

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 15.05.2017. godine, broj 5940/10, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

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

kandidata **dipl. molekularnog biologa i fiziologa Mihajla Bošnjaka**, zaposlenog na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar . Kostić “ Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je **prof. dr Vladimir Bumbaširević** . Komentor je **v. n. sar. dr Ljubica Harhaji Trajković** .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Aleksandra Isaković** , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. **N. sar. dr Gordana Tovilović Kovačević** , naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković “ u Beogradu
3. **Prof. dr Dejan Baskić** , profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija Mihajla Bošnjaka pod nazivom „Uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina *in vitro*“ napisana je na ukupno 137 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 55 slika i 5 shema. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju

kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu. Struktura i kompozicija rada u celini sadrži sve elemente i zadovoljava sve kriterijume doktorske disertacije.

U **uvodu** kandidat Mihajlo Bošnjak iznosi podatke o osnovnim karakteristikama tumora i elijskim mehanizmima njihovog nastanka, pri čemu je posebna pažnja posvećena leukemijama, progresivnim malignim oboljenjima hematopoetskog sistema. Osim toga, detaljno je opisana savremena terapija leukemija, sa posebnim osvrtom na mehanizme delovanja antimetabolita citarabina i antitumorskog antibiotika idarubicina. U uvodnom delu je tako detaljno opisan i molekularni mehanizam apoptoze, programirane elijske smrti tipa I, kojom leukemijske ćelije tretirane citarabinom i idarubicinom umiru. U daljem toku uvoda detaljno je opisana autofagija, bazirana na kataboličkom procesu koji uključuje elijsku degradaciju sopstvenih proteina i organela u lizozomima. Takođe, precizno su definisani molekularni mehanizmi indukcije autofagije, kao i njena uloga u smrti tumorskih ćelija indukovanoj različitim antileukemijskim lekovima.

Imaju na umu da se tokom korišćenja citarabina i idarubicina razvijaju rezistentnost na ove antileukemijske lekove i neželjeni sporedni efekti, nameću se potreba za poboljšanjem njihove efikasnosti. Modulacija procesa autofagije predstavlja jedan od načina kojim se povećava citotoksičnost antitumorskih lekova. S obzirom da do sada nije ispitivana sposobnost citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju, postavljeni su sledeći **ciljevi** ovog istraživanja: (1) ispitati sposobnost citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju u humanim leukemijskim elijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*. (2) ispitati mehanizme odgovorne za indukciju autofagije citarabinom i idarubicinom u humanim leukemijskim elijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*. (3) ispitati da li je autofagija indukovana citarabinom i idarubicinom citoprotektivna ili citotoksična u humanim leukemijskim elijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama *in vitro*.

U poglavlju **materijal i metode**, kandidat detaljno opisuje eksperimentalne metode i uslove pod kojima su eksperimenti izvedeni: () Gajenje elijske linije humane akutne promijelocitne leukemije (HL-60), hronične mijelocitne leukemije (K562), akutne limfocitne leukemije (REH), kao i izolaciju primarnih leukemijskih ćelija iz krvi pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana hronična mijeloidna leukemija i

mononuklearnih elija periferne krvi (MNPK) zdravih kontrola. Dijagnoza je postavljena na Klinici za hematologiju Klini kog centra Srbije u Beogradu. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom Deklaracijom, i odobreno od strane Eti kog komiteta Klini kog centra Srbije i Eti kog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Srbija. Svi u esnici 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 u estvovanju u studiji, jedan opšti, koji se odnosio na dijagnosti ke procedure, i drugi koji se odnosio na analize u nau ne svrhe, jer su uzorci uzimani tokom regularne postavke dijagnoze oboljenja. (b) Odre ivanje vijabilnosti elija merenjem aktivnosti elijskog enzima kisele fosfataze i merenjem aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza (d) Analiza indukcije autofagije i njenih mehanizama. Za ovu svrhu je koriš ena: proto na citofluorimetrija (prilikom utvr ivanja prisustva autofagolizozoma); TEM (za detekciju prisustva autofagozoma i autofagolizozoma); Imunoblot metoda (za ispitivanje aktivnosti/fosforilacije razli itih signalnih molekula (AMPK, Akt, ERK, mTOR, p70S6 kinaza), kao i ekspresije molekula uklju enih u indukciju autofagije (LC3, beclin-1, p62)); *Real-time* RT-PCR metoda (za analizu ekspresije Atg gena) (e) Ispitivanje uloge autofagije u citotoksi noj aktivnosti citarabina i idarubicina merenjem vijabilnosti elija kod kojih je autofagija indukovana citarabinom i idarubicinom inhibirana farmakološkim inhibitorima ili smanjenjem ekspresije LC3 , beklina-1 i p62 RNK interferencijom. (f) Utvr ivanje tipa i mehanizama elijske smrti na proto nom citofluorimetru analizom apoptotske fragmentacije DNK, translokacije fosfatidilserina, aktivacije kaspaza, produkcije superoksida, promene potencijala mitohondrijalne membrane. (g) Statisti ke metode koriš ene za obradu dobijenih podataka.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

U poglavlju **diskusija** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan na in povezao svoje rezultate sa rezultatima drugih autora. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaklju ke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u skladu sa rezultatima ve ine drugih autora koji imaju isti nau ni interes.

U poglavlju **zaklju ci** su sumirani svi rezultati dobijeni u ovoj disertaciji, koji u potpunosti odgovaraju na ciljeve postavljene na po etku izrade teze.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 267 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U poglavlju **rezultati** kandidat jasno i dokumentovano prikazuje dobijene eksperimentalne podatke o antileukemijskom efektu citarabina i idarubicina u REH leukemijskim elijama. Oba leka su o ekivano smanjila vijabilitet REH leukemijskih elija i indukovala apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza, depolarizacije mitohondrija i oksidativnog stresa.

Osim toga, pokazano je da citarabin i idarubicin indukuju autofagiju u REH leukemijskim elijama. Naime, ispitivanjem ekspresije proteina karakteristi nih za indukciju autofagije je utvr eno da citarabin i idarubicin stimulišu konverziju LC3 i razgradnju p62, što je pouzdan pokazatelj prisustva autofagije. Dodatno, upotrebom inhibitora proteolize je pokazano da oba leka indukuju pove anje autofagnog fluksa u leukemijskim elijama, odnosno da je pove anje ekspresije LC3-II forme proteina zaista posledica njegovog pove anog stvaranja, a ne smanjene razgradnje. Prisustvo autofagozomima sli nih vezikula u leukemijskim elijama tretiranim antileukemijskim lekovima potvr eno je transmisijom elektronskom mikroskopijom. Citarabin ne uti e na ekspresiju beclin-1 proteina u leukemijskim elijama, što navodi na zaklju ak da je njegova bazalna ekspresija dovoljna da izazove autofagni odgovor. Važno je napomenuti da antileukemijski lekovi nisu indukovali autofagiju u MNPK zdravih kontrola. Dalje ispitivanje unutar elijskih mehanizama pokazalo je da je autofagija indukovana citarabinom i idarubicinom posredovana inhibicijom mTOR kinaze, glavnog negativnog regulatora autofagije, kao i njenog direktnog supstrata p70S6K. Idarubicin je, s jedne strane, inhibirao aktivnost mTOR aktivatora Akt kinaze, a s druge strane doveo do pove anja fosforilacije mTOR inhibitora AMPK u REH leukemijskim elijama, što navodi na zaklju ak da ovi mTOR regulatori igraju zna ajnu ulogu u indukciji autofagije. Citarabin je u REH elijama smanjio je fosforilaciju Akt i pove ao aktivaciju MAP kinaze ERK, ali su ove promene kasnile u odnosu na inhibiciju mTOR/p70S6K, sugerišu i da ovi molekuli pre imaju ulogu u održavanju procesa autofagije, koji je prethodno pokrenut nekim drugim signalnim putem. U HL-60

elijama tretman citarabinom je doveo do poveanja aktivnosti AMPK i ERK i smanjenja fosforilacije Akt. U primarnim leukemijskim elijama izolovanim iz CML pacijenata tretiranim citarabinom aktivacija AMPK i inhibicija Akt tako e su korelirale sa mTOR inhibicijom i stimulacijom autofagije, dok je ekspresija mTOR inhibitora ERK kinaze bila smanjena, pa zakljuujemo da nije u estvovala u indukciji autofagije citarabinom.

U daljem toku eksperimenata ispitivana je uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina u leukemijskim elijama. Inhibicija autofagije farmakološkim inhibitorima bafilomicinom A1 i hlorokinom, kao i supresijom ekspresije LC3 i p62 gena, stimulisala je aktivaciju kaspaza, oksidativni stres i depolarizaciju mitohondrija i apoptozu u leukemijskim elijama tretiranim citarabinom, ukazuju i na protektivnu ulogu autofagije.

S druge strane, u leukemijskim elijama tretiranim idarubicinom inhibicija autofagije dovela je do smanjenja proapoptotskih promena, sugerišu i da idarubicin izaziva citotoksi nu autofagiju u leukemijskim elijama.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati kandidata su detaljno uporeeni sa podacima iz literature. Poreenje rezultata sa rezultatima ranijih studija govori da su postignuti rezultati delimi no u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima, sa jasnim isticanjem novih saznanja u vezi sa istraživa kim pitanjima.

U ovoj disertaciji je utvr eno da citarabin i idarubicin smanjuju vijabilitet i izazivaju apoptozu posredovanu oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza u razli itim leukemijskim elijama. Sposobnost citarabina da indukuje apoptozu ve je ranije pokazana u elijama periferne krvi B-CLL pacijenata, elijama izolovanim iz koštane srži AML pacijenata, elijama AML linija MV4-11, MOLM-13 i HL-60, kao i elijama CML linije K562 (Ray i sar., 1996; Kim i sar., 1997; de Vries i sar., 2006; Li i sar., 2017). Tako e, pokazano je da idarubicin izaziva apoptozu u elijama promonocitne linije U937, elijama eritroleukemijske linije HEL, elijama AML linija SKM-1, HL-60, NB4, THP-1, i MOLM-13, elijama CML linije K562 i elijama ALL linije MOLT-4 (Lotfi i sar., 2002; Barbarroja i sar., 2009;

Switalska i sar., 2012; Li i sar., 2014). U mnogobrojnim studijama drugih autora pokazano je da citarabin i idarubicin izazivaju oštećenje mitohondrija povezano sa snažnom produkcijom reaktivnih kiseoniknih vrsta (RKV) i nastankom oksidativnog stresa (Geller i sar., 2001; Swift i sar., 2003; Hewish i sar., 2013; Liu i sar., 2013). U skladu s tim, u ovoj disertaciji je utvrđeno da oba ispitivana antileukemijska leka indukuju depolarizaciju membrane mitohondrija i stimulišu produkciju superoksidnog anjonskog radikala u REH leukemijskim elijama. Dodatno, u ovoj disertaciji je utvrđeno da citarabin i idarubicin indukuju aktivaciju kaspaza i stimulišu pojavu fosfatidilserina na spoljašnjoj strani elijske membrane leukemijskih elija, što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija na različitim leukemijskim elijama (Liu i sar., 2001; Florio i sar., 2003; Vial i sar., 2006; Xie i sar., 2010; Wen i sar., 2011; Harrison i sar., 2016; Shi i sar., 2006; Liu i sar., 2013; Ma i sar., 2017). Osim rezultata ove disertacije i radovi drugih autora pokazali su da citarabin i idarubicin indukuju fragmentaciju DNK u leukemijskim elijama (Florio i sar., 2003; Qi i sar., 2003; Ma i sar., 2017).

U saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazano da antraciklini doksorubicin, daunorubicin i epirubicin indukuju autofagiju u leukemijskim elijama (Han i sar., 2011; Sishi i sar., 2012; Chittaranjan i sar., 2014; Park i sar., 2016), u ovoj disertaciji je po prvi put pokazana sposobnost citarabina i idarubicina da indukuju autofagiju. Poput drugih citostatika, u ovoj studiji je utvrđeno da idarubicin i citarabin dovode do smanjenja ekspresije p62 proteina, odnosno do indukcije potpune autofagije (He i sar., 2016; Zhu i sar., 2017). U ovoj disertaciji je utvrđeno da je citarabin indukuvao porast ekspresije Atg4, Atg5 i Atg7 u leukemijskim elijama i smanjenje aktivacije mTOR/p70S6K kinaze, što ukazuje da oslobađanje od supresivnog delovanja mTOR-a predstavlja osnovni mehanizam indukcije autofagije dejstvom citarabina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa hipotezom da mTOR reguliše proces autofagije u manjoj meri kontrolom transkripcije ATG gena, a u većoj kontrolisanjem fosforilacije proteina poput Ulk1, ATG13 i FIP200 (Jung i sar., 2010; Alers i sar., 2012). U skladu sa rezultatima prethodnih studija gde je pokazano da antraciklin doksorubicin inhibira mTOR kinaznu aktivnost u kardiomiocitima i elijama kancera jajnika (Zhu i sar., 2009; Brum i sar., 2013) su i rezultati ove studije koji pokazuju mTOR inhibitornu aktivnost idarubicina. U istraživanjima drugih autora je pokazano da

su AMPK i ERK inhibitori mTOR aktivnosti, odnosno stimulatori autofagije (Harhaji-Trajkovic i sar., 2009; Wang i sar., 2009; Arsikin i sar., 2012), dok s druge strane, Akt predstavlja jedan od najpoznatijih aktivatora mTOR i supresora autofagije (He i Klionsky, 2009). Tako e, pokazano je da su aktivacija AMPK i ERK, kao i inhibicija Akt, indukovali autofagiju zavisnu od mTOR inhibicije u razli itim leukemijskim elijama (Wang i sar., 2009; Evangelisti i sar., 2011; Huang i sar., 2011; Grimaldi i sar., 2012; Martelli i sar., 2012). U saglasnosti sa tim, u ovoj studiji tretman citarabinom je doveo do pove anja aktivnosti AMPK i ERK i smanjenja fosforilacije Akt u HL-60 elijama. Modulacije aktivnosti AMPK i Akt kinaza u citarabinom tretiranim primarnim leukemijskim elijama izolovanim iz CML pacijenata su tako e korelirale sa mTOR inhibicijom i stimulacijom autofagije. Prethodna istraživanja su pokazala da doksorubicin, daunorubicin i epirubicin stimulišu fosforilaciju Akt u malignim i primarnim elijama (Lee i sar., 2006; Qu i sar., 2009). Tako e, utvr eno je da idarubicin aktivira Akt u endotelijalnim elijama (Kaushal i sar., 2004). Suprotno tome, rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da idarubicin inhibira aktivnost Akt u leukemijskim elijama, što bi se moglo objasniti time da delovanje idarubicina na aktivnost Akt zavisi od vrste elija. U studijama drugih autora je pokazano da je pove anje 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, u ovoj disertaciji je pokazano da je indukcija autofagije korelirala sa pojavom oksidativnog stresa. Osim toga, u istraživanjima drugih autora pokazano je da doksorubicin stimuliše mitofagiju u kardiocitima i elijama tumora dojke (Guo i sar., 2016; Koleini i Kardami, 2017), što ukazuje da bi depolarizacija mitohondrija opisana u ovoj studiji mogla u estvovati u indukciji autofagije citarabinom i idarubicinom.

U saglasnosti sa ispitivanjima drugih autora obavljenim na razli itim leukemijskim elijskim linijama (Bjorkoy i sar., 2005; Kim i sar., 2008; Grander i sar., 2009; Puissant i sar., 2010), u ovoj disertaciji je pokazano da je transfekcija malom interferiraju om RNK za beclin-1, p62 i LC3 efikasno smanjila indukciju autofagije u leukemijskim elijama. Genetska i farmakološka supresija autofagije dovela je do zna ajnog pove anja elijske smrti indukovane citarabinom. Na ovaj na in je pokazano da citarabin indukuje citoprotektivnu autofagiju u leukemijskim elijskim linijama

(REH, HL-60) i primarnim leukemijskim elijama izolovanim iz pacijenata kod kojih je *de novo* dijagnostifikovana CML, što je u skladu sa rezultatima drugih studija gde je inhibicija autofagnog odgovora povećala citotoksičnost daunorubicina, flavopiridola, triciribina i inhibitora tirozin kinaze prema leukemijskim elijama (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 elijama, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su u skladu 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). Osim toga, 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 elija dejstvom idarubicina i daunorubicina (Yang i sar., 2012; Wu i sar., 2014). Međutim, u studiji Hana i saradnika pokazano je da inhibicija autofagije hlorokinom ili smanjenjem ekspresije Atg5/Atg7 proteina dovodi do povećanja citotoksičnosti daunorubicina u K562 elijama (Han i sar., 2011). Rezultati drugih autora pokazali su da je doksorubicin indukovao citoprotektivnu autofagiju u elijama multiplog mijeloma (Pan i sar., 2011), citotoksičnu autofagiju u kardiomiocitima, hepatocelularnom karcinomu i humanim elijama 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 elija i statusa diferencijacije, koncentracije leka i/ili eksperimentalnih uslova.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Bosnjak M, Ristic B, Arsikin K, Mircic A, Suzin-Zivkovic V, Perovic V, Bogdanovic A, Paunovic V, Markovic I, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L. Inhibition of mTOR-Dependent Autophagy Sensitizes Leukemic Cells to Cytarabine-Induced Apoptotic Death. PLoS One. 2014; 9(4):12.

Ristic B, **Bosnjak M**, Arsikin K, Mircic A, Suzin-Zivkovic V, Bogdanovic A, Perovic V, Martinovic T, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L. Idarubicin induces mTOR-dependent cytotoxic autophagy in leukemic cells. *Exp Cell Res.* 2014; 326(1):90-102.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija Mihajla N. Bošnjaka pod nazivom „Uloga autofagije u antileukemijskom dejstvu citarabina i idarubicina *in vitro*“ predstavlja originalan rad iz oblasti eksperimentalne biomedicine. Značaj ove doktorske disertacije je u tome što je po prvi put ispitana sposobnost antileukemijskih lekova antimetabolita citarabina i antraciklina idarubicina da indukuju autofagiju u humanim leukemijskim ćelijskim linijama i primarnim leukemijskim ćelijama, kao i mehanizmi odgovorni za njenu indukciju. Takođe, utvrđivanje uloge autofagije, citoprotektivne kod citarabina, a citotoksične kod idarubicina, obezbedilo je smernice za potencijalnu upotrebu modulatora autofagije kao adjuvanasa u terapiji leukemija ovim lekovima.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kandidata dipl. molekularnog biologa Mihajla Bošnjaka i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Mentor:

lanovi Komisije:

Prof. dr Vladimir Bumbaširevi

Prof. dr Aleksandra Isakovi

Komentor:

V. N. Sar. dr Ljubica Harhaji Trajkovi

N.Sar. dr Gordana Tovilovi Kova evi

Prof. dr Dejan Baski

U Beogradu, 09.06.2017.