

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica Đ. Kosić

**Antitumorski efekat inhibicije glikolize u
kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i
supresijom oksidativne fosforilacije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica Đ. Kosić

**Antitumor effect of glycolysis inhibition in
combination with lysosome permeabilization
and oxidative phosphorylation suppression**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

MENTORI:

1. Prof. dr Biljana Božić Nedeljković,
redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet
2. dr Ljubica Harhaji Trajković,
naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković" - Institut
od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Biljana Božić Nedeljković,
redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet
2. dr Ljubica Harhaji Trajković,
naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković" - Institut
od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
3. dr Verica Paunović,
viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

DATUM ODBRANE:

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju i Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Rezultati istraživanja predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji realizovani su u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ pod rukovodstvom naučnog savetnika dr Ljubice Harhaji Trajković i „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Trajkovića.

Zahvaljujem se

dr Ljubici Harhaji Trajković na neposrednom rukovođenju pri izradi eksperimenata i pisanju doktorske disertacije i radova koji su iz nje proistekli, na nesebičnom prenošenju znanja i iskustva, uloženom ogromnom trudu i vremenu, dobronamernim kritikama, savetima i brzim razrešenjima svih nedoumica, a pre svega na ukazanom poverenju, strpljenju i razumevanju,

prof. dr Biljani Božić Nedeljković na iskrenoj podršci i pomoći tokom celokupnog trajanja doktorskih studija, na svim konstruktivnim savetima tokom spremanja ispita, rešavanju brojnih izazova tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, ličnom zalaganju i ukazanom poverenju,

dr Verici Paunović na izuzetnoj pomoći i dragocenim sugestijama tokom svih faza izrade i pisanja doktorske disertacije, na motivaciji, nesebičnom trudu i angažovanju, usmeravanju i prenošenju stečenog iskustva i znanja koje je značajno doprinelo kvalitetu ove doktorske disertacije,

prof. dr Vladimiru Trajkoviću na neposrednom rukovođenju pri izradi eksperimenata i pisanju disertacije i radova koji su iz nje proistekli,

dr Biljani Ristić, dr Mihajlu Bošnjaku, Katarini Arsikin Csordas, dr Ljubici Vučićević, dr Maji Misirkić Marjanović, dr Aleksandru Mirčiću i Milošu Mandiću na pomoći pri izradi eksperimenata,

svim kolegamicama i kolegama koji su doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije.

Mom deki, prof. dr Božidaru Mihajloviću što je u meni od malena probudio ljubav prema nauci i što me je uvek bezgranično voleo.

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, pre svega mojim roditeljima i mom Simiću, Milošu, Hani, Relji, na veri, razumevanju, podršci i безусловnoj ljubavi koju mi nesebično pružaju.

mami i tati

Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i supresijom oksidativne fosforilacije

SAŽETAK

Povećane energetske potrebe tumorske ćelije zadovoljavaju prevashodno aerobnom glikolizom, ali ukoliko je ona inhibirana ove metabolički plastične ćelije prelaze na oksidativnu fosforilaciju. Veliki nestabilni lizozomi, bogati hidrolitičkim enzimima, omogućavaju tumorima metastaziranje i rezistenciju na lekove, ali je njihovo izlivanje u citoplazmu citotoksično. Cilj ove disertacije je bio da se ispituju antitumorski efekti kombinovanih tretmana inhibitora glikolize 2-dezoksi-D-glukoze (2DG) sa supresorom oksidativne fosforilacije rotenonom (ROT), ili sa lizozomalnim deterdžentom N-dodecilimidazolom (NDI).

Pokazali smo da i 2DG+ROT i 2DG+NDI sinergistički ubijaju B16 melanomske i U251 gliomske ćelije nekrozom, a ne apoptozom, nekroptozom i autofagijom. Kombinovani tretmani su izazvali depleciju ATP, aktivaciju AMPK i produkciju mitohondrijskog superoksida. 2DG+ROT je stimulisao otpuštanje heksokinaze II sa membrane mitohondrija i posledično otvaranje VDAC kanala, što je omogućilo izlazak superoksida i citohroma c u citoplazmu. Citohrom c je aktivirao kaspaze, ali zbog nedostatka ATP nije došlo do fragmentacije DNK i inicijalno aktivirana apoptoza je završena nekrozom. Deplecija ATP je aktivirala AMPK i suprimirala mTORC1, ali je paradoksalno inhibirala autofagiju. Sa druge strane, NDI je indukovao permeabilizaciju membrane lizozoma i izlazak proteolitičkih enzima katepsina, depolarizaciju mitohondrija, oksidativni stres i supresiju oksidativne fosforilacije, što je u kombinaciji sa inhibicijom glikolize izazvanom 2DG, dovelo do potpune deplecije ATP i nekroze tumorskih ćelija.

Istovremena inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije, ili inhibicija glikolize i destabilizacija lizozoma, mogle bi se iskoristiti u antitumorskoj terapiji.

Ključne reči: glikoliza, oksidativna fosforilacija, lizozom, permeabilizacija membrane lizozoma, mitohondrije, nekroza, 2-dezoksi-D-glukoza, rotenon, N-dodecilimidazol, kombinovana antitumorska terapija, melanom, gliom

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Ćelijska biologija

Antitumor effect of glycolysis inhibition in combination with lysosome permeabilization and oxidative phosphorylation suppression

ABSTRACT

Tumor cells preferentially use aerobic glycolysis to satisfy increased energy needs, but if glycolysis is inhibited they switch to oxidative phosphorylation. Tumor cells have large unstable lysosomes, rich in hydrolytic enzymes that stimulate metastases and drug resistance, but induce cell death if released into cytoplasm. The aim of this dissertation was to investigate the antitumor effects of combined treatments of glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2DG) with the oxidative phosphorylation suppressor rotenone (ROT), or with the lysosomal detergent N-dodecylimidazole (NDI).

We showed that both, 2DG+ROT and 2DG+NDI, synergistically induced B16 melanoma and U251 glioma cell death by necrosis, and not apoptosis, necroptosis, and autophagy. Combined treatments caused ATP depletion, AMPK activation, and mitochondrial superoxide production. 2DG+ROT induced release of hexokinase II from the mitochondrial membrane and the consequent opening of the VDAC channel, which led to the release of superoxide and cytochrome c into the cytoplasm. Cytochrome c activated caspases, but due to ATP deficiency, there was no DNA fragmentation and the initially activated apoptosis converted to necrosis. ATP depletion activated AMPK and suppressed mTORC1, but paradoxically inhibited autophagy. On the other hand, NDI induced lysosome membrane permeabilization and release of proteolytic enzymes cathepsins, depolarization of mitochondria, oxidative stress and suppression of oxidative phosphorylation, which in combination with inhibition of glycolysis induced by 2DG, led to complete energy depletion and necrosis of tumor cells.

Concomitant inhibition of glycolysis and oxidative phosphorylation, or inhibition of glycolysis and destabilization of lysosomes, could be used in antitumor therapy.

Keywords: glycolysis, oxidative phosphorylation, lysosome, lysosome membrane permeabilization, mitochondria, necrosis, 2-deoxy-D-glucose, rotenone, N-dodecylimidazole, combination antitumor therapy, melanoma, glioma

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Cell biology

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Rastvori i reagensi.....	15
3.2. <i>In vitro</i> kultivacija ćelijskih kultura i primarnih ćelija	16
3.3. Testovi vijabilnosti.....	16
3.3.1. Test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza	17
3.3.2. Kristal violet test	17
3.3.3. Test oslobađanja laktat dehidrogenaze.....	17
3.4. Ispitivanje uzajamnog dejstva dva agensa	18
3.5. Fazno kontrastna mikroskopija	18
3.6. Analiza parametara ćelijske smrti primenom protočne citofluorimetrije	19
3.6.1. Određivanje zastupljenosti apoptoze i nekroze.....	19
3.6.2. Određivanje fragmentacije DNK	20
3.6.3. Određivanje aktivacije kaspaza	20
3.6.4. Određivanje aktivacije kaspaze 8 i 9.....	21
3.6.5. Merenje membranskog potencijala mitohondrija.....	21
3.6.6. Određivanje unutarćelijske produkcije slobodnih kiseoničnih radikala	22
3.6.7. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije.....	23
3.7. Određivanje nivoa ATP u ćelijama.....	23
3.8. Određivanje prisustva kiselih vezikula	24
3.9. Određivanje morfologije ćelija transmisionom elektronskom mikroskopijom	25
3.10. Izolacija ćelijskih frakcija	26
3.11. Imunoblot analiza.....	27

3.12. Transfekcija ćelija pomoću male interferirajuće RNK - siRNA.....	29
3.13. Statističke analize.....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa supresijom oksidativne fosforilacije.....	30
4.1.1. 2DG i ROT, samostalno i u kombinaciji, smanjuju vijabilnost B16 i U251 ćelija.....	30
4.1.2. 2DG i ROT sinergizuju u ubijanju B16 i U251 ćelija.....	31
4.1.3. Kombinovani tretman 2DG+ROT ubija transformisane B16, U251 i L929, ali ne i primarne MSC ćelije.....	32
4.1.4. Kombinovani tretman 2DG+ROT menja morfologiju B16 i U251 ćelija	32
4.1.5. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje nekrozu B16 ćelija	33
4.1.6. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje dezintegraciju ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme B16 ćelija	35
4.1.7. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje aktivaciju kaspaza	35
4.1.8. Depolarizacija mitohondrija nije u osnovi citotoksičnosti kombinovanog tretmana 2DG+ROT	38
4.1.9. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje oštećenja mitohondrija u B16 ćelijama...	39
4.1.10. Superoksid sintetisan u mitohondrijama učestvuje u citotoksičnom delovanju 2DG+ROT na B16 ćelije	40
4.1.11. Citotoksičnost 2DG+ROT zavisi od otpuštanja HKII sa mitohondrija i otvaranja VDAC	41
4.1.12. Antitumorski efekat 2DG+ROT je posredovan deplecijom ATP	42
4.1.13. Antitumorski efekat 2DG+ROT je posredovan inhibicijom glikolize i oksidativne fosforilacije	43
4.1.14. Citotoksični efekat 2DG+ROT ne zavisi od autofagije	44
4.1.15. Aktivacija AMPK ima protektivnu ulogu u B16 ćelijama tretiranim 2DG+ROT	48
4.1.16. Citotoksični efekat 2DG+ROT ne zavisi od inhibicije mTORC1	49
4.1.17. Citotoksični efekat 2DG+ROT ne zavisi od aktivacije ERK.....	50
4.1.18. Citotoksični efekat 2DG+ROT zavisi od aktivacije JNK	51
4.2. Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma ...	52

4.2.1. 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, smanjuju vijabilnost U251 i B16 ćelija.....	52
4.2.2. 2DG i NDI sinergizuju u ubijanju U251 i B16 ćelija.....	53
4.2.3. 2DG i NDI smanjuju vijabilnost U251 i B16 ćelija na vremenski-zavisan način	54
4.2.4. 2DG, NDI i njihova kombinacija ne ubijaju primarne ćelije	54
4.2.5. Kombinovani tretman 2DG+NDI menja morfologiju U251 ćelija	55
4.2.6. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje oslobađanje LDH u U251 ćelijama na vremenski-zavisan način.....	56
4.2.7. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje nekrozu U251 ćelija	57
4.2.8. Kombinovani tretman 2DG+NDI ne indukuje aktivaciju kaspaza	58
4.2.9. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje dezintegraciju ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme U251 ćelija	59
4.2.10. Apoptoza, ferroptoza, nekroptoza i autofagija nisu uključene u antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana 2DG+NDI	59
4.2.11. 2DG i NDI sinergistički indukuju depolarizaciju mitohondrija u U251 i B16 ćelijama.....	63
4.2.12. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji oksidativnog stresa u U251 i B16 ćelijama.....	64
4.2.13. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji lipidne peroksidacije u U251 ćelijama	66
4.2.14. Vitamin E smanjuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres indukovani 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama	66
4.2.15. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji oštećenja mitohondrija u U251 ćelijama.....	67
4.2.16. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji LMP u U251 i B16 ćelijama	69
4.2.17. Vitamin E smanjuje LMP indukovani 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama.....	70
4.2.18. Katepsini učestvuju u indukciji nekroze 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama	71
4.2.19. Citotoksični efekat 2DG+NDI zavisi od indukcije LMP	71
4.2.20. Sinergistička citotoksičnost 2DG i NDI zavisi od inhibicije glikolize	72
4.2.21. 2DG i NDI sinergizuju u depleciji ATP.....	74
4.2.22. 2DG i NDI sinergizuju u aktivaciji AMPK.....	74
5. DISKUSIJA	76
6. ZAKLJUČCI.....	86

7. LITERATURA	87
8. SPISAK SKRAĆENICA	111
BIOGRAFIJA	116
PRILOZI.....	117

1. UVOD

Maligne bolesti predstavljaju jedan od vodećih uzročnika smrti u savremenom svetu. Nastaju neoplastičnom transformacijom normalnih ćelija i tkiva [1]. Neoplastična transformacija je složen, višestepeni proces tokom kojeg dolazi do stvaranja brojnih mutacija, čije nakupljanje dovodi do povećane aktivnosti protoonkogena i/ili smanjene aktivnosti tumor supresor gena, što za posledicu ima nekontrolisanu proliferaciju ćelija i inhibiciju ćelijskog umiranja, gubitak diferenciranosti i sposobnosti za obavljanje specifičnih funkcija, odnosno nastanak tumorske ćelije [2]. U tumorskim ćelijama se tokom kancerogeneze dešavaju različite promene, kao što su modifikacije signalnih puteva, strukture i funkcije organela, metabolizma, koje doprinose razvoju malignog fenotipa [3-5]. Tumori se razlikuju prema poretku ćelija, načinu i prognozi rasta. Benigni tumori ostaju inkapsulirani na mestu nastanka, dok maligni tumori ili kanceri koji nisu inkapsulirani imaju sposobnost metastaziranja, odnosno odvajanja manje grupe ćelija sa mesta nastanka i odlaženja putem krvi i limfe u druga tkiva i organe, gde formiraju sekundarne tumore [6]. Prema generalnoj podeli Svetske zdravstvene organizacije hiljade različitih tipova tumora se na osnovu vrste ćelija ili tkiva od kojih su se razvili dele na: epitelne (karcinome), tumore vezivnog tkiva ili mezenhimske tumore (sarkome), mijelome, gliome, embrionalne tumore, leukemije i limfome [7]. Gliomi nastaju malignom transformacijom glijalnih ćelija i predstavljaju najčešće tumore centralnog nervnog sistema. U svetu je tokom 2018. godine dijagnostikovano 296 851 novih slučajeva svih tipova tumora mozga i 241 037 smrtnih slučajeva [8]. Različiti sredinski i genetski faktori su u korelaciji sa povećanim rizikom za razvijanje tumora mozga [9]. Hiruška resekcija predstavlja osnovni način za uklanjanje tumora, ali zbog specifičnosti mesta nastanka često su inoperabilni. Većina malignih tumora nakon hiruške intervencije zahteva primenu kombinovane agresivne radioterapije i hemoterapije, čiji tip zavisi od stepena progresije, starosne dobi, histopatološkog nalaza, molekularnih markera i prethodnih terapija [9, 10]. Melanomi su maligni tumori pigmentnih ćelija melanocita, koji se nalaze u koži, mukoznim membranama, centralnom nervnom sistemu i ćelijama uvealnog trakta [11]. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka u 2018. godini širom sveta je registrovano 287 723 novih slučajeva melanoma i 60 712 smrtnih slučajeva [8]. Smrtnost i incidenca malignog melanoma su globalno u konstantnom porastu, uprkos značajnim naporima koji se ulažu u prevenciju, ranu detekciju i razvoj terapije. Iako melanom kože predstavlja samo 4% svih tumora kože (uključujući nemijelocitne tumore kože), odgovoran je za 80% svih smrtnih slučajeva uzrokovanih kancerima kože [11, 12]. Za lokalizovane tumore hirurgija je i dalje najbolji pristup u lečenju [13]. U poslednjih deset godina došlo je do značajnog napretka kako u hiruškoj, tako i u adjuvansnoj i sistemskoj terapiji melanoma [14]. Trenutno su dostupne dve nove klase sistemskih terapija: imunoterapije (imunološki inhibitori kontrolnih tačaka), koji povećavaju antitumorski imunski odgovor i ciljane terapije (BRAF i MEK inhibitori) za pacijente sa BRAF^{V600}-mutantnim melanomom [13]. Najveći napredak u lečenju melanoma je ostvaren kada je otkriveno da gotovo 50% pacijenata sa uznapredovanim melanomima ima aktivirane BRAF mutacije (BRAF^{V600E}), koje su najvećim delom putem konstitutivne aktivacije MEK/ERK signalnog puta umešane u mnogobrojne aspekte melanomogeneze, što je dovelo do uvođenja BRAF (BRAFi) i ERK inhibitora u terapiju [15]. Međutim, iako su ovi inhibitori u početku efikasni, pacijenti sa melanomom ubrzo razvijaju rezistenciju [15]. Najsavremenije antimelanomske terapije omogućavaju petogodišnje preživljavanje u 50% pacijenata. Dakle, gliome i melanome karakteriše velika agresivnost i ogroman metastatski potencijal. Uprkos intenzivnim istraživanjima za ove tumore još uvek ne postoji efikasna terapija [13, 16, 17].

Cilj hemioterapije je da se inhibira proliferacija ili indukuje smrt tumorskih ćelija. Najčešći tip ćelijske smrti koju indukuju antitumorski lekovi jeste apoptoza. Međutim, tumorske ćelije često postaju rezistentne na indukciju apoptoze, pa se u poslednje vreme sve više traga za alternativnim putevima indukcije ćelijske smrti kao što su: nekroza, nekroptoza, ferroptoza, autofagija i lizosomalna ćelijska smrt. Apoptoza (programirana ćelijska smrt tipa I) je evolutivno visoko konzerviran i genetski determinisan proces koji organizam koristi za eliminaciju oštećenih i suvišnih ćelija. Apoptoza se odigrava u normalnim fiziološkim uslovima, tokom embriogeneze, diferencijacije, u procesima razvoja i regulacije imunog sistema, kao i nizu patoloških stanja [1, 18]. U toku apoptoze dolazi do karakterističnih morfoloških promena ćelije. Prvi morfološki znak apoptoze je kondenzacija hromatina, koja se dešava u marginalnim oblastima nukleusa. Uporedo dolazi i do kondenzacije citoplazme, smanjenja volumena ćelije, sabijanja organela i razgradnje citoskeleta. Kondenzaciju hromatina prati sečenje lanaca DNK na uniformne fragmente od oko 180 baznih parova. U kasnijim fazama apoptoze dolazi do segmentacije nukleusa i fragmentacije citoplazme. Na plazma membrani se pojavljuje veći broj citoplazmatskih izvrata. Terminalnu fazu apoptoze karakteriše pojava apoptotskih tela, delova apoptotske ćelije okruženih membranom [1, 18]. Na spoljašnjoj membrani apoptotskih tela pojavljuje se fosfatidilserin, što predstavlja signal za fagocitozu od strane makrofaga i dendritskih ćelija. U *in vitro* uslovima apoptotska tela se spontano degenerišu nekrozom, što se naziva sekundarna nekroza [19]. Proces apoptoze je koordinisan aktivnošću kaspaza, cistein proteaza koje imaju esencijalnu ulogu u inicijaciji i egzekuciji apoptoze, na osnovu čega se dele na inicijatorske (kaspaza-2, -8, -9, -10), koje se aktiviraju u odgovoru na signal, egzekutorske (kaspaza-3, -6, -7), koje su aktivirane inicijatorskim kaspazama i učestvuju u egzekutorskoj fazi dovodeći do aktivacije brojnih strukturnih i regulatornih proteina, koji onemogućavaju funkcionisanje ćelije [20]. Kaspaze se sintetišu u obliku neaktivnih zimogena prokaspaza, koje se potom grupišu u odgovarajuće proteinske komplekse, što dovodi do autokatalitičke aktivacije inicijatorskih kaspaza, a potom i aktivacije efektorskih kaspaza. Efektorske ili egzekutorske kaspaze nakon toga aktiviraju endonukleaze i proteaze, što za posledicu ima fragmentaciju hromozomalne DNK i sečenje proteina citoskeleta i nukleusa, i formiranje citomorfoloških promena karakterističnih za apoptozu [20].

Dva glavna apoptotska puta su spoljašnji ili receptorski i unutrašnji ili mitohondrijalni put. Spoljašnji put započinje na nivou ćelijske membrane vezivanjem liganada za receptore smrti iz TNFR (*engl.* tumor necrosis factor receptor) familije i ima ključnu ulogu u aktivaciji i prenošenju kaskade signala sa površine ćelija na unutarćelijske signalne puteve preko inicijatorske kaspaze-8 [21]. Dok unutrašnji, odnosno mitohondrijalni put apoptoze zavisi od faktora koji se otpuštaju iz mitohondrija. Unutrašnji put izazivaju faktori koji dovode do oštećenja DNK ili izazivaju ćelijski stres, uključujući odsustvo faktora rasta, promene u citoskeletu, akumulaciju nesavijenih proteina, hipoksiju, odsustvo citokina i hormona neophodnih za preživljavanje. Ovi faktori dovode do depolarizacije i promena u propustljivosti spoljašnje membrane mitohondrija (MOMP, *engl.* mitochondrial outer membrane permeabilization), usled čega dolazi do oslobađanja proapoptotskih proteina poput citohroma c, indukujućeg faktora apoptoze (AIF), endonukleaze G, Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 u citoplazmu ćelija [21]. Niz proteina iz Bcl-2 familije u koje spadaju proapoptotski (Bax, Bad, Bak) i antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1) proteini, učestvuju u regulaciji propustljivosti membrana mitohondrija, a samim tim i u regulaciji procesa apoptoze [22]. Oslobodeni citohrom c u citoplazmi zajedno sa dimerom inicijatorske kaspaze-9 i brojnim molekulima proteina Apaf-1 formira proteinski kompleks apoptozom koji aktivira egzekutorske kaspaze-3 i -7 i indukuje apoptozu, dok se Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 vezuju za XIAP i na taj način ga sprečavaju da inhibira egzekutorske kaspaze [22].

Program ćelijskog umiranja apoptozom i nekrozom može otpočeti istovetnim signalima. Različiti odgovor na dejstvo identičnog stimulusa objašnjava se dužinom i jačinom stimulusa [23]. Za razliku od apoptoze tokom nekroze dolazi do nasumične fragmentacije DNK, pri čemu nastaju

fragmenti različitih dužina [1]. Obično se dešava kao posledica ćelijske traume izazvane fizičkim/sredinskim faktorima, što dovodi do prerane smrti ćelija u tkivu procesom autolize. Nekrozu izazivaju infekcije, toksini, mehaničke traume, ishemija i termička oštećenja [24]. Nekroza se morfološki značajno razlikuje od apoptoze. Tokom nekroze, ćelije pokazuju brojne morfološke karakteristike koje mogu varirati u zavisnosti od tipa ćelije. Neke od uobičajenih strukturnih karakteristika nekroze uključuju: oticanje plazma membrane, formiranje citoplazmatskih vakuola, narušavanje integriteta membrane mitohondrija i lizozoma i na kraju gubitak integriteta plazma membrane [25]. Tokom nekroze zbog nekontrolisanog ulaska vode u ćeliju i organele dolazi do njenog bubrenja i prskanja ćelijske membrane, čime se ćelijski sadržaj oslobađa u okoloćelijsku sredinu. Oslobađanjem ćelijskog sadržaja aktiviraju se makrofagi, neutrofil i druge ćelije imunog sistema, što dovodi do inflamatorne reakcije i oštećenja tkiva [26]. Nekroza je nekontrolisan i pasivan proces koji obično zahvata veće grupe ćelija, za razliku od apoptoze koja je aktivan proces koji troši energiju poreklom od ATP i obično je ograničena na pojedinačne ćelije ili manje klastere ćelija [23]. Intracelularni nivoi ATP imaju odlučujuću ulogu u indukciji apoptoze i nekroze: visoki nivoi ATP obično omogućavaju ćeliji da uđe u apoptozu, dok niski nivoi ATP favorizuju nekrozu [27].

Novija naučna istraživanja su identifikovala programiranu nekrotičnu ćelijsku smrt, nazvanu nekroptoza [24]. Pokreće se vezivanjem TNF- α i Fas liganda za njihove receptore na površini ćelija, na sličan način kao kod indukcije klasičnog spoljašnjeg puta apoptoze. Vezivanje liganda za TNF receptor aktivira prenošenje signala koji dovode do fosforilacije RIPK1 i RIPK3 kinaza (*engl.* receptor interacting protein kinase) i stvaranja RIPK1-RIPK3 heterodimernog proteinskog kompleksa koji se naziva nekrozom. Nekrozom omogućava dalje regrutovanje slobodne RIPK3, što dovodi do autofosforilacije RIPK3 i na kraju do aktivacije MLKL kinaze (MLKL, *engl.* mixed lineage kinase domain-like protein). MLKL homo-trimeri zatim migriraju i ubacuju se u plazma membranu uzrokujući njenu rupturu [24]. Nekroptoza indukuje inflamatorni odgovor, koji je posredovan oslobađanjem molekularnih obrazaca oštećenja (DAMP, *engl.* damage-associated molecular patterns) i citokina u vanćelijsku sredinu.

Feroptoza je takođe vrsta programirane nekroze. Za razliku od nekroptoze, feroptoza ne zavisi od aktivnosti RIPK1 kinaze [28]. U feroptozu pod uticajem slobodnog gvožđa dolazi do pojave oksidativnog stresa, peroksidacije lipida i gubitka selektivne propustljivosti plazma membrane. Morfološke promene feroptoze su smanjenje zapremine mitohondrija, gubljenje kristi i oštećenje spoljašnje mitohondrijalne membrane [29].

Autofagija takođe može dovesti do smrti ćelije i tada se naziva programirana ćelijska smrt tipa II. Međutim, njena primarna funkcija je uklanjanje oštećenih organela, membrana i proteina, odnosno proteinskih agregata i preživljavanje ćelije. Termin autofagija potiče od grčkih reči „auto“ i „phagia“, što znači jesti samu sebe. Autofagija je precizno regulisani katabolički proces razgradnje i reciklaže nepotrebnih ili disfunkcionalnih elemenata ćelije pomoću lizozomske mašinerije [30]. Autofagija učestvuje u kontroli ćelijskog rasta, razvića i homeostaze, a greške koje nastaju tokom procesa autofagije ili njen potpun izostanak su važni uzročnici nagomilavanja oštećenja tokom procesa starenja ćelije [31]. Postoje tri različita oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i šaperonima posredovana autofagija [31]. U mikroautofagiji dolazi do direktnog zahvatanja citoplazmatskog materijala invaginacijom lizozomalne membrane, dok u šaperonima posredovanoj autofagiji molekule koje treba degradovati prepoznaje HSP70 kompleks. Makroautofagija je glavni put koji eliminiše oštećene organele i disfunkcionalne proteine [32, 33]. Mehanizam makroautofagije počinje odvajanjem unutarćelijskog sadržaja u dvostruku membranu fagoforu i formiranjem autofagozoma [34]. Autofagozom se potom fuzioniše sa lizozomom i dovodi do formiranja autolizozoma u kome se vezikularni sadržaj degradira lizozomalnim kiselim hidrolazama [30].

Različite faze makroautofagije (indukcija autofagije, stvaranje, sazrevanje i recikliranje autofagozoma) regulisane su produktima ATG gena (*engl.* autophagy related genes). Formiranje autofagozoma je indukovano klasom III fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) i proteinom beclinom 1 (produktom Atg6 gena). Aktivnost beklina 1 je inhibirana vezivanjem za Bcl-2 u uslovima visokog energetskeg stanja u ćeliji [35, 36]. Fosforilacija beklina 1 dovodi do slabljenja interakcije sa Bcl-2 i indukcije autofagije [35, 37]. U procesu rasta i sazrevanja autofagozoma učestvuju dva kompleksa, prvi koga čine Atg12-Atg5-Atg16 proteini i drugi sastavljen od proteaze Atg4 i ubikvitinu sličnog proteina Atg8. Kod sisara Atg8 se naziva LC3 protein. LC3 tokom faze sazrevanja autofagozoma prelazi iz solubilne citoplazmatske forme LC3-I u LC3-II formu, koja se ugrađuje u membranu autofagozoma, što služi za eksperimentalno dokazivanje prisustva autofagije. Za LC3 protein se direktno vezuje p62 (takođe poznat i kao sequestosome 1, SQSTM1), čija je osnovna uloga da dovede ubikvitirane proteine do autofagozoma [37, 38]. Kada je stvaranje autofagozoma završeno dolazi do njegovog spajanja sa lizozomom pri čemu se formira autolizozom čiji se sadržaj zatim razgrađuje kiselim hidrolazama [37]. Protein p62 se i sam degradira u procesu autofagije, pa se smanjivanje njegove koncentracije koristi kao dokaz efikasne autofagne degradacije [39]. Glavni regulator autofagije je inhibitor ekspresije Atg proteina serin/treonin kinaza mTOR (*engl.* mechanistic target of rapamycin) [40]. Aktivnost mTOR kinaze je, sa druge strane, regulisana Akt i AMPK kinazama. Akt je serin treonin kinaza koja zavisi od aktivnosti PI3K i osnovni je aktivator mTOR-a, dok je glavni inhibitor AMPK (adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza) [40]. AMPK se aktivira u uslovima niskog energetskeg statusa u ćeliji, odnosno smanjenog odnosa ATP/AMP [41].

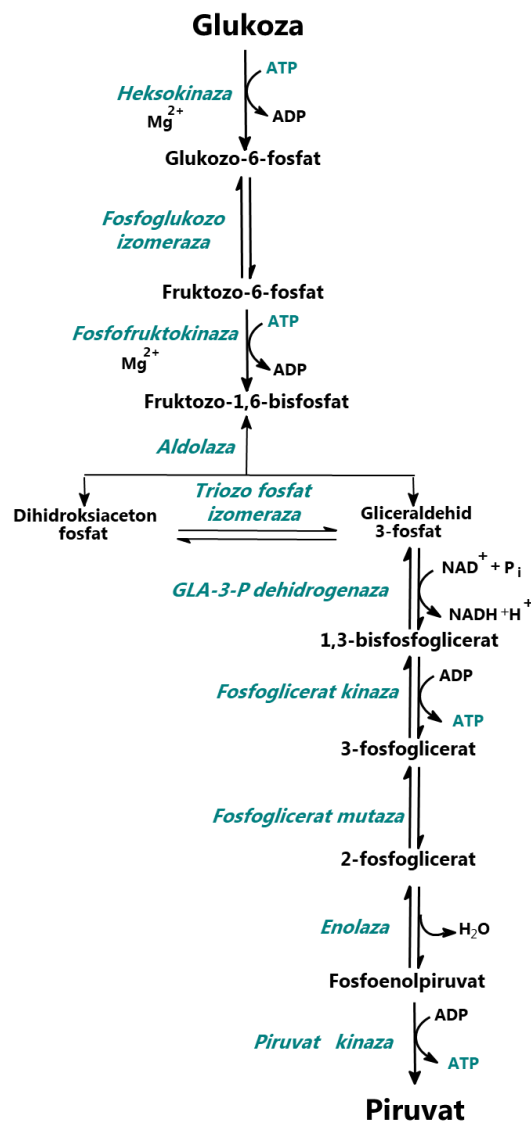
Fiziološka uloga autofagije je uklanjanje dotrajalih proteina i oštećenih organela. U uslovima metaboličkog stresa, kao što su gladovanje, oštećenje DNK ili oksidativni stres, autofagija služi kao alternativni izvor energije neophodne za održavanje osnovnog ćelijskog metabolizma, te na taj način sprečava umiranje ćelije [42, 43]. Međutim, kada je neadekvatno ili preterano aktivirana, ili kada je indukovana u ćelijama sa oštećenim mehanizmom apoptoze, autofagija može funkcionisati kao alternativni put umiranja ćelije [44]. Ovaj način umiranja se naziva programirana ćelijska smrt tipa II i ima drugačiji mehanizam i morfološke karakteristike od apoptoze i nekroze [45].

Zbog brzih i nekontrolisanih proliferacija tumorske ćelije imaju uvećane potrebe za energijom. Usled velike genomske nestabilnosti one imaju sposobnost da se prilagođavaju uslovima sredine [46]. Kako će tumorske ćelije sintetisati energiju zavisi od dostupnosti supstrata, ali i od faze neoplastičnog razvića [5]. Pokazano je da postoje značajne razlike u načinu sinteze energije ne samo među različitim tipovima kancera, već i između različitih ćelija istog tumora [47]. Jedan od glavnih razloga zbog koga dolazi do promena u ćelijskom metabolizmu je činjenica da rast tumora nikada ne prati adekvatna vaskularizacija, tako da se ćelije unutar slabo vaskularizovanih delova solidnih tumora suočavaju sa periodima kraćeg ili dužeg nedostatka kiseonika ili hipoksije, na koje se moraju metabolički prilagoditi [48].

Većina ćelija sisara koristi glukozu kao osnovni izvor energije. Glukoza u organizmu nastaje razgradnjom ugljenih hidrata u digestivnom traktu ili reciklažom molekula u procesu autofagije [49, 50]. Glukoza se procesom glikolize, oksidativne dekarboksilacije piruvata, ciklusom trikarboksilnih kiselina (TCA ciklus, Krebsov ciklus ili ciklus limunske kiseline) i oksidativnom fosforilacijom oksiduje do CO₂ i H₂O, pri čemu se stvara energija. Nobelovac Otto Warburg je otkrio da tumorske ćelije koriste glikolizu kao preferencijalni put proizvodnje ATP [48]. Ovaj proces je karakterističan za uslove smanjene koncentracije kiseonika, ali kod tumorskih ćelija može da se dešava i u prisustvu visoke koncentracije kiseonika, što se naziva "aerobna glikoliza" ili Varburgov efekat [51]. Piruvat koji nastaje u aerobnoj glikolizi ne odlazi u mitohondrije da bi se dalje metabolisao TCA ciklusom i oksidativnom fosforilacijom, već ostaje u citoplazmi gde se

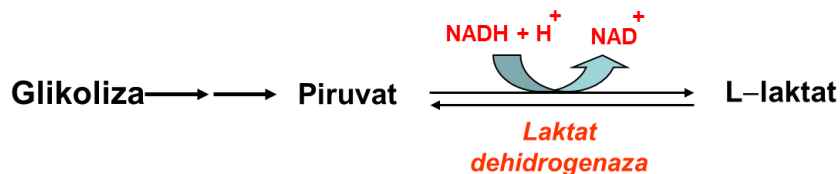
prevodi u laktat [52]. U zdravim ćelijama procesom oksidativne fosforilacije nastaje oko 90% ATP, a samo 10% ATP procesom glikolize. U tumorskim ćelijama taj odnos je značajno promenjen, oko 60% ATP nastaje glikolizom, a 40% oksidativnom fosforilacijom [51].

Proces glikolize se odigrava u citoplazmi ćelija (Slika 1). Prva reakcija u procesu glikolize predstavlja fosforilaciju glukoze u glukozo-6-fosfat, u prisustvu enzima heksokinaze (HK), koji katalizuje transfer fosforne grupe sa jednog molekula ATP na molekul glukoze. Potom dolazi do reakcije izomerizacije glukozo-6-fosfata u fruktozo-6-fosfat pod delovanjem enzima fosfoglukoizoizomeraze. Nakon izomerizacije dolazi do druge fosforilacije u procesu glikolize, odnosno do prevođenja fruktozo-6-fosfata u fruktozo-1,6-bisfosfat prenošenjem fosforne grupe sa molekula ATP. Tu reakciju katalizuje enzim fosfofruktokinaza. Nastali fruktozo-1,6-bisfosfat se u prisustvu enzima aldolaze potom razlaže na dva triozofosfata: gliceralhid-3-fosfat i dihidroksiaceton fosfat koji mogu da prelaze jedan u drugi u prisustvu enzima triozo fosfat izomeraze. Gliceraldehid-3-fosfat je deo glavnog puta glikolize, i kao rezultat delovanja enzima aldolaze i triozofosfat izomeraze od fruktozo-1,6-bisfosfata dobijaju se dva molekula gliceraldehid-3-fosfata. Time je završena prva faza glikolize uz utrošak dva molekula ATP.



Slika 1. Put glikolize

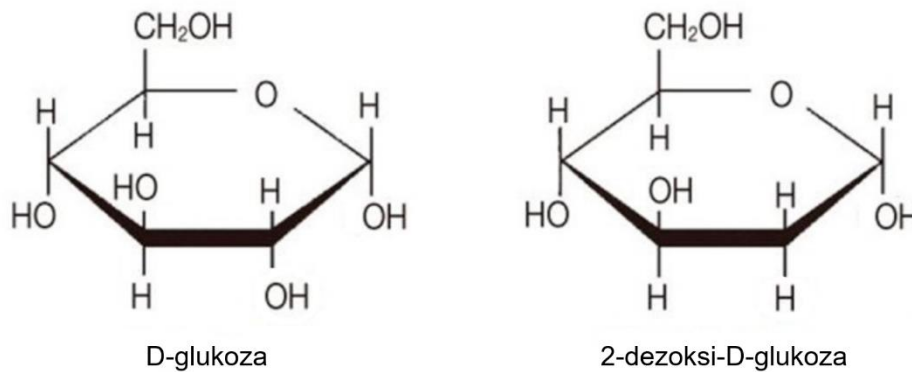
Potom sledi druga faza glikolize gde od gliceraldehid-3-fosfata nastaje 1,3-bisfosfoglicerat u prisustvu enzima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze, koja kao koenzim koristi NAD^+ pri čemu nastaje $\text{NADH} + \text{H}^+$ (NADH). Nakon toga dolazi do transfera fosforne grupe sa 1,3-bisfosfoglicerata na ADP u prisustvu enzima fosfoglicerat kinaze i dobija se 3-fosfoglicerat i molekul ATP. Dalje, 3-fosfoglicerat prelazi u 2-fosfoglicerat, koji potom u prisustvu enzima enolaze prelazi u fosfoenolpiruvat, koji u završnoj reakciji glikolize u prisustvu piruvat kinaze i molekula ADP daje piruvat i molekul ATP. Jedan molekul glukoze se tokom glikolize metaboliše do dva molekula piruvata. U reakcijama glikolize se tokom prve faze troše 2 molekula ATP, a tokom druge sintetise 4 molekula, tako da je energetska neto bilans glikolize 2 molekula ATP i 2 molekula NADH [53-55]. Kod malignih ćelija u prisustvu kiseonika (aerobna glikoliza) i u hipoksičnim uslovima kod zdravih ćelija (anaerobna glikoliza), piruvat se u prisustvu enzima laktat dehidrogenaze prevodi u laktat. Laktat dehidrogenaza koristi redukovanu formu NADH , dobijenu u procesu glikolize. NADH se reoksiduje u NAD^+ (Slika 2), koji se potom ponovo vraća u proces glikolize [56]. Akumulacija laktata u okolini tumora dovodi do lokalnog zakišeljavanja koje omogućava bržu invaziju tumora, uništavanje susednih zdravih ćelija, degradaciju ekstracelularnog matriksa i promovisanje angiogeneze [57].



Slika 2. Mehanizam delovanja enzima laktat dehidrogenaze

U procesu glikolize, enzimi koji katalizuju ireverzibilne reakcije razgradnje glukoze, heksokinaza, fosfofruktokinaza i piruvat kinaza su mesta regulacije procesa glikolize. Enzim HK postoji u 4 različite izoforme kod sisarskih ćelija. U tumorskim ćelijama prevashodno je zastupljena HKII, koja je uglavnom vezana za membranu mitohondrija. Tako je na primer pokazano, da je u gliomima 69% HK vezano za membranu mitohondrija, a samo 9% u zdravim ćelijama mozga [58]. Pošto se glukozo-6-fosfat može preusmeriti i u metabolički put pentozo fosfata, HK ne stimuliše samo stvaranje energije nego i nastanak NADPH i anaboličkih intermedijara neophodnih za proliferaciju [59]. HKII na citoplazmatskoj površini spoljašnje membrane mitohondrija interaguje sa voltažno zavisnim anjonski-selektivnim kanalom (VDAC). VDAC se nalazi u neposrednoj blizini adenin nukleotid translokaze (ANT) koja vrši razmenu ADP za ATP kroz unutrašnju membranu mitohondrija [60]. Interakcija HKII sa VDAC kanalom u membrani mitohondrija omogućava HKII da fosforiliše glukozu koristeći ATP sintetisan u mitohondrijama tokom oksidativne fosforilacije [61, 62]. Koristeći prevashodno ATP generisan u mitohondrijama u odnosu na citosolni i smanjivanjem koncentracije dostupnog P_i i ADP u mitohondrijama HKII povećava glikolitički, a suprimira kapacitet za oksidativnu fosforilaciju [47, 63]. Supresijom oksidativne fosforilacije, mitohondrijalna HKII inhibira i proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) [64]. Osim toga, mitohondrijalna HKII može direktno inhibirati apoptozu regulacijom propustljivosti tranzicione pore u mitohondrijama (MPTP, *engl.* mitochondrial permeability transition pore) i blokiranjem regrutovanja proapoptotskih proteina kao što su Bax i Bak [65]. Pokazano je da uklanjanje HKII iz membrane mitohondrija indukuje apoptozu u ćelijama tumora [66, 67]. Imajući u vidu da je HKII bitna za preživljavanje tumorskih ćelija, mogla bi biti i dobra meta za antitumorsku terapiju.

Jedan od najbolje ispitanih supresora glikolize je inhibitor enzima heksokinaze 2-dezoksi-D-glukoza (2DG) [68-70]. 2DG je analog glukoze kod koga je 2-hidroksilna grupa zamenjena vodonikom (Slika 3). Osim što inhibira aktivnost HK, 2DG inhibira i transport glukoze u ćeliju. Kada se veže za HK, 2DG se fosforiliše u 2-dezoksi-D-glukozo-6-fosfat, koji ostaje zarobljen u ćeliji budući da zbog nedostatka 2-OH grupe nije u stanju da se dalje metabolizuje glikolizom [71, 72].



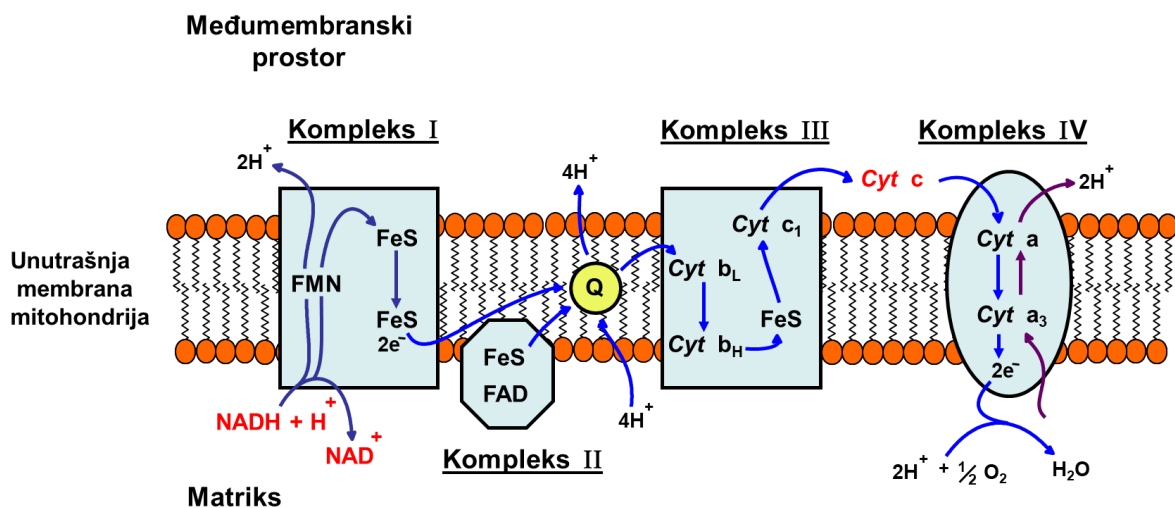
Slika 3. Primarna struktura D-glukoze i 2-dezoksi-D-glukoze

U dosadašnjoj literaturi pokazano je da 2DG pored toga što dovodi do smanjenja nivoa ATP, uzrokuje i promene u glikozilaciji proteina, unutarćelijskom prenosu signala i ekspresiji gena, zaustavlja ćelijski ciklus, izaziva oksidativni stres i apoptozu tumorskih ćelija *in vitro* [73-77]. Pokazano je da 2DG ima selektivni, ćelijski specifični efekat i sposobnost da senzibilizuje tumorske ćelije na citotoksične lekove na koje su rezistentne kada se primenjuju samostalno [78, 79]. Brojna ispitivanja na životinjama i kliničke studije su pokazale da je 2DG relativno netoksična, zbog čega predstavlja potencijalan lek za antitumorsku terapiju [80, 81]. Najčešći neželjeni efekti nakon primenjene doze od 63 mg/kg 2DG su bili slični simptomima hipoglikemije i nisu bili opasni po život, a uključivali su umor, znojenje, vrtoglavicu i mučninu [82]. Takođe, kliničke studije su pokazale da pacijenti sa gliomima dobro podnose terapiju 2DG u kombinaciji sa radio terapijom [83, 84]. Bitno je istaći, da je 2DG pogodna za tretman tumora mozga jer prolazi kroz krvno moždanu barijeru, nakon čega je ćelije brzo preuzimaju uglavnom olakšanom difuzijom preko glukoznih transportera ili ređe aktivnim transportom [85, 86]. Nedostatak kiseonika, koji je česta pojava u unutartumorskoj sredini, povećava ekspresiju transportera glukoze i glikolitičkih enzima, što povećava unos 2DG u tumorske ćelije u poređenju sa normalnim ćelijama u aerobnom okruženju [69, 87, 88]. Takođe, 2DG je efikasnija u hipoksičnim uslovima, jer kod normoksije tumorske ćelije mogu nastaviti da proizvode ATP oksidativnom fosforilacijom i TCA ciklusom koristeći masne kiseline i aminokiseline kao alternativne izvore energije [89]. Nasuprot snažnom antitumorskom potencijalu pokazanom *in vitro*, u *in vivo* studijama antitumorska dejstva 2DG su prilično ograničena kada se koristi samostalno, dok u kombinaciji sa drugim antitumorskim agensima (npr. adriamicinom, paklitakselom, metforminom) 2DG značajno pojačava njihove antitumorske efekte [90-92].

Kod netransformisanih ćelija sa normalnim nivoom kiseonika, najveći deo piruvata ulazi u mitohondrije gde se oksidativno dekarboksiliše pomoću kompleksa piruvat dehidrogenaze u acetyl-CoA, pri čemu nastaje CO₂ i molekul NADH. Acetyl-CoA se potom oksiduje u TCA ciklusu koji se odvija u matriksu mitohondrija i predstavlja seriju biohemijskih reakcija koje prevode svaki

molekul acetil-CoA u po 2 molekula CO₂, pri čemu u svakom ciklusu nastaju 3 molekula NADH, i po 1 molekul FADH₂ i GTP. Elektronski parovi nastali tokom oksidacije glukoze u procesima glikolize, oksidativne dekarboksilacije piruvata i ciklusa limunske kiseline prenose se na koenzime kompleksa piruvat dehidrogenaze. Prilikom reoksidacije redukovanih formi ovih koenzima (NADH u NAD⁺ i FADH₂ u FAD), u respiratornom lancu dolazi do izbacivanja protona u međumembranski prostor mitohondrija, pri čemu dolazi do formiranja gradijenta protona koji omogućava sintezu ATP u procesu oksidativne fosforilacije. Kod sisara pri oksidaciji jednog molekula glukoze do CO₂ i H₂O nastaje ukupno 38 molekula ATP. Terminalni akceptor elektrona je O₂, pri čemu nastaje H₂O kao krajnji produkt [54].

Otto Warburg je još 1913. godine uveo naziv respiratorni lanac koji se odnosi na seriju prenosilaca elektrona sa koenzima NADH i FADH₂ na molekularni kiseonik O₂, a enzime koji učestvuju u ovom procesu nazvao respiratornim enzimima. Respiratorni lanac čine četiri kompleksa uronjena u unutrašnju membranu mitohondrija. Svaki kompleks se sastoji od nekoliko proteinskih komponenti za koje su vezane različite redoks-aktivne prostetičke grupe sa rastućim redukcionim potencijalom. Kompleks I je flavoprotein NADH-CoQ-reduktaza (NADH dehidrogenaza) i predstavlja mesto gde se NADH reoksiduje, pri čemu se njegovi elektroni prenose na ubikvinon (koenzim Q, CoQ) (Slika 4). Zbog svoje solubilnosti u lipidnom sloju unutrašnje membrane mitohondrija CoQ poseduje mobilnost i sposobnost da vrši prenos elektrona na citohrome kompleksa III. Kompleks II je sukcinat-CoQ-reduktaza koji omogućava prebacivanje elektrona sa sukcinata na CoQ. Kompleks III je citohrom c reduktaza koja učestvuje u prebacivanju elektrona sa redukovanog CoQ na citohrom c, koji se alternativno vezuje za citohrom c₁ ili za citohrom c oksidazu iz kompleksa IV. Kompleks IV je citohrom c oksidaza koja postepeno vrši prenos četiri elektrona sa redukovanog citohroma c na molekul O₂ dajući H₂O [53, 93].



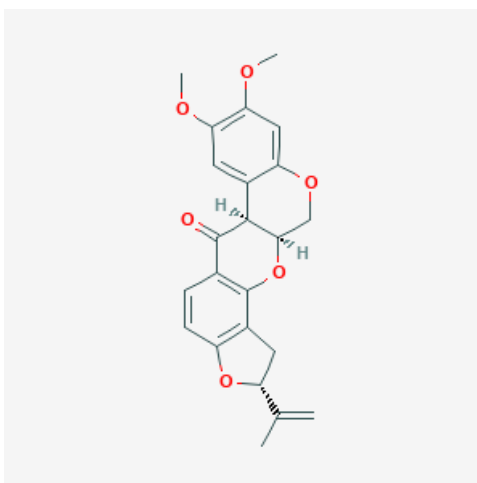
Slika 4. Topološka organizacija respiratornog lanca mitohondrija

Istovremeno sa procesom prenosa elektrona do molekularnog kiseonika kroz respiratorni lanac vrši se i ispumpavanje protona (H⁺) iz matriksa mitohondrija kroz unutrašnju membranu u međumembranski prostor mitohondrija. To se dešava na tri mesta u respiratornom lancu, na kompleksu I, III i IV, pri čemu se generiše elektrohemijski gradijent protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija. Matriks mitohondrija ima smanjen nivo H⁺, dok međumembranski prostor mitohondrija ima povišen nivo H⁺ [53, 54]. Enzim koji koristi elektrohemijski gradijent za sintezu

ATP od ADP i Pi je ATP-sintaza (F₀F₁-ATPaza, ili kompleks V) [53, 93]. Osim toga, protoni iz međumembranskog prostora se mogu vratiti u matriks, nezavisno od ATP sintaze. To je proces koji se naziva curenje protona. Curenje protona u mitohondrijama i curenje elektrona na respiratornom lancu indukuju stvaranje RKV [93].

Iako većina tumora ima povećanu glikolizu, danas se zna da neki tipovi tumora ili grupe ćelija u okviru tumora imaju sličan ili čak veći intenzitet oksidativne fosforilacije od netransformisanih ćelija. Tako je na primer pokazano da su kancerske stem ćelije, koje imaju sposobnost da daju različite tipove ćelija u tumoru, cirkulišuće kancerske ćelije i ćelije koje su postale rezistentne na hemoterapeutike veoma zavisne od oksidativne fosforilacije [94, 95]. U slučaju da je glikoliza smanjena ili da se završava stvaranjem laktata, supstrati za oksidativnu fosforilaciju dobijaju se iz metabolizma masnih i aminokiselina posredstvom TCA ciklusa. Masne kiseline se oksiduju do acetil-CoA, a aminokiseline do različitih supstrata TCA ciklusa [96, 97]. Pokazano je da postoje tumori koji koriste masne kiseline [98] i aminokiseline [99] kao osnovni izvor energije.

Pored inhibitora glikolize i supresori oksidativne fosforilacije su intenzivno ispitivani kao potencijalni lekovi za tretman tumora [95]. Jedan od njih je i rotenon (Slika 5), jedinjenje izolovano iz biljaka porodice mahunarki (Leguminosae). Rotenon blokira transfer elektrona sa kompleksa I respiratornog lanaca na CoQ, inhibirajući oksidaciju NADH u mitohondrijama i sintezu ATP. U mitohondrijama zatim nastaju RKV koje oštećuju DNK i druge komponente mitohondrija i tako inhibiraju njihovu funkciju i indukuju apoptozu [100, 101]. Osim toga, rotenon inhibira grupisanje mikrotubula i tako zaustavlja proliferaciju tumorskih ćelija [102]. Pokazano je da rotenon inhibira rast različitih tumorskih ćelija *in vitro* [103-107], kao i rast spontano ili hemijski indukovanih tumora u miševima i pacovima [108-112]. Zbog svoje velike lipofilnosti rotenon lako prolazi krvno moždanu barijeru [113], što je uzrok njegove neurotoksičnosti [114]. Takođe, rotenon je pokazao značajnu toksičnost prema hematopoetskom tkivu i koštanoj srži [115]. Međutim, kao inhibitor kompleksa I, rotenon pokazuje protektivnu ulogu u akutnoj bolesti bubrega nastaloj usled hipoksije [116]. Zbog velike sposobnosti tumorskih ćelija da menjaju svoj energetskei metabolizam u zavisnosti od dostupnosti supstrata, brojni pokušaji inhibicije samo jednog puta sinteze energije nisu imali značajnog uspeha.



Slika 5. Hemijska struktura rotenona

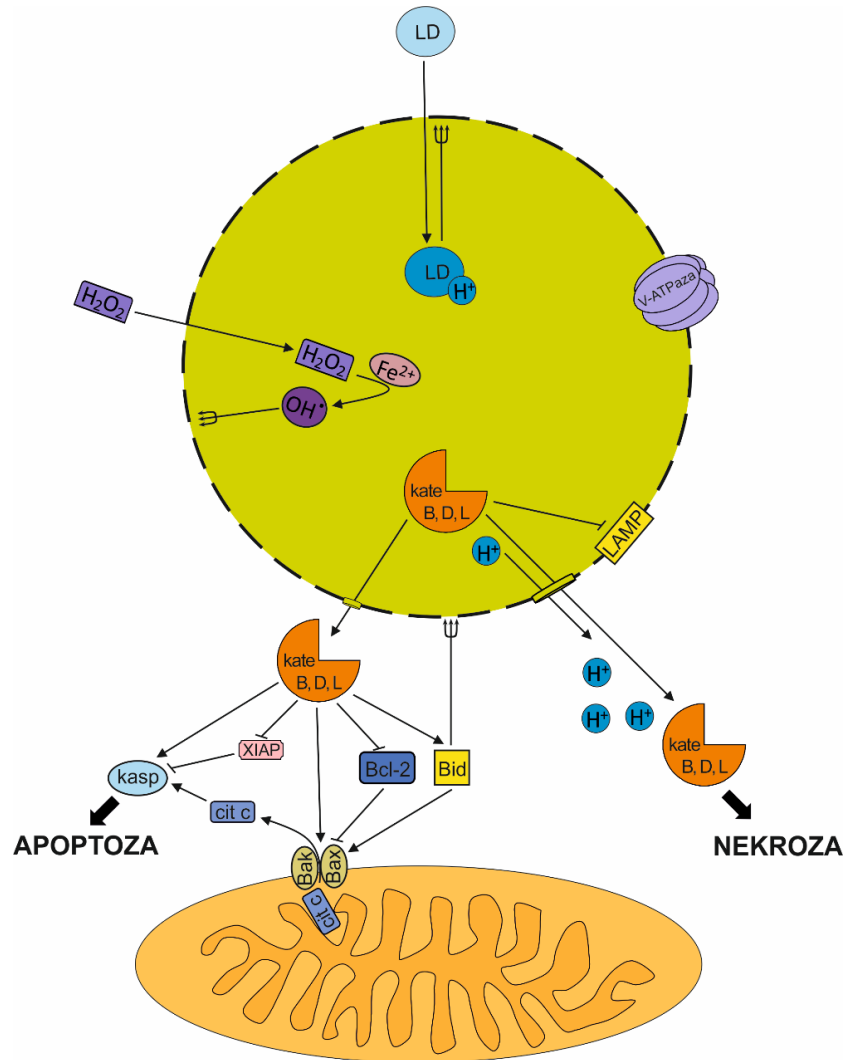
(preuzeto sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rotenone>)

Osim što se tokom maligne transformacije dešavaju promene u energetskom metabolizmu, utvrđeno je da dolazi i do značajnih promena u građi i funkciji lizozoma. Lizosome je prvi put uočio 1955. godine Cristian de Duve i opisao ih kao "digestivna tela" i za to otkriće dobio Nobelovu nagradu 1974. godine [117]. Ranije se smatralo da su u pitanju organele čiji sadržaj predstavlja ćelijski otpad, ali danas se zna da lizozomi učestvuju u brojnim procesima u ćeliji [117]. Glavna funkcija lizozoma je razgradnja ekstraćelijskih i unutarćelijskih komponenti dobijenih endocitozom, fagocitozom i autofagijom [117]. Lizozomi su organele koje poseduju jednoslojnu membranu, unutar koje sadrže preko 60 hidrolitičkih enzima, uključujući proteaze, nukleaze, lipaze, glikozidaze, fosfolipaze i fosfataze, koji se zajedno nazivaju kiselim hidrolazama, zbog svoje aktivnosti u kiseloj sredini kakva je u lizozomima (pH 4,8) [118, 119]. Međutim, pokazano je da lizozomalne cisteinske proteaze katepsin B i L, i aspartat proteaza katepsin D mogu biti aktivne i u neutralnoj sredini u citoplazmi (pH 7,2) [120]. Kisela pH sredina u lizozomima se održava aktivnošću vakuolarne H⁺ATP-aze (V-ATP-aza), koja za ubacivanje protona u lumen koristi energiju dobijenu hidrolizom ATP [117]. Ovaj enzim je strukturno sličan F₀F₁-ATP-azi mitohondrija [121].

Tokom onkogene transformacije ćelija i progresije tumora dolazi do povećanja broja i zapremine lizozoma, njihovog enzimskog sadržaja, kao i do redistribucije lizozoma iz perinukleusne u perifernu citoplazmu [122]. Ove promene promovišu invazivni rast tumora, angiogenezu i otpornost na lekove [122]. Zbog brzog i nekontrolisanog rasta tumorske ćelije akumuliraju veliku količinu proteinskih agregata i oštećenih organela koje se razgrađuju u autolizozomima [118]. Razgradnjom ćelijskog sadržaja u lizozimima obezbeđuje se glukoza koja se dalje razgrađuje glikolizom, aminokiseline i masne kiseline koje se dalje oksiduju u mitohondrijima, čime se dobija ATP neophodan za zadovoljavanje povećanih energetskih potreba tumorskih ćelija [123]. Osim toga, aminokiseline se koriste za sintezu novih proteina, a nukleozidi za sintezu nukleinskih kiselina. Sekretija lizozomalnih enzima u ekstraćelijski prostor pospešuje rast tumora, angiogenezu i nastanak metastaza [118]. Lizozomalna V-ATP-aza izbacuje protone van ćelije, što poput laktata nastalog aerobnom glikolizom, dovodi do zakišeljavanja mikrookoline tumora i pogoduje njegovom rastu [118]. Takođe, lizozomi imaju sposobnost da u svojoj unutrašnjosti zadržavaju blago bazne hidrofobne antitumorske lekove, koje zatim uklanjaju egzocitozom, sprečavajući ih na taj način da dođu do svojih meta u ćeliji, što dovodi do stvaranja multirezistencije [124, 125].

Osim što umnožavanje i uvećavanje lizozoma predstavlja selektivnu prednost za rast i progresiju tumora, imajući u vidu da curenje njihovih enzima u citoplazmu dovodi do smrti ćelija, lizozomi mogu biti i pogodna meta za antitumorsku terapiju [126]. Oslobođanje lizozomalnih hidrolaza i lizozomalna ćelijska smrt (LCD, *engl.* Lysosomal cell death) posledica su permeabilizacije membrane lizozoma (LMP, *engl.* Lysosomal membrane permeabilization) [127]. LMP uglavnom indukuju jedinjenja koja se akumuliraju u lizozomima i dovode do oštećenja membrane direktno ili indirektno povećavanjem osmotskog pritiska u lizozomu (Slika 6). U ova jedinjenja spadaju lizozomotropni deterdženti, dipeptidni metil estri, RKV, metaboliti lipida (sfingozin i fosfatidinska kiselina), katjonski amfifilni lekovi (*engl.* cationic amphiphilic drugs, CAD) [127]. Glavni medijatori LCD su katepsini B, D i L [128, 129], koji kada izađu iz lizozoma razlažu brojne proteine u citosolu (Slika 6). U zavisnosti od stepena oštećenja lizozoma, LCD može imati karakteristike ili apoptoze ili nekroze [130]. Obimno oštećenje lizozoma indukuje nekrozu zavisnu od aktivnosti katepsina i zakišeljavanja citoplazme [131]. Treba napomenuti da aktivnost katepsina ne zahteva potrošnju ATP [132]. S druge strane, ograničeni LMP može aktivirati apoptozu na nekoliko načina: 1. katepsini aktiviraju proapoptotske Bid i Bak proteine, i/ili inhibiraju antiapoptotske Bcl-2 proteine, dovodeći do permeabilizacije spoljašnje membrane mitohondrija i oslobođanja citohroma c [133, 134]; 2. katepsini u citoplazmi mogu direktno

aktivirati kaspaze [135]; 3. katepsini suprimiraju aktivnost inhibitora kaspaza XIAP-a [136]; 4. katepsini inhibiraju supresor apoptoze PARP [137, 138] (Slika 6).



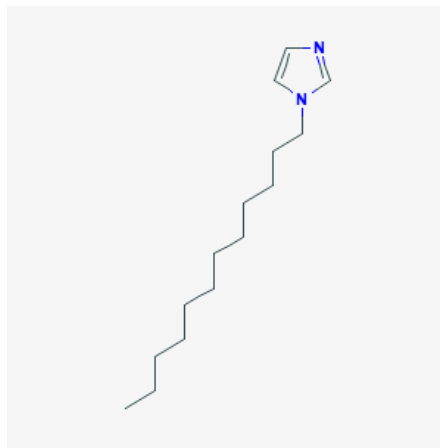
Slika 6. Pojednostavljeni model mehanizama LMP i LCD.

Linije sa strelicama predstavljaju stimulaciju, linije koje se završavaju sa ravnom crtom predstavljaju inhibiciju, dok linije sa koje se završavaju trozupcem predstavljaju štetne efekte na integritet membrane lizozoma. H_2O_2 se pretvara u izuzetno reaktivan OH^\bullet u prisustvu lizozomalnog Fe^{2+} i indukuje oksidativni stres. Nakon ulaska unutar lizozoma, lizozomalni deterđenti (LD) razvijaju surfaktantska svojstva i solubilizuju membranu lizozoma. V-ATP-aza održava kiselu pH sredinu u unutrašnjosti lizozoma. Katepsini B i D isecaju LAMP ili izlaze iz lizozoma. Katepsini B i D koji se oslobađaju u citoplazmu pri ograničenom LMP izazivaju apoptozu aktivacijom kaspaza ili inhibicijom XIAP koji suprimira kaspaze. Štaviše, katepsini B i D aktivacijom Bid i Bak ili inhibicijom Bcl-2 proteina indukuju otvaranje pora u membranama mitohondrija, nakon čega dolazi do oslobađanja citohroma c i aktivacije kaspaza. Citoplazmatsko zakiseljavanje i oslobađanje katepsina indukovano snažnim LMP indukuje nekrozu.

Pokazano je da se veliki lizozomi tumorskih ćelija mogu lakše oštetiti nego lizozomi netransformisanih ćelija [126]. Pored toga, katepsini degradiraju zaštitni LAMP protein (*engl.* lysosomal-associated membrane protein), koji se nalazi na unutrašnjoj strani membrane lizozoma,

čime povećavaju fragilnost membrane lizozoma tumorskih ćelija (Slika 6) [127]. Takođe, lizozomi tumorskih ćelija imaju povećanu koncentraciju destabilišućeg lipida sfingozina [139]. Konačno, zbog snažnog metabolizma tumorske ćelije imaju povećan promet proteina koji sadrže gvožđe i značajnu akumulaciju gvožđa u lizozomima (Fe^{2+}), što podstiče sintezu reaktivnog hidroksilnog radikala (OH^{\bullet}), koji narušava integritet membrane lizozoma i senzibilise tumorske ćelije na RKV (Slika 6) [140]. Važno je istaći da lizozomima nedostaju antioksidativni enzimi superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza što onemogućava antioksidativnu zaštitu lizozomalnih komponenti [141].

Jedan od kandidata za antitumorsku terapiju baziranu na permeabilizaciji lizozoma je N-dodecilimidazol (NDI), lizozomotropno jedinjenje sa svojstvima deterdženata, koje je 1979. godine sintetisao dr. Raymond Firestone sa svojim saradnicima [142, 143]. NDI predstavlja molekul koji na kraju dugog ugljovodoničnog lanaca sadrži imidazol (Slika 7) i zbog takve strukture ima sposobnost da difunduje kroz membranu lizozoma, pri čemu u kiseljoj sredini postaje protonovan i zarobljen, izazivajući dalje LMP i LCD [144-146]. Imajući u vidu da u kiselim uslovima NDI zadobija svojstva deterdženta, pretpostavlja se da bi mogao selektivno delovati na tumore, koji zbog anaerobnog metabolizma imaju smanjen ekstracelularni pH [144, 147, 148].



Slika 7. Hemijska struktura N-dodecilimidazola

(preuzeto sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Dodecyl-1H-imidazole#section=Structures>)

Postoji višestruka međusobna povezanost energetskog metabolizma i lizozoma. Kao što je već rečeno, supstrati za energetski metabolizam poput glukoze, masnih kiselina i aminokiselina se mogu dobiti razgradnjom u autolizozomima procesom autofagije [149, 150]. Pored toga, autofagija, tačnije mitofagija, pomaže u održavanju homeostaze i funkcije mitohondrija, glavnih proizvođača energije u eukariotskoj ćeliji [123]. Biogeneze i lizozoma i mitohondrija aktivirane su istim transkripcionim faktorom TFEB [123]. U prisustvu hranljivih materija glavni regulator rasta i metabolizma mTORC1 se regrutuje i aktivira na membrani lizozoma, a zatim inhibira proces autofagije, i stimuliše metabolizam glukoze i različite procese za koje je neophodna energija, kao što su biogeneza ribozoma, sinteza proteina, lipida i nukleotida [151]. U lizozomima se skladišti značajna količina ATP [152]. ATP je neophodan za aktivnost lizozomalne V-ATP-aze i funkcionisanje lizozoma [139, 153]. Takođe, smanjenje koncentracije kiseonika, glukoze i deprivacija seruma dovode do smanjenja koncentracije LAMP proteina i na taj način destabilizuju membranu lizozoma [154].

Kombinovana terapija je osnova moderne terapije kancera. Upotreba lekova koji imaju različite mehanizme antitumorskog delovanja povećava učestalost i intenzitet terapijskog odgovora, a istovremeno smanjuje verovatnoću razvoja rezistentnih ćelija i pojavu neželjenih efekata. Mnogi lekovi se danas kombinuju u hemioterapiji na osnovu podataka o njihovom aditivnom ili sinergističkom delovanju dobijenom na ćelijskim linijama i *in vivo* modelima tumora [155]. Iako je pokazano da 2DG, inhibitor glikolize, osnovnog metaboličkog puta za sintezu energije u tumorskim ćelijama [73], ispoljava snažno citotoksično delovanje prema tumorskim ćelijama *in vitro*, njegovi antitumorski efekti u *in vivo* studijama bili su skromni. Sa druge strane, pokazano je da 2DG značajno povećava antitumorski efekat različitih citostatika, kako u *in vivo* tako i u kliničkim ispitivanjima [90, 92]. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivali smo antitumorski efekat dva kombinovana antitumorska tretmana koja se zasnivaju na korišćenju inhibitora 2DG.

U prvom delu studije 2DG smo kombinovali sa inhibitorom oksidativne fosforilacije rotenonom. Iako većina tumorskih ćelija preferencijalno koristi glikolizu za sintezu ATP [48], u uslovima kada je glikoliza inhibirana tumorske ćelije imaju sposobnost da prilagode svoj energetski metabolizam dostupnim supstratima i preusmere ga na neki drugi metabolički put, npr. oksidativnu fosforilaciju. Antitumorska strategija koja se zasniva na istovremenoj inhibiciji glikolize i oksidativne fosforilacije poznata je od ranije [156, 157], uključujući i antitumorsko dejstvo kombinovanog tretmana 2DG sa rotenonom [157-159]. Međutim, unutarćelijski mehanizmi antitumorskog delovanja 2DG i rotenona gotovo su neispitani.

U drugom delu studije 2DG smo kombinovali sa lizozomalnim deterdžentom NDI, koji ima sposobnost da izazove destabilizaciju lizozoma. Ovo jedinjenje smo izabrali jer se zna da tumorske ćelije imaju uvećan broj i zapreminu lizozoma, kao i da su njihovi lizozomi nestabilniji od lizozoma netransformisanih ćelija [122], a da izlivanje lizozomalnog sadržaja u citoplazmu indukuje ćelijsku smrt [118]. Osim toga, poznato je da u tumorima postoji višestruka uzajamna povezanost između energetskog metabolizama i lizozoma [123, 149, 150]. U dosadašnjoj naučnoj literaturi ne postoji nijedna studija u kojoj je ispitivano antitumorsko delovanje istovremene inhibicije glikolize i destabilizacije lizozoma.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ova doktorska disertacija ima sledeće ciljeve istraživanja:

1. Ispitati kakav uticaj imaju inhibitor glikolize 2DG i inhibitor oksidativne fosforilacije rotenon, odnosno 2DG i lizosomalni deterdžent NDI, samostalno i u kombinaciji na vijabilitet i proliferaciju ćelija melanoma i glioma *in vitro*.
2. Ispitati koji tip smrti tumorskih ćelija indukuje 2DG samostalno ili u kombinaciji sa rotenonom ili NDI *in vitro*.
3. Ispitati koji unutarćelijski mehanizmi su odgovorni za smrt tumorskih ćelija indukovanu 2DG samostalno ili u kombinaciji sa rotenonom ili NDI *in vitro*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Rastvori i reagensi

U izradi ove disertacije korišćeni su sledeći reagensi: medijum za kultivaciju ćelija - RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute Medium, GIBCO, Life Technologies), serum fetusa govečeta (*engl.* fetal calf serum, FCS, Capricorn Scientific), L-glutamin (Capricorn Scientific), natrijum piruvat (GIBCO, Life Technologies), rastvor antibiotika i antimikotika (Capricorn Scientific), HEPES, EDTA, PBS (*engl.* phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), tripsin (Capricorn Scientific), dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich), 2-dezoksi-D-glukoza (Sigma-Aldrich), NDI (Princeton Global Synthesys, Bristol, PA), rotenon (Sigma-Aldrich), D-glukoza (Zorka, Srbija), jodoacetat (IA, Sigma-Aldrich), natrijumfluorid (NaF, Sigma-Aldrich), 1-metil-4- fenilpiridinijum (MPP⁺, Sigma-Aldrich), karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon (CCCP, Sigma-Aldrich), MTT (3-4,5dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich), kristal violet, metanol, H₃PO₄ (Zorka), jodonitrotetrazolijum hlorid, mlečna kiselina, N-metilfenazonijum metilsulfat, β-nikotinamid dinukleotid, triton X-100 (sve Sigma Aldrich), aneksin V-FITC/PI i aneksin V-FITC/7AAD (Biologend Inc.), ApoStat (R&D Systems), Q-VD-Oph (Calbiochem), Z-VAD-FMK (Sigma-Aldrich), deferoksamin (DFO, Sigma-Aldrich), batofenantrolindisulfonska kiselina (BPS, 4,7-di(4-fenilsulfonat)-1,10-fenantrolin, Sigma-Aldrich), nekrostatin-1 (Santa Cruz), E64d (Tocris Bioscience), akridin-oranž (AO, Sigma-Aldrich), zeleni i crveni lizotreker (LysoTracker Green DND-26, LysoTracker Red DND-99, Thermo Fisher Scientific), mitotreker red (MitoTracker Red CMXRos, Life Technologies), JC-1 (5,5',6,6'-tetrahaloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol karbocijanin jodid, Sigma-Aldrich), dihidrorodamin (DHR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), MitoSOX Red (Invitrogen), vitamin E (α-tokoferol, Sigma-Aldrich), hlorokin (CQ, Tocris Bioscience), bafilomicin (BAF, Tocris Bioscience), amonijum hlorid (NH₄Cl, Merck), 4, 4'-diizotiocijano-2, 2'-stilbenedisulfonska kiselina (DIDS, Sigma-Aldrich), leucin (Sigma-Aldrich), SP600125 (Sigma-Aldrich), tiobarbituratna kiselina (TBA, Sigma-Aldrich), malondialdehid (MDA, Sigma-Aldrich), bioluminescentni kit za detekciju ATP (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Applied Science), kit za frakcionaciju ćelija (FractionPREP™ Cell Fractionation kit, BioVision), glutaraldehid (Sigma-Aldrich), kakodilatni pufer (Merck), osmium tetroksid (Spi-chem), uranil acetat (Sigma-Aldrich), propilen oksid (Sigma-Aldrich), Epon smola (Agar Scientific), toluidin plavo (Sigma-Aldrich), olovo citrat (Sigma-Aldrich), albumin iz seruma govečeta (*engl.* bovine serum albumin, BSA), akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED, Serva), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, Thermo Fisher Scientific), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza, natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, glicin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Tween 20 (Serva), odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth), zečja antitela protiv formi LC3, p62, beclin-1, ATG5, ATG7, p4EBP, 4EBP, p-AMPK, AMPK, pJNK, JNK, pERK, ERK, p-Raptor, Raptor, PARP, prokaspaza/kaspaza-3, p-RIP, p-MLKL, citohrom c, TOM20 (Cell Signaling Technology), RIP, MLKL, heksokinaza II (Santa Cruz Biotechnology) i β-aktina (Abcam), kozji anti-zečji IgG konjugovan sa peroksidazom rena (Jackson ImmunoResearch), siRNA AMPK, beclin-1, LC3, RIP, MLKL (Santa Cruz Biotechnology), ATG5, ATG7 (Qiagen). Vreme inkubacije i koncentracije određenih agenasa su navedeni na slikama ili u legendama slika.

NDI je čuvan na -20°C i pred svaki tretman je rastvaran u DMSO rastvoru do 1M koncentracije, a potom razblaživan u medijumu do navedene koncentracije. 4mM rotenon je čuvan

na -20°C rastvoren u DMSO i pred svaki eksperiment je rastvaran u medijumu do navedene koncentracije. 2DG je čuvana na 4°C i pred tretman rastvarana u medijumu do navedene koncentracije.

3.2. *In vitro* kultivacija ćelijskih kultura i primarnih ćelija

Dejstvo 2DG samostalno i u kombinaciji sa rotenonom ili NDI je ispitivano na U251 ćelijama glioma čoveka, B16 ćelijama mišjeg melanoma, L929 ćelijama mišjeg fibrosarkoma, primarnim astrocitima pacova i primarnim mišjim mezenhimalnim stem ćelijama (MSC) *in vitro*. Ćelijske linije U251, B16 i L929 nabavljene su od Evropske kolekcije ćelijskih kultura (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velika Britanija). Primarni astrociti izolovani iz mozgova novorođenih Albino Oxford pacova dobijeni su od prof. dr Aleksandre Isaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, dok su primarne mišje (C57BL/6) mezenhimalne stem ćelije (Invitrogen, Paisley, Ujedinjeno Kraljevstvo; S1502-100) dobijene od prof. dr Vladislava Volarevića, Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu. Ćelije su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, u RPMI 1640 medijumu puferizovanom sa HEPES (20 mM) i sa dodatkom fetalnog goveđeg seruma (5% FCS za U251, L929 i primarne astrocite, a 10% FCS za B16 i MSC ćelije), 1% L-glutamina (2 mM) i 1% rastvora antibiotika i antimikotika. U medijum za primarne astrocite su dodati i 2-merkaptoetanol (0.4%) i 45% glukoza (1.5%).

Ćelijske linije su čuvane zamrznute u tečnom azotu. Odmrzavanje ćelija je vršeno prema standardnom protokolu. Po odmrzavanju ćelije su propagirane u petri šoljama za kultivaciju adherentnih ćelija od 100 mm. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su ispirane sa PBS, tripsinizirane, centrifugirane 5 minuta na 500 g, resuspendovane i gajene u preporučenom medijumu.

Za potrebe pasažiranja, održavanja ćelijskih kultura i izvođenja eksperimenata, ćelije su zasejavane u različitom broju u odgovarajuće polistirenske sudove kompanije Sarstedt za rad sa adherentnim ćelijama. Za ispitivanje uticaja tretmana na vijabilnost ćelije su zasejavane u ploče sa ravnim dnom sa 96 bunara (1×10⁴ ćelija/bunaru), dok su za analize na protočnom citofluorimetru zasejavane u ploče sa 24 bunara (1×10⁵ ćelija/bunaru). Za elektronsku mikroskopiju i imunoblot analize ćelije su zasejavane u petri šolje od 100 mm (2×10⁶ ćelija/petri šolji). Za ispitivanja sa siRNK ćelije su gajene u pločama sa 6 bunara (8×10⁵ ćelija/bunaru). Ćelijske linije su tretirane 24 h nakon zasejavanja, a nakon toga su analizirane po postupcima kao što je detaljnije opisano u rezultatima i legendama slika.

3.3. Testovi vijabilnosti

Antiproliferativni efekat inhibitora glikolize 2DG samostalno i u kombinaciji sa inhibitorom oksidativne fosforilacije rotenonom ili lizozomalnim deterđžentom NDI, odnosno njihov uticaj na vijabilnost tumorskih ćelijskih linija i primarnih ćelija određivan je kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza, laktat dehidrogenaze, kao i određivanjem broja adherentnih ćelija kristal violet testom.

3.3.1. Test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza

Princip kolorimetrijskog MTT testa zasniva se na redukciji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida dehidrogenazama poreklom iz mitohondrija metabolički aktivnih ćelija. U ovoj reakciji prilikom cepanja tetrazolijumskog prstena nastaje nerastvorljivi formazan, koji poseduje intenzivnu boju. Kristali formazana se lako rastvaraju u DMSO, pri čemu se razvija ljubičasta boja koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija zbog čega je MTT test pogodan za merenje broja vijabilnih ćelija, njihove metaboličke aktivnosti i proliferacije.

Po isteku tretmana medijumi iz bunarića su odlivani, a potom je nalivano po 50 μ l rastvora MTT (0,5 mg/ml u medijumu). Nakon 30 minuta inkubacije ćelija na 37°C MTT je uklonjen i u bunariće je dodato po 50 μ l DMSO, koji rastvara stvoreni formazan pri čemu se razvija intenzivna ljubičasta boja čiji intenzitet je određivan spektrofotometrijski merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 570 nm, na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča (Sunrise, Tecan, Dorset, Velika Britanija). Vrednosti izmerenih apsorbanci predstavljaju meru enzimske aktivnosti, odnosno proporcionalne su broju živih ćelija.

3.3.2. Kristal violet test

Kristal violet test je metoda koja se koristi za određivanje relativnog broja živih ćelija.

Na kraju perioda inkubacije iz bunarića je uklonjen medijum i adhezivne ćelije su isprane PBS puferom kako bi se uklonile mrtve ćelije. Nakon ispiranja adherentne ćelije su fiksirane inkubiranjem u metanolu 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim su bojene sa 1% rastvorom kristal violet boje 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, bunarići su temeljno ispirani u vodi da bi se odstranio višak boje, nakon čega su ostavljeni da se osuše. Kristal violet boja koja se vezala za fiksirane ćelije je rastvarana u 33% rastvoru sirćetne kiseline. Intenzitet rastvorene boje je meren na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča (Sunrise, Tecan, Dorset, Velika Britanija) na 570 nm i proporcionalan je broju živih adherentnih ćelija.

Od vrednosti apsorbanci izmerenih MTT i kristal violet testom oduzimane su vrednosti apsorbanci DMSO i 33% sirćetne kiseline u bunarima bez ćelija. Rezultati oba testa su prikazani kao % tretiranih u odnosu kontrolne (netretirane) ćelije čija vijabilnost je arbitrarno postavljena na 100%.

3.3.3. Test oslobađanja laktat dehidrogenaze

Test aktivnosti citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH) se koristi za ispitivanje ćelijske smrti koja nastaje usled narušavanja integriteta membrane ćelija. Tokom apoptoze ili nekroze može doći do oštećenja ćelijske membrane, pri čemu se LDH oslobađa iz citosola u okolni medijum. Aktivnost enzima laktat dehidrogenaze u medijumu direktno je proporcionalna broju mrtvih ćelija, zbog čega se smatra merom citotoksičnosti ispitivanog agensa. Pored netretiranih kontrolnih ćelija, neophodno je izmeriti i aktivnost LDH enzima pozitivne kontrole (100% mrtvih ćelija), koja se meri nakon potpune dezintegracije ćelijskih membrana svih ćelija u bunariću primenom nejonskog deterdženta Triton X-100, i predstavlja apsorbancu maksimalno oslobođenog LDH. LDH test se zasniva na dve reakcije oksido-redukcije. U prvoj reakciji LDH katalizuje oksidaciju laktata do piruvata, uz istovremenu redukciju koenzima NAD^+ do NADH i H^+ . U drugoj

reakciji se pomoću redukovanog N-metilfenazonijum metilsulfata H^+ prenosi na jodonitrotetrazolijum hlorid, pri čemu se i on sam redukuje u formazan, koji daje intenzivan crveno obojeni rastvor koji apsorbuje svetlost talasne dužine 492 nm.

Po završetku tretmana 50 μ l supernatanta iz svakog bunarića je uzeto i preneto u novu ploču a potom pomešano sa 50 μ l supstrata za LDH. Supstrat za LDH se priprema mešanjem 54 mM mlečne kiseline, 0,66 mM jodonitrotetrazolijum hlorida, 0,28 mM N-metilfenazonijum metilsulfata i 1,3 mM β -nikotinamid adenin dinukleotida (β -NAD⁺) rastvorenih u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2 u identičnim zapreminama. Nekoliko minuta nakon mešanja supernatanta i supstrata na sobnoj temperaturi, na čitaču mikrotitarskih ploča (Sunrise, Tecan, Dorset, Velika Britanija) merene su apsorbance na talasnoj dužini od 530 nm sa korekcijom na 650 nm. Citotoksičnost ispitivanog agensa je računata u procentima tako što je od svake izmerene apsorbance LDH tretiranih ćelija oduzimana apsorbance kontrolnih (netretiranih) ćelija i ta vrednost je deljena sa razlikom apsorbanci pozitivne kontrole (100% mrtvih ćelija) i kontrolnih (netretiranih) ćelija, a potom množena sa brojem 100:

$$\% C = [(T-NK)/(PK-NK)] \times 100, \text{ gde je:}$$

C - citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

T - apsorbance tretiranih ćelija

NK - negativna kontrola, apsorbance kontrolnih (netretiranih) ćelija

PK - pozitivna kontrola, apsorbance mrtvih ćelija dobijenih liziranjem pomoću triton X-100

3.4. Ispitivanje uzajamnog dejstva dva agensa

Uzajamni efekti različitih agenasa u kombinovanom tretmanu u odnosu na njihov efekat u pojedinačnim tretmanima na ćelije u kulturi, ispitivani su primenom matematičkih analiza izračunavanja α indeksa. α indeks predstavlja proizvod frakcije živih ćelija tretiranih samo sa 2DG i frakcije živih ćelija tretiranih samo sa ROT ili NDI, podeljen sa frakcijom živih ćelija tretiranih sa kombinovanim tretmanom 2DG+ROT ili 2DG+NDI, dobijenih kristal violet testom nakon 24 h od početka tretmana.

$$\alpha = SF_{2DG} \times SF_{ROT} / SF_{2DG+ROT}$$

$$\alpha = SF_{2DG} \times SF_{NDI} / SF_{2DG+NDI}$$

SF - frakcija živih ćelija posle pojedinačnih tretmana 2DG, ROT, NDI ili njihovih kombinovanih tretmana 2DG+ROT i 2DG+NDI

Ukoliko je $\alpha=1$ uzajamni efekat dva agensa je aditivni, ukoliko je $\alpha>1$ efekat je sinergistički, a ako je $\alpha<1$ efekat je antagonistički [160].

3.5. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfologija i gustina (proliferacija) ćelija mišjeg melanoma B16 i humanog glioma U251 analizirane su korišćenjem invertnog mikroskopa sa faznim kontrastom (Leica Microsystems DMIL, Veclar, Nemačka), Leica Microsystems DFC320 kamere i Leica Application Suite (verzija 2.8.1) softvera.

3.6. Analiza parametara ćelijske smrti primenom protočne citofluorimetrije

Parametri ćelijske smrti su ispitivani primenom metode protočne citofluorimetrije (FACS, *engl.* Fluorescence-Activated Cell Sorting) na aparatima FACSCalibur sa CellQuest softverom (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države) i FACS Aria III sa FACSDiva 6.0 softverom (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države), a potom su analizirani pomoću FlowJo softvera (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države). Merenja parametara su vršena pojedinačno za svaku ćeliju u suspenziji, 10000 ćelija po uzorku, pri čemu je svaki uzorak ispitivan u duplikatu ili triplicatu, čime su dobijeni statistički relevantni podaci koji se odnose na sveukupnu populaciju ćelija. Korišćenjem protočne citofluorimetrije ispitivano je prisustvo apoptoze, nekroze i autofagije u ćelijskoj kulturi, aktivacija kaspaza, produkcija superoksida, promena membranskog potencijala mitohondrija, permeabilizacija membrane lizozoma.

3.6.1. Određivanje zastupljenosti apoptoze i nekroze

Da bi se ispitao udeo ćelija u apoptozi i nekrozi u uzorku nakon tretmana, ćelije su analizirane na protočnom citofluorimetru nakon dvostrukog bojenja sa fluorescentnim bojama aneksin V-fluorescein-izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI) ili aneksin V-FITC i 7-aminoaktinomycinom D (7-AAD) (Biolegend Inc., Sjedinjene Američke Države). Aneksin V je protein obeležen fluorohromom (FITC) koji nakon pobuđivanja laserskom svetlošću protočnog citofluorimetra emituje zelenu fluorescencu. Aneksin V-FITC se vezuje za fosfatidilserinske ostatke koji se nalaze na površini ćelijskih membrana ćelija u apoptozi čiji je integritet očuvan. PI i 7AAD su fluorescentne boje koje ulaze u ćelije sa oštećenom membranom, interkaliraju se između nukleinskih baza DNK ćelija, pri čemu se emituje crvena fluorescencija proporcionalna količini sadržaja DNK ćelija u nekrozi. PI i 7AAD ne mogu da prođu kroz intaktnu ćelijsku membranu i jedarnu membranu živih ćelija, i ćelija u ranoj apoptozi [161], ali prolaze kroz oštećenu membranu ćelija u kasnoj apoptozi ili nekrozi i vezuju se za njihovu DNK. Nakon dvostrukog bojenja sa aneksin V-FITC i PI ili aneksin V-FITC i 7AAD bojama, zelena i crvena fluorescencija su analizirane kako bi se utvrdio procenat broja živih (aneksin⁻/PI⁻; aneksin⁻/7AAD⁻), rano apoptotičnih (aneksin⁺/PI⁻; aneksin⁺/7AAD⁻), kasno apoptotičnih odnosno nekrotičnih ćelija (aneksin⁺/PI⁺; aneksin⁺/7AAD⁺).

Po završetku tretmana, medijumi iz bunarića su uklonjeni, ćelije oprane u PBS, tripsinizirane i prebačene u odgovarajuće FACS tube. Nakon toga su centrifugirane 5 minuta na 500 g, oprane u 3 ml PBS 5 minuta na 500 g, a potom obojene u skladu sa uputstvima proizvođača (Biolegend Inc., Sjedinjene Američke Države). Ukratko, ćelije su resuspendovane u 100 µl aneksin vezujućeg pufera sa aneksin V-FITC (2 µg/ml) i inkubirane 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Neposredno pre analiziranja na protočnom citofluorimetru, u suspenziju ćelija je dodato još 300 µl aneksin vezujućeg pufera i 10 µl propidijum jodida (20 µg/ml) ili 3 µl 7AAD (50 µg/ml). Nakon 5 minuta inkubacije, na protočnom citofluorimetru je određivan procenat živih, apoptotičnih i nekrotičnih ćelija korišćenjem CellQuest Pro softvera na FACSCalibur ili FACSDiva 6.0 softvera na FACS Aria III aparatu.

3.6.2. Određivanje fragmentacije DNK

Apoptoza je ispitivana na protočnom citofluorimetru u ćelijama obeleženim sa fluorohromom PI, pri čemu je praćena DNK fragmentacija, jedna od glavnih odlika apoptotske ćelijske smrti. Ova metoda se zasniva na sposobnosti fluorohroma PI da se umeće u dvolančani molekul DNK i RNK, pri čemu emituje crvenu fluorescencu koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji [162]. Pomoću ove metode se može izvršiti analiza različitih faza ćelijskog ciklusa (G₀/G₁-faza rasta ćelija, S-faza replikacije DNK molekula, G₂/M-faza ćelijske deobe) i kvantifikacija fragmentacije DNK molekula ćelija u apoptozi, koje se nalaze u subG₀ fazi ćelijskog ciklusa. Tokom kasne faze apoptoze endonukleaze isecaju molekul DNK, pri čemu se formiraju DNK fragmenti veličine oko 180 baznih parova, koji se akumuliraju u ćeliji. Ovi fragmenti se mogu ukloniti iz uzorka fiksiranjem ćelija etanolom i ispiranjem PBS puferom, čime se smanjuje sadržaj DNK molekula u ćeliji. Zbog nižeg sadržaja DNK, ćelije koje su u apoptozi se nakon bojenja sa PI i detekcije crvene fluorescence na protočnom citofluorimetru distribuiraju na histogramu ispred živih ćelija, formirajući hipodiploidni region ili sub-G₀/G₁ zonu specifičnu za apoptozu. PI boja se takođe vezuje i za RNK molekul, pa je neophodno razgraditi RNK prisutnu u uzorcima korišćenjem enzima RNA-ze.

Nakon isteka inkubacije medijumi su uklonjeni iz bunara, ćelije oprane u 1 ml PBS, tripsinizirane i centrifugirane 5 minuta na 500 g, ponovo oprane u 3 ml PBS i centrifugirane 5 minuta na 500 g, nakon čega je PBS uklonjen a ćelije fiksirane u 1 ml 70% etanola 60 minuta na 4°C. Zatim je ponovljeno pranje ćelija u 3 ml PBS, kako bi se uklonio etanol, i centrifugiranje 7 minuta na 800 g. Ćelije su resuspendovane u 500 µl PBS, dodata im je RNA-za (70 µg/ml) i inkubirane su 15 minuta na 37°C. Nakon toga, ćelijama je dodat PI (20 µg/ml) i inkubacija je produžena za još 30 minuta na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije usledilo je analiziranje na protočnom citofluorimetru. Crvena fluorescenca koja je detektovana je poreklom od kompleksa PI-DNK. Udeo hipodiploidnih ćelija sa fragmentisanom DNK u sub-G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa određen je pomoću FACSDiva 6.0 softvera i predstavljen je kao % ćelija u sub-G₀/G₁ fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.6.3. Određivanje aktivacije kaspaza

Aktivacija kaspaza je takođe jedna od glavnih odlika apoptoze. Kaspaze su cistein proteaze koje nakon aktivacije dovode do razgradnje proteina, fragmentacije DNK, kondenzacije hromatina i apoptotske ćelijske smrti. Aktivacija kaspaza analizirana je na protočnom citofluorimetru nakon obeležavanja ćelija sa pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat (ApoStat; R&D Systems, Sjedinjene Američke Države), koji prolazi kroz ćelijsku membranu i obeležen je fluorescein izotiocijanatom (FITC). ApoStat se u ćelijama selektivno vezuje za aktivirane kaspaze, a intenzitet očitane zelene fluorescence FITC boje direktno je proporcionalan aktivnosti kaspaza. Analize su obavljene na FACSCalibur i FACS Aria III protočnim citofluorimetrima.

Nakon isteka inkubacije, medijumi su uklonjeni iz bunara, ćelije oprane u 1 ml PBS, tripsinizirane i centrifugirane 5 minuta na 500 g, ponovo oprane u 3 ml PBS i centrifugirane 5 minuta na 500g. Potom su supernatanti odliveni a ćelije resuspendovane u 100 µl ApoStat (0.5 µg/ml) rastvorenog u medijumu za kultivaciju ćelija, nakon čega su inkubirane u mraku 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, u svaku epruvetu je dodato po 3 ml PBS, kako bi se isprala nevezana boja, i ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g. Nakon toga ćelije su resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su predstavljeni u vidu histograma raspodele intenziteta zelene fluorescence koja predstavlja % ćelija sa aktiviranim kaspazama.

Povećanje detektovane zelene fluorescence FITC boje, odnosno pomeranje histogramskog zapisa udesno u odnosu na kontrolu, proporcionalno je aktivnosti kaspaza u tretiranim ćelijama.

3.6.4. Određivanje aktivacije kaspaze 8 i 9

Aktivacija kaspaze-8, inicijatorske kaspaze spoljašnjeg puta apoptoze, i aktivacija kaspaze-9, inicijatorske kaspaze unutrašnjeg puta apoptoze, analizirane su na protočnom citofluorimetru korišćenjem odgovarajućih kitova za detekciju aktivacije kaspaze-8 i -9 (*engl.* CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit, Biovision, Sjedinjene Američke Države). Ćelije su nakon tretmana obeležavane specifičnim inhibitorima IETD-FMK za kaspazu-8 i LEHD-FMK za kaspazu-9, prema uputstvima proizvođača. Oba inhibitora su konjugovana sa FITC fluoroforom (FITC-IETD-FMK i FITC-LEDH-FMK), ćelijski permeabilna, netoksična i ireverzibilno se vezuju za kaspaze-8 ili -9 u živim apoptotičnim ćelijama, pri čemu se emituje zelena fluorescenca.

Nakon isteka tretmana, medijumi su uklonjeni iz bunara, ćelije oprane u 1 ml PBS, zatim su tripsinizirane, prebačene u epruvete za protočnu citometriju i centrifugirane 5 minuta na 500 g. Potom su odliveni supernatanti, a talog sa ćelijama resuspendovan u 300 µl medijuma za kultivaciju ćelija u koji je dodat 1 µl odgovarajućeg inhibitora i inkubiran 60 minuta na 37°C. Ćelije su zatim centrifugirane 5 minuta na 500 g, supernatanti odliveni i resuspendovani u 500 µl komercijalnog pufera za pranje (*engl.* washing buffer). Procedure centrifugiranja i ispiranja u puferu su ponovljene na isti način još jednom, a zatim su ćelije resuspendovane u 500 µl pufera za pranje i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati predstavljaju povećanje srednjeg intenziteta zelene fluorescence poreklom od FITC-obeleženog specifičnog inhibitora za kaspazu-8 i -9, što ukazuje na njihovu aktivaciju.

3.6.5. Merjenje membranskog potencijala mitohondrija

Membranski potencijal mitohondrija je ispitivan na protočnom citofluorimetru korišćenjem fluorofore JC-1 (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države) i MitoTracker Red CMXRos (Life Technologies, Sjedinjene Američke Države).

JC-1 boja (5,5',6,6'-tetrahaloro-1,1',3,3'-tetra-etilbenzimidazol-karbocijanin jodid) je lipofilni katjon koji zahvaljujući svom pozitivnom naelektrisanju prolazi kroz membranu mitohondrija kada su one sa unutrašnje strane negativno naelektrisane, odnosno kada je potencijal membrane mitohondrija neizmenjen i sama membrana očuvana. U matriksu mitohondrija boja formira agregate koji fluoresciraju crveno. Ukoliko je membranski potencijal narušen, kao što je slučaj u apoptozi, boja ne može da prođe kroz intermembranski prostor i ostaje u citoplazmi u svom monomernom obliku i fluorescira zeleno. Zeleni monomeri i crveni agregati JC-1 boje detektuju se pomoću protočnog citofluorimetra. Povećanje zelene u odnosu na crvenu fluorescencu ukazuje na depolarizaciju membrane, dok povećanje crvene u odnosu na zelenu fluorescencu ukazuje na hiperpolarizaciju membrane mitohondrija.

Nakon tretmana medijumi su uklonjeni iz bunarića, ćelije su oprane u 1 ml PBS, a zatim tripsinizirane i centrifugirane 5 minuta na 500 g, oprane u 3 ml PBS, oborene 5 minuta na 500 g, potom su supernatanti odlivani a talog ćelija resuspendovan u 100 µl JC-1 boje (5 µg/ml) rastvorene u reakcionom puferu. Uzorci su nakon dodavanja boje inkubirani 30 minuta na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije uzorci su oprani u 3 ml PBS i centrifugirani 5 minuta na 500 g, a

potom resuspendovani u 500 μ l PBS. Detekcija fluorescenci zelenih monomera i crvenih agregata JC-1 boje je vršena na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani histogramom distribucije odnosa zelene i crvene fluorescence, arbitrarno postavljenim na 1 u kontrolnim uzorcima, čije povećanje odražava depolarizaciju, a smanjenje hiperpolarizaciju membrane mitohondrija.

Funkcija mitohondrija živih ćelija je takođe ispitivana korišćenjem fluorescentne boje Mitotrek Red CMXRos (*engl.* Mitotracker Red Chloromethyl-X-rosamine) na protočnom citofluorimetru i fluorescentnom mikroskopu. Mitotrek Red CMXRos je lipofilni katjon koji se takođe nakuplja u unutrašnjosti mitohondrija zahvaljujući negativnom potencijalu membrana mitohondrija (MMP, *engl.* mitochondrial membrane potential). Povećanje crvene fluorescence CMXRos boje je proporcionalno povećanju MMP u ćelijama i oslikava hiperpolarizaciju membrane, dok smanjenje crvene fluorescence ukazuje na depolarizaciju mitohondrija. Priprema radnog rastvora Mitotrek boje, finalne koncentracije 100 nM i bojenje ćelija su obavljani u skladu sa uputstvom proizvođača.

Nakon isteka tretmana, medijumi iz bunarića su uklonjeni i zamenjeni sa rastvorom mitotrek red boje u medijumu za kultivaciju ćelija koji je prethodno ugrijan na 37°C u skladu sa uputstvima proizvođača. Ćelije su potom inkubirane sa fluorescentnom bojom 45 minuta na 37°C u mraku. Nakon isteka inkubacije medijum sa bojom je uklonjen, bunarići su isprani dva puta sa 1 ml PBS i dodat je prethodno ugrijan medijum za kultivaciju ćelija. Nakon toga, ćelije su posmatrane na Leica DMIL invertnom fluorescentnom mikroskopu opremljenim sa Leica Microsystems DFC320 kamerom i Leica Application Suite softverom (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka). Takođe, nakon inkubacije ćelija u medijumu sa fluorescentnom bojom, medijumi su uklonjeni iz bunarića, ćelije su oprane u 1 ml PBS, zatim tripsinizirane i centrifugirane 5 minuta na 500 g, nakon čega su supernatanti odliveni a talog ćelija resuspendovan u 500 μ l medijuma za kultivaciju. Ćelije su potom analizirane na protočnom citofluorimetru pri čemu je merena promena emisije crvene fluorescence mitotrek boje.

3.6.6. Određivanje unutarćelijske produkcije slobodnih kiseoničnih radikala

Za ispitivanje unutarćelijske produkcije slobodnih kiseoničnih radikala ćelije su bojene neselektivnom redoks-senzitivnom bojom dihidrorodamin 123 (DHR, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države) i bojom specifičnom za superoksid anjon radikal O_2^- iz mitohondrija (MitoSOXTM Red, Invitrogen, Sjedinjene Američke Države) i analizirane na protočnom citofluorimetru. DHR je lipofilna boja koja u svom osnovnom obliku ne fluorescira i ulazi u mitohondrije pasivnom difuzijom. U mitohondrijama se oksiduje pod uticajem slobodnih kiseoničnih radikala i prelazi u katjonski derivat rodamin 123, koji fluorescira zeleno i akumulira se u mitohondrijama. MitoSox Red je boja koja ulazi u mitohondrije živih ćelija i oksiduje se pod uticajem superoksidnih anjona, ali ne i drugih reaktivnih vrsta kiseonika ili reaktivnih vrsta azota, pri čemu emituje crvenu fluorescencu. Bojenje ćelija je urađeno prema uputstvima proizvođača.

Za ispitivanje prisustva slobodnih kiseoničnih radikala korišćena je DHR boja. U bunariće sa ćelijama je na početku tretmana dodata i DHR boja finalne koncentracije 2 μ M, rastvorena u medijumu za kultivaciju ćelija prema uputstvu proizvođača. Po isteku tretmana medijumi iz bunarića su uklonjeni, ćelije su oprane sa 1 ml PBS, tripsinizirane i prebačene u FACS tube za protočnu citofluorimetriju. Potom su centrifugirane 5 minuta na 500 g, supernatanti su odliveni, ćelije oprane u 3 ml PBS, ponovo centrifugirane 5 minuta na 500 g, nakon čega je PBS uklonjen a ćelije finalno resuspendovane u 500 μ l PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati

su prikazani kao srednje vrednosti intenziteta zelene fluorescence DHR, pri čemu je kontrola arbitrarno postavljena na 1.

Za ispitivanje prisustva superoksid anjon radikala iz mitohondrija korišćena je MitoSOX™ Red boja. Čelije su pripremane za analizu na protočnom citofluorimetru tako što je po isteku tretmana medijum uklonjen iz bunarića, a zatim su čelije oprane sa 1 ml PBS, tripsinizirane i prebačene u FACS tube za protočnu citofluorimetriju. Potom su centrifugirane 5 minuta na 500 g, supernatanti su odliveni, a talog sa ćelijama je resuspendovan sa 100 µl MitoSOX™ Red boje, finalne koncentracije 5 µM, rastvorene u HBSS/Ca²⁺/Mg²⁺ medijumu za kultivaciju ćelija, nakon čega su inkubirane 10 minuta na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije, čelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g, oprane u 3 ml PBS, ponovo centrifugirane 5 minuta na 500 g i finalno resuspendovane u 500 µl HBSS/Ca²⁺/Mg²⁺ medijuma i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti intenziteta crvene fluorescence MitoSOX™ Red boje, pri čemu je kontrola arbitrarno postavljena na 1.

3.6.7. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je mehanizam oštećenja ćelija koji nastaje usled prisustva oksidativnog stresa u ćeliji. Oksidativni stres utiče na ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide. Lipidna peroksidacija je lančana reakcija koju pokreću slobodni radikali u ćelijama, vezujući se za nezasićene masne kiseline u ćelijskim membranama, što dovodi do njihovog oštećenja. Slobodni radikali pokreću čitav niz reakcija, koje se propagiraju autokatalitički, a takođe i završavaju proces peroksidacije lipida. Krajnji rezultat lipidne peroksidacije su strukturne i funkcionalne promene supstrata [163]. Kvantifikacija lipidne peroksidacije je važna za merenje nivoa oksidativnog stresa u ćelijama. Jedan od najčešće korišćenih testova za merenje lipidne peroksidacije je test tiobarbituratne kiseline (TBA). U uzorcima u kojima se meri nivo lipidne peroksidacije usled oksidativnog stresa dolazi do formiranja reaktivnih molekula, poput reaktivnih aldehida kao što je malondialdehid (MDA). U TBA testu, uzorci u kojima se meri nivo malondialdehida (MDA) se zagrevaju se TBA pri niskom pH, kako bi se omogućilo stvaranje MDA-TBA hromogenog kompleksa. Intenzitet izmerenih apsorbanaci u uzorcima proporcionalan je stepenu peroksidacije lipida.

Nakon tretmana, medijumi iz bunarića su uklonjeni, čelije oprane sa 1 ml PBS, a potom lizirane sa hladnom 10% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA). Na taj način su dobijeni ćelijski lizati koji su potom prebačeni u tubice i centrifugirani 10 minuta na 800 g. Nakon centrifugiranja iz svakog uzorka je uzeto po 1 ml supernatanta i dodato je po 1 ml 0,6% 2-tiobarbituratne kiseline (TBA), a zatim su smeše inkubirane 10 minuta u vodenom kupatilu na 100°C. Nakon inkubacije, uzorci su hlađeni na ledu i njihova apsorbanca je merena na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča na talasnoj dužini od 535 nm. Nivoi MDA u tretiranim uzorcima prikazani su u odnosu na kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena jedinična vrednost.

3.7. Određivanje nivoa ATP u ćelijama

Koncentracija unutarćelijskih nivoa ATP merena je pomoću komercijalnog kita za detekciju ATP baziranog na bioluminiscentnoj reakciji (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Applied Science, Nemačka), koji može da se koristi za kvantifikaciju izrazito niskih koncentracija ATP. Princip ovog visoko senzitivnog eseja se bazira na ATP zavisnoj reakciji oksidacije luciferina

u oksiluciferin koja je katalizovana enzimom luciferazom, pri čemu dolazi do emisije svetlosti koja je direktno proporcionalna koncentraciji ATP u ćelijama. Merenje unutarćelijskih nivoa ATP zahteva prethodno liziranje ćelija pomoću odgovarajućeg deterđženta, kako bi došlo do oslobađanja ATP u supernatante, gde dolazi do reakcije sa luciferinom u prisustvu luciferaze, i emisije svetlosti na 562 nm. Razblaživanjem ATP standarda u odgovarajućem puferu, prema uputstvu proizvođača, dobijen je standard finalne koncentracije 10 mg/ml. Zatim su pravljena serijska razblaženja standarda (10x) na osnovu kojih je formirana standardna kriva. Korišćenjem standardne krive preračunate su koncentracije ATP u ispitivanim uzorcima.

Nakon isteka tretmana iz ploča sa ćelijama uklonjen je medijum iz bunarića i naliveno je 40 μ l pufera za razblaživanje. U drugu providnu ploču za gajenje ćelija naliveno je po 40 μ l serijskih razblaženja standarda ATP u triplikatu. U obe ploče, i sa tretiranim ćelijama i sa standardima ATP, u svaki bunar je dodato po 40 μ l reagensa za liziranje ćelija i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Iz obe ploče uzeto je po 50 μ l smeše, prebačeno u novu ploču crne boje, i držano na ledu do merenja. Neposredno pred merenje u sve bunariće je dodato po 50 μ l pripremljenog reagensa sa luciferazom i mereno na Chameleon čitaču mikrotitarskih ploča (Hidex, Turku, Finska) na talasnoj dužini od 562 nm.

3.8. Određivanje prisustva kiselih vezikula

Detekcija kiselih vezikula u ćelijama, karakterističnih za proces autofagije, analizirana je na protočnom citofluorimetru korišćenjem LysoTracker Green (LT) i akridin-oranž (AO) fluorescentnih boja, kao i na fluorescentnom mikroskopu pomoću AO boje.

Za ispitivanje funkcije i prisustva kiselih vezikula poput lizozoma i autolizozoma u ćelijama korišćena je izrazito selektivna fluorescentna acidotropna proba LysoTracker Green koja boji kisele vezikule u ćeliji, gde postaje još više fluorescentna i emituje svetlost talasne dužine od 505 nm.

Ćelijama je po isteku tretmana u medijum za kultivaciju ćelija dodata fluorescentna boja LysoTracker Green DND-189 (Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države), finalne koncentracije 100 nM, u trajanju od 5 minuta na 37°C u mraku. Nakon inkubacije medijum iz bunarića je uklonjen, ćelije su oprane sa 1 ml PBS, tripsinizirane i prebačene u FACS tube. Potom su centrifugirane 5 minuta na 500 g, supernatanti su odliveni, ponovo su oprane sa 3 ml PBS i centrifugirane 5 minuta na 500 g. Nakon centrifugiranja talog sa ćelijama je resuspendovan u 500 μ l PBS a zatim je zelena fluorescence, koja predstavlja stepen kiselosti ćelijskog sadržaja, merena na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti intenziteta zelene fluorescence LT boje u odnosu na netretirane ćelije.

Akridin-oranž je supravitalni metahromatski fluorohrom koji pokazuje različitu fluorescencu pri različitim pH vrednostima, zelenu pri neutralnom pH u jedru i citoplazmi, a narandžasto-crvenu pri kiselom pH u autolizozomima i lizozomima, zbog čega se primenjuje za detekciju promene intercelularnog pH usled povećane aktivnosti fagolizozoma i omogućava verifikaciju autofagije. Intenzitet crvene fluorescence direktno je proporcionalan stepenu kiselosti, kao i zapremini kiselih vezikula u ćeliji. Stepenu autofagije se određuje kao odnos narandžasto-crvene fluorescence i zelene fluorescence. Rezultati su prikazani kao odnos srednjih vrednosti intenziteta crvene i zelene fluorescence, pri čemu povećanje odnosa ukazuje na povećanje autofagije u odnosu na kontrolni uzorak.

Po isteku tretmana ćelije su pripremane za analizu određivanja prisustva autofagije na protočnom citofluorimetru tako što je medijum iz bunarića uklonjen, ćelije oprane sa 1 ml PBS, tripsinizirane i prebačene u FACS tube. Potom su centrifugirane 5 minuta na 500 g, supernatanti su odliveni, a talog sa ćelijama je resuspendovan u 100 μ l akridin-oranž boje (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države), finalne koncentracije 1 μ M, rastvorene u kompletnom medijumu za kultivaciju ćelija, nakon čega su ćelije inkubirane 15 minuta na 37°C u mraku. Po isteku inkubacije, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g, oprane u 3 ml PBS, ponovo centrifugirane 5 minuta na 500 g i finalno resuspendovane u 500 μ l PBS a zatim su narandžasto-crvena i zelena fluorescencija merene na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao odnos srednjih vrednosti intenziteta crvene i zelene fluorescencije AO boje i normalizovani u odnosu na kontrolu.

Invertna fluorescentna mikroskopija je mikroskopska tehnika u kojoj svetlost koja se emituje sa donje strane fluorescentno obojenog uzorka pobuđuje fluorescenciju samog uzorka. Za detekciju kiselih vezikula u citoplazmi ćelija i analizu pomoću fluorescentnog mikroskopa korišćena je AO fluorescentna boja. Nakon tretmana ćelijama je uklonjen medijum, a zatim su oprane pomoću PBS i obojene pomoću AO boje rastvorene u medijumu za kultivaciju, finalne koncentracije 1 μ M i inkubirane 15 minuta na 37°C u mraku, a zatim analizirane pomoću inverznog fluorescentnog mikroskopa (Leica Microsystems DMIL, Veclar, Nemačka), Leica Microsystems DFC320 kamere i Leica Application Suite softvera (verzija 2.8.1). U zavisnosti od njihove kiselosti, autolizozomi i lizozomi su izgledali kao narandžasto-crvene fluorescentne citoplazmatske vezikule, dok su jedra bila obojena zeleno.

Supstance koje su korišćene kao inhibitori autofagije su bafilomicin A1, hlorokin i amonijum hlorid (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države). Bafilomicin A1 je specifični inhibitor vakuolarne H⁺ ATPaze i inhibira fuziju autofagozoma i lizozoma [164]. Hlorokin se selektivno akumulira u lizozomima i postaje pozitivno naelektrisan i zarobljen unutar ovih organela što im povećava ili neutrališe pH [165]. Amonijum hlorid je lizozomotropni agens koji se akumulira u lizozomima gde neutrališe nisku pH čime sprečava maturaciju i blokira fuziju autofagozoma i lizozoma [166].

3.9. Određivanje morfologije ćelija transmissionom elektronskom mikroskopijom

Analiza morfologije i ultrastrukturnih promena u ćelijama koje su karakteristične za različite tipove i mehanizme ćelijske smrti ispitivane su na transmissionom elektronskom mikroskopu (TEM).

Nakon isteka tretmana, medijumi iz petri šolja su uklonjeni, ćelije su oprane korišćenjem PBS, zatim tripsinizirane, prenete u odgovarajuće epruvete i centrifugirane 5 minuta na 500 g. Zatim su supernatanti odliveni, a talozi resuspendovani u 1 ml PBS i centrifugirani 5 minuta na 500 g. Postupak pranja ćelija sa PBS je ponovljen dva puta. Potom je talog sa ćelijama resuspendovan u 1 ml PBS, prenet u mikrotubice i centrifugiran 5 minuta na 150 g na sobnoj temperaturi. Supernatanti su zatim pažljivo uklonjeni a na ćelijski talog je naliven rastvor 2,5% glutaraldehida u 100 mM PBS koji omogućava fiksiranje ćelija. Nakon minimum 48 h, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 150 g, a fiksativ je pažljivo uklonjen. Zatim je talog sa ćelijama ispiran 5 minuta u 1 ml 0,1% kakodilatnog pufera i centrifugiran 5 minuta na 150 g. Postupak pranja je ponovljen još dva puta. Potom je usledila postfiksacija ćelija u 1% rastvoru osmijum tetroksida, koji je naliven na talog ćelija i inkubiran 1 h na 4°C. Nakon inkubacije, postupak ispiranja ćelija u kakodilatnom puferu u trajanju od 5 minuta i centrifugiranja ćelija 5 minuta na 150 g je ponovljen još tri puta. Potom je na taloge naliveno po 1 ml 0,5% vodenog rastvora uranil acetata, koji su zatim inkubirani

preko noći na 4°C. Nakon inkubacije, uklonjen je rastvor uranil acetata i usledio je postupak dehidracije taloga koji se sastoji iz niza ispiranja taloga u etanolu različitih, rastućih koncentracija (50%, 70%, 90%, 100%). Nakon dehidracije sledio je postupak prožimanja taloga smolom pomoću dve mešavine propilen oksida i EPON 812 smole (1:1, 1:3). Zatim su talozi ukalupljeni i sušeni 24 h na 60°C. Nakon sušenja, ukalupljeni talozi su vađeni iz tubica i sečeni na ultramikrotomu. Prvo su pravljene semitanki isečci, koji su bojeni toluidin plavim reagensom a zatim su birani isečci koji su dodatno sečeni na ultratanke isečke. Nakon sečenja, ultratanke isečci su hvatani na bakarne mrežice i kontrastirani pomoću uranil acetata i olovo citrata. Konačno, kontrastirani isečci su zatim posmatrani i analizirani na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM) Morgagni 268D (FEI, Hillsboro, Oregon, Sjedinjene Američke Države). Slike su dobijene pomoću MegaView III CCD kamere opremljene sa iTEM softverom (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Nemačka). Mikrografije za analizu su odabrane korišćenjem sistemski uniformnog nasumičnog uzorkovanja (*engl.* Systematic Uniform Random Sampling) [167], dok je broj intaktnih/oštećenih mitohondrija i citoplazmatskih vezikula određen u najmanje 60 ćelija po tretmanu.

3.10. Izolacija ćelijskih frakcija

Za izolaciju ćelijskih frakcija korišćen je komercijalni kit za frakcionaciju ćelija (FractionPREP™ Cell Fractionation kit, Biovision, Sjedinjene Američke Države). Princip ove metode je zasnovan na primeni različitih pufera koji omogućavaju ekstrakciju četiri subcelularne proteinske frakcije: citosolne, membranske, nukleusne i citoskeletne. Citosolna frakcija sadrži sve celularne solubilne proteine iz citoplazme. Membranska frakcija sadrži sve membranske proteine uključujući ćelijske organele i proteine membrana organela, izuzev proteina nukleusne membrane. Citosolna frakcija obuhvata solubilne proteine citoplazme. Citoskeletna frakcija obuhvata ukupne nesolubilne proteine, genomsku DNK. Postupak izolacije ćelijskih frakcija rađen je u skladu sa uputstvom proizvođača.

Pre samog eksperimenta u odgovarajuće puferne za ekstrakciju citosolne, membranske i nukleusne frakcije je dodato po 2 µl koktela inhibitora proteaza i 2 µl 1M ditiotreitola (DTT) po ml pufera. Puferi su čuvani na ledu sve vreme izolacije. Po isteku tretmana, iz petri šolja je uklonjen medijum, ćelije su oprane u 4 ml PBS, tripsinizirane i centrifugirane 5 minuta na 700 g na 4°C. Zatim su ćelije ponovo oprane sa 5 ml hladnog PBS i centrifugirane 5 minuta na 700 g na 4°C. Talozima sa ćelijama su resuspendovani u 1 ml hladnog PBS, prebačeni u mikrotubice i oboreni 5 minuta na 700 g na 4°C. Nakon centrifugiranja, supernatanti su uklonjeni a talozi resuspendovani u 400 µl pufera za ekstrakciju citosolne frakcije koji sadrži DTT i koktel inhibitora proteaza, a zatim inkubirani 20 minuta na ledu. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 700 g na 4°C. Supernatanti koji predstavljaju citosolne frakcije su skupljeni i prebačeni u nove tubice. Zatim su talozi resuspendovani u 400 µl hladnog pufera A za ekstrakciju membranske frakcije koji sadrži DTT i koktel inhibitora proteaza i vorteksovani oko 15 sekundi kako bi se dobro izmešali. Nakon toga, u svaki uzorak je dodato po 22 µl pufera B za ekstrakciju membranske frakcije, uzorci su ponovo vorteksovani i inkubirani na ledu 1 minut. Nakon inkubacije uzorci su vorteksovani 5 sekundi i centrifugirani 5 minuta na 1000 g na 4°C. Odmah nakon centrifugiranja supernatanti koji predstavljaju membranske frakcije su prebačeni u nove ohlađene tubice, nakon čega su držani na ledu. Talozima su zatim resuspendovani u 200 µl hladnog pufera za ekstrakciju nukleusne frakcije koji sadrži DTT i koktel inhibitora proteaza, vorteksovani oko 15 sekundi, ostavljeni na ledu 40 minuta i na svakih 10 minuta vorteksovani oko 15 sekundi. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 14000 g na 4°C. Zatim su supernatanti koji predstavljaju nukleusne frakcije prebačeni u

nove ohlađene tubice i stavljeni na led. Peleti koji predstavljaju citoskeletne frakcije su rastvoreni u 100 µl 0,2% SDS koji sadrži 10 mM DTT. Frakcije su čuvane na -80°C.

3.11. Imunoblot analiza

Imunoblot ili Western blot je metoda koja se koristi za detekciju i kvantifikaciju proteina. Proteini se razdvajaju prema veličini elektroforezom na natrijum dodecil sulfat poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), a zatim se prenose na nitroceluloznu membranu. Proteini od interesa vezani za nitroceluloznu membranu inkubiraju se sa primarnim antitelima. Primarno antitelo će prepoznati odgovarajuće sekundarno antitelo koje je kovalentno vezano za reporterski molekul, poput enzima peroksidaze rena. Enzimskom aktivnošću peroksidaze rena, po dodavanju odgovarajućeg supstrata za detekciju, nastaje hemiluminescentni produkt koji emituje svetlost određene talasne dužine koja se detektuje pomoću ChemiDoc aparata (Bio-Rad, Sjedinjene Američke Države). Intenzitet detektovane hemiluminescence je proporcionalan količini specifično prepoznatog proteina. U ovoj disertaciji analizirane su aktivnosti i ekspresije različitih signalnih puteva, i proteina koji su uključeni u indukciju smrti tumorskih ćelija.

Po isteku inkubacije ćelije su lizirane na ledu u puferu za liziranje ćelija (30 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NP-40), koji sadrži 1 mM fenilmetilsulfonyl fluorid (PMSF), 2 mM natrijum vanadat (Na_3VO_4), 50 mM natrijum fluorid (NaF) i 20 µl/ml koktela inhibitora proteaza (sve Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države), vorteksovane i ostavljene na ledu 30 minuta. Nakon toga lizati su centrifugirani 15 minuta na 14000 g na 4°C, a zatim su supernatanti ćelijskih lizata u kojima se nalaze proteini bez ostatka ćelijskog sadržaja prebačeni u nove tubice i čuvani na -20°C.

Za određivanje koncentracije proteina u lizatima korišćena je metoda po Bradfordu. Princip ove metode zasniva se na sposobnosti Coomassie Brilliant Blue G-250 boje da se veže za proteine u kiseloj sredini, pri čemu dolazi do pomeranja apsorbanca boje iz crvene u plavu oblast vidljivog spektra. Merenje koncentracije metodom po Bradfordu započeto je dodavanjem 1 µl uzorka u 1 ml Bradfordovog reagensa (0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% etanol; 10% H_3PO_4 u vodi). Tom prilikom korišćen je i standard, albumin iz seruma govečeta (BSA, *engl.* bovine serum albumine). Na čitaču mikrotitarskih ploča (Sunrise, Tecan, Dorset, Velika Britanija) očitavane su apsorbanca BSA standarda i uzoraka, na talasnoj dužini od 595 nm, koje su direktno proporcionalne koncentracijama proteina u uzorcima. Na osnovu izmerenih apsorbanca standarda formirana je standardna kriva, koja je zatim korišćena za određivanje koncentracija proteina u uzorcima. Nakon toga pripremani su uzorci za elektroforezu, kuvanjem 5 minuta na 100°C, nakon čega su finalne koncentracije sastojaka pufera bile: 2% natrijum dodecil sulfat (SDS); 10% glicerol; 2 mM 2-merkaptoetanol; 0,002% bromfenol plavo; 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8. Kuvanjem na visokoj temperaturi proteini su denaturisani, a dodavanjem 2-merkaptoetanol sprečeno je ponovno formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Dodavanje SDS u pufer dovodi do njegove interakcije sa denaturisanim proteinima koji postaju okruženi SDS molekulima, a time i negativno naelektrisani, što omogućava razdvajanje na osnovu molekulske mase.

Proteini su nakon toga razdvojeni vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum dodecil sulfata (*engl.* sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), na osnovu razlika u molekulskim masama. Korišćeni su poliakrilamidni gelovi različitih gustina, prilagođeni veličini ispitivanih proteina. Za analizu proteina AMPK, 4EBP, ERK, JNK, p62, beclin-1, RIP, MLKL, ATG7 i aktina korišćen je 10% poliakrilamidni gel, za analizu prokaspaze/kaspaze-3 i ATG5 proteina korišćen je 12%

poliakrilamidni gel, za analizu LC3 β , citohroma c i TOM20 proteina upotrebljen je 13% poliakrilamidni gel, a za ispitivanje PARP, HKII i Raptor proteina korišćen je 8% poliakrilamidni gel. U sastav gelova za razdvajanje proteina (*engl.* resolving gel) ulaze 10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid ili 13% akrilamid/0,44% bisakrilamid ili 8% akrilamid/0,27% bisakrilamid; 0,1% SDS; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,05% amonijum persulfata (APS) i 0,033% tetrametil etilendiamin (TEMED). Preko poliakrilamidnih gelova za razdvajanje proteina nalivani su gelovi za sabijanje proteina (*engl.* stacking gel) koji se sastoje iz 4% akrilamid/0,14% bisakrilamid; 0,1% SDS; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,05% APS i 0,033% TEMED. U bunariće gela za sabijanje proteina je nalivena ista količina svakog uzorka. Gel za sabijanje proteina omogućava proteinima prolaz do gela za razdvajanje i njihovo koncentrisanje kao bi ušli u gel za razdvajanje u isto vreme. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 minuta pri konstantnom naponu od 100 V tokom kretanja proteina kroz gel za sabijanje i 140 V tokom kretanja proteina kroz gel za razdvajanje proteina.

Nakon elektroforeze proteini su prebačeni sa poliakrilamidnog gela na nitrocelulozne membrane sa porama veličine 0,45 μm (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo). Transfer proteina je izvršen pomoću aparature za polusubi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Bio-Rad, Sjedinjene Američke Države). Poliakrilamidni gelovi, nitrocelulozne membrane i filter papiri specijalizovani za transfer proteina su potapani u pufer za transfer (192 mM glicin; 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3) u trajanju od 3 minuta. Nakon toga u aparaturu je za svaki gel posebno ređan sloj filter papira, pa membrana, pa poliakrilamidni gel i na kraju ponovo sloj filter papira. Takav redosled u aparaturi određuje da je membrana okrenuta ka pozitivnoj a gel ka negativnoj elektrodi, i pri dejstvu struje konstantne jačine od 0,8 mA/cm² membrane, negativno naelektrisani proteini putuju sa gela na membranu, odnosno ka pozitivnoj elektrodi. Transfer proteina sa gela na membranu je trajao 90 minuta.

Nakon transfera, membrane su inkubirane u 5% obranom mleku rastvorenom u TBS-T puferu (0,5% Tween u Tris puferu, pH=7,4) u trajanju od 1 h uz blago mešanje, kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane preko noći na 4°C sa odgovarajućim primarnim antitelom za protein LC3, p62, beclin-1, Atg5, Atg7, p4EBP, 4EBP, pAMPK, AMPK, pJNK, JNK, pERK, ERK, pRaptor, Raptor, PARP, prokaspazu/kaspazu-3, pRIP, pMLKL, citohrom c, TOM20 (Cell Signaling Technology, Sjedinjene Američke Države), RIP, MLKL, heksokinazu II (Santa Cruz Biotechnology, Sjedinjene Američke Države) i β -aktin (Abcam, Sjedinjene Američke Države), uz blago mešanje. Zatim je usledilo ispiranje primarnog antitela, 3 puta po 5 minuta u TBS-T puferu, a potom inkubacija sa sekundarnim antitelom, kozijim antizečijim IgG konjugovanim sa peroksidazom rena (*engl.* horseradish peroxidase, HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Sjedinjene Američke Države), 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom membrane su ponovo ispirane 3 puta po 5 minuta u TBS-T puferu, a zatim prelivene supstratom za detekciju. Peroksidaza rena koja je vezana za sekundarno antitelo je razgradila H₂O₂ iz supstrata za detekciju do O₂ i H₂O. Nastali O₂ je zatim reagovao sa luminolom iz supstrata za detekciju, pri čemu je nastao 3-aminoftalat koji emituje foton. Nastala svetlost je detektovana na ChemiDoc aparatu (Bio-Rad, Sjedinjene Američke Države), a intenzitet izmerene hemiluminiscence je direktno proporcionalan količini proteina u uzorku. Aktivacija i ekspresija proteina od interesa kvantifikovana je denzitometrijskom analizom korišćenjem Image Lab softvera. Enzimaska aktivnost proteina je izražena kao koncentracija fosforilisanih formi proteina u odnosu na koncentraciju odgovarajućih nefosforilisanih formi, dok je relativna ekspresija proteina izražena kao koncentracija nefosforilisanih proteina u odnosu na aktin. Rezultati su predstavljeni u odnosu na netretiranu kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena jedinična vrednost.

3.12. Transfekcija ćelija pomoću male interferirajuće RNK - siRNA

Kako bi se inhibirala ekspresija LC3 β , beclin, ATG5, ATG7, RIP i MLKL ili AMPK proteina, B16 ili U251 ćelije su transfektovane pomoću malih interferirajućih RNK (siRNA, *engl.* small interfering RNA), za mišji LC3 β , beclin, AMPK (Santa Cruz Biotechnology, Sjedinjene Američke Države) ili humani ATG5, ATG7 (Qiagen, Sjedinjene Američke Države), RIP, MLKL (Santa Cruz Biotechnology, Sjedinjene Američke Države), kao i odgovarajućim mišjim i humanim kontrolnim siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Sjedinjene Američke Države; Qiagen, Sjedinjene Američke Države). Za uvođenje siRNA u ćelije korišćen je reagens za transfekciju, lipofektamin 2000 (*engl.* Lipofectamine 2000, Invitrogen, Sjedinjene Američke Države). Lipofekcija predstavlja metodu za uvođenje genetskog materijala u ćelije formiranjem lipozoma, čiji je fosfolipidni dvosloj pozitivno naelektrisan i formira agregate sa negativno naelektrisanim genetskim materijalom. Proces transfekcije pomoću siRNA urađen je u skladu sa uputstvima proizvođača.

B16 i U251 ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunarića ili u petri šolje prečnika 100 mm u RPMI medijumu sa 10% i 5% FCS, bez antibiotika i inkubirane preko noći. Lipolizovane siRNA su prvo rastvarane u dejonizovanoj vodi prema uputstvima proizvođača (10 μ M), a zatim su rastvarane u transfekcionom Opti-MEM medijumu bez antibiotika i inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi. Istovremeno je i transfekcioni reagens lipofektamin inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi u Opti-MEM medijumu bez antibiotika. Nakon inkubacije, jednake zapremine rastvora sa siRNA i rastvora sa lipofektaminom su pomešane i inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se formirali siRNA-lipofektamin kompleksi. Zatim je iz ploča sa 96 bunarića i petri šolja uklonjen kompletan medijum u kome su ćelije inkubirane, i dodata je smeša siRNA-lipofektamin i kompletan RPMI medijum sa FCS i antibiotikom u odnosu 1:4, tako da je finalna koncentracija siRNA bila 100 nM, a lipofektamin 600 puta razblažen. Nakon 8 h inkubacije na 37°C ćelijama je dodata jednaka zapremina kompletnog medijuma za kultivaciju (RPMI sa 10% FCS za B16 i 5% FCS za U251 ćelije). Nakon 24 h ćelije su tretirane odgovarajućim tretmanima a zatim analizirane LDH testom ili imunoblot metodom.

3.13. Statističke analize

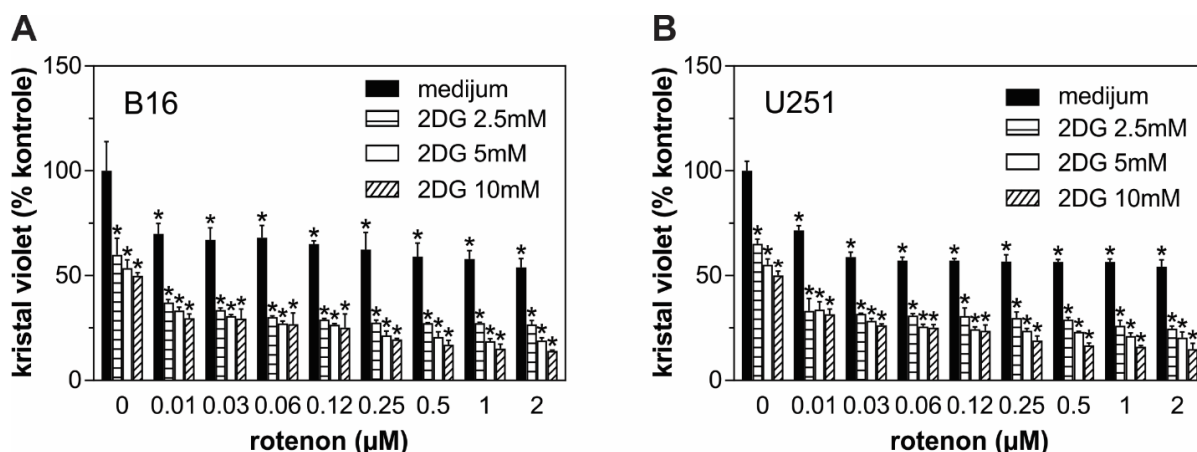
Statistička značajnost razlike između tretmana je procenjena korišćenjem ANOVA i Student-Neuman-Keuls testa za višestruka poređenja. Vrednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa supresijom oksidativne fosforilacije

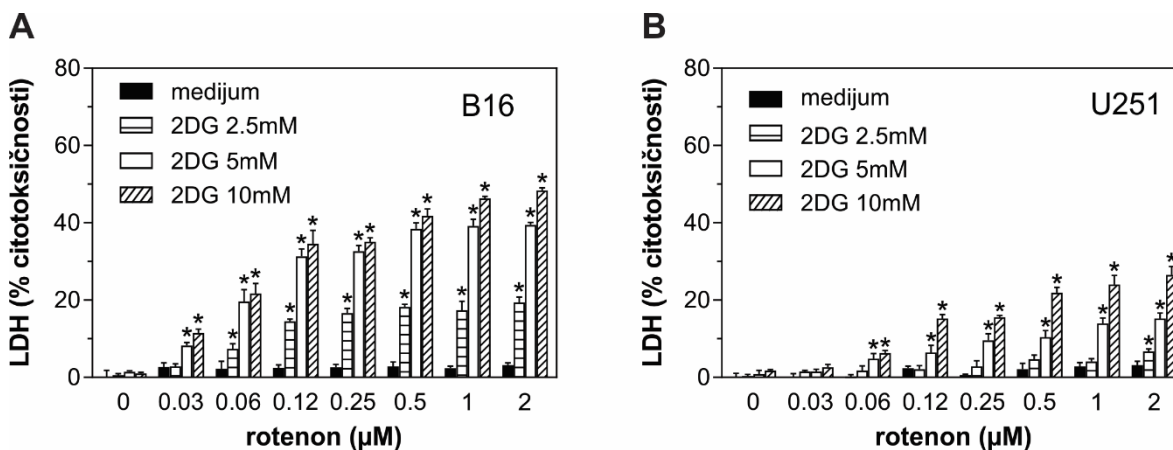
4.1.1. 2DG i ROT, samostalno i u kombinaciji, smanjuju vijabilnost B16 i U251 ćelija

Da bismo ispitali antitumorski efekat inhibitora glikolize 2DG i inhibitora mitohondrijalnog kompleksa I respiratornog lanca rotenona (ROT), tretirali smo ćelije mišjeg melanoma B16 i ćelije humanog glioma U251 različitim dozama ovih agenasa, samostalno i u kombinaciji, a vijabilnost ćelija je određena nakon 24 h od početka tretmana. Kristal violet test je pokazao da i 2DG i ROT, ako se koriste samostalno, na dozno-zavisani način smanjuju broj živih ćelija. Takođe, moglo se uočiti da je najjači antitumorski efekat pokazao kombinovani tretman 2DG+ROT (Slika 8).



Slika 8. 2DG i ROT, samostalno i u kombinaciji, smanjuju vijabilnost B16 i U251 ćelija na dozno-zavisani način. (A) B16 i (B) U251 ćelije su tretirane različitim koncentracijama 2DG i/ili ROT. Nakon 24 h vijabilnost ćelija je određena kristal violet testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD tripplikata iz jednog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

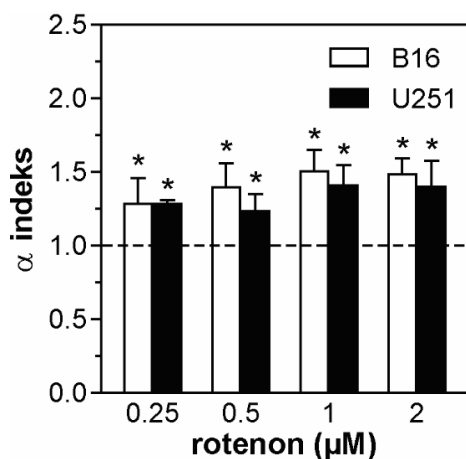
Smanjenje broja ćelija detektovano kristal violet testom je moglo biti posledica inhibicije proliferacije i/ili indukcije ćelijske smrti. Kako bismo ispitali koji mehanizam dovodi do smanjenja vijabilnosti merili smo citotoksičnost 2DG i rotenona, samostalno i u kombinaciji, LDH testom koji meri oslobađanje intracelularnog enzima laktat dehidrogenaze iz ćelija sa oštećenom ćelijskom membranom, što je karakteristika nekroze ili sekundarne nekroze, koja nastaje u ćelijskoj kulturi nakon apoptoze zbog nepostojanja fagocita koji uklanjaju apoptotične ćelije [168, 169]. LDH test je pokazao da pojedinačni tretmani ni u jednoj od ispitivanih koncentracija nisu indukovali značajnu citotoksičnost (Slika 9). Sa druge strane, kombinovani tretman je indukovao značajno oslobađanje laktat dehidrogenaze, odnosno umiranje tumorskih ćelija na dozno-zavisani način (Slika 9). Dakle, za razliku od kombinovanog tretmana, 2DG i ROT, ukoliko se primene samostalno, ne indukuju ćelijsku smrt već samo inhibiciju proliferacije.



Slika 9. 2DG+ROT indukuje oslobađanje LDH iz B16 i U251 ćelija. (A) B16 i (B) U251 ćelije su tretirane različitim koncentracijama 2DG i ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

4.1.2. 2DG i ROT sinergizuju u ubijanju B16 i U251 ćelija

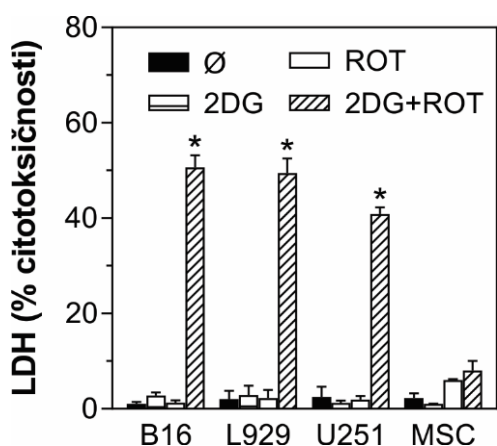
Kako bi se ispitala vrsta interakcije između antitumorskog delovanja 2DG i ROT računali smo α indekse za različite koncentracije ovih supstanci. α indeks predstavlja proizvod frakcije živih ćelija tretiranih samo sa 2DG i frakcije živih ćelija tretiranih samo sa ROT, podeljen sa frakcijom živih ćelija tretiranih sa 2DG i ROT u kombinaciji. Pošto su vrednosti α indeksa za sve ispitivane doze 2DG i ROT bile veće od 1, zaključili smo da 2DG i ROT sinergizuju u ubijanju tumorskih ćelija (Slika 10). U skladu sa izračunatim α indeksima, koncentracije od 5 mM za 2DG i 1 μ M za ROT su izabrane za dalje eksperimente. Takođe, na osnovu izračunatih vrednosti α indeksa moglo se zaključiti da su B16 ćelije nešto osetljivije na kombinovani tretman 2DG+ROT nego U251 ćelije.



Slika 10. 2DG i ROT u kombinaciji sinergistički ubijaju B16 i U251 ćelije. B16 i U251 su inkubirane sa 5 mM 2DG i 0.25-2 μ M ROT. Vrednosti α indeksa kao mere uzajamnog efekta (sinergizma/ antagonizma) dva agensa izračunate su primenom formule $\alpha = SF_{2DG} \times SF_{ROT} / SF_{2DG+ROT}$, gde su vrednosti SF_{2DG} , SF_{ROT} , $SF_{2DG+ROT}$ frakcije živih ćelija dobijene kristal violet testom nakon 24 h tretmana. Rezultati su prikazani kao SV ± SD vrednosti iz tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava vrednosti >1).

4.1.3. Kombinovani tretman 2DG+ROT ubija transformisane B16, U251 i L929, ali ne i primarne MSC ćelije

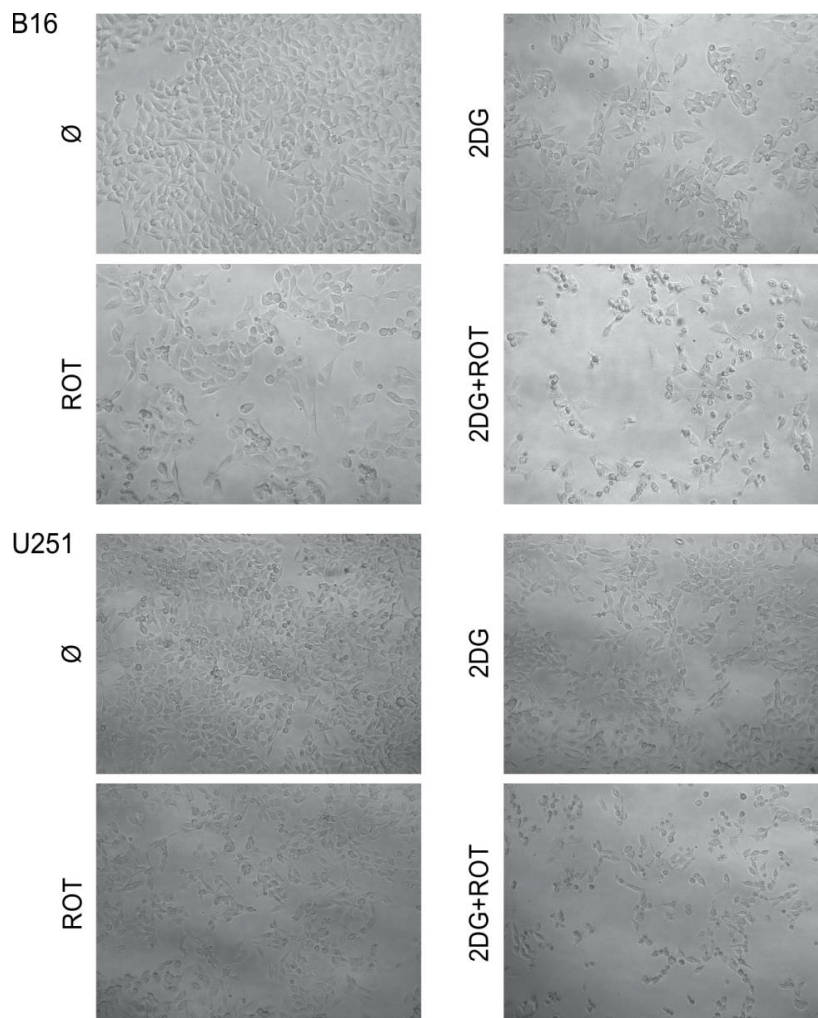
U narednom eksperimentu upoređivali smo citotoksični efekat kombinovanog tretmana na tumorske i primarne ćelije. B16, U251, L929 ćelije mišjeg fibrosarkoma i netransformisane primarne mezenhimalne stem ćelije (MSC) su tretirane 2DG i rotenonom, samostalno i u kombinaciji, i nakon 24 h je mereno oslobađanje LDH. Kao što je već pokazano za B16 i U251 ćelije, 2DG i ROT samostalno nisu bili toksični prema L929 i MSC ćelijama (Slika 11). S druge strane, kombinovani tretman je doveo do značajnog otpuštanja LDH iz transformisanih L929 ćelija, ali ne i iz primarnih MSC ćelija (Slika 11). Dakle, kombinovani tretman 2DG+ROT je toksičan za tumorske B16, U251 i L929 ćelije, ali ne i za primarne mezenhimalne ćelije.



Slika 11. 2DG+ROT indukuju oslobađanje LDH iz B16, L929 i U251, ali ne iz primarnih MSC ćelija. B16, L929, U251 i MSC ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

4.1.4. Kombinovani tretman 2DG+ROT menja morfologiju B16 i U251 ćelija

Da bi se ispitaio efekat 2DG i rotenona na gustinu i morfologiju B16 ćelija, ćelije su posmatrane tokom tretmana pod fazno-kontrastnim mikroskopom i fotografisane nakon 16 h. U skladu sa rezultatima biohemijskih testova, analiza fotografija je pokazala da je gustina B16 ćelija tretiranih samo sa 2DG i rotenonom bila smanjena, a morfologija u velikoj meri očuvana u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Slika 12). S druge strane, ćelije izložene kombinovanom tretmanu su se smanjile, zaokruglile, odlepile od podloge, izgubile svoj karakterističan poligonalni oblik i definisane ivice, što potvrđuje indukciju ćelijske smrti (Slika 12) [170].

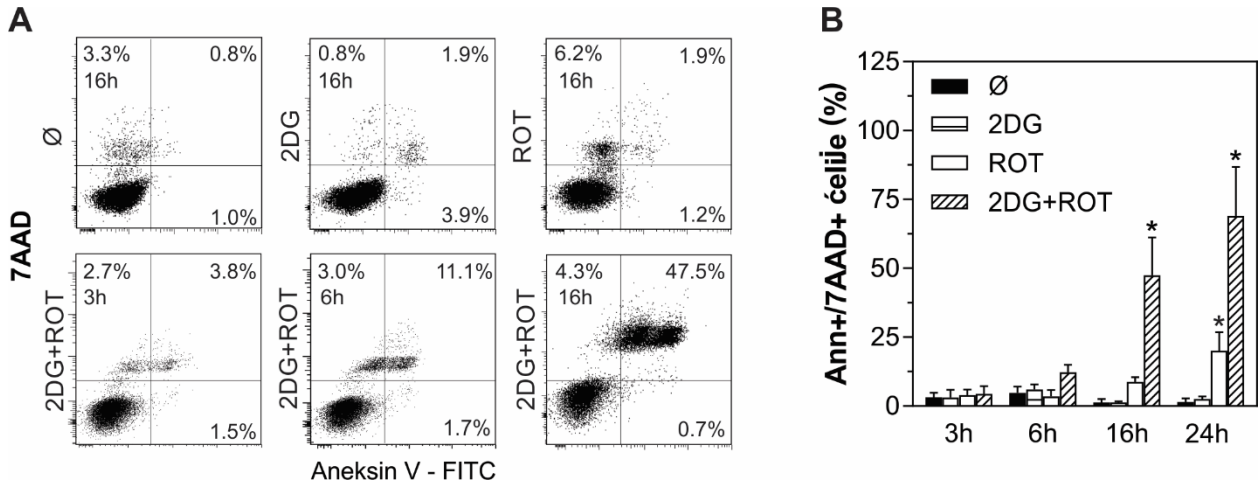


Slika 12. Uticaj 2DG i ROT na morfologiju B16 i U251 ćelija. B16 i U251 ćelije su tretirane 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Morfologija tretiranih ćelija je analizirana pod svetlosnim mikroskopom 16 h nakon tretmana (uveličanje 10x).

4.1.5. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje nekrozu B16 ćelija

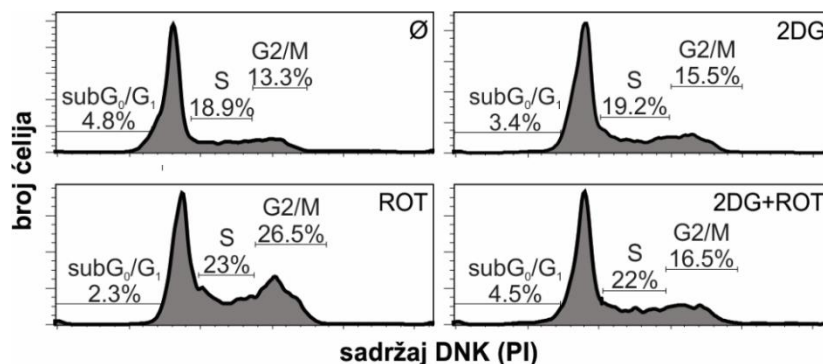
U narednim eksperimentima smo želeli da ispitamo tip i mehanizme ćelijske smrti indukovane kombinovanim tretmanom. Da bismo utvrdili da li B16 ćelije umiru apoptozom ili nekrozom, ćelije smo obojili aneksin V-FITC i 7AAD reagensima i analizirali na protočnom citofluorimetru. Tokom rane faze apoptoze fosfatidilserinski ostaci se premeštaju sa unutrašnje strane ćelijske membrane na spoljašnju stranu pri čemu se aneksin V-FITC reagens vezuje za fosfatidilserinske ostatke, omogućavajući detekciju ćelija koje su ušle u apoptozu. Tokom kasne faze apoptoze (sekundarne nekroze) ili nekroze dolazi do pucanja ćelijske membrane i do oslobađanja ćelijskog sadržaja [169], pri čemu 7AAD boja ulazi u ćelije, vezuje se za DNK ćelija i omogućava njihovu detekciju fluoresciranjem pri pobuđivanju sa laserom talasne dužine 488 nm. U skladu sa očuvanim vijabilitetom, analize ćelija obojenih sa aneksin V-FITC i 7AAD na protočnom citofluorimetru nisu pokazale da ćelije tretirane samo 2DG ili rotenonom gube integritet membrane, niti da im se povećava koncentracija fosfatidilserina na spoljašnjoj strani membrane (aneksin⁺/7AAD⁻ ćelije) (Slika 13). S druge strane, analiza ćelija tretiranih sa oba jedinjenja istovremeno

pokazala je vremenski zavisno povećanje dvostruko pozitivnih ćelija (aneksin⁺/7AAD⁺ ćelije) (Slika 13). Odsustvo apoptotskih ćelija sa eksternalizovanim fosfatidilserinom bez oštećenja membrana (aneksin⁺/7AAD⁻) u kraćim tretmanima ukazuje na indukciju primarne, a ne sekundarne nekroze.



Slika 13. 2DG+ROT indukuje nekrozu B16 ćelija. (A, B) B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. (A) Nakon 3, 6 i 16 h od početka tretmana ćelije su bojene sa aneksin V-FITC i 7AAD i analiziran je procenat nekrotičnih (aneksin⁺/7AAD⁺) i apoptotičnih (aneksin⁺/7AAD⁻) ćelija na protočnom citofluorimetru. (B) Nakon 3, 6, 16 i 24 h od početka tretmana određen je procenat nekrotičnih (aneksin⁺/7AAD⁺) ćelija protočnom citofluorimetrijom; (A) Rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta su prikazani u vidu tačkastih grafika (dot plot) na kojima svaka tačka predstavlja pojedinačnu ćeliju. (B) Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

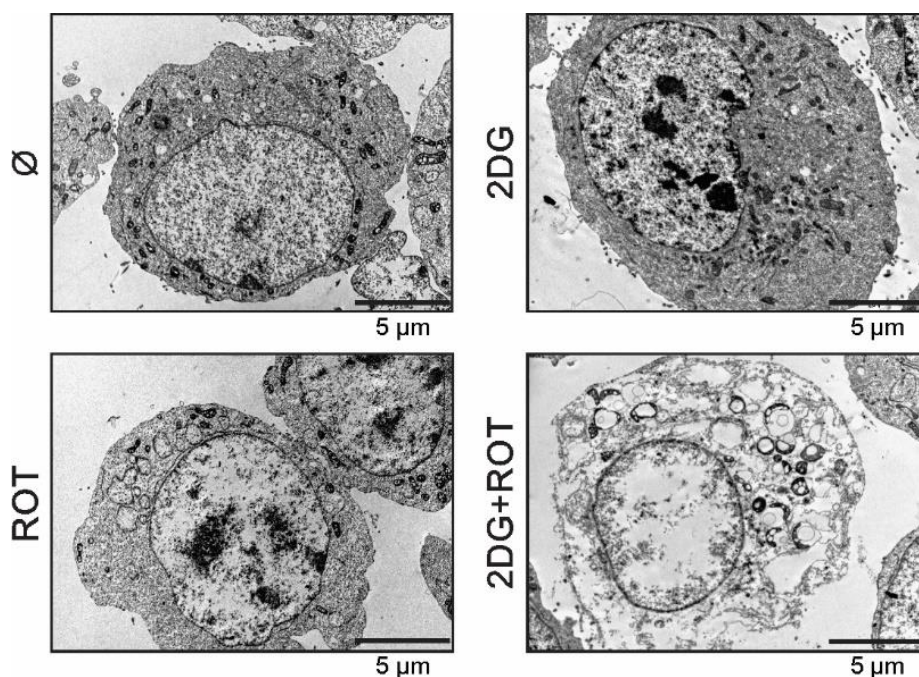
Kako bismo potvrdili da kombinovani tretman ne izaziva apoptozu ispitivali smo i njegovu sposobnost da indukuje fragmentaciju DNK. Ćelije su fiksirane etanolom i bojene propidijum jodidom, a potom je na protočnom citofluorimetru analizirana distribucija ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa. U skladu sa prethodnim rezultatima, kombinovani tretman nije povećao procenat hipodiploidnih (sub-G₀/G₁) apoptotskih ćelija sa fragmentisanom DNK (Slika 14). Zanimljivo je međutim da je rotenon indukovao povećanje broja ćelija u S i G₂/M fazi, što je bilo potpuno poništeno dodatkom 2DG.



Slika 14. 2DG+ROT ne indukuje fragmentaciju DNK u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h od početka tretmana ćelije su fiksirane etanolom i bojene sa propidijum jodidom (PI). Ćelijski ciklus je analiziran na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u vidu reprezentativnih histograma iz tri nezavisna eksperimenta.

4.1.6. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje dezintegraciju ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme B16 ćelija

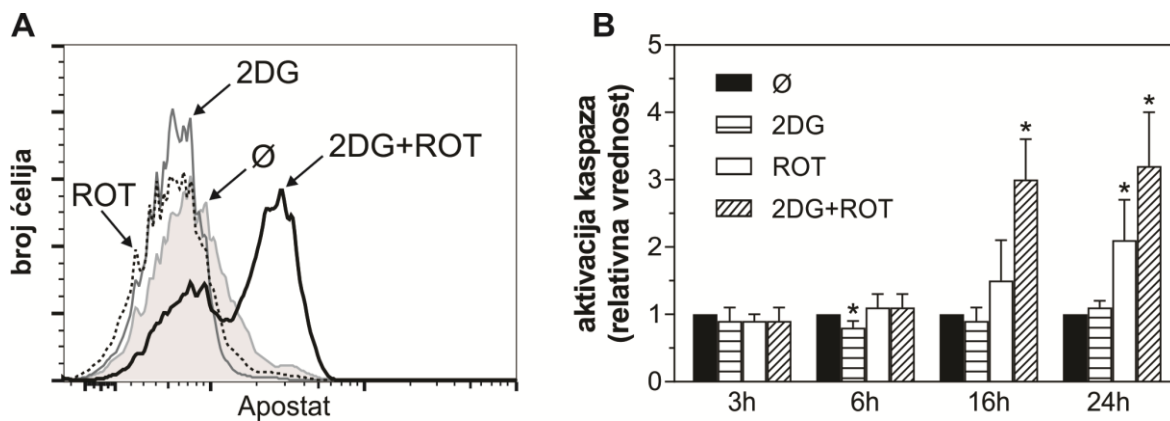
U narednom eksperimentu ispitivali smo efekat pojedinačnih i kombinovanog tretmana 2DG i ROT na unutarćelijsku morfologiju B16 ćelija. Analiza pomoću elektronskog mikroskopa je pokazala da je struktura ćelijskih komponenti u ćelijama tretiranim samo sa 2DG i rotenonom u potpunosti očuvana, dok je u ćelijama izloženim kombinovanom tretmanu došlo do dezintegracije ćelijske membrane i smanjenja elektronske gustine (prosvetljenja) citoplazme, što su sve karakteristike nekrotične ćelijske smrti (Slika 15) [171].



Slika 15. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje dezintegraciju ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme B16 ćelija. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 µM ROT samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h morfologija ćelija je analizirana pomoću transmisivnog elektronskog mikroskopa. Prikazane su reprezentativne mikrografije sa razmernikom veličine 5 µm.

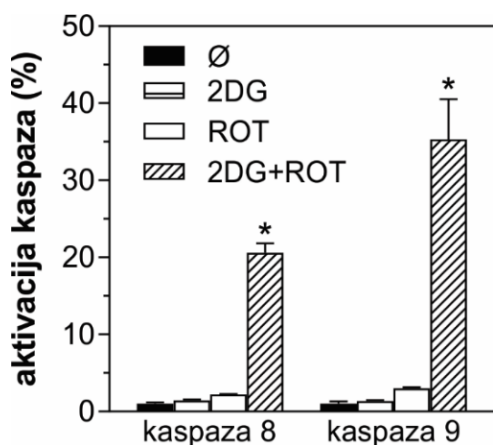
4.1.7. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje aktivaciju kaspaza

Kaspaze su inicijalno smatrane enzimima koji vrše lizu unutarćelijskih komponenti kada je indukovana apoptoza. Međutim, novija istraživanja su pokazala da su kaspaze aktivne i kada je pokrenuta nekroza, stoga smo ispitivali kako kombinovani tretman utiče na aktivaciju kaspaza. Analiza ćelija tretiranih pan-kaspaznim inhibitorom Apostat obeleženim fluorescentnom bojom na protočnom citofluorimetru pokazala je da postoji vremenski-zavisno povećanje aktivacije kaspaza u ćelijama tretiranim kombinovanim tretmanom (Slika 16).



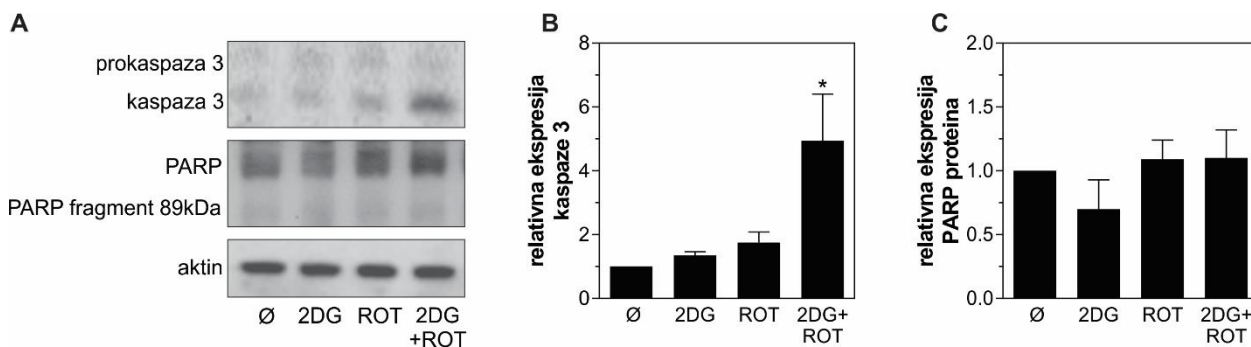
Slika 16. 2DG+ROT indukuje aktivaciju kaspaza. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon (A) 24 h i (B) nakon 3, 6, 16 i 24 h ćelije su tretirane inhibitorom Apostat i aktivacija kaspaza je analizirana na protočnom citofluorimetru. (A) Rezultati su prikazani u vidu histograma iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta; (B) Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

Pošto je Apostat reagens kojim se detektuje nespecifična aktivacija kaspaza [172], u narednim eksperimentima identifikovali smo kaspaze koje aktivira tretman 2DG+ROT. Citofluorimetrijska analiza ćelija tretiranih fluorescentno obeleženim inhibitorima kaspaza-8 i -9 pokazala je da kombinovani, za razliku od pojedinačnih tretmana 2DG i ROT, indukuje značajnu aktivaciju i kaspaze-8, inicijatorske kaspaze spoljašnjeg puta apoptoze [21], i kaspaze-9, inicijatorske kaspaze unutrašnjeg puta apoptoze [173] (Slika 17).



Slika 17. 2DG+ROT indukuje aktivaciju kaspaza 8 i 9. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h ćelije su tretirane specifičnim fluorescentnim inhibitorima kaspaza-8 i -9 i vezivanje inhibitora, odnosno njihova aktivacija je analizirana na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

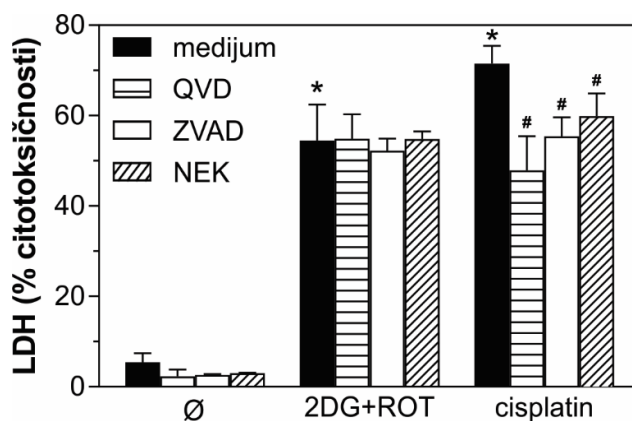
U skladu sa ovim rezultatom, imunoblot analiza je pokazala da u B16 ćelijama tretiranim 2DG+ROT dolazi do aktivacije kaspaze-3 (Slika 18), egzekutorske kaspaze koju aktiviraju i kaspaza-8 i kaspaza-9 [20]. Uprkos aktivaciji kaspaza, imunoblot analiza je pokazala da kombinovani tretman ne stimuliše proteolitičko isecanje PARP, dobro poznatog supstrata aktivnih kaspaza [174] (Slika 18). Dakle, iako kombinovani tretman stimuliše aktivaciju različitih kaspaza, ne dolazi do fragmentacije DNK, odnosno indukuje se nepotpuna apoptoza. Stoga, na osnovu naših rezultata (Slika 13-18) možemo da zaključimo da 2DG+ROT indukuje nepotpunu apoptozu koja se pretvara u nekrozu.



Slika 18. 2DG+ROT indukuje aktivaciju kaspaze-3, ali ne i proteolitičko isecanje PARP. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. (A) Nakon 12 h nivoi kaspaze-3 i PARP analizirani su imunoblot metodom, a jačine traka kvantifikovane denzitometrijski i analizirane u odnosu na aktin. Relativne ekspresije kaspaze-3 (B) i PARP (C) su prikazane kao reprezentativni blotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu, koja je svedena na 1).

Da bismo ispitali da li kaspaze učestvuju u indukciji ćelijske smrti, B16 ćelije smo tretirali 2DG+ROT u prisustvu ili odsustvu inhibitora kaspaza Q-VD-OPh i ZVAD-FMK. Inhibitori kaspaza nisu uticali na vijabilitet ćelija tretiranih kombinovanim tretmanom, međutim, redukovali su antitumorski efekat cisplatina (Slika 19), koji je korišćen kao pozitivna kontrola jer je poznato da indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza [175]. Dakle, iako citotoksični efekat 2DG+ROT prati aktivacija kaspaza, one ne učestvuju u njegovom citotoksičnom delovanju.

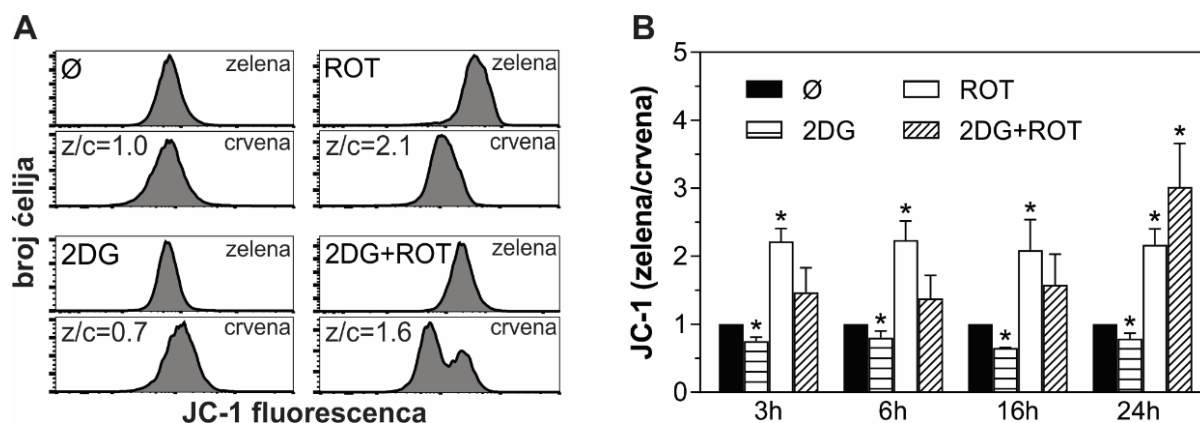
Kaspaze pored apoptoze učestvuju i u egzekuciji nekroptoze, stoga smo ispitali da li je nekroptoza odgovorna za antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana. U tu svrhu, ćelije izložene 2DG+ROT smo tretirali inhibitorom nekroptoze nekrostatinom, a kao pozitivnu kontrolu ponovo smo koristili cisplatin, za koga je ranije pokazano da pored apoptoze indukuje i nekroptozu [176]. Nekrostatin je delimično redukovao antitumorski efekat cisplatina, ali ne i kombinovanog tretmana, pa se moglo zaključiti da nekroptoza ne učestvuje u citotoksičnosti 2DG+ROT (Slika 19). Dakle, na osnovu prikazanih rezultata možemo da zaključimo da u osnovi citotoksičnog efekata 2DG+ROT nisu ni klasična apoptoza, ni nekroptoza.



Slika 19. U osnovi citotoksičnog efekata 2DG+ROT nisu ni apoptoza ni nekroptoza. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, ili sa 50 μ M cisplatinom, u prisustvu ili odsustvu inhibitora kaspaza 10 μ M QVD-OPH (QVD), 1 μ M ZVAD-FMK (ZVAD) ili inhibitora nekroptoze 10 μ M nekrostatina-1 (NEK). Nakon 24 h ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane cisplatinom).

4.1.8. Depolarizacija mitohondrija nije u osnovi citotoksičnosti kombinovanog tretmana 2DG+ROT

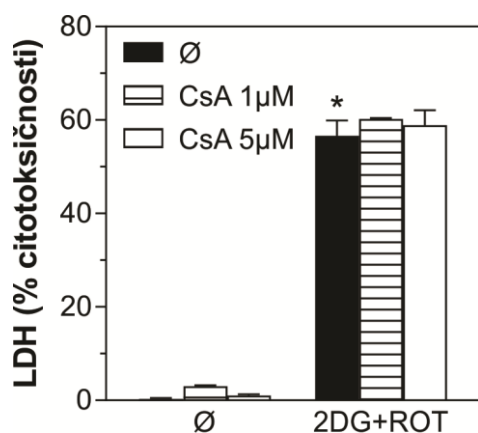
Imajući u vidu da indukciji nekroze često prethodi depolarizacija membrane mitohondrija [177], dalje je ispitan uticaj 2DG i ROT, samostalno i u kombinaciji, na funkciju i strukturu mitohondrija. Da bismo utvrdili uticaj na funkciju mitohondrija pratili smo kako se menja membranski potencijal mitohondrija (MMP) u zavisnosti od vrste i dužine tretmana. Čelije su tretirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, u trajanju od 3, 6, 16 i 24 h, nakon čega su bojene fluorescentnom bojom JC-1 i analizirane na protočnom citofluorimetru. JC-1 boja ulazi u mitohondrije živih ćelija zahvaljujući svom pozitivnom naelektrisanju, akumulira se unutar mitohondrija zahvaljujući negativnom potencijalu membrane mitohondrija, pri čemu se formiraju agregati koji fluoresciraju crveno. Ukoliko je membranski potencijal mitohondrija narušen JC-1 boja ne može da prođe kroz intermembranski prostor, ostaje u citoplazmi u svom monomernom obliku i fluorescira zeleno. Analiza odnosa zelene i crvene fluorescence JC-1 boje, koji ako je veći u tretmanu u nego u kontroli ukazuje na depolarizaciju mitohondrija, pokazala je da je sam rotenon već nakon 3 h izazivao vremenski održivu depolarizaciju, za razliku od 2DG koja je indukovala hiperpolarizaciju mitohondrijske membrane (Slika 20). U ćelijama tretiranim 2DG+ROT mitohondrije su bile depolarisane, ali manje nego u ćelijama tretiranim samo rotenonom, i njihova depolarizacija nije dostigla statističku značajnost u odnosu na kontrolu sve do 24 h, kada je prevazišla i depolarizaciju indukovanu samim rotenonom (Slika 20). Dakle, 2DG indukuje brzu hiperpolarizaciju, ROT brzu depolarizaciju membrane mitohondrija, a u kombinovanom tretmanu dolazi do međusobnog poništavanja ova dva efekta sve do 24 h, kada dolazi do snažne depolarizacije membrane mitohondrija, koja prevazilazi depolarizaciju indukovanu samim rotenonom.



Slika 20. 2DG+ROT indukuje depolarizaciju mitohondrija nakon 24 h inkubacije. (A, B) B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, u trajanju od 16 h (A) ili 3, 6, 16 i 24 h (B). Po isteku tretmana ćelije su bojene JC-1 fluorescentnom bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru. (A) Rezultati su prikazani u vidu histograma iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta; (B) Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu, koja je svedena na 1).

Iako smo prethodno pokazali da depolarizacija mitohondrija (Slika 20) indukovana kombinovanim tretmanom ne prethodi indukciji ćelijske smrti (Slika 13), uradili smo dodatno ispitivanje kako bismo potvrdili da depolarizacija mitohondrija nije u osnovi citotoksičnog efekata 2DG+ROT. U tu svrhu koristili smo ciklosporin A, inhibitor promene propustljivosti

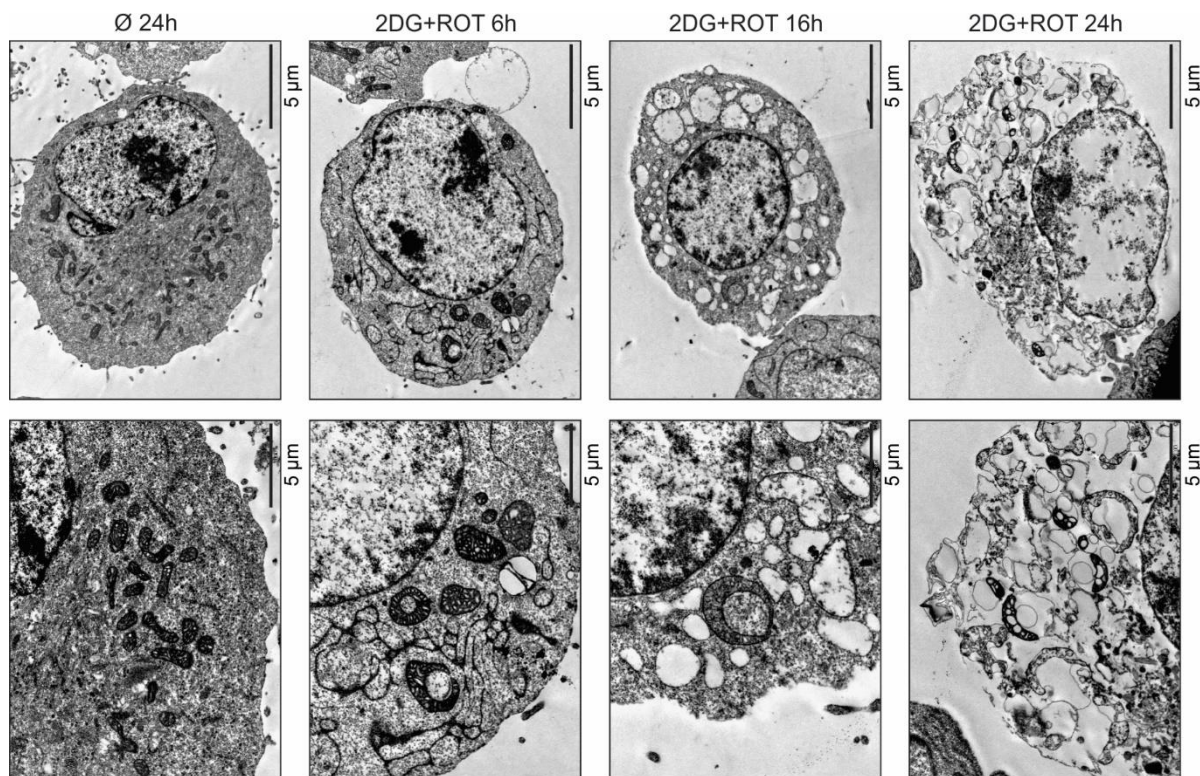
mitohondrijske membrane [178]. LDH test je pokazao da ciklosporin A nije redukovao citotoksični efekat kombinovanog tretmana (Slika 21), čime je potvrđeno da on ne zavisi od depolarizacije mitohondrija.



Slika 21. Ciklosporin A ne redukuje citotoksični efekat 2DG+ROT tretmana na B16 ćelije. B16 ćelije su tretirane 5 mM 2DG i 1 µM ROT i inkubirane, u prisustvu i odsustvu različitih koncentracija ciklosporina A. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

4.1.9. Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje oštećenja mitohondrija u B16 ćelijama

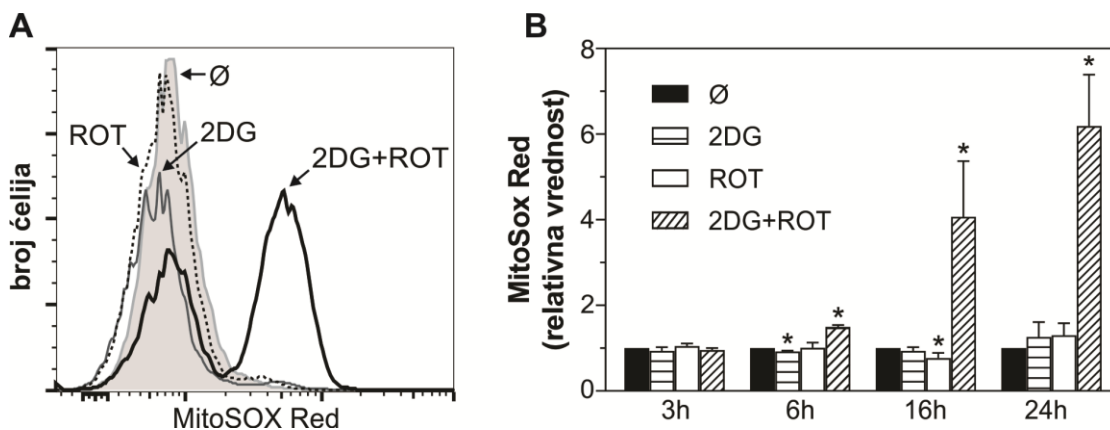
Imajući u vidu da kombinovani tretman izaziva depolarizaciju membrane mitohondrija ispitali smo da li utiče i na njihovu strukturu. B16 ćelije smo tretirali sa 2DG i ROT istovremeno, a zatim nakon različitih vremenskih intervala analizirali mitohondrije pomoću elektronskog mikroskopa. Na elektronskim mikrografijama može se primetiti da je kombinovani tretman doveo do blagog oticanja mitohondrija i pojave toroidalnih mitohondrija nakon 6 h [179]. Nakon 16 h došlo je do fragmentacije kristi i pojave izrazito dilatiranih mitohondrija sa prosvetljenim matriksom, da bi nakon 24 h mitohondrije, citoplazma i membrana ćelije bile potpuno dezintegrisane (Slika 22) [180].



Slika 22. 2DG+ROT indukuje oštećenja mitohondrija B16 ćelija. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT u kombinaciji. Nakon 6, 16 i 24 h ćelijske strukture su analizirane pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa. Prikazane su reprezentativne mikrografije sa razmernikom veličine 5 μ m.

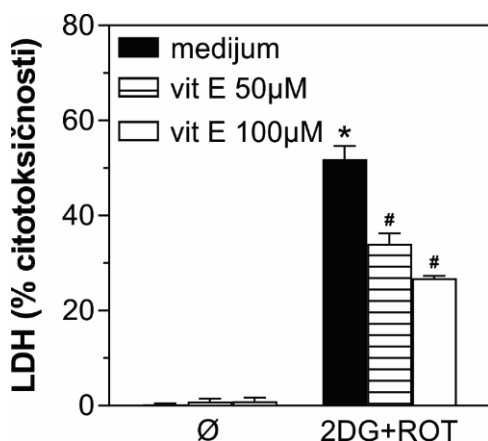
4.1.10. Superoksid sintetisan u mitohondrijama učestvuje u citotoksičnom delovanju 2DG+ROT na B16 ćelije

Različite studije su pokazale da je nekroza često praćena povećanom produkcijom superoksida u mitohondrijama [181-183], stoga smo dalje hteli da utvrdimo da li nekroza indukovana 2DG+ROT tretmanom zavisi od produkcije mitohondrijskog superoksida. U mitohondrijama tokom procesa oksidativne fosforilacije dolazi do curenja elektrona sa elektron transportnog lanca koji reaguju sa molekulima kiseonika pri čemu se formiraju superoksidni anjoni [93]. MitoSOX Red fluorescentna boja se oksiduje pod uticajem superoksida i emituje crvenu fluorescencu u mitohondrijama, pa se koristi za njegovu detekciju. Analiza na protočnom citofluorimetru B16 ćelija obojenih fluorescentnom bojom MitoSOX Red pokazala je da u ćelijama tretiranim pojedinačno 2DG i rotenonom ne dolazi do značajne produkcije superoksida, ali da njihova kombinacija već nakon 6 h indukuje snažnu, vremenski-zavisnu produkciju superoksida u mitohondrijama (Slika 23).



Slika 23. 2DG+ROT indukuje produkciju superoksida u mitohondrijama B16 ćelija. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 24 h (A) i 3, 6, 16 i 24 h (B). Po isteku tretmana ćelije su obojene MitoSOX Red fluorescentnom bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru. (A) Rezultati su prikazani u vidu histograma iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta; (B) Rezultati su prikazani kao SV \pm SD vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu, koja je svedena na 1).

Da bi smo ispitali ulogu produkcije superoksida u citotoksičnom efektu kombinovanog tretmana, B16 ćelije smo pored tretmana 2DG i/ili rotenonom tretirali i vitaminom E, antioksidansom koji inhibira sintezu i uklanja višak superoksida u mitohondrijama [184]. Rezultati LDH testa su pokazali da vitamin E značajno smanjuje citotoksični efekat kombinovanog tretmana (Slika 24), čime je potvrđeno da mitohondrijski superoksid zaista učestvuje u indukciji nekroze 2DG+ROT u B16 ćelijama.

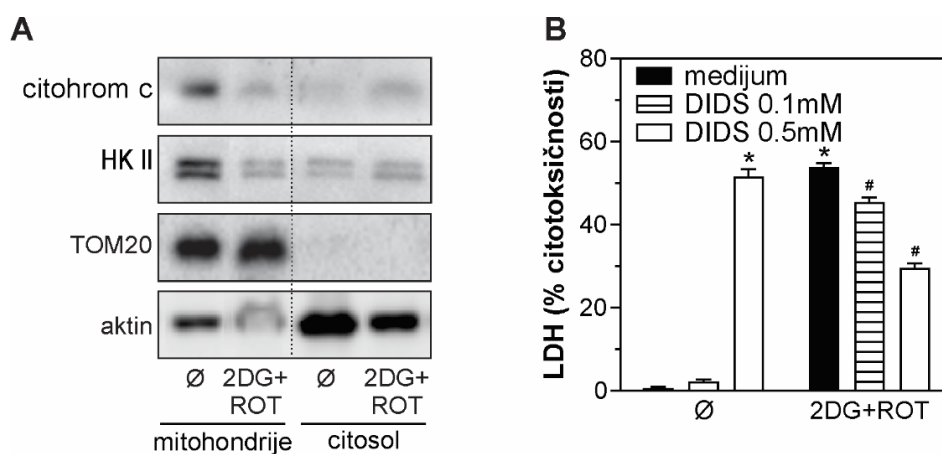


Slika 24. Vitamin E smanjuje citotoksičnost 2DG+ROT tretmana na B16 ćelije. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, u prisustvu i odsustvu različitih koncentracija vitamina E. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; # p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na tretman 2DG+ROT).

4.1.11. Citotoksičnost 2DG+ROT zavisi od otpuštanja HKII sa mitohondrija i otvaranja VDAC

Imajući u vidu da citohrom c uklanja superoksid u mitohondrijama [185], kao i da aktivira kaspaze [186], hteli smo da ispitamo da li kombinovani tretman utiče na oslobađanje citohroma c iz mitohondrija. Imunoblot metodom smo pokazali da 2DG+ROT tretman smanjuje koncentraciju citohroma c u mitohondrijskoj, a povećava u citoplazmatskoj ćelijskoj frakciji, odnosno da

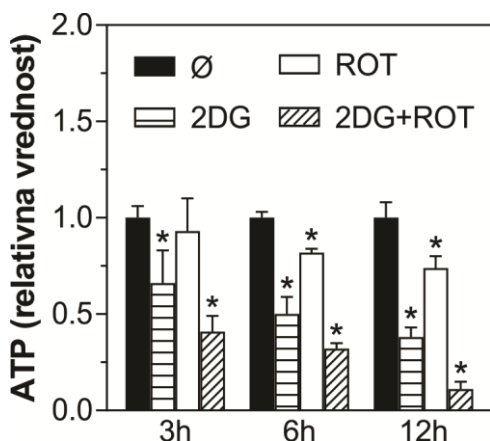
indukuje oslobađanje citohroma c iz mitohondrija u citoplazmu (Slika 25A). Dalje, pošto se i superoksid [187] i citohrom c [188, 189], otpuštaju iz mitohondrija kroz isti voltažno zavisni anjonski kanal VDAC, koji se nalazi na spoljašnjoj strani mitohondrijske membrane, hteli smo da ispitamo kako kombinovani tretman utiče na njegovu aktivnost. Efekat kombinovanog tretmana na VDAC smo posredno ispitali određivanjem lokalizacije HKII, enzima koji pored glikolize indukuje stabilizaciju i zatvaranje ovog jonskog kanala [66]. Tretman 2DG+ROT je stimulisao oslobađanje HKII sa mitohondrija u citoplazmu, što je ukazalo da dolazi do otvaranja VDAC kanala (Slika 25A). Da bismo ispitali da li otvaranje VDAC kanala ima aktivnu ulogu u indukciji nekroze kombinovanim tretmanom, koristili smo inhibitor VDAC kanala DIDS [190]. Iako je sam DIDS u većoj koncentraciji imao toksično dejstvo, u obe testirane koncentracije snažno je smanjio citotoksično delovanje 2DG+ROT (Slika 25B). Dakle, nekroza indukovana kombinovanim tretmanom najverovatnije zavisi od otpuštanja HKII sa membrane mitohondrija, otvaranjem VDAC kanala i oslobađanjem superoksida iz mitohondrija kroz VDAC.



Slika 25. 2DG+ROT indukovana nekroza zavisi od otpuštanja HKII sa mitohondrija i otvaranjem VDAC kanala. (A) B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT i nakon 12 h iz ćelija su izolovane mitohondrijske i citosolne frakcije, koje su potom pripremljene za imunoblot analizu prisustva citohroma c i heksokinaze II. Ekspresija aktina i TOM20 proteina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina kao i dobre izolacije frakcija u analiziranim uzorcima. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. (B) B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, u prisustvu i odsustvu različitih koncentracija DIDS inhibitora. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na tretman 2DG+ROT).

4.1.12. Antitumorski efekat 2DG+ROT je posredovan deplecijom ATP

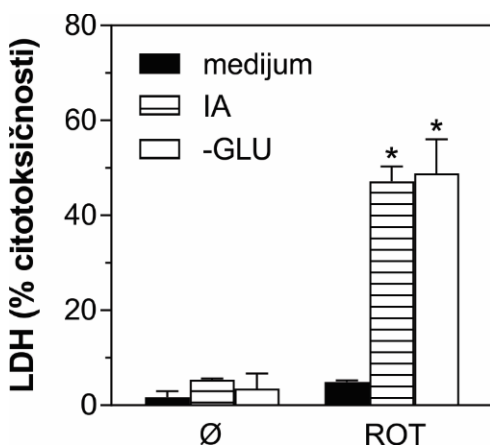
Imajući u vidu da je 2DG inhibitor glikolize a rotenon oksidativne fosforilacije, želeli smo da ispitamo u kojoj meri kombinovani tretman utiče na sintezu ATP. Ćelije su tretirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, u trajanju od 3, 6 i 12 h, nakon čega su bioluminiscentnim esejom mereni unutarćelijski nivoi ATP. Pokazano je da sam rotenon, a naročito 2DG smanjuju sintezu ATP počevši od 6 h inkubacije (Slika 26). Očekivano, deplecija ATP bila je najveća u ćelijama tretiranim kombinovanim tretmanom i postepeno se povećavala kroz vreme (Slika 26). Dakle, citotoksično delovanje 2DG+ROT koreliralo je sa indukcijom energetske deplecije.



Slika 26. Antitumorski efekat 2DG+ROT zavisi od deplecije ATP. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 3, 6 i 12 h. Intracelularni nivoi ATP izmereni su bioluminiscentnim esejom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD vrednosti triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

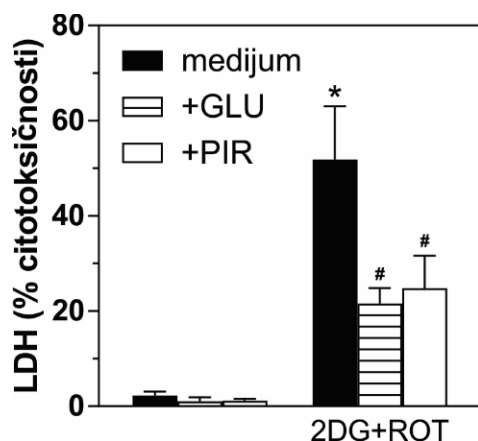
4.1.13. Antitumorski efekat 2DG+ROT je posredovan inhibicijom glikolize i oksidativne fosforilacije

U sledećim eksperimentima smo želeli da potvrdimo da su inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije odgovorne za antitumorski efekat kombinovanog tretmana. Kako bismo verifikovali ulogu inhibicije glikolize, B16 ćelije smo umesto 2DG tretirali inhibitorom glikolize jodoacetatom (IA) ili smo ih inkubirali u medijumu bez glukoze. LDH test je pokazao da su i IA i medijum bez glukoze snažno stimulisali citotoksični efekat rotenona, iako sami nisu imali toksično dejstvo (Slika 27). Ovi rezultati potvrđuju da inhibicija glikolize indukovana sa 2DG učestvuje u citotoksičnom delovanju kombinovanog tretmana.



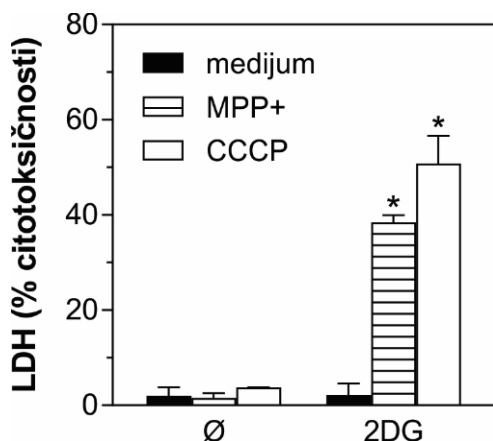
Slika 27. Rotenon sinergizuje sa inhibicijom glikolize u indukciji smrti B16 ćelija. B16 ćelije su inkubirane sa 4 μ M jodoacetatom (IA) i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, ili u medijumu bez glukoze u prisustvu i odsustvu 1 μ M rotenona. Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu u medijumu sa glukozom).

Kako bismo dalje ispitali da li je inhibicija glikolize odgovorna za antitumorski efekat 2DG+ROT, suprimirali smo efekat inhibicije glikolize dodavanjem njenog glavnog supstrata glukoze ili njenog krajnjeg produkta piruvata. LDH test je pokazao da su inkubacija B16 ćelija u medijumu sa dvostrukom koncentracijom glukoze, kao i inkubacija u medijumu sa dvostrukom koncentracijom piruvata delimično poništili toksično delovanje kombinovanog tretmana (Slika 28), čime smo potvrdili da je inhibicija glikolize odgovorna za antitumorski efekat 2DG+ROT.



Slika 28. Inhibicija glikolize je u osnovi antitumorskog efekta 2DG+ROT. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT u kombinaciji u normalnom ili u medijumima sa dva puta većim koncentracijama glukoze (+GLU) ili piruvata (+PIR). Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, # p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na 2DG+ROT u normalnom medijumu).

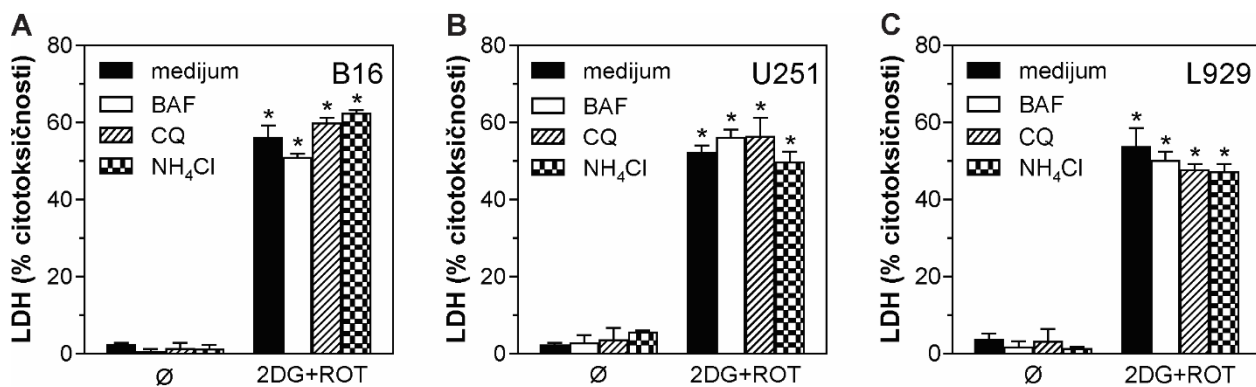
Da bismo potvrdili ulogu inhibicije oksidativne fosforilacije u antitumorskom delovanju 2DG+ROT, rotenon smo zamenili sa druga dva inhibitora oksidativne fosforilacije 1-metil-4-fenilpiridiniumom (MPP+), koji inhibira kompleks I respiratornog lanca [191], ili karbonilcijanid-m-hlorfenilhidrazonom (CCCP), koji narušava protonski gradijent [192]. Pokazali smo da poput rotenona i MPP+ i CCCP stimulišu citotoksičnost 2DG (Slika 29), što je potvrdilo ključnu ulogu inhibicije oksidativne fosforilacije u antitumorskom delovanju 2DG+ROT. Dakle, inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije odgovorne su za antitumorsko delovanje 2DG+ROT.



Slika 29. 2DG sinergizuje sa inhibicijom oksidativne fosforilacije u indukciji smrti B16 ćelija. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 4 mM MPP+ ili 30 μ M CCCP, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

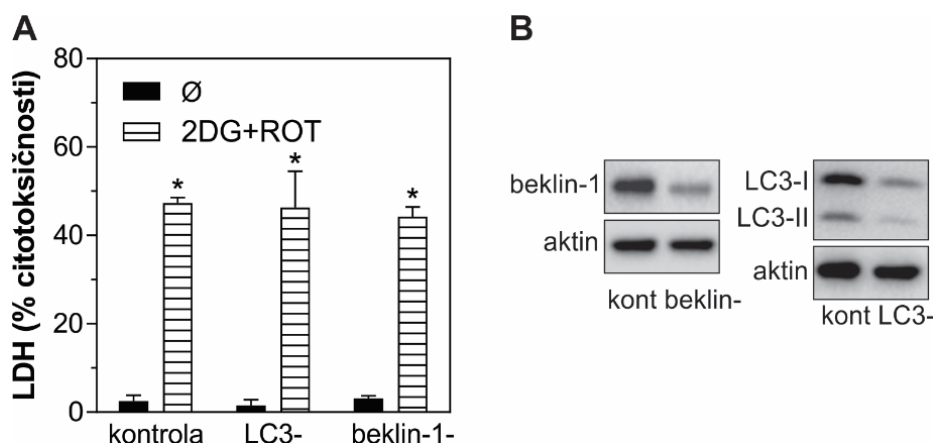
4.1.14. Citotoksični efekat 2DG+ROT ne zavisi od autofagije

U uslovima energetske deplecije autofagija obezbeđuje energiju neophodnu za osnovni ćelijski metabolizam i tako omogućava preživljavanje ćelija [43]. U skladu sa navedenim, prepostavili smo da energetski stres indukovani 2DG+ROT tretmanom aktivira protektivnu autofagiju, i u narednim eksperimentima smo hteli da njenom inhibicijom stimulišemo antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana. U tu svrhu, autofagiju smo suprimirali različitim farmakološkim i genetskim inhibitorima. Međutim, nijedan od farmakoloških inhibitora autofagije (bafilomicin A1, hlorokin i NH_4Cl) ni u jednoj od ispitivanih tumorskih linija (B16, U251 i L929) nije stimulisao citotoksično delovanje 2DG+ROT (Slika 30).



Slika 30. Citotoksično delovanje 2DG+ROT na B16, U251 i L929 ćelije ne zavisi od autofagije. (A) B16, (B) U251 i (C) L929 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, u prisustvu i odsustvu bafilomicina A1 (BAF; 10 nM), hlorokina (CQ, 20 μ M), amonijum hlorida (NH₄Cl; 10 mM). Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

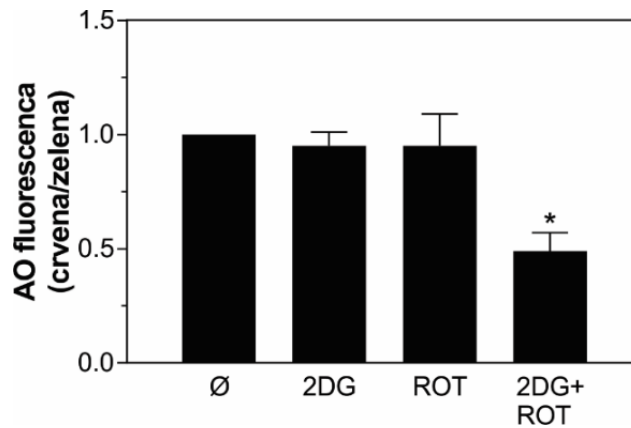
U skladu sa ovim rezultatom, inhibicija autofagije siRNA koje suprimiraju ekspresiju ključnih autofagnih proteina LC3 i beklina-1 nije imala uticaja na citotoksično delovanje kombinovanog tretmana (Slika 31). Dakle, mogli smo da zaključimo da 2DG+ROT ne indukuje protektivnu, ali ni citotoksičnu autofagiju.



Slika 31. Citotoksično delovanje 2DG+ROT na B16 ne zavisi od autofagije. B16 ćelije transfekovane kontrolnom, LC3 ili beklin-1 siRNA su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT. Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom (A). Uspešnost transfekcije je potvrđena imunoblotom (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

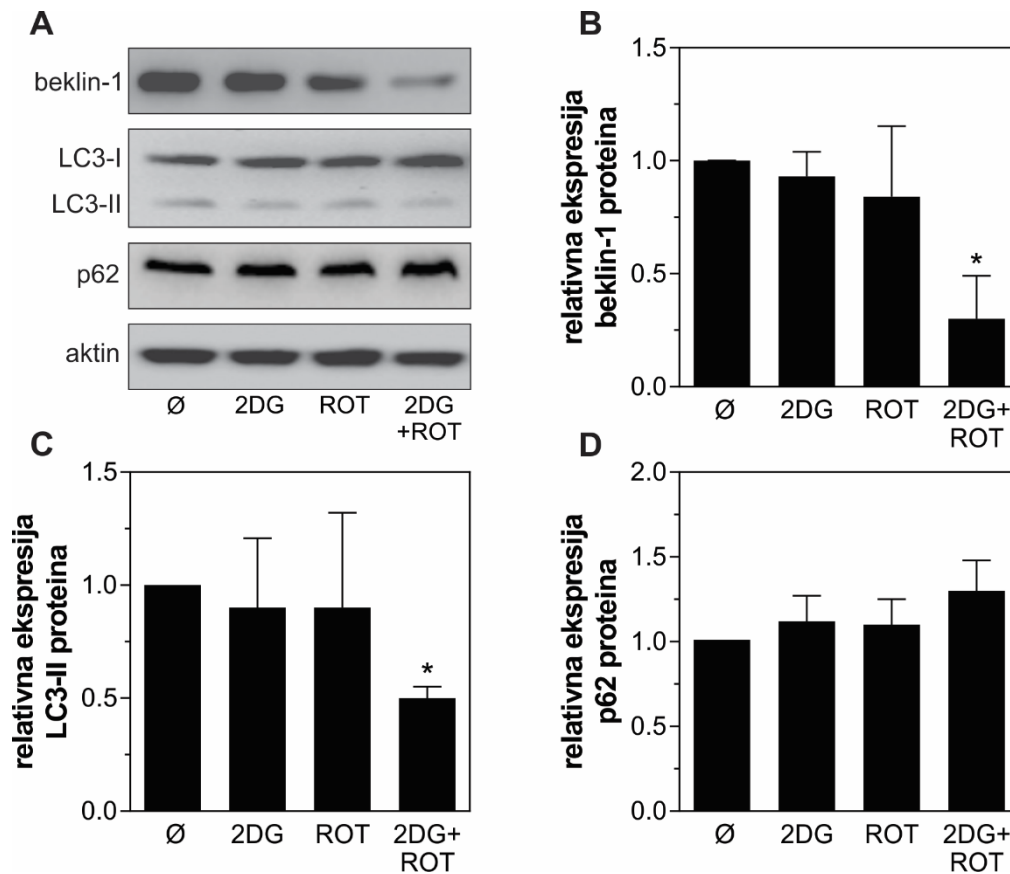
Imajući u vidu prethodno navedene rezultate, u narednim eksperimentima bilo je neophodno da ispitamo da li kombinovani tretman uopšte indukuje autofagiju. U prvom eksperimentu ispitivali smo kako tretman 2DG+ROT utiče na kiselost citoplazme, korišćenjem fluorescentne boje akridin-oranž, koja na neutralnom pH u citoplazmi fluorescira zeleno, a u kiselom pH, kakav je u lizozomima i autolizozomima, fluorescira crveno. Odnos crvene i zelene fluorescence izmerene protočnom citofluorimetrijom, proporcionalan je broju kiselih vezikula. Analiza je pokazala da kod ćelija tretiranih posebno sa 2DG i ROT nije došlo do značajne promene odnosa crvene i zelene

fluorescence, dok je u ćelijama tretiranim kombinovanim tretmanom došlo do smanjenja odnosa crvene i zelene fluorescence, što sugerise da u ovim ćelijama ima manje lizozoma i/ili autolizozoma nego u kontrolnim ćelijama (Slika 32).



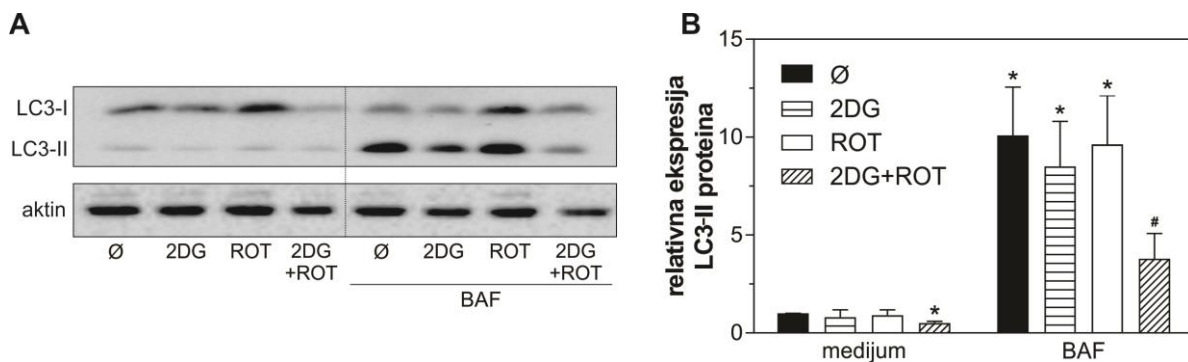
Slika 32. 2DG+ROT smanjuje broj kiselih vezikula u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 16 h tretmana ćelije su obojene akridin-oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Akumulacija kiselih vezikula kvantifikovana je kao odnos crvene i zelene fluorescence. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, koja je svedena na 1).

U sledećem eksperimentu B16 ćelije smo inkubirali sa 2DG i ROT, samostalno i u kombinaciji, a zatim smo imunoblot metodom ispitivali ekspresiju proautofagnog proteina beklina-1, konverziju citoplazmatske forme LC3-I u formu vezanu za membranu autofagozoma LC3-II, i degradaciju specifičnog supstrata autofagije SQSTM1/p62 (*engl.* sequestosome 1/p62) proteina. Za razliku od pojedinačnih tretmana koji nisu imali značajnijeg uticaja na koncentracije pomenutih proteina, kombinovani tretman je smanjio koncentracije beklina-1 i LC3-II, dok na koncentraciju proteina p62 nije imao značajnog efekta (Slika 33). Dakle, mogli smo zaključiti da 2DG+ROT ne samo što ne indukuje autofagiju, već je i inhibira.



Slika 33. 2DG+ROT inhibira ekspresiju beklina-1 i konverziju LC3, ali ne menja koncentraciju p62 proteina. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT samostalno ili u kombinaciji. Nakon 16 h koncentracije beklina-1, LC3 i p62 proteina analizirane su imunoblot metodom (A) i kvantifikovane denzitometrijom (B, C, D). Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazani su rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (A), kao i SV \pm SD njihove denzitometrijske analize (B, C, D) (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

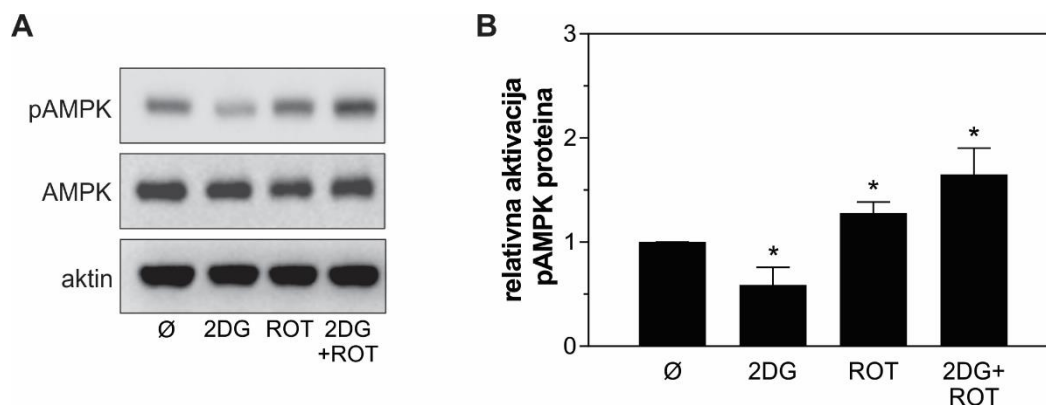
Pošto se LC3 protein razgrađuje autofagijom [193], smanjena koncentracija LC3-II u kombinovanom tretmanu mogla bi ukazivati ne samo na smanjenu konverziju LC3-I u LC3-II, već i na njegovu povećanu razgradnju, odnosno na povećan autofagni fluks. Da bismo isključili ovakvu mogućnost, merili smo koncentraciju LC3-II u prisustvu inhibitora autolizozomalne razgradnje bafilomicina A1. Očekivano, bafilomicin A1 je povećao koncentraciju LC3-II (Slika 34). 2DG i rotenon samostalno nisu imali značajnog uticaja na koncentraciju LC3-II u ćelijama u kojima je njegova razgradnja bila inhibirana, odnosno nisu indukovali autofagiju. Sa druge strane, kombinovani tretman značajno je smanjio nivo LC3-II proteina u ćelijama tretiranim bafilomicinom A1, što je ukazalo na inhibiciju sinteze LC3 i supresiju autofagije. Nasuprot našim očekivanjima, na osnovu prethodnih rezultata mogli smo da zaključimo da inhibicija autofagije nema uticaja na citotoksičnost kombinovanog tretmana, zbog toga što kombinovani tretman ne indukuje već inhibira autofagiju.



Slika 34. 2DG+ROT inhibira autofagni fluks. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu inhibitora autofagije 10 nM BAF. Nakon 6 h koncentracije LC3-II analizirane su imunoblot metodom i kvantifikovane denzitometrijom. Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (A), kao i SV \pm SD njihove denzitometrijske analize (B) (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na bafilomicin A1).

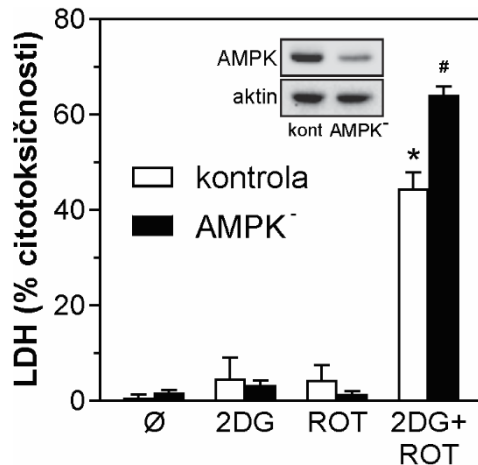
4.1.15. Aktivacija AMPK ima protektivnu ulogu u B16 ćelijama tretiranim 2DG+ROT

Imajući u vidu da kombinovani tretman indukuje snažnu energetska depleciju (Slika 26), ispitivali smo da li modulacija AMPK, osnovnog energetske senzora u ćeliji [194], učestvuje u antitumorskom delovanju 2DG+ROT. U prvom eksperimentu imunoblot analizom je ispitivano kako 2DG, rotenon i njihova kombinacija utiču na aktivnost AMPK. Pokazano je da za razliku od 2DG koja smanjuje, rotenon, a naročito kombinovani tretman povećavaju fosforilaciju, odnosno aktivnost AMPK (Slika 35).



Slika 35. 2DG+ROT aktivira AMPK u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. (A) Nakon 2 h koncentracije AMPK i pAMPK analizirane su imunoblotom i (B) kvantifikovane denzitometrijom. Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (A), kao i SV \pm SD njihove denzitometrijske analize (B) (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, koja je svedena na 1).

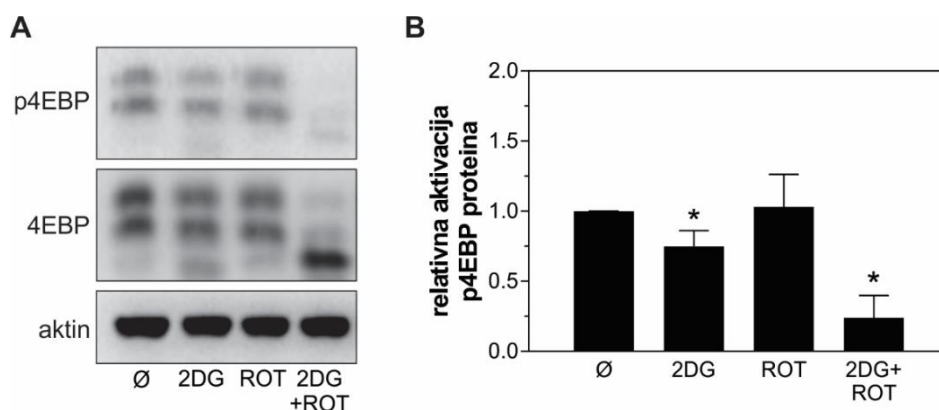
Da bismo utvrdili da li aktivacija AMPK učestvuje u antitumorskom efektu kombinovanog tretmana, ispitivali smo citotoksičnost 2DG+ROT u B16 ćelijama u kojima je ekspresija AMPK bila genetski suprimirana. Supresija AMPK nije značajno uticala na citotoksično delovanje pojedinačnih tretmana, ali je dodatno povećala antitumorski efekat 2DG+ROT (Slika 36), sugerišući da aktivacija AMPK umanjuje antitumorski efekat kombinovanog tretmana, odnosno da nije u osnovi njegovog antitumorskog delovanja.



Slika 36. Aktivacija AMPK štiti B16 ćelije od 2DG+ROT. B16 ćelije su transfekovane kontrolnom ili AMPK siRNA (uspešnost transfekcije je potvrđena imunoblotom) i inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μM ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h citotoksičnost je merena LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; #p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA tretirane 2DG+ROT).

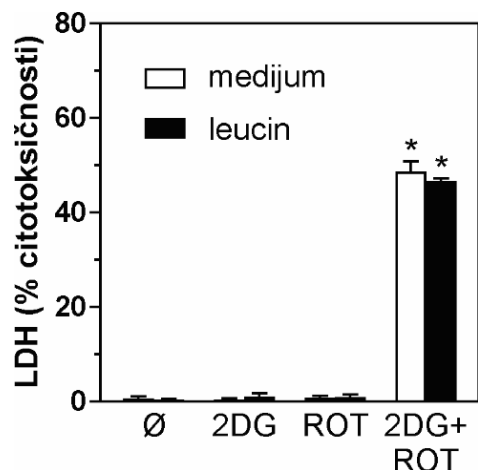
4.1.16. Citotoksični efekat 2DG+ROT ne zavisi od inhibicije mTORC1

U narednim eksperimentima ispitivali smo ulogu mTORC1, glavnog regulatora rasta i metabolizma [195], u antitumorskom delovanju kombinovanog tretmana. U skladu sa aktivacijom AMPK (Slika 35), imunoblot analiza je pokazala da kombinacija 2DG i ROT smanjuje fosforilaciju 4EBP u B16 ćelijama, ukazujući na smanjenu aktivaciju mTORC1 (Slika 37).



Slika 37. 2DG+ROT smanjuje fosforilaciju 4EBP u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μM ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 2 h koncentracije p4EBP i 4EBP analizirane su imunoblotom (A) i kvantifikovane denzitometrijom (B). Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Rezultati su prikazani kao reprezentativni blotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta (A) i kao SV ± SD njihove denzitometrijske analize (B) (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, koja je svedena na 1).

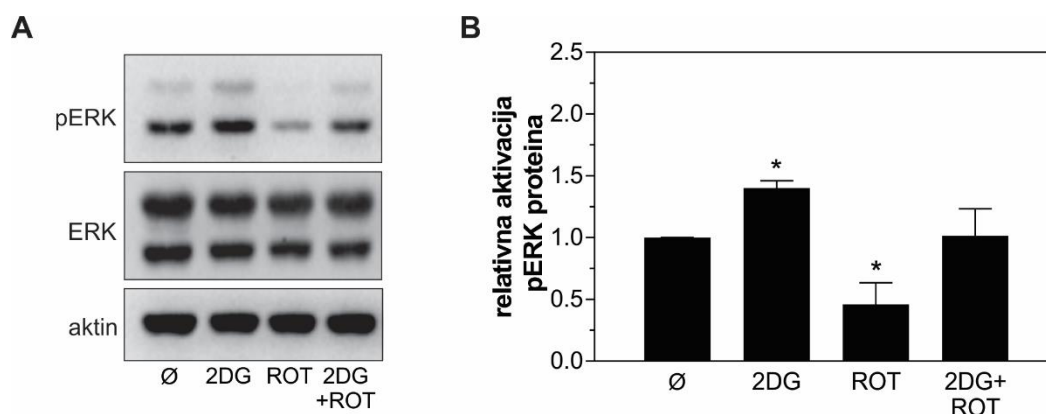
Da bismo ispitali da li inhibicija mTORC1 učestvuje u citotoksičnom delovanju 2DG+ROT, koristili smo aktivator mTORC1 leucin [196]. Reaktivacija mTORC1 leucinom nije imala uticaja na citotoksičnost kombinovanog, niti pojedinačnih tretmana (Slika 38). Dakle, prethodno detektovana inhibicija mTORC1 ne doprinosi antitumorskom delovanju 2DG+ROT.



Slika 38. Citotoksični efekat 2DG+ROT na B16 ćelije ne zavisi od inhibicije mTORC1. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu 6 mM leucina. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu).

4.1.17. Citotoksični efekat 2DG+ROT ne zavisi od aktivacije ERK

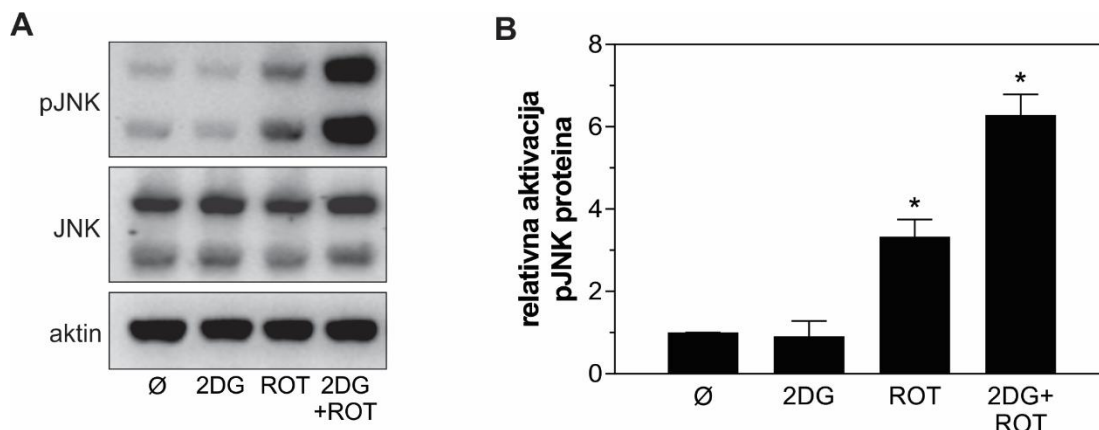
Mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK) su važni enzimi za transmisiju signala koji kontrolišu mnoge važne ćelijske procese, među kojima su proliferacija ćelija, preživljavanje i smrt [197]. Generalno, aktivacija ERK1/2 stimuliše preživljavanje ćelija, dok JNK prenosi signale ćelijske smrti [198]. Analiza imunoblotom je pokazala da 2DG povećava, a rotenon smanjuje fosforilaciju ERK proteina, dok kombinacija ova dva agensa nije značajno uticala na aktivaciju ERK kinaza (Slika 39).



Slika 39. 2DG+ROT ne utiče na fosforilaciju ERK u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 2 h koncentracije pERK i ERK analizirane su imunoblotom (A) i kvantifikovane denzitometrijom (B). Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Rezultati su prikazani kao reprezentativni blotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta (A) i kao SV \pm SD njihove denzitometrijske analize (B) (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, koja je svedena na 1).

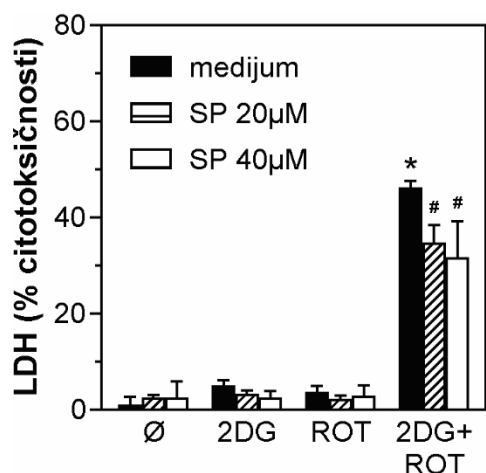
4.1.18. Citotoksični efekat 2DG+ROT zavisi od aktivacije JNK

Na kraju smo ispitali ulogu JNK u citotoksičnom delovanju kombinovanog tretmana. Imunoblot analiza nakon 2 h tretmana je pokazala da 2DG ne menja, kao i da rotenon samostalno, a naročito u kombinaciji sa 2DG značajno povećava fosforilaciju JNK (Slika 40).



Slika 40. 2DG+ROT stimuliše fosforilaciju JNK u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji. Nakon 2 h koncentracije pJNK i JNK analizirane su imunoblotom (A) i kvantifikovane denzitometrijom (B). Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Rezultati su prikazani kao reprezentativni blotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta (A), i kao $SV \pm SD$ njihove denzitometrijske analize (B) (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, koja je svedena na 1).

Da bismo ispitali da li aktivacija JNK učestvuje u citotoksičnom delovanju 2DG+ROT koristili smo farmakološki inhibitor JNK kinaze SP600125. LDH test je pokazao da SP600125 inhibitor nije uticao na efekte 2DG i ROT, ali je značajno smanjio citotoksičnost 2DG+ROT (Slika 41), ukazujući da je antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana posredovano aktivnošću MAP kinaze JNK. Dakle, na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da AMPK inhibira, JNK doprinosi, dok mTORC1 i ERK ne učestvuju u antitumorskom delovanju 2DG+ROT.

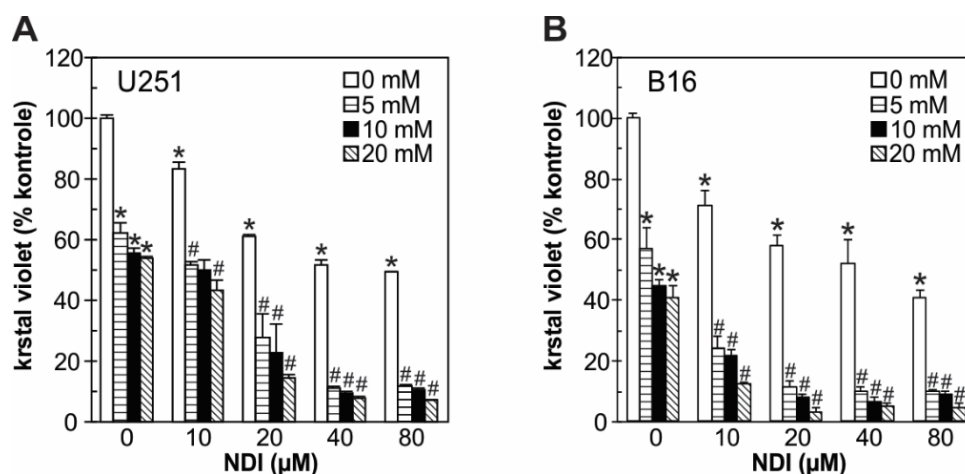


Slika 41. Citotoksični efekat 2DG+ROT u B16 ćelijama zavisi od aktivacije JNK. B16 ćelije su inkubirane sa 5 mM 2DG i 1 μ M ROT, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu različitih koncentracija SP600125 (SP). Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na tretman 2DG+ROT).

4.2. Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma

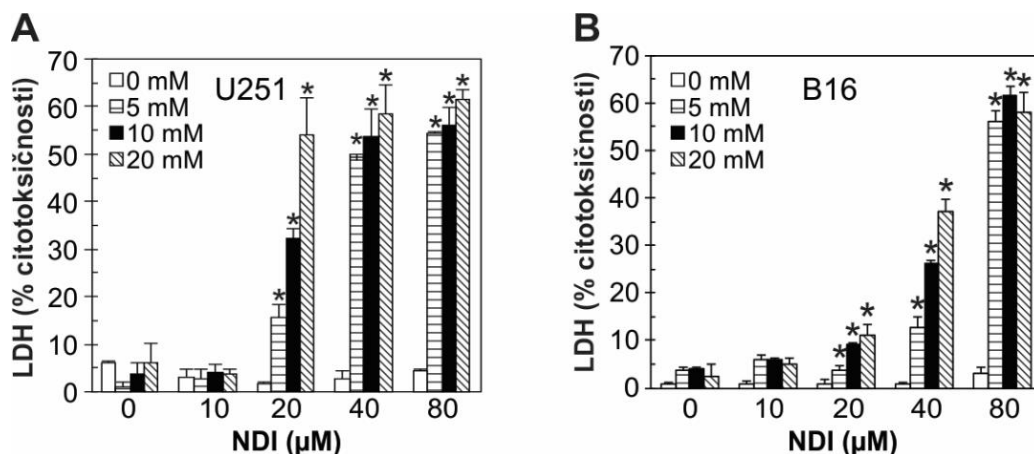
4.2.1. 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, smanjuju vijabilnost U251 i B16 ćelija

Tumorske ćelije pored brojnih prednosti stečenih malignom transformacijom imaju i niz "slabosti" koje mogu biti iskorišćene za razvijanje novih terapijskih pristupa. U prvom delu ove doktorske disertacije za tretman tumorskih ćelija iskoristili smo činjenicu da one imaju jači energetski metabolizam od netransformisanih ćelija. U drugom delu, osim činjenice da tumorske ćelije imaju pojačanu glikolizu, iskoristili smo i to što imaju povećan broj, zapreminu i enzimski sadržaj lizozoma, kao i da su membrane njihovih lizozoma fragilnije od membrana lizozoma primarnih ćelija. Da bi se ispitaio antitumorski efekat lizozomalnog deterdženta NDI, pojedinačno ili u kombinaciji sa inhibitorom glikolize 2DG, tretirali smo humane ćelije glioma U251 i mišje ćelije melanoma B16 različitim dozama oba agensa, a vijabilnost tumorskih ćelija je merena nakon 24 h od početka tretmana. Kristal violet test je pokazao da i 2DG i NDI samostalno na dozno-zavisnan način smanjuju broj živih U251 (Slika 42A) i B16 (Slika 42B) ćelija, ali je njihov efekat na vijabilnost tumorskih ćelija znatno izraženiji u kombinovanom 2DG+NDI tretmanu (Slika 42).



Slika 42. 2DG i NDI smanjuju vijabilnost U251 i B16 ćelija na dozno-zavisnan način. (A) U251 i (B) B16 ćelije su tretirane različitim koncentracijama 2DG i NDI. Nakon 24 h vijabilnost ćelija je merena kristal violet testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz jednog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu; #p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

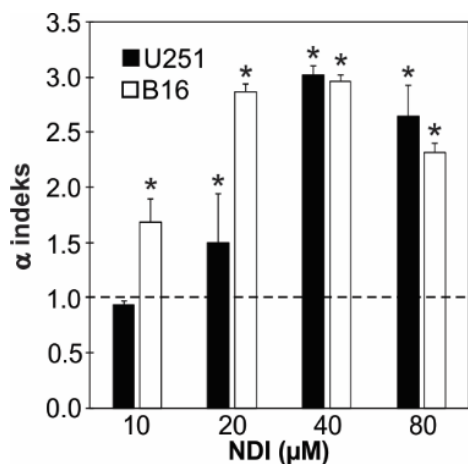
Potom smo ispitivali na koji način 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji utiču na oslobađanje intracelularnog enzima laktat dehidrogenaze iz U251 i B16 ćelija. Slično kao i u rezultatima prikazanim u prvom delu disertacije, pojedinačni tretmani u različitim koncentracijama, nisu indukovali značajno oslobađanje LDH enzima u U251 (Slika 43A) i B16 ćelijama (Slika 43B). Nasuprot tome, kombinovani tretman je doveo do značajnog oslobađanja laktat dehidrogenaze na dozno-zavisnan način i u U251 i u B16 ćelijama (Slika 43).



Slika 43. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje oslobađanje LDH u U251 i B16 ćelijama na dozno-zavisan način. (A) U251 i (B) B16 su inkubirane sa različitim dozama 2DG (5-20 mM) i NDI (10-80 μM) samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h ispitivana je citotoksičnost tretmana LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu ili u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

4.2.2. 2DG i NDI sinergizuju u ubijanju U251 i B16 ćelija

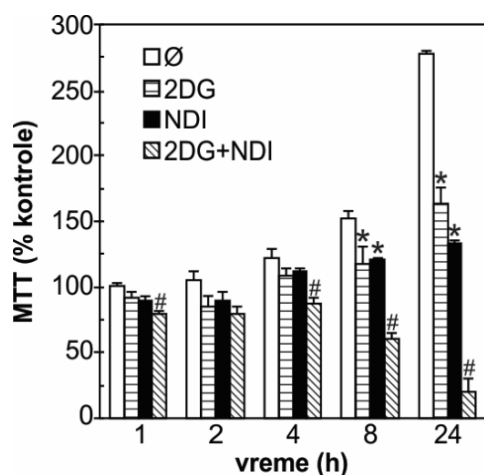
Kako bismo odredili vrstu interakcije između 2DG i NDI izračunat je α indeks. Budući da su vrednosti α indeksa izračunate na osnovu rezultata dobijenih kristal violet testom i za U251 i za B16 ćelije bile veće od 1, matematička analiza je pokazala da postoji sinergizam u antitumorskom delovanju 2DG i NDI (Slika 44). Na osnovu α indeksa i dobijenih vrednosti LDH testom (Slika 43), moglo se zaključiti da su U251 ćelije osetljivije na kombinovani tretman 2DG+NDI nego B16, a pošto je α indeks bio najveći za 10 mM 2DG i 40 μM NDI u obe ćelijske linije, ove koncentracije i U251 ćelije su izabrane za dalje eksperimente.



Slika 44. 2DG i NDI u kombinaciji sinergistički ubijaju U251 i B16 ćelije. U251 i B16 su inkubirane sa 10 mM 2DG i 10-80 μM NDI. Vrednosti α indeksa kao mere uzajamnog efekta (sinergizma/ antagonizma) dva agensa izračunate su primenom formule $\alpha = SF_{2DG} \times SF_{NDI} / SF_{2DG+NDI}$, gde su vrednosti SF_{2DG} , SF_{NDI} , $SF_{2DG+NDI}$ frakcije živih ćelija dobijene kristal violet testom nakon 24 h tretmana. Rezultati su prikazani kao SV ± SD vrednosti iz tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava vrednosti >1).

4.2.3. 2DG i NDI smanjuju vijabilnost U251 i B16 ćelija na vremenski-zavisan način

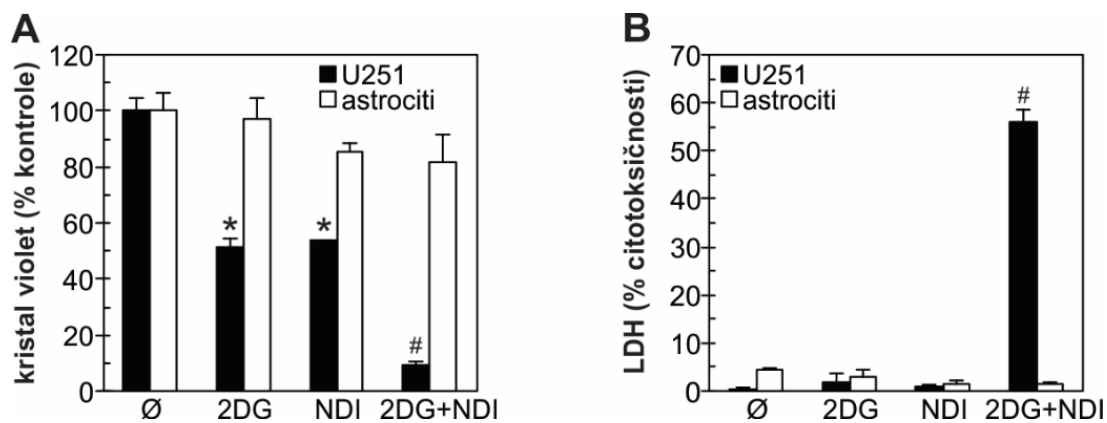
Da bismo ispitali kinetiku antitumorskog delovanja 2DG i NDI, U251 ćelije smo tretirali ovim supstancama samostalno i u kombinaciji, nakon čega smo u različitim vremenskim intervalima određivali vijabilitet ćelija testom aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze (MTT). Antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana moglo se uočiti već nakon 1 h, a zatim se na vremenski-zavisan način postepeno povećavalo tokom naredna 24 h (Slika 45).



Slika 45. 2DG i NDI smanjuju vijabilnost U251 ćelija na vremenski-zavisan način. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Nakon 1, 2, 4, 8 i 24 h određivana je vijabilnost ćelija pomoću MTT testa. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

4.2.4. 2DG, NDI i njihova kombinacija ne ubijaju primarne ćelije

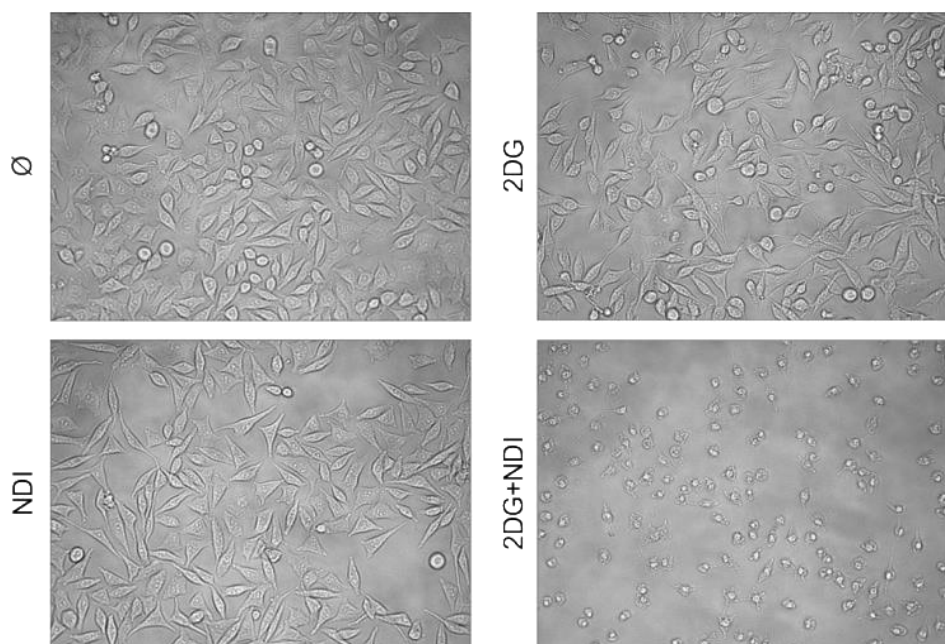
Dalje smo želeli da ispitamo da li je sinergistički citotoksični efekat ograničen samo na tumorske ćelije ili postoji i kada se primeni na zdrave ćelije. Da bismo uporedili efekte 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, na tumorskim i zdravim ćelijama, istovremeno smo tretirali U251 ćelije i primarne astrocite pacova i nakon 24 h od početka tretmana merili vijabilost ćelija kristal violet i LDH testom. Analize su pokazale da su za razliku od U251, primarni astrociti pacova skoro neosetljivi na tretman sa 2DG, NDI, kao i na njihov kombinovani tretman, što je pokazano i bojenjem ćelija kristal violetom (Slika 46A), kao i ispitivanjem citotoksičnosti kombinovanog tretmana LDH testom (Slika 46B).



Slika 46. 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, smanjuju vijabilnost i indukuju oslobađanje LDH iz U251 ćelija, ali ne i primarnih astrocita pacova. (A, B) U251 i primarni astrociti su inkubirani sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je (A) vijabilnost ćelija kristal violet testom, dok je (B) citotoksičnost određena LDH testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu i u odnosu na tretman sa 2DG ili NDI).

4.2.5. Kombinovani tretman 2DG+NDI menja morfologiju U251 ćelija

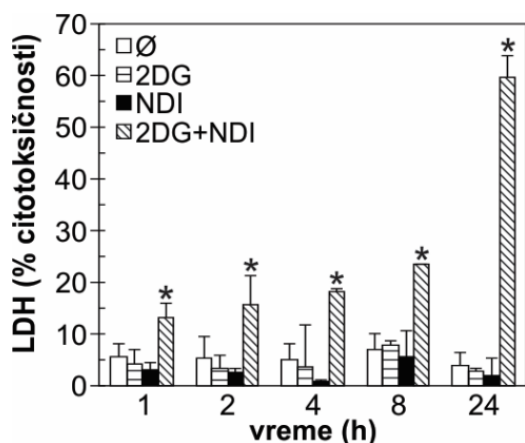
Kako bi se ispitaio uticaj 2DG i NDI na gustinu i morfologiju U251 ćelija, ćelije su nakon 8 h od početka tretmana posmatrane pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Analiza mikroskopija je pokazala da je gustina U251 ćelija tretiranih samo sa 2DG i NDI bila smanjena, verovatno usled suprimirane proliferacije, dok je morfologija ćelija u velikoj meri bila očuvana (Slika 47). Takođe je pokazano i da su se ćelije izložene kombinovanom tretmanu smanjile, zaokruglile, odlepile od podloge, izgubile svoj karakterističan poligonalni oblik i definisane ivice u odnosu na kontrolne ćelije, što sve ukazuje na indukciju ćelijske smrti (Slika 47) [170].



Slika 47. Uticaj 2DG i NDI na morfologiju U251 ćelija. U251 ćelije su tretirane 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Morfologija tretiranih ćelija je analizirana pod svetlosnim mikroskopom 8 h nakon početka tretmana i upoređivana sa morfologijom kontrolnih ćelija (uveličanje 10x).

4.2.6. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje oslobađanje LDH u U251 ćelijama na vremenski-zavisan način

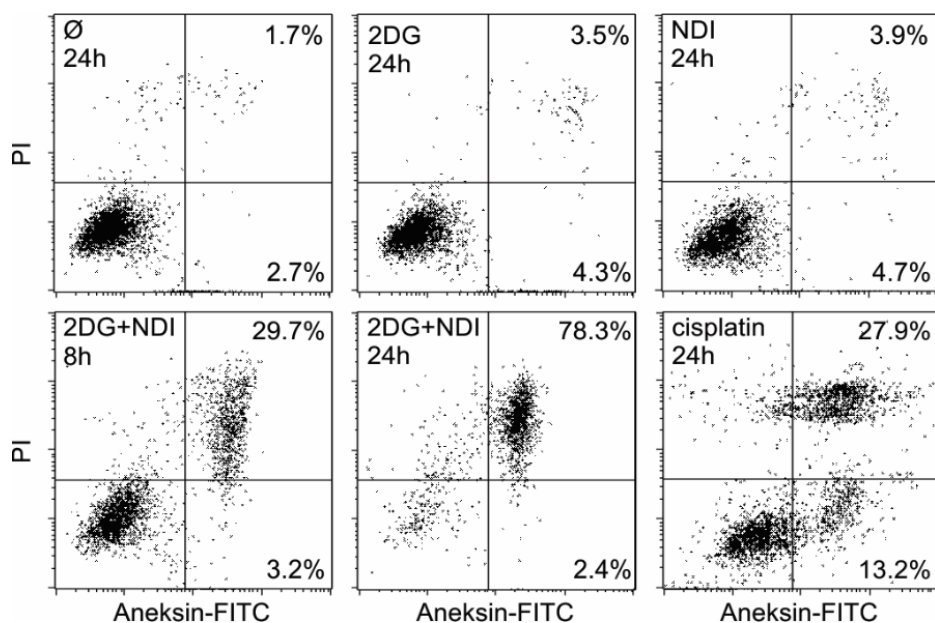
Pošto su prethodni rezultati pokazali da 2DG i NDI sinergistički ubijaju U251 i B16 ćelije, dalje je ispitivan tip (apoptoza ili nekroza) i mehanizmi ćelijske smrti indukovane kombinovanim tretmanom. Dakle, LDH test je pokazao da prilikom izlaganja U251 i B16 ćelija pojedinačnim tretmanima ne dolazi do značajnog oslobađanja LDH (Slika 43), sugerišući da ne postoje oštećenja ćelijske membrane, dok se pri izlaganju kombinovanom tretmanu nivo LDH u supernatantima značajno povećava (Slika 43), ukazujući na gubitak integriteta ćelijske membrane. Kako bismo ispitali kinetiku citotoksičnog delovanja kombinovanog tretmana pratili smo oslobađanje LDH enzima u različitim vremenskim intervalima u U251 ćelijama. U skladu sa podacima dobijenim MTT testom (Slika 45) i LDH test je pokazao da se iz ćelija tretiranim sa 2DG+NDI oslobađanje laktat dehidrogenaze desilo brzo, nakon samo 1 h od početka tretmana, a potom se postepeno povećavalo do kraja inkubacije (24 h) (Slika 48), što je potvrdilo vremensku zavisnost oštećenja integriteta ćelijske membrane.



Slika 48. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje oslobađanje LDH u U251 ćelijama na vremenski zavisni način. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI samostalno i u kombinaciji. Nakon 1, 2, 4, 8 i 24 h ispitivana je citotoksičnost kombinovanog tretmana LDH testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

4.2.7. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje nekrozu U251 ćelija

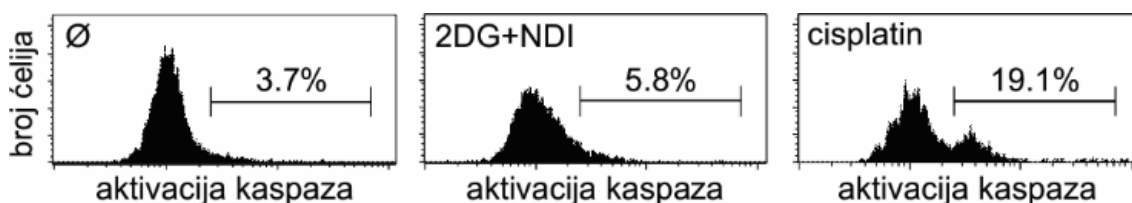
Uzimajući u obzir rezultate LDH testa kako bismo razjasnili da li se radi o primarnoj ili sekundarnoj nekrozi, U251 ćelije su 8 i 24 h nakon tretmana obojene fluorescentnim bojama aneksin V-FITC i propidijum jodidom (PI), a potom analizirane na protočnom citofluorimetru. Analiza na protočnom citofluorimetru je pokazala da tretman 2DG ili NDI nije uzrokovao značajne promene u broju ćelija sa eksternalizovanim fosfatidilserinom ili sa narušenim integritetom membrane (Slika 49). Sa druge strane, kombinovani tretman je indukovao porast broja nekrotičnih (aneksin⁺/PI⁺), ali ne i apoptotičnih ćelija (aneksin⁺/PI⁻) nakon 8 i 24 h, za razliku od hemoterapijskog leka cisplatina koga smo koristili kao pozitivnu kontrolu za indukciju apoptoze [175], koji je indukovao značajno povećanje i (aneksin⁺/PI⁻) i (aneksin⁺/PI⁺) ćelija (Slika 49). Dakle, 2DG+NDI najverovatnije indukuje nekrozu, a ne apoptozu gliomskih ćelija.



Slika 49. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje nekrozu U251 ćelija. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji, ili sa 50 μ M cisplatinom. Nakon 8 i 24 h od početka tretmana ćelije su bojene sa aneksinV-FITC i propidijum jodidom i analiziran je procenat nekrotičnih (aneksin⁺/PI⁺) i apoptotičnih (aneksin⁺/PI⁻) ćelija na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

4.2.8. Kombinovani tretman 2DG+NDI ne indukuje aktivaciju kaspaza

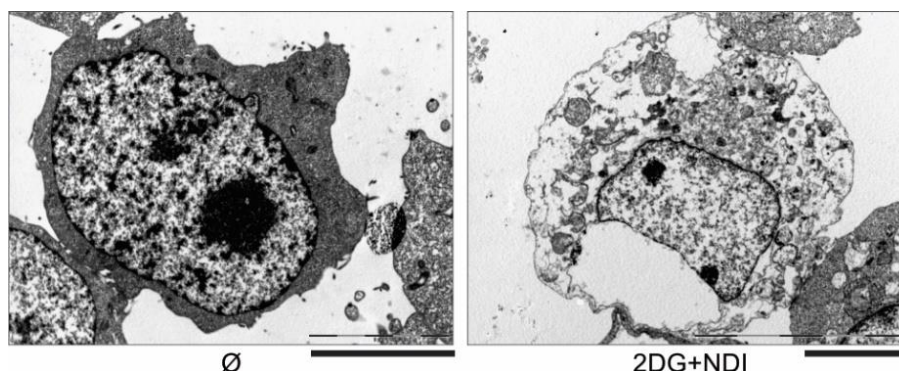
Da bismo dalje ispitali ovu pretpostavku, ispitivali smo da li kombinovani tretman 2DG+NDI dovodi do aktivacije kaspaza, glavnih enzima egzekutora u apoptozi [199]. U251 ćelije su nakon 4 h od početka tretmana obojene pan-kaspaznim inhibitorom Apostat i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su pokazali da kombinovani tretman 2DG+NDI, za razliku od cisplatina, ne indukuje aktivaciju kaspaza (Slika 50), ukazujući ponovo na odsustvo apoptoze koja zavisi od aktivacije kaspaza.



Slika 50. Kombinovani tretman 2DG+NDI ne indukuje aktivaciju kaspaza. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI ili sa 50 μ M cisplatinom. Nakon 4 h ćelije su obojene pan-kaspaznim inhibitorom Apostat i aktivacija kaspaza je analizirana na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u vidu histograma iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

4.2.9. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje dezintegraciju ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme U251 ćelija

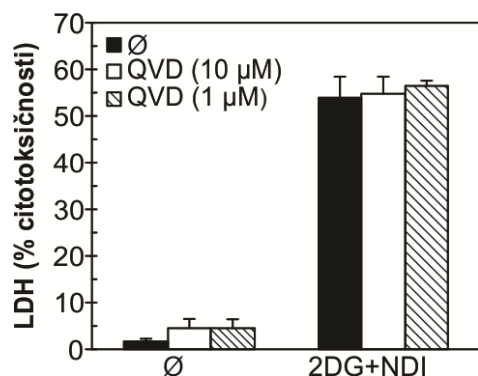
Tip ćelijske smrti koju indukuje kombinovani tretman ispitivali smo i transmissionom elektronskom mikroskopijom. Za razliku od kontrolnih U251 ćelija, kod ćelija tretiranih sa 2DG+NDI nakon 24 h od početka tretmana mogla se jasno primetiti dezintegracija ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme (Slika 51), što su glavne morfološke karakteristike nekrotične ćelijske smrti [171]. Dakle, iz svega navedenog moglo se nedvosmisleno zaključiti da kombinovani tretman izaziva nekrozu tumorskih ćelija.



Slika 51. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje dezintegraciju ćelijske membrane i gubitak elektronske gustine citoplazme U251 ćelija. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI u kombinaciji. Nakon 24 h morfolologija ćelija je analizirana pomoću transmissionog elektronskog mikroskopa. Prikazane su reprezentativne mikrografije sa razmernikom veličine 5 μ m.

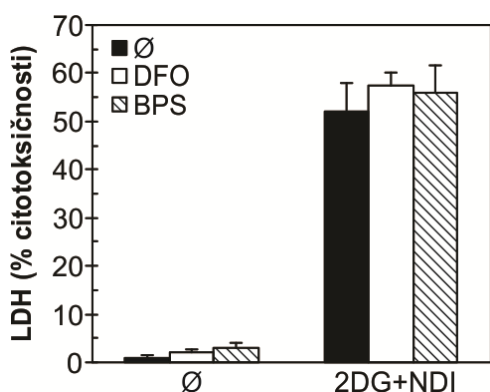
4.2.10. Apoptoza, ferroptoza, nekroptoza i autofagija nisu uključene u antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana 2DG+NDI

U narednim eksperimentima primenom odgovarajućih inhibitora ispitivano je da li i neki od tipova programirane ćelijske smrti (apoptoza, ferroptoza, nekroptoza, autofagija) [200, 201] doprinosi citotoksičnom delovanju 2DG+NDI. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, u prisustvu i odsustvu inhibitora kaspaza širokog spektra QVD-OPH, nakon čega je ispitivana vijabilnost ćelija. Inhibitor kaspaza QVD-OPH nije imao efekta na smrt U251 ćelija indukovanu 2DG+NDI tretmanom (Slika 52), ukazujući još jednom da kombinovani tretman ne indukuje apoptozu.



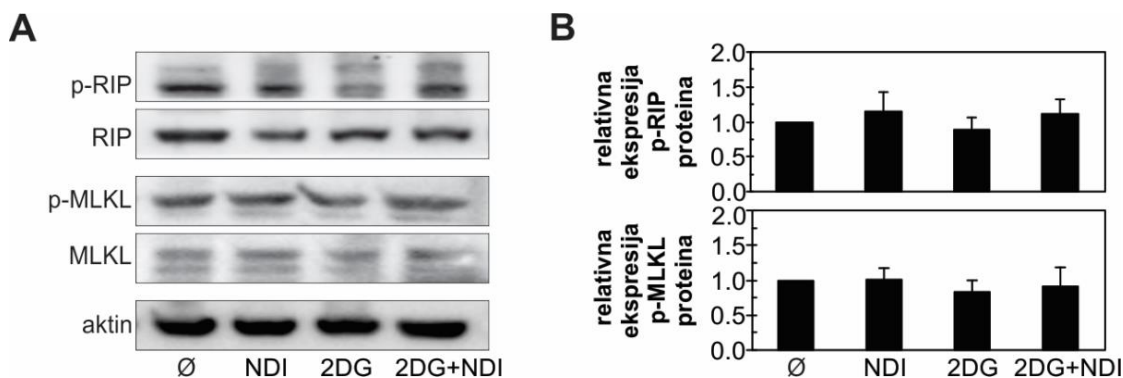
Slika 52. Apoptoza nije uključena u ćelijsku smrt indukovanu kombinovanim tretmanom 2DG+NDI. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 µM NDI u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija inhibitora kaspaza QVD-OPH (QVD). Nakon 24 h ispitivana je citotoksičnost kombinovanog tretmana LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

Helatori gvožđa deferoksamin (DFO) i batofenantrolin disulfonat (BPS), koji se koriste kao inhibitori ferroptoze [202, 203], takođe nisu smanjili citotoksično delovanje tretmana 2DG+NDI (Slika 53), čime je utvrđeno da ćelije ne umiru ferroptozom.

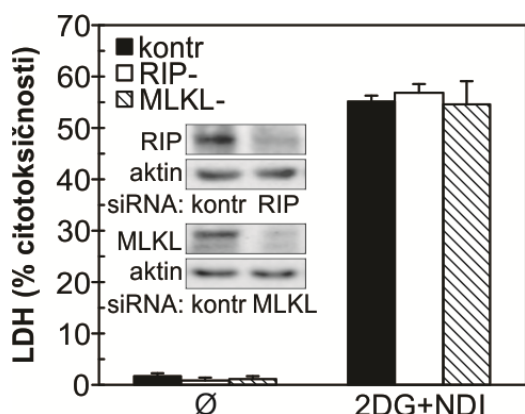


Slika 53. Ferroptoza nije uključena u ćelijsku smrt indukovanu kombinovanim tretmanom 2DG+NDI. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 µM NDI u prisustvu ili odsustvu helatora gvožđa deferoksamina (DFO; 100 µM) ili batofenantrolin disulfonata (BPS; 10 µM). Nakon 24 h ispitivana je citotoksičnost kombinovanog tretmana LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

Da bismo utvrdili da li proces nekroptoze učestvuje u indukciji ćelijske smrti U251 ćelija, ispitivali smo aktivaciju proteina koji učestvuju u procesu nekroptoze imunoblot metodom. Pokazali smo da kombinovani tretman 2DG+NDI nije povećao fosforilaciju medijatora nekroptoze RIP1 (*engl.* receptor-interacting protein) i MLKL kinaze (*engl.* mixed lineage kinase domain-like protein) (Slika 54) u U251 ćelijama. Osim toga, inhibicija nekroptoze utišavanjem gena za ove proteine RNK interferencijom pomoću RIP i MLKL siRNA nije redukovala citotoksični efekat 2DG+NDI tretmana (Slika 55).

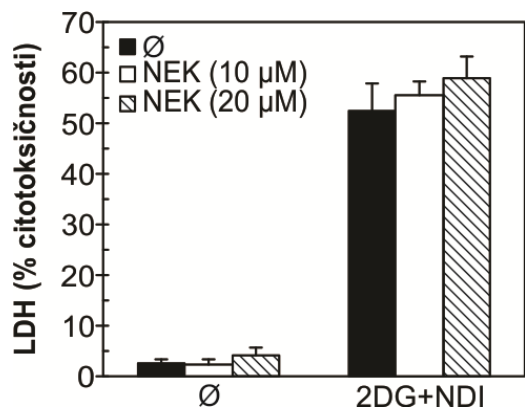


Slika 54. Imunoblot analiza proteina karakterističnih za nekroptozu. U251 ćelije su inkubirane 2 h sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. (A) Nivoi fosfo i total forme RIP1 i MLKL kinaza su praćeni imunoblot metodom i (B) kvantifikovani denzitometrijom. Ekspresija aktina je korišćena za normalizaciju koncentracija proteina u različitim uzorcima. (A) Prikazani su reprezentativni blotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta, kao i (B) rezultati njihove denzitometrijske analize prikazani kao SV \pm SD.



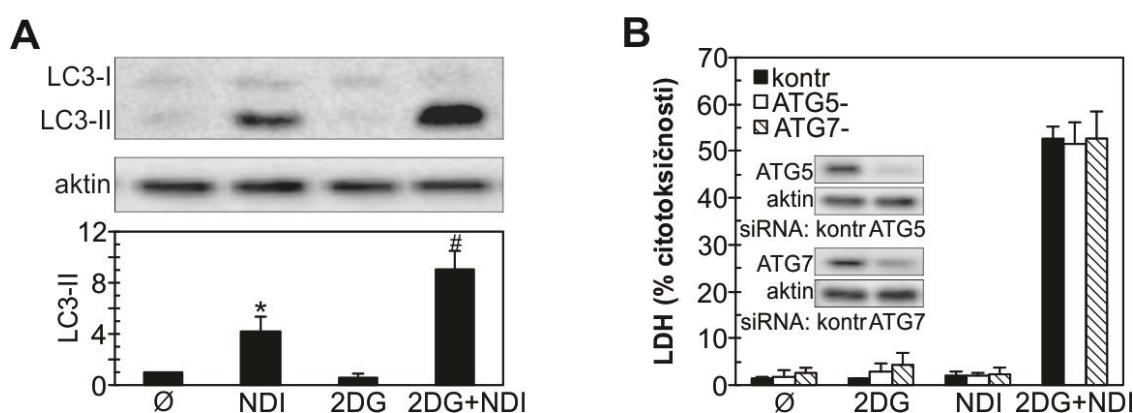
Slika 55. Nekroptozu nije uključena u ćelijsku smrt indukovanu kombinovanim tretmanom 2DG+NDI. U251 ćelije su transfekovane pomoću kontrolne ili siRNA za RIP1 i MLKL kinazu i 24 h nakon transfekcije tretirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI. Nakon 24 h ispitivana je citotoksičnost 2DG+NDI tretmana LDH testom. Uspešnost transfekcije je potvrđena imunoblotom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

U skladu sa prethodnim rezultatima, ni farmakološki inhibitor nekroptoze nekrostatin nije smanjio citotoksičnost 2DG+NDI tretmana (Slika 56). Dakle, kombinovani tretman ne indukuje nekroptozu.



Slika 56. Nekroptozu nije uključena u ćelijsku smrt indukovanu kombinovanim tretmanom 2DG+NDI. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija inhibitora nekroptoze nekrostatina (NEK). Nakon 24 h ispitivana je citotoksičnost kombinovanog tretmana LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

Autofagija ili programirana ćelijska smrt tipa II, može predstavljati mehanizam umiranja ćelija. Međutim, u nepovoljnim stanjima kao što su energetske stres, oksidativni stres ili oštećenja mitohondrija, autofagija može imati protektivni efekat i omogućiti preživljavanje ćelija [204]. Da bi se ispitala sposobnost 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, da indukuju autofagiju, ispitivana je konverzija LC3-I forme u LC3-II formu proteina primenom imunoblot metode kao i uloga ključnih autofagnih gena u smrti U251 ćelija primenom RNK interferencije. LC3-II protein (*engl.* microtubule-associated protein light chain 3B-II) je jedan od glavnih markera autofagije i predstavlja lipidnu formu LC3-I proteina koja je vezana za autofagozom [205]. Imunoblot analiza je pokazala da su nivoi LC3-II proteina povećani nakon 2 h tretmana sa NDI, a još više nakon tretmana 2DG+NDI (Slika 57A). Međutim, utišavanje ključnih gena za autofagiju *ATG5* i *ATG7* (*engl.* autophagy related genes) procesom RNK interferencije nije imalo efekta na smrt U251 ćelija indukovanu kombinovanim tretmanom (Slika 57B). Naši rezultati su pokazali da proces autofagije nije uključen u ćelijsku smrt indukovanu kombinovanim tretmanom 2DG+NDI.

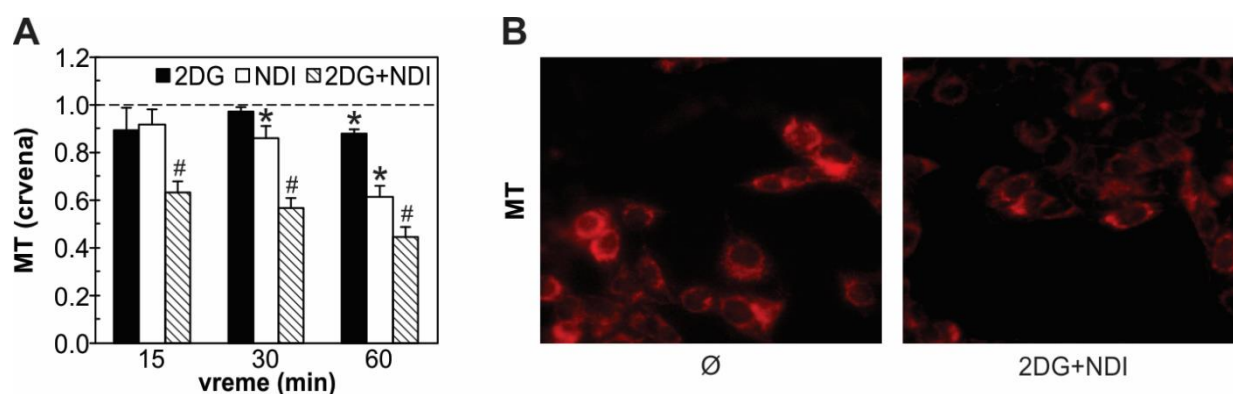


Slika 57. Autofagija nije uključena u ćelijsku smrt indukovanu kombinovanim tretmanom 2DG+NDI. (A) U251 ćelije su inkubirane 2 h sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Konverzija LC3 proteina je praćena i analizirana imunoblot metodom. (B) U251 ćelije su transfekovane pomoću kontrolne ili malih interferirajućih RNK (siRNA) za *ATG5* i *ATG7* i 24 h po završetku transfekcije tretirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Nakon 24 h inkubacije kombinovanog tretmana ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Uspešnost transfekcije je potvrđena imunoblotom. (A) Prikazani su reprezentativni blotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta, kao i (A, donji grafik) rezultati njihove denzitometrijske analize prikazani kao $SV \pm SD$ (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman sa 2DG ili NDI). (B) Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

Prikazani rezultati jasno ukazuju da apoptoza, ferroptaza, nekroptaza ili autofagija, za razliku od nekroze, nisu uključene u smrt U251 ćelija indukovanu 2DG+NDI kombinovanim tretmanom.

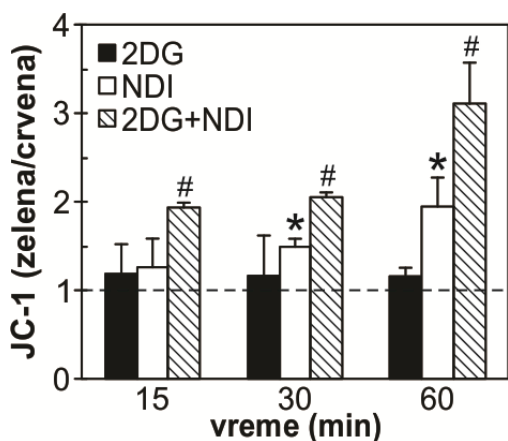
4.2.11. 2DG i NDI sinergistički indukuju depolarizaciju mitohondrija u U251 i B16 ćelijama

U daljim eksperimentima ispitivali smo koji su unutarćelijski mehanizmi odgovorni za indukciju nekroze kombinovanim tretmanom. Imajući u vidu da je nekroza često uzrokovana/praćena depolarizacijom membrane mitohondrija i oksidativnim stresom [177], hteli smo da ispitamo kako 2DG, NDI i njihov zajednički tretman utiču na ove procese u U251 ćelijama humanog glioma i B16 ćelijama mišjeg melanoma. Da bismo utvrdili da li dolazi do promene potencijala membrana mitohondrija U251 ćelije su nakon tretmana bojene MitoTracker Red CMXRos ili JC-1 bojom, a potom analizirane na protočnom citofluorimetru i fluorescentnom mikroskopu. MitoTracker Red CMXRos je lipofilni katjon koji zahvaljujući svom pozitivnom naelektrisanju i negativnom potencijalu membrane mitohondrija ulazi u mitohondrije živih ćelija, akumulira se unutar mitohondrija i fluorescira crveno. Analize na protočnom citofluorimetru su pokazale da NDI, i u manjoj meri 2DG, indukuju umereno vremenski zavisno smanjenje crvene fluorescence MitoTracker Red, odnosno depolarizaciju mitohondrija U251 ćelija (Slika 58A). Izlaganje U251 ćelija kombinovanim tretmanu 2DG+NDI dovelo je do sinergističkog povećanja depolarizacije mitohondrija koje se jasno videlo nakon samo 15 min od početka tretmana, a postajalo sve izraženije tokom vremena (Slika 58A). Gubitak potencijala membrana mitohondrija u ćelijama tretiranim sa 2DG i NDI je potvrđen i analizom na fluorescentnom mikroskopu 1 h nakon tretmana (Slika 58B).



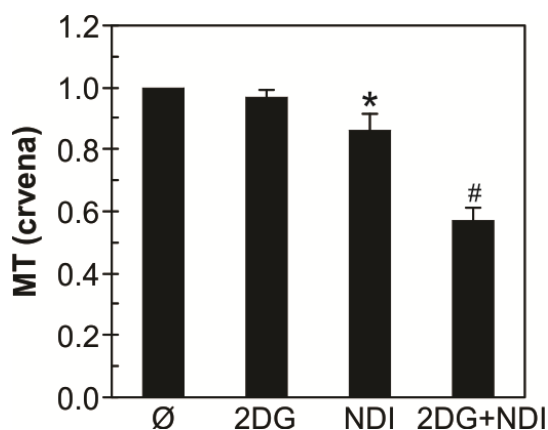
Slika 58. Kombinovani tretman 2DG+NDI sinergistički indukuje vremenski zavisnu depolarizaciju mitohondrija. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji u trajanju od (A) 15, 30 i 60 min ili (B) 60 min. Nakon bojenja MitoTracker Red CMXRos fluorescentnom bojom intenzitet crvene fluorescence je meren na (A) protočnom citofluorimetru i (B) fluorescentnom mikroskopu. (A) Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu, koja je prikazana isprekidanom linijom; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

Takođe, vremenski zavisna depolarizacija mitohondrija u U251 ćelijama je potvrđena analizom na protočnom citofluorimetru bojenjem ćelija fluorescentnom bojom JC-1. Pokazano je da NDI, a naročito 2DG+NDI povećavaju odnos zelene i crvene fluorescence JC-1 boje, odnosno da indukuju depolarizaciju membrane mitohondrija (Slika 59).



Slika 59. Kombinovani tretman 2DG+NDI indukuje vremenski zavisnu depolarizaciju mitohondrija. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 15, 30 i 60 min. Po isteku tretmana ćelije su bojene JC-1 bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, prikazanu isprekidanom linijom; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

Da bismo ispitali da li je depolarizacija mitohondrija uključena i u nekrotičnu smrt B16 ćelija izazvanu tretmanom 2DG+NDI, pratili smo membranski potencijal mitohondrija na protočnom citofluorimetru pomoću MitoTracker Red CMXRos fluorescentne boje. U skladu sa rezultatima dobijenim na U251 ćelijama, analiza na protočnom citofluorimetru je pokazala da sam NDI indukuje blagu depolarizaciju mitohondrija u B16 ćelijama, dok u kombinaciji sa 2DG, dovodi do snažne depolarizacije mitohondrija, koja se reflektuje kao smanjenje crvene fluorescence MitoTracker Red CMXRos boje 1 h nakon početka tretmana (Slika 60).

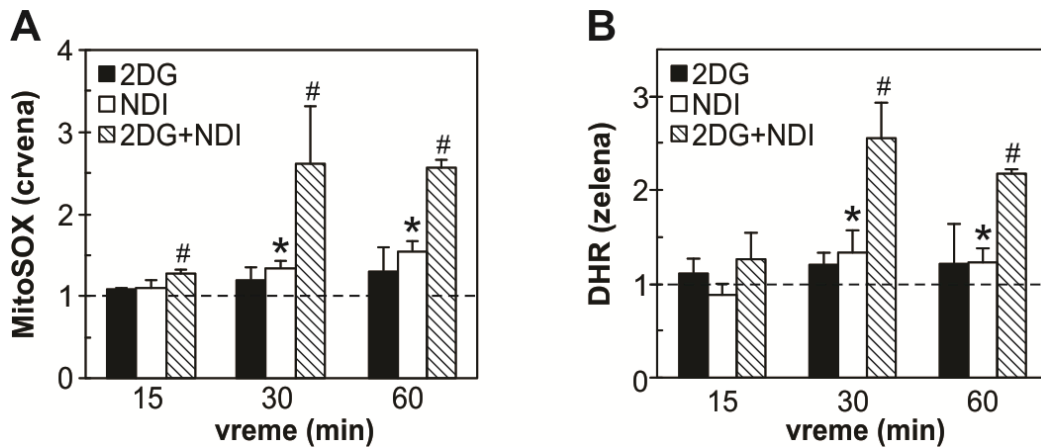


Slika 60. Kombinovani tretman 2DG+NDI sinergistički indukuje depolarizaciju mitohondrija u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Nakon 1 h ćelije su bojene MitoTracker Red CMXRos bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

4.2.12. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji oksidativnog stresa u U251 i B16 ćelijama

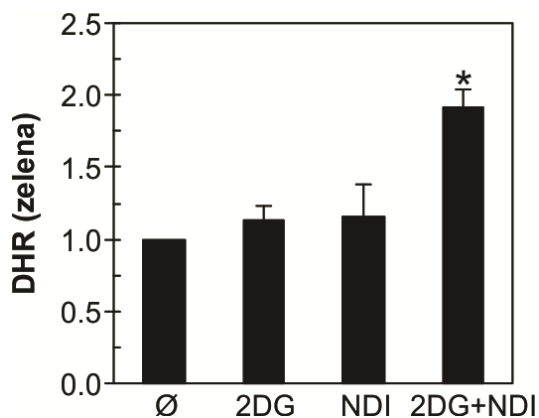
Imajući u vidu da oksidativni stres može biti uzrok ili posledica depolarizacije mitohondrija [206], ispitali smo da li kombinovani tretman 2DG+NDI stimuliše produkciju RKV u U251 i B16 ćelijama analizama na protočnom citofluorimetru primenom specifičnih fluorescentnih boja MitoSOX Red i dihidrorodamina 123 (DHR). DHR je lipofilna boja koja u svom osnovnom obliku ne fluorescira, a kada se u ćeliji pod uticajem RKV oksiduje prelazi u katjonski derivat rodamin 123, koji fluorescira zeleno i akumulira se u mitohondrijama. Analizom U251 ćelija obojenih MitoSOX Red bojom, koja se oksiduje pod uticajem mitohondrijskog superoksida i emituje crvenu fluorescencu, pokazano je da je detektovana depolarizacija mitohondrija praćena povećanjem

koncentracije intracelularnog superoksida oslobođenog iz mitohondrija nakon 30 i 60 min od početka 2DG+NDI tretmana (Slika 61A). U skladu sa povećanim oslobađanjem superoksida iz mitohondrija u ćelijama tretiranim kombinovanim tretmanom nakon 30 i 60 minuta povećana je i ukupna produkcija RKV, što je detektovano kao povećanje zelene fluorescence DHR (Slika 61B).



Slika 61. Kombinovani tretman 2DG+NDI sinergistički indukuje oksidativni stres u U251 ćelijama. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 15, 30 i 60 min. Po isteku tretmana ćelije su obojene (A) MitoSOX Red i (B) DHR fluorescentnim bojama i analizirane na protočnom citofluorimetru praćenjem promena crvene (MitoSOX Red) i zelene (DHR) fluorescence. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

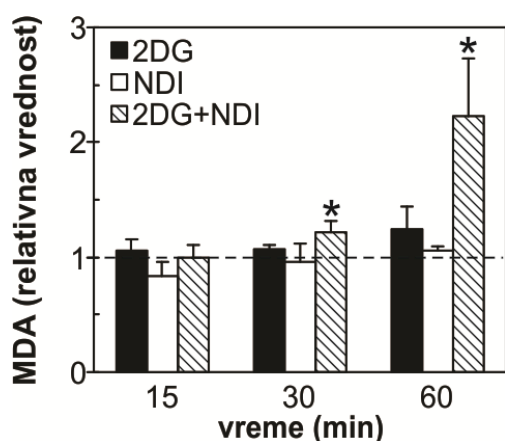
U skladu sa dobijenim rezultatima na U251 ćelijama i analiza B16 ćelija na protočnom citofluorimetru primenom DHR boje je pokazala da u ćelijama tretiranim kombinovanim tretmanom 2DG+NDI dolazi do značajne produkcije RKV u odnosu na netretirane ćelije, kao i ćelije tretirane samo sa 2DG ili samo sa NDI nakon 1 h (Slika 62).



Slika 62. Kombinovani tretman 2DG+NDI sinergistički indukuje oksidativni stres u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Nakon 1 h ćelije su bojene DHR bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

4.2.13. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji lipidne peroksidacije u U251 ćelijama

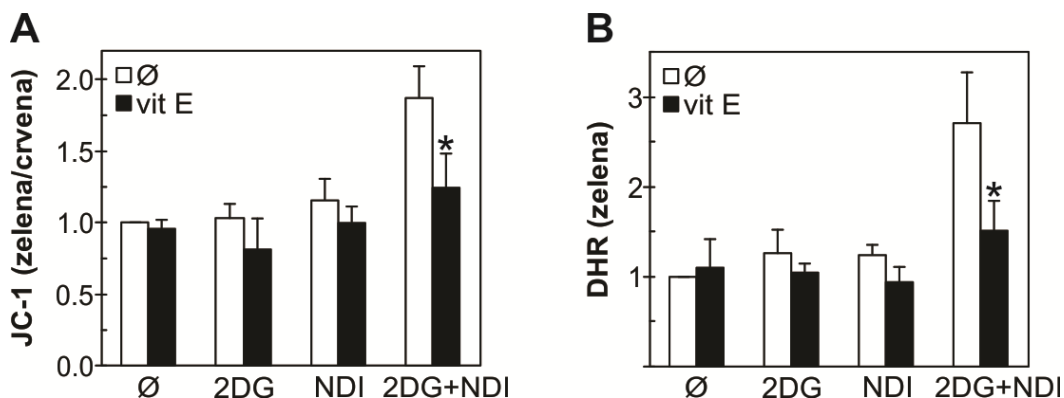
Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da indukciji nekroze u tumorskim ćelijama tretiranim sa 2DG+NDI prethodi depolarizacija mitohondrija i produkcija RKV. Potom, RKV dovode do lipidne peroksidacije ćelijske membrane, što uzrokuje njeno oštećenje, povećanje propustljivosti i konačno nekrozu ćelija [207]. Poznato je da degradacijom oksidovanih lipida nastaje malondialdehid (MDA), koji u reakciji sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) daje obojeni produkt, čija je absorbanca proporcionalna stepenu lipidne peroksidacije ćelijske membrane. Na ovom principu se zasniva MDA test za merenje lipidne peroksidacije. Da bi ispitali kako tretman 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, utiče na strukturu ćelijskih membrana praćen je nivo MDA u U251 ćelijama. U skladu sa prethodnim rezultatima, pre svega pojačanom produkcijom RKV izazvanom kombinovanim tretmanom, lipidna proksidacija bila je značajno povećana nakon 30 i 60 minuta od početka kombinovanog tretmana (Slika 63).



Slika 63. Kombinovani tretman 2DG+NDI sinergistički indukuje lipidnu peroksidaciju u U251 ćelijama. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 15, 30 i 60 min. Po isteku tretmana mereni su nivoi MDA na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča na talasnoj dužini od 535 nm. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD vrednosti triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, koja je prikazana isprekidanom linijom).

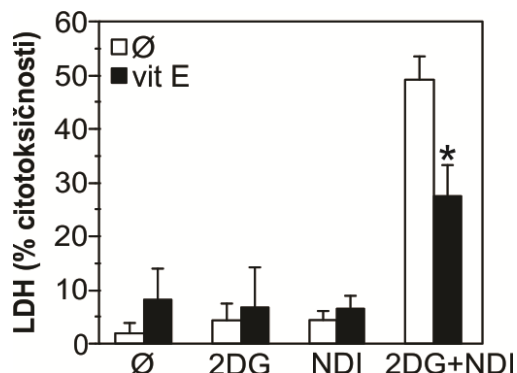
4.2.14. Vitamin E smanjuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres indukovani 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama

Da bismo potvrdili da depolarizacija mitohondrija i oksidativni stres prethode nekrozi indukovanoj tretmanom 2DG+NDI, U251 ćelije su prethodno tretirane antioksidansom vitaminom E (α -tokoferol) [208]. Kako smo već naveli, α -tokoferol štiti membrane ćelija od oksidacije lipida, neutrališući slobodne radikale nastale u procesu lipidne peroksidacije. Vitamin E je značajno smanjio depolarizaciju mitohondrija (Slika 64A) i produkciju RKV (Slika 64B) u U251 ćelijama, što je pokazano analizama na protočnom citofluorimetru primenom JC-1 i DHR boja.



Slika 64. Vitamin E smanjuje depolarizaciju mitohondrija i produkciju RNV indukovanu 2DG+NDI tretmanom u U251. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu 10 μ M vitamina E. Nakon 1 h ćelije su obojene sa (A) JC-1 ili (B) DHR bojom i depolarizacija mitohondrija i produkcija RNV su analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na 2DG+NDI tretman).

Takođe, da bi se utvrdilo da li oksidativni stres doprinosi citotoksičnosti 2DG+NDI tretmana, U251 ćelije su tretirane sa vitaminom E. LDH test je pokazao da vitamin E značajno smanjuje citotoksičnost 2DG+NDI kombinovanog tretmana (Slika 65).

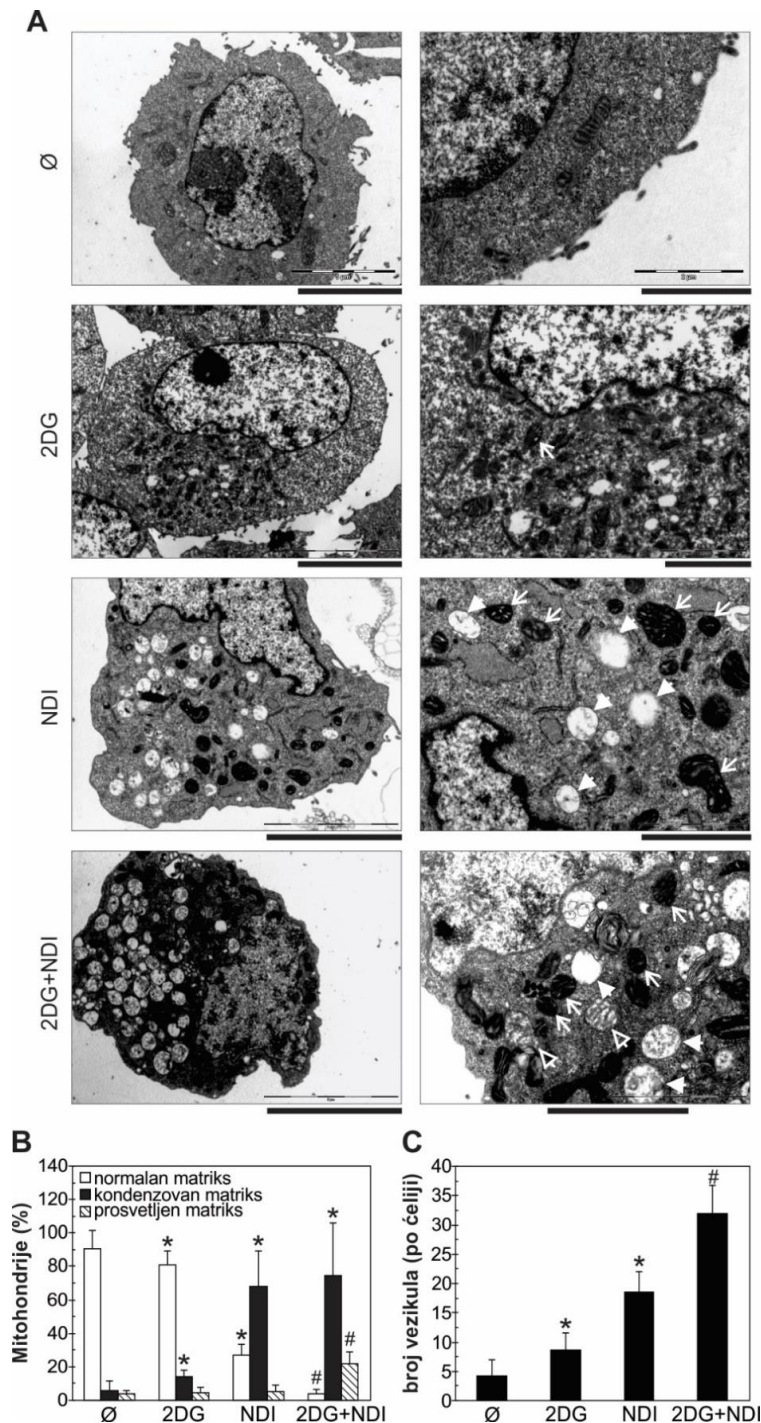


Slika 65. Vitamin E redukuje citotoksičnost 2DG+NDI tretmana U251 ćelija. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu 10 μ M vitamina E. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na 2DG+NDI tretman).

4.2.15. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji oštećenja mitohondrija u U251 ćelijama

Da bismo ispitali na koji način tretman 2DG, NDI i njihova kombinacija utiču na strukturu ćelijskih komponenti, U251 ćelije smo analizirali elektronskom mikroskopijom. U poređenju sa kontrolnim ćelijama, pokazano je da kod ćelija tretiranih sa 2DG, NDI ili oba agensa istovremeno, dolazi do pojave mitohondrija sa tamnim, kondenzovanim matriksom i dilatiranim kristama (Slika 66A, B), što su znaci reverzibilnog oštećenja mitohondrija [209]. Osim toga kombinovani tretman značajno je povećao broj nabubrelih mitohondrija sa prosvetljenim matriksom i diskontinuiranim kristama ili njihovim ostacima, što ukazuje na njihovo nepovratno oštećenje [180] (Slika 66A, B). U skladu sa povećanim nagomilavanjem markera autofagije LC3-II (Slika 57A), primećeno je da NDI sam, a naročito u kombinaciji sa 2DG, dovodi do pojave brojnih vezikula ispunjenih

citoplazmatskim komponentama kao što su mitohondrije (Slika 66A, C), koje podsećaju na autofagne vezikule [31]. Takođe, u U251 ćelijama tretiranim 2DG+NDI, uočene su i prosvetljene vezikule, koje izgledaju prazno i nalik su dilatiranim lizozomima (Slika 66A).

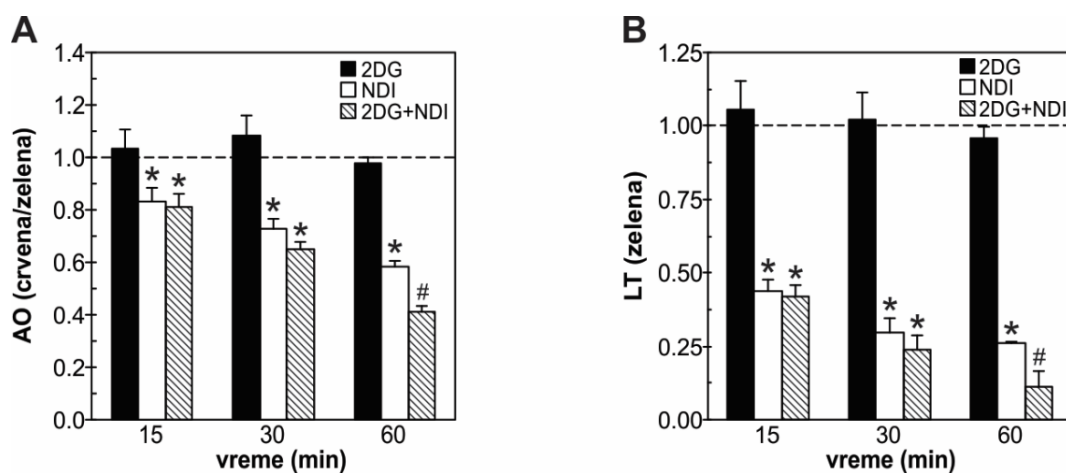


Slika 66. Kombinovani 2DG+NDI tretman indukuje oštećenja mitohondrija. (A, B, C) U251 ćelije su inkubirane 4 h sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji nakon čega je morfologija ćelija analizirana TEM. (A) Tanke bele strelice ukazuju na tamne mitohondrije sa dilatiranim kristama, neispunjene bele strelice ukazuju na nabubrele mitohondrije sa prosvetljenim matriksom i diskontinuiranim kristama, dok ispunjene bele strelice ukazuju na krupne vezikule sa ili bez citoplazmatskog sadržaja. (B) Prikazana je kvantifikacija oštećenih mitohondrija sa tamnim i prosvetljenim matriksom i (C) intracelularnih vezikula sa ili bez ćelijskog sadržaja (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i tretmane samo sa 2DG ili NDI; $n \geq 60$ ćelija po tretmanu).

Dakle, naši rezultati ukazuju da kombinovani tretman izaziva nekrozu koja zavisi od indukcije oksidativnog stresa i oštećenja mitohondrija, udruženu sa pojavom velikog broja autofagnih/lizozomnih vakuola.

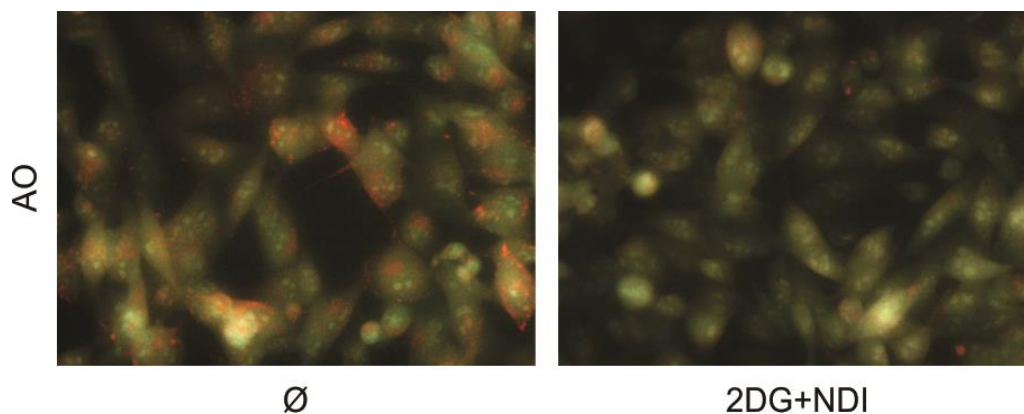
4.2.16. 2DG i NDI sinergizuju u indukciji LMP u U251 i B16 ćelijama

Imajući u vidu da je NDI lizozomalni deterdžent, ispitivali smo da li permeabilizacija membrane lizozoma (LMP) učestvuje u citotoksičnosti kombinovanog tretmana 2DG+NDI. LMP i oslobađanje kiselog sadržaja lizozoma u citoplazmu su ispitivani korišćenjem lizozomotropnih fluorohroma akridin-oranž (AO) i LysoTracker Green (LT) boje. Odnos crvene i zelene fluorescence akridin-oranž boje, kao i intenzitet zelene fluorescence LysoTracker Green boje, proporcionalni su količini kiselog sadržaja lizozoma. Analize na protočnom citofluorimetru U251 ćelija tretiranih sa NDI su pokazale vremenski-zavisno smanjenje odnosa crvene i zelene fluorescence AO (Slika 67A) i zelene fluorescence LT boje (Slika 67B), ukazujući na smanjenje kislosti lizozoma. Taj efekat je uočen nakon samo 15 min od dodavanja tretmana NDI, i postepeno se povećavao u narednih 45 min. Sa druge strane, iako sam tretman 2DG nije doveo do LMP i oslobađanja kiselog sadržaja lizozoma, 2DG je pojačao efekat indukovano NDI, a ovo povećanje postalo je statistički značajno 1 h nakon tretmana (Slika 67).



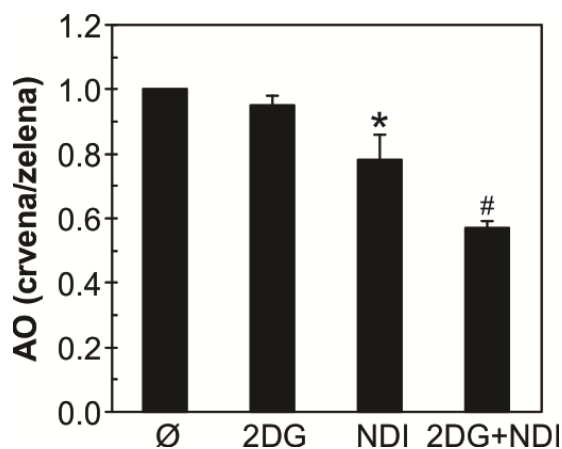
Slika 67. Sinergistička citotoksičnost 2DG+NDI zavisi od indukcije LMP u U251 ćelijama. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 15, 30 i 60 min. Po isteku tretmana ćelije su obojene (A) akridin-oranž i (B) LysoTracker Green fluorescentnim bojama specifičnim za lizosome i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu prikazanu isprekidanom linijom; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

Takođe, korišćenjem fluorescentnog mikroskopa uočeno je da u U251 ćelijama obojenim akridin-oranž fluorescentnom bojom nakon 1 h tretmana 2DG+NDI dolazi do skoro potpunog nestanka lizozoma koji fluoresciraju crveno/narandžasto (Slika 68), što je u skladu sa indukcijom LMP i gubitkom kiselog sadržaja lizozoma.



Slika 68. Sinergistička citotoksičnost 2DG+NDI zavisi od indukcije LMP u U251 ćelijama. U251 ćelije su inkubirane u prisustvu i odsustvu kombinovanog tretmana 10 mM 2DG i 40 μ M NDI. Nakon 1 h ćelije su obojene akridin-oranž fluorescentnom bojom, i posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom.

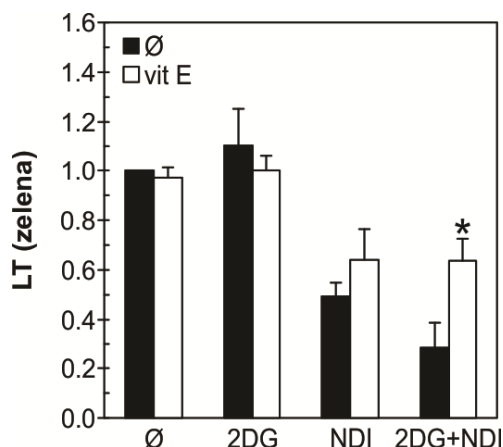
Kako bismo ispitali da li je indukcija LMP karakteristična i za B16 ćelije tretirane 2DG i NDI, analizirali smo ćelije obojene AO na protočnom citofluorimetru. Takođe, kao i kod U251 ćelija (Slika 67A), i kod B16 ćelija tretiranih NDI je pokazano da dolazi do smanjenja odnosa crvene i zelene fluorescence AO boje nakon 1 h (Slika 69). Taj efekat je bio dodatno pojačan u prisustvu 2DG, dok sam tretman sa 2DG nije doveo do smanjenja kiselog sadržaja lizozoma (Slika 69).



Slika 69. Citotoksičnost 2DG+NDI zavisi od indukcije LMP u B16 ćelijama. B16 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. Nakon 1 h ćelije su bojene AO i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

4.2.17. Vitamin E smanjuje LMP indukovano 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama

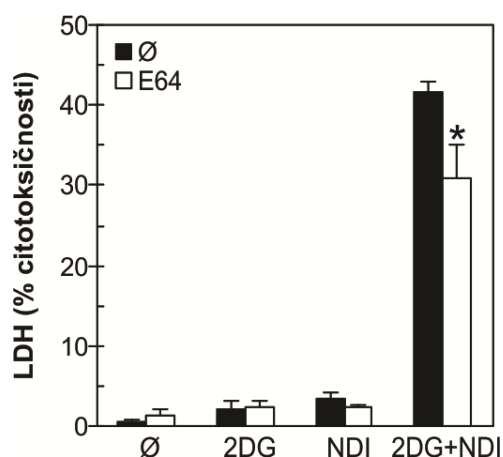
Da bismo ispitali da li oksidativni stres indukovano 2DG+NDI učestvuje u stimulaciji LMP, U251 ćelije su tretirane u prisustvu i odsustvu antioksidansa vitamina E, pa su nakon 1 h obojene sa LysoTracker Green i analizirane na protočnom citofluorimetru. Pokazano je da je indukcija LMP stimulirana 2DG+NDI tretmanom delimično smanjena u prisustvu vitamina E (Slika 70), ukazujući na značajnu ulogu RKV u indukciji LMP.



Slika 70. Vitamin E smanjuje LMP indukovan 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu 10 μ M vitamina E. Nakon 1 h ćelije su obojene LysoTracker Green bojom i zelena fluorescencija obojenih ćelija je analizirana na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednosti tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajući tretman bez vitamina E).

4.2.18. Katepsini učestvuju u indukciji nekroze 2DG+NDI tretmanom u U251 ćelijama

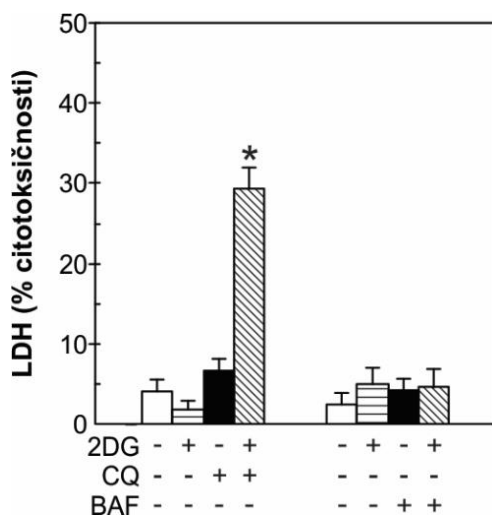
Kao posledica LMP dolazi do oslobađanja katepsina iz lizozoma u citoplazmu, enzima koji razgradnjom citoplazmatskih proteina indukuju nekrozu [148]. Da bismo utvrdili da li je aktivnost katepsina odgovorna za indukciju nekroze kombinovanim tretmanom, ispitivali smo kako inhibitor katepsina E64d utiče na citotoksično delovanje 2DG+NDI. LDH test je pokazao da E64d smanjuje citotoksičnost kombinovanog tretmana (Slika 71), što je ukazalo na ključnu ulogu katepsina u indukciji nekroze.



Slika 71. E64d smanjuje citotoksičnost indukovanu 2DG+NDI tretmanom u U251. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji, u prisustvu i odsustvu 50 μ M inhibitora cistein katepsina E64d. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajući tretman bez E64d).

4.2.19. Citotoksični efekat 2DG+NDI zavisi od indukcije LMP

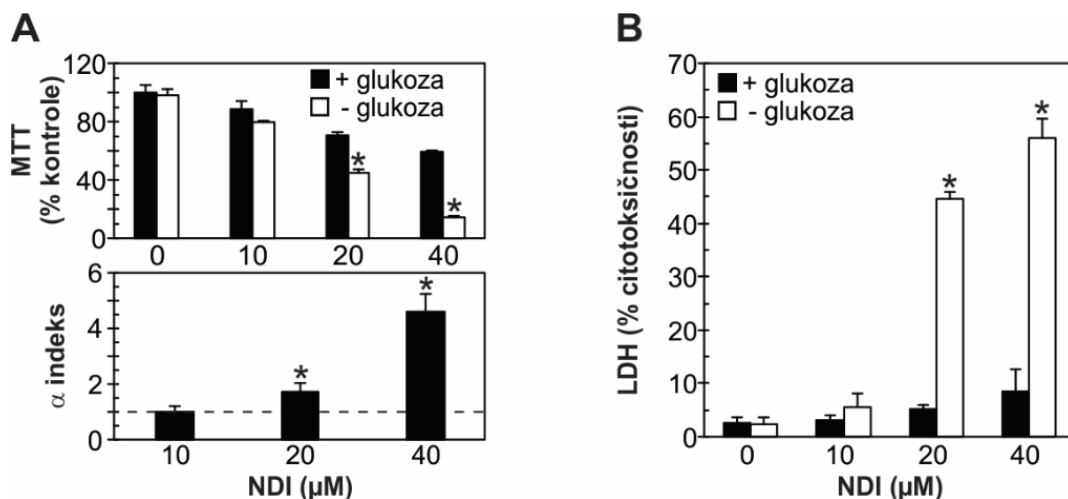
Da bismo potvrdili da je indukcija LMP odgovorna za citotoksično delovanje NDI u kombinaciji sa 2DG, ispitivali smo da li i drugi agensi koju interaguju sa lizozomima sinergizuju u antitumorskom delovanju sa 2DG. Bafilomicin A1, inhibitor V-ATPaze i zakišeljavanja lizozoma, u koncentraciji od 100 nM koja povećava pH lizozoma, a ne dovodi do LMP [210-213], nije stimulisao citotoksičnost 2DG (Slika 72). Sa druge strane, induktor LMP hlorokin [148, 210, 211, 214, 215], je poput NDI snažno pojačao citotoksičnost 2DG. Ovakvi rezultati ukazuju, da je indukcija LMP odgovorna za sinergističko antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana.



Slika 72. Sinergistička citotoksičnost 2DG+NDI zavisi od indukcije LMP. U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG u prisustvu ili odsustvu induktora LMP hlorokina (CQ; 20 μ M) ili inhibitora zakišeljavanja lizozoma bafilomicina A1 (BAF; 100 nM). Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* p <0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i pojedinačne tretmane 2DG i CQ).

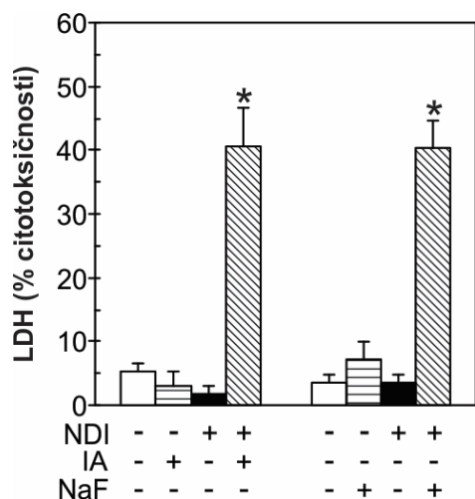
4.2.20. Sinergistička citotoksičnost 2DG i NDI zavisi od inhibicije glikolize

Dva osnovna procesa sinteze ATP u ćelijama su glikoliza i oksidativna fosforilacija [51]. Imajući u vidu da je 2DG inhibitor glikolize, a da NDI samostalno i u kombinaciji sa 2DG indukuje snažno oštećenje mitohondrija (Slika 66A, B), hteli smo da ispitamo da li deplecija energije koja nastaje kao posledica inhibicije glikolize i oštećenja mitohondrija doprinosi sinergističkom antitumorskom delovanju 2DG i NDI. Da bi se potvrdilo da je inhibicija glikolize odgovorna za citotoksičnost 2DG u kombinaciji sa NDI, U251 ćelije su tretirane različitim dozama NDI u prisustvu i odsustvu glukoze. Deplecija glukoze u medijumu za kultivaciju ćelija je sinergizovala sa različitim koncentracijama NDI kako je pokazano MTT testom, a potvrđeno α indeksom izračunatim iz rezultata MTT testa koji je bio veći od 1 (Slika 73A). Takođe, ispitivanje citotoksičnosti LDH testom 24 h nakon dodavanja NDI u različitim koncentracijama ćelijama kojima je standardni medijum za kultivaciju sa glukozom zamenjen identičnim medijumom bez glukoze potvrdilo je snažan sinergistički citotoksični efekat NDI i deplecije glukoze (Slika 73B).



Slika 73. NDI i deplecija glukoze sinergizuju u ubijanju U251 ćelija. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa 10-40 μM NDI u medijumu sa ili bez glukoze. Nakon 24 h inkubacije ispitivana je vijabilnost ćelija MTT testom (A, gornji grafik), i citotoksičnost LDH testom (B). Vrednosti dobijene iz tri različita MTT testa korišćene su za izračunavanje α indeksa (A, donji grafik). Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (A gornji grafik, B) (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na NDI tretman + medijum sa glukozom) ili kao SV ± SD iz tri nezavisna eksperimenta (A donji grafik) (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku za vrednosti α indeksa > 1).

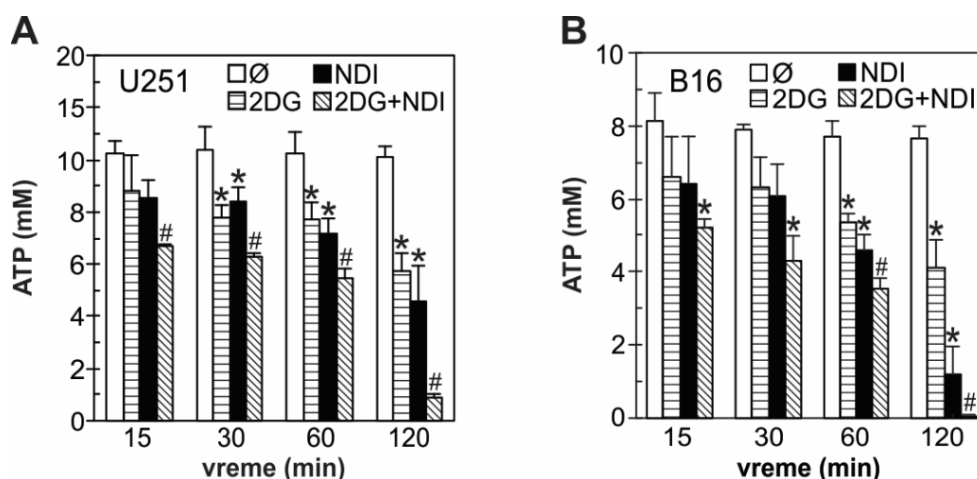
Uloga inhibicije glikolize u citotoksičnom delovanju 2DG+NDI je ispitivana i primenom drugih dobro poznatih blokatora glikolize. U skladu sa prethodnim rezultatom, pokazano je da inhibitori glikolize jodoacetat (IA) i natrijumfluorid (NaF) [216, 217] poput 2DG stimulišu citotoksično delovanje NDI (Slika 74), potvrđujući ključnu ulogu inhibicije glikolize u antitumorskom delovanju 2DG+NDI.



Slika 74. Sinergistička citotoksičnost 2DG+NDI zavisi od inhibicije glikolize. U251 ćelije su inkubirane sa 40 μM NDI u prisustvu ili odsustvu inhibitora glikolize jodoacetata (IA; 1.5 mM) ili natrijumfluorida (NaF; 3 mM). Nakon 24 h inkubacije ispitivana je citotoksičnost LDH testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na sve druge tretmane).

4.2.21. 2DG i NDI sinergizuju u depleciji ATP

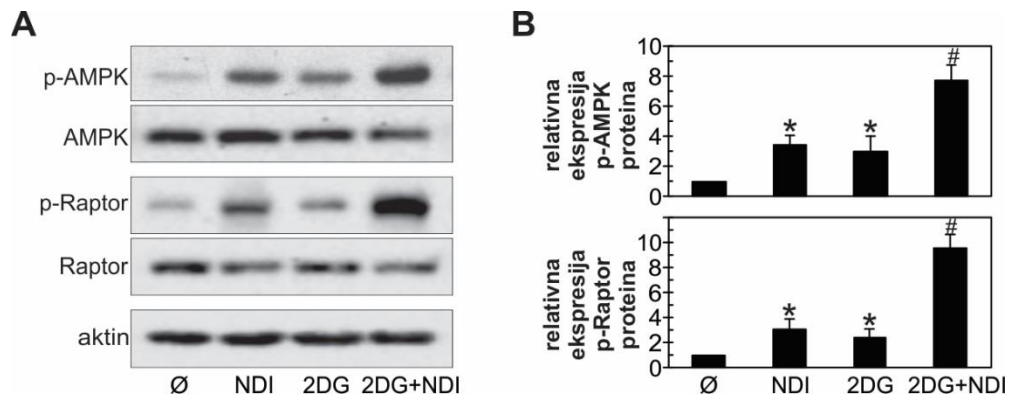
U narednom eksperimentu smo hteli da ispitamo kako tretman sa 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji utiče na sintezu ATP u ćelijama glioma i melanoma. Korišćenjem specifičnog testa za detekciju unutarćelijskog ATP ispitivani su nivoi ATP u U251 i B16 ćelijama tretiranim sa 2DG i NDI, samostalno i u kombinaciji, u različitim vremenskim intervalima. Očekivano, 2DG je značajno smanjila koncentraciju ATP već nakon 30 min u U251 i nakon 60 min u B16 ćelijama (Slika 75). Interesantno je da je i NDI u istim vremenskim terminima takođe smanjio nivo ATP, pri čemu je to smanjenje u poslednjem ispitivanom vremenskom terminu (120 min) čak bilo veće nego smanjenje izazvano 2DG (Slika 75). Ovaj rezultat je potvrdio našu pretpostavku da NDI koji oštećuje mitohondrije inhibira i oksidativnu fosforilaciju. Konačno, kombinovani tretman 2DG+NDI je sinergizovao u depleciji ATP, pri čemu je značajno smanjenje bilo uočljivo već nakon 15 min i postepeno se povećavalo do kraja tretmana i u U251 i u B16 ćelijama (Slika 75).



Slika 75. 2DG i NDI sinergistički smanjuju sintezu ATP u U251 i B16 ćelijama. (A) U251 i (B) B16 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji u trajanju od 15, 30, 60 i 120 min. Po isteku tretmana mereni su intracelularni nivoi ATP korišćenjem bioluminiscentnog testa. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD vrednosti triplikata iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

4.2.22. 2DG i NDI sinergizuju u aktivaciji AMPK

Da bismo potvrdili sposobnost 2DG, NDI i njihove kombinacije da izazivaju depleciju energije u tumorskim ćelijama, imunoblot metodom je ispitivana aktivnost glavnog energetskog senzora u ćeliji molekula AMPK, koji se aktivira sa povećanjem odnosa AMP/ATP u ćeliji [194], i njegovog supstrata Raptor. U skladu sa energetskom deplecijom, 2 h nakon tretmana i 2DG i NDI, a naročito njihova kombinacija stimulisali su aktivnost AMPK i Raptor (Slika 76). Dakle, dobijeni rezultati ukazuju da oštećenje mitohondrija izazvano NDI i inhibicija glikolize indukovana 2DG sinergistički ubijaju U251 ćelije procesom energetske deplecije.



Slika 76. 2DG, NDI i njihova kombinacija aktiviraju AMPK i Raptor. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa 10 mM 2DG i 40 μ M NDI, samostalno i u kombinaciji. (A) Nakon 2 h nivoi fosfo i total formi AMPK i Raptor proteina su analizirani imunoblot tehnikom i (B) kvantifikovani pomoću denzitometrije. (A) Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta, kao i (B) SV \pm SD njihove denzitometrijske analize (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu; # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman samo sa 2DG ili NDI).

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da dva kombinovana tretmana kojima je zajednička komponenta inhibitor glikolize 2DG ispoljavaju snažno antitumorsko delovanje. U prvom delu studije 2DG je kombinovana sa inhibitorom oksidativne fosforilacije rotenonom, a u drugom delu sa lizozomalnim deterdžentom NDI. Iako su rotenon i NDI dva potpuno različita jedinjenja, njihovo antitumorsko delovanje u kombinaciji sa 2DG imalo je slične unutarćelijske mehanizme. Oba tretmana bila su toksična prema humanim gliomskim U251 i mišjim melanomskim B16 ćelijama, a netoksična prema primarnim ćelijama. Antitumorsko delovanje i 2DG+ROT i 2DG+NDI bilo je posredovano nekrozom i potpuno nezavisno od apoptoze, nekroptoze, ferroptoze i autofagije. Takođe, snažna energetska deplecija, aktivacija AMPK i produkcija mitohondrijskog superoksida bile su zajedničke za obe vrste tretmana. U daljem tekstu biće prvo detaljnije diskutovani unutarćelijski mehanizmi antitumorskog delovanja 2DG u kombinaciji sa rotenonom, a zatim u kombinaciji sa NDI.

Usled velike metaboličke plastičnosti tumorskih ćelija pokušaji da se inhibira samo jedan metabolički put sinteze energije nisu dali dobre rezultate [218]. Zbog toga je u više studija ispitivano antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana koji se zasniva na istovremenoj inhibiciji dva osnovna energetska puta: glikolize i oksidativne fosforilacije [156, 157]. Takođe, pokazano je i da 2DG pojačava citotoksična svojstva rotenona na ćelijama osteosarkoma [158], tumorskim ćelijama epitela jajnika [159] i tumorskim ćelijama debelog creva [157]. S druge strane, 2DG je inhibirala smrt dopaminergičkih neurona indukovanu rotenonom u kulturi supresijom oksidativnog stresa i depolarizacije mitohondrija [219]. U skladu sa tim, naši rezultati su pokazali snažno toksično delovanje kombinovanog tretmana na ćelije melanoma i glioma, dok su primarne mezenhimalne ćelije bile gotovo neosetljive. Veća senzitivnost tumorskih nego primarnih ćelija na tretman 2DG+ROT može se objasniti njihovim bržim metabolizmom i većim energetskim potrebama u odnosu na netransformisane ćelije [220].

Tretmani samo sa 2DG ili rotenonom su smanjili koncentraciju ATP u ćelijama, pri čemu je očekivano i u skladu s prethodnim rezultatima [221-225], deplecija energije bila najjača nakon izlaganja kombinovanom tretmanu. Zanimljivo je da je 2DG smanjila koncentraciju ATP u ćelijama više nego rotenon. To bi se moglo objasniti ili činjenicom da je aerobna glikoliza glavni put sinteze energije u ovim ćelijama [48, 56], ili time da inhibicija glikolize, ukoliko se ne završava produkcijom lakтата [56], indirektno smanjuje i proizvodnju energije oksidativnom fosforilacijom, budući da se piruvat kao krajnji produkt glikolize prevodi u acetyl-CoA i ulazi u TCA ciklus gde se dalje metaboliše, pri čemu nastaju supstrati za oksidativnu fosforilaciju NADH i FADH₂ [226]. U skladu sa drugom pretpostavkom, dodatak piruvata medijumu za kultivaciju smanjio je toksičnost 2DG+ROT. Međutim, protektivno delovanje piruvata moglo bi biti posledica i njegovog ranije pokazanog antioksidativnog delovanja [227]. Takođe, dodatak glukoze umanjio je efekat toksičnog delovanja kombinovanog tretmana na tumorske ćelije, što bi se moglo objasniti činjenicom da su 2DG i glukoza u kompeticiji za isti enzim heksokinazu [69], pa bi dodavanje glukoze moglo smanjiti inhibitorno delovanje 2DG na glikolizu. Da su upravo inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije odgovorne za antitumorsko delovanje 2DG+ROT dokazano je njihovom zamenom drugim inhibitorima glikolize i oksidativne fosforilacije. 2DG je osim sa rotenonom sinergizovala sa MPP⁺ i CCCP, a rotenon osim sa 2DG, sa jodoacetatom, kao i totalnom deplecijom glukoze iz medijuma za kultivaciju. Važno je naglasiti da su, za razliku od 2DG koja se kao antitumorska terapija nalazi u brojnim kliničkim studijama [82] ([NCT00096707](#), [NCT00633087](#)), rotenon [228], MPP⁺ [229], CCCP [230] i jodoacetat [231] visoko toksični agensi. Budući da se sva tri inhibitora

oksidativne fosforilacije koriste u istraživanju Parkinsonove bolesti [232], očigledno je da se ne mogu koristiti za lečenje pacijenata. Zbog toga se prvi deo naše studije može razmatrati samo uopšteno, kao potencijalna antitumorska terapija u čijoj osnovi se nalaze istovremena inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije. U budućnosti u ovakvoj vrsti antitumorske terapije rotenon bi se mogao zameniti manje toksičnim inhibitorima oksidativne fosforilacije kao što su arsenik trioksid, koji se koristi u terapiji akutne promielocitne leukemije [233], ili 3-nitropropionskom kiselinom koja je trenutno u kliničkim ispitivanjima ([NCT03738878](#); [NCT00972569](#); [NCT02041663](#)) i BAY 87-2243 ([NCT01297530](#)). Pored toga, kombinacija 2DG i rotenona mogla bi oponašati hipoksična i ishemijska stanja u tumorskim ćelijama udaljenim od krvnih sudova sa ograničenom dostupnošću kiseonika i glukoze [234]. Ovakve energetske deficitarne ćelije sporo rastu, otporne su na većinu standardnih citostatika i predstavljaju veliki izazov u lečenju tumora [158].

Očekivano, snažna energetska deplecija uzrokovana kombinovanim tretmanom stimulisala je osnovni unutarćelijski energetske senzor AMPK [194], a suprimirala aktivnost njegovog supstrata mTORC1 [195] u tumorskim ćelijama. Aktivacija AMPK može imati citotoksičnu, kao i citoprotektivnu ulogu u rastu tumora [235]. Budući da su naša istraživanja pokazala da transfekcija ćelija sa AMPK siRNA pojačava citotoksično delovanje kombinovanog tretmana, zaključili smo da AMPK štiti tumorske ćelije od 2DG+ROT. Takođe, u studijama Chaube i saradnika [236] i Jeon i saradnika [237], aktivacija AMPK je imala protektivno dejstvo na tumorske ćelije umanjujući efekat toksičnog delovanja energetske deplecije. Sa druge strane, iako je mTORC1 dobro poznati signal za ćelijsko preživljavanje [238], antimelanomski efekat kombinovanog tretmana ne zavisi od supresije aktivnosti mTORC1, jer smo pokazali da aktivator mTORC1 kompleksa leucin nije smanjio njegovu citotoksičnost.

Zanimljivo je da, iako je pokazano da 2DG+ROT indukuje snažnu aktivaciju AMPK i inhibiciju mTORC1, što predstavlja osnovni signalni put za indukciju autofagije [40], ovaj tretman ne samo da nije indukovao, već je inhibirao autofagiju u našoj studiji. Ovakav rezultat je u potpunoj suprotnosti sa opšteprihvatenim uverenjem da se autofagija aktivira u uslovima energetske deplecije kako bi se obezbedila energija za bazalne metaboličke procese [43]. Sa druge strane, postoji studija koja je pokazala da je autofagija energetske zavisan proces i da postoji prag koncentracije ATP koji je neophodan za indukciju autofagije [239]. U skladu sa ovom pretpostavkom snažna energetska deplecija indukovana kombinovanim tretmanom mogla bi suprimirati indukciju autofagije. Naši rezultati su takođe u skladu sa studijama drugih autora u kojima je pokazano da je autofagija inhibirana u ćelijama tumora pankreasa tretiranim 2DG u kombinaciji sa inhibitorom mitohondrijalne ATP-aze oligomicinom [89], inhibitorom mitohondrijalnog kompleksa I metforminom [240] ili umerenom hipoksijom [241]. Pored toga, u studiji Xi i saradnika [241] pokazano je da 2DG u hipoksičnim uslovima suprimira formiranje inicijacionog kompleksa fosfatidilinozitol 3-kinaze klase III (PI3K-III) i beklina-1, kao i konverziju LC3 proteina. U saglasnosti sa tim, naši rezultati su pokazali da kombinovani tretman snižava nivo beklina-1 i LC3-II proteina, dok je koncentracija autofagnog supstrata p62 bila povećana, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno. Pošto smanjenje koncentracije LC3-II može biti i posledica njegove pojačane razgradnje u autolizozoma, odnosno pojačanog autofagnog fluksa, merili smo koncentraciju LC3-II proteina u ćelijama tretiranim 2DG+ROT u prisustvu inhibitora autofagne proteolize bafilomicina A1. Pošto je koncentracija LC3-II bila značajno manja u ćelijama tretiranim kombinovanim tretmanom i bafilomicinom A1 nego u ćelijama tretiranim samo bafilomicinom A1, mogli smo da zaključimo da 2DG+ROT ne povećava autofagnu razgradnju ovog proteina, već da inhibira konverziju LC3-I u LC3-II formu, odnosno stvaranje autofagozoma. Da je kombinovani tretman zaista inhibirao indukciju autofagije sugerisala je i činjenica da je smanjio kiselost citoplazme, odnosno broj kiselih vezikula, koje mogu biti ili lizozomi ili autolizozomi [242]. 2DG se smatra induktorom autofagije [89, 241, 243-246], mada postoje i studije u kojima 2DG inhibira

autofagiju [247, 248]. U našim eksperimentima 2DG nije imala uticaja na proces autofagije, odnosno nije značajno uticala na kiselost citoplazme, niti je promenila koncentraciju beklina-1, p62 i LC3-II u prisustvu i odsustvu bafilomicina A1. Takođe, iako postoje studije u kojima rotenon stimuliše [249, 250], kao i one u kojima inhibira autofagiju [249, 251], i kako u ovoj doktorskoj disertaciji rotenon nije imao značajnog uticaja na kiselost citoplazme i na koncentraciju proteinskih markera autofagije, zaključili smo da rotenon niti indukuje niti inhibira autofagiju. U skladu sa odsustvom indukcije autofagije u pojedinačnim i kombinovanom tretmanu njena genetska supresija pomoću LC3 i beclin-1 siRNA i farmakološka inhibicija bafilomicinom A1, hlorokinom i NH₄Cl nisu imale uticaja na vijabilnost tumorskih ćelija tretiranih sa 2DG, rotenonom i njihovom kombinacijom. Dakle, proces autofagije ne učestvuje u citotoksičnosti kombinovanog tretmana i ne štiti ćelije od toksičnosti 2DG, rotenona i njihove kombinacije. Dakle, naša hipoteza da će 2DG+ROT indukovati protektivnu autofagiju i da će se njenom inhibicijom pojačati antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana ispostavila se netačnom.

Ako se izuzme deplecija ATP i indukcija oksidativnog stresa, koja je pokazana u studiji Fath i saradnika [157], unutarćelijski mehanizmi odgovorni za citotoksično delovanje 2DG+ROT do sada nisu ispitivani. U ovoj disertaciji po prvi put smo pokazali da kombinovani tretman indukuje oslobađanje superoksida i citohroma c iz mitohondrija, koji zatim aktivira kaspaze, međutim ne dolazi do fragmentacije DNK, niti do proteolitičkog isecanja PARP. Takođe, eksternalizacija fosfatidilserina koincidirala je sa narušavanjem integriteta plazma membrane, a pojavile su se i morfološke promene ćelija karakteristične za nekrotične ćelije, kao što su smanjenje gustine citoplazme i dezintegracija ćelijske membrane. Naši rezultati su u skladu sa činjenicom da je za translokaciju aktiviranih kaspaza u nukleus i izvršenje kasnijih koraka apoptoze, koji uključuju kondenzaciju nukleusa i degradaciju DNK, potreban ATP [252, 253]. Imajući sve ovo u vidu, kao i činjenicu da inhibitor kaspaza Apoptat ne inhibira toksičnost kombinovanog tretmana, zaključili smo da antitumorsko delovanje 2DG+ROT započinje indukcijom apoptoze, koja se ubrzo zbog nedostatka ATP pretvara u nekrozu, ćelijsku smrt za koju nije potrebna energija [254]. Nepotpuna apoptoza, koja se u stanju niskog energetskeg statusa ćelije pretvara u nekrozu, poznata je od ranije i naziva se aponekroza [255]. U citosolu citohrom c formira apoptozom sa aktivirajućim faktorom-1 apoptotske proteaze (Apaf-1), koji se zatim vezuje za inicijatorsku kaspazu-9, indukujući njeno autokatalitičko isecanje, što na kraju dovodi do aktivacije efektorske kaspaze-3 [173]. Pored generalne aktivacije kaspaza, kombinovani tretman je indukovao i aktivaciju efektorske kaspaze-3 [21], kao i inicijatorskih kaspaza-8 i -9, uključenih u spoljašnji i unutrašnji put apoptoze [21, 173]. Imajući u vidu da je aktivacija kaspaza energetski zavisna proces, čini se kontradiktornim da ćelija koja gladuje troši energiju na nepotrebnu aktivaciju kaspaza. Stoga, bilo bi zanimljivo ispitati da li je aktivacija kaspaza samo slučajna posledica oslobađanja citohroma c u citoplazmu ili ima neku ulogu u ćeliji. Pored toga što je bila nezavisna od indukcije apoptoze i autofagije, smrt indukovana 2DG+ROT nije imala karakteristike ni nekroptoze ni ferroptoze, kako je pokazano eksperimentima sa inhibitorom nekroptoze nekrostatinom, odnosno helatorima gvožđa.

Iako sam rotenon nije bio citotoksičan, indukovao je masivno rasipanje mitohondrijskog potencijala, kako je pokazano u ovoj, ali i prethodnim studijama [219, 256-258]. Ovaj efekat je najverovatnije bio izazvan inhibicijom kompleksa I respiratornog lanca, za koju je poznato da predstavlja snažan signal za depolarizaciju mitohondrija [259]. Nasuprot rotenonu, 2DG je hiperpolarisala membranu mitohondrija u našim eksperimentima i radovima drugih autora [260, 261]. Slično kao što je ranije pokazano na mišjim dopaminergičnim neuronima [219], u prvih 16 h 2DG je svojom hiperpolarizujućom aktivnošću neutralisala depolarizaciju indukovanu rotenonom. Imajući u vidu da je za održavanje membranskog potencijala neophodan integritet unutrašnje membrane mitohondrija [262], naši rezultati sugerišu da u prvih 16 h nije došlo do njenog oštećenja. Sa druge strane, nakon 24 h, kada su mitohondrije kao i većina drugih organela bile

oštećene, mitohondrijska depolarizacija izazvana kombinovanim tretmanom prevazišla je depolarizaciju indukovanu samim rotenonom. Osim oštećenja mitohondrija, njihovoj snažnoj depolarizaciji u kasnom terminu mogli su doprineti i oksidativni stres, koji je poznati induktor depolarizacije mitohondrija [263], kao i potpuna energetska deplecija, imajući u vidu da je ATP neophodan za održavanje membranskog potencijala mitohondrija [264]. Takođe, kombinovani tretman indukovao je i značajno vremenski zavisno bubrenje mitohondrija detektovano elektronskom mikroskopijom. Mada je dilatacija mitohondrija najčešće posledica otvaranja mitohondrijalne pore [265], pokazano je da je mogu indukovati i drugi mehanizmi, kao što su lipidna peroksidacija [266], povišena produkcija vode [267], povećan ulazak kalijuma u mitohondrije [268, 269]. Pošto u našoj studiji kombinovani tretman nije indukovao depolarizaciju mitohondrija, odnosno povećanje propustljivosti pore na membrani mitohondrija, bar ne u prvih 16 h, bilo bi zanimljivo ispitati kako dolazi do njihovog bubrenja. Takođe, zanimljivo je da se nakon 6 i 16 h moglo primetiti prisustvo toroidalnih mitohondrija u obliku krofni. Kako su ranije predložili Liu i Hajnoczky, ovakav oblik mitohondrija predstavlja njihov zaštitni mehanizam u uslovima metaboličkog stresa [270]. Imajući u vidu da je ćelijska smrt prethodila kasnoj depolarizaciji mitohondrija, kao i da smrt ćelija tretiranih 2DG+ROT nije bila umanjena u prisustvu ciklosporina A, inhibitora otvaranja mitohondrijske pore [178], zaključili smo da depolarizacija mitohondrija ne učestvuje u citotoksičnom delovanju kombinovanog tretmana.

U prethodnoj studiji pokazano je da 2DG+ROT indukuju oksidativni stres u ćelijama kolorektalnog karcinoma [157]. U skladu sa ovim rezultatima, mi smo pokazali da kombinovani tretman indukuje sinergističku produkciju mitohondrijskog superoksida nakon 6 h od početka tretmana. Najveći deo superoksida se upravo produkuje u mitohondrijama curenjem elektrona sa elektron transportnog lanca na kiseonik [271]. Imajući u vidu da citohrom c uklanja superokside [187], oslobađanje citohroma c iz mitohondrija moglo je da dovede do povećanja koncentracije superoksida. Takođe, da mitohondrijski superoksid ima bitnu ulogu u citotoksičnom delovanju 2DG+ROT potvrđeno je eksperimentima u kojima je antioksidans α -tokoferol oporavio vijabilitet tumorskih ćelija.

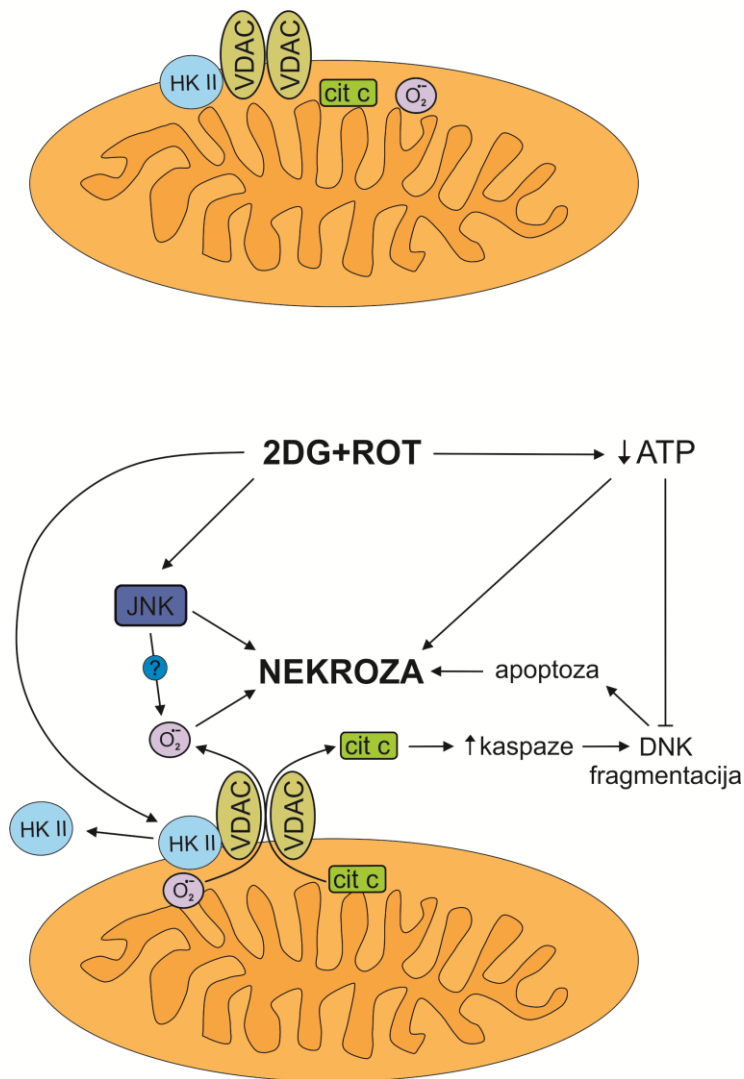
Citohrom c je vezan za unutrašnju membranu mitohondrija i nakon prekida ove interakcije može proći kroz permeabilizovanu spoljašnju membranu mitohondrija [272]. I superoksid [187] i citohrom c [188, 189] izlaze iz mitohondrija kroz voltažno-zavisni anjonski kanal - VDAC. Zanimljivo je da superoksid takođe i stimuliše otvaranje VDAC [273], čime se formira pozitivna povratna sprega između ova dva procesa. Sa druge strane, HKII, glavna meta 2DG [274] i protektivni molekul tumorskih ćelija [59], stabilizuje VDAC u zatvorenoj formi [190]. Pokazano je da se preko 70% HKII nalazi u spoljašnjoj membrani mitohondrija vezano za VDAC i da inhibira oslobađanje citohroma c u citosol [188]. Pošto smo utvrdili da kombinovani tretman pored citohroma c i superoksida indukuje i oslobađanje HKII sa membrane mitohondrija u citoplazmu, prepostavili smo da on zapravo dovodi do otvaranja VDAC. Na ovakav zaključak naveo nas je i eksperiment u kome smo pokazali da DIDS, inhibitor otvaranja VDAC [190], delimično umanjuje toksični efekat 2DG+ROT na tumorske ćelije. Zanimljivo je, međutim da je sam DIDS, kada je bio korišćen u višoj koncentraciji, smanjio vijabilitet tumorskih ćelija, kao i da je kombinacija DIDS sa 2DG+ROT imala veći vijabilitet od ćelija tretiranih samo sa DIDS i samo sa 2DG+ROT. Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti studijom Dubey i sardnika u kojoj je pokazano da je za preživljavanje ćelije neophodna precizna regulacija otvaranja VDAC, jer preterano zatvaranje onemogućava prolazak ATP i ADP, dok preterano otvaranje dovodi do izlaska superoksida i citohroma c iz mitohondrija [190].

Različiti tretmani stimulišu oslobađanje citohroma c i ćelijsku smrt aktivacijom MAP kinaze JNK [275-277]. Otkriveno je i da se JNK aktivira u uslovima energetske deplecije [278-281]. Shodno tome, kombinovani tretman je indukovao snažnu aktivaciju JNK. Pošto je inhibitor

JNK SP600125 smanjio citotoksičnost dejstva kombinovanog tretmana na tumorske ćelije, zaključili smo da je u osnovi citotoksičnog delovanja 2DG+ROT aktivnost JNK kinaze. Iako u ovoj studiji nisu ispitivane uzročno posledične veze između aktivacije JNK i oslobađanja superoksida, činjenica da je snažna aktivacija JNK detektovana na samom početku izlaganja ćelija kombinovanom tretmanu, pre oslobađanja mitohondrijskog superoksida sugerise da bi aktivacija JNK mogla učestvovati u indukciji njegovog oslobađanja iz mitohondrija. Takođe, nismo ispitali ni vezu između aktivacije JNK i otvaranja VDAC. Imajući u vidu da je prethodno pokazano da otvaranje VDAC indukuje aktivaciju JNK i sledstveno oslobađanje superoksida iz mitohondrija u ćelijama hepatocelularnog karcinoma [282, 283], ali i da aktivacija JNK povećava otvaranje VDAC i apoptozu zavisnu od kaspaza u T limfocitima [284], moguće je da u tretmanu 2DG+ROT aktivacija JNK stimuliše otvaranje VDAC, ali i da otvoreni VDAC aktivira JNK, kao i da postoji pozitivna povratna sprega između ova dva procesa. Za razliku od JNK kinaze, aktivacija MAP kinaze ERK predstavlja uglavnom preživljavajući signal za tumorske ćelije [198]. 2DG je pojačala, a rotenon inhibirao aktivnost ERK. Čini se da je u kombinovanom tretmanu došlo do poništavanja ova dva efekta, tako da aktivnost ERK nije bila promenjena u ćelijama tretiranim 2DG+ROT u odnosu na kontrolu, pa njenu funkciju u citotoksičnom delovanju kombinovanog tretmana nismo dalje proučavali.

Hipotetički model antitumorskog delovanja 2DG+ROT prikazan je na slici 77. Kombinovani tretman indukuje oslobađanje HKII sa membrane mitohondrija i otvaranje VDAC, kroz koje zatim izlazi superoksid i citohrom c. Citohrom c nakon toga stimuliše kaskadnu aktivaciju kaspaza, ali usled nedostatka ATP, indukovano istovremenom inhibicijom glikolize i oksidativne fosforilacije, ne dolazi do fragmentacije DNK i apoptoza ubrzo prelazi u nekrozu. Zanimljivo je da iako deplecija energije indukuje aktivaciju AMPK i inhibiciju mTORC1, ne dolazi do stimulacije, već naprotiv do inhibicije autofagije. Osim toga, kombinovani tretman stimuliše i aktivaciju JNK, koja učestvuje u njegovom citotoksičnom efektu, verovatno posredstvom stimulacije oslobađanja superoksida iz mitohondrija. Uzročno-posledične veze između otvaranja VDAC i aktivacije JNK indukovane 2DG+ROT trebalo bi dalje ispitati.

BEZ TRETMANA



Slika 77. Pretpostavljeni mehanizam dejstva 2DG+ROT kombinovanog tretmana

U drugom delu ove doktorske disertacije po prvi put je pokazano sinergističko antitumorsko delovanje 2DG i lizosomalnog deterdženta NDI. Važno je naglasiti da u ovoj studiji nije samo prvi put pokazana sinergistička antigliomska i antimelanomska aktivnost dva farmakološka agensa, već je ovo i prvo istraživanje koje je pokazalo da inhibicija glikolize i destabilizacija lizozoma sinergizuju u ubijanju tumorskih ćelija uopšte. Ukratko, inhibicija glikolize pomoću 2DG i LMP indukovana pomoću NDI izazvali su brzu depleciju ATP, oštećenje mitohondrija i oksidativni stres, koji su na kraju doveli do nekrotične smrti tumorskih ćelija. Ovakvi rezultati u skladu su sa sposobnošću mitohondrijske depolarizacije, deplecije ATP, oksidativnog stresa i LMP da indukuju nekrozu [177]. Takođe, poznato je da oštećenja mitohondrija [285] i oštećenja lizozoma [286] u stanju energetske deplecije prevashodno indukuju nekrozu. Kao i u slučaju 2DG+ROT, korišćenjem odgovarajućih farmakoloških i genetskih inhibitora, pokazali smo da apoptoza, ferroptoza, nekroptoza i autofagija nisu uključene u citotoksično delovanje 2DG+NDI.

Iako je efikasno ubijao ćelije B16 melanoma i U251 glioma, tretman 2DG+NDI nije bio toksičan za primarne astrocite. Razlog za to bi mogao ležati u činjenici da tumorske ćelije više zavise od glikolize od normalnih ćelija [287], što je između ostalog ranije upravo pokazano za U251 ćelije i netransformisane astrocite [288]. Pored toga, pokazano je da su tumorske ćelije podložnije LMP nego normalne ćelije, zbog uvećanog broja i zapremine lizozoma [126, 289], kao i zbog povećane ekspresije katepsina [290]. U skladu sa tim, ranije je pokazano da su diferencirani HL-60 promijelociti manje osetljivi na NDI nego nediferencirane ćelije HL-60 [146]. Dakle, tretmani 2DG+NDI i 2DG+ROT bili su slični po selektivnoj toksičnosti prema tumorskim ćelijama.

Biološki efekti NDI do sada su ispitivani samo *in vitro*. Dakle, nije poznato kako bi se NDI ponašao u organizmu čoveka. Stoga je od izuzetne važnosti istaći činjenicu da u našoj studiji 2DG nije sinergizovala u ubijanju tumorskih ćelija samo sa NDI, već i sa lizozomotropnim lekom hlorokinom, koji se široko koristi u tretmanu malarije i reumatoidnog artritisa [291]. Kao što je prethodno rečeno, hlorokin je inhibitor autofagije [292], ali ako se koristi u visokim koncentracijama ima sposobnost da indukuje LMP [166]. Takođe, u našoj prethodnoj studiji pokazali smo da hlorokin u stanju energetske deplecije, izazvane deprivacijom seruma iz medijuma za kultivaciju, indukuje snažnu destabilizaciju lizozoma [293]. Za razliku od hlorokina, drugi inhibitor autofagije supresor vakuolarne (H⁺)-ATPaze bafilomicin A, koji alkalizuje lizosome i sprečava autofagnu proteolizu [205], ali nije u stanju da izazove LMP [210-213], nije sinergizovao sa 2DG, čime je sugerisano da je LMP odgovorna za citotoksično delovanje 2DG+NDI. Ova pretpostavka potvrđena je protektivnim efektom inhibitora katepsina E64d. Takođe, ranije je pokazano na ćelijama rabdomyosarkoma i raka prostate da hlorokin sinergizuje u citotoksičnom efektu sa 2DG, ali autori ovog rada nisu ispitivali permeabilizaciju lizozoma, već su sugerisali da je inhibicija protektivne autofagije bila odgovorna za pomenuti efekat [75]. Dalje, imajući u vidu da su pored 2DG i inhibitori glikolize IA i NaF sinergizovali sa NDI, mogli smo da zaključimo da je upravo inhibicija glikolize bitna za antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana. Osim što pokazuju ključnu ulogu inhibicije glikolize i indukcije LMP u antitumorskom delovanju 2DG+NDI, prethodno opisani rezultati sugerišu da je sinergizam u antitumorskom delovanju ova dva fenomena opštevažeći princip koji bi mogao biti osnova za razvoj buduće hemoterapije.

I 2DG i NDI, a naročito njihova kombinacija, bili su u stanju da izazovu naglo smanjenje ATP u tumorskim ćelijama i dovedu do energetskog stresa, koji je potvrđen i aktivacijom AMPK i njegovog supstrata Raptor. Smanjenje ATP u ćelijama tretiranim sa 2DG bilo je logična posledica inhibicije glikolize. Sa druge strane, veza između LMP indukovano pomoću NDI i smanjenja ATP bila je manje očigledna. Naši rezultati su utvrdili da NDI izaziva depolarizaciju mitohondrija, a poznato je da je elektrohemijski gradijent na membrani mitohondrija neophodan za oksidativnu fosforilaciju [93]. Takođe, TEM analiza pokazala je sposobnost NDI da izazove kondenzaciju matriksa u mitohondrijama, što je poznato da nastaje kao posledica pada potencijala membrane mitohondrija [294]. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranije pokazanom sposobnošću drugih induktora LMP da izazovu depolarizaciju mitohondrija katepsin-zavisnim [211] i katepsin-nezavisnim mehanizmima [295, 296]. Tako je, na primer, utvrđeno da katepsini mogu proteolitički aktivirati Bid i izazvati permeabilizaciju membrane mitohondrija [297]. Sa druge strane, kako je pokazano u studiji Lee i saradnika, mehanizmi nezavisni od dejstva katepsina uključuju aktivnost lizozomalnih lipaza i članova Bcl-2 familije proteina: Bax i Bak [295]. Takođe, u jednoj studiji utvrđeno je da se i NDI akumulira u mitohondrijama [144], što sugerise na mogućnost da direktno inhibira njihovu funkciju. Imajući u vidu da je inhibitor katepsina delimično spasio tumorske ćelije od 2DG+NDI, naši rezultati ukazuju na umešanost i katepsin-zavisnih i katepsin-nezavisnih mehanizama u oštećenje mitohondrija i ćelijsku smrt. Sa druge strane, iako sama 2DG nije izazvala, dodatno je povećala depolarizaciju indukovanu sa NDI i oštećenje mitohondrija, odnosno broj oštećenih i degenerisanih mitohondrija. Ovaj efekat se može objasniti činjenicom da ćelije u stresu nastalom usled oštećenja mitohondrija, pokušavaju da održe potencijal mitohondrijske

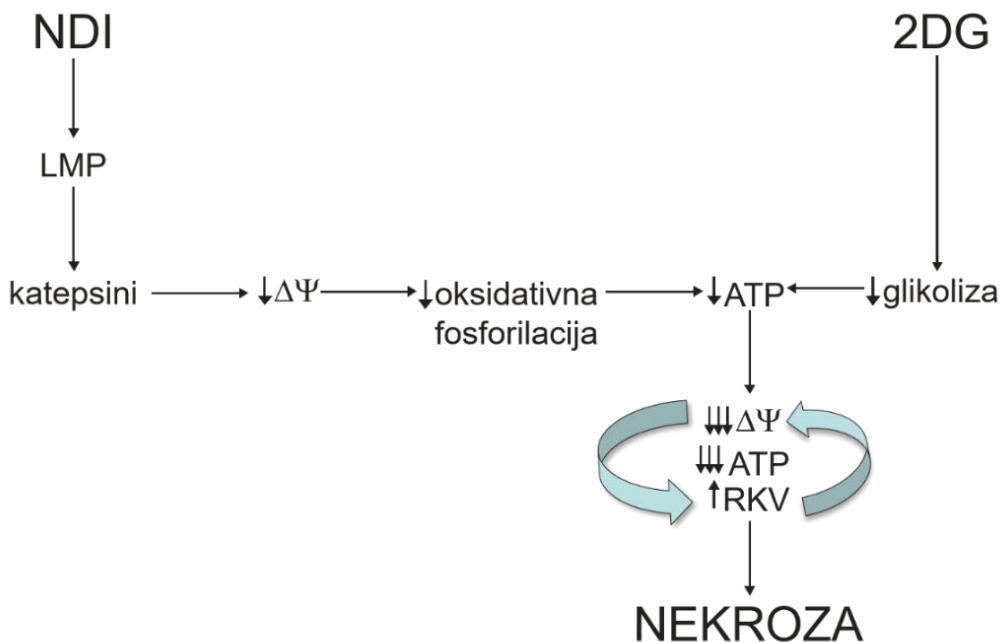
membrane hidrolizom ATP generisanog tokom glikolize pomoću F_1F_0 -ATPaze i korišćenjem dobijene energije za transport protona kroz membranu mitohondrija [264]. Međutim, ukoliko je glikoliza blokirana, ovaj mehanizam postaje nefunkcionalan i ćelije umiru, baš kao što je ranije pokazano eksperimentima u kojima su tumorske ćelije bile istovremeno izložene 2DG i lekovima koji oštećuju mitohondrije [91, 158]. Stoga, mi pretpostavljamo da LMP aktiviran NDI tretmanom izaziva inicijalnu depolarizaciju mitohondrija, koju dodatno povećava tretman sa 2DG, usled nedostatka glikolizom nastalog ATP, neophodnog za održavanje funkcije mitohondrija. Ovo na kraju dovodi do začaranog kruga pozitivnih povratnih spreaga disfunkcije mitohondrija i gubitka ATP.

Sinergistički porast koncentracije superoksida produkovanog u mitohondrijama, ukupnih RKV i peroksidacija lipida, kao i zaštitno delovanje antioksidanasa, sugerisali su važnu ulogu oksidativnog stresa u citotoksičnosti 2DG+NDI tretmana. Povezanost depolarizacije mitohondrija i produkcije superoksida u ćelijama tretiranim sa 2DG+NDI je u skladu sa činjenicom da kolaps mitohondrijskog potencijala povećava stvaranje superoksida na elektron transportnom lancu [206]. To može dovesti do stvaranja i drugih RKV, kao što su H_2O_2 i hidroksilni radikal, što doprinosi produžavanju disfunkcije mitohondrija daljom oksidacijom mitohondrijske DNK, akonitaze i lipida u membrani i povećavanjem propustljivosti membrane mitohondrija [206]. Osim toga, H_2O_2 može ući u lizosome i u Fentonovoj reakciji, koja se odigrava u prisustvu gvožđa nastalog u procesu autofagije razgradnjom proteina koji sadrže gvožđe, dati hidroksilni radikal [148, 214, 298]. Hidroksilni radikal je izuzetno reaktivan i indukuje lipidnu peroksidaciju, koja može izazvati destabilizaciju membrane lizozoma [298]. Važno je istaći da su lizozomi veoma osetljivi na delovanje H_2O_2 jer ne poseduju enzime za njegovu degradaciju, kao što su katalaze i glutation peroksidaza [298]. Međutim, imajući u vidu da helatori gvožđa nisu spasili tumorske ćelije od kombinovanog tretmana, diskutabilno je da li je ovaj mehanizam odgovoran za njegovo citotoksično delovanje. Sa druge strane, moguće je da je kasno sinergističko oštećenje lizozoma kombinovanim tretmanom izazvano delovanjem RKV iz mitohondrija, jer je α -tokoferol sprečio sinergističku indukciju LMP. To implicira da u kasnijim stadijumima kombinovanog tretmana oštećujuće pozitivne povratne sprege postaju još složenije, jer uključuju i destabilizaciju lizozoma indukovanu oksidativnim stresom, koja dalje može potencirati depolarizaciju mitohondrija i gubitak ATP. Oslobođeni lizozomalni enzimi dovode do digestije citosolnih supstrata, oksidativni stres do oštećenja membranskih lipida, a deplecija ATP do gubitka funkcije homeostatskih jonskih pumpi/kanala, što sve na kraju rezultira nekrozom.

Energetski stres, oštećenja mitohondrija i oksidativni stres su glavni induktori autofagije [299]. Autofagija uglavnom predstavlja protektivni mehanizam u energetske depleciji i drugim nepovoljnim stanjima [204]. Tako je, na primer pokazano da se depolarizovane mitohondrije koje proizvode RKV razlažu mitofagijom [300], čime se smanjuje oksidativni stres i omogućava preostalim, neoštećenim mitohondrijama da se umnože i spase ćeliju [301, 302]. Gubitak ATP indukovani NDI i 2DG+NDI tretmanima korelirao je sa aktivacijom AMPK i Raptor, kao i sa porastom nivoa LC3-II molekula i broja autofagnih vezikula. Međutim, na osnovu rezultata sa drugim lizozomalnim inhibitorima [205], povećana akumulacija LC3-II proteina, kao i povećan broj autofagozoma nakon tretmana NDI najverovatnije potiču od inhibicije autofagne proteolize nastale usled oštećenja lizozoma, a ne od indukcije autofagije. Kao i u eksperimentima sa rotenonom, sama 2DG nije stimulisala povećanje koncentracije LC3-II. Sa druge strane, povećanje koncentracije LC3-II detektovano u prisustvu 2DG+NDI verovatno pokazuje stvarno povećanje sinteze autofagozoma, koje se jasno uočava u uslovima inhibirane proteolize [205]. Interesantno je, međutim, da je u prethodnom delu studije pokazano da 2DG ne povećava koncentraciju LC3-II u prisustvu lizozomalnog inhibitora bafilomicina. Različita sposobnost 2DG da indukuje autofagiju mogla bi se objasniti različitim koncentracijama 2DG korišćenim u prvom delu studije u eksperimentima sa rotenonom (5 mM) i drugom delu studije u eksperimentima sa NDI (10 mM).

Osim toga, moguće je i da 2DG ima sposobnost da stimuliše autofagiju u prisustvu NDI, ali ne i u prisustvu bafilomicina. Pošto je pokazano da 2DG aktivira autofagiju, mogla se postaviti hipoteza da destabilizacija lizozoma indukovana NDI ubija ćelije tretirane 2DG inhibicijom citoprotektivne autofagije. Međutim, kako je prethodno rečeno, bafilomicin A1 nije sinergizovao sa 2DG, a ni utišavanje autofagnih gena za *ATG5* i *ATG7*, sugerišući da inhibicija protektivne autofagije ne učestvuje u citotoksičnom delovanju 2DG+NDI. Ovo bi moglo biti naizgled kontradiktorno sa dosadašnjim rezultatima koji pokazuju povećanje citotoksičnosti 2DG nakon farmakološke ili genetske inhibicije autofagije, ali treba napomenuti da su u ovim studijama efekti 2DG praćeni nakon inkubacije ćelija u trajanju od 48 h i 72 h [75, 89, 246, 303], dok su u našoj studiji praćeni samo u prvih 24 h. Dakle, iako ovo pitanje zahteva dalja istraživanja, naši rezultati ukazuju da je, baš kao i u slučaju 2DG+ROT, modulacija autofagije bila irelevantna za antitumorsko delovanje 2DG+NDI.

Kako je prikazano na slici 78. NDI indukuje LMP i izlazak katepsina iz lizozoma. Katepsini zatim verovatno permeabilizuju membranu mitohondrija, što izaziva oksidativni stres i zaustavlja oksidativnu fosforilaciju. Inhibicija oksidativne fosforilacije indukovana NDI zajedno sa supresijom glikolize, koju indukuje 2DG, izaziva snažnu energetske depleciju. U odsustvu ATP, neophodnog za održavanje naelektrisanja membrane mitohondrija, dolazi do još veće depolarizacije, inhibicije sinteze ATP i oksidativnog stresa, što sve zajedno na kraju dovodi do nekroze tumorskih ćelija. Dakle, sinergistička indukcija nekrotične ćelijske smrti 2DG+NDI tretmanom u tumorskim ćelijama se odvija putem složene mreže pozitivnih povratnih sprega, koje uključuju oštećenja lizozoma, depolarizaciju mitohondrija, depleciju ATP i oksidativni stres. Dodatne studije su potrebne da bi se ispitali tačni vremenski i uzročno-posledični odnosi između ovih fenomena u 2DG+NDI tretmanu, kao i obim njihovog doprinosa nekrozi tumorskih ćelija.



Slika 78. Pretpostavljeni mehanizam dejstva 2DG+NDI kombinovanog tretmana

U ovoj disertaciji je pokazano da inhibicija glikolize pomoću 2DG u kombinaciji sa supresijom oksidativne fosforilacije rotenonom ili permeabilizacijom lizozoma NDI ispoljava snažan sinergistički antitumorski efekat na ćelije glioma i melanoma. Budući da je incidenca ovih tumora u stalnom porastu, a da za njih još uvek ne postoji efikasna terapija, naši rezultati snažno podržavaju dalja istraživanja antigliomskih i antimelanomskih tretmana koja se baziraju na istovremenoj inhibiciji glikolize i oksidativne fosforilacije, kao i na istovremenoj inhibiciji glikolize i destabilizaciji lizozoma.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima i na osnovu dobijenih rezultata u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Za razliku od pojedinačnih tretmana 2DG, rotenonom i NDI, koji ispoljavaju samo antiproliferativni efekat, kombinacija 2DG sa rotenonom i kombinacija 2DG sa NDI imaju i antiproliferativni i citotoksični efekat na ćelije melanoma i glioma *in vitro*.
2. Citotoksično delovanje 2DG u kombinaciji i sa ROT i sa NDI posredovano je nekrozom, a potpuno nezavisno od apoptoze, autofagije i nekroptoze.
3. Kombinovani tretman 2DG i rotenonom stimuliše citotoksičnu aktivnost MAP kinaze JNK, otpuštanje HKII sa spoljašnje membrane mitohondrija i posledično otvaranje VDAC kanala kroz koje iz mitohondrija izlaze superoksid i citohrom c. Citohrom c zatim aktivira kaspaze, ali zbog potpune deplecije energije u tumorskoj ćeliji ne dolazi do fragmentacije DNK, a apoptoza prelazi u nekrozu.
4. NDI indukuje permeabilizaciju lizozoma i oslobađanje katepsina, koji zatim indukuju depolarizaciju mitohondrija, oksidativni stres i supresiju oksidativne fosforilacije, što zajedno sa inhibicijom glikolize indukovane 2DG dovodi do potpune energetske deplecije u tumorskim ćelijama. Energetska deplecija zatim izaziva još veću depolarizaciju, oštećenja mitohondrija i oksidativni stres, koji zatim dodatno oštećuje lizozome, čime se između pomenutih citotoksičnih događaja uspostavlja pozitivna povratna sprega, što sve zajedno rezultuje u nekrotičnoj smrti tumorskih ćelija.

7. LITERATURA

1. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York ; Abingdon: Garland Science. xxxiii, 1601, 40, 49, 1 p.
2. Osborne, C., P. Wilson, D. Tripathy, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. *Oncologist*, 2004. **9**(4): p. 361-77.
3. Kallunki, T., O.D. Olsen, M. Jäättelä, *Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes?* *Oncogene*, 2013. **32**(16): p. 1995-2004.
4. Shtivelman, E., M.Q. Davies, P. Hwu, J. Yang, M. Lotem, M. Oren, K.T. Flaherty, D.E. Fisher, *Pathways and therapeutic targets in melanoma*. *Oncotarget*, 2014. **5**(7): p. 1701-52.
5. Galluzzi, L., O. Kepp, M.G. Vander Heiden, G. Kroemer, *Metabolic targets for cancer therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(11): p. 829-46.
6. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
7. Fritz, A., C. Percy, A. Jack, K. Shanmugaratnam, L.H. Sobin, D.M. Parkin, S.L. Whelan, O. World Health, *International classification of diseases for oncology / editors, April Fritz ... [et al.]*. 2000, World Health Organization: Geneva.
8. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
9. Reni, M., E. Mazza, S. Zanon, G. Gatta, C.J. Vecht, *Central nervous system gliomas*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017. **113**: p. 213-234.
10. Kaba, S.E., A.P. Kyritsis, *Recognition and management of gliomas*. *Drugs*, 1997. **53**(2): p. 235-44.
11. Zaremba, A., L. Zimmer, K.G. Griewank, S. Ugurel, A. Roesch, D. Schadendorf, E. Livingstone, *Immunotherapy for malignant melanoma*. *Internist (Berl)*, 2020. **61**(7): p. 669-675.
12. Gorantla, V.C., J.M. Kirkwood, *State of melanoma: an historic overview of a field in transition*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2014. **28**(3): p. 415-35.
13. Longvert, C., P. Saiag, *Melanoma update*. *Rev Med Interne*, 2019. **40**(3): p. 178-183.
14. Sullivan, R.J., *The role of targeted therapy for melanoma in the immunotherapy era*. *Semin Cutan Med Surg*, 2018. **37**(2): p. 112-119.

15. Savoia, P., P. Fava, F. Casoni, O. Cremona, *Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
16. Cloughesy, T.F., W.K. Cavenee, P.S. Mischel, *Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2014. **9**(1): p. 1-25.
17. Hoang, M.-T.R., L.F. Eichenfield, *The Rising Incidence of Melanoma in Children And Adolescents*, in *Dermatology Nursing*. 2000. p. 188.
18. Fink, S.L., B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
19. Ruddon, R.W., *Cancer biology*. Fourth edition. ed. 2007, Oxford ; New York: Oxford University Press. xiv, 530 pages.
20. Boice, A., L. Bouchier-Hayes, *Targeting apoptotic caspases in cancer*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(6): p. 118688.
21. McIlwain, D.R., T. Berger, T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4).
22. Hensley, P., M. Mishra, N. Kyprianou, *Targeting caspases in cancer therapeutics*. Biol Chem, 2013. **394**(7): p. 831-43.
23. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
24. Dasgupta, A., M. Nomura, R. Shuck, J. Yustein, *Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue*. Int J Mol Sci, 2016. **18**(1).
25. Raffray, M., G.M. Cohen, *Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?* Pharmacol Ther, 1997. **75**(3): p. 153-77.
26. Taylor, R.C., S.P. Cullen, S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
27. Nikolettou, V., M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis, *Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3448-3459.
28. Bebbler, C.M., F. Muller, L. Prieto Clemente, J. Weber, S. von Karstedt, *Ferroptosis in Cancer Cell Biology*. Cancers (Basel), 2020. **12**(1).
29. Mou, Y., J. Wang, J. Wu, D. He, C. Zhang, C. Duan, B. Li, *Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer*. J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 34.
30. Yang, Z., D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 124-31.

31. Mizushima, N., B. Levine, A.M. Cuervo, D.J. Klionsky, *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
32. Kroemer, G., G. Marino, B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 280-93.
33. Levine, B., G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
34. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
35. Green, D.R., F. Llambi, *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(12).
36. Pattingre, S., B. Levine, *Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer?* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2885-8.
37. He, C., D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
38. Shaid, S., C.H. Brandts, H. Serve, I. Dikic, *Ubiquitination and selective autophagy*. Cell Death Differ, 2013. **20**(1): p. 21-30.
39. Bjorkoy, G., T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech, T. Johansen, *Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1*. Methods Enzymol, 2009. **452**: p. 181-97.
40. Paquette, M., L. El-Houjeiri, A. Pause, *mTOR Pathways in Cancer and Autophagy*. Cancers (Basel), 2018. **10**(1).
41. Hardie, D.G., S.C. Lin, *AMP-activated protein kinase - not just an energy sensor*. F1000Res, 2017. **6**: p. 1724.
42. Jain, M.V., A.M. Paczulla, T. Klonisch, F.N. Dimgba, S.B. Rao, K. Roberg, F. Schweizer, C. Lengerke, P. Davoodpour, V.R. Palicharla, S. Maddika, M. Łos, *Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(1): p. 12-29.
43. Jin, S., E. White, *Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress*. Autophagy, 2008. **4**(5): p. 563-6.
44. Notte, A., L. Leclere, C. Michiels, *Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(5): p. 427-34.
45. Gozuacik, D., A. Kimchi, *Autophagy and cell death*. Curr Top Dev Biol, 2007. **78**: p. 217-45.
46. Sonugür, F.G., H. Akbulut, *The Role of Tumor Microenvironment in Genomic Instability of Malignant Tumors*. Front Genet, 2019. **10**: p. 1063.

47. Jose, C., N. Bellance, R. Rossignol, *Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?* Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(6): p. 552-61.
48. Muz, B., P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy.* Hypoxia (Auckl), 2015. **3**: p. 83-92.
49. Tirone, T.A., F.C. Brunicardi, *Overview of glucose regulation.* World J Surg, 2001. **25**(4): p. 461-7.
50. Wood, I.S., P. Trayhurn, *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins.* Br J Nutr, 2003. **89**(1): p. 3-9.
51. Lis, P., M. Dyląg, K. Niedźwiecka, Y.H. Ko, P.L. Pedersen, A. Goffeau, S. Ułaszewski, *The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate.* Molecules, 2016. **21**(12).
52. Fiume, L., M. Manerba, M. Vettraino, G. Di Stefano, *Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy.* Future Med Chem, 2014. **6**(4): p. 429-45.
53. Topisirović, L., *Dinamička biohemija.* 2005: Biološki fakultet.
54. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, L. Stryer, L. Stryer, I. National Center for Biotechnology, *Biochemistry.* 2002.
55. Alfarouk, K.O., D. Verduzco, C. Rauch, A.K. Muddathir, H.H. Adil, G.O. Elhassan, M.E. Ibrahim, J. David Polo Orozco, R.A. Cardone, S.J. Reshkin, S. Harguindey, *Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question.* Oncoscience, 2014. **1**(12): p. 777-802.
56. Liberti, M.V., J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(3): p. 211-218.
57. Herling, A., M. König, S. Bulik, H.G. Holzhütter, *Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells.* Febs j, 2011. **278**(14): p. 2436-59.
58. Oudard, S., E. Boitier, L. Miccoli, S. Rousset, B. Dutrillaux, M.F. Poupon, *Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure.* Anticancer Res, 1997. **17**(3c): p. 1903-11.
59. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, P.L. Pedersen, *Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria.* Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4777-86.
60. Bustamante, E., P.L. Pedersen, *High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(9): p. 3735-9.
61. Wilson, J.E., *Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function.* J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 12): p. 2049-57.

62. Solaini, G., G. Sgarbi, A. Baracca, *Oxidative phosphorylation in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(6): p. 534-42.
63. Pedersen, P.L., *Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(3): p. 211-22.
64. da-Silva, W.S., A. Gómez-Puyou, M.T. de Gómez-Puyou, R. Moreno-Sanchez, F.G. De Felice, L. de Meis, M.F. Oliveira, A. Galina, *Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39846-55.
65. Cheung, E.C., R.L. Ludwig, K.H. Vousden, *Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(50): p. 20491-6.
66. Azoulay-Zohar, H., A. Israelson, S. Abu-Hamad, V. Shoshan-Barmatz, *In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 347-55.
67. Chiara, F., D. Castellaro, O. Marin, V. Petronilli, W.S. Brusilow, M. Juhaszova, S.J. Sollott, M. Forte, P. Bernardi, A. Rasola, *Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1852.
68. Chen, Z., H. Zhang, W. Lu, P. Huang, *Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 553-60.
69. Aft, R.L., F.W. Zhang, D. Gius, *Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death*. Br J Cancer, 2002. **87**(7): p. 805-12.
70. Maher, J.C., A. Krishan, T.J. Lampidis, *Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions*. Cancer Chemother Pharmacol, 2004. **53**(2): p. 116-22.
71. Dwarakanath, B.S., *Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro*. J Cancer Res Ther, 2009. **5 Suppl 1**: p. S27-31.
72. Bost, F., A.G. Decoux-Poullot, J.F. Tanti, S. Clavel, *Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy?* Oncogenesis, 2016. **5**(1): p. e188.
73. Zhang, D., J. Li, F. Wang, J. Hu, S. Wang, Y. Sun, *2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy*. Cancer Lett, 2014. **355**(2): p. 176-83.
74. Zagorodna, O., S.M. Martin, D.T. Rutkowski, T. Kuwana, D.R. Spitz, C.M. Knudson, *2-deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines*. Oncogene, 2012. **31**(22): p. 2738-49.

75. Ramirez-Peinado, S., C.L. Leon-Annicchiarico, J. Galindo-Moreno, R. Iurlaro, A. Caro-Maldonado, J.H. Prehn, K.M. Ryan, C. Munoz-Pinedo, *Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy*. J Biol Chem, 2013. **288**(42): p. 30387-98.
76. Kurtoglu, M., N. Gao, J. Shang, J.C. Maher, M.A. Lehrman, M. Wangpaichitr, N. Savaraj, A.N. Lane, T.J. Lampidis, *Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(11): p. 3049-58.
77. Bell, S.E., D.M. Quinn, G.L. Kellett, J.R. Warr, *2-Deoxy-D-glucose preferentially kills multidrug-resistant human KB carcinoma cell lines by apoptosis*. Br J Cancer, 1998. **78**(11): p. 1464-70.
78. Valera, V., M. Ferretti, D. Prabharasuth, M. Chaimowitz, M. Choudhury, J. Phillips, S. Konno, *Is targeting glycolysis with 2-deoxyglucose a viable therapeutic approach to bladder cancer?* International Journal of Cancer Therapy and Oncology, 2017. **5**.
79. Cheng, Y., D. Diao, H. Zhang, Q. Guo, X. Wu, Y. Song, C. Dang, *High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose*. Biomed Rep, 2014. **2**(2): p. 188-192.
80. Jin, T., H. Mehrens, P. Wang, S.G. Kim, *Glucose metabolism-weighted imaging with chemical exchange-sensitive MRI of 2-deoxyglucose (2DG) in brain: Sensitivity and biological sources*. Neuroimage, 2016. **143**: p. 82-90.
81. Stein, M., H. Lin, C. Jeyamohan, D. Dvorzhinski, M. Gounder, K. Bray, S. Eddy, S. Goodin, E. White, R.S. Dipaola, *Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies*. Prostate, 2010. **70**(13): p. 1388-94.
82. Raez, L.E., K. Papadopoulos, A.D. Ricart, E.G. Chiorean, R.S. Dipaola, M.N. Stein, C.M. Rocha Lima, J.J. Schlesselman, K. Tolba, V.K. Langmuir, S. Kroll, D.T. Jung, M. Kurtoglu, J. Rosenblatt, T.J. Lampidis, *A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **71**(2): p. 523-30.
83. Mohanti, B.K., G.K. Rath, N. Anantha, V. Kannan, B.S. Das, B.A. Chandramouli, A.K. Banerjee, S. Das, A. Jena, R. Ravichandran, U.P. Sahi, R. Kumar, N. Kapoor, V.K. Kalia, B.S. Dwarakanath, V. Jain, *Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **35**(1): p. 103-11.
84. Singh, D., A.K. Banerji, B.S. Dwarakanath, R.P. Tripathi, J.P. Gupta, T.L. Mathew, T. Ravindranath, V. Jain, *Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme*. Strahlenther Onkol, 2005. **181**(8): p. 507-14.
85. Navale, A.M., A.N. Paranjape, *Glucose transporters: physiological and pathological roles*. Biophys Rev, 2016. **8**(1): p. 5-9.

86. Cura, A.J., A. Carruthers, *Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis*. Comprehensive Physiology, 2012. **2**(2): p. 863-914.
87. Zhang, Y., F. Huang, J. Wang, H. Luo, Z. Wang, *2-DG-Regulated RIP and c-FLIP Effect on Liver Cancer Cell Apoptosis Induced by TRAIL*. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2015. **21**: p. 3442-3448.
88. Magier, Z., R. Jarzyna, *The role of glucose transporters in human metabolic regulation*. Postepy Biochem, 2013. **59**(1): p. 70-82.
89. Xi, H., M. Kurtoglu, H. Liu, M. Wangpaichitr, M. You, X. Liu, N. Savaraj, T.J. Lampidis, *2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(4): p. 899-910.
90. Maschek, G., N. Savaraj, W. Priebe, P. Braunschweiger, K. Hamilton, G.F. Tidmarsh, L.R. De Young, T.J. Lampidis, *2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo*. Cancer Res, 2004. **64**(1): p. 31-4.
91. Cheng, G., J. Zielonka, B.P. Dranka, D. McAllister, A.C. Mackinnon, Jr., J. Joseph, B. Kalyanaraman, *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2634-44.
92. Cheong, J.H., E.S. Park, J. Liang, J.B. Dennison, D. Tsavachidou, C. Nguyen-Charles, K. Wa Cheng, H. Hall, D. Zhang, Y. Lu, M. Ravoori, V. Kundra, J. Ajani, J.S. Lee, W. Ki Hong, G.B. Mills, *Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(12): p. 2350-62.
93. Jastroch, M., A.S. Divakaruni, S. Mookerjee, J.R. Treberg, M.D. Brand, *Mitochondrial proton and electron leaks*. Essays Biochem, 2010. **47**: p. 53-67.
94. Jia, D., J.H. Park, K.H. Jung, H. Levine, B.A. Kaiparettu, *Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States*. Cells, 2018. **7**(3).
95. Sica, V., J.M. Bravo-San Pedro, G. Stoll, G. Kroemer, *Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy*. Int J Cancer, 2020. **146**(1): p. 10-17.
96. Koundouros, N., G. Poulogiannis, *Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer*. Br J Cancer, 2020. **122**(1): p. 4-22.
97. Lieu, E.L., T. Nguyen, S. Rhyne, J. Kim, *Amino acids in cancer*. Exp Mol Med, 2020. **52**(1): p. 15-30.
98. Ma, Y., S.M. Temkin, A.M. Hawkrige, C. Guo, W. Wang, X.Y. Wang, X. Fang, *Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer*. Cancer Lett, 2018. **435**: p. 92-100.

99. Vettore, L., R.L. Westbrook, D.A. Tennant, *New aspects of amino acid metabolism in cancer*. Br J Cancer, 2020. **122**(2): p. 150-156.
100. Li, N., K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, J.P. Robinson, *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8516-25.
101. Fato, R., C. Bergamini, M. Bortolus, A.L. Maniero, S. Leoni, T. Ohnishi, G. Lenaz, *Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 384-92.
102. Brinkley, B.R., S.S. Barham, S.C. Barranco, G.M. Fuller, *Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells*. Exp Cell Res, 1974. **85**(1): p. 41-6.
103. Armstrong, J.S., B. Hornung, P. Lecane, D.P. Jones, S.J. Knox, *Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(5): p. 973-8.
104. Tada-Oikawa, S., Y. Hiraku, M. Kawanishi, S. Kawanishi, *Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis*. Life Sci, 2003. **73**(25): p. 3277-88.
105. Chung, W.G., C.L. Miranda, C.S. Maier, *Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Brain Res, 2007. **1176**: p. 133-42.
106. Deng, Y.T., H.C. Huang, J.K. Lin, *Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling*. Mol Carcinog, 2010. **49**(2): p. 141-51.
107. Shi, Y.L., S. Feng, W. Chen, Z.C. Hua, J.J. Bian, W. Yin, *Mitochondrial inhibitor sensitizes non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by reactive oxygen species and Bcl-X(L)/p53-mediated amplification mechanisms*. Cell Death Dis, 2014. **5**(12): p. e1579.
108. Abdo, K.M., S.L. Eustis, J. Haseman, J.E. Huff, A. Peters, R. Persing, *Toxicity and carcinogenicity of rotenone given in the feed to F344/N rats and B6C3F1 mice for up to two years*. Drug Chem Toxicol, 1988. **11**(3): p. 225-35.
109. Cunningham, M.L., M.S. Soliman, M.Z. Badr, H.B. Matthews, *Rotenone, an anticarcinogen, inhibits cellular proliferation but not peroxisome proliferation in mouse liver*. Cancer Lett, 1995. **95**(1-2): p. 93-7.
110. Isenberg, J.S., K.L. Kolaja, S.A. Ayoubi, J.B. Watkins, 3rd, J.E. Klaunig, *Inhibition of WY-14,643 induced hepatic lesion growth in mice by rotenone*. Carcinogenesis, 1997. **18**(8): p. 1511-9.
111. Yoshitani, S.I., T. Tanaka, H. Kohno, S. Takashima, *Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone*. Int J Oncol, 2001. **19**(5): p. 929-39.

112. Tanaka, T., H. Kohno, K. Sakata, Y. Yamada, Y. Hirose, S. Sugie, H. Mori, *Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(8): p. 1361-7.
113. Higgins, D.S., Jr., J.T. Greenamyre, *[3H]dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study*. *J Neurosci*, 1996. **16**(12): p. 3807-16.
114. Lawana, V., J. Cannon, *Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease*. 2020.
115. Heinz, S., A. Freyberger, B. Lawrenz, L. Schladt, G. Schmuck, H. Ellinger-Ziegelbauer, *Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 45465.
116. Zhang, W., Y. Sha, K. Wei, C. Wu, D. Ding, Y. Yang, C. Zhu, Y. Zhang, G. Ding, A. Zhang, Z. Jia, S. Huang, *Rotenone ameliorates chronic renal injury caused by acute ischemia/reperfusion*. *Oncotarget*, 2018. **9**(36): p. 24199-24208.
117. Appelqvist, H., P. Wäster, K. Kågedal, K. Öllinger, *The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target*. *J Mol Cell Biol*, 2013. **5**(4): p. 214-26.
118. Fennelly, C., R.K. Amaravadi, *Lysosomal Biology in Cancer*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1594**: p. 293-308.
119. Cooper, G.M., *The cell : a molecular approach*. 2nd ed. 2000, Washington, D.C.; Sunderland, Mass.: ASM Press ; Sinauer Associates.
120. Serrano-Puebla, A., P. Boya, *Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells*. *Biochem Soc Trans*, 2018. **46**(2): p. 207-215.
121. Nakanishi-Matsui, M., M. Futai, *Stochastic proton pumping ATPases: from single molecules to diverse physiological roles*. *IUBMB Life*, 2006. **58**(5-6): p. 318-22.
122. Halaby, R., *Role of lysosomes in cancer therapy*. *Research and Reports in Biology*, 2015. **2015**: p. 6-147.
123. Todkar, K., H.S. Ilamathi, M. Germain, *Mitochondria and Lysosomes: Discovering Bonds*. *Front Cell Dev Biol*, 2017. **5**: p. 106.
124. Zhitomirsky, B., Y.G. Assaraf, *Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance*. *Oncotarget*, 2015. **6**(2): p. 1143-56.
125. Zhitomirsky, B., Y.G. Assaraf, *Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(28): p. 45117-45132.
126. Ono, K., S.O. Kim, J. Han, *Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(2): p. 665-76.

127. Repnik, U., M. Hafner Česen, B. Turk, *Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges*. Mitochondrion, 2014. **19 Pt A**: p. 49-57.
128. Mrschik, M., K.M. Ryan, *Lysosomal proteins in cell death and autophagy*. Febs j, 2015. **282**(10): p. 1858-70.
129. Kirkegaard, T., M. Jäättelä, *Lysosomal involvement in cell death and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(4): p. 746-54.
130. Aits, S., M. Jäättelä, *Lysosomal cell death at a glance*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 9): p. 1905-12.
131. Gómez-Sintes, R., M.D. Ledesma, P. Boya, *Lysosomal cell death mechanisms in aging*. Ageing Res Rev, 2016. **32**: p. 150-168.
132. Dong, B.W., G.M. Qin, Y. Luo, J.S. Mao, *Metabolic enzymes: key modulators of functionality in cancer stem-like cells*. Oncotarget, 2017. **8**(8): p. 14251-14267.
133. Droga-Mazovec, G., L. Bojic, A. Petelin, S. Ivanova, R. Romih, U. Repnik, G.S. Salvesen, V. Stoka, V. Turk, B. Turk, *Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 19140-50.
134. Bidère, N., H.K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont, A. Senik, *Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31401-11.
135. Conus, S., C. Pop, S.J. Snipas, G.S. Salvesen, H.U. Simon, *Cathepsin D primes caspase-8 activation by multiple intra-chain proteolysis*. J Biol Chem, 2012. **287**(25): p. 21142-51.
136. Taniguchi, M., H. Ogiso, T. Takeuchi, K. Kitatani, H. Umehara, T. Okazaki, *Lysosomal ceramide generated by acid sphingomyelinase triggers cytosolic cathepsin B-mediated degradation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in natural killer/T lymphoma cell apoptosis*. Cell Death Dis, 2015. **6**(4): p. e1717.
137. Boulares, A.H., A.G. Yakovlev, V. Ivanova, B.A. Stoica, G. Wang, S. Iyer, M. Smulson, *Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22932-40.
138. Wang, L., L. Liu, Y. Shi, H. Cao, R. Chaturvedi, M.W. Calcutt, T. Hu, X. Ren, K.T. Wilson, D.B. Polk, F. Yan, *Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36418.
139. Domagala, A., K. Fidyt, M. Bobrowicz, J. Stachura, K. Szczygiel, M. Firczuk, *Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death: A Promising Anticancer Strategy*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).

140. Terman, A., T. Kurz, *Lysosomal iron, iron chelation, and cell death*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(8): p. 888-98.
141. Wang, F., R. Gómez-Sintes, P. Boya, *Lysosomal membrane permeabilization and cell death*. *Traffic*, 2018. **19**(12): p. 918-931.
142. Firestone, R.A., J.M. Pisano, R.J. Bonney, *Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents*. *J Med Chem*, 1979. **22**(9): p. 1130-3.
143. Firestone, R.A., J.M. Pisano, P.J. Bailey, A. Sturm, R.J. Bonney, P. Wightman, R. Devlin, C.S. Lin, D.L. Keller, P.C. Tway, *Lysosomotropic agents. 4. Carbobenzoyglycylphenylalanyl, a new protease-sensitive masking group for introduction into cells*. *J Med Chem*, 1982. **25**(5): p. 539-44.
144. Miller, D.K., E. Griffiths, J. Lenard, R.A. Firestone, *Cell killing by lysosomotropic detergents*. *J Cell Biol*, 1983. **97**(6): p. 1841-51.
145. Wilson, P.D., R.A. Firestone, J. Lenard, *The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole*. *Journal of Cell Biology*, 1987. **104**(5): p. 1223-1229.
146. Wilson, P.D., D. Hreniuk, J. Lenard, *Reduced cytotoxicity of the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole after differentiation of HL60 promyelocytes*. *Cancer research*, 1989. **49**(3): p. 507-510.
147. Boyer, M.J., I. Horn, R.A. Firestone, D. Steele-Norwood, I.F. Tannock, *pH dependent cytotoxicity of N-dodecylimidazole: a compound that acquires detergent properties under acidic conditions*. *Br J Cancer*, 1993. **67**(1): p. 81-87.
148. Boya, P., G. Kroemer, *Lysosomal membrane permeabilization in cell death*. *Oncogene*, 2008. **27**(50): p. 6434-51.
149. Yang, J., R. Zhou, Z. Ma, *Autophagy and Energy Metabolism*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1206**: p. 329-357.
150. Santana-Codina, N., J.D. Mancias, A.C. Kimmelman, *The Role of Autophagy in Cancer*. *Annual review of cancer biology*, 2017. **1**: p. 19-39.
151. Lawrence, R.E., R. Zoncu, *The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(2): p. 133-142.
152. Zhang, Z., G. Chen, W. Zhou, A. Song, T. Xu, Q. Luo, W. Wang, X.S. Gu, S. Duan, *Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(8): p. 945-53.
153. Nakashima, S., Y. Hiraku, S. Tada-Oikawa, T. Hishita, E.C. Gabazza, S. Tamaki, I. Imoto, Y. Adachi, S. Kawanishi, *Vacuolar H⁺-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1*. *J Biochem*, 2003. **134**(3): p. 359-64.

154. Cui, L., L.P. Zhao, J.Y. Ye, L. Yang, Y. Huang, X.P. Jiang, Q. Zhang, J.Z. Jia, D.X. Zhang, Y. Huang, *The Lysosomal Membrane Protein Lamp2 Alleviates Lysosomal Cell Death by Promoting Autophagic Flux in Ischemic Cardiomyocytes*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 31.
155. Bayat Mokhtari, R., T.S. Homayouni, N. Baluch, E. Morgatskaya, S. Kumar, B. Das, H. Yeger, *Combination therapy in combating cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(23): p. 38022-38043.
156. Martin, M.J., C. Eberlein, M. Taylor, S. Ashton, D. Robinson, D. Cross, *Inhibition of oxidative phosphorylation suppresses the development of osimertinib resistance in a preclinical model of EGFR-driven lung adenocarcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(52): p. 86313-86325.
157. Fath, M.A., A.R. Diers, N. Aykin-Burns, A.L. Simons, L. Hua, D.R. Spitz, *Mitochondrial electron transport chain blockers enhance 2-deoxy-D-glucose induced oxidative stress and cell killing in human colon carcinoma cells*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(13): p. 1228-36.
158. Liu, H., Y.P. Hu, N. Savaraj, W. Priebe, T.J. Lampidis, *Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors*. *Biochemistry*, 2001. **40**(18): p. 5542-7.
159. Dier, U., D.H. Shin, L.P. Hemachandra, L.M. Uusitalo, N. Hempel, *Bioenergetic analysis of ovarian cancer cell lines: profiling of histological subtypes and identification of a mitochondria-defective cell line*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e98479.
160. Drewinko, B., T.L. Loo, B. Brown, J.A. Gottlieb, E.J. Freireich, *Combination chemotherapy in vitro with adriamycin. Observations of additive, antagonistic, and synergistic effects when used in two-drug combinations on cultured human lymphoma cells*. *Cancer Biochem Biophys*, 1976. **1**(4): p. 187-95.
161. Crowley, L.C., B.J. Marfell, A.P. Scott, N.J. Waterhouse *Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2016. **2016**, DOI: 10.1101/pdb.prot087288.
162. Kaludjerovic, G.N., D. Miljkovic, M. Momcilovic, V.M. Djinovic, M. Mostarica Stojkovic, T.J. Sabo, V. Trajkovic, *Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(3): p. 479-86.
163. Desai, S.N., F.F. Farris, S.D. Ray, *Lipid Peroxidation*, in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, P. Wexler, Editor. 2014, Academic Press: Oxford. p. 89-93.
164. Ohba, Y., T. Ohba, K. Sumitani, K. Tagami-Kondoh, K. Hiura, Y. Miki, H. Kakegawa, T. Takano-Yamamoto, N. Katunuma, *Inhibitory mechanisms of H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 and carbonic anhydrase II inhibitor acetazolamide on experimental bone resorption*. *FEBS letters*, 1996. **387**(2-3): p. 175-178.
165. Krogstad, D.J., I.Y. Gluzman, B.L. Herwaldt, P.H. Schlesinger, T.E. Wellems, *Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol*, 1992. **43**(1): p. 57-62.

166. Stamenkovic, M., K. Janjetovic, V. Paunovic, D. Ciric, T. Kravic-Stevovic, V. Trajkovic, *Comparative analysis of cell death mechanisms induced by lysosomal autophagy inhibitors*. European journal of pharmacology, 2019. **859**: p. 172540.
167. Gundersen, H.J., E.B. Jensen, K. Kiêu, J. Nielsen, *The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered*. J Microsc, 1999. **193**(Pt 3): p. 199-211.
168. Chan, F.K., K. Moriwaki, M.J. De Rosa, *Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity*. Methods Mol Biol, 2013. **979**: p. 65-70.
169. Silva, M.T., *Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program*. FEBS Lett, 2010. **584**(22): p. 4491-9.
170. Taatjes, D.J., B.E. Sobel, R.C. Budd, *Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(1): p. 33-43.
171. Krampe, B., M. Al-Rubeai, *Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies*. Cytotechnology, 2010. **62**(3): p. 175-88.
172. Cossarizza, A., H.-D. Chang, A. Radbruch, A. Acs, D. Adam, S. Adam-Klages, W.W. Agace, N. Aghaepour, M. Akdis, M. Allez, L.N. Almeida, G. Alvisi, G. Anderson, I. Andrä, F. Annunziato, A. Anselmo, P. Bacher, C.T. Baldari, S. Bari, V. Barnaba, J. Barros-Martins, L. Battistini, W. Bauer, S. Baumgart, N. Baumgarth, D. Baumjohann, B. Baying, M. Bebawy, B. Becher, W. Beisker, V. Benes, R. Beyaert, A. Blanco, D.A. Boardman, C. Bogdan, J.G. Borger, G. Borsellino, P.E. Boulais, J.A. Bradford, D. Brenner, R.R. Brinkman, A.E.S. Brooks, D.H. Busch, M. Büscher, T.P. Bushnell, F. Calzetti, G. Cameron, I. Cammarata, X. Cao, S.L. Cardell, S. Casola, M.A. Cassatella, A. Cavani, A. Celada, L. Chatenoud, P.K. Chattopadhyay, S. Chow, E. Christakou, L. Čičin-Šain, M. Clerici, F.S. Colombo, L. Cook, A. Cooke, A.M. Cooper, A.J. Corbett, A. Cosma, L. Cosmi, P.G. Coulie, A. Cumano, L. Cvetkovic, V.D. Dang, C. Dang-Heine, M.S. Davey, D. Davies, S. De Biasi, G. Del Zotto, G.V. Dela Cruz, M. Delacher, S. Della Bella, P. Dellabona, G. Deniz, M. Dessing, J.P. Di Santo, A. Diefenbach, F. Dieli, A. Dolf, T. Dörner, R.J. Dress, D. Dudziak, M. Dustin, C.-A. Dutertre, F. Ebner, S.B.G. Eckle, M. Edinger, P. Eede, G.R.A. Ehrhardt, M. Eich, P. Engel, B. Engelhardt, A. Erdei, C. Esser, B. Everts, M. Evrard, C.S. Falk, T.A. Fehniger, M. Felipe-Benavent, H. Ferry, M. Feuerer, A. Filby, K. Filkor, S. Fillatreau, M. Follo, I. Förster, J. Foster, G.A. Foulds, B. Frehse, P.S. Frenette, S. Frischbutter, W. Fritzsche, D.W. Galbraith, A. Gangaev, N. Garbi, B. Gaudilliere, R.T. Gazzinelli, J. Geginat, W. Gerner, N.A. Gherardin, K. Ghoreschi, L. Gibellini, F. Ginhoux, K. Goda, D.I. Godfrey, C. Goettlinger, J.M. González-Navajas, C.S. Goodyear, A. Gori, J.L. Grogan, D. Grummitt, A. Grützkau, C. Haftmann, J. Hahn, H. Hammad, G. Hämmerling, L. Hansmann, G. Hansson, C.M. Harpur, S. Hartmann, A. Hauser, A.E. Hauser, D.L. Haviland, D. Hedley, D.C. Hernández, G. Herrera, M. Herrmann, C. Hess, T. Höfer, P. Hoffmann, K. Hogquist, T. Holland, T. Höllt, R. Holmdahl, P. Hombrink, J.P. Houston, B.F. Hoyer, B. Huang, F.-P. Huang, J.E. Huber, J. Huehn, M. Hundemer, C.A. Hunter, W.Y.K. Hwang, A. Iannone, F. Ingelfinger, S.M. Ivison, H.-M. Jäck, P.K. Jani, B. Jávega, S. Jonjic, T. Kaiser, T. Kalina, T. Kamradt, S.H.E. Kaufmann, B. Keller, S.L.C. Ketelaars, A. Khalilnezhad, S. Khan, J. Kisielow, P. Klenerman, J. Knopf, H.-F. Koay, K. Kobow, J.K. Kolls, W.T. Kong, M. Kopf, T. Korn, K. Kriegsmann, H. Kristyanto, T. Kroneis, A. Krueger, J. Kühne, C. Kukat, D. Kunkel, H. Kunze-Schumacher, T. Kurosaki, C. Kurts, P. Kvistborg, I. Kwok, J. Landry, O. Lantz, P. Lanuti, F. LaRosa, A. Lehuen, S.

LeibundGut-Landmann, M.D. Leipold, L.Y.T. Leung, M.K. Levings, A.C. Lino, F. Liotta, V. Litwin, Y. Liu, H.-G. Ljunggren, M. Lohoff, G. Lombardi, L. Lopez, M. López-Botet, A.E. Lovett-Racke, E. Lubberts, H. Luche, B. Ludewig, E. Lugli, S. Lunemann, H.T. Maecker, L. Maggi, O. Maguire, F. Mair, K.H. Mair, A. Mantovani, R.A. Manz, A.J. Marshall, A. Martínez-Romero, G. Martrus, I. Marventano, W. Maslinski, G. Matarese, A.V. Mattioli, C. Maueröder, A. Mazzoni, J. McCluskey, M. McGrath, H.M. McGuire, I.B. McInnes, H.E. Mei, F. Melchers, S. Melzer, D. Mielenz, S.D. Miller, K.H.G. Mills, H. Minderman, J. Mjösberg, J. Moore, B. Moran, L. Moretta, T.R. Mosmann, S. Müller, G. Multhoff, L.E. Muñoz, C. Münz, T. Nakayama, M. Nasi, K. Neumann, L.G. Ng, A. Niedobitek, S. Nourshargh, G. Núñez, J.-E. O'Connor, A. Ochel, A. Oja, D. Ordonez, A. Orfao, E. Orłowski-Oliver, W. Ouyang, A. Oxenius, R. Palankar, I. Panse, K. Pattanapanyasat, M. Paulsen, D. Pavlinic, L. Penter, P. Peterson, C. Peth, J. Petriz, F. Piancone, W.F. Pickl, S. Piconese, M. Pinti, A.G. Pockley, M.J. Podolska, Z. Poon, K. Pracht, I. Prinz, C.E.M. Pucillo, S.A. Quataert, L. Quatrini, K.M. Quinn, H. Radbruch, T.R.D.J. Radstake, S. Rahmig, H.-P. Rahn, B. Rajwa, G. Ravichandran, Y. Raz, J.A. Rebhahn, D. Recktenwald, D. Reimer, C. Reis e Sousa, E.B.M. Remmerswaal, L. Richter, L.G. Rico, A. Riddell, A.M. Rieger, J.P. Robinson, C. Romagnani, A. Rubartelli, J. Ruland, A. Saalmüller, Y. Saeys, T. Saito, S. Sakaguchi, F. Sala-de-Oyanguren, Y. Samstag, S. Sanderson, I. Sandrock, A. Santoni, R.B. Sanz, M. Saresella, C. Sautes-Fridman, B. Sawitzki, L. Schadt, A. Scheffold, H.U. Scherer, M. Schiemann, F.A. Schildberg, E. Schimisky, A. Schlitzer, J. Schlosser, S. Schmid, S. Schmitt, K. Schober, D. Schraivogel, W. Schuh, T. Schüler, R. Schulte, A.R. Schulz, S.R. Schulz, C. Scottá, D. Scott-Algara, D.P. Sester, T.V. Shankey, B. Silva-Santos, A.K. Simon, K.M. Sitnik, S. Sozzani, D.E. Speiser, J. Spidlen, A. Stahlberg, A.M. Stall, N. Stanley, R. Stark, C. Stehle, T. Steinmetz, H. Stockinger, Y. Takahama, K. Takeda, L. Tan, A. Tárnok, G. Tiegs, G. Toldi, J. Tornack, E. Traggiai, M. Trebak, T.I.M. Tree, J. Trotter, J. Trowsdale, M. Tsoumakidou, H. Ulrich, S. Urbanczyk, W. van de Veen, M. van den Broek, E. van der Pol, S. Van Gassen, G. Van Isterdael, R.A.W. van Lier, M. Veldhoen, S. Vento-Asturias, P. Vieira, D. Voehringer, H.-D. Volk, A. von Borstel, K. von Volkman, A. Waisman, R.V. Walker, P.K. Wallace, S.A. Wang, X.M. Wang, M.D. Ward, K.A. Ward-Hartstonge, K. Warnatz, G. Warnes, S. Warth, C. Waskow, J.V. Watson, C. Watzl, L. Wegener, T. Weisenburger, A. Wiedemann, J. Wienands, A. Wilharm, R.J. Wilkinson, G. Willmsky, J.B. Wing, R. Winkelmann, T.H. Winkler, O.F. Wirz, A. Wong, P. Wurst, J.H.M. Yang, J. Yang, M. Yazdanbakhsh, L. Yu, A. Yue, H. Zhang, Y. Zhao, S.M. Ziegler, C. Zielinski, J. Zimmermann, A. Zychlinsky, *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition)*. European Journal of Immunology, 2019. **49**(10): p. 1457-1973.

173. Li, P., L. Zhou, T. Zhao, X. Liu, P. Zhang, Y. Liu, X. Zheng, Q. Li, *Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application*. Oncotarget, 2017. **8**(14): p. 23996-24008.
174. Chaitanya, G.V., J.S. Alexander, P.P. Babu, *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell Communication and Signaling, 2010. **8**(1): p. 31.
175. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7265-7279.
176. Xu, Y., H.B. Ma, Y.L. Fang, Z.R. Zhang, J. Shao, M. Hong, C.J. Huang, J. Liu, R.Q. Chen, *Cisplatin-induced necroptosis in TNF α dependent and independent pathways*. Cell Signal, 2017. **31**: p. 112-123.

177. Zong, W.X., C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
178. McCommis, K.S., C.P. Baines, *The role of VDAC in cell death: Friend or foe?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2012. **1818**(6): p. 1444-1450.
179. Ahmad, T., K. Aggarwal, B. Pattnaik, S. Mukherjee, T. Sethi, B.K. Tiwari, M. Kumar, A. Micheal, U. Mabalirajan, B. Ghosh, S. Sinha Roy, A. Agrawal, *Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state*. Cell Death Dis, 2013. **4**(1): p. e461.
180. Def Webster, H., A. Ames, *REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE CHANGES IN THE FINE STRUCTURE OF NERVOUS TISSUE DURING OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION*. J Cell Biol, 1965. **26**(3): p. 885-909.
181. Hirose, K., D.L. Longo, J.J. Oppenheim, K. Matsushima, *Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation*. Faseb j, 1993. **7**(2): p. 361-8.
182. Wong, G.H., J.H. Elwell, L.W. Oberley, D.V. Goeddel, *Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor*. Cell, 1989. **58**(5): p. 923-31.
183. Li, J.J., L.W. Oberley, *Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia*. Cancer Res, 1997. **57**(10): p. 1991-8.
184. Chow, C.K., *Vitamin E regulation of mitochondrial superoxide generation*. Biol Signals Recept, 2001. **10**(1-2): p. 112-24.
185. Pasdois, P., J.E. Parker, E.J. Griffiths, A.P. Halestrap, *The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia*. Biochem J, 2011. **436**(2): p. 493-505.
186. Jiang, X., X. Wang, *Cytochrome C-mediated apoptosis*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 87-106.
187. Han, D., F. Antunes, R. Canali, D. Rettori, E. Cadenas, *Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5557-63.
188. Pastorino, J.G., N. Shulga, J.B. Hoek, *Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7610-8.
189. Shoshan-Barmatz, V., D. Ben-Hail, L. Admoni, Y. Krelin, S.S. Tripathi, *The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2547-75.

190. Dubey, A.K., A. Godbole, M.K. Mathew, *Regulation of VDAC trafficking modulates cell death*. Cell Death Discov, 2016. **2**: p. 16085.
191. Murphy, M.P., M.J. Krueger, S.O. Sablin, R.R. Ramsay, T.P. Singer, *Inhibition of complex I by hydrophobic analogues of N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and the use of an ion-selective electrode to measure their accumulation by mitochondria and electron-transport particles*. Biochem J, 1995. **306 (Pt 2)**(Pt 2): p. 359-65.
192. Heytler, P.G., *uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts*. Biochemistry, 1963. **2**: p. 357-61.
193. Yoshii, S.R., N. Mizushima, *Monitoring and Measuring Autophagy*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
194. Hardie, D.G., F.A. Ross, S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
195. Saxton, R.A., D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
196. Son, S.M., S.J. Park, H. Lee, F. Siddiqi, J.E. Lee, F.M. Menzies, D.C. Rubinsztein, *Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A*. Cell Metab, 2019. **29**(1): p. 192-201.e7.
197. Chang, L., M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
198. Lee, S., J. Rauch, W. Kolch, *Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).
199. Los, M., M. Mozoluk, D. Ferrari, A. Stepczynska, C. Stroh, A. Renz, Z. Herceg, Z.Q. Wang, K. Schulze-Osthoff, *Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 978-88.
200. Fuchs, Y., H. Steller, *Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(6): p. 329-44.
201. Yang, W.S., B.R. Stockwell, *Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(3): p. 165-176.
202. Lei, P., T. Bai, Y. Sun, *Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 139.
203. Codenotti, S., M. Poli, M. Asperti, D. Zizioli, F. Marampon, A. Fanzani, *Cell growth potential drives ferroptosis susceptibility in rhabdomyosarcoma and myoblast cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol, 2018. **144**(9): p. 1717-1730.

204. Yonekawa, T., A. Thorburn, *Autophagy and cell death*. Essays Biochem, 2013. **55**: p. 105-17.
205. Rubinsztein, D.C., A.M. Cuervo, B. Ravikumar, S. Sarkar, V. Korolchuk, S. Kaushik, D.J. Klionsky, *In search of an "autophagometer"*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 585-9.
206. Orrenius, S., V. Gogvadze, B. Zhivotovsky, *Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 143-83.
207. Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, *Mitochondria, oxidative stress and cell death*. Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 913-22.
208. Traber, M.G., J. Atkinson, *Vitamin E, antioxidant and nothing more*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(1): p. 4-15.
209. Hackenbrock, C.R., *Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria*. J Cell Biol, 1966. **30**(2): p. 269-97.
210. Seitz, C., M. Hugle, S. Cristofanon, A. Tchoghandjian, S. Fulda, *The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and chloroquine synergize to trigger apoptosis via mitochondrial-lysosomal cross-talk*. Int J Cancer, 2013. **132**(11): p. 2682-93.
211. Boya, P., R.A. Gonzalez-Polo, D. Poncet, K. Andreau, H.L. Vieira, T. Roumier, J.L. Perfettini, G. Kroemer, *Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine*. Oncogene, 2003. **22**(25): p. 3927-36.
212. Boya, P., K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzami, J.L. Perfettini, D. Metivier, D.M. Ojcius, M. Jäättelä, G. Kroemer, *Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion*. J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1323-34.
213. Denamur, S., D. Tyteca, J. Marchand-Brynaert, F. Van Bambeke, P.M. Tulkens, P.J. Courtoy, M.P. Mingeot-Leclercq, *Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(9): p. 1656-65.
214. Repnik, U., B. Turk, *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*. Mitochondrion, 2010. **10**(6): p. 662-9.
215. Dehay, B., A. Ramirez, M. Martinez-Vicente, C. Perier, M.H. Cannon, E. Doudnikoff, A. Vital, M. Vila, C. Klein, E. Bezdard, *Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9611-6.
216. Mueller, W.M., F.M. Gregoire, K.L. Stanhope, C.V. Mobbs, T.M. Mizuno, C.H. Warden, J.S. Stern, P.J. Havel, *Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes*. Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 551-8.

217. Malhotra, R., F.C. Brosius, 3rd, *Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12567-75.
218. Cannino, G., F. Ciscato, I. Masgras, C. Sánchez-Martín, A. Rasola, *Metabolic Plasticity of Tumor Cell Mitochondria*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 333.
219. Duan, W., M.P. Mattson, *Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease*. J Neurosci Res, 1999. **57**(2): p. 195-206.
220. Deberardinis, R.J., N. Sayed, D. Ditsworth, C.B. Thompson, *Brick by brick: metabolism and tumor cell growth*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 54-61.
221. Bump, E.A., S.K. Calderwood, J.M. Sawyer, J.M. Brown, *Role of the adenylate energy charge in the response of Chinese hamster ovary cells to radiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1984. **10**(8): p. 1411-4.
222. Jirsch, J.D., D.W. Loe, S.P. Cole, R.G. Deeley, D. Fedida, *ATP is not required for anion current activated by cell swelling in multidrug-resistant lung cancer cells*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. C688-99.
223. Richards, J.M., I.F. Gibson, W. Martin, *Effects of hypoxia and metabolic inhibitors on production of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor by pig aortic endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1991. **102**(1): p. 203-9.
224. Silver, I.A., J. Deas, M. Erecinska, *Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells*. Neuroscience, 1997. **78**(2): p. 589-601.
225. Abe, Y., T. Sakairi, H. Kajiyama, S. Shrivastav, C. Beeson, J.B. Kopp, *Bioenergetic characterization of mouse podocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(2): p. C464-76.
226. Gray, L.R., S.C. Tompkins, E.B. Taylor, *Regulation of pyruvate metabolism and human disease*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(14): p. 2577-604.
227. Kladna, A., M. Marchlewicz, T. Piechowska, I. Kruk, H.Y. Aboul-Enein, *Reactivity of pyruvic acid and its derivatives towards reactive oxygen species*. Luminescence, 2015. **30**(7): p. 1153-8.
228. Wood, D.M., H. Alshahaf, P. Streete, P.I. Dargan, A.L. Jones, *Fatality after deliberate ingestion of the pesticide rotenone: a case report*. Crit Care, 2005. **9**(3): p. R280-4.
229. Singer, T.P., R.R. Ramsay, K. McKeown, A. Trevor, N.E. Castagnoli, Jr., *Mechanism of the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), the toxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)*. Toxicology, 1988. **49**(1): p. 17-23.
230. Sato, S., N. Hattori, *Genetic mutations and mitochondrial toxins shed new light on the pathogenesis of Parkinson's disease*. Parkinsons Dis, 2011. **2011**: p. 979231.

231. Dickens, F., *Interaction of halogenacetates and SH compounds: The reaction of halogenacetic acids with glutathione and cysteine. The mechanism of iodoacetate poisoning of glyoxalase.* Biochem J, 1933. **27**(4): p. 1141-51.
232. Dagda, R.K., T. Das Banerjee, E. Janda, *How Parkinsonian toxins dysregulate the autophagy machinery.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(11): p. 22163-89.
233. Kritharis, A., T.P. Bradley, D.R. Budman, *The evolving use of arsenic in pharmacotherapy of malignant disease.* Ann Hematol, 2013. **92**(6): p. 719-30.
234. Kovacevic, Z., D. Jerance, O. Brkljac, *The role of glutamine oxidation and the purine nucleotide cycle for adaptation of tumour energetics to the transition from the anaerobic to the aerobic state.* Biochem J, 1988. **252**(2): p. 381-6.
235. Jeon, S.M., N. Hay, *The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications.* Arch Pharm Res, 2015. **38**(3): p. 346-57.
236. Chaube, B., P. Malvi, S.V. Singh, N. Mohammad, B. Viollet, M.K. Bhat, *AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis.* Cell Death Discov, 2015. **1**: p. 15063.
237. Jeon, S.M., N.S. Chandel, N. Hay, *AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress.* Nature, 2012. **485**(7400): p. 661-5.
238. Hung, C.M., L. Garcia-Haro, C.A. Sparks, D.A. Guertin, *mTOR-dependent cell survival mechanisms.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
239. Loos, B., A.M. Engelbrecht, R.A. Lockshin, D.J. Klionsky, Z. Zakeri, *The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions.* Autophagy, 2013. **9**(9): p. 1270-85.
240. Ben Sahra, I., J.F. Tanti, F. Bost, *The combination of metformin and 2 deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells.* Autophagy, 2010. **6**(5): p. 670-671.
241. Xi, H., J.C. Barredo, J.R. Merchan, T.J. Lampidis, *Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK β leading to autophagy.* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(10): p. 1463-77.
242. Trivedi, P.C., J.J. Bartlett, T. Pulinilkunnil, *Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin.* Cells, 2020. **9**(5).
243. Choi, Y., J.H. Lee, *The combination of tephrosin with 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxicity via accelerating ATP depletion and blunting autophagy in human cancer cells.* Cancer Biol Ther, 2011. **12**(11): p. 989-96.
244. Jalota, A., M. Kumar, B.C. Das, A.K. Yadav, K. Chosdol, S. Sinha, *Synergistic increase in efficacy of a combination of 2-deoxy-D-glucose and cisplatin in normoxia and hypoxia: switch from autophagy to apoptosis.* Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 12347-12358.

245. Jeon, J.Y., S.W. Kim, K.C. Park, M. Yun, *The bifunctional autophagic flux by 2-deoxyglucose to control survival or growth of prostate cancer cells*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 623.
246. Wang, L., J. Wang, H. Xiong, F. Wu, T. Lan, Y. Zhang, X. Guo, H. Wang, M. Saleem, C. Jiang, J. Lu, Y. Deng, *Co-targeting hexokinase 2-mediated Warburg effect and ULK1-dependent autophagy suppresses tumor growth of PTEN- and TP53-deficiency-driven castration-resistant prostate cancer*. EBioMedicine, 2016. **7**: p. 50-61.
247. Dodson, M., Q. Liang, M.S. Johnson, M. Redmann, N. Fineberg, V.M. Darley-Usmar, J. Zhang, *Inhibition of glycolysis attenuates 4-hydroxynonenal-dependent autophagy and exacerbates apoptosis in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Autophagy, 2013. **9**(12): p. 1996-2008.
248. Peng, X., F. Gong, Y. Chen, Y. Jiang, J. Liu, M. Yu, S. Zhang, M. Wang, G. Xiao, H. Liao, *Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1-alpha-mediated signaling*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1367.
249. Giordano, S., M. Dodson, S. Ravi, M. Redmann, X. Ouyang, V.M. Darley Usmar, J. Zhang, *Bioenergetic adaptation in response to autophagy regulators during rotenone exposure*. J Neurochem, 2014. **131**(5): p. 625-33.
250. Xiong, N., J. Xiong, M. Jia, L. Liu, X. Zhang, Z. Chen, J. Huang, Z. Zhang, L. Hou, Z. Luo, D. Ghoorah, Z. Lin, T. Wang, *The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling*. Behav Brain Funct, 2013. **9**: p. 13.
251. Mader, B.J., V.N. Pivtoraiko, H.M. Flippo, B.J. Klocke, K.A. Roth, L.R. Mangieri, J.J. Shacka, *Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death*. ACS Chem Neurosci, 2012. **3**(12): p. 1063-72.
252. Yasuhara, N., Y. Eguchi, T. Tachibana, N. Imamoto, Y. Yoneda, Y. Tsujimoto, *Essential role of active nuclear transport in apoptosis*. Genes Cells, 1997. **2**(1): p. 55-64.
253. Leist, M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kühnle, P. Nicotera, *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-6.
254. Nicotera, P., G. Melino, *Regulation of the apoptosis-necrosis switch*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2757-65.
255. Formigli, L., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G.E. Orlandini, S. Capaccioli, S.Z. Orlandini, *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 41-9.
256. Moon, Y., K.H. Lee, J.H. Park, D. Geum, K. Kim, *Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10*. J Neurochem, 2005. **93**(5): p. 1199-208.

257. Fortalezas, S., D. Marques-da-Silva, C. Gutierrez-Merino, *Creatine Protects Against Cytosolic Calcium Dysregulation, Mitochondrial Depolarization and Increase of Reactive Oxygen Species Production in Rotenone-Induced Cell Death of Cerebellar Granule Neurons*. Neurotox Res, 2018. **34**(3): p. 717-732.
258. Lin, T.K., C.H. Cheng, S.D. Chen, C.W. Liou, C.R. Huang, Y.C. Chuang, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress promote apoptotic cell death in the striatum via cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following chronic rotenone intoxication in rats*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(7): p. 8722-39.
259. Fontaine, E., P. Bernardi, *Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(4): p. 335-45.
260. Giammarioli, A.M., L. Gambardella, C. Barbati, D. Pietraforte, A. Tinari, M. Alberton, L. Gnessi, R.J. Griffin, M. Minetti, W. Malorni, *Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response*. Int J Cancer, 2012. **131**(4): p. E337-47.
261. Wojtczak, L., V.V. Teplova, K. Bogucka, A. Czyz, A. Makowska, M.R. Wieckowski, J. Duszynski, Y.V. Evtodienko, *Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics. Further arguments for the role of Ca(2+) in the mechanism of the crabtree effect*. Eur J Biochem, 1999. **263**(2): p. 495-501.
262. Zorova, L.D., V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhaszova, S.J. Sollott, D.B. Zorov, *Mitochondrial membrane potential*. Anal Biochem, 2018. **552**: p. 50-59.
263. Marchi, S., C. Giorgi, J.M. Suski, C. Agnoletto, A. Bononi, M. Bonora, E. De Marchi, S. Missiroli, S. Patergnani, F. Poletti, A. Rimessi, J. Duszynski, M.R. Wieckowski, P. Pinton, *Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging*. J Signal Transduct, 2012. **2012**: p. 329635.
264. Chinopoulos, C., *Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast*. FEBS Lett, 2011. **585**(9): p. 1255-9.
265. Sesso, A., J.E. Belizario, M.M. Marques, M.L. Higuchi, R.I. Schumacher, A. Colquhoun, E. Ito, J. Kawakami, *Mitochondrial swelling and incipient outer membrane rupture in preapoptotic and apoptotic cells*. Anat Rec (Hoboken), 2012. **295**(10): p. 1647-59.
266. Fortney, S.R., W.S. Lynn, Jr., *Role of Ascorbate and Cysteine on Swelling and Lipid Peroxidation in Rat Liver Mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1964. **104**: p. 241-7.
267. Lehninger, A.L., *Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation*. Physiol Rev, 1962. **42**: p. 467-517.
268. Eliseev, R.A., K.K. Gunter, T.E. Gunter, *Bcl-2 sensitive mitochondrial potassium accumulation and swelling in apoptosis*. Mitochondrion, 2002. **1**(4): p. 361-70.

269. Halestrap, A.P., P.T. Quinlan, D.E. Whipps, A.E. Armston, *Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of calcium.* Biochem J, 1986. **236**(3): p. 779-87.
270. Liu, X., G. Hajnoczky, *Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress.* Cell Death Differ, 2011. **18**(10): p. 1561-72.
271. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
272. Ott, M., J.D. Robertson, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, *Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1259-63.
273. Madesh, M., G. Hajnoczky, *VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release.* J Cell Biol, 2001. **155**(6): p. 1003-15.
274. Pajak, B., E. Siwiak, M. Sołtyka, A. Priebe, R. Zieliński, I. Fokt, M. Ziemniak, A. Jaśkiewicz, R. Borowski, T. Domoradzki, W. Priebe, *2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents.* Int J Mol Sci, 2019. **21**(1).
275. Tournier, C., P. Hess, D.D. Yang, J. Xu, T.K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S.N. Jones, R.A. Flavell, R.J. Davis, *Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway.* Science, 2000. **288**(5467): p. 870-4.
276. Zhang, J., J. Wang, J.Y. Jiang, S.D. Liu, K. Fu, H.Y. Liu, *Tanshinone IIA induces cytochrome c-mediated caspase cascade apoptosis in A549 human lung cancer cells via the JNK pathway.* Int J Oncol, 2014. **45**(2): p. 683-90.
277. Zhang, L., D. Xing, M. Chen, *Bim(L) displacing Bcl-x(L) promotes Bax translocation during TNFalpha-induced apoptosis.* Apoptosis, 2008. **13**(7): p. 950-8.
278. Chen, S.H., J.K. Lin, S.H. Liu, Y.C. Liang, S.Y. Lin-Shiau, *Apoptosis of cultured astrocytes induced by the copper and neocuproine complex through oxidative stress and JNK activation.* Toxicol Sci, 2008. **102**(1): p. 138-49.
279. Gabai, V.L., A.B. Meriin, J.A. Yaglom, J.Y. Wei, D.D. Mosser, M.Y. Sherman, *Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 38088-94.
280. Shanware, N.P., K. Bray, C.H. Eng, F. Wang, M. Follettie, J. Myers, V.R. Fantin, R.T. Abraham, *Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 4900.
281. Wei, J., W. Wang, I. Chopra, H.F. Li, C.J. Dougherty, J. Adi, N. Adi, H. Wang, K.A. Webster, *c-Jun N-terminal kinase (JNK-1) confers protection against brief but not extended ischemia during acute myocardial infarction.* J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 13995-4006.

282. Heslop, K.A., A. Rovini, E.G. Hunt, D. Fang, M.E. Morris, C.F. Christie, M.B. Gooz, D.N. DeHart, Y. Dang, J.J. Lemasters, E.N. Maldonado, *JNK activation and translocation to mitochondria mediates mitochondrial dysfunction and cell death induced by VDAC opening and sorafenib in hepatocarcinoma cells*. *Biochem Pharmacol*, 2020. **171**: p. 113728.
283. Maldonado, E., D. DeHart, D. Fang, K. Heslop, M. Gooz, J. Lemasters, *Oxidative Stress and JNK Activation cause Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Hepatocarcinoma after VDAC-Tubulin Antagonists*. *Biophysical Journal*, 2016. **110**(3): p. 470a.
284. Chhabra, A., B. Mukherji, D. Batra, *Activation induced cell death (AICD) of human melanoma antigen-specific TCR engineered CD8 T cells involves JNK, Bim and p53*. *Expert Opin Ther Targets*, 2017. **21**(2): p. 117-129.
285. Kim, J.S., L. He, J.J. Lemasters, *Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **304**(3): p. 463-70.
286. Sato, T., T. Machida, S. Takahashi, K. Murase, Y. Kawano, T. Hayashi, S. Iyama, K. Takada, K. Kuribayashi, Y. Sato, M. Kobune, R. Takimoto, T. Matsunaga, J. Kato, Y. Niitsu, *Apoptosis supercedes necrosis in mitochondrial DNA-depleted Jurkat cells by cleavage of receptor-interacting protein and inhibition of lysosomal cathepsin*. *J Immunol*, 2008. **181**(1): p. 197-207.
287. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
288. Jelluma, N., X. Yang, D. Stokoe, G.I. Evan, T.B. Dansen, D.A. Haas-Kogan, *Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes*. *Mol Cancer Res*, 2006. **4**(5): p. 319-30.
289. Glunde, K., S.E. Guggino, M. Solaiyappan, A.P. Pathak, Y. Ichikawa, Z.M. Bhujwalla, *Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells*. *Neoplasia*, 2003. **5**(6): p. 533-45.
290. Palermo, C., J.A. Joyce, *Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer*. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(1): p. 22-8.
291. Solitro, A.R., J.P. MacKeigan, *Leaving the lysosome behind: novel developments in autophagy inhibition*. *Future Med Chem*, 2016. **8**(1): p. 73-86.
292. Mauthe, M., I. Orhon, C. Rocchi, X. Zhou, M. Luhr, K.J. Hijlkema, R.P. Coppes, N. Engedal, M. Mari, F. Reggiori, *Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion*. *Autophagy*, 2018. **14**(8): p. 1435-1455.
293. Harhaji-Trajkovic, L., K. Arsin, T. Kravic-Stevovic, S. Petricevic, G. Tovilovic, A. Pantovic, N. Zogovic, B. Ristic, K. Janjetovic, V. Bumbasirevic, V. Trajkovic, *Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation*. *Pharm Res*, 2012. **29**(8): p. 2249-63.
294. Gottlieb, E., S.M. Armour, M.H. Harris, C.B. Thompson, *Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(6): p. 709-17.

295. Lee, J., T. Repasy, K. Papavinasasundaram, C. Sassetti, H. Kornfeld, *Mycobacterium tuberculosis induces an atypical cell death mode to escape from infected macrophages*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18367.
296. Ghosh, M., F. Carlsson, A. Laskar, X.M. Yuan, W. Li, *Lysosomal membrane permeabilization causes oxidative stress and ferritin induction in macrophages*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 623-9.
297. Stoka, V., B. Turk, S.L. Schendel, T.H. Kim, T. Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J.C. Reed, X.M. Yin, V. Turk, G.S. Salvesen, *Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3149-57.
298. Terman, A., T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk, *Lysosomal labilization*. IUBMB Life, 2006. **58**(9): p. 531-9.
299. Parzych, K.R., D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-73.
300. Wang, K., D.J. Klionsky, *Mitochondria removal by autophagy*. Autophagy, 2011. **7**(3): p. 297-300.
301. Colell, A., J.E. Ricci, S. Tait, S. Milasta, U. Maurer, L. Bouchier-Hayes, P. Fitzgerald, A. Guio-Carrion, N.J. Waterhouse, C.W. Li, B. Mari, P. Barbry, D.D. Newmeyer, H.M. Beere, D.R. Green, *GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation*. Cell, 2007. **129**(5): p. 983-97.
302. Tait, S.W., M.J. Parsons, F. Llambi, L. Bouchier-Hayes, S. Connell, C. Munoz-Pinedo, D.R. Green, *Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria*. Dev Cell, 2010. **18**(5): p. 802-13.
303. DiPaola, R.S., D. Dvorzhinski, A. Thalasila, V. Garikapaty, D. Doram, M. May, K. Bray, R. Mathew, B. Beaudoin, C. Karp, M. Stein, D.J. Foran, E. White, *Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy*. Prostate, 2008. **68**(16): p. 1743-52.

8. SPISAK SKRAĆENICA

2DG - 2-dezoksi-D-glukoza (*engl.* 2-Deoxy-d-glucose)

4EBP1 - protein koji se vezuje za eukariotski translacioni faktor inicijacije 4E 1 (*engl.* eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)

7-AAD - 7-aminoaktinomycinom D (*engl.* 7-Amino-Actinomycin D)

AIF - indukujući faktor apoptoze (*engl.* apoptosis-inducing factor)

ADP - adenzin difosfat (*engl.* adenosine diphosphate)

AMP - adenzin monofosfat (*engl.* adenosine monophosphate)

AMPK - adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza

Ann V-FITC - aneksin V - fluorescein izotiocijanat (*engl.* annexin V-fluorescein isothiocyanate)

ANOVA - analiza varijanse (*engl.* analysis of variance)

ANT - adenin nukleotid translokaza (*engl.* adenine nucleotide translocator)

AO - akridinoranž (*engl.* acridine orange)

Apaf-1 - faktor-1 za aktivaciju apoptotskih peptidaza (*engl.* apoptotic peptidase activating factor 1)

ApoStat - fluorescein izotiocijanat (FITC)-konjugovani pankaspazni inhibitor (*engl.* fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated pan-caspase inhibitor)

APS - amonijum persulfat (*engl.* ammonium persulfate)

ATG - geni ili proteini povezani s autofagijom (*engl.* autophagy related)

ATP - adenzin trifosfat (*engl.* adenosine triphosphate)

B16 - ćelije mišjeg melanoma

BAF - bafilomicin A1 (*engl.* Bafilomycin A1)

Bcl-2 - B ćelijski limfom 2 (*engl.* B-cell lymphoma 2)

BPS - so batofenantrolindisulfonske kiseline (*engl.* bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt trihydrate)

BSA - albumin iz seruma govečeta (*engl.* bovine serum albumin)

BRAF - humani gen koji kodira protein B-Raf (*engl.* B-Raf proto-oncogene)

MEK - Mitogenom-aktivirana proteinska kinaza kinaza (*engl.* Mitogen-activated protein kinase kinase)

CAD - katjonski amfifilni lekovi (*engl.* cationic amphiphilic drugs)

CCCP - karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon (*engl.* carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)

CoQ - koenzim Q, ubikvinon (*engl.* Coenzyme Q)

CQ - hlorokin (*engl.* chloroquine)

DAMP - molekularni obrazci oštećenja (*engl.* damage-associated molecular patterns)

DFO - deferoksamin (*engl.* deferoxamine)

DHR - dihidrorodamin 123 (*engl.* dihydrorhodamine 123)

DIDS - 4, 4'-diizotiocijano-2, 2'-stilbenedisulfonska kiselina (*engl.* 4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid)

DMSO - dimetilsulfoksid (*engl.* dimethyl sulfoxide)

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)

DTT - ditiotreitol (*engl.* dithiothreitol)

E 64d - inhibitor cistein proteaze katepsin B (*engl.* (2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester)

EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid)

ERK - kinaza regulisana ekstraćelijskim signalima (*engl.* extracellular signal-regulated kinase)

FACS - sortiranje ćelija aktivirano fluorescencijom (*engl.* fluorescence-activated cell sorting)

Fas - membranski receptor smrti (*engl.* Fas Cell Surface Death Receptor)

FCS - goveđi fetalni serum (*engl.* fetal calf serum)

FAD - flavin adenin dinukleotid (*engl.* flavin adenine dinucleotide)

GTP - guanozin trifosfat (*engl.* guanosine-5'-triphosphate)

H₃PO₄ - fosforna kiselina (*engl.* phosphoric acid)

HBSS - *engl.* Hank's Balanced Salt Solution

HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (*engl.* 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HK - heksokinaza (HX, *engl.* hexokinase)

HSP70 - protein šaperon od 70 kDa (*engl.* Heat shock protein 70)

IA - jodoacetat (*engl.* Iodoacetate)

JC-1 - 5,5',6,6'-tetrahaloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol karbocijanin jodid (*engl.* 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide)

JNK - c-Jun N-terminalna kinaza (*engl.* c-Jun N-terminal kinase)

L929 - ćelije mišjeg fibrosarkoma

LAMP - membranski protein vezan za lizozom (*engl.* lysosomal-associated membrane protein)

LC3 - protein asociran sa mikrotubulama lakog lanca 3 (*engl.* microtubule-associated light chain 3)

LCD - lizozomalna ćelijska smrt (*engl.* lysosomal cell death)

LDH - laktat dehidrogenaza (*engl.* lactate dehydrogenase)

LMP - permeabilizacija membrane lizozoma (*engl.* lysosomal membrane permeabilization)

LT - lizotreker (*engl.* lysotracker)

MDA - malondialdehid (*engl.* malondialdehyde)

MLKL - protein sa domenom sličnim MLK (*engl.* mixed lineage kinase domain-like protein)

MMP - potencijal membrana mitohondrija (*engl.* mitochondrial membrane potential)

MOMP - promene u propustljivosti spoljašnje membrane mitohondrija (*engl.* mitochondrial outer membrane permeabilization)

MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridinium (*engl.* 1-methyl-4-phenylpyridinium)

MPTP - propustljivost tranzicione pore u mitohondrijama (*engl.* mitochondrial permeability transition pore)

MSC - primarne mišje mezenhimalne stem ćelije (*engl.* mesenchymal stem cell)

MT Red CMXRos - crveni mitotreker (*engl.* MitoTracker Chloromethyl-X-rosamine)

mTOR - mehanistička meta rapamicina (*engl.* mechanistic target of rapamycin)

mTORC1 - kompleks 1 mehanističke mete rapamicina (*engl.* mechanistic target of rapamycin complex 1)

MTT - 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolijum bromid (*engl.* 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NAD - nikotinamid adenin dinukleotid (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide)

NaF - natrijumfluorid (*engl.* sodium fluoride)

Na₃VO₄ - natrijum vanadat (*engl.* sodium orthovanadate)

NDI - N-dodecilimidazol, N-dodecil-1H-imidazol (*engl.* N-Dodecylimidazole, N-Dodecyl-1H-imidazole)

NH₄Cl - amonijum hlorid (*engl.* ammonium chloride)

PARP - poli (ADP-riboza) polimeraza (*engl.* Poly (ADP-ribose) polymerase)

PBS - puferizovan fiziološki rastvor (*engl.* phosphate buffered saline)

PI - propidijum jodid (*engl.* propidium iodide)

Pi - inorganski fosfor (*engl.* inorganic phosphate)

PI3K - fosfatidilinozitol 3-kinaza (*engl.* phosphatidylinositol 3-kinase)

PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid (*engl.* phenylmethylsulfonyl fluoride)

Q-VD-OPh - kvinolin-Val-Asp-difluorofenoksimetilketon (*engl.* Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketone)

Raptor - regulator mTOR kinaze (*engl.* regulatory-associated protein of mTOR)

RIPK - protein kinaza koja inteeaguje sa receptorom (*engl.* receptor interacting protein kinase)

RKV - reaktivne kiseonične vrste (*engl.* reactive oxygen species)

RNK - ribonukleinska kiselina (*engl.* ribonucleic acid)

ROT - rotenon (*engl.* rotenone)

RPMI 1640 - medijum za kultivaciju ćelija (*engl.* Roswell Park Memorial Institute 1640)

SDS - natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE - elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum dodecil sulfata (*engl.* sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)

SD - standardna devijacija

SV - srednja vrednost

siRNA - mala interferirajuća RNK (*engl.* small interfering RNA)

Smac/DIABLO - drugi aktivator kaspaza iz mitohondrija/ aktivator kaspaza koji se direktno vezuje za IAP i ima nisku izoelektičnu tačku (*engl.* Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low PI)

SQSTM1 - p62 (*engl.* p62/sequestosome1-SQSTM1)

TBA - tiobarbituratna kiselina (*engl.* thiobarbituric acid)

TBS-T - rastvor soli puferisan trisom sa tween deterdžentom (*engl.* tris-buffered saline with tween)

TCA ciklus - ciklus trikarboksilnih kiselina, Krebsov ciklus, ciklus limunske kiseline (*engl.* tricarboxylic acid cycle)

TCA kiselina - trihlorsirćetna kiselina (*engl.* trichloroacetic acid)

TEM - transmisiona elektronska mikroskopija (*engl.* transmission electron microscopy)

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (*engl.* N,N,N',N'-tetramethylethylene-1,2-diamine)

TFEB - transkripcioni faktor EB (*engl.* transcription factor EB)

TNF - faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor)

TNFR - receptor za faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor receptor)

TOM20 - subjedinice mitohondrijskog import receptora sa TOM20 homologijom (*engl.* Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog)

Tris - tris (hidroksimetil) aminometan (*engl.* tris (hydroxymethyl) aminomethane)

U251- ćelije glioma čoveka

VDAC - voltažno zavisani anjonski kanal (*engl.* Voltage-dependent anion channel)

XIAP - X-vezani protein inhibitor apoptoze (*engl.* X-linked inhibitor of apoptosis protein)

Z-IETD-FMK - benziloksikarbonil-izoleucil-glutamil-treonil-aspartanska kiselina fluorometil keton (*engl.* benzyloxycarbonyl-isoleucyl-glutamyl-threonyl-aspartic acid fluoromethyl ketone)

Z-LEHD-FMK - inhibitor kaspaze-9 Z-LEHD-fluorometilketon (*engl.* Z-LEHD-fluoromethylketone)

Z-VAD-FMK - karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilketon (*engl.* carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone)

BIOGRAFIJA

Milica Kosić je rođena 15.08.1984. u Beogradu.

Završila je osnovnu školu „Kralj Petar I“ u Beogradu i Prvu beogradsku gimnaziju. Diplomirala je 2013. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao redovan student studijske grupe Molekularna biologija i fiziologija, smer Primenjena biohemija, sa prosečnom ocenom 8,53.

Doktorske akademske studije upisala je školske 2014/15. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Imunobiologija.

Od aprila 2014. godine je zaposlena na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Naučno-istraživački rad Milice Kosić realizovan je višegodišnjim angažovanjem na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ (evidencioni broj 173053), čiji je rukovodilac naučni savetnik dr Ljubica Harhaji Trajković. Od januara 2021. godine angažovana je i na projektu Fonda za nauku, u okviru specijalnog programa istraživanja COVID-19 pod nazivom „Uloga autofagije u imunskoj disregulaciji prouzrokovanoj SARS-CoV-2 infekcijom“ (projekat TACTICIAN, evidencioni broj 7552006), čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu jula 2017. godine, Milica Kosić je stekla zvanje Istraživač saradnik u oblasti Molekularne medicine.

Koautor je 9 radova objavljenih u međunarodnim časopisima. Član je Srpskog društva za molekularnu biologiju (MolBioS), Društva za neuronauke Srbije (DNS), Federacije evropskih društava za neuronauke (*Federation of European Neuroscience Societies*, FENS), Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju (SDMSRF) i Evropskog društva za istraživanje slobodnih radikala (*Society for Free Radical Research Europe*, SFRR-E).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milica Kosić

broj indeksa B3026/2014

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i supresijom oksidativne fosforilacije

- 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, _____

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske
verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Milica Kosić

Broj indeksa B3026/2014

Studijski program Biologija, modul Imunobiologija

Naslov rada: **Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i supresijom oksidativne fosforilacije**

Mentori: Prof. dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ljubica Harhaji Trajković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Potpisani Milica Kosić

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, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i supresijom oksidativne fosforilacije

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).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

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.