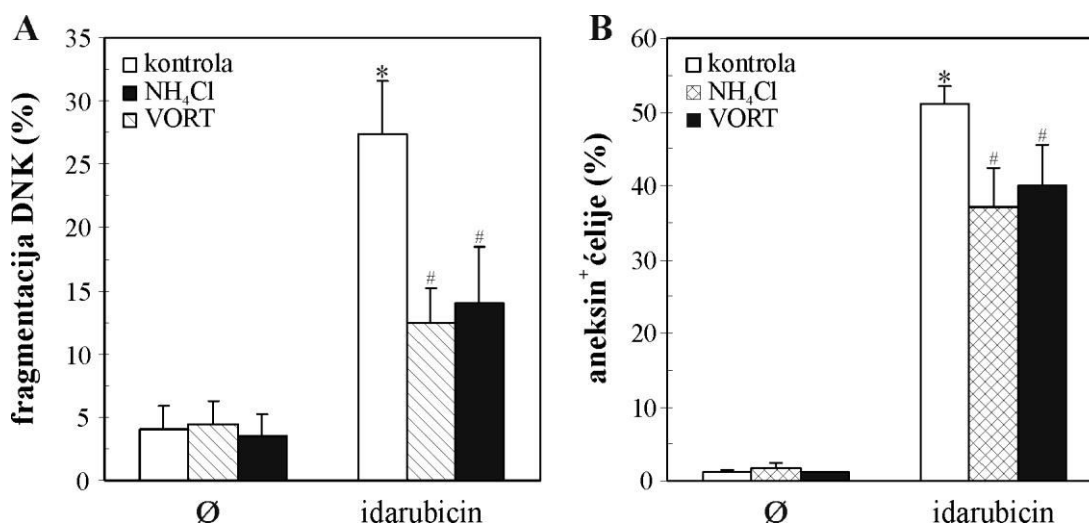


**Slika 44. Idarubicin indukuje toksičnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.** (A, B) REH ćelije su inkubirane sa idarubicinom (25 nM) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora autofagije bafilomicina A1 (BAF; 10 nM), hlorokina (HK; 20  $\mu$ M), amonijum hlorida (NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM), vortmanina (VORT; 200 nM) (A), kao i aktivatora mTOR kinaze leucina (1,25 mM i 5 mM) (B). Nakon 24 časa inkubacije, testom aktivnosti kisele fosfataze određen je ćelijski vijabilitet. Prikazani su reprezentivni

rezultati tripplikata iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo idarubicinom.

#### 4.6.1. Autofagija smanjuje idarubicinom indukovanu apoptozu u REH leukemijskim ćelijama

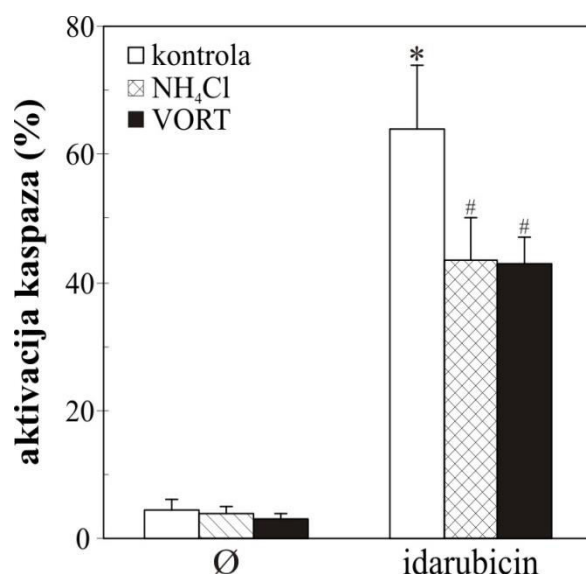
Prethodnim eksperimentima jasno je pokazano da apoptoza i autofagija učestvuju u citotoksičnom delovanju idarubicina, pa je u daljim eksperimentima ispitivan međusobni uticaj ova dva procesa. Protočnom citofluorimetrijom je pokazano da farmakološki inhibitori autofagije, amonijum hlorid i vortmanin, smanjuju fragmentaciju DNK molekula (slika 45A) i eksternalizaciju fosfatidilserina (slika 45B) ćelija tretiranih idarubicinom. Dakle, autofagija pospešuje proapoptotsko dejstvo idarubicina u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 45. Inhibicija autofagije smanjuje apoptozu u REH leukemijskim ćelijama tretiranim idarubicinom.** REH leukemijske ćelije su inkubirane sa idarubicinom (25 nM) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora autofagije, amonijum hlorida (NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM) i vortmanina (VORT; 200 nM). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana fragmentacija DNK u ćelijama obojenim propidijum jodidom (A) i translokacija fosfatidilserina u ćelijama obojenim aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo idarubicinom.

#### 4.6.2. Autofagija indukuje aktivaciju kaspaza stimulisanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama

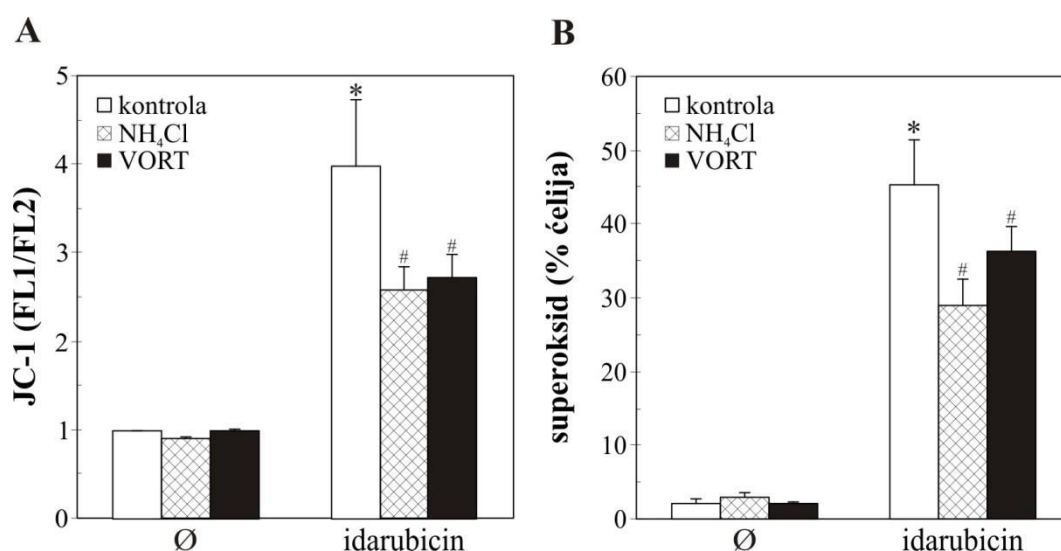
Analizom mehanizama citotoksičnog delovanja autofagije pokazano je da amonijum hlorid i vortmanin smanjuju idarubicinom indukovanu aktivnost kaspaza (slika 46) ćelija tretiranih idarubicinom, tj. da sama autofagija izaziva aktivaciju egzekutornih enzima apoptoze, kaspaza, u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 46. Inhibicija autofagije smanjuje aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim idarubicinom.** REH leukemijske ćelije su inkubirane sa idarubicinom (25 nM) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora autofagije, amonijum hlorida (NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM) i vortmanina (VORT; 200 nM). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana aktivacija kaspaza u ćelijama obojenim ApoStat-om. Prikazan je reprezentativni rezultat iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok #p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo idarubicinom.

### 4.6.3. Autofagija stimuliše oksidativni stres i depolarizaciju mitohondrija indukovanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama

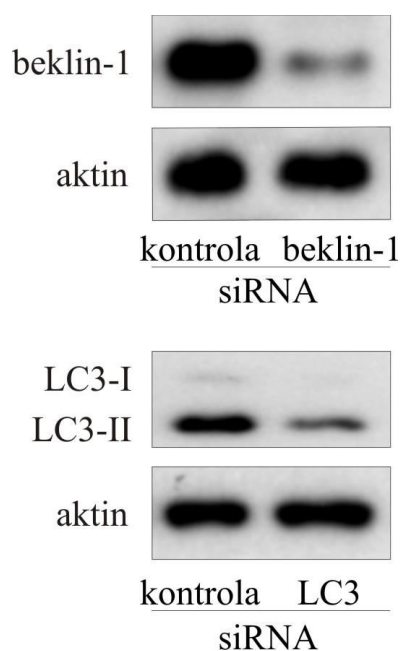
Prethodnim eksperimentima pokazano je da depolarizacija mitohondrija i oksidativni stres učestvuju u toksičnom dejstvu idarubicina u REH ćelijama (slika 35 i 36). Rezultati dobijeni protočnom citofluorimetrijom su pokazali da inhibitori autofagije suprimiraju ove procese u leukemijskim ćelijama inkubiranim sa idarubicinom (slika 47A, B). Dakle, citotoksična autofagija doprinosi depolarizaciji mitohondrija i oksidativnom stresu indukovanim idarubicinom u REH leukemijskoj ćelijskoj liniji.



**Slika 47. Inhibicija autofagije smanjuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim idarubicinom.** REH leukemijske ćelije su inkubirane sa idarubicinom (25 nM) u odsustvu i prisustvu farmakoloških inhibitora autofagije, amonijum hlorida (NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM) i vortmanina (VORT; 200 nM). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana promena membranskog potencijala nakon bojenja ćelija fluorescentnom bojom JC-1 (A) i sinteza superoksidnog anjonskog radikala nakon bojenja ćelija fluorescentnom bojom DHE (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok #p<0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo idarubicinom.

#### 4.6.4. Transfekcija REH ćelija malom interferirajućom RNK za LC3 i beclin-1 smanjuje ekspresiju ovih autofagnih proteina

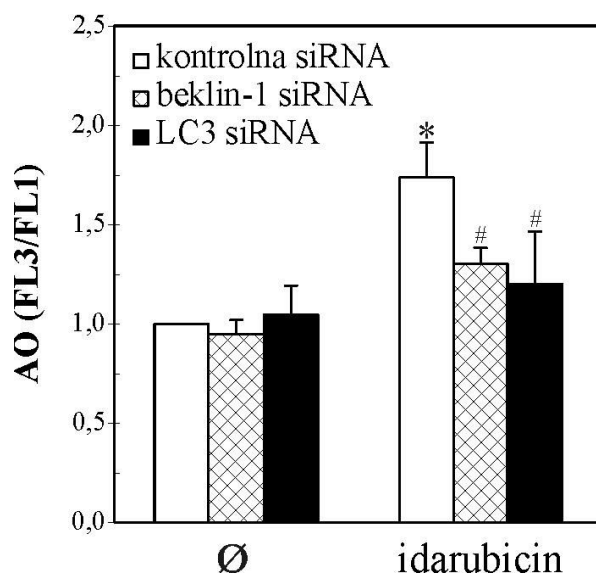
Nakon što je upotrebom farmakoloških inhibitora autofagije pokazano da idarubicin indukuje toksičnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama, u narednom koraku istraživanja je analizirano da li suprimiranje autofagije na nivou ekspresije autofagnih gena takođe dovodi do toksičnog autofagnog odgovora. Da bi se to ispitalo, prvo je trebalo pokazati da je transfekcija sa malim interferirajućim RNK za LC3 i beclin-1 uspešno suprimirala ekspresiju ovih gena. Imunoblot tehnikom je pokazano da je transfekcija smanjila ekspresiju beclin-1 gena sa 80% uspešnosti, dok je redukcija konverzije LC3 proteina imala 70% uspešnosti (slika 48). Takođe je pokazano da je u slučaju LC3 gena, transfekcija smanjila zastupljenost obe izoforme proteina (slika 48). Dakle, transfekcija malom interferirajućom RNK za LC3 i beclin-1 zaista smanjuje ekspresiju ovih autofagnih proteina.



**Slika 48. Transfekcija sa LC3 i beclin-1 siRNA efikasno smanjuje ekspresiju LC3 i beclin-1 gena u REH ćelijama.** U REH leukemijskim ćelijama transpektovanim sa LC3, beclin-1 i odgovarajućom kontrolnom siRNA analizirana je ekspresija ovih gena imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta.

#### 4.6.5. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje zakišeljavanje citoplazme indukovano idarubicinom u REH ćelijama

U narednom koraku istraživanja je ispitivano da li inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena u transfekovanim ćelijama zaista sprečava indukciju autofagije idarubicinom. Analizom leukemijskih ćelija protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja akridin oranžom, utvrđeno je da je u ćelijama sa suprimiranom ekspresijom autofagnih gena, idarubicinom indukovana acidifikacija citoplazme bila značajno manja nego u kontrolnim ćelijama (slika 49). Dobijeni rezultati ukazuju da transfekcija REH leukemijskih ćelija sa malim interferirajućim RNK za LC3 i beclin-1 zaista inhibira indukciju autofagije idarubicinom.

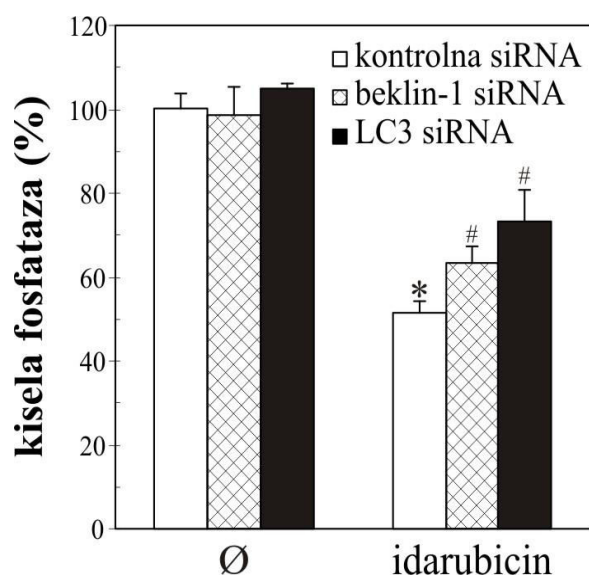


**Slika 49. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje acidifikaciju citoplazme indukovanu idarubicinom.** REH ćelije transfektovane sa LC3, beclin-1 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su 24 časa tretirane idarubicinom (25 nM), a zatim obojene akridin oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na idarubicinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.



#### 4.6.6. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje toksičnost idarubicina prema REH leukemijskim ćelijama

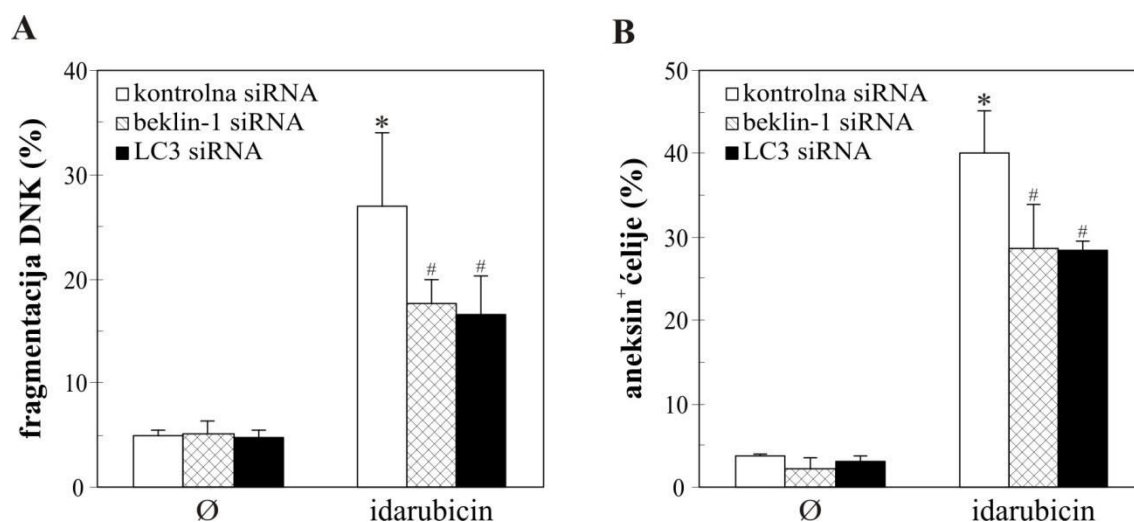
Daljim istraživanjem je analiziran uticaj genetske supresije autofagije na toksično dejstvo idarubicina u REH leukemijskoj ćelijskoj liniji. Testom aktivnosti kisele fosfataze pokazano je da inhibicija autofagije transfekcijom siRNA za LC3 $\beta$  i beclin-1, poput farmakološke inhibicije autofagije, dovodi do smanjenja toksičnosti idarubicina prema tumorskim ćelijama (slika 50). Dakle, ovim rezultatima je definitivno potvrđeno da idarubicin indukuje citotoksičnu autofagiju u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 50. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje toksičnost idarubicina prema REH leukemijskim ćelijama.** REH ćelije transfektovane sa LC3, beclin-1 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane sa idarubicinom (25 nM). Nakon 24 časa njihov vijabilitet je ispitivan testom aktivnosti kisele fosfataze. Prikazani su reprezentativni rezultati triplikata iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na idarubicinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### 4.6.7. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje apoptozu indukovanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama

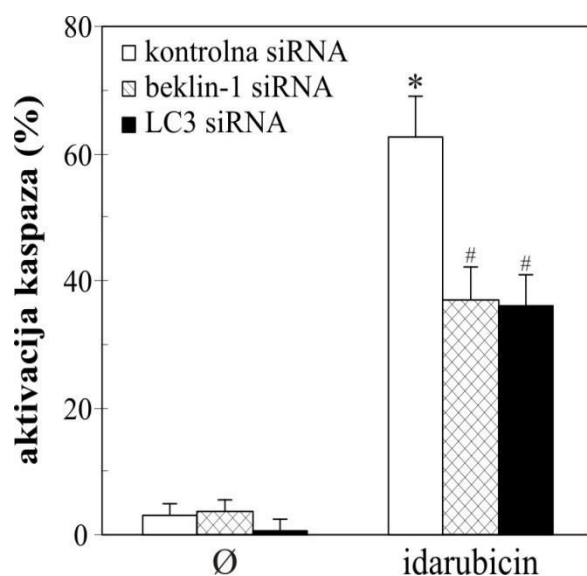
Da bi se ispitaio uticaj autofagije na apoptozu indukovanu idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama, REH ćelije transfektovane siRNA za LC3 i beclin-1 inkubirane su sa idarubicinom. Nakon obeležavanja odgovarajućim fluorescentnim bojama, ćelije su analizirane protočnom citofluorimetrijom. Dobijeni rezultati su pokazali da transfekcija LC3 i beclin-1 siRNA značajno smanjuje fragmentaciju DNK (slika 51A) i eksternalizaciju fosfatidilserina (slika 51B), koje nastaju pod uticajem idarubicina. Dakle, genetskom supresijom potvrđena je sposobnost autofagije da dodatno stimuliše idarubicinom indukovanu apoptozu.



**Slika 51. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje apoptozu u REH leukemijskim ćelijama tretiranim idarubicinom.** REH leukemijske ćelije transfektovane sa LC3, beclin-1 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane idarubicinom (25 nM). Posle 24 časa inkubacije protočnom citofluorimetrijom je analizirana fragmentacija DNK u ćelijama obojenim propidijum jodidom (A) i translokacija fosfatidilserina u ćelijama obojenim aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na idarubicinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### 4.6.8. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim idarubicinom

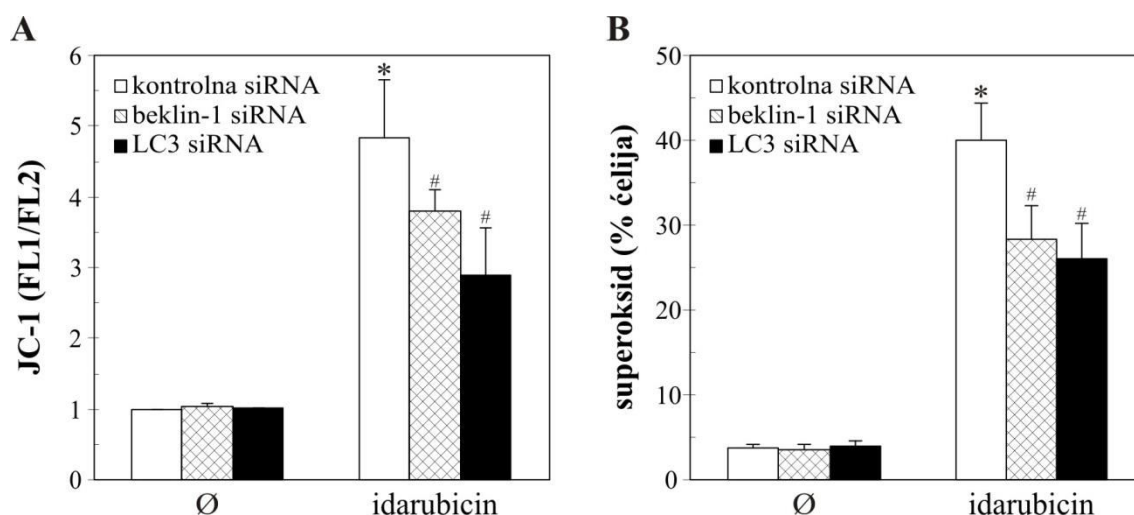
Nakon što je potvrđeno da supresija LC3 i beclin-1 gena smanjuje apoptozu ćelija tretiranih idarubicinom, analizirana je aktivnost kaspaza u ovim ćelijama. Ćelije sa redukovanom ekspresijom autofagnih gena tretirane su idarubicinom, a zatim obojene ApoStat-om i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Dobijeni rezultati su pokazali da supresija LC3 i beclin-1 dovodi i do smanjenja aktivacije kaspaza u REH leukemijskim ćelijama, odnosno da autofagija doprinosi aktivaciji kaspaza u ćelijama tretiranim idarubicinom (slika 52).



**Slika 52. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje aktivaciju kaspaza u REH ćelijama tretiranim idarubicinom.** REH leukemijske ćelije transfektovane sa LC3, beclin-1 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane idarubicinom (25 nM). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana aktivacija kaspaza u ćelijama obojenim ApoStat-om. Prikazan je reprezentativni rezultat iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na idarubicinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### 4.6.9. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim idarubicinom

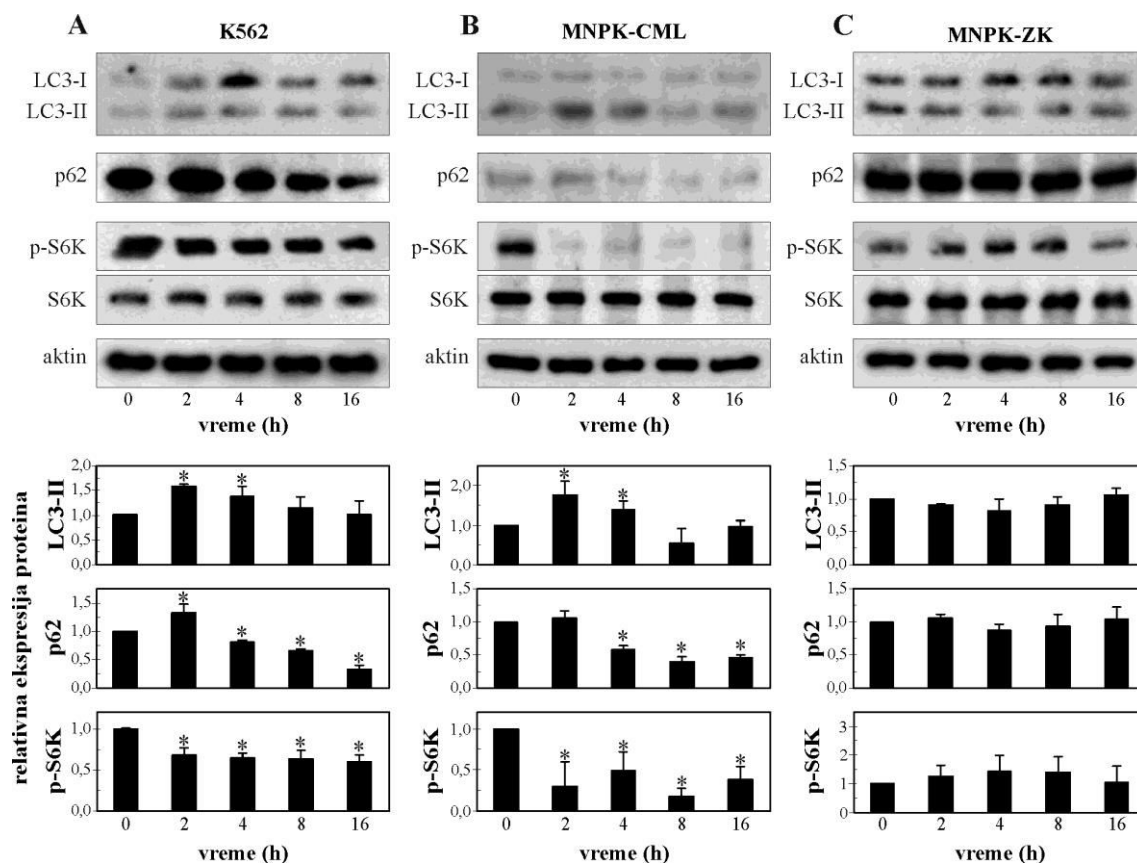
Konačno, genetskom inhibicijom ispitivano je da li autofagija učestvuje u oksidativnom stresu i depolarizaciji mitohondrija. U skladu sa rezultatima dobijenim korišćenjem farmakoloških inhibitora autofagije (slika 47), supresija autofagnih gena LC3 i beklina-1 smanjuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane (slika 53A) i produkciju superoksidnog anjonskog radikala (slika 53B), kako je pokazano citofluorimetrijskom analizom. Dakle, autofagija indukovana idarubicinom doprinosi oksidativnom stresu, depolarizaciji mitohondrija i sledstvenoj apoptozi u REH leukemijskim ćelijama.



**Slika 53. Inhibicija ekspresije LC3 i beclin-1 gena smanjuje depolarizaciju mitohondrijalne membrane i oksidativni stres u REH ćelijama tretiranim idarubicinom.** REH leukemijske ćelije transfektovane sa LC3, beclin-1 i odgovarajućom kontrolnom siRNA su tretirane idarubicinom (25 nM). Nakon 24 časa inkubacije, protočnom citofluorimetrijom je analizirana promena membranskog potencijala u ćelijama obojenim JC-1 (A) i sinteza superoksidnog anjonskog radikala u ćelijama obojenim DHE fluorohromom (B). Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta kao srednja vrednost ± standardna devijacija triplikata. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na idarubicinom tretirane ćelije transfektovane kontrolnom siRNA.

#### **4.6.10. Idarubicin stimuliše LC3 konverziju i degradaciju p62 proteina u drugim leukemijskim ćelijama, ali ne i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih kontrola**

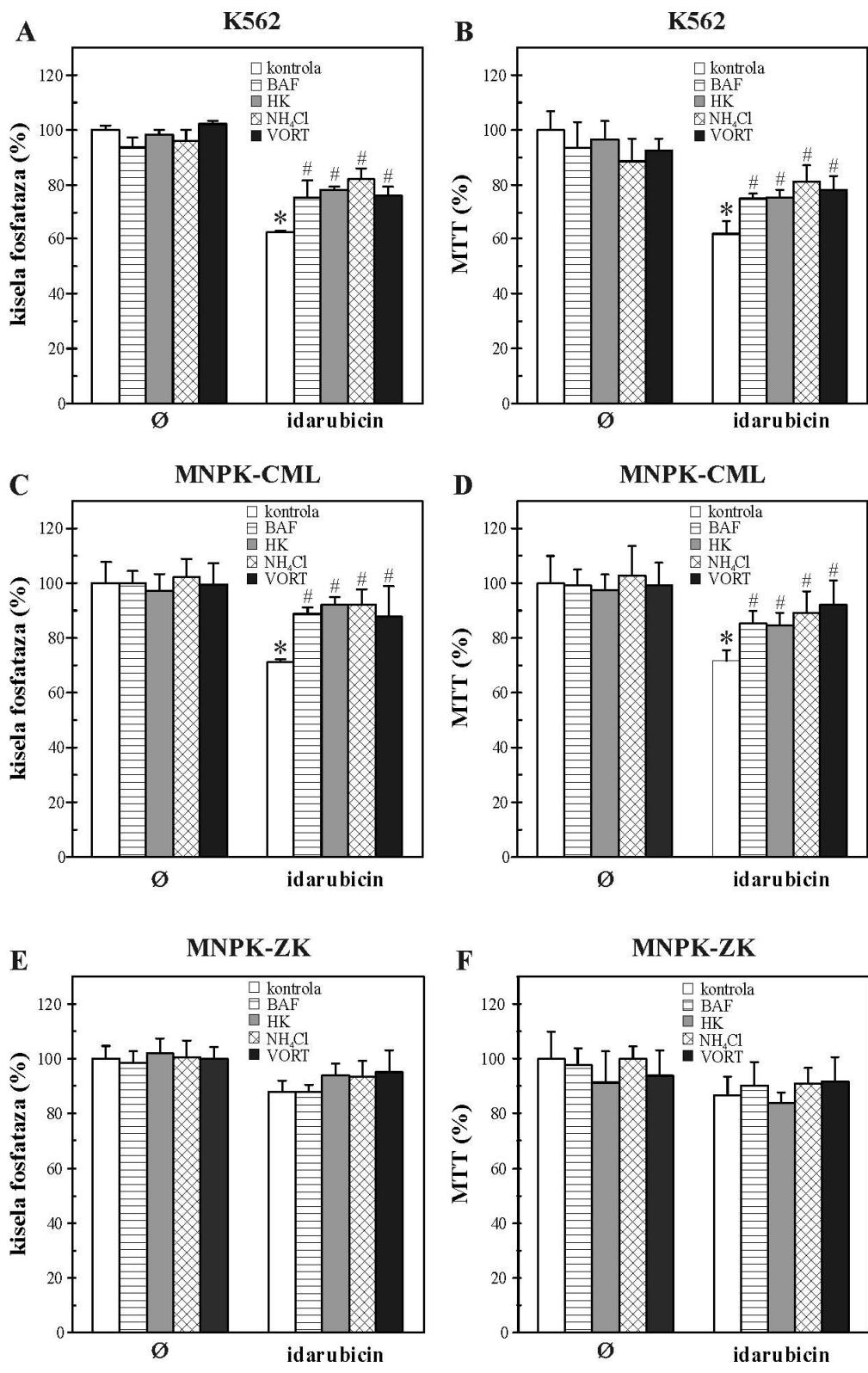
Dalje je ispitivano da li je indukcija citotoksične autofagije specifična za humanu akutnu limfocitnu leukemijsku ćelijsku liniju ili se javlja i kod drugih vrsta leukemijskih ćelija i/ili zdravih limfocita. Da bi se ovo utvrdilo, korišćene su ćelije humane hronične mijelogene leukemijske linije (K562), primarne leukemijske ćelije izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija, kao i MNPK zdravih dobrovoljaca usklađenih sa grupom obolelih po uzrastu i polu, koje su upotrebljene za kontrole. Nakon 2, 4, 8 i 16 časova tretmana idarubicinom, imunoblot tehnikom su ispitane ekspresija p62 proteina i fosforilacija p70S6 kinaze, kao i konverzija LC3 molekula. Utvrđeno je da idarubicin dovodi do degradacije p62, indukcije LC3 konverzije, i inhibicije fosforilacije p70S6 kinaze u K562 i primarnim leukemijskim ćelijama pacijenata (slika 54A, B). Antileukemijski lek nije doveo do promena nivoa p62, LC3-II i p70S6 kinaze u MNPK zdravih kontrola (slika 54C). Dobijeni rezultati pokazuju da idarubicin izaziva mTOR-zavisnu autofagiju u različitim humanim leukemijskim ćelijskim linijama, kao i primarnim leukemijskim ćelijama, ali da ne dovodi do opisanih promena u MNPK zdravih kontrola.



**Slika 54. Idarubicin indukuje autofagiju u K562 i primarnim leukemijskim ćelijama.** K562 leukemijske ćelije (A), primarne leukemijske ćelije koje su izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija (MNPk-CML) (B), kao i mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz krvi zdravih kontrola (MNPk-ZK) (C) su nakon 2, 4, 8 i 16 časova inkubacije sa idarubicinom (25 nM) analizirane imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta i srednja srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija njihove densitometrijske analize. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije.

#### **4.6.11. Supresija autofagije farmakološkim inhibitorima smanjuje toksičnost idarubicina u različitim leukemijskim ćelijama**

Konačno, analizirana je uloga autofagije indukovane idarubicinom u K562 i primarnim leukemijskim ćelijama upotrebom farmakoloških inhibitora. Rezultati dobijeni testom aktivnosti kisele fosfataze i MTT testom su pokazali da u primenjenim koncentracijama sami inhibitori autofagije nisu imali uticaj na preživljavanje leukemijskih ćelija (slika 55). Sa druge strane, vortmanin, amonijum hlorid, bafilomicin A1 i hlorokin su redukovali toksičnost idarubicina u K562 i primarnim leukemijskim ćelijama (slika 55A-D). Inhibicija autofagije nije imala uticaj na preživljavanje MNPK zdravih kontrola u prisustvu idarubicina (slika 55E, F). Dakle, idarubicin indukuje toksičnu autofagiju u različitim leukemijskim ćelijama (REH, K562 i primarnim leukemijskim ćelijama pacijenata), ali ne i u MNPK zdravih kontrola.



**Slika 55. Farmakološka inhibicija autofagije smanjuje toksičnost idarubicina prema leukemijskim ćelijama.** K562 (A, B), primarne leukemijske ćelije koje su izolovane iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija (MNPK-CML) (C, D) i mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz krvi zdravih kontrola (MNPK-ZK) (E, F) su inkubirane sa idarubicinom (25



nM) u odsustvu i prisustvu bafilomicina A1 (BAF; 10 nM), hlorokina (HK; 20  $\mu$ M), amonijum hlorida ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 10 mM) i vortmanina (VORT; 200 nM) (A-F). Nakon 24 časa, testom aktivnosti kisele fosfataze (A, C, E) i MTT testom (B, D, F) određen je ćelijski vijabilitet. Prikazani su reprezentativni rezultati iz tri nezavisna eksperimenta (A, B) ili tri različita MNPK uzorka (C, D, E, F) kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \* $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, dok # $p < 0,05$  ukazuje na statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo idarubicinom.

## 5. DISKUSIJA

Eksperimentalni rezultati ove disertacije su po prvi put pokazali sposobnost antileukemijskih lekova antimetabolita citarabina i antraciklina idarubicina da stimulišu autofagiju u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*, ali ne i u limfocitima izolovanim iz krvi zdravih kontrola. Citarabin i idarubicin indukovali su apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza u tumorskim ćelijama. Osim toga, oba antileukemijska leka stimulisala su mTOR zavisnu autofagiju, koja je korelirala sa modulacijom mTOR aktivatora Akt i mTOR inhibitora AMPK i ERK kinaza u ćelijama tretiranim citarabinom, odnosno sa modulacijom Akt i AMPK u leukemijskim ćelijama tretiranim idarubicinom. Korišćenjem farmakološke i genetske inhibicije autofagije, utvrđeno je da citarabin indukuje citoprotektivnu, a idarubicin citotoksičnu autofagiju u leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama.

Indukcija apoptoze je osnovni mehanizam antileukemijskog delovanja velikog broja antineoplastičnih lekova (Hannun, 1997; Mesner i sar., 1997). Tako je, na primer, pokazano da citarabin indukuje apoptozu u različitim humanim leukemijskim ćelijama kao što su: ćelije periferne krvi B-CLL pacijenata, ćelije izolovane iz koštane srži AML pacijenata, ćelije AML linija MV4-11, MOLM-13 i HL-60, ćelije CML linije K562 i mnoge druge (Ray i sar., 1996; Kim i sar., 1997; de Vries i sar., 2006; Li i sar., 2017). Takođe, tretman idarubicinom dovodi do apoptoze u ćelijama promonocitne linije U937, ćelijama eritroleukemijske linije HEL, ćelijama AML linija SKM-1, HL-60, NB4, THP-1 i MOLM-13, ćelijama CML linije K562 i ćelijama ALL linije MOLT-4 (Lotfi i sar., 2002; Barbarroja i sar., 2009; Switalska i sar., 2012; Li i sar., 2014). U skladu sa prethodno opisanim rezultatima, u ovoj studiji je pokazana sposobnost citarabina i idarubicina da indukuju apoptozu u ćelijama ALL linije REH, odnosno da smanjuju vijabilitet HL-60, K562 leukemijskih ćelijskih linija i primarnih leukemijskih ćelija izolovanih iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana CML.

Poznato je da se oba ispitivana antileukemijska leka ugrađuju u DNK uzrokujući prekide jednog ili oba lanca ovog molekula (Fukushima i sar., 1993; Zwelling i sar., 1993; Studzian i sar., 2001). Oštećenje DNK obično predstavlja signal za otpočinjanje unutrašnjeg mitohondrijskog puta apoptoze (Wang i Youle, 2009). Shodno tome, u

brojnim radovima utvrđeno je da citarabin i idarubicin indukuju oštećenje mitohondrija asocirano sa snažnom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) i nastankom oksidativnog stresa (Geller i sar., 2001; Swift i sar., 2003; Hewish i sar., 2013; Liu i sar., 2013). Takođe, u ovoj studiji je pokazano da oba ispitivana antileukemijska medikamenta izazivaju depolarizaciju membrane mitohondrija i stimulišu produkciju superoksidnog anjonskog radikala u REH leukemijskim ćelijama. Poznato je da oksidativna fosforilacija u mitohondrijama putem transportnog lanca elektrona stvara RKV, pa mitohondrije predstavljaju glavni izvor oksidativnog stresa u ćeliji (West i sar., 2011). Produkcija RKV se može naglo uvećati u uslovima stresa ili mitohondrijalnog oštećenja (West i sar., 2011). Sa druge strane, RKV dodatno indukuju oštećenje mitohondrija, što dovodi do još većeg oksidativnog stresa, odnosno između oštećenja mitohondrija i oksidativnog stresa postoji pozitivna povratna sprega (Brady i sar., 2006). Dakle, iako uzročno posledična veza između depolarizacije mitohondrija i oksidativnog stresa indukovano citarabinom i idarubicinom nije ispitivana u ovoj studiji, vrlo je verovatno da postoji.

Povećana produkcija RKV indukuje otvaranje pora na spoljašnjoj membrani mitohondrija, što za posledicu ima oslobađanje mitohondrijalnih intermembranskih proteina među kojima je i citohrom c (Vempati i sar., 2007). Kada se nađe u citosolu, citohrom c intereaguje sa apoptozomalnim kompleksom koji zatim izaziva aktivaciju kaspaza, ključnih enzima za izvršavanje procesa apoptoze (Li i sar., 1997; Zou i sar., 1997). U ovoj disertaciji je pokazano da oba ispitivana antileukemijska leka indukuju aktivaciju kaspaza, što je u potpunoj saglasnosti sa ranije objavljenim studijama na različitim leukemijskim ćelijama (Liu i sar., 2001; Florio i sar., 2003; Vial i sar., 2006; Xie i sar., 2010; Wen i sar., 2011; Harrison i sar., 2016).

U eukariotskim ćelijama unutrašnja i spoljašnja strana ćelijske membrane ispoljavaju asimetričnu lipidnu distribuciju, pri čemu se fosfatidilserin nalazi isključivo na unutrašnjoj strani membrane. Tokom apoptoze, dolazi do aktivacije skremblaze Xkr8 indukovane dejstvom kaspaze-3 i kaspaze-8, koja dovodi do premeštanja fosfatidilserina na spoljašnju stranu plazmaleme, što je signal za prepoznavanje i uklanjanje apoptotskih tela fagocitima (Marino i Kroemer, 2013; Rysavy i sar., 2014). Eksternalizacija fosfatidilserina omogućava i vezivanje anjonskog lipid-vezujućeg proteina aneksina V, koji se koristi za detekciju apoptotičnih ćelija (Lee i sar., 2013). U skladu sa prethodnim

istraživanjima, u ovoj studiji je pokazano da oba ispitivana antileukemijska leka stimulišu premeštanje fosfatidilserina na spoljašnu stranu ćelijske membrane leukemijskih ćelija (Shi i sar., 2006; Liu i sar., 2013; Ma i sar., 2017). Osim toga, i citarabin i idarubicin su izazvali fragmentaciju DNK u tumorskim ćelijama, što takođe predstavlja marker apoptoze. Enzim koji fragmentira DNK je DNaza aktivirana kaspazama (engl. *Caspase-Activated DNase, CAD*). U normalnim uslovima CAD je inhibiran delovanjem inhibitora CAD (engl. *Inhibitor of Caspase Activated DNase, ICAD*), ali u toku apoptoze, efektorska kaspaza-3 seče ICAD i tako aktivira CAD (Zhang i Xu, 2000; Widlak i Garrard, 2009). Osim rezultata ove disertacije, i radovi drugih autora pokazali su da citarabin i idarubicin indukuju fragmentaciju DNK u leukemijskim ćelijama (Florio i sar., 2003; Qi i sar., 2003; Ma i sar., 2017). Konačno, tretman idarubicinom doveo je do značajnih morfoloških promena REH ćelija poput smanjenja njihovog volumena, pojave kondenzovanih, fragmentisanih jedara srpastog oblika, što je karakteristično za apoptotski način umiranja ćelija (Coleman i sar., 2001).

Iako je u ovoj i u prethodnim studijama utvrđeno da leukemijske ćelije nakon *in vitro* tretmana citarabinom i idarubicinom umiru apoptozom, poznato je da se kod pacijenata nakon dugotrajnog korišćenja ovih citostatika razvija rezistentnost (Kartalou i Essigmann, 2001). Uprkos značajnom napretku u razumevanju bioloških, molekularnih i citogenetskih aspekata različitih formi leukemija, kao i pomaku u dijagnostifikovanju i terapiji leukemija, kod većine odraslih pacijenata dolazi do pojave relapsa bolesti (Tallman i sar., 2005; Appelbaum i sar., 2007). Tako je, na primer, pokazano da se nakon terapije AML bolesnika kombinacijom citarabina i antraciklina potpuna remisija bolesti postiže u manje od 75% slučajeva. Klinički ishod bolesti je nezadovoljavajući, jer većina pacijenata sa postignutom potpunom remisijom relapsira u roku od dve godine od trenutka postavljanja dijagnoze, često sa pojavom rezistencije i lošeg odgovora na sledeću terapiju. Dugoročno preživljavanje bez simptoma bolesti se javlja samo kod 20-30% pacijenata koji postižu potpunu remisiju bolesti (Burk i sar., 1997; Rowe, 1998; Funato i sar., 2004), a glavni uzrok ovome je hemiorezistentnost leukemijskih ćelija na citotoksično dejstvo antileukemijskih lekova koja se javlja kao posledica različitih ćelijskih mehanizama.

Tako je, na primer, pokazano da otpornost na dejstvo citarabina proizlazi iz smanjenog unosa leka u ćeliju, što je uzrokovano nedovoljnom zastupljenošću

transportera nukleozida hENT1 (engl. *human equilibrative nucleoside transporter 1*) na ćelijskoj membrani (White i sar., 1987; Gati i sar., 1997). Takođe, smanjena ekspresija deoksicitidin kinaze koja katalizuje transformaciju citarabina u aktivnu formu Ara-CTP (engl. *arabinofuranosylcytosine triphosphate*) povezuje se sa neosetljivošću ćelija na dejstvo citarabina (Cai i sar., 2008). Konačno, povećanje ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2, kao i MAP kinaze (MAPK) ERK5, koje se javljaju u velikom broju slučajeva kod AML, sprečavaju leukemijske ćelije da umru apoptozom nakon tretmana citarabinom (Konopleva i sar., 2000; Xu i sar., 2015). Rezistencija leukemijskih ćelija na tretman idarubicinom posledica je povećanog izbacivanja leka iz ćelije pomoću P-gp (engl. *P-glycoprotein*) i MRP (engl. *MDR (multidrug resistance)-associated protein*) proteina, njegove detoksifikacije pomoću glutation S-transferaze i narušene sposobnosti ćelije za indukciju apoptoze zbog mutacija u tumor supresor genu p53 (Den Boer i sar., 1998; Chien i Moasser, 2008). Dakle, iako se citarabin i idarubicin široko primenjuju u tretmanu različitih formi leukemija, dobro bi bilo pronaći način za poboljšanje njihove antileukemijske efikasnosti kompromitovane brojnim neželjenim dejstvima i hemiorezistentnošću nastalom usled dugotrajnog korišćenja.

Kombinovanje citarabina i idarubicina sa drugim antitumorskim lekovima predstavlja jedan od načina poboljšanja antileukemijske efikasnosti ovih medikamenata. Tako je, na primer, pokazano da se citotoksični efekat citarabina može pospešiti ako se paralelno koristi fludarabin, flavonidi, alvocidib, inhibitori ribonukleotid reduktaze (Gandhi i sar., 1993; Hubeek i sar., 2005; Nadova i sar., 2007; Kim i sar., 2015). Takođe, antitumorsko dejstvo idarubicina potenciraju inhibitor DNK zavisne protein kinaze NU7026, metotreksat, decitabin i drugi lekovi (Willmore i sar., 2004; Li i sar., 2014; Fan i sar., 2017). Osim toga, upravo se kombinacija idarubicina i citarabina široko koristi u terapiji različitih vrsta leukemija, naročito AML (Barone i sar., 2001; Karbasian-Esfahani i sar., 2004; Zhou i sar., 2016).

Antitumorsko delovanje citostatika koji indukuju protektivnu autofagiju može se pospešiti njenom inhibicijom, dok se kod lekova koji stimulišu citotoksičnu autofagiju, indukcijom autofagije podstiče dodatno ubijanje tumorskih ćelija (Xu i sar., 2011; Sharma i sar., 2014). Imajući u vidu da je za antracikline doksorubicin, daunorubicin i epirubicin već pokazano da indukuju autofagiju u leukemijskim ćelijama (Han i sar., 2011; Sishi i sar., 2012; Chittaranjan i sar., 2014; Park i sar., 2016), u ovoj studiji je po

prvi put ispitana sposobnost citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju. Takođe, ispitivana je uloga autofagije u smrti leukemijskih ćelija, kao i mogućnost poboljšanja antitumorskog efekta ovih lekova odgovarajućom modulacijom autofagije.

Sposobnost idarubicina i citarabina da indukuju kompletnu autofagiju nedvosmisleno je dokazana korišćenjem indikatora autofagije na različitim nivoima procesa, koji uključuju zakišeljavanje citoplazme, morfološku detekciju autofagnih vezikula, ekspresiju ATG gena, konverziju LC3 proteina sa analizom ćelijskog fluksa i digestiju selektivne mete autofagije, proteina p62 (Mizushima i sar., 2010). U krajnjem stadijumu maturacije autofagozoma, dolazi do njihovog spajanja sa lizozomima, prilikom čega se obrazuju kisele vezikule, autofagolizozomi (engl. *acidic vesicular organelles, AVOs*) (Ye i sar., 2012). Pokazano je da različiti hemioterapeutici indukuju acidifikaciju citoplazme tumorskih ćelija (Kondo i sar., 2005; Udelnow i sar., 2011). Korišćenjem protočne citofluorimetrije i fluorescentne mikroskopije nakon bojenja ćelija akridin oranžom, pokazali smo da citarabin i idarubicin takođe stimulišu intracelularno zakišeljavanje u REH ćelijama. Sposobnost citarabina i idarubicina da stimulišu stvaranje autolizozoma, vezikula sa jednostrukom membranom u kojima se uočava citoplazmatski sadržaj, pokazana je i transmissionom elektronskom mikroskopijom, koja predstavlja „zlatni standard“ za praćenje procesa autofagije (Gozuacik i Kimchi, 2004). Osim vezikula sa jednoslojnom membranom, ovi antileukemijski lekovi stimulisali su i stvaranje vakuola sa dvoslojnom ćelijskom membranom u kojima se nalazi nesvareni ćelijski sadržaj, odnosno pojavu autofagozoma.

Rezultati ove disertacije utvrdili su da citarabin i idarubicin indukuju vremenski zavisnu konverziju LC3-I u LC3-II formu proteina, što je pokazatelj stvaranja autofagozoma. Važno je napomenuti da ispitivani antileukemijski lekovi indukuju povećanje autofagnog fluksa u leukemijskim ćelijama, odnosno da do povećanja ekspresije LC3-II proteina zaista dolazi usled njegovog povećanog stvaranja, a ne smanjene razgradnje. Interesantno je da citarabin i idarubicin osim što povećavaju koncentraciju LC3 II forme istovremeno povećavaju i koncentraciju LC3 I forme proteina, što ukazuje na sposobnost ovih antileukemijskih lekova da povećaju ekspresiju LC3. U radovima drugih autora takođe je pokazano da transkripciju LC3 gena stimulišu

različiti antikancerski agensi kao što su inhibitor histon deacetilaze vorinostat, ceramid, atorvastatin (Sun i sar., 2011; Gammoh i sar., 2012).

Sekvestozom-1 (SQSTM1) ili p62 predstavlja ubikvitin-vezujući adaptorski protein koji je sposoban da polimerizuje preko N-terminalnog PB1 domena, dok s druge strane intereaguje sa ubikvitiranim proteinskim agregatima preko C-terminalnog domena, UBA domena (engl. *ubiquitin-associated domain*). p62 se vezuje direktno za LC3 i GABARAP familiju proteina putem specifičnog sekvencijalnog motiva koji interaguje sa LC3 molekulom (engl. *LC3 interaction region, LIR*) (Komatsu i sar., 2007). Sekvestozom-1 u procesu autofagije ima ulogu u povezivanju ubikvitiranih proteina sa autofagnom mašinerijom i njihovoj daljoj degradaciji u lizozomima, prilikom čega se i sam razgrađuje. Prilikom inhibicije razgradnje u autolizozomima dolazi do akumuliranja p62, a u procesu potpune autofagije dolazi do smanjenja nivoa ovog proteina, pa se koncentracija p62 proteina može koristiti za određivanje autofagnog fluksa (Filimonenko i sar., 2007; Mizushima i Yoshimori, 2007). U ovoj studiji je pokazano da citarabin i idarubicin dovode do smanjenja ekspresije p62 proteina, odnosno do indukcije potpune autofagije, što je u skladu sa prethodno pokazanom sposobnošću različitih citostatika da smanjuju koncentraciju ovog proteina u leukemijskim ćelijama (He i sar., 2016; Zhu i sar., 2017).

Beklin-1 je proautofagni protein koji učestvuje u inicijaciji formiranja autofagozoma (Zeng i sar., 2006). Interesantno je da ni u jednoj vrsti ispitivanih leukemijskih ćelija, citarabin i idarubicin nisu povećali ekspresiju beklina-1. Ovakav ishod se može objasniti na dva načina. Pretpostavkom da je autofagija inicirana citarabinom i idarubicinom nezavisna od beklina-1, kao što je prethodno opisano za rezveratrol u ćelijama raka dojke, i kobalt hlorid u ćelijama raka dojke i grlića materice (Scarlati i sar., 2008; Sun i sar., 2015). Sa druge strane, bazalna ekspresija beklina-1 mogla bi biti dovoljna za inicijaciju formiranja autofagozoma (Li i sar., 2011). Imajući u vidu da je RNK transfekcija sa siRNA za beklin-1 značajno redukovala autofagni odgovor indukovani idarubicinom, naši rezultati sugerišu da beklin-1 učestvuje u autofagiji stimulisanom ovim lekom i da je njegova bazalna ekspresija dovoljna za indukciju autofagije.

Regulacija autofagije predstavlja kompleksan proces koji se može odvijati na transkripcionom, post-transkripcionom i post-translacionom nivou (Feng i sar., 2015).

Do sada je identifikovano skoro 40 ATG gena koji učestvuju u procesu autofagije. Proteini koji nastaju transkripcijom ATG gena i translacijom odgovarajućih iRNK se mogu podeliti u različite funkcionalne celine: Atg1 kompleks (Atg1, Atg13, Atg17, Atg29, i Atg31) je inicijalni kompleks koji reguliše indukciju formiranja autofagozoma; Atg9 i njegov ciklični sistem (Atg23, Atg27, Atg2, i Atg18) ima ulogu u dostavljanju membrane neophodne za ekspanziju fagofore; PI3K kompleks (Vps34, Vps30/Atg6, Vps15, Atg14, i Atg38) je odgovoran za fazu nukleacije vezikula; dva ubikvitinu-slična konjugaciona sistema koja uključuju Atg12 (Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, i Atg16) i Atg8 (Atg3, Atg4, Atg7, i Atg8) i imaju ulogu u ekspanziji vezikula (Feng i sar., 2014; Feng i sar., 2015). U ovoj studiji je utvrđeno da je citarabin indukuvao ekspresiju pojedinih ATG gena, odnosno da je značajno stimulisao ekspresiju iRNK za Atg4, Atg5 i Atg7 u REH leukemijskim ćelijama. Međutim, iako značajan, porast Atg4, Atg5 i Atg7 ekspresije u leukemijskim ćelijama bio je umerenog karaktera. S druge strane, smanjenje aktivacije mTOR/p70S6K kinaze je bilo gotovo kompletno, a indukcija autofagije je sprečena dejstvom leucina, kinaznog aktivatora mTOR-a, što upućuje na zaključak da oslobađanje od supresivnog delovanja mTOR-a predstavlja osnovni mehanizam indukcije autofagije dejstvom citarabina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa mišljenjem da mTOR kinaza reguliše proces autofagije u manjoj meri kontrolom transkripcije ATG gena, a u većoj kontrolisanjem fosforilacije proteina kao što su: Ulk1, ATG13 i FIP200 (Jung i sar., 2010; Alers i sar., 2012). Takođe, u prethodnim studijama pokazano je da antraciklin doksorubicin inhibira mTOR kinaznu aktivnost u kardiomiocitima i ćelijama kancera jajnika (Zhu i sar., 2009; Brum i sar., 2013). Povećana aktivacija PI3K/Akt i mTOR signalnih puteva uočena je u limfocitima pacijenata obolelih od leukemije, pa represija ovih preživljavajućih signala predstavlja specifičnu metu antileukemijske terapije (Park i sar., 2010).

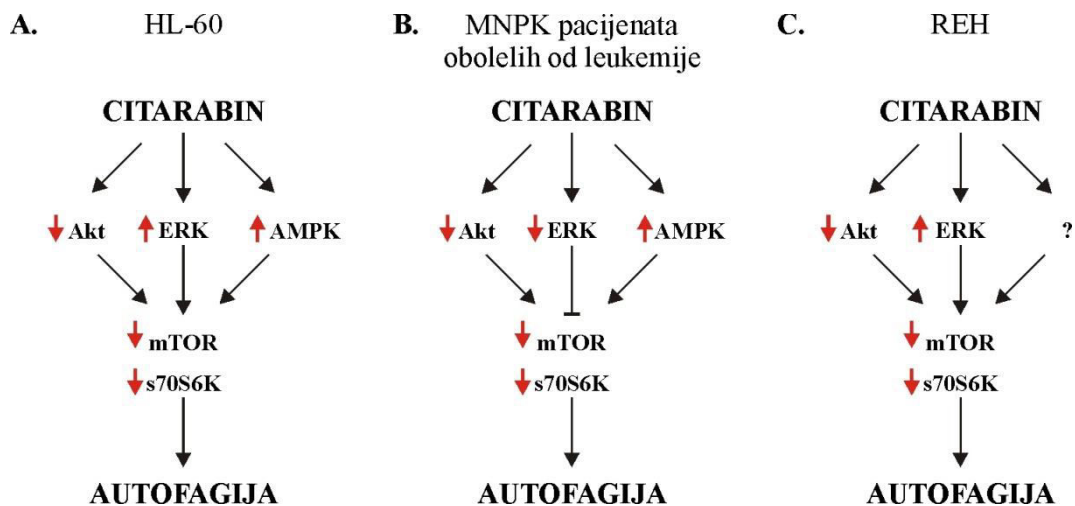
Zbog toga je sledeći cilj bio da se ispituju signalni molekuli koji učestvuju u regulaciji mTOR kinazne aktivnosti. U studijama drugih autora je pokazano da su AMPK i ERK kinaza inhibitori mTOR aktivnosti i stimulatori autofagije (Harhaji-Trajkovic i sar., 2009; Wang i sar., 2009; Arsikin i sar., 2012). S druge strane, Akt je jedan od najpoznatijih aktivatora mTOR kinaze i supresora autofagije (He i Klionsky, 2009). Takođe, utvrđeno je da su aktivacija AMPK i ERK kinaze, kao i inhibicija Akt kinaze, indukovali autofagiju zavisnu od mTOR inhibicije u različitim leukemijskim ćelijama



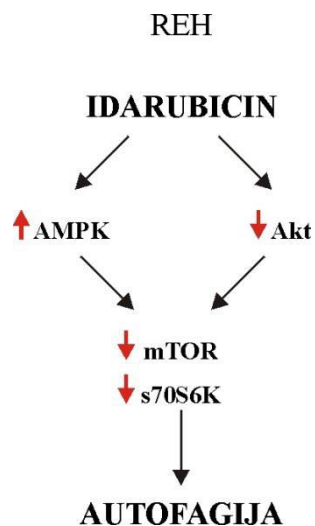
(Wang i sar., 2009; Evangelisti i sar., 2011; Huang i sar., 2011; Grimaldi i sar., 2012; Martelli i sar., 2012). U saglasnosti sa tim, tretman citarabinom je doveo do brzog povećanja aktivnosti AMPK i ERK i smanjenja fosforilacije Akt u HL-60 ćelijama, što upućuje na zajedničku aktivnost ovih signalnih puteva u mTOR supresiji posredovanoj citarabinom i posledičnoj indukciji autofagije u ovoj leukemijskoj ćelijskoj liniji (shema 2A). Dok su modulacije aktivnosti AMPK i Akt kinaza u citarabinom tretiranim primarnim leukemijskim ćelijama izolovanim iz CML pacijenata takođe korelirale sa mTOR inhibicijom i stimulacijom autofagije, ekspresija mTOR inhibitora ERK kinaze je bila smanjena, pa zaključujemo da nije učestvovala u indukciji autofagije citarabinom (shema 2B). Interesantno je da u REH leukemijskim ćelijama nije došlo do promene aktivnosti AMPK, dok su citarabinom stimulisana inhibicija Akt i aktivacija ERK kasnile za početkom autofagije, odnosno za početkom konverzije LC3 proteina, ukazujući da ovi molekuli pre imaju ulogu u održavanju procesa autofagije, koji je prethodno pokrenut nekim drugim signalnim putem. Jedan od molekula koji bi mogao biti odgovoran za pokretanje procesa autofagije u REH leukemijskim ćelijama je tumor supresor protein p53, koji je uključen u indukciju mTOR zavisnog autofagnog odgovora u tumorskim ćelijama (Maiuri i sar., 2010) (shema 2C). Osim toga, kako je ranije utvrđeno, ekspresija p53 proteina je povećana u leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom (Kobayashi i sar., 1998). Iz svega što je prethodno navedeno se može izvesti zaključak da su citarabinom indukovane promene u aktivnosti signalnih molekula koji učestvuju u regulisanju aktivnosti mTOR kinaze i posledičnoj indukciji autofagije specifične u odnosu na vrstu leukemijskih ćelija i zahtevaju dodatna ispitivanja.

Istraživanja drugih autora utvrdila su da doksorubicin, daunorubicin i epirubicin stimulišu fosforilaciju Akt u malignim i primarnim ćelijama (Lee i sar., 2006; Qu i sar., 2009). Takođe, pokazano je da idarubicin aktivira Akt kinazu u endotelijalnim ćelijama (Kaushal i sar., 2004). Nasuprot tome, rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da idarubicin inhibira aktivnost Akt kinaze u leukemijskim ćelijama, što bi moglo biti objašnjeno time da delovanje idarubicina na aktivnost Akt zavisi od vrste ćelija. Dakle, inhibicija Akt mogla bi biti uzrok za supresiju aktivnosti mTOR kinaze i indukciju autofagije idarubicinom u REH leukemijskim ćelijama. Osim toga, pokazana aktivacija mTOR represora AMPK bi takođe mogla doprineti supresiji mTOR kinaze koju

indukuje idarubicin (Shema 3). Ovakva pretpostavka podržana je ranije objavljenim rezultatima Chena i saradnika koji su pokazali da AMPK učestvuje u inhibiciji mTOR kinaze i posledičnoj smrti kardiomiocita izazvanoj doksorubicinom (Chen i sar., 2011).



Shema 2. Pretpostavljeni mehanizam dejstva citarabina u različitim leukemijskim ćelijama.

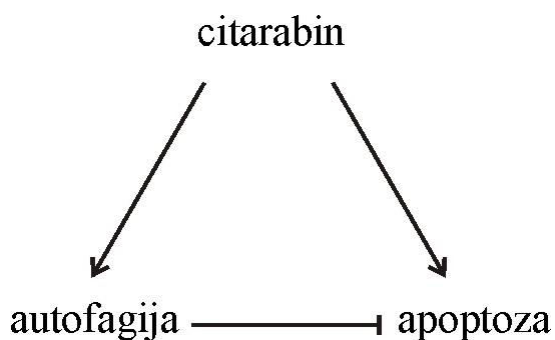


Shema 3. Pretpostavljeni mehanizam dejstva idarubicina u REH leukemijskoj ćelijskoj liniji.

Oksidativni stres je jedan od glavnih pokretača autofagije u ćeliji (Filomeni i sar., 2015). Pokazano je da je povećanje RKV, pogotovo superoksida, uzrokovalo aktivaciju autofagnog odgovora hantingtin proteinom, gladovanjem, inhibitorima elektronskog transporta u mitohondrijama i vodonik peroksidom (Bjorkoy i sar., 2005; Chen i sar., 2009; Li i sar., 2012). U skladu s tim, može se pretpostaviti da je oksidativni stres bio odgovoran za indukciju autofagije dejstvom citarabina i idarubicina. Takođe, disfunkcija mitohondrija, koja može i ne mora biti posledica oksidativnog stresa, povezuje se sa indukcijom autofagije (Lee i sar., 2012). Oštećene mitohondrije se razgrađuju u procesu mitofagije, dok se od neoštećenih stvara pul novih (Lee i sar., 2012). Pokazano je da doksorubicin stimuliše mitofagiju u kardiocitima i ćelijama tumora dojke (Guo i sar., 2016; Koleini i Kardami, 2017), što ukazuje da bi depolarizacija mitohondrija opisana u ovoj studiji mogla učestvovati u indukciji autofagije citarabinom i idarubicinom.

Da bi se utvrdila uloga autofagije u indukciji apoptotske ćelijske smrti dejstvom citarabina i idarubicina, ispitivano je kakav efekat na vijabilitet i parametre apoptoze imaju genetska i farmakološka inhibicija autofagije. U saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima obavljenim na različitim leukemijskim ćelijskim linijama (Bjorkoy i sar., 2005; Kim i sar., 2008; Grander i sar., 2009; Puissant i sar., 2010), transfekcija malom interferirajućom RNK za beclin-1, p62 i LC3 efikasno je smanjila indukciju autofagije. Ovakva supresija ranih faze autofagije, kao i blokada formiranja autofagozoma farmakološkim inhibitorom 3-metiladeninom, ali i inhibicija razgradnje proteina u autofagolizozomima bafilomicinom i hlorokinom, dovela je do značajnog povećanja ćelijske smrti indukovane citarabinom. Na ovaj način je pokazano da citarabin indukuje citoprotektivnu autofagiju u leukemijskim ćelijskim linijama (REH, HL-60) i primarnim leukemijskim ćelijama izolovanim iz pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana CML (Shema 4). Do sličnih rezultata se došlo i u drugim studijama gde je inhibicija autofagnog odgovora povećala citotoksičnost daunorubicina, flavopiridola, triciribina i inhibitora tirozin kinaze prema leukemijskim ćelijama (Bellodi i sar., 2009; Evangelisti i sar., 2011; Han i sar., 2011; Mahoney i sar., 2012). Iako je po prvi put pokazano da citarabin samostalno izaziva citoprotektivnu autofagiju u leukemijskim ćelijama, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa nalazima prethodnih studija u kojima je utvrđeno da autofagija indukovana proteinom visoke mobilnosti B1 i imatinib

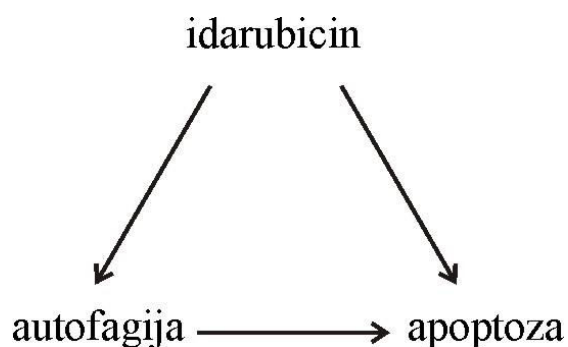
mezilatom smanjuje *in vitro* antileukemijsko dejstvo citarabina (Ohtomo i sar., 2010; Liu i sar., 2011). Mehanizam protektivnog delovanja autofagije nije do kraja objašnjen, ali postoje podaci koji pokazuju da autofagija uklanjanjem oštećenih proteina i nefunkcionalnih mitohondrija koje su proizvođači RKV, zapravo štiti ćelije (Kiffin i sar., 2006). U skladu sa takvom pretpostavkom rezultati ove disertacije pokazali su da je inhibicija autofagije u leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom značajno povećala produkciju superoksida i posledično oštećenje mitohondrija, uzrokujući aktivaciju kaspaza i apoptotsku fragmentaciju DNK molekula. Iako ovi rezultati ukazuju da autofagijom posredovana supresija oksidativnog stresa učestvuje u protekciji leukemijskih ćelija od citotoksičnog dejstva citarabina, precizan odnos između apoptoze i autofagije indukovane ovim antileukemijskim lekom tek treba da bude razjašnjen.



**Shema 4. Pretpostavljeni mehanizam interakcije autofagije i apoptoze u leukemijskim ćelijama tretiranim citarabinom.**

Sa druge strane, upotrebom farmakoloških inhibitora autofagije (vortmanina, NH<sub>4</sub>Cl, bafilomicina i hlorokina) i smanjenjem ekspresije LC3 i beklina-1 putem RNK interferencije u ovoj studiji je pokazano da autofagija doprinosi apoptotskoj smrti indukovanoj idarubicinom u leukemijskim ćelijskim linijama REH i K562 i primarnim leukemijskim ćelijama izolovanim iz krvi CML pacijenata. Iako nije u potpunosti jasno na koji način autofagija indukuje ćelijsku smrt, predloženo je da autofagna degradacija katalaze, glavnog enzimatskog „čistača“ RKV, može izazvati prekomernu akumulaciju RKV i povećanu propustljivost spoljašnje membrane mitohondrija, što za posledicu ima umiranje ćelije (Yu i sar., 2006). U skladu sa tim, inhibicija autofagije u ovoj studiji korelirala je sa smanjenjem idarubicinom stimulisano oksidativnog stresa, mitohondrijalne depolarizacije, aktivnosti kaspaza i apoptoze. Ipak, treba istaći da su

promene detektovane testom kisele fosfataze i pomoću MTT eseja, koji mere i ćelijsku proliferaciju i ćelijsku smrt, bile nešto manje izražene nego one uočene korišćenjem specifičnih testova za apoptozu. Ovo zapažanje ukazuje da bi autofagija mogla biti uključena samo u proces apoptotske smrti, ali ne i u blokadu ćelijske proliferacije ili drugih vidova ćelijske smrti koje bi mogle biti indukovane idarubicinom, na primer nekroze. Rezultati ove disertacije, koji pokazuju citotoksičnu prirodu autofagije inicirane idarubicinom, su u saglasnosti sa prethodno opisanom sposobnošću rapamicina, mTOR inhibitora i inicijatora autofagije, da stimuliše ubijanje leukemijskih ćelija dejstvom idarubicina i daunorubicina (Yang i sar., 2012; Wu i sar., 2014) (Shema 5). S druge strane, inhibicija autofagije hlorokinom ili smanjenjem ekspresije Atg5/Atg7 proteina dovodi do povećanja citotoksičnosti daunorubicina u K562 ćelijama (Han i sar., 2011). Doksorubicin je indukovao citoprotektivnu autofagiju u ćelijama multipnog mijeloma (Pan i sar., 2011), citotoksičnu autofagiju u kardiomiocitima, hepatocelularnom karcinomu i humanim ćelijama tumora dojke (Di i sar., 2009; Lu i sar., 2009; Manov i sar., 2011), dok je njegova toksičnost prema srčanim mioblastima bila povezana sa inhibicijom autofagije (Sishi i sar., 2013). S obzirom na ove podatke, izgleda da uloga različitih antraciklina u modulaciji autofagije zavisi od tipa ćelija i statusa diferencijacije, koncentracije leka i/ili eksperimentalnih uslova.



**Shema 5. Pretpostavljeni mehanizam interakcije autofagije i apoptoze u leukemijskim ćelijama tretiranim idarubicinom.**

Važno je istaći da se koncentracija citarabina korišćena u ovoj studiji (3,2  $\mu$ M), a koja ujedno izaziva i autofagiju, može postići u krvi obolelih od leukemije (Cros i sar., 2004) i da je u ovoj disertaciji pokazano da se inhibicijom autofagije izazvane citarabinom može pospešiti apoptoza leukemijskih ćelija. U saglasnosti sa činjenicom

da citarabin i idarubicin nisu indukovali autofagiju u MNPK zdravih kontrola, inhibicija ovog procesa nije uticala na njihovo preživljavanje. Međutim, treba napomenuti da bi ćelije koštane srži zdravih osoba više odgovarale zdravoj kontrolnoj grupi, ali one iz etičkih razloga nisu korišćene u našim ispitivanjima. U svakom slučaju, trebalo bi utvrditi da li citarabin indukuje protektivnu autofagiju u normalnim progenitorskim ćelijama krvi, jer bi na taj način upotreba inhibitora autofagije u hemioterapiji bila kontraproduktivna. Hlorokin, klinički odobren inhibitor autofagije koji blokira proteolizu u lizozomima (Maycotte i sar., 2012), je trenutno u fazi II kliničkih ispitivanja u svojstvu adjuvansa u tretmanima leukemija i multipnog mijeloma u kombinaciji sa ciklofosamidom, bortezomibom ili imanitibom (Trial #NCT01438177, ISCRTN No. 61568166, Trial #NCT01227135), i doze inhibitora koje su upotrebljene u ovoj studiji *in vitro* su u okviru jednog reda veličine od maksimuma koncentracija koje se može izmeriti u krvi pacijenata (Tett i sar., 1988). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju da bi se sličan pristup mogao upotrebiti u senzitivizaciji leukemijskih ćelija na dejstvo citarabina, smanjujući tako efektivnu dozu ovog leka i verovatnoću da se pojave neželjeni efekti kao što su: cerebelarna toksičnost, leukopenija, trombocitopenija, anemija i gastrointestinalni poremećaji (Stentoft, 1990). Dodatno, u svetlu moguće upotrebe mTOR kinaznih inhibitora kao adjuvantne terapije u leukemijama (Martelli i sar., 2011), čini se da bi autofagija koju oni indukuju mogla poremetiti citotoksičnost citarabina. Podaci dobijeni u ovoj studiji sugerišu da bi se njihova efikasnost u kombinaciji sa citarabinom mogla poboljšati inhibicijom pratećeg autofagnog odgovora. Ipak, ove rezultate treba uzeti sa rezervom, zbog suprotne, od konteksta zavisne uloge autofagije u regulaciji preživljavanja i smrti leukemijskih ćelija.

Sa druge strane, rezultati ove studije pokazuju da autofagija učestvuje u antitumorskom dejstvu idarubicina. Imajući u vidu da je autofagni odgovor na idarubicin bio pokrenut modulacijom mTOR, Akt i AMPK, bilo bi zanimljivo proveriti da li bi dodatna indukcija autofagije inhibicijom Akt/mTOR ili stimulacijom AMPK mogla pospešiti antitumorsko delovanje idarubicina. Pošto se dejstvo inhibitora autofagije hlorokina trenutno ispituje u lečenju hematoloških maligniteta u kombinaciji sa različitim hemioterapeuticima, rezultati ove studije upućuju na oprez prilikom razmatranja korišćenja ovog, ali i drugih inhibitora autofagije u tretmanima koji se zasnivaju na idarubicinu u lečenju različitih formi leukemija.

U zaključku ove disertacije treba još jednom istaći da je po prvi put pokazano da citarabin indukuje protektivnu, a idarubicin citotoksičnu autofagiju. Dakle antileukemijsko dejstvo citarabina moglo bi se pospešiti inhibicijom, a idarubicina stimulacijom autofagije. Imajući u vidu da se u terapiji citarabin i idarubicin dugi niz godina upotrebljavaju zajedno (Barone i sar., 2001; Karbasian-Esfahani i sar., 2004; Zhou i sar., 2016), bilo bi korisno ispitati da li se, i koja vrsta autofagije indukuje ako se ćelije istovremeno tretiraju sa oba leka, odnosno kako treba modulirati autofagiju u cilju poboljšanja efekata kombinovane hemioterapije.

## 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije, a na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Citarabin i idarubicin indukuju autofagiju u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*.
2. Citarabin indukuje Akt/mTOR zavisnu autofagiju u različitim humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*. Aktivacije AMPK i ERK kinaza takođe mogu biti uključene u indukciju autofagije u zavisnosti od tipa leukemijskih ćelija.
3. Idarubicin indukuje mTOR zavisnu autofagiju posredovanu inhibicijom Akt i aktivacijom AMPK u leukemijskim ćelijama *in vitro*.
4. Citarabin indukuje citoprotektivnu, a idarubicin citotoksičnu autofagiju u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*.



## 7. LITERATURA

1. Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B, 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32, 2-11.
2. Alikian M, Gale RP, Apperley JF, Foroni L, 2017. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomol Detect Quantif* 11, 4-20.
3. Alnaim L, 2007. Idarubicin: An Anthracycline For Acute Myelogenous Leukemia  
*The Internet Journal of Oncology* 5.
4. Anasetti C, Hansen JA, 1992. Marrow transplantation in cancer therapy. *Tohoku J Exp Med* 168, 333-343.
5. Appelbaum FR, Rosenblum D, Arceci RJ, Carroll WL, Breitfeld PP, Forman SJ, Larson RA, Lee SJ, Murphy SB, O'Brien S, Radich J, Scher NS, Smith FO, Stone RM, Tallman MS, 2007. End points to establish the efficacy of new agents in the treatment of acute leukemia. *Blood* 109, 1810-1816.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW, 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.
7. Arcamone F, Bernardi L, Giardino P, Patelli B, Marco A, Casazza AM, Pratesi G, Reggiani P, 1976. Synthesis and antitumor activity of 4-demethoxydaunorubicin, 4-demethoxy-7,9-diepidaunorubicin, and their beta anomers. *Cancer Treat Rep* 60, 829-834.
8. Arcaro A, Wymann MP, 1993. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296 ( Pt 2), 297-301.
9. Arsikin K, Kravic-Stevovic T, Jovanovic M, Ristic B, Tovilovic G, Zogovic N, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L, 2012. Autophagy-dependent and -

independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1826-1836.

10. Banerji V, Gibson SB, 2012. Targeting metabolism and autophagy in the context of haematologic malignancies. *Int J Cell Biol* 2012, 595976.
11. Barbarroja N, Torres LA, Luque MJ, Carretero RM, Valverde-Esteba A, Lopez-Sanchez LM, Rodriguez-Ariza A, Velasco F, Torres A, Lopez-Pedraza C, 2009. Additive effect of PTK787/ZK 222584, a potent inhibitor of VEGFR phosphorylation, with Idarubicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 37, 679-691.
12. Barone S, Baer MR, Sait SN, Lawrence D, Block AW, Wetzler M, 2001. High-dose cytosine arabinoside and idarubicin treatment of chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am J Hematol* 67, 119-124.
13. Barth S, Glick D, Macleod KF, 2010. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 221, 117-124.
14. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Van Etten RA, Donato N, Hunter A, Dinsdale D, Tirro E, Vigneri P, Nicotera P, Dyer MJ, Holyoake T, Salomoni P, Calabretta B, 2009. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest* 119, 1109-1123.
15. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T, 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171, 603-614.
16. Blasiak J, Gloc E, Warszawski M, 2002. A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol* 49, 145-155.
17. Bouchlaka MN, Redelman D, Murphy WJ, 2010. Immunotherapy following hematopoietic stem cell transplantation: potential for synergistic effects. *Immunotherapy* 2, 399-418.
18. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

19. Brady NR, Hamacher-Brady A, Westerhoff HV, Gottlieb RA, 2006. A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 8, 1651-1665.
20. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM, 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.
21. Brogгинi M, Sommacampagna B, Paolini A, Dolfini E, Donelli MG, 1986. Comparative metabolism of daunorubicin and 4-demethoxydaunorubicin in mice and rabbits. *Cancer Treat Rep* 70, 697-702.
22. Brown M, Wittwer C, 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 46, 1221-1229.
23. Brum G, Carbone T, Still E, Correia V, Szulak K, Calianese D, Best C, Cammarata G, Higgins K, Ji F, Di W, Wan Y, 2013. N-acetylcysteine potentiates doxorubicin-induced ATM and p53 activation in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 42, 211-218.
24. Buckley MM, Lamb HM, 1997. Oral idarubicin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of haematological malignancies and advanced breast cancer. *Drugs Aging* 11, 61-86.
25. Burk M, Heyll A, Arning M, Volmer M, Fartash K, Schneider W, 1997. Pharmacokinetics of high-dose cytarabine and its deamination product--a reappraisal. *Leuk Lymphoma* 27, 321-327.
26. Cai J, Damaraju VL, Groulx N, Mowles D, Peng Y, Robins MJ, Cass CE, Gros P, 2008. Two distinct molecular mechanisms underlying cytarabine resistance in human leukemic cells. *Cancer Res* 68, 2349-2357.
27. Carella AM, Berman E, Maraone MP, Ganzina F, 1990. Idarubicin in the treatment of acute leukemias. An overview of preclinical and clinical studies. *Haematologica* 75, 159-169.
28. Chao MW, Lai MJ, Liou JP, Chang YL, Wang JC, Pan SL, Teng CM, 2015. The synergic effect of vincristine and vorinostat in leukemia in vitro and in vivo. *J Hematol Oncol* 8, 82.

29. Chen K, Xu X, Kobayashi S, Timm D, Jepperson T, Liang Q, 2011. Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose antagonizes doxorubicin-induced cardiomyocyte death by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 286, 21993-22006.
30. Chen Y, Azad MB, Gibson SB, 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16, 1040-1052.
31. Chien AJ, Moasser MM, 2008. Cellular mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes in cancer: intrinsic and acquired. *Semin Oncol* 35, S1-S14; quiz S39.
32. Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, Xu J, Abeysundara N, Leung A, Go NE, DeVorkin L, Weppler SA, Gelmon K, Yapp DT, Bally MB, Gorski SM, 2014. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 20, 3159-3173.
33. Choi C, Benveniste EN, 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* 44, 65-81.
34. Cicchini M, Karantza V, Xia B, 2015. Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context. *Clin Cancer Res* 21, 498-504.
35. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF, 2001. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3, 339-345.
36. Coleman WB, 2015. Genomic Catastrophe and Neoplastic Transformation. *Am J Pathol* 185, 1846-1849.
37. Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J, 1986. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem* 152, 136-140.
38. Cortes-Funes H, Coronado C, 2007. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol* 7, 56-60.
39. Cros E, Jordheim L, Dumontet C, Galmarini CM, 2004. Problems related to resistance to cytarabine in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 45, 1123-1132.
40. Cuervo AM, Wong E, 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24, 92-104.

41. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M, 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 41, 431-444.
42. de Vries JF, Falkenburg JH, Willemze R, Barge RM, 2006. The mechanisms of Ara-C-induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 91, 912-919.
43. Delbridge AR, Strasser A, 2015. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 22, 1071-1080.
44. Den Boer ML, Pieters R, Veerman AJ, 1998. Mechanisms of cellular anthracycline resistance in childhood acute leukemia. *Leukemia* 12, 1657-1670.
45. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM, 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 29, 309-316.
46. Desagher S, Martinou JC, 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
47. Di X, Shiu RP, Newsham IF, Gewirtz DA, 2009. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. *Biochem Pharmacol* 77, 1139-1150.
48. Durrieu F, Belaud-Rotureau MA, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P, Belloc F, 1999. Synthesis of Bcl-2 in response to anthracycline treatment may contribute to an apoptosis-resistant phenotype in leukemic cell lines. *Cytometry* 36, 140-149.
49. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH, 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
50. Ekiz HA, Can G, Baran Y, 2012. Role of autophagy in the progression and suppression of leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol* 81, 275-285.
51. Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
52. Evangelisti C, Ricci F, Tazzari P, Chiarini F, Battistelli M, Falcieri E, Ognibene A, Pagliaro P, Cocco L, McCubrey JA, Martelli AM, 2011. Preclinical testing of the

- Akt inhibitor triciribine in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol* 226, 822-831.
53. Fan N, Zhang L, Xu X, Chen B, Zhu C, Li P, Chen Z, Ding T, Ma Y, Yuan Y, Lin Z, 2017. Methotrexate plus idarubicin improves outcome of patients with primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*.
54. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ, 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24, 24-41.
55. Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ, 2015. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 25, 354-363.
56. Fidler IJ, 1978. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 38, 2651-2660.
57. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A, 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179, 485-500.
58. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F, 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22, 377-388.
59. Fimia GM, Piacentini M, 2010. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 67, 1581-1588.
60. Florio S, Crispino L, Ciarcia R, Vacca G, Pagnini U, de Matteis A, Pacilio C, D'Andrilli G, Kumar C, Giordano A, 2003. MPA increases idarubicin-induced apoptosis in chronic lymphatic leukaemia cells via caspase-3. *J Cell Biochem* 89, 747-754.
61. Fuentes-Prior P, Salvesen GS, 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.
62. Fukushima T, Ueda T, Uchida M, Nakamura T, 1993. Action mechanism of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) as compared with daunorubicin in leukemic cells. *Int J Hematol* 57, 121-130.
63. Funato T, Harigae H, Abe S, Sasaki T, 2004. Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Mol Diagn* 4, 705-713.

64. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G, 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14, 1237-1243.
65. Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks PA, Jiang X, 2012. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6561-6565.
66. Gandhi V, Estey E, Keating MJ, Plunkett W, 1993. Fludarabine potentiates metabolism of cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia during therapy. *J Clin Oncol* 11, 116-124.
67. Gati WP, Paterson AR, Larratt LM, Turner AR, Belch AR, 1997. Sensitivity of acute leukemia cells to cytarabine is a correlate of cellular es nucleoside transporter site content measured by flow cytometry with SAENTA-fluorescein. *Blood* 90, 346-353.
68. Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL, Morris EJ, Grandison L, 2001. Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem* 78, 265-275.
69. Glick D, Barth S, Macleod KF, 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3-12.
70. Gozuacik D, Kimchi A, 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891-2906.
71. Grander D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T, 2009. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy* 5, 1198-1200.
72. Grant S, 1998. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res* 72, 197-233.
73. Green DR, Reed JC, 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
74. Grimaldi C, Chiarini F, Tabellini G, Ricci F, Tazzari PL, Battistelli M, Falcieri E, Bortul R, Melchionda F, Iacobucci I, Pagliaro P, Martinelli G, Pession A, Barata JT, McCubrey JA, Martelli AM, 2012. AMP-dependent kinase/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: therapeutic implications. *Leukemia* 26, 91-100.

75. Guo B, Tam A, Santi SA, Parissenti AM, 2016. Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells. *BMC Cancer* 16, 762.
76. Hamerschlak N, 2008. Leukemia: genetics and prognostic factors. *J Pediatr (Rio J)* 84, S52-57.
77. Han W, Sun J, Feng L, Wang K, Li D, Pan Q, Chen Y, Jin W, Wang X, Pan H, Jin H, 2011. Autophagy inhibition enhances daunorubicin-induced apoptosis in K562 cells. *PLoS One* 6, e28491.
78. Han Y, Ye A, Zhang Y, Cai Z, Wang W, Sun L, Jiang S, Wu J, Yu K, Zhang S, 2015. Musashi-2 Silencing Exerts Potent Activity against Acute Myeloid Leukemia and Enhances Chemosensitivity to Daunorubicin. *PLoS One* 10, e0136484.
79. Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
80. Hannun YA, 1997. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 89, 1845-1853.
81. Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V, 2009. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J Cell Mol Med* 13, 3644-3654.
82. Harhaji L, Vuckovic O, Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V, 2004. Iron down-regulates macrophage anti-tumour activity by blocking nitric oxide production. *Clin Exp Immunol* 137, 109-116.
83. Harrison JS, Wang X, Studzinski GP, 2016. The role of VDR and BIM in potentiation of cytarabine-induced cell death in human AML blasts. *Oncotarget* 7, 36447-36460.
84. He C, Klionsky DJ, 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
85. He W, Ye X, Huang X, Lei W, You L, Wang L, Chen X, Qian W, 2016. Hsp90 inhibitor, BIIB021, induces apoptosis and autophagy by regulating mTOR-Ulk1 pathway in imatinib-sensitive and -resistant chronic myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 48, 1710-1720.



86. Heasman SA, Zaitseva L, Bowles KM, Rushworth SA, Macewan DJ, 2011. Protection of acute myeloid leukaemia cells from apoptosis induced by front-line chemotherapeutics is mediated by haem oxygenase-1. *Oncotarget* 2, 658-668.
87. Henkes M, van der Kuip H, Aulitzky WE, 2008. Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevec trade mark). *Ther Clin Risk Manag* 4, 163-187.
88. Hewish M, Martin SA, Elliott R, Cunningham D, Lord CJ, Ashworth A, 2013. Cytosine-based nucleoside analogs are selectively lethal to DNA mismatch repair-deficient tumour cells by enhancing levels of intracellular oxidative stress. *Br J Cancer* 108, 983-992.
89. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A, 2006. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 66, 9349-9351.
90. Hollingshead LM, Faulds D, 1991. Idarubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* 42, 690-719.
91. Hotchkiss R, Strasser A, McDunn J, Swanson P, 2009. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *The New England journal of medicine* 361, 1570-1583.
92. Huang Y, Hou JK, Chen TT, Zhao XY, Yan ZW, Zhang J, Yang J, Kogan SC, Chen GQ, 2011. PML-RARalpha enhances constitutive autophagic activity through inhibiting the Akt/mTOR pathway. *Autophagy* 7, 1132-1144.
93. Hubeek I, Peters GJ, Broekhuizen AJ, Sargent J, Gibson BE, Creutzig U, Kaspers GJ, 2005. Potentiation of in vitro ara-C cytotoxicity by ribonucleotide reductase inhibitors, cyclin-dependent kinase modulators and the DNA repair inhibitor aphidicolin in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 131, 219-222.
94. Hurley JH, Young LN, 2017. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem*.
95. Ishdorj G, Li L, Gibson SB, 2012. Regulation of autophagy in hematological malignancies: role of reactive oxygen species. *Leuk Lymphoma* 53, 26-33.
96. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Los M, 2013.

Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* 17, 12-29.

97. Jin S, White E, 2007. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3, 28-31.
98. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH, 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584, 1287-1295.
99. Kaludjerovic GN, Miljkovic D, Momcilovic M, Djinovic VM, Mostarica Stojkovic M, Sabo TJ, Trajkovic V, 2005. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer* 116, 479-486.
100. Kannan K, Jain SK, 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153-163.
101. Kanno S, Hiura T, Shouji A, Osanai Y, Ujibe M, Ishikawa M, 2007. Resistance to Ara-C up-regulates the activation of NF-kappaB, telomerase activity and Fas expression in NALM-6 cells. *Biol Pharm Bull* 30, 2069-2074.
102. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Cortes J, Giles FJ, Beran M, Pierce S, Huh Y, Andreeff M, Koller C, Ha CS, Keating MJ, Murphy S, Freireich EJ, 2000. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 18, 547-561.
103. Karbasian-Esfahani M, Wiernik PH, Novik Y, Paietta E, Dutcher JP, 2004. Idarubicin and standard-dose cytosine arabinoside in adults with recurrent and refractory acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 101, 1414-1419.
104. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M, 2015. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J* 282, 4672-4678.
105. Kaushal V, Kaushal GP, Mehta P, 2004. Differential toxicity of anthracyclines on cultured endothelial cells. *Endothelium* 11, 253-258.
106. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV, 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
107. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
108. Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC, 2000. Mechanisms of resistance to apoptosis in human AML blasts: the role of differentiation-induced perturbations of cell-cycle checkpoints. *Leukemia* 14, 620-628.

109. Kharfan-Dabaja MA, Abou Mourad YR, Fernandez HF, Pasquini MC, Santos ES, 2007. Hematopoietic cell transplantation in acute promyelocytic leukemia: a comprehensive review. *Biol Blood Marrow Transplant* 13, 997-1004.
110. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM, 2006. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 8, 152-162.
111. Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, Bhalla K, 1997. Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 57, 3115-3120.
112. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J, 2008. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20567-20574.
113. Kim W, Bahr B, Soh K, Bearss J, Y. L, P. P, Whatcott C, A. S-J, Weitman S, Bearss D, Warner S, 2015. Alvocidib Potentiates the Activity of Cytarabine and Mitoxantrone through the Targeting of MCL-1 When Administered in a Time Sequential Regimen in AML. *Blood* 126, 3799.
114. Kimball SR, Shantz LM, Horetsky RL, Jefferson LS, 1999. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem* 274, 11647-11652.
115. Klionsky DJ, Emr SD, 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
116. Kobayashi T, Ruan S, Jabbur JR, Consoli U, Clodi K, Shiku H, Owen-Schaub LB, Andreeff M, Reed JC, Zhang W, 1998. Differential p53 phosphorylation and activation of apoptosis-promoting genes Bax and Fas/APO-1 by irradiation and ara-C treatment. *Cell Death Differ* 5, 584-591.
117. Koleini N, Kardami E, 2017. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*.
118. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z,

- Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, 2007. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.
119. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S, 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5, 726-734.
120. Konopleva M, Tari AM, Estrov Z, Harris D, Xie Z, Zhao S, Lopez-Berestein G, Andreeff M, 2000. Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood* 95, 3929-3938.
121. Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY, 1992. The specificity of chloroquine. *Parasitol Today* 8, 183-184.
122. Kruidering M, Evan GI, 2000. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life* 50, 85-90.
123. Kumar S, 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14, 32-43.
124. Lamba JK, 2009. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 10, 1657-1674.
125. Lee ER, Kim JY, Kang YJ, Ahn JY, Kim JH, Kim BW, Choi HY, Jeong MY, Cho SG, 2006. Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1763, 958-968.
126. Lee J, Giordano S, Zhang J, 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 441, 523-540.
127. Lee SH, Meng XW, Flatten KS, Loegering DA, Kaufmann SH, 2013. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ* 20, 64-76.
128. Li J, Liu Y, Wang Z, Liu K, Wang Y, Liu J, Ding H, Yuan Z, 2011. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol* 85, 6319-6333.
129. Li K, Hu C, Mei C, Ren Z, Vera JC, Zhuang Z, Jin J, Tong H, 2014. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. *J Transl Med* 12, 167.

130. Li L, Ishdorj G, Gibson SB, 2012. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med* 53, 1399-1410.
131. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP, 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278, 8516-8525.
132. Li P, Diab S, Yu M, Adams J, Islam S, Basnet SK, Albrecht H, Milne R, Wang S, 2016. Inhibition of Mnk enhances apoptotic activity of cytarabine in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 7, 56811-56825.
133. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X, 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
134. Li X, Yan X, Guo W, Huang X, Huang J, Yu M, Ma Z, Xu Y, Huang S, Li C, Zhou Y, Jin J, 2017. Chidamide in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia and the synergistic effect in combination with cytarabine. *Biomed Pharmacother* 90, 699-704.
135. Limonta M, Biondi A, Giudici G, Specchia G, Catapano C, Masera G, Barbui T, D'Incalci M, 1990. Cytotoxicity and DNA damage caused by 4-demethoxydaunorubicin and its metabolite 4-demethoxy-13-hydroxydaunorubicin in human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 26, 340-342.
136. Lin L, Baehrecke EH, 2015. Autophagy, cell death, and cancer. *Mol Cell Oncol* 2, e985913.
137. Lin X, Li S, Zhao Y, Ma X, Zhang K, He X, Wang Z, 2013. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA Cell Biol* 32, 220-227.
138. Lind MJ, 2011. Principles of cytotoxic chemotherapy *Medicine* 39, 711-716.
139. Liu FT, Kelsey SM, Newland AC, Jia L, 2001. Generation of reactive oxygen species is not involved in idarubicin-induced apoptosis in human leukaemic cells. *Br J Haematol* 115, 817-825.
140. Liu L, Yang M, Kang R, Wang Z, Zhao Y, Yu Y, Xie M, Yin X, Livesey KM, Lotze MT, Tang D, Cao L, 2011. HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells. *Leukemia* 25, 23-31.

141. Liu Y, Chen F, Wang S, Guo X, Shi P, Wang W, Xu B, 2013. Low-dose triptolide in combination with idarubicin induces apoptosis in AML leukemic stem-like KG1a cell line by modulation of the intrinsic and extrinsic factors. *Cell Death Dis* 4, e948.
142. Lotfi K, Zackrisson AL, Peterson C, 2002. Comparison of idarubicin and daunorubicin regarding intracellular uptake, induction of apoptosis, and resistance. *Cancer Lett* 178, 141-149.
143. Lu L, Wu W, Yan J, Li X, Yu H, Yu X, 2009. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol* 134, 82-90.
144. Ma J, Li X, Su Y, Zhao J, Luedtke DA, Epshteyn V, Edwards H, Wang G, Wang Z, Chu R, Taub JW, Lin H, Wang Y, Ge Y, 2017. Mechanisms responsible for the synergistic antileukemic interactions between ATR inhibition and cytarabine in acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep* 7, 41950.
145. Ma P, Dong X, Swadley CL, Gupte A, Leggas M, Ledebur HC, Mumper RJ, 2009. Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia. *J Biomed Nanotechnol* 5, 151-161.
146. Mahoney E, Lucas DM, Gupta SV, Wagner AJ, Herman SE, Smith LL, Yeh YY, Andritsos L, Jones JA, Flynn JM, Blum KA, Zhang X, Lehman A, Kong H, Gurcan M, Grever MR, Johnson AJ, Byrd JC, 2012. ER stress and autophagy: new discoveries in the mechanism of action and drug resistance of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Blood* 120, 1262-1273.
147. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G, 2010. Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol* 22, 181-185.
148. Malik P, Cashen AF, 2014. Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Cancer Manag Res* 6, 53-61.
149. Manov I, Pollak Y, Broneshter R, Iancu TC, 2011. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib--the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS J* 278, 3494-3507.
150. Mantadakis E, Cole PD, Kamen BA, 2005. High-dose methotrexate in acute lymphoblastic leukemia: where is the evidence for its continued use? *Pharmacotherapy* 25, 748-755.

151. Marino G, Kroemer G, 2013. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res* 23, 1247-1248.
152. Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Ognibene A, Bressanin D, Billi AM, Manzoli L, Cappellini A, McCubrey JA, 2012. Targeting the liver kinase B1/AMP-activated protein kinase pathway as a therapeutic strategy for hematological malignancies. *Expert Opin Ther Targets* 16, 729-742.
153. Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, Abrams SL, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo V, Ruvolo P, Kempf CR, Steelman LS, McCubrey JA, 2011. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia* 25, 1064-1079.
154. Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A, 2012. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* 8, 200-212.
155. McClanahan F, Gribben J, 2014. Transplantation in chronic lymphocytic leukemia: does it still matter in the era of novel targeted therapies? *Hematol Oncol Clin North Am* 28, 1055-1071.
156. Mehrpour M, Botti J, Codogno P, 2012. Mechanisms and regulation of autophagy in mammalian cells  
*Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 16.
157. Mesner PW, Jr., Budihardjo, II, Kaufmann SH, 1997. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 41, 461-499.
158. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L, 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-229.
159. Misirlic Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovich U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, Dulovic M, Zogovic N, Isakovic AM, Grguric-Sipka S, Bumbasirevic V, Sabo T, Trajkovic V, Markovic I, 2012. Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol* 25, 931-939.
160. Mizushima N, 2005. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1535-1541.

161. Mizushima N, Yoshimori T, 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.
162. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B, 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326.
163. Moorman AV, 2016. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 101, 407-416.
164. Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
165. Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I, Kyurkchiev S, 2005. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis* 10, 209-217.
166. Munshi PN, Lubin M, Bertino JR, 2014. 6-thioguanine: a drug with unrealized potential for cancer therapy. *Oncologist* 19, 760-765.
167. Nadova S, Miadokova E, Cipak L, 2007. Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis. *Neoplasma* 54, 202-206.
168. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H, 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-116.
169. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C, 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.
170. Notte A, Leclere L, Michiels C, 2011. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol* 82, 427-434.
171. Novotny L, Rauko P, 2009. Cytarabine conjugates with biologically active molecules and their potential anticancer activity. *Neoplasma* 56, 177-186.
172. Ohba Y, Ohba T, Sumitani K, Tagami-Kondoh K, Hiura K, Miki Y, Kakegawa H, Takano-Yamamoto T, Katunuma N, 1996. Inhibitory mechanisms of H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 and carbonic anhydrase II inhibitor acetazolamide on experimental bone resorption. *FEBS Lett* 387, 175-178.
173. Ohkuma S, Poole B, 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3327-3331.



174. Ohtomo T, Miyazawa K, Naito M, Moriya S, Kuroda M, Itoh M, Tomoda A, 2010. Cytoprotective effect of imatinib mesylate in non-BCR-ABL-expressing cells along with autophagosome formation. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 310-315.
175. Pan Y, Gao Y, Chen L, Gao G, Dong H, Yang Y, Dong B, Chen X, 2011. Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 3248-3258.
176. Park JH, Choi SH, Kim H, Ji ST, Jang WB, Kim JH, Baek SH, Kwon SM, 2016. Doxorubicin Regulates Autophagy Signals via Accumulation of Cytosolic Ca<sup>2+</sup> in Human Cardiac Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* 17.
177. Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, Green A, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D, 2010. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 95, 819-828.
178. Parker WB, 2009. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev* 109, 2880-2893.
179. Patingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P, 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 90, 313-323.
180. Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z, 2009. Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology *AJP-Renal Physiol* 297, F244-F256.
181. Pigneux A, Perreau V, Jourdan E, Vey N, Dastugue N, Huguet F, Sotto JJ, Salmi LR, Ifrah N, Reiffers J, 2007. Adding lomustine to idarubicin and cytarabine for induction chemotherapy in older patients with acute myeloid leukemia: the BGMT 95 trial results. *Haematologica* 92, 1327-1334.
182. Pucci B, Kasten M, Giordano A, 2000. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2, 291-299.
183. Puissant A, Robert G, Auberger P, 2010. Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies. *Cell Cycle* 9, 3470-3478.
184. Qi SN, Yoshida A, Ueda T, 2003. Activation of caspases-3/7 is dispensable for idarubicin-induced apoptotic DNA fragmentation in human leukemia cells. *Int J Oncol* 22, 1123-1128.
185. Qu X, Zhang Y, Li Y, Hu X, Xu Y, Xu L, Hou K, Sada K, Liu Y, 2009. Ubiquitin ligase Cbl-b sensitizes leukemia and gastric cancer cells to anthracyclines by

activating the mitochondrial pathway and modulating Akt and ERK survival signals. *FEBS Lett* 583, 2255-2262.

186. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA, 2000. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343, 1750-1757.

187. Ray S, Bullock G, Nunez G, Tang C, Ibrado AM, Huang Y, Bhalla K, 1996. Enforced expression of Bcl-XS induces differentiation and sensitizes chronic myelogenous leukemia-blast crisis K562 cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-mediated differentiation and apoptosis. *Cell Growth Differ* 7, 1617-1623.

188. Renehan AG, Booth C, Potten CS, 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322, 1536-1538.

189. Riccardi C, Nicoletti I, 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461.

190. Robert J, 1993. Clinical pharmacokinetics of idarubicin. *Clin Pharmacokinet* 24, 275-288.

191. Roberts WK, Dekker CA, 1967. A convenient synthesis of arabinosylcytosine (cytosine arabinoside). *J Org Chem* 32, 816-817.

192. Rowe JM, 1998. What is the best induction regimen for acute myelogenous leukemia? *Leukemia* 12 Suppl 1, S16-19.

193. Roy B, Pattanaik AK, Das J, Bhutia SK, Behera B, Singh P, Maiti TK, 2014. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. *Chem Biol Interact* 210, 96-102.

194. Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, Klionsky DJ, 2009. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 5, 585-589.

195. Rysavy NM, Shimoda LM, Dixon AM, Speck M, Stokes AJ, Turner H, Umemoto EY, 2014. Beyond apoptosis: the mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. *Bioarchitecture* 4, 127-137.

196. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P, 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.

197. Salvesen GS, Renatus M, 2002. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2, 256-257.
198. Sarkar S, 2013. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans* 41, 1103-1130.
199. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R, 2008. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 15, 1318-1329.
200. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J, 2014. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol* 36, 503-517.
201. Seglen PO, Munthe-Kaas AC, Dybedal MA, 1984. Amino acid control of protein degradation in normal and leukemic human lymphocytes. *Exp Cell Res* 155, 121-128.
202. Seguin SJ, Morelli FF, Vinet J, Amore D, De Biasi S, Poletti A, Rubinsztein DC, Carra S, 2014. Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly. *Cell Death Differ* 21, 1838-1851.
203. Seth R, Singh A, 2015. Leukemias in Children. *Indian J Pediatr* 82, 817-824.
204. Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz DA, 2014. Cytotoxic autophagy in cancer therapy. *Int J Mol Sci* 15, 10034-10051.
205. Shepshelovich D, Edel Y, Goldvaser H, Dujovny T, Wolach O, Raanani P, 2015. Pharmacodynamics of cytarabine induced leucopenia: a retrospective cohort study. *Br J Clin Pharmacol* 79, 685-691.
206. Shi J, Shi Y, Waehrens LN, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE, 2006. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytometry A* 69, 1193-1201.
207. Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, Loos B, Jonassen AK, van Rooyen J, Engelbrecht AM, 2012. Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Exp Biol Med (Maywood)* 237, 219-226.
208. Sishi BJ, Loos B, van Rooyen J, Engelbrecht AM, 2013. Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol* 85, 124-134.

209. Sjostrom J, Bergh J, 2001. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ* 322, 1538-1539.
210. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E, 2011. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 105, 1684-1692.
211. Smolewski P, Grabarek J, Phelps DJ, Darzynkiewicz Z, 2001. Stathmo-apoptosis: arresting apoptosis by fluorochrome-labeled inhibitor of caspases. *Int J Oncol* 19, 657-663.
212. Stentoft J, 1990. The toxicity of cytarabine. *Drug Saf* 5, 7-27.
213. Studzian K, Wasowska M, Piestrzeniewicz MK, Wilmanska D, Szmigiero L, Oszczapowicz I, Gniazdowski M, 2001. Inhibition of RNA synthesis in vitro and cell growth by anthracycline antibiotics. *Neoplasma* 48, 412-418.
214. Sun L, Liu N, Liu SS, Xia WY, Liu MY, Li LF, Gao JX, 2015. Beclin-1-independent autophagy mediates programmed cancer cell death through interplays with endoplasmic reticulum and/or mitochondria in colbat chloride-induced hypoxia. *Am J Cancer Res* 5, 2626-2642.
215. Sun R, Luo Y, Li J, Wang Q, Li J, Chen X, Guan K, Yu Z, 2015. Ammonium chloride inhibits autophagy of hepatocellular carcinoma cells through SMAD2 signaling. *Tumour Biol* 36, 1173-1177.
216. Sun T, Li D, Wang L, Xia L, Ma J, Guan Z, Feng G, Zhu X, 2011. c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. *J Transl Med* 9, 161.
217. Sun WL, Chen J, Wang YP, Zheng H, 2011. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy* 7, 1035-1044.
218. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES, 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375-2390.
219. Swift L, McHowat J, Sarvazyan N, 2003. Inhibition of membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 as a potential culprit of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Res* 63, 5992-5998.

220. Switalska M, Nasulewicz-Goldeman A, Opolska A, Maciejewska M, Kutner A, Wietrzyk J, 2012. The in-vitro antiproliferative effect of PRI-2191 and imatinib applied in combined treatment with cisplatin, idarubicin, or docetaxel on human leukemia cells. *Anticancer Drugs* 23, 70-80.
221. Tabarestani S, Movafagh A, 2016. New Developments in Chronic Myeloid Leukemia: Implications for Therapy. *Iran J Cancer Prev* 9, e3961.
222. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y, 2011. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol* 85, 13185-13194.
223. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM, 2005. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 1154-1163.
224. Tan CT, Hancock C, Steinherz P, Bacha DM, Steinherz L, Luks E, Winick N, Meyers P, Mondora A, Dantis E, et al., 1987. Phase I and clinical pharmacological study of 4-demethoxydaunorubicin (idarubicin) in children with advanced cancer. *Cancer Res* 47, 2990-2995.
225. Tanida I, 2011. Autophagy basics. *Microbiol Immunol* 55, 1-11.
226. Tett SE, Cutler DJ, Day RO, Brown KF, 1988. A dose-ranging study of the pharmacokinetics of hydroxy-chloroquine following intravenous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 26, 303-313.
227. Uchakina ON, Ban H, Hostetler BJ, McKallip RJ, 2016. Inhibition of hyaluronic acid formation sensitizes chronic myelogenous leukemia to treatment with doxorubicin. *Glycobiology* 26, 1171-1179.
228. Udelnow A, Kreyes A, Ellinger S, Landfester K, Walther P, Klapperstueck T, Wohlrab J, Henne-Bruns D, Knippschild U, Wurl P, 2011. Omeprazole inhibits proliferation and modulates autophagy in pancreatic cancer cells. *PLoS One* 6, e20143.
229. Vander Heide SR, L'Ecuyer JT, 2007. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity *Heart Metab.* 35, 1-4.
230. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD, 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.

231. Vempati UD, Diaz F, Barrientos A, Narisawa S, Mian AM, Millan JL, Boise LH, Moraes CT, 2007. Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* 27, 1771-1783.
232. Vial JP, Tabrizi R, Pigneux A, Lacombe F, Praloran V, Belloc F, 2006. Remission induction chemotherapy induces in vivo caspase-dependent apoptosis in bone marrow acute myeloid leukemia blast cells and spares lymphocytes. *Cytometry B Clin Cytom* 70, 115-123.
233. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G, 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 54, 92-99.
234. Vucicevic L, Misirkic-Marjanovic M, Paunovic V, Kravic-Stevovic T, Martinovic T, Ciric D, Maric N, Petricevic S, Harhaji-Trajkovic L, Bumbasirevic V, Trajkovic V, 2014. Autophagy inhibition uncovers the neurotoxic action of the antipsychotic drug olanzapine. *Autophagy* 10, 2362-2378.
235. Walwick R, Roberts W, Dekker C, 1959. Cyclization during phosphorylation of uridine and cytidine. *Proc. Chem. Soc.* 84.
236. Wang C, Youle RJ, 2009. The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annu Rev Genet* 43, 95-118.
237. Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D, Denmark T, 2009. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 284, 21412-21424.
238. Weiss RB, 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19, 670-686.
239. Wen Y, Gorsic LK, Wheeler HE, Ziliak DM, Huang RS, Dolan ME, 2011. Chemotherapeutic-induced apoptosis: a phenotype for pharmacogenomics studies. *Pharmacogenet Genomics* 21, 476-488.
240. West AP, Shadel GS, Ghosh S, 2011. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 11, 389-402.

241. White JC, Rathmell JP, Capizzi RL, 1987. Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J Clin Invest* 79, 380-387.
242. Widlak P, Garrard WT, 2009. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* 66, 263-274.
243. Wiernik PH, Banks PL, Case DC, Jr., Arlin ZA, Periman PO, Todd MB, Ritch PS, Enck RE, Weitberg AB, 1992. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 79, 313-319.
244. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, Durkacz BW, 2004. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 103, 4659-4665.
245. Winston DJ, Gale RP, Meyer DV, Young LS, 1979. Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)* 58, 1-31.
246. Wu KN, Zhao YM, He Y, Wang BS, Du KL, Fu S, Hu KM, Zhang LF, Liu LZ, Hu YX, Wang YJ, Huang H, 2014. Rapamycin interacts synergistically with idarubicin to induce T-leukemia cell apoptosis in vitro and in a mesenchymal stem cell simulated drug-resistant microenvironment via Akt/mammalian target of rapamycin and extracellular signal-related kinase signaling pathways. *Leuk Lymphoma* 55, 668-676.
247. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM, 2010. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 285, 10850-10861.
248. Wyllie AH, 1993. Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 67, 205-208.
249. Xie C, Edwards H, Xu X, Zhou H, Buck SA, Stout ML, Yu Q, Rubnitz JE, Matherly LH, Taub JW, Ge Y, 2010. Mechanisms of synergistic antileukemic interactions between valproic acid and cytarabine in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 16, 5499-5510.

250. Xu L, Qu XJ, Liu YP, Xu YY, Liu J, Hou KZ, Zhang Y, 2011. Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Cancer* 30, 490-496.
251. Xu Y, Cao C, Gong X, Rong L, 2015. Inhibition of ERK5 enhances cytarabine-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Int J Clin Exp Med* 8, 6446-6455.
252. Yang TT, Sinai P, Kain SR, 1996. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal Biochem* 241, 103-108.
253. Yang X, Lin J, Gong Y, Ma H, Shuai X, Zhou R, Guo Y, Shan Q, He G, 2012. Antileukaemia effect of rapamycin alone or in combination with daunorubicin on Ph+ acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Hematol Oncol* 30, 123-130.
254. Yang Z, Klionsky DJ, 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131.
255. Ye LH, Li WJ, Jiang XQ, Chen YL, Tao SX, Qian WL, He JS, 2012. Study on the autophagy of prostate cancer PC-3 cells induced by oridonin. *Anat Rec (Hoboken)* 295, 417-422.
256. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ, 2016. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell* 3, 588-596.
257. Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL, 2009. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol* 452, 143-164.
258. Youle RJ, Strasser A, 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
259. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M, 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4952-4957.
260. Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA, 2006. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* 119, 259-270.
261. Zhang JH, Xu M, 2000. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 10, 205-211.
262. Zhou L, Liu X, Liu H, Zhu W, Cai X, Song K, Zheng C, Tang B, Sun Z, 2016. A comparative study of idarubicin 12 mg/m<sup>2</sup> and 8 mg/m<sup>2</sup> combined with cytarabine as the first induction regimen for adult acute myeloid leukemia patients. *Onco Targets Ther* 9, 985-991.



263. Zhu L, Guo D, Sun L, Huang Z, Zhang X, Ma W, Wu J, Xiao L, Zhao Y, Gu N, 2017. Activation of autophagy by elevated reactive oxygen species rather than released silver ions promotes cytotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in hematopoietic cells. *Nanoscale* 9, 5489-5498.
264. Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, Caldwell RL, Shou W, Field LJ, 2009. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation* 119, 99-106.
265. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM, 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21-35.
266. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X, 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
267. Zwellung LA, Bales E, Altschuler E, Mayes J, 1993. Circumvention of resistance by doxorubicin, but not by idarubicin, in a human leukemia cell line containing an intercalator-resistant form of topoisomerase II: evidence for a non-topoisomerase II-mediated mechanism of doxorubicin cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 45, 516-520.

## Spisak skraćenica

- **Akt** – protein kinaza B (engl. *protein kinase B, PKB*)
- **ALL** – akutna limfocitna leukemija (engl. *acute lymphocytic leukemia*)
- **AMBRA1** – aktivirajući molekul u beclin-1 regulisanoj autofagiji 1 (engl. *activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy 1*)
- **AML** – akutna mijeloidna leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*)
- **AMP** – adozin monofosfat (engl. *adenosine monophosphate*)
- **AMPK** – adozin monofosfatom aktivirana protein kinaza (engl. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*)
- **Ann V-FITC** – aneksin V-fluorescein izotiocijanat (engl. *annexin V-fluorescein isothiocyanate*)
- **ANOVA** – analiza varijanse (engl. *analysis of variance*)
- **Apaf-1** – faktor-1 za aktivaciju apoptotskih proteaza (engl. *apoptotic protease-activating factor 1*)
- **ApoStat** – fluorescein izotiocijanat (FITC)-konjugovani pan-kaspazni inhibitor (engl. *fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated pan-caspase inhibitor*)
- **Ara-C** – citozin arabinozid (engl. *cytosine arabinoside*)
- **Ara-CTP** – arabinofuranozilcitozin trifosfat (engl. *arabinofuranosylcytosine triphosphate*)
- **Atg** – engl. *autophagy related*
- **ATP** – adozin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

- **AVOs** – autofagolizozomi (engl. *acidic vesicular organelles*)
- **Bad** – engl. *Bcl-2 antagonist of cell death*
- **BAF** – bafilomicin A1 (engl. *bafilomycin A1*)
- **Bak** – engl. *Bcl-2-antagonist/killer-1*
- **Bax** – engl. *Bcl-2-associated X protein*
- **Bcl-2** – engl. *B cell lymphoma*
- **Bcl-w** – engl. *B cell lymphoma-w*
- **Bcl-x** – engl. *B cell lymphoma-x*
- **BCR-ABL1** – engl. *Breakpoint Cluster Region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
- **beklin-1** – engl. *autophagy-related bcl2-interacting Atg6 homolog*
- **BH3-only** – engl. *Bcl-2 homology-only*
- **Bok** – engl. *Bcl-2 related ovarian killer*
- **BSA** – albumin iz govedeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)
- **CAD** – DNaza aktivirana kaspazama (engl. *caspase-activated DNase*)
- **cDNK** – komplementarna DNK (engl. *complementary DNA*)
- **CIT** – citarabin
- **CLL** – hronična limfocitna leukemija (engl. *chronic lymphocytic leukemia*)
- **CMA** – autofagija posredovana šaperonima (engl. *chaperone mediated autophagy*)
- **CML** – hronična mijeloidna leukemija (engl. *chronic myeloid leukemia*)

- **CO<sub>2</sub>** – ugljen dioksid (engl. *carbon dioxide*)
- **Ct** – prag ciklusa (engl. *cycle of threshold*)
- **DD** – domen smrti (engl. *death domain*)
- **DEPC** – dietilpirokarbonat (engl. *diethylpyrocarbonate*)
- **DHE** – dihidroetidijum (engl. *dihydroethidium*)
- **DISC** – signalni kompleks indukovan smrću (engl. *death-inducing signalling complex*)
- **DMSO** – dimetilsulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)
- **DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*)
- **ECL** – engl. *enhanced chemiluminescence*
- **ERK** – kinaza regulisana vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)
- **FACS** – protočna citofluorimetrija (engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*)
- **FBS** – goveđi fetalni serum (engl. *fetal bovine serum*)
- **FIP200** – engl. *focal adhesion kinase [FAK] family interacting protein of 200 kD*
- **FL** – fluorescenca
- **G<sub>0</sub>** – faza mirovanja
- **GABARAP** – engl. *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*
- **HCl** – hlorovodonična kiselina (engl. *hydrochloric acid*)
- **HEL** – ćelijska linija humane eritroleukemije

- **hENT1** – transporter nukleozida (engl. *human equilibrative nucleoside transporter 1*)
- **HEPES** – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (engl. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)
- **HK** – hlorokin (engl. *chloroquine*)
- **HL-60** – ćelijska linija humane akutne promijelocitne leukemije
- **HMGB1** – protein visoke mobilnosti B1 (engl. *high mobility group box 1*)
- **hsc70** – protein toplotnog šoka (engl. *heat shock cognate protein of 70 kDa*)
- **hVps34** – engl. *mammalian vacuolar protein sorting 34 homologue*
- **IC<sub>50</sub>** – polovina maksimalne inhibitorne koncentracije
- **ICAD** – inhibitor CAD (engl. *Inhibitor of Caspase Activated DNase*)
- **IDA** – idarubicin
- **IgG** – imunoglobulin G
- **iRNK** – informaciona RNK
- **IUPAC** – Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- **JC-1** – 5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-karbocijanin jodid
- **K562** – ćelijska linija humane hronične mijelocitne leukemije
- **LC3** – mikrotubulama asocirani protein 1 lakog lanca 3 (engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*)
- **LIR** – motiv koji interaguje sa LC3 molekulom (engl. *LC3 interaction region*)

- **MAPK** – mitogenom-aktivirana proteinska kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)
- **Mcl-1** – engl. *Myeloid cell leukemia-1*
- **M-MuLV** – reverzna transkriptaza (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transcriptase*)
- **MNPK** – mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells, PBMC*)
- **MOLM-13** – ćelijska linija humane akutne mijeloidne leukemije
- **MOLT-4** – ćelijska linija humane akutne limfoblastne leukemije
- **MRP** – engl. *MDR (multidrug resistance)-associated protein*
- **mTOR** – meta rapamicina kod sisara (engl. *mechanistic/mammalian target of rapamycin*)
- **mTORC1/2** – mTOR kompleks 1/2 (engl. *mTOR complex1/2*)
- **MTT** – 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid
- **MV4-11** – ćelijska linija humane akutne monocitne leukemije
- **Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>** – natrijum ortovanadat (engl. *sodium orthovanadate*)
- **NB4** – ćelijska linija humane akutne promijelocitne leukemije
- **NBR1** – engl. *neighbor of BRCA1 gene 1*
- **NDP52** – engl. *nuclear dot protein 52 kDa*
- **NF-κB** – nuklearni faktor kapa B
- **NH<sub>4</sub>Cl** – amonijum hlorid (engl. *ammonium chloride*)

- **NP-40** – nonil fenoksipolietoksiletanol-40 (engl. *nonyl phenoxyethoxyethanol-40*)
- **Opti-MEM** – minimalni esencijalni medijum (engl. *minimal essential medium*)
- **p70S6K** – p70S6 kinaza (engl. *ribosomal protein S6 kinase*)
- **PAS** – mesto formiranja fagofore (engl. *phagophore assembly site*)
- **PB1** – (Phox/Bem 1) domen
- **PBMC** – mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)
- **PBS** – puferizovan fiziološki rastvor (engl. *phosphate-buffered saline*)
- **PE** – fosfatidiletanolamin (engl. *phosphatidylethanolamine*)
- **P-gp** – P glikoprotein (engl. *P-glycoprotein*)
- **PI** – propidijum jodid (engl. *propidium iodide*)
- **PI3K** – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)
- **PI3KC1** – fosfoinozitol 3-kinaza klase 1 (engl. *class I phosphoinositide 3-kinase*)
- **PI3KC3** – fosfoinozitol 3-kinaza klase 3 (engl. *class III phosphoinositide 3-kinase*)
- **PI3P** – fosfatidilinozitol 3-fosfat (engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*)
- **PMSF** – fenilmetilsulfonil fluorid (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- **Puma** – engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*
- **qRT-PCR** – reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu (engl. *real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

- **REH** – ćelijska linija humane akutne limfocitne leukemije
- **RKV** – reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species, ROS*)
- **RNK** – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid, RNA*)
- **RPMI 1640** – medijum za kultivaciju humanih limfocita (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*)
- **SDS** – natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
- **siRNA** – mala interferirajuća RNK (engl. *small interfering RNA*)
- **SKM-1** – ćelijska linija humane mijelomonocitne leukemije
- **SQSTM1** – p62 (engl. *sequestosome1*)
- **TBS-T** – deterdžent (engl. *tris-buffered saline (TBS) and Polysorbate 20 (Tween 20)*)
- **TEM** – transmisiona elektronska mikroskopija
- **TEMED** – N,N,N',N'-tetrametilen-1,2-diamin (engl. *N,N,N',N'-tetramethylethylene-1,2-diamine*)
- **THP-1** – ćelijska linija humane monocitne leukemije
- **TNFR** –receptor za faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor*)
- **Tris** – tris(hidroksimetil)aminometan (engl. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*)
- **TSC** – engl. *tuberous sclerosis complex*
- **Tween20** – deterdžent (engl. *polysorbate 20*)
- **U937** – ćelijska linija humane monocitne limfomske leukemije
- **UBA** – ubikvitinu-pridruženi domen (engl. *ubiquitin-associated domain*)



- **ULK** – engl. *Unc-51-like kinase*
- **WIPI-1** – engl. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1*
- **Xkr8** – engl. *Xk-related (Xkr) protein 8*
- **ZK** – zdrava kontrola
- **$\Delta$ Ct** –  $\Delta\text{Ct (gena)} = \text{Ct (gena, uzorak)} - \text{Ct (gena, kontrola)}$

## **BIOGRAFIJA**

Mihajlo N. Bošnjak je rođen 25.06.1980. godine u Beogradu. Diplomirao je 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, na smeru Genetički inženjering i biotehnologija sa prosečnom ocenom tokom studija 8,69. Diplomski rad pod nazivom „Analiza 4G/5G polimorfizma gena PAI-1 kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom“ uradio je na Institutu za zoologiju, Katedra za genetiku i evoluciju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod vođstvom prof. dr Marine Stamenković-Radak.

Doktorske akademske studije u oblasti Molekularne medicine je upisao školske 2010/11. godine. Od januara 2011. godine zaposlen je kao Istraživač saradnik na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu i angažovan je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj br. III 41025 pod nazivom „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.

Koautor je 6 radova u međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Mihajlo Bošnjak

broj upisa MM-12/10

Izjavljujem

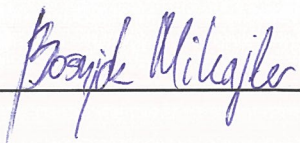
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina *in vitro*“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 09.06.2017.

  
\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Mihajlo Bošnjak

Broj upisa: MM-12/10

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: „Uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina *in vitro*“

Mentor: prof. dr Vladimir Bumbaširević

Komentor: v. n. sar. dr Ljubica Harhaji Trajković

Potpisani: Mihajlo Bošnjak

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 09.06.2017.

Mihajlo Bošnjak

Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina in vitro“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

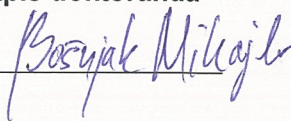
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 09.06.2017.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.