

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

Ана Р. Деспотовић

**МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ЦИТОТОКСИЧНОГ
ДЕЈСТВА АСКОРБИНСКЕ КИСЕЛИНЕ И
МЕНАДИОНА У КУЛТУРИ U251 ЋЕЛИЈА ХУМАНОГ
ГЛИОБЛАСТОМА**

докторска дисертација

Београд, 2024.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Ana R. Despotović

**MOLECULAR MECHANISMS OF CYTOTOXIC ACTIVITY
OF ASCORBIC ACID AND MENADIONE
IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINE U251**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

МЕНТОРИ

др Гордана Товиловић Ковачевић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Ива Лакић, доцент
Универзитет у Београду
Биолошки факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Невена Зоговић, научни саветник
Универзитет у Београду
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Кристина Јањетовић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Тања Јевђовић, ванредни професор
Универзитет у Београду
Биолошки факултет

Датум одбране: _____

Експериментални део докторске дисертације „Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“ је урађен у лабораторијама Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, као и Института за микробиологију и имунологију и Института за медицинску и клиничку биохемију у оквиру Медицинског факултета Универзитета у Београду. Трансмисиона електронска микроскопија је урађена у Институту за хистологију и ембриологију „Александар Ђ. Костић“ Медицинског факултета Универзитета у Београду. Истраживање је реализовано у оквиру пројеката „Улога аутофагије у регулацији смрти туморских ћелија“ (евиденциони број 173053) чији је руководилац била др Љубица Хархаји Трајковић и „Модулација сигналних путева који контролишу интрацелуларни баланс у терапији тумора и неуро-имуно-ендокриних поремећаја“ (евиденциони број ИИИ41025) којим је руководио проф. др Владимир Трајковић, као и пројеката Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ 451-03-9/2021-14/200007 и 451-03-68/2022-14/200007. Наведени пројекти су били финансирани од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, односно Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије.

Захвалница

Захваљујем се др Гордани Товиловић Ковачевић и др Невени Зоговић за пренето знање, непосредно стручно руковођење и идејно и практично учешће у свим корацима истраживања које је било предмет ове докторске дисертације, као и израде и публикавања радова који су из ње проистекли. Такође, др Гордани Товиловић Ковачевић се захваљујем што је са мном делила искуства која је стекла кроз рад у лабораторији и што ме је учила значају и вештинама истицања суштине. Др Невени Зоговић хвала што ми је била ослонац, а посебно хвала за самоиницијативно залагање и помоћ да се и формално прикључим научно-истраживачкој заједници и колективу Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Др Кристини Јањетовић хвала на дивној сарадњи, изузетној посвећености читању дисертације, охрабрењу и уношењу необјашњиве лакоће и тихе радости у сваки радни дан.

Доц. др Иви Лакић хвала што ми је указала поверење и што је трасирала почетак мог научно-истраживачког рада.

Проф. др Тањи Јевђовић се захваљујем што ми је, приликом читања дисертације, дала сугестије које су заиста допринеле њеном квалитету.

Др Љубици Хархаји Трајковић и проф. др Владимиру Трајковићу сам захвална јер су ми пружили могућност да, у оквиру пројеката којима су руководили, радим и реализујем значајан део овог истраживања у Лабораторији за имунологију Медицинског факултета у Београду.

Др Бранки Петковић, руководиоцу Одељења за неурофизиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, хвала на указаном поверењу.

Свим колегама из поменутих лабораторија хвала на сарадњи, подршци и дружењу.

Др Ђорђу Антонијевићу, др Драгану Илићу и др Вукоману Јокановићу неизмерно хвала за вољу и труд који су уложили у разрешење једне, готово нерешиве, процедуралне заврзламе.

Професору Ужичке гимназије Саши Станојевићу се захваљујем што ми је приближио биологију и што је битно утицао на усмеравање мог даљег образовања.

Пријатељима и онима који су, физички или у мислима, били присутни и подржавали ме током протеклих година, безгранично сам захвална на томе.

Неисказиву захвалност дугујем Јелени Јешић, јер је оставила неизбрисив траг у развоју мог настојања ка критичкој мисли и објективној перцепцији стварности, важних компоненти научно-истраживачког рада.

Даници и њеној породици хвала што су ми били ослонац и што су ми током свих ових година стварали осећај да одласком на студије нисам отишла далеко од куће.

„Целим срца топлим дном“ се захваљујем Нади и Ђорђу, мом пуферском систему, јер су са мном прошли кроз сва годишња доба докторандског живота, пружајући ми непроцењив осећај мира и сигурности.

Мојој породици – Деспотовићима и Јоксимовићима – хвала за радост, љубав и безусловну подршку. Баби Љубици Јоксимовић дугујем неизрециву захвалност за сваку њену мисао која је досезала далеко изван граница времена и простора у којима је живела.

Мојим родитељима,
оцу Радовану, палом борцу,
за све битке које је за нас водио и
мајци Милици, мојој неисцрпној инспирацији.

МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ЦИТОТОКСИЧНОГ ДЕЈСТВА АСКОРБИНСКЕ КИСЕЛИНЕ И МЕНАДИОНА У КУЛТУРИ U251 ЋЕЛИЈА ХУМАНОГ ГЛИОБЛАСТОМА

САЖЕТАК

Глиобластоми су најагресивнији и најучесталији тумори мозга у адултној популацији. Карактерише их висока инвазивност и резистенција на терапију. У овој докторској дисертацији је проучаван цитотоксични ефекат редокс-активног пара аскорбинске киселине (АК) и менадиона (МД) на ћелијама хуманог глиобластома U251. Могућност појачавања њиховог цитотоксичног потенцијала испитана је модулацијом аутофагије, процеса са важном улогом у одговору глиобластома на конвенционалну терапију, као и применом малих молекулских инхибитора АКТ (10-DEBC) и JNK (SP600125), киназа које припадају најчешће измењеним сигналним путевима у глиобластомима.

У комбинацији, АК и МД синергистички изазивају некрозу посредовану деполаризацијом мембране митохондрија и оксидативним стресом, док примењени појединачно нису токсични за U251 ћелије. Комбинација АК+МД и, у мањој мери, сâм МД покрећу аутофагију у U251 ћелијама, што је показано појавом аутофагних вакуола, појачаном разградњом аутофагног супстрата p62 и повећањем нивоа маркера аутофагије у U251 ћелијама – протеина LC3-II и беклин-1. Оба третмана повећавају фосфорилацију AMPK, позитивног регулатора аутофагије, али само АК+МД повећава експресију већине гена повезаних са аутофагијом и утиче на активност нисходних супстрата AMPK, односно инхибира mTOR/S6K и активира ULK1. Фармаколошка и генетичка инхибиција аутофагије смањују токсичност АК+МД, док позитивна регулација аутофагије повећава токсичност и АК+МД и МД. Комбинација АК+МД активира JNK и, након пролазне активације, снажно инхибира АКТ киназу. Мали молекулски инхибитори АКТ и JNK киназа, 10-DEBC и SP600125, редом, повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и потенцирају некрозу изазвану комбинацијом АК и МД. Ефекат 10-DEBC корелира са појачавањем оксидативног стреса и цитотоксичне аутофагије у третману МД и АК+МД и поништен је генетичком инхибицијом аутофагије. Једињење SP600125 повећава осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД такође потенцирањем оксидативног стреса, али независно од процеса аутофагије. Антиоксиданс N-ацетил цистеин спречава активацију аутофагије, као и промене у активностима AMPK/mTOR/ULK1, АКТ и JNK киназа и смрт U251 ћелија. Ниједан од испитиваних третмана није токсичан за здраве ћелије хуманих фибробласта MRC5.

Добијени резултати указују да се МД и АК+МД у комбинацији са активаторима аутофагије или инхибиторима АКТ и JNK киназа могу даље испитивати као нова стратегија за лечење глиобластома. Такође, показани молекуларни механизми представљају добру основу за развој терапијских стратегија за превазилажење резистенције глиобластома на конвенционалне хемиотерапеутике.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: менадион, аскорбинска киселина, глиобластом, оксидативни стрес, аутофагија, АКТ киназа, JNK киназа, 10-DEBC хидрохлорид, SP600125

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија

УЖА НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија малигне ћелије

MOLECULAR MECHANISMS OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF ASCORBIC ACID AND MENADIONE IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINE U251

ABSTRACT

Glioblastomas are the most aggressive and most common brain tumors in the adult population, characterized by high invasiveness and resistance to therapy. In this doctoral dissertation, the cytotoxic effect of the redox-active pair of ascorbic acid (AA) and menadione (MD) on human glioblastoma U251 cells was investigated. The possibility of enhancing their cytotoxic potential was investigated through the modulation of autophagy, a process that plays an important role in the response of glioblastomas to conventional therapy, as well as through the application of small molecule inhibitors of AKT (10-DEBC) and JNK (SP600125), kinases involved in the most frequently altered signaling pathways in glioblastomas.

AA and MD in combination synergistically induce necrosis mediated by mitochondrial membrane depolarization and oxidative stress, whereas neither agent is cytotoxic to U251 cells when applied individually. The combination of AA+MD, and to a lesser extent MD alone, trigger autophagy in U251 cells, as evidenced by the appearance of autophagic vacuoles, enhanced degradation of the autophagic substrate p62, and increased levels of autophagy markers in U251 cells – proteins LC3-II and Beclin-1. Both treatments increase the phosphorylation of positive autophagy regulator AMPK, but only AA+MD increases the expression of most autophagy related genes and affects the activity of downstream substrates of AMPK: inhibits mTOR/S6K and activates ULK1. Pharmacological and genetic inhibition of autophagy decrease the toxicity of AA+MD, whereas upregulation of autophagy increases the toxicity of both AA+MD and MD. The combination of AA and MD activates JNK and, following transient activation, robustly inhibits AKT kinase. The small molecule inhibitors of AKT and JNK kinases, 10-DEBC and SP600125, respectively, increase the sensitivity of U251 cells to MD and potentiate the necrosis induced by the combination of AA and MD. The effect of 10-DEBC correlates with enhancement of oxidative stress and cytotoxic autophagy in MD- and AA+MD-treated cells and is reversed by genetic inhibition of autophagy. The compound SP600125 also increases the sensitivity of U251 cells to MD and AA+MD by potentiating oxidative stress, but independently of the autophagy process. The antioxidant N-acetyl cysteine prevents the activation of autophagy, as well as changes in AMPK/mTOR/ULK1, AKT and JNK kinase activities and U251 cell death. None of the treatments tested exhibit toxicity towards healthy human MRC5 fibroblast cells.

The obtained results suggest that MD and AA+MD in combination with autophagy activators or AKT and JNK kinase inhibitors can be further investigated as a new strategy for the treatment of glioblastoma. Also, the molecular mechanisms identified provide a good basis for the development of therapeutic strategies to overcome the resistance of glioblastoma to conventional chemotherapeutic agents.

KEY WORDS: menadione, ascorbic acid, glioblastoma, oxidative stress, autophagy, AKT kinase, JNK kinase, 10-DEBC hydrochloride, SP600125

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Cancer cell biology

Регистар скраћеница:

АК – аскорбинска киселина

АО – акридин оранж

ADP – аденозин-дифосфат

AIF – енгл. *apoptosis inducing factor*

AMBRA1 – енгл. *activating molecule in beclin 1-regulated autophagy protein 1*

AMP – аденозин-монофосфат

AMPK – енгл. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*

AP-1 – енгл. *transcription factor activator protein-1*

ATF – енгл. *activating transcription factor*

APS – амонијумперсулфат

ATG – енгл. *autophagy related*

ATG16L1 – енгл. *autophagy-related 16-like 1*

АТР – аденозин-трифосфат

BAF – бафиломицин-A1

Bcl2 – енгл. *B-cell lymphoma 2*

Bcl-XL – енгл. *B-cell lymphoma-extra large*

BIF-1 – енгл. *Bax-interacting factor 1*

BIM – енгл. *Bcl2-interacting mediator of cell death*

BNIP3 – енгл. *Bcl2-interacting protein 1*

BSA – енгл. *bovine serum albumine*

ЦНС – централни нервни систем

CBV G-250 – Coomassie Brilliant Blue G-250

cDNK – комплементарна ДНК

CI – енгл. *combination index*

Ct – енгл. *cycle of threshold*

Cyb5R3 – цитохром b5 оксидоредуктаза

СYP450 – цитохром P450 оксидоредуктаза

DEPTOR – енгл. *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

DHA – дехидроаскорбат

DHR – енгл. *dihydrorhodamine 123*

DMSO – диметилсулфоксид

dNTP – дезоксирибонуклеотид-трифосфат

EDTA – етилендиамино тетрасирћетна киселина

EGFR – енгл. *epidermal growth factor receptor*

eIF4E – енгл. *eukaryotic translation initiation factor 4E*

ERK – енгл. *extracellular signal-regulated protein kinases*

ФС – фосфатидилсерин

FACS – енгл. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FBS – енгл. *fetal bovine serum*

FIP200 – енгл. *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*

FITC – енгл. *fluorescein isothiocyanate*

FOXO – енгл. *forkhead box transcription factors*

GABARAP – енгл. *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*

GSH – глутатион

HIF-1α – енгл. *hypoxia-inducible factor-1α*

Hsp90 – енгл. *heat shock protein 90 kDa*

IDH1 – изоцитрат-дегидрогеназа 1

IDH2 – изоцитрат-дегидрогеназа 2

JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензимидазол карбоцијанин јодид

JNK – енгл. *c-Jun N-terminal kinase*

Kearp1 – енгл. *Kelch-like ECH-associated protein 1*

ЛФ – липофектамин 2000

LC3 – енгл. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LIR – енгл. *LC3-interacting region*

LTR – енгл. *LysoTracker Red DND-99*

МД – менадион

М-MuLV – енгл. *Moloney Murine Leukemia Virus RevertAid Reverse Transcriptase*

MAF – енгл. *musculoaponeurotic fibrosarcoma*

МАРК – митогеном активирани протеинске киназе (енгл. *mitogen-activated protein kinase*)

MLST8 – енгл. *mTOR-associated protein, LST8 homolog*

MMR – енгл. *mismatch repair*

mTOR – енгл. *mechanistic target of rapamycin*

mTORC1 – mTOR комплекс 1 (енгл. *mTOR complex 1*)

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2)-2, 5-дифенилтетразолијум бромид

myr-AKT – миристилована АКТ киназа

НАС – N-ацетилцистеин

NaF – натријум флуорид

Na₂VO₄ – натријум ортованадат

NF-κB – енгл. *nuclear factor kappa B*

NH₄Cl – амонијум хлорид

NP-40 – енгл. *Nonidet P-40*

NQO1 – NAD(P)H-зависна хинон оксидоредуктаза 1

Nrf2 – енгл. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

O6-mG – O6-метилгуанин

Opti-MEM – енгл. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*

p70S6K – енгл. *70 kDa ribosomal protein S6 kinase*

PARP – енгл. *poly ADP-ribose polymerase-1*

PBS – енгл. *Phosphate Buffered Saline*

PE – фосфатидилетаноламин (енгл. *phosphatidylethanolamine*)

PH – енгл. *pleckstrin homology*

PI – енгл. *propidium iodide*

PI-C – енгл. *protease inhibitor cocktail*

PI3K – фосфатидил инозитол 3-киназа

PI3K γ -C1 – комплекс 1 класе III фосфатидилинозитол 3 киназе

PI3K α – каталитичка субјединица α PI3K класе IA

PIP2 – фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфат

PIP3 – фосфатидилинозитол (3, 4, 5)-трифосфат

PMSF – фенилметилсулфонил флуорид

PRAS40 – енгл. *proline-rich AKT substrate of 40 kDa*

PTEN – енгл. *phosphatase and tensin homolog*

PVK –реактивне врсте кисеоника

RB – ретинобластом

RTK – рецептор са тирозин киназном активношћу

RT-qPCR – енгл. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

RUBICON – енгл. *Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein*

RPMI – енгл. *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*

C3O – Светска здравствена организација

СТС – стауроспорин

SAPK – стресом активирана протеин киназа

SDS – енгл. *sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE – енгл. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

siRNA – енгл. *small interfering RNA*

SNARE – енгл. *soluble N-ethylmaleimidesensitive fusion protein attachment protein receptors*

SOD – супероксид дисмутаза

SVCT – енгл. *sodium-dependent vitamin C transporter*

ТМЗ – темозоломид

TCGA – Атлас генома рака (енгл. *The Cancer Genome Atlas*)

TBS – енгл. *Tris Buffer Saline*

TBS-T – енгл. *Tris Buffer Saline-Tween 20*

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин

TERT – енгл. *telomerase reverse transcriptase*

TET – енгл. *ten-eleven translocation*

TFEB – енгл. *transcription factor EB*

TNFR – енгл. *tumor necrosis factor receptor*

TREH – трехалоза

TSC1/TSC2 – енгл. *tuberous sclerosis complex 1/2*

UBA – енгл. *ubiquitin-associated*

UBIAD1 – енгл. *UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1*

ULK1 – енгл. *UNC-51-like kinase 1*

UVRAG – енгл. *UV radiation resistance-associated*

VPS34 – енгл. *vesicular protein sorting 34*

10-DEBC – 10-DEBC хидрохлорид

ЗМА – 3-метиладенин

Регистар табела, схема и слика:

- Табела 1.** Класификација глиома према петом издању класификације тумора ЦНС
- Табела 2.** Пуфери и раствори коришћени током имуноблота
- Табела 3.** Термални циклуси и реакционе смеше реверзне транскрипције
- Табела 4.** Преглед коришћених прајмера/проба у RT-qPCR
-
- Схема 1.** Основна биолошка обележја малигних тумора
- Схема 2.** Редокс циклуси менадиона током којих се производе $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2
- Схема 3.** Редокс циклус између аскорбата и менадиона
- Схема 4.** Морфолошке фазе аутофагије и протеини који их регулишу
- Схема 5.** Утицај комбинације АК и МД на процес аутофагије у U251 ћелијама хуманог глиобластома
- Схема 6.** Приказ главних догађаја које изазивају МД и АК+МД у U251 ћелијама и њихова међусобна повезаност
- Схема 7.** Утицај малих молекулских инхибитора АКТ и JNK киназа (10-DEBC и SP600125) на процесе које комбинација АК+МД покреће у ћелијама хуманог глиобластома U251
- Схема 8.** Токсичност различитих комбинација МД, АК, 10-DEBC и SP600125 расте са повећањем производње РВК у U251 ћелијама
- Схема 9.** Комбиновањем МД са АК и/или инхибиторима АКТ и JNK киназа (10-DEBC и SP600125) постиже се цитотоксичност примењених третмана
- Схема 10.** Преглед ефеката које остварује МД у комбинацији са АК и/или инхибиторима АКТ и JNK киназа (10-DEBC и SP600125) на ћелије хуманог глиобластома U251
-
- Слика 1.** Дозно-зависно цитотоксично дејство комбинације АК и МД на ћелије хуманог глиобластома U251
- Слика 2.** Временски-зависно цитотоксично дејство комбинације АК и МД на ћелије хуманог глиобластома U251
- Слика 3.** Синергистичко цитотоксично дејство АК и МД у култури U251 ћелија хуманог глиобластома
- Слика 4.** АК+МД утиче на морфолошке и ултраструктурне карактеристике U251 ћелија
- Слика 5.** АК+МД изазива некрозу U251 ћелија глиобластома
- Слика 6.** АК+МД не активира каспазе у U251 ћелијама
- Слика 7.** АК+МД изазива оксидативни стрес и деполаризацију мембране митохондрија
- Слика 8.** Оксидативни стрес је узрок цитотоксичног дејства АК+МД на U251 ћелије хуманог глиобластома
- Слика 9.** МД и АК+МД изазивају накупљање аутофагних везикула у U251 ћелијама
- Слика 10.** МД и АК+МД повећавају број/волумен киселих везикула у ћелијама
- Слика 11.** МД и АК+МД повећавају ниво беклина-1, прелазак LC3-I у LC3-II и разградњу p62
- Слика 12.** МД и АК+МД појачавају аутофагни флуks у U251 ћелијама

- Слика 13.** МД и АК+МД појачавају транскрипцију гена чији продукти имају важну улогу у процесу аутофагије
- Слика 14.** АК+МД активира AMPK/mTOR/ULK1 сигнални пут у ћелијама глиобластома U251
- Слика 15.** Аутофагија посредована активацијом сигналног пута AMPK/mTOR/ULK1 је последица оксидативног стреса
- Слика 16.** Аутофагија коју изазива АК+МД доприноси уклањању РВК из цитосола и митохондрија U251 ћелија
- Слика 17.** Фармаколошка и генетичка инхибиција аутофагије штите U251 ћелије од цитотоксичног дејства АК+МД
- Слика 18.** Аутофагија коју изазива комбинација АК+МД доприноси некрози U251 ћелија
- Слика 19.** Фармаколошки и генетички активатори аутофагије иницирају цитотоксичност МД и појачавају цитотоксично дејство АК+МД
- Слика 20.** АК+МД инхибира АКТ и активира MAPK
- Слика 21.** Инхибитори АКТ, JNK, ERK и p38 на различите начине утичу на осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД
- Слика 22.** Перифозин и генетичка инхибиција JNK потенцирају токсичност МД и АК+МД
- Слика 23.** 10-DEBC и SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД: утицај на ћелијску морфологију
- Слика 24.** 10-DEBC и SP600125 повећавају удео некротичних ћелија у третманима МД и АК+МД, без утицаја на активацију каспаза
- Слика 25.** Реципрочна регулација активности АКТ и производње РВК под утицајем МД и АК+МД
- Слика 26.** Реципрочна регулација активности JNK и производње РВК под утицајем МД и АК+МД
- Слика 27.** 10-DEBC појачава конверзију LC3 и деградацију p62, док SP600125 нема утицај на ове догађаје у U251 ћелијама третираним МД и комбинацијом АК+МД
- Слика 28.** SP600125 не утиче, док 10-DEBC повећава заступљеност киселих везикула унутар U251 ћелија третираних МД и АК+МД
- Слика 29.** 10-DEBC потенцира цитотоксичну аутофагију у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД
- Слика 30.** Фармаколошка и генетичка активација АКТ смањује осетљивост U251 ћелија на АК+МД
- Слика 31.** Експресија конститутивно активне форме АКТ киназе смањује удео некротичних U251 ћелија у култури третираној АК+МД
- Слика 32.** Експресија конститутивно активне форме АКТ киназе смањује количину РВК у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД
- Слика 33.** Експресија конститутивно активне форме АКТ киназе спречава МД и АК+МД да изазову аутофагију у U251 ћелијама
- Слика 34.** Испитивани третмани нису токсични за здраве, неизмењене ћелије фибробласта плућа

Садржај

1. Увод.....	1
1.1. Тумори.....	3
1.2. Глиоми: класификација, епидемиологија и терапија.....	4
1.3. Најчешће измењени сигнални путеви у глиобластомима.....	6
1.3.1. Инхибитори PI3K/AKT/mTOR и MAPK/JNK киназа као потенцијални антитуморски агенси	8
1.4. Оксидативни стрес, митохондрије и глиоми: импликације за нове стратегије лечења	9
1.5. Менадион, аскорбинска киселина и њихова редокс-активна комбинација.....	11
1.6. Механизми ћелијског умирања.....	16
1.7. Аутофагија.....	18
1.7.1. Киназе и транскрипциони фактори који регулишу процес аутофагије	21
1.7.2. Улога аутофагије у ћелији	22
2. Циљеви	25
3. Материјал и методе	29
3.1. Уређаји и софтвери.....	31
3.2. Ћелијске линије, <i>in vitro</i> култивација ћелија и третмани	31
3.3. Тестови за одређивање ћелијске вијабилности	32
3.3.1. МТТ тест	32
3.3.2. Кристал виолет тест.....	33
3.4. Математичка анализа интеракције аскорбинске киселине и менадиона.....	33
3.5. Светлосна микроскопија.....	34
3.6. Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)	34
3.7. Проточна цитофлуориметрија	34
3.7.1. Анализа апоптозе и некрозе ћелија	35
3.7.2. Мерење активности каспаза	35
3.7.3. Мерење унутарћелијске продукције слободних кисеоничних радикала.....	36
3.7.4. Мерење потенцијала мембране митохондрија	36
3.7.5. Детекција киселих унутарћелијских везикула	37
3.8. Имуноблот анализа	38
3.8.1. Припрема укупног ћелијског екстракта.....	38
3.8.2. Одређивање концентрације протеина у ћелијским екстрактима.....	38
3.8.3. Припрема узорак и денатуришућа гел електрофореза.....	39
3.8.4. Електротрансфер протеина са полиакриламидног гела на нитроцелулозну мембрану.....	40
3.8.5. Детекција протеина од интереса.....	40
3.8.6. Стриповање мембрана	41
3.9. Квантификовање експресије гена укључених у процес аутофагије	41
3.9.1. Изоловање и мерење концентрације РНК	42
3.9.2. Реверзна транскрипција	42
3.9.3. Ланчана реакција полимеразе у реалном времену	43

3.10. Трансфекција ћелија малом интерферирајућом РНК и плазмидним вектором	44
3.11. Статистичка обрада резултата	45
4. Резултати	47
4.1. Комбинација АК и МД смањује вијабилност U251 ћелија на дозно- и временски- зависан начин.....	49
4.2. АК и МД остварују интеракцију синергистичког типа у култури U251 ћелија.....	50
4.3. Комбинација АК и МД изазива морфолошке промене U251 ћелија.....	51
4.4. Комбинација АК и МД изазива некрозу U251 ћелија.....	52
4.5. Комбинација АК и МД не утиче на активност каспаза у U251 ћелијама	52
4.6. АК+МД повећава производњу РВК и изазива деполаризацију мембране митохондрија у U251 ћелијама.....	53
4.7. АК+МД изазива смрт U251 ћелија посредством оксидативног стреса.....	54
4.8. МД и АК+МД изазивају накопљање киселих аутофагних везикула у U251 ћелијама.....	55
4.9. МД и АК+МД утичу на ниво протеинских маркера аутофагије	56
4.10. МД и АК+МД стимулишу аутофагни флуks у U251 ћелијама	57
4.11. МД и АК+МД појачавају транскрипцију аутофагних гена у U251 ћелијама	58
4.12. АК+МД у U251 ћелијама активира сигналне путеве повезане са аутофагијом	58
4.13. Оксидативни стрес изазван комбинацијом АК+МД активира сигнални пут AMPK/mTORC1/ULK1 и аутофагију у U251 ћелијама.....	59
4.14. Аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД смањује ниво РВК у цитосолу и митохондријама U251 ћелија	61
4.15. Инхибиција аутофагије штити ћелије од цитотоксичног дејства АК+МД.....	62
4.16. Инхибиција аутофагије спречава некрозу U251 ћелија третираних АК+МД	62
4.17. Активатори аутофагије стимулишу цитотоксично дејство МД и АК+МД на U251 ћелије хуманог глиобластома	64
4.18. АК+МД инхибира АКТ и активира MAPK сигналне путеве у U251 ћелијама	64
4.19. Различит утицај инхибиције АКТ и MAPK на вијабилност U251 ћелија третираних МД и комбинацијом АК+МД	66
4.20. 10-DEBC и SP600125 утичу на морфолошке промене U251 ћелија које изазивају МД и комбинација АК+МД.....	68
4.21. 10-DEBC и SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД потенцирањем некрозе, без утицаја на активацију каспаза.....	68
4.22. Негативна повратна спрега између производње РВК и активације АКТ и JNK у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД.....	70
4.23. 10-DEBC појачава, док SP600125 не утиче на конверзију LC3 и деградацију p62 у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД.....	72
4.24. 10-DEBC повећава, док SP600125 не утиче на број киселих везикула у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД	74
4.25. 10-DEBC изазива токсичност МД и појачава токсичност АК+МД потенцирањем цитотоксичне аутофагије у U251 ћелијама.....	74
4.26. Активација АКТ киназе смањује осетљивост U251 ћелија на АК+МД.....	75
4.27. Генетичка активација АКТ киназе спречава некрозу U251 ћелија третираних комбинацијом АК+МД.....	76

4.28. Генетичка активација АКТ киназе смањује количину РВК у U251 ћелијама третираним МД и комбинацијом АК+МД.....	77
4.29. Генетичка активација АКТ киназе поништава ефекат МД и АК+МД на конверзију LC3 и деградацију p62 у U251 ћелијама.....	78
4.30. Инхибитори киназа, АК, МД и њихове комбинације не утичу на вијабилност ћелијске линије хуманих плућних фибробласта MRC5.....	79
5. Дискусија.....	81
6. Закључци.....	99
7. Литература	103

1. Увод

1.1. Тумори

Тумор (лат. *tumor* – отеклина, оток) или неоплазија (од грчког *νέος* – ново и *πλασις* – раст, формирање) представља лезију која настаје као последица прогресивне акумулације генетичких и епигенетичких измена које утичу на гене и протеине укључене у контролу ћелијског циклуса и одржавање стабилности генома, услед којих се неизмењена, здрава ћелија трансформише у малигну ћелију која почиње неконтролисано да се дели (Bertram, 2000). Туморско ткиво се састоји од ћелија са хетерогеним генетичким и фенотипским особинама које се манифестују кроз разлике у капацитету пролиферације, експресији протеина и тумор-маркера, метастатском потенцијалу и развоју резистенције на терапију (Lawson и сар., 2018). Главне биолошке карактеристике које ћелије попримају током малигне трансформације пресликавају се на туморско ткиво које образују и приказане су на **Схеми 1**. Малигне ћелије туморског ткива остварују сложене интеракције са околном стромом, сачињеном од неизмењених фибробласта, ендотелних ћелија као и инфилтрирајућих ћелија имуног система (Lawson и сар., 2018). Уколико су тумори локализовани, инкапсулирани, изграђени од ћелија са високом стопом диференцијације, без метастатског потенцијала и локалног инвазивног раста, називају се **бенигним**, односно доброћудним туморима. За разлику од бенигних, **малигне** неоплазије одликује брз, инвазиван раст у околно ткиво и присуство слабо диференцираних ћелија са високим митотичким и метастатским потенцијалом.



Схема 1. Основна биолошка обележја малигнух тумора. Преузето и модификовано према Hanahan, 2022.

Малигне болести се, заједно са кардиоваскуларним болестима, налазе међу водећим узрочницима смрти у свету и представљају највећу препреку продужењу просечне дужине људског живота у 21. веку (Bray и сар., 2021; Sung и сар., 2021). Према подацима Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“, број преминулих од последица малигнух обољења у Републици Србији достиже чак 20000 годишње, док је број регистрованих новооболелих случајева на годишњем нивоу

двоструко већи. Током 2021. године, стопа морталитета је била 0,29%, док је инциденца новооболелих износила 0,61% на 100000 становника. Код 2,7% мушкараца, односно 2,3% жена, малигна неоплазија је примарно локализована у пределу мозга, а знатно мањи проценат (0,1%) у другим деловима централног нервног система (ЦНС).

1.2. Глиоми: класификација, епидемиологија и терапија

Тумори који се примарно развијају у ткивима ЦНС представљају малигнитете са највишом стопом морталитета, иако су према учесталости у свету позиционирани тек на осмом месту. Најучесталији облик примарних малигнитета ЦНС су **глиоми**, тумори који потичу од глија ћелија или њихових ћелијских прекурсора (Ostrom и сар., 2023). На основу типа глијских ћелија од којих воде порекло, разликују се астроцитоми и олигодендроглиоми. Образац раста ових тумора био је критеријум за разврставање глиома на **недифузне**, чији је раст ограничен и **дифузне глиоме** које одликује инфилтративни раст и продор ћелија у околни паренхим. Светска здравствена организација (СЗО), у тренутно важећем, петом издању класификације тумора ЦНС, интегрише морфолошке особености туморског ткива са кључним молекуларно-биолошким параметрима које је било неопходно узети у обзир приликом дефинисања различитих туморских ентитета, како би се могао прецизније предвидети ток болести и побољшати клинички исход избором ефикасне терапије. Класификација глиома, издвојена из целокупне класификације тумора ЦНС коју је објавила СЗО 2021. године, приказана је у **Табели 1** (Louis и сар., 2021).

Табела 1. Класификација глиома према петом издању класификације тумора ЦНС. Светска здравствена организација, 2021. година.

Адутни тип дифузних глиома	астроцитом, <i>IDH</i> -мутант
	олигодендроглиом, <i>IDH</i> -мутант и 1p/19q-коделеција
	глиобластом, <i>IDH</i> -дивљи тип
Педијатријски тип дифузних глиома ниског градуса	дифузни астроцитом, <i>MYB</i> - или <i>MYBL1</i> -измењен
	ангиоцентрични глиом
	полиморфни нискоградусни неуроепителни тумор у младих нискоградусни дифузни глиом, измењен MAPK сигнални пут
Педијатријски тип дифузних глиома високог градуса	дифузни глиом средње линије, <i>H3 K27</i> -измењен
	дифузни хемисферни глиом, <i>H3 G34</i> -мутант
	високоградусни дифузни глиом у деце, <i>H3</i> - и <i>IDH</i> -дивљи тип
	хемисферични глиом у беба (инфантилни тип)
Ограничени астроцитни глиоми	пилоцитни астроцитом
	високоградусни астроцитом са пилоидним карактеристикама
	плеоморфни ксантоастроцитом
	субependимални астроцитом циновских ћелија
	хордоидни глиом
	астробластом, <i>MN1</i> -измењен

Класификација глиома који се јављају у адулној популацији, поред хистолошких и имунохистохемијских анализа, у великој мери се ослања и на молекуларно-биолошке параметре: присуство коделеције 1p/19q и образац мутације гена за ензиме учеснике

реакција Кребсовог циклуса, изоцитрат-дехидрогеназу 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*). На основу ових важних параметара, дифузни глиоми одраслих су разврстани у три главна дијагностичка типа: астроцитоме са мутираним *IDH* геном; олигодендроглиоме са мутираним *IDH* геном и *1p/19q* коделецијом и глиобластоме са неизмењеним, односно дивљим типом *IDH* гена (енгл. *wild type*) (**Табела 1**). Према овој класификацији, у групу **глиобластома** сврстани су астроцитни глиоми са неизмењеним *IDH* геном који имају најмање једну од следећих карактеристика: микроваскуларну пролиферацију, некрозу, мутацију у промотору гена за реверзну транскриптазу теломеразе (енгл. *telomerase reverse transcriptase*, TERT), амплификацију гена за рецептор епидермалног фактора раста (енгл. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) и/или варијације у броју поновака хромозома 7. Ентитет „глиобластом, *IDH* мутант“ дефинисан у претходној класификацији, сада је замењен типом „астроцитом, *IDH* мутант“ (Louis и сар., 2021).

Према степену агресивности који се огледа кроз присуство једарне атипичности, појачане митотичке активности, некрозе и микроваскуларне пролиферације, а према СЗО се изражава у градусима од 1 до 4, глиобластоми представљају астроцитоме са **највишим степеном малигнитета (градус 4)**. Први пут су описани 1800-тих година, а данас чине чак половину свих малигних неоплазија ЦНС и око 60% примарних глиома (Stoyanov и Dzhenkov, 2018; Ostrom и сар., 2023). Иако се могу развити у свим узрастима, глиобластоми се ретко срећу код пацијената млађих од 55 година. Просечна старосна граница за појаву ових тумора је 65 година, док вредност стопе инциденце достиже максимум између 75. и 84. године старости, дакле, у каснијој животној доби, при чему мушкарци чешће оболевају. Глиобластоми могу да се јаве у било ком делу ЦНС, али најчешће настају у белој маси великог мозга.

Стандардна терапијска процедура новодијагностикованих глиобластома ослања се на Ступов протокол успостављен 2005. године (Stupp и сар., 2005). Протокол укључује прецизну хируршку ресекцију у циљу постављања патохистолошке дијагнозе и максималног уклањања туморске масе, праћену терапијом алкилирајућим агенсом темозоломидом (ТМЗ) у трајању од 6 недеља (75 mg/m²/дан) и терапијом зрачењем од укупно 60 Gy (30 фракција по 2 Gy). Након завршене зрачне терапије примењује се 6 циклуса помоћне терапије ТМЗ (на сваких 28 дана, 5 дана заредом, 150-200 mg/m²/дан). Првобитно је, увођењем адјувансне зрачне терапије након хируршке ресекције, дужина живота пацијената удвостручена: са 6 месеци након хируршког захвата до годину дана уз пратеће зрачење (Salazar и сар., 1979). Укључивањем ТМЗ у стандардни протокол лечења, који се примењује и данас, просечна дужина живота је повећана за само 2,5 месеци у односу на постоперативну радиотерапију (Stupp и сар., 2005). Своје цитостатичко дејство ТМЗ испољава као дозор метил група пуринским базама ДНК (гуанину на позицијама *O6* и *N7* и аденину на позицији *N3*). Главни посредник у оштећењима ДНК које изазива ТМЗ је *O6*-метилгуанин (*O6*-mG), јер се током репликације ДНК погрешно спарује са тимином, услед чега се покреће репарација погрешно спарених базних парова (енгл. *mismatch repair*, MMR). Током MMR, погрешно спарени тимин у новосинтетисаном ланцу се препознаје и исеца, чиме се *O6*-mG родитељског ланца ослобађа за даље погрешно спаривање. На тај начин се покреће циклус погрешног спаривања и исецања тимина који се окончава прекидима ДНК ланца и колапсом репликационе виљушке, услед чега долази до заустављања ћелијског циклуса и покретања апоптозе ћелија које се деле (Zhang и сар., 2012). Темозоломид се као стандардна терапија у Србији користи од 2011. године. Ранији терапијски режим глиобластома заснивао се на примени ломустина и кармустина, деривата нитрозоурее, који такође припадају групи алкилирајућих агенаса (Ilić, 2018). Иако представља „златни стандард“ у терапији глиобластома већ две деценије, ризик од развоја имунодефицијенције, анемије и других озбиљних коморбидитета, као пратећих ефеката

хемиотерапије ТМЗ, намеће потребу за тражењем нових терапијских решења (Villano и сар., 2011; Ogura и сар., 2011; Liu и сар., 2018; Gilbar и сар., 2020; Sato и сар., 2023).

Иако је познавање молекуларних механизма патогенезе и усавршавање стратегија лечења глиобластома напредовало, прогностичка унапређења се односе углавном на побољшање квалитета живота пацијената и евентуално одлагање пратећих здравствених компликација, док је потпуно излечење још увек недостижно. Статистички подаци о дужини живота и смртности пацијената са глиобластомом се нису променили деценијама. Само 5% пацијената живи дуже од пет година након успостављања дијагнозе (Poop и сар., 2020), а просечна дужина живота је 14,6 месеци (Stupp и сар., 2005). Код највећег броја пацијената се већ неколико месеци након иницијалног лечења јављају рецидиви за које тренутно не постоје стандардни терапијски протоколи и углавном имају леталан исход након мање од годину дана (Vaz-Salgado и сар., 2023). Разлози због којих терапија глиобластома остаје велики изазов савремене медицине су разноврсни. Инвазивна природа, дифузан раст и инфилтрација ћелија у околни паренхим онемогућавају јасно уочавање граница тумора и значајно умањују успешност зрачне терапије, а комплетно хируршко уклањање чине немогућим. Висока стопа пролиферације малигних глиобластомских ћелија, појава резистентних ћелија убрзо након иницијалне терапије (тзв. туморских стем ћелија), изражена генетичка хетерогеност и активација вишеструких сигналних путева, такође отежавају лечење ове болести и подстичу њен изузетно агресиван фенотип. Поред особина самог тумора, селективно пропустљива крвно-мождана баријера која онемогућава приступ системским агенсима у туморско ткиво, имуносупресивно микроокружење тумора, оштећење здравих ћелија алкилирајућим цитостатикима и повећана осетљивост одређених делова мозга на терапију зрачењем, такође представљају препреке које би будућа истраживања требало да превазиђу (Noch и сар., 2018; Cruz и сар., 2022; Seker-Polat и сар., 2022).

1.3. Најчешће измењени сигнални путеви у глиобластомима

Термин „мултиформни“, који је СЗО искључила из назива глиобластома 2007. године, али се задржао у научној литератури до данас, изворно је уведен како би се једном речју објединила висока морфолошка хетерогеност овог тумора. Међутим, мултиформност осликава и широк опсег генетичких и епигенетичких промена које су узрок измењене активности главних сигналних путева укључених у малигну трансформацију, раст, прогресију и развој резистенције глиобластомских ћелија на терапију (Wen и сар., 2020; Liu и сар., 2022). Анализом биопсија туморског ткива пацијената, у оквиру пројекта „Атлас генома рака“ (енгл. *The Cancer Genome Atlas*, TCGA), урађена је карактеризација генетичког профила глиобластома. Према TCGA, најчешће идентификоване генетичке промене су прекомерна активација сигналне осовине са онкогеним потенцијалом RTK/RAS/PI3K (рецептор са тирозин киназном активношћу/RAS/фосфатидил инозитол 3-киназа), која је била присутна код чак 88% пацијената и инактивација туморсупресорских сигналних путева повезаних са p53 (87% случајева) и ретинобластомом (RB; 78% случајева) (TCGA Research Network, 2008). Поред тога што је најчешће измењен, пут RTK/RAS/PI3K се издваја и по томе што активира неколико киназа кључних за малигну трансформацију ћелија, због чега тренутно представља сигнални пут који је најпогоднији за фармаколошку манипулацију. Хиперактивацију PI3K, карактеристичну за глиобластома, изазивају мутације које обухватају умножавање гена за EGFR, активацију каталитичке субјединице α PI3K класе IA (PIK3CA) или губитак функције PTEN (енгл. *phosphatase and tensin homolog*), туморсупресорске фосфатазе која негативно регулише PI3K.

Киназа PI3K припада фамилији унутарћелијских липидних киназа које се у физиолошким условима активирају као одговор на факторе раста, инсулин, цитокине и хормоне. Након интеракције са мембранским рецепторима (RTK и рецептори спрегнути са протеином G), ове киназе регулишу напредовање ћелије кроз ћелијски циклус, раст, преживљавање и миграцију ћелија, као и унутарћелијски транспорт посредован везикулама. Киназе PI3K су подељене у три класе (класа I-III), а са процесима малигне трансформације и одржавањем особина малигних ћелија најчешће се повезује PI3K-IA коју активирају RTK (Yuan и Cantley, 2008; Vanhaesebroeck и сар., 2010). Активирана PI3K, фосфорилацијом фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфата (PIP2), формира фосфатидилинозитол (3, 4, 5)-трифосфат (PIP3) који се везује за PH (енгл. *pleckstrin homology*) домене ефекторских протеина, мењајући њихову локализацију и активност (Lemmon, 2008). Фосфатаза PTEN, која је веома често инактивирана у малигним ћелијама, конвертује PIP3 до PIP2 и на тај начин превенира активацију киназа нисходно од PI3K (Vanhaesebroeck и сар., 2010).

Међу ефекторским протеинима које стимулише PI3K, као кључни посредници у преносу сигнала у свим ћелијама виших еукариота издвајају се **АКТ киназе**, серин/треонин киназе познате и као протеин киназе Б. Фамилији АКТ киназа припадају три изоформе АКТ (АКТ1, АКТ2 и АКТ3) које имају исту структуру: PH домен на N-терминусу, праћен каталитичким киназним доменом који се завршава регулаторним хидрофобним мотивом на C-терминусу (Bellacosa и сар., 1998). Интеракцијом са АКТ киназом у оквиру PH домена, PIP3 омогућава њену транслокацију из цитосола до плазма мембране, што је неопходно да би се АКТ потпуно фосфорилисала и активирала (Andjelkovic и сар., 1997). Киназа АКТ даље регулише активност преко четрдесет нисходних циљних молекула посредством којих утиче на спектар ћелијских процеса, од преживљавања, раста, пролиферације, миграције и инвазије ћелија у ванћелијски матрикс, до одговора ћелија на доступне нутријенте, контроле метаболизма и ангиогенезе (Manning и Cantley, 2007). Поремећаји у овим физиолошким процесима уједно представљају и нека од главних обележја малигних ћелија и отежавају проналазак ефикасног терапијског решења (Nanahan, 2022). То се посебно односи на избегавање ћелијске смрти, односно ћелијско преживљавање у одговору на факторе раста, онкогене или ћелијски стрес, у коме АКТ посредује тако што спречава апоптозу негативном регулацијом генске експресије или функције проапоптотских протеина (Manning и Cantley, 2007). Такође, АКТ учествује у контроли оног дела ћелијског раста који се односи на повећање величине ћелија, као одговор на повећану доступност хранљивих материја, енергије и митогена (Kaldis, 2016). Главни регулатор овог процеса је циљни молекул рапамицина код сисара – mTOR (енгл. *mechanistic target of rapamycin*), серин/треонин киназа која контролише синтезу протеина и представља један од најважнијих молекула који се активирају нисходно од АКТ. Иако су мутације у самим генима за АКТ и mTOR веома ретке у глиобластомима, као и у другим типовима тумора, прекомерна активација ових киназа која се јавља као последица промена у њиховим усходним регулаторима је једно од главних обележја глиобластома (McDowell и сар., 2011; Colardo и сар., 2021). Поред стимулације раста и пролиферације, PI3K/АКТ/mTOR сигнални пут обезбеђује ћелијама глиобластома резистенцију на хемиотерапију и терапију зрачењем (Colardo и сар., 2021).

Хистолошки градус и лоша прогноза пацијената са глиобластомом доведени су у везу и са појачаном активацијом сигналне каскаде **митогеном активираних протеинских киназа – МАРК** (енгл. *mitogen-activated protein kinase*). Ове киназе представљају главне путеве преноса сигнала са ћелијске мембране до једра и регулишу различите процесе у ћелијама, као што су пролиферација, диференцијација, апоптоза и одговор ћелије на стрес у нормалним или патолошким стањима (Wong и сар., 2021).

Чланови MAPK суперфамилије су подељени у три главне групе: протеин киназе регулисане екстраћелијским сигналимa (енгл. *extracellular signal-regulated protein kinases*; ERK), p38 киназа и стресом активирана протеин киназа (енгл. *stress-activated protein kinase*, SAPK) позната као **JNK** (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*). Висока активност MAPK у глиобластомима има важну улогу у бројним сигналним путевима који стимулишу прогресивну природу ових тумора. Чак 86% примарних глиома карактерише појачана активација JNK, те се сматра да, међу члановима MAPK, JNK има највећег удела у настанку овог тумора (Antonyak и сар., 2002). Серин-треонин протеин киназа JNK фосфорилацијом c-Jun активира комплекс AP-1 (енгл. *transcription factor activator protein-1*), димерни транскрипциони фактор изграђен од протеина из фамилија Jun, Fos, ATF (енгл. *activating transcription factor*) и MAF (енгл. *musculoaponeurotic fibrosarcoma*). Комплекс AP-1 може имати проонкогену или антионкогену улогу. Након активације, AP-1 се везује за контролне елементе у промоторима гена укључених у процесе пролиферације, диференцијације, апоптозе, одговора ћелије на стрес, као и ангиогенезе и инвазије туморских ћелија (Karin и сар., 1997; Eferl и Wagner, 2003). Идентификована су три гена која кодирају JNK код људи (*JNK1*, *JNK2* и *JNK3*), а алтернативним сплајсовањем дају најмање 10 изоформи. Показано је да MAPK заједничким дејством са сигналним путевима које покреће PI3K учествују у патогенези глиобластома (Vitucci и сар., 2013), а истовремена активација PI3K/AKT и JNK путева је описана у глиобластомима и другим типовима тумора са хиперактивацијом EGFR и мутираним *PTEN* геном. Тако је JNK2 α 2, изоформа JNK која се конститутивно активира аутофосфорилацијом независно од усходних сигнала, одговорна за поспешивање пролиферације ћелија глиобластома и одржавање малигног фенотипа, углавном преко активације AKT и регулације експресије eIF4E (енгл. *eukaryotic translation initiation factor 4E*). Фактор иницијације транслације eIF4E функционише као централни регулатор транслације протеина и има важну улогу у неопластичној трансформацији (Cui и сар., 2006). Такође, међу супстратима на које JNK делује су и онкогени протеини у цитоплазми, као што је антиапоптотски Bcl2 протеин (енгл. *B-cell lymphoma 2*) (Yamamoto и сар., 1999). Коначно, активација JNK сигналног пута је обележје глиобластома које се повезује са пролиферацијом и инхибицијом диференцијације глиобластомских стем ћелија, чиме доприноси високом капацитету самообнављања ових тумора (Matsuda и сар., 2012; Portela и сар., 2019).

1.3.1. Инхибитори PI3K/AKT/mTOR и MAPK/JNK киназа као потенцијални антитуморски агенси

У складу са наведеним молекуларно-биолошким обележјима глиобластома који су уско повезани са агресивном природом овог тумора, лошим одговором на терапију и појавом резистентних ћелијских клонова, последњих година се интензивно истражују терапеутици који утичу на функцију кључних молекула најчешће измењених путева преноса сигнала у глиобластомима. Међу њима се издвајају мали молекулски инхибитори, чија се примена испитује као једна од стратегија за сузбијање прогресије глиобластома и превазилажење њихове резистенције на стандардну терапију. **Мали молекулски инхибитори** спречавају активност циљних протеина алостерном регулацијом или везивањем за њихова активна места. Већина ових молекула припада групи киназних инхибитора. Киназни инхибитори могу бити селективни, односно могу да поседују афинитет према специфичном молекулу и циљано инхибирају његов нисходни сигнални пут, или могу припадати групи инхибитора који делују на већи број киназа. Бројне *in vitro* и *in vivo* студије су показале да **инхибитори PI3K/AKT/mTOR и MAPK/JNK** сигналних путева поседују антиглиомски потенцијал, који се углавном испољава кроз смањење пролиферације, покретање апоптозе, регулацију аутофагије или сузбијање малигне трансформације глија ћелија (Cheng и сар., 2012; Matsuda и сар., 2012; Vo и сар., 2014; Ríos-Marco и сар., 2015; Narayan и сар., 2017; Song и сар., 2019;

Wu и сар., 2020). Неколико клиничких студија које су у току испитују потенцијал инхибитора PI3K, АКТ и mTOR киназа да спрече раст и пролиферацију глиобластома, било у виду самостално примењене терапије (монотерапије) или у комбинацији са стандардним протоколом лечења (NCT05432518; NCT03673787).

Инхибиција АКТ киназе је препозната као могући приступ у борби против малигних болести јер АКТ учествује у бројним путевима преноса сигнала и регулише на десетине циљних молекула. Стога је очекивано да инхибиција ове киназе вишеструко утиша одговор на факторе раста, инсулин и друге ванћелијске и унутарћелијске стимулусе укључене у преживљавање, раст и пролиферацију туморских ћелија (Manning и Toker, 2017). Антитуморски потенцијал селективних инхибитора АКТ киназе се темељно изучава. Бројна синтетичка (МК-2206, AZD5363, GSK690693, GDC-0068, GSK2141795, GSK2110183, АТ7867, CCT128930, BAY1125976, перифозин, АКТ инхибитор VIII, АКТ1, АКТ2-IN-1) и једињења природног порекла (6-схогаол, хербацетин, оридонин) која инхибирају ову киназу су свој антитуморски потенцијал показала на различитим моделима малигнитета, а многа од њих (обележена подвучено) су у току последњих 15 година била предмет клиничких истраживања (Song и сар., 2019). Без обзира на атрактивност АКТ киназе као мете за терапију малигних болести, ефекти **10-DEBC хидрохлорида**, АТР-компетитивног инхибитора АКТ (Thimmaiah и сар., 2005), ипак нису детаљније изучавани у ћелијским, као ни у сложенијим моделима тумора. За разлику од инхибитора АКТ, инхибитори JNK још нису ушли у фазу клиничких истраживања, углавном због непостојања специфичних инхибитора за различите изоформе ове киназе (Wu и сар., 2020). Најчешће испитивани инхибитор JNK је АТР-компетитивни инхибитор **SP600125** (Bennett и сар., 2001). Антитуморски потенцијал SP600125 је запажен у различитим *in vitro* и *in vivo* моделима тумора: малигним ћелијама тироидне жлезде, желуца, плућа, простате, ћелијама оралног сквамозног карцинома, холангиокарцинома, глиобластома, као и ксенографтима хуманог карцинома колона у мишјим моделима (Jemaа и сар., 2012; Yu и сар., 2019; Wu и сар., 2020). Поред SP600125, и други директни инхибитори JNK киназе (AS601245, AS602801, JNK-IN-1, JNK-IN-8, BI-78D3, гинзенозид Rg1, 4-флуорофенил изоксазоли, XG-102) су познати по својим антитуморским својствима (Wu и сар., 2020). Нежељени ефекти, као што су системска токсичност и механизам повратне спреге којим се активирају пролиферативни сигнални путеви у туморским ћелијама, представљају главне изазове са којима се суочавају истраживања малих молекулских инхибитора протеинских киназа као монотерапије малигних болести (Kaley и сар., 2019). Као начин да се ови проблеми превазиђу, предлаже се примена киназних инхибитора заједно са хемиотерапијом, терапијом зрачењем или другим антитуморским агенсима.

1.4. Оксидативни стрес, митохондрије и глиоми: импликације за нове стратегије лечења

Ћелијска редокс хомеостаза представља динамичку равнотежу између реакција оксидације и редукције, односно процес одржавања физиолошког баланса између оксидативних молекула и њиховог елиминисања током времена (Salazar-Ramiro и сар., 2016). Редокс интеракције представљају део оптималног ћелијског метаболизма и заснивају се на преносу електрона између два молекула, при чему се еквивалент који губи електроне оксидује, а еквивалент који их прима редукује. Одржавање редокс хомеостазе је неопходно за нормално функционисање аеробних организама. Како би одржали стабилно редокс стање, аеробни организми користе антиоксидативне ензиме попут супероксид дисмутазе (SOD), каталазе и глутатион пероксидазе или системе за детоксификацију РВК као што су пероксиредоксин, тиоредоксин и

глутатион/глутаредоксин системи. Уколико се деси да количина оксиданата у ћелији превазиђе капацитете антиоксидативних система за њихову неутрализацију, долази до оксидативног стреса. **Оксидативни стрес** представља стање у коме је редокс равнотежа нарушена у смеру прекомерног стварања оксидативних молекула, услед немогућности ћелије да их правовремено неутралише и елиминише. Главни медијатори оксидативног стреса су **реактивне врсте кисеоника (РВК)**, метаболити који настају редукцијом молекуларног кисеоника (O_2). Реактивним врстама кисеоника припадају слободни радикали – супероксидни анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) и хидроксил радикал ($\cdot OH$) и нерадикалски облици – водоник пероксид (H_2O_2) и синглетни кисеоник (1O_2) (Sies и Jones, 2020). Неспарени валентни електрон чини РВК, а посебно радикалске облике, веома реактивним и омогућава им да оксидују друге молекуле у ћелији. У стању оксидативног стреса, сходно разликама у дужини полуживота, стабилности, степену хемијске реактивности као и месту њиховог настанка, РВК могу интераговати и изменити биолошке макромолекуле као што су ДНК, липиди и протеини. РВК у протеинима најчешће изазивају промене цистеинских тиол група (SH групе) и узрокују неповратна оштећења ћелијских и протеинских структура и функција.

У физиолошким условима, РВК се континуирано производе у процесу ћелијске респирације и учествују у регулацији бројних физиолошких процеса и одговора ћелије на утицаје из ванћелијске средине. Током оксидативног метаболизма липида, аминокиселина и глукозе ослобађају се електрони који се путем електрон-транспортног (респираторног) ланца на унутрашњој мембрани митохондрија преносе до O_2 . Респираторни ланац је организован у четири комплекса (комплекс I-IV). Ток електрона кроз ланац условљава редукцију протеинских супстрата ових комплекса, праћену ослобађањем протона у међумембрански простор митохондрија. На тај начин се ствара електрохемијски протонски градијент са две стране унутрашње митохондријске мембране, неопходан за функционисање АТФ-синтазе (комплекс V) која врши фосфорилацију аденозин-дифосфата (ADP) у аденозин-трифосфат (АТФ). Иако је систем респираторног ланца организован тако да је проток електрона усмерен и да су њихове споредне интеракције ограничене, дешава се да електрони скрену са овог пута услед постојања јаког електрохемијског градијента који утиче на кретање јона у унутрашњој мембрани митохондрија. Електрони се крећу секвенцијално, са једног комплекса на други, те пролазно кашњење у том протоку изазива застој електрона на претходним комплексима, услед чега они могу реаговати са O_2 и створити $O_2^{\cdot-}$. Супероксид који се ствара током ћелијског метаболизма може бити претворен у H_2O_2 или друге РВК. Митохондрије, дакле, представљају доминантан извор унутарћелијских РВК које посредују у ретроградној сигнализацији и регулацији бројних унутарћелијских процеса.

За разлику од неизмењених, **малигне ћелије** имају повишен ниво ендогених оксидативних молекула услед појачане метаболичке активности и то представља једно од главних обележја прогресије тумора. Оксидативно окружење, осим што доприноси унутарћелијској сигнализацији и одржавању малигних карактеристика, може изазвати оштећења ћелија уколико дође до прекомерног накупљања РВК (Liu и Wang 2015). Производња великих количина РВК у малигним ћелијама ствара одређену врсту селективног притиска који ове ћелије превазилазе развојем ефикасних механизма за њихову детоксикацију. То их уједно чини високо зависним од система антиоксидативне заштите и мање отпорним на додатно повећање количине РВК у односу на здраве, малигно неизмењене ћелије. Због већ постојећег дисбаланса редокс система, праћеног повишеним нивоом РВК, туморске ћелије су ближе прагу осетљивости на оксидативни стрес због чега су **осетљивије на егзогене прооксидативне агенсе**. Ово представља тумор-специфичну промену која пружа шансу за селективно циљање малигних ћелија егзогеним агенсима који појачавају стварање РВК, с обзиром на то да су мање отпорне

од неизмењених ћелија на промене редокс хомеостазе. Уз то, двосмерна веза између оксидативног стреса и митохондрија, која се огледа у томе да оксидативни стрес може изазвати оштећења митохондрија и на тај начин пореметити њихову функцију, те да су дисфункционалне митохондрије главни извори оксидативног стреса у малигним ћелијама, представља погодно циљно место за деловање терапеутика који би додатно нарушили редокс хомеостазу и функцију митохондрија. Ове органеле представљају потенцијално важне терапијске мете и у случају глиобластома.

Глиобластоми, као и други солидни тумори, углавном користе гликолизу као доминантан метаболички пут, за разлику од малигно неизмењених ћелија које енергију обезбеђују процесом оксидативне фосфорилације (Elstrom и сар., 2004). Међутим, ћелије глиома су, поред гликолитичког пута, задржале и активност митохондријских биохемијских процеса помоћу којих задовољавају своје енергетске потребе. Захваљујући оваквој метаболичкој дихотомији, глиобластоми лако превазилазе биоенергетска ограничења и прилагођавају се условима микросредине (Marin-Valencia и сар, 2012). Постојање субпопулација ћелија са различитим метаболичким профилима повезано је са различитим обрасцима раста и преживљавања глиобластома и представља један од темеља за развој резистенције на терапију и готово неизбежно рецидивирање ових тумора. Метаболичка слика рецидивних глиобластома преклапа се са особинама ћелијских субпопулација које споро пролиферишу, резистентне су на терапију и имају изражену способност миграције и инвазије у околни паренхим. Ове ћелије функционално и фенотипски одговарају туморским стем ћелијама, а као извор енергије користе митохондрије, односно оксидацију масних киселина и оксидативну фосфорилацију. За разлику од њих, брзопролиферишуће ћелије користе гликолизу као доминантан метаболички пут и погодније су за деловање конвенционалних терапеутика. Када глукоза није доступна, глиобластомске ћелије зависне од гликолизе превазилазе биоенергетски стрес тако што обезбеђују енергију за раст и преживљавање ангажовањем митохондријских биохемијских путева (Griguer и Oliva, 2011). Појачана експресија гена који кодирају протеине укључене у процес оксидативне фосфорилације у рецидивним глиобластомима, као и повезаност хеморезистенције са појачаном активности митохондрија указују да су, између осталог, **митохондрије** заслужне за неуспех терапије глиобластома (Oliva и сар., 2011; Wolf, 2014; Hoang-Minh и сар., 2018). Због тога би ове органеле могле бити погодне мете потенцијално ефикасних антиглиобластомских агенаса. Развој редокс-активних супстанци које би циљано нарушиле интегритет и функцију митохондрија у туморским ћелијама препознат је као обећавајућа стратегија у борби против малигних болести. Међутим, проблем селективности потенцијалних антитуморских агенаса према митохондријама малигно трансформисаних ћелија још увек није превазиђен, због чега нема значајног напретка на овом пољу.

1.5. Менадион, аскорбинска киселина и њихова редокс-активна комбинација

Менадион (МД), познат и као витамин К₃, је синтетички дериват нафтохинона изузетно високе биолошке активности који се, заједно са природним облицима (витамин К₁ и витамин К₂), сврстава у класу липосолубилних једињења означених заједничким генеричким именом – витамини К. Ова једињења имају структуру 1,4-нафтохинона са метил групом на позицији 2, а разликују се према бочним ланцима на угљенику на позицији 3: филохинон (К₁, фитоменадион) има три сатурисане и једну несатурисану изопреноидну групу у транс конфигурацији; менахинон (К₂) садржи од једне до тринаест несатурисаних изопреноидних остатака, на основу чега се обележава

ознакама МК-4 до МК-13, док менадион (К₃) нема бочни ланац у својој структури (Пора и сар., 2021; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin-K>) (**Схема 2**).

Менадион у организму постаје биолошки активан тако што се након апсорпције метаболише до менахинона (МК-4) у ендоплазматичном ретикулуму, у реакцији коју катализује ензим UBIAD1 (енгл. *UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1*) (Nakagawa и сар., 2010). Са друге стране, током интестиналне апсорпције филохинона, примарног дијететског извора витамина К, као производ његове метаболичке конверзије настаје МД (Hirota и сар., 2013). Европска агенција за безбедност хране је дефинисала адекватне дозе дневног уноса природних облика витамина К (филохинона и менахинона), а до сада нису забележени никакви штетни ефекти повезани са њиховим конзумирањем путем хране или суплемената код људи и животиња. Са друге стране, иако делује као прекурсор витамина К, менадион се не користи као суплемент у људској популацији, док су фортификација сточне хране менадионом и његова употреба као суплемента у ветерини честе.

Све већи број студија указује на то да је МД добар кандидат за развој **антитуморске терапије**, с обзиром на то да поседује цитостатичко и цитотоксично дејство. Уопштено, основу антитуморске природе МД чини његова способност да изазове оксидативни стрес или да се ковалентно веже за аmine и тиоле у ћелијама (Klotz и сар., 2014). Једињења са хинонском структуром се у ћелији метаболишу редукцијом помоћу једног или два електрона. Редукцију хинона, уз утрошак NADH или NADPH, катализује неколико различитих ензима (**Схема 2**).

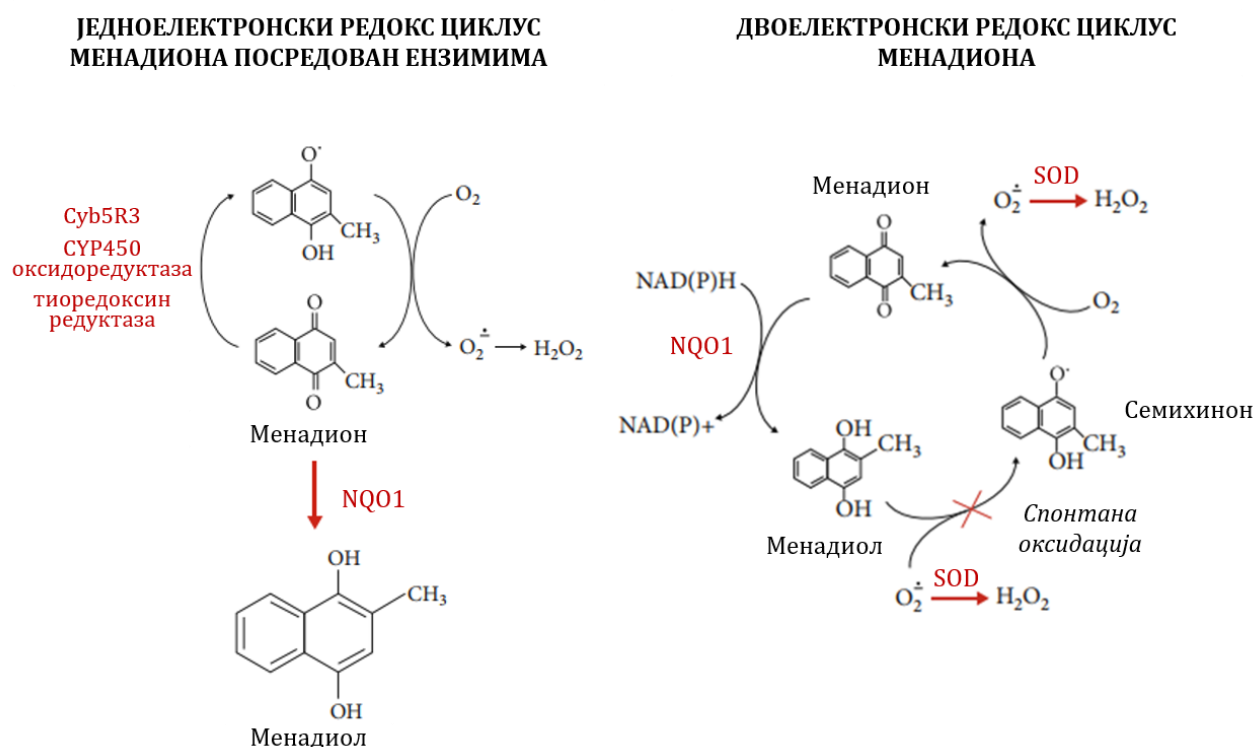


Схема 2. Редокс циклуси менадиона током којих се производе $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 . Cyb5R3—цитохром b5 оксидоредуктаза; CYP450 – цитохром P450 оксидоредуктаза; NQO1 – NAD(P)H-зависна хинон оксидоредуктаза 1; SOD – супероксид дисмутаза. Преузето и модификовано према Bakalova и сар., 2020.

Цитохром Р450 оксидоредуктаза, цитохром b5 оксидоредуктаза (Cyb5R3) и тиоредоксин редуктаза катализују једноелектронску редукцију хинона до одговарајућег семихинонског радикала. Семихинонски радикал је нестабилан и даље се, уз стварање $O_2^{\cdot-}$, може редуковати до хидрохинона (менадиол) или се уз редукцију кисеоника до $O_2^{\cdot-}$ спонтано оксидује до хинона. Супероксидни анјон који се ствара током редокс циклуса хинона се може превести у H_2O_2 и O_2 активношћу SOD, или делом може ући у реакције катализоване металима и даље формирати велике количине РВК. Такође, МД се помоћу два електрона може редуковати директно до хидрохинона, у једностепеној реакцији вођеној ензимом NQO1 (NAD(P)H-зависна хинон оксидоредуктаза 1). Ова реакција омогућава да хидрохинон уђе у следећу фазу метаболизма без стварања $O_2^{\cdot-}$, чиме се поспешује његова елиминација, а самим тим и детоксикација ћелија. И поред тога што се током ове реакције не ствара $O_2^{\cdot-}$, ова једињења се могу спонтано оксидовати и формирати семихинонски радикал и $O_2^{\cdot-}$ (Klotz и сар., 2014). Дакле, NQO1 има про- и антиоксидативну улогу, а активност овог ензима је појачана у различитим туморима (Oh и Park, 2015; Zhang и сар., 2018). Стога, уколико капацитет редокс циклуса МД надвлада капацитете ензима за детоксикацију, долази до оксидативног стреса и иреверзибилних оштећења ћелијских биомолекула. Менадион изазива оксидативни стрес у цитосолу и у матриксу митохондрија, услед чега долази до оштећења и губитка потенцијала мембране митохондрија, смањења залиха NADP, АТФ и глутатиона (GSH), оштећења ДНК и оксидације сулфхидрилних група у протеинима цитоскелета (Malorni и сар., 1993; Loog и сар., 2010). Смањење залиха GSH и протеина са сулфхидрилним групама јавља се и као последица арилације тиола у ћелијама, што је други механизам токсичног дејства МД. Трошење глутатиона узрокује алкилацију ћелијских макромолекула услед чега долази до њихове деактивације (Calderon и сар., 2008).

Везивањем за цистеин у каталитичким доменима, МД инхибира ензиме међу којима се истичу протеин киназе и фосфатазе укључене у регулацију ћелијског циклуса (Wu и Sun, 1999). На тај начин МД инхибира раст и пролиферацију туморских ћелија. Такође, МД може да прође кроз спољашњу и унутрашњу мембрану митохондрија и специфично инхибира ДНК полимеразу γ , без утицаја на друге ДНК полимеразе (Sasaki и сар., 2008). Овај ензим учествује у репликацији, рекомбинацији и поправци оштећења митохондријске ДНК. Познато је да мутације у митохондријској ДНК и поремећена синтеза протеина које она кодира доводе до повећане производње $O_2^{\cdot-}$. Ово је веома важно, с обзиром на улогу митохондрија у метаболичком репрограмирању тумора (глиобластома), посебно имајући у виду да је већина протеина који формирају респираторни ланац кодирана митохондријским геномом. Још једна специфичност повезује МД са митохондријама, а то је редокс циклус менадион/менадиол који се дешава између NQO1 и комплекса III на унутрашњој митохондријској мембрани и доводи до конверзије менадиола у МД (Chan и сар., 2002). Додатни МД који се ствара у митохондријама може подлећи једноелектронској редукцији и на тај начин појачати стварање РВК. С обзиром на то да малигне ћелије због својих енергетских потреба имају већи број митохондрија у односу на здраве ћелије, утицај МД на експресију митохондријских гена и стварање РВК се наводи као један од механизма селективности МД према малигно трансформисаним ћелијама (Sasaki и сар., 2008; Bakalova и сар., 2020).

Антитуморски ефекат МД показан је у бројним студијама урађеним на различитим ћелијским линијама тумора, међу којима су и глиобластоми. Поред антипролиферативног дејства, описани су и различити типови смрти малигних ћелија: каспазно-зависна и каспазно-независна апоптоза, некроптоза и ћелијска смрт слична некрози (Osada и сар., 2008; Akiyoshi и сар., 2009; Fukui и сар., 2012; Kim и сар., 2014; Wiraswati и сар., 2016; Војић и сар., 2019; Мајјене и сар., 2019). Охрабрујући резултати добијени на ћелијским моделима подстакли су неколико *in vivo* студија. У првој фази

клиничких истраживања је показано да је МД добро толерисан и да су концентрације које су биле ефикасне у *in vitro* системима клинички достижне и оствариве (Chlebowski и сар., 1985; Lim и сар., 2005). На основу синергистичке цитотоксичности МД и других потенцијалних антитуморских лекова, показане *in vitro* и *in vivo*, спроведене су и клиничке студије које су испитивале употребу МД као адјуванса или ко-адјуванса другим хемиотерапијским агенсима или зрачењу. Међу њима се посебно истакла комбинација МД и аскорбинске киселине (Chlebowski и сар., 1985; Tetef и сар., 1995; Tareen и сар., 2008).

Аскорбинска киселина (АК), познатија као витамин Ц, је есенцијални микронутријент који има изузетно важну улогу у великом броју биолошких процеса. Назив аскорбинска киселина потиче од улоге АК у синтези колагена, а тиме и превенцији скорбута који се јавља као последица његовог дефицита. Како се раније сматрало да је антискорбутни фактор витамин, назив витамин Ц се задржао до данас. Организам човека, као и других примата, морског прасета и неких врста слепих мишева, нема способност *de novo* синтезе АК због недостатка L-гулоно-1,4-лактон оксидазе, ензима који катализује последњи корак у биосинтези АК. Због тога је неопходан унос АК путем хране или у виду суплемената, а врсте које не синтетишу АК су развиле ефикасне механизме за њену апсорпцију и рециклирање.

Аскорбинска киселина припада групи хидросолубилних витамина и у организму се налази у два хемијска облика: редукованом (L-аскорбинска киселина и њен јон L-аскорбат) и оксидованом (L-дехидроаскорбинска киселина и њен јон L-дехидроаскорбат). Активна форма АК је аскорбат (**Схема 3**), јак редукујући агенс, донор електрона ензимима и у реакцијама неутралисања слободних радикала. Оксидацијом аскорбата једним електроном ствара се релативно стабилан, слабо реактивни аскорбил радикал (познат и као монодехидроаскорбат или семидехидроаскорбат). Губитком још једног електрона, аскорбил радикал се оксидује до дехидроаскорбата (DHA). Унутар ћелије се DHA брзо редукује до АК, чиме се спречава повратак у ванћелијску средину и омогућава акумулација аскорбата супротно концентрационом градијенту. Аскорбинска киселина улази у ћелије помоћу котранспортера зависних од натријума (SVCT1 и SVCT2; енгл. *sodium-dependent vitamin C transporter*), док DHA улази у ћелије олакшаном дифузијом, путем глукозних транспотера (GLUT1 и GLUT3). Показано је да већина типова ћелија, укључујући и малигне ћелије, доминантно преузима АК из ванћелијске средине у облику DHA који се затим у унутарћелијској средини конвертује у АК (May, 2012; Ngo и сар., 2019). С обзиром на то, може се сматрати да процеси који доводе до оксидације АК у DHA у ћелијском окружењу фаворизују унос и акумулацију АК у ћелијама. Такође, редукција DHA у АК представља важан корак у одржавању стабилних концентрација АК у ћелији, посебно у условима оксидативног стреса, приликом којих велике количине слободних радикала доводе до смањења унутарћелијског депоа редукованог облика АК.

Физиолошке улоге АК у великој мери зависе од њеног оксидо-редукционог капацитета. АК има кофакторску улогу у ензимским реакцијама, омогућава апсорпцију гвожђа у гастроинтестиналном тракту, пружа ћелијама антиоксидативну заштиту али може имати и прооксидативно дејство. У организму сисара, АК је у највећој концентрацији присутна у нервном ткиву, где учествује у процесима формирања мијелина, диференцијацији и сазревању неурона, као и у модулацији неуротрансмисије (Huang и сар., 2001; May, 2012). Као важан медијатор антиоксидативне заштите, АК доприноси одржавању интегритета биомолекула и геномске стабилности здравих ћелија, а такође смањује споредне ефекте хемиотерапеутика и на тај начин доприноси терапији малигних болести у погледу побољшања квалитета и продужавања живота

пацијената. Међутим, АК може имати и прооксидативно дејство. Интравенском администрацијом високих доза, АК може достићи фармаколошку концентрацију (15 mM) која је до сто пута виша у односу на физиолошке вредности које се постижу оралним уносом АК (Padayatty и сар., 2004). Када је присутна у високој концентрацији, АК може да интерагује са прелазним металима чији су нивои релативно ниски, услед чега се покреће низ реакција праћених производњом РВК. Редукцијом слободних јона гвожђа и бакра у феро (Fe^{2+}) и купро (Cu^+) облик, АК се оксидује до аскорбил радикала. Редуковани $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$ реагују са кисеоником, стварајући $\text{O}_2^{\cdot-}$ који заједно са водоником дисмутацијом прелази у H_2O_2 . Водоник пероксид даље реагује са $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$ и ствара високо реактивни хидроксил радикал и хидроксилни анјон (Pawlowska и сар., 2019). Они нарушавају редокс хомеостазу, на шта су посебно осетљиве малигне ћелије.

Бројне *in vitro* и *in vivo* студије су показале да АК у фармаколошким дозама има антитуморски потенцијал. Као механизам цитотоксичности се најчешће наводи производња H_2O_2 и других РВК које доводе до оксидативног стреса у малигним, без наношења штете здравим, малигно неизмењеним ћелијама (Chen и сар., 2008; Takemura и сар., 2010; Ваек и сар., 2016; Roa и сар., 2020). Антитуморске карактеристике АК нису ограничене само на њено прооксидативно дејство. Познато је да АК инхибира хијалуронидазе, ензиме који разграђују екстраћелијски матрикс и омогућавају ширење малигнућ ћелија. Поред тога, као кофактор хидроксилаза, АК поспешује деградацију и инактивацију HIF-1 α (енгл. *hypoxia-inducible factor-1 α*), који омогућава ћелијама прилагођавање на услове сиромашне кисеоником у туморском ткиву (Roa и сар., 2020; Reang и сар., 2021). Такође, АК утиче и на епигенетичку регулацију метилационог статуса ДНК и експресије тумор-супресорских гена посредоване ТЕТ ензимима (енгл. *ten-eleven translocation*). Ензими ТЕТ представљају Fe^{2+}/α -кетоглутарат зависне диоксигеназе које врше деметилацију цитозина, а користе АК као кофактор за своју каталитичку активност (Shenoy и сар., 2017; Roa и сар., 2020; Reang и сар., 2021).

Менадион и аскорбинска киселина у комбинацији (АК+МД) представљају редокс-активни пар који је, због специфичног синергистичког цитотоксичног дејства на малигне ћелије различитог порекла, привукао пажњу научне заједнице пре више од две деценије (Gilloteaux и сар., 2001; Verrax и сар., 2006; Beck и сар., 2009; Ren и сар., 2019; Semkova и сар., 2020). Основу синергистичке интеракције АК и МД представља неензимски редокс циклус између аскорбата и МД који се одвија у цитосолу (**Схема 3**). Током ових реакција се стварају велике количине $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 и долази до снажног оксидативног стреса у туморским, али не и у малигно неизмењеним ћелијама истог порекла (Semkova и сар., 2020).

Фармаколошки достижне концентрације АК и МД имају селективно дејство на малигне ћелије, са занемарљивим ефектом на редокс стање и вијабилност малигно нетрансформисаних ћелија и ткива. Један од разлога циљаног дејства комбинације АК и МД на ћелије тумора је селективно одвијање редокс циклуса у дисфункционалним митохондријама малигнућ ћелија, за разлику од митохондрија здравих ћелија, праћено оштећењем транспортног ланца електрона и неповратним смањењем количине АТР (Bakalova и сар., 2020). Поред тога, здраве ћелије су заштићеније од оксидативног стреса који се ствара током редокс циклуса између МД и АК, јер се у њима МД пренилује до витамина K₂, услед чега се смањује његова доступност за улазак у реакцију са АК (Nakagawa и сар., 2010; Nakagawa и сар., 2019; Bakalova и сар., 2020).

Иреверзибилна оштећења туморских ћелија, изазвана дејством комбинације АК и МД, завршавају се ћелијском смрти. Слично самом МД, комбинација АК+МД може изазвати апоптозу зависну од каспаза или AIF (енгл. *apoptosis inducing factor*), ћелијску

смрт која подсећа на некрозу зависну или независну од PARP (енгл. *poly ADP-ribose polymerase-1*), као и специфичан облик ћелијске смрти који се означава као аутошиза, а представља појаву карактеристичну за ћелије третиране комбинацијом АК+МД (Gilloteaux и сар., 2001; Verrax и сар., 2006; Beck и сар., 2009; Gilloteaux и сар., 2010; Bonilla-Porras и сар., 2011; Gilloteaux и сар., 2014; Ren и сар., 2019). Антиглиобластомски потенцијал АК+МД је показан и *in vitro* и *in vivo*, на различитим ћелијским линијама глиома, ћелијским културама изолованим из пацијената са глиобластомом, као и мишевима код којих је извршена интеркранијална трансплантација ћелија хуманог глиобластома (Vita и сар., 2011; Ren и сар., 2019; Semkova и сар., 2020; Sumiyoshi и сар., 2023). Позитивни исходи преклиничких студија увели су комбинацију АК+МД, као изузетно ефикасан антитуморски редокс пар, у клиничка истраживања, где је потврђена њихова ефикасност у борби против малигних ћелија простате (Lasalvia-Prisco и сар., 2003; Tareen и сар., 2008). Данас се комбинација АК и МД (такође позната као *Apaton®*) користи у терапији карцинома простате градуса 3 и 4. Постигнути резултати код пацијената са узнатпредовалим стадијумом ове болести, код којих стандардни терапијски режим није био учинковит, су обећавајући. Ову комбинацију је, због њеног јединственог дејства, Америчка Управа за храну и лекове (енгл. *U.S. Food and Drug Administration*) уврстила у категорију лекова за ретке индикације (енгл. *Orphan Drugs*).

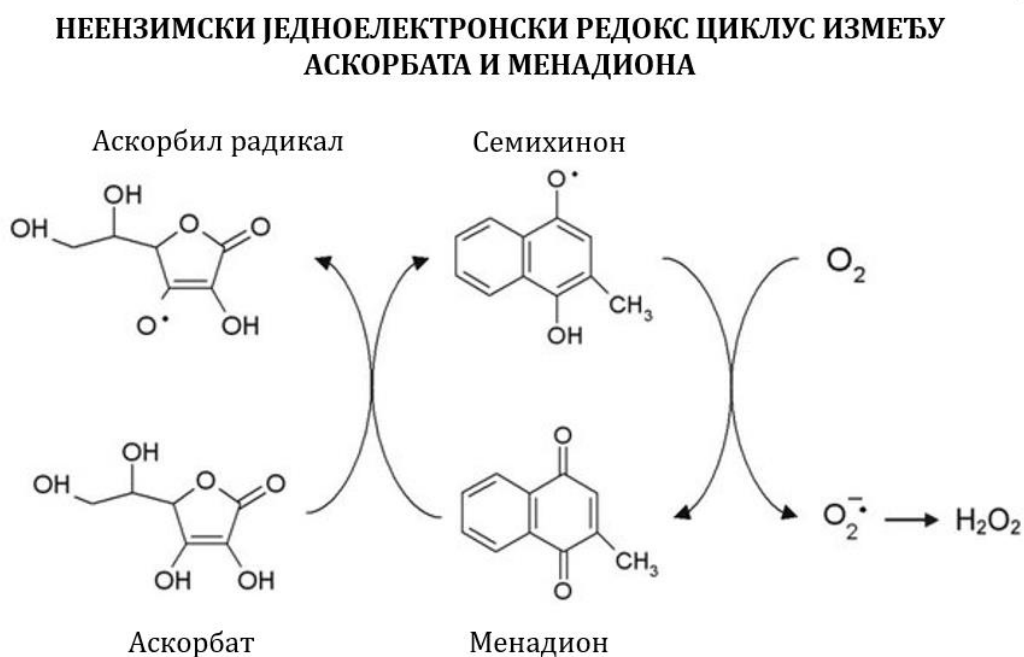


Схема 3. Редокс циклус између аскорбата и менадиона.

1.6. Механизми ћелијског умирања

Животни циклус ћелије се завршава ћелијском смрти и овај процес има важну улогу у хомеостатском одржавању броја ћелија у здравим ткивима. Нарушен баланс између пролиферације и смрти ћелија је последица измењених контролних механизма који регулишу ћелијски циклус и представља једну од основних карактеристика малигне трансформације. Нефункционални механизми ћелијске смрти, не само да олакшавају туморигенезу, већ су и разлог развијања отпорности тумора на примењену терапију. Због тога је главни циљ клиничке онкологије проналазак терапије која подстиче ефикасну елиминацију малигних ћелија регулисањем ћелијске смрти.

Ћелијска смрт може бити акцидентална (задесна) и регулисана. **Акцидентална ћелијска смрт** је неконтролисан процес који се јавља готово тренутно, као последица интензивних штетних физичких, хемијских и механичких стимулуса. За разлику од акциденталне, **регулисана ћелијска смрт** се активира и у одсуству стресних услова, као физиолошки програм развића или обнове ткива и у том случају се назива **програмирана ћелијска смрт**. Такође, облици регулисане ћелијске смрти се могу покренути и под утицајем промена у унутарћелијској и ванћелијској средини, које својим интензитетом или дужином трајања превазилазе адаптивне одговоре који би одржали ћелијску хомеостазу ненарушеном. Регулисана ћелијска смрт је посредована активацијом специфичних молекуларних механизма који је контролишу, због чега може бити модулисана (одложена или појачана) одређеном фармаколошком или генетичком интервенцијом. Макроскопске морфолошке промене којима се манифестује смрт ћелија су, заједно са механизмима којима се мртве ћелије и њихови фрагменти уклањају, узете у обзир приликом дефинисања три главна типа ћелијске смрти: **апоптоза (тип I)**, **аутофагија (тип II)** и **некроза (тип III)** (Galluzzi и сар., 2018). Важност ћелијске смрти у физиолошким и патофизиолошким стањима условила је стално развијање овог поља истраживања, те су тако откривени бројни сигнални путеви који регулишу процес ћелијског умирања и на основу тога описани различити модалитети ћелијске смрти. С обзиром на то да се њихове карактеристике често преклапају, уколико се изузме аутофагија која представља засебан ентитет због својих специфичних улога, до сада откривени облици ћелијске смрти се уопштено могу сврстати у оне које личе на апоптозу (енгл. *apoptosis-like cell death*) и оне које личе на некрозу (енгл. *necrosis-like cell death*).

Апоптоза, активан процес програмиране ћелијске смрти, праћена је карактеристичним морфолошким променама које се завршавају појавом апоптотских тела, делова цитоплазме са густо пакованим интактним органелама окруженим плазма мембраном. На површини апоптотских тела се налазе молекули фосфатидилсерина. Они представљају сигнал за околне ћелије са фагоцитном активношћу да их уклоне, без појаве инфламаторне реакције. Анјонски фосфолипид **фосфатидилсерин (ФС)** је један од најзаступљенијих фосфолипида у већини еукариотских ћелија. Дејством ензима флипазе (енгл. *flippase*), ФС се одржава на унутрашњој, цитосолној страни ћелијске мембране. У почетним фазама апоптозе долази до инактивације флипазе и активације скрамблазе (енгл. *scramblase*), протеина који има улогу у двосмерној трансмембранској транслокацији фосфолипида (Segawa и Nagata, 2015). Услед тога се ФС премешта са унутрашње на спољашњу страну интактне ћелијске мембране. Овај догађај, у литератури познат као **екстернализација ФС**, представља рани знак апоптозе и користи се као важан маркер приликом експерименталне анализе овог процеса. Апоптотска тела формирана у експерименталним условима *in vitro* пропадају у току неколико сати, процесом који се назива **секундарна некроза**. На основу сигнала који је покрећу, разликују се спољашњи (пут рецептора смрти) и унутрашњи (митохондријски) пут апоптозе. Спољашњи пут је инициран на нивоу ћелијске мембране, где се различити сигнали смрти везују за рецепторе смрти из фамилије TNFR (енгл. *tumor necrosis factor receptor*). Унутрашњи пут апоптозе може бити покренут како спољашњим, тако и унутрашњим факторима који за последицу имају промену пропустљивости спољашње мембране митохондрија и губитак мембранског потенцијала. У одговору на пут рецептора смрти активира се каспаза 8, док се током митохондријског пута из ових органела ослобађају фактори који активирају каспазу 9. Међу протеинима који се ослобађају из митохондрија су и фактор који индукује апоптозу – AIF и ендонуклеаза G. Они врше исецање ДНК и кондензацију хроматина независно од активације каспаза. Каспазе -8 и -9 представљају иницијаторске каспазе и оне у каскади апоптотских

догађаја активирају ефекторске каспазе којима припадају каспазе -3, -6 и -7. Активација ефекторских каспаза представља почетак извршне фазе апоптозе. Сматра се да је **активација каспазе 3** догађај који опредељује иреверзибилни ток процеса апоптозе, односно представља сигнал да ће ћелија сигурно умрети апоптозом. У активном месту **каспаза** се налази аминокиселина цистеин, а протеолитичка активност ових ензима је усмерена на С-терминус аминокиселине аспартат у циљним протеинима, на основу чега су и добиле име (енгл. *caspases*, *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) (Alnemri и сар., 1996). У цитоплазми су присутне у неактивној, проензимској форми, као прокаспазе. Када се активирају, каспазе разграђују различите протеине међу којима су структурне компоненте цитоскелета или протеини укључени у репликацију и репарацију ДНК и одржавање геномске стабилности, попут протеина PARP. **Протеолитичка разградња PARP** се сматра карактеристичним обележјем апоптозе. Каспазе протеолитички активирају и ензиме попут ДНК нуклеаза, чиме покрећу каскаду догађаја који резултирају морфолошким и биохемијским променама ћелија карактеристичним за апоптотску смрт.

Некроза, за разлику од апоптозе која се одвија кроз неколико строго регулисаних фаза уз утрошак енергије у виду АТФ и може бити ограничена на појединачне ћелије, представља пасиван ћелијски одговор који углавном захвата групације већег броја ћелија. Истоветни стимулуси који покрећу апоптозу могу бити узрочници и некрозе, уколико је њихов интензитет јак и трајање продужено. Цитоморфологија некрозе се карактерише нарушавањем интегритета ћелијске мембране и органела, појавом цитоплазматских вакуола, бубрењем ћелије, њеним распадањем и изливањем садржаја у околно ткиво, што је углавном праћено инфламацијом. Поред морфолошких разлика, апоптозу и некрозу прате и разлике у биохемијским карактеристикама. За разлику од апоптозе у којој је фрагментација ДНК униформна, током некрозе долази до насумичног исецања ДНК на фрагменте различитих дужина. Иако се примарно повезује са пасивним, нерегулисаним процесом ћелијског умирања, откривени су облици некрозе који су координисани специфичним програмом генетички кодиране ћелијске апаратуре и испољавају морфолошки фенотип сличан некрози, а означавају се као програмирана или регулисана некроза.

1.7. Аутофагија

Аутофагија представља процес разградње оштећених, неправилно формираних и сувишних компоненти цитоплазме или елиминације унутарћелијских патогена у лизозомима и еволутивно је очувана код свих еукариотских организама. Деградацијом ћелијских органела, протеина и макромолекула и рециклирањем добијених мономерних производа генетички контролисаним механизмом, аутофагија учествује у одржавању ћелијске хомеостазе, за коју је неопходно успостављање равнотеже између катаболичких и анаболичких процеса. Начин на који се материјал за деградацију доставља у лумен лизозома дефинише **три морфолошки различита типа аутофагије**: аутофагију посредовану шаперонима, микроаутофагију и макроаутофагију. Супстрати аутофагије посредоване шаперонима су неадекватно савијени протеини са специфичним мотивом у аминокиселинској секвенци, које цитосолни шаперони препознају и појединачно их транспортују кроз мембрану лизозома (Kaushik и Cuervo, 2018). За разлику од друга два типа аутофагије, шаперонима посредована аутофагија не укључује реорганизацију мембрана. Током микроаутофагије долази до инвагинације и протрузије мембране лизозома и на тај начин се делови цитоплазме, који могу садржати и интактне органеле, обухватају и директно убацују у унутрашњост лизозома (Mijaljica и сар., 2011).

Макроаутофагија је највише изучаван облик аутофагије и надаље ће у тексту бити поистовећена са аутофагијом. У овом процесу се садржај предодређен за деградацију издваја из цитоплазме у *de novo* формиране двослојне везикуле, тзв. аутофагозоми. Аутофагозоми долазе у контакт и спајају се са лизозомима, градећи нову везикулу у којој су помешани садржај за деградацију и кисели садржај са хидролитичким ензимима. Ово је вишефазни процес у ком се најпре формира **фагофора**, двомембранска структура која се издужује, селективно или насумично обухвата супстрате из цитоплазме и потом се затвара у сферичну структуру оивичену двоструком мембраном (**аутофагозом**). Аутофагозом испоручује обухваћени садржај лизозому тако што се спољашњом мембраном споји са мембраном лизозома, градећи једнослојну везикулу која се назива **аутолизозом** (фаголизозом). У аутолизозому се испоручени садржај заједно са унутрашњом мембраном аутофагозома разграђује у киселим условима, дејством лизозомалних хидролаза. Производи разградње се враћају у цитоплазму, како би били искоришћени за процесе биосинтезе или стварања енергије (**Схема 4**).

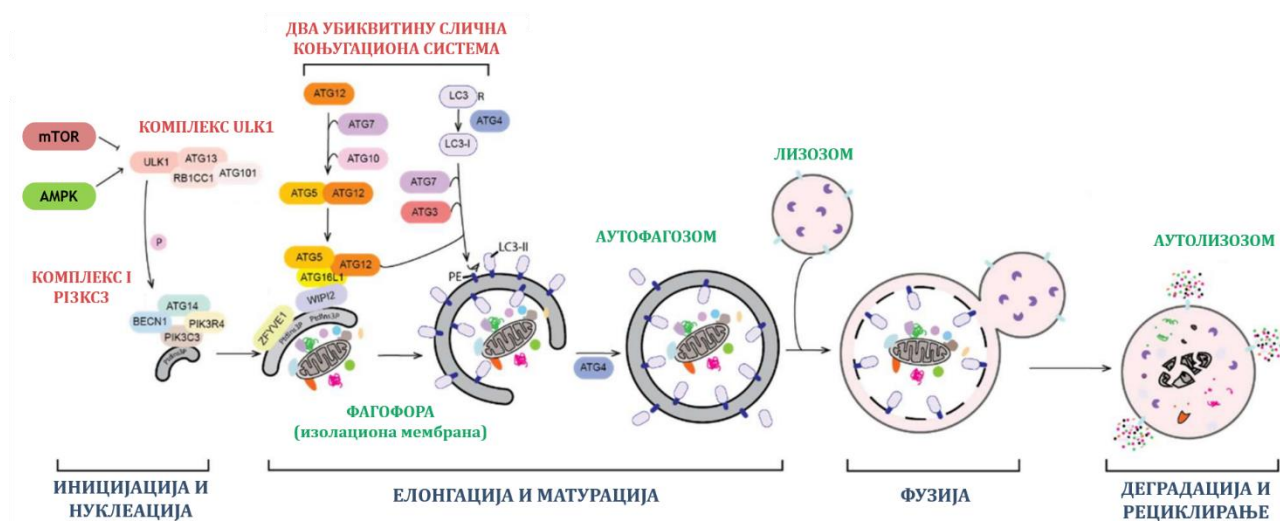


Схема 4. Морфолошке фазе аутофагије и протеини који их регулишу. Процес аутофагије одвија се кроз неколико фаза за које су карактеристичне морфолошки различите структуре. Након индукције аутофагије долази до формирања фагофоре (*иницијација и нуклеација*), потом до њеног издуживања (*елонгација*) и затварања у аутофагозом (*матурација*). Затим наступа фузија аутофагозома са лизозомом, разградња садржаја у новонасталом аутофагозому и враћање производа у цитоплазму (*деградација и рециклирање*). Прикзана схема је преузета (Lei и Klionsky, 2021) и преуређена.

Морфолошке фазе аутофагног процеса координисане су макромолекулским комплексима протеина, који су због своје специфичне улоге у аутофагији названи ATG (енгл. *autophagy related*) протеинима (Galluzzi и сар., 2017). Формирање фагофоре започињу комплекс **ULK1*** (енгл. *UNC-51-like kinase 1*) који се састоји од ULK1, FIP200 (енгл. *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*, познат и као RB1CC1), **ATG13** и ATG101 и комплекс 1 класе III фосфатидилинозитол 3 киназе (PI3KC3-C1), сачињен од липидне киназе члана III класе PI3K – **VPS34** (енгл. *vesicular protein sorting 34*), **беклина-1**, ATG14L и p150. Комплекс PI3KC3-C1 је регулисан кроз интеракције беклина-1 са протеинима као што су **AMBRA1** (енгл. *activating molecule in beclin 1-regulated autophagy protein 1*), **UVRAG** (енгл. *UV radiation resistance-associated*) и **BIF-1** (енгл. *Bax-interacting factor 1*), који делују као позитивни регулатори и неопходни су за индукцију аутофагије. Насупрот њима, RUBICON (енгл. *Run domain Beclin-1-interacting and*

*Подебљаним словима су означени протеини или протеински производи гена који су изучавани у оквиру ове докторске дисертације.

cysteine-rich domain-containing protein) инхибира UVRAG, док се апоптотски протеини **Bcl2**, Bcl-XL (енгл. *B-cell lymphoma-extra large*) и BIM (енгл. *Bcl2-interacting mediator of cell death*) компетитивно везују за беклин-1, услед чега онемогућавају његову асоцијацију са VPS34 и тиме спречавају иницијацију аутофагије.

Када се активира, ULK1 фосфорилацијом активира компоненте PI3KC3-C1. Активирана VPS34 фосфорилише фосфатидинозитол до PIP3. PIP3 регрутује протеине који учествују у елонгацији фагофоре (WIPI2 и ZFYVE1/DFCP1). Ова фаза се одвија помоћу два убиквитину слична коњугациона система. Први је зависан од активности ATG7 и ATG10 и омогућава да се изгради мултипротеински комплекс сачињен од ATG5, ATG12 и ATG16L1 (енгл. *autophagy-related 16-like 1*), који се у виду димера везује за спољашњу мембрану фагофоре. Други систем укључује **ATG3**, ATG4 и ATG7 и неопходан је за исецање протеина из фамилије ATG8 и њихову коњугацију са фосфатидилетаноламином (енгл. *phosphatidylethanolamine*, PE), фосфолипидом који је саставни део мембране фагофоре. Фамилији ATG8 припадају субфамилије **LC3** (енгл. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) и **GABARAP** (енгл. *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*). Цистеин протеаза ATG4 исеца солубилне форме ових протеина, ослобађајући глицин на њиховом С-терминусу. У случају LC3, исецањем се формира **LC3-I** који се активира дејством ATG7. Даље се LC3-I преноси до мембранског ATG3 и на крају се, помоћу ATG12-ATG5-ATG16L1 комплекса, са ATG3 пребацује на PE, прелазећи у липидовани облик **LC3-II** везан за будући аутофагозом. GABARAP пролази кроз сличан процес обраде као LC3, а његова липидована форма (GABARAP-II) колокализује са LC3-II на аутофагозоима (Kirkin и сар., 2009). Липидација LC3 и GABARAP доприноси расту и затварању фагофоре. Након што се фагофора затвори, LC3-II који остане на површини аутофагозома са ње се одваја помоћу ATG4 и потом се рециклира. LC3-II позициониран на унутрашњој страни аутофагозома остаје за њу везан док се заједно са осталим садржајем не деградује у аутолизозоима. Током каснијих ступњева сазревања аутофагозома долази до одвајања ATG протеина са његове површине, а сложени процес фузије аутофагозома са лизозомом је посредован SNARE протеинима (енгл. *soluble N-ethylmaleimidesensitive fusion protein attachment protein receptors*).

Синтеза и обрада LC3 протеина се повећава током процеса аутофагије, а **количина LC3-II корелира са бројем аутофагозома**, тако да овај протеин представља један од кључних раних маркера за експериментално праћење аутофагије. Поред тога што има улогу у елонгацији и затварању фагофоре, LC3 има изузетно важну улогу у одвајању молекула предвиђених за деградацију. Селективни рецептори аутофагије препознају супstrate за деградацију и достављају их до фагофоре тако што својим LIR доменом (енгл. *LC3-interacting region*) интерагују са LC3-II (Mizushima и сар., 2011). Први откривени селективни рецептор аутофагије је **протеин p62**, познат још и као секвестозом 1 (енгл. *sequestosome 1*), протеин који се данас користи као важан показатељ процеса аутофагије (Ichimura и сар., 2008; Bjørkøy и сар., 2009). Молекули и цитосолни делови предодређени за деградацију обележени су убиквитинским ланцем којег препознаје p62. Овај мултифункционални протеин има домен за препознавање убиквитина (енгл. *ubiquitin-associated*, UBA домен), LIR домен и домен за мултимеризацију (PBI домен). Помоћу ових домена, p62 препознаје убиквитиниране протеине и допрема их до LC3-II на аутофагозоима. Формирајући олигомере, p62 омогућава да се више убиквитинираних протеина прикачи на један молекул LC3-II. Заједно са овим протеинима и **p62 подлеже деградацији у аутолизозоима**, због чега се смањење његовог нивоа тумачи као маркер аутофагне разградње (Bjørkøy и сар., 2009).

1.7.1. Киназе и транскрипциони фактори који регулишу процес аутофагије

Централни модулатор процеса аутофагије је mTOR комплекс 1 (енгл. *mTOR complex 1*, mTORC1). Овај комплекс се састоји од серин/треонин киназе **mTOR** и адапторских протеина RAPTOR, MLST8 (енгл. *mTOR-associated protein, LST8 homolog*), PRAS40 (енгл. *proline-rich AKT substrate of 40 kDa*) и DEPTOR (енгл. *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) и функционише као главни репресор иницијације аутофагије (Amaravadi и сар., 2019). mTORC1 се налази под негативном контролом хетеродимера TSC1/TSC2 (енгл. *tuberous sclerosis complex 1/2*) који интегрише сигнале из микроокружења. Главни нисходни супстрат mTORC1 је **S6K**, позната и као p70S6K (енгл. *70 kDa ribosomal protein S6 kinase*), киназа одговорна за синтезу протеина, одржавање хомеостазе глукозе, ћелијски раст и преживљавање. Комплекс mTORC1 одговара на промене у унутарћелијској микросредини, као што су недостатак аминокиселина/глукозе, али одговара и на спољашње стресорне факторе попут хипоксије, UV зрачења или третмана хемијским агенсима. У условима богатим нутријентима, mTORC1 инхибира почетне фазе биогенезе аутофагозома инхибицијом комплекса за формирање фагофоре (ULK1). Иако је иницијациони комплекс ULK1 *per se* стабилан, његово асоцирање са mTORC1 зависи од микросрединских фактора. Киназа mTOR рефлектује енергетски статус ћелије кроз одговор на усходне киназе које контролишу њену активност: АКТ киназу која је активира и протеин киназу активiranу аденозин-монофосфатом (енгл. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK) која је инхибира. У одговору на факторе раста и сигнале који долазе од RTK, **АКТ** киназа фосфорилише TSC2 и тако спречава формирање TSC1/TSC2, у чијем одсуству mTORC1 постаје активан (Inoki и сар., 2002). Такође, АКТ фосфорилише PRAS40, услед чега се он одваја од mTORC1 и тиме појачава његову активност, односно инхибира аутофагију. Поред инхибиције аутофагије, укупни ефекат активације АКТ киназе је стимулација пролиферативних процеса у ћелији. До активације **АМПК** долази током енергетског стреса који се огледа кроз повишен ниво аденозин-монофосфата (AMP) у односу на АТР. Као одговор на недостатак енергије, АМПК покреће катаболичке процесе међу којима је и аутофагија. Активирана АМПК фосфорилише RAPTOR и TSC2 чиме инхибира mTORC1 и на тај начин посредно омогућава комплексу ULK1 да започне процес аутофагије. Поред индиректног дејства на ULK1 комплекс посредством mTORC1, АМПК може директно да активира **ULK1** фосфорилацијом серина на позицијама 317 (**Ser317**), 555 (Ser555) и 777 (Ser777). Интеракција између АМПК и ULK1 није могућа уколико је ULK1 фосфорилисан од стране mTORC1 (фосфорилација серина на позицији 757) (Holczger и сар., 2020). Дакле, у условима када је ћелија нутритивно и енергетски снабдевена, mTORC1 је асоциран са ULK1 комплексом и активност ULK1 је инхибирана (Kim и сар., 2011). У условима нутритивне депривације долази до одвајања mTORC1 од иницијационог комплекса, ULK1 се дефосфорилише и стиче способност да иницира процес аутофагије.

Поред АКТ/mTOR и АМПК/mTOR сигналних путева, у регулацију аутофагије укључене су и **МАРК/JNK киназе**. Свој утицај на процес аутофагије JNK остварује и у једру, и у цитоплазми. Активирана стресним условима из ванћелијског окружења (хипоксија, оксидативни стрес, UV зрачење, гладовање, третман антитуморским агенсима), JNK фосфорилише Bcl2 и омогућава његово одвајање од беклина-1. На тај начин JNK ослобађа беклин-1 да заједно са VPS34, ATG14L и p150 формира PI3KC3-C1 (Wei и сар., 2008; Pattingre и сар., 2009). Такође, JNK утиче на беклин-1 и на транскрипционом нивоу, тако што фосфорилацијом активира c-Jun који се везује за промоторе гена за беклин-1 и активира његову транскрипцију (Li и сар., 2008). Посредством c-Jun, JNK такође покреће транскрипцију гена за ATG5 и ATG7 (Byun и сар., 2009; Yu и сар., 2004).

Главни учесници транскрипционе регулације аутофагије су транскрипциони фактори **TFEB** (енгл. *transcription factor EB*) и **FOXO** (енгл. *forkhead box transcription factors*). Активност TFEB и FOXO је контролисана фосфорилацијом која онемогућава њихов прелазак у једро, чиме је блокирана транскрипција аутофагних гена, а самим тим и аутофагија. **TFEB** се специфично везује за промоторе бројних гена који кодирају аутофагне и лизозомске протеине укључене у закишељавање лизозома, деградацију цитоплазматског матрикса, формирање аутофагозома и њихову фузију са лизозомима (Settembre и сар., 2011). Иако је mTOR главна киназа одговорна за фосфорилацију TFEB у присуству аминокиселина, показано је да АКТ независно од mTOR може да фосфорилише TFEB и спречи његову транслокацију у једро (Martina и сар., 2012; Palmieri и сар., 2017). Фамилија FOXO се састоји од четири члана (FOXO1, FOXO3, FOXO4 и FOXO6). Активност **FOXO1**, **FOXO3** и FOXO4 предоминантно регулише АКТ киназу у одговору на сигнале који преко RTK долазе од инсулина и фактора раста. Поред тога што регулише транскрипцију гена, FOXO1 може да изазове аутофагију на транскрипционо-независан начин: у условима оксидативног стреса или гладовања, FOXO1 се након ацетилације у цитосолу везује за ATG7 и тако поспешује аутофагију директном интеракцијом са кључним регулаторима биогенезе аутофагозома (Zhao и сар., 2010).

Оксидативни стрес, дакле, утиче на најважније регулаторе аутофагије који овај процес контролишу на транскрипционом и посттранскрипционом нивоу. Оксидација ATG4 спречава одвајање LC3-II од PE, услед чега се овај комплекс акумулира на мембрани фагофора и поспешује се стварање аутофагозома. РВК могу инхибирати mTORC1 или активацијом AMPK, што доводи до активације ULK1 комплекса, или инхибицијом АКТ киназе. РВК стабилизују HIF-1 α , омогућавајући му да активира циљне гене међу којима је и BNIP3 (енгл. *Bcl2-interacting protein 1*) који се компетитивно везује за Bcl2 и на тај начин ослобађа беклин-1 за покретање аутофагије. Такође, РВК регулишу процес аутофагије активацијом MAPK сигналног пута који утиче на активност AP-1, FOXO и NF- κ B (енгл. *nuclear factor kappa B*), транскрипционих фактора који индукују експресију аутофагних гена. Аутофагија даље може активирати транскрипционе факторе који учествују у антиоксидативној заштити ћелије и на тај начин смањити количину РВК. Услед селективне деградације Keap1 (енгл. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), у којој посредује p62, долази до ослобађања и активације транскрипционог фактора Nrf2 (енгл. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) и транскрипције гена укључених у антиоксидативни одговор ћелије. Поред тога, аутофагија може утицати на смањење оксидативног стреса рециклирањем оштећених митохондрија, главних извора РВК у ћелијама. Иако на различите начине доприноси превазилажењу штетних ефеката РВК, аутофагија која се јавља као последица оксидативног стреса може бити деструктивна за ћелије у којима је активирана (Ornatowski и сар., 2020; Redza-Dutordoir и Averill-Bates, 2021).

1.7.2. Улога аутофагије у ћелији

Аутофагија се конститутивно одиграва у ћелијама као део базалног метаболизма, одржавајући хомеостазу кроз обраду непотребних или оштећених делова ћелије. Окидач аутофагије може бити и унутарћелијски или ванћелијски стрес различитог порекла, попут гладовања и недовољне доступности енергије, хипоксије, оксидативног стреса, стреса ендоплазматског ретикулума или агрегације протеина (Ravikumar и сар., 2010; Dikić и Elazar, 2018; Rangel и сар., 2021). Обнављањем енергије и градивних блокова биомолекула, аутофагија може помоћи ћелијама да одговоре на стресне услове и у том случају има **цитопротективну улогу**. Међутим, у случају када је прекомерно активирана, аутофагија може деловати и као алтернативни пут ћелијске смрти и тада се означава као **цитотоксична** (Chen и сар., 2014). Поред цитопротективне и цитотоксичне,

предлажу се још два функционална облика аутофагије, а то су непротективна и цитостатичка аутофагија (Gerwitz, 2014).

Иако се базална аутофагија сматра механизмом укљученим у контролу раста и супресије тумора, улога аутофагије у малигној трансформацији, прогресији и лечењу тумора је сложена и зависи од стадијума болести, микроокружења тумора, као и дужине и интензитета стимулуса ком су малигне ћелије изложене. Аутофагни одговор дејствује као систем унутарћелијске контроле који превенира хронична оштећења ћелије и акумулацију дефеката које прати малигна трансформација. Ипак, када се ћелије малигно измене, аутофагија обезбеђује раст, преживљавање и прогресију тумора. Такође, аутофагија смањује осетљивост на унутарћелијске и терапијом изазване услове који би требало да промовишу смрт малигнућ ћелија (Amaravadi и сар., 2019). У умерено стимулираним условима, активација аутофагије води ка одржавању ћелијског преживљавања кроз снабдевање ћелије енергијом. Уколико је тај стимулус неконтролисан или продужен, аутофагија резултује ћелијском смрти која се може одвијати зависно или независно од апоптозе.

Постоје подаци да се, у одговору ћелија глиобластома на ТМЗ, аутофагија покреће као процес уско повезан са одбрамбеним механизмом и резистенцијом на примењену терапију (Elshazly и Gewirtz, 2023). Са друге стране, све је више доказа који указују да је у резистентним глиомским ћелијама аутофагна активност смањена, те да би се проблем резистенције на стандардну терапију могао превазићи применом адјуванаса који активирају аутофагију у ћелијама глиобластома (Palumbo и сар., 2012; Shi и сар., 2017; Li и сар., 2018). Штавише, бројне *in vitro* и *in vivo* студије су показале да је аутофагија главни механизам неапоптотске ћелијске смрти изазване радиотерапијом и терапијом ТМЗ, главним чиниоцима стандардног протокола лечења глиобластома. Након примене клиничких доза зрачења, аутофагија се јавља раније (први дан) у односу на апоптозу (трећи дан). Сматра се да је, међу различитим облицима ћелијске смрти индуковане зрачењем, појава аутофагије најчешћа (Kanzawa и сар., 2004; Zhuang и сар., 2009; Torres и сар., 2011; Zhuang и сар., 2011; Jo и сар., 2014). Како су хемио- и радиотерапија спрегнуте током лечења глиобластома, агенси који имају способност да модулишу аутофагију у правцу њене прекомерне активације, са циљем достизања аутофагне ћелијске смрти, могли би имати потенцијал за унапређење клиничког исхода терапије глиобластома.

Иако је способност МД и комбинације АК+МД да изазову аутофагију показана у ранијим студијама, опречна су тумачења улоге аутофагије коју ови третмани изазивају у различитим ћелијским и експерименталним поставкама (Singh и Czaja 2008; Wang и сар., 2010; Czaja, 2011; Tomasetti и сар., 2012; Yu, и сар., 2012; Gilloteaux и сар., 2014; Borgne и сар., 2017; Galati и сар., 2019; Miyai и сар., 2019; Guizzardi и сар., 2020). Док је аутофагија коју је МД изазвао у HeLa ћелијској линији карцинома грлића материце, U937 ћелијама дифузног хистиоцитичног лимфома и имортализованим хепатоцитима пацова имала цитопротективну улогу, у C2C12 мишјим миобластима МД је изазвао цитотоксичну аутофагију (Wang и сар., 2010; Yu и сар., 2012; Borgne и сар., 2017; Galati и сар., 2019). И у случају комбиновања АК и МД, у литератури су описани различити функционални облици аутофагије. Аутофагија индукована комбинацијом АК+МД је у РС3 хуманим ћелијама карцинома простате деловала цитопротективно, али није имала утицај на преживљавање MCF7 ћелија хуманог карцинома дојке (Beck и сар., 2009; Tomasetti и сар., 2012). Важно је напоменути да је улога аутофагије изазване комбинацијом АК+МД у ћелијској смрти, односно преживљавању, истраживана само помоћу фармаколошких инхибитора аутофагије (Beck и сар., 2009; Tomasetti и сар., 2012), за које је познато да свој утицај на ћелијску вијабилност могу остваривати и независно од аутофагног процеса (Wu и сар., 2010; Harhaji-Trajković и сар., 2012; Stamenković и сар., 2019).

Молекуларни механизми којима комбинација АК+МД изазива аутофагију, као и улога оксидативног стреса у овом процесу, до сада нису испитивани. Такође, још увек није истражен ефекат комбинације АК+МД на индукцију аутофагије у U251 ћелијама хуманог глиобластома, као ни могући утицај на њихово преживљавање. Поред наведених непознаница, предмет ове докторске дисертације је било и испитивање утицаја МД и комбинације АК+МД на активност АКТ и JNK киназа, важних компоненти сигналних путева који су веома често измењени у глиобластомима. С обзиром на то да је значајан антиглиобластомски ефекат инхибитора PI3K/АКТ/mTOR и MAPK/JNK показан на ћелијским и анималним моделима глиобластома (Cheng и сар., 2012; Matsuda и сар., 2012; Vo и сар., 2014; Ríos-Marco и сар., 2015; Narayan и сар., 2017; Song и сар., 2019; Wu и сар., 2020), модулација ових сигналних путева инхибиторима киназа испитана је као потенцијална стратегија за повећање токсичности МД и комбинације АК+МД у култури U251 ћелија.

2. Циљеви

Истраживање спроведено у оквиру ове докторске дисертације било је усмерено ка следећим циљевима:

- Испитати цитотоксичност комбинације АК и МД у култури ћелија хуманог глиобластома U251.
- Испитати тип ћелијске смрти и молекуларне механизме цитотоксичног дејства комбинације АК+МД у култури U251 ћелија.
- Испитати улогу аутофагије у одговору U251 ћелија на цитотоксичну активност комбинације АК+МД.
- Испитати утицај инхибитора АКТ киназе – 10-DEBC и инхибитора JNK киназе – SP600125 на цитотоксичност МД и АК+МД и молекуларне механизме посредством којих 10-DEBC и SP600125 утичу на исход третмана МД и АК+МД у култури U251 ћелија.
- Испитати утицај појединачних и комбинованих третмана МД, АК+МД, 10-DEBC и SP600125 на вијабилност хуманих фибробласта MRC5, као модела малигно неизмењених ћелија.

3. Материјал и методе

3.1. Уређаји и софтвери

Аутоматски читач микротитарских плоча (Sunrise, Tecan, Дорзет, Велика Британија), CmpuSyn софтвер (<https://www.combosyn.com>), CO₂ инкубатор за гајење ћелијске културе (Esco Lifesciences, Хоршам, Пенсилванија, САД), инвертни микроскоп са фазним контрастом Leica DMIL, опремљен Leica Application Suite (верзија 2.8.1) софтвером (Leica Microsystems, Вецлар, Немачка) и Leica Microsystems DF320 камером, уређај за снимање ћелија Bio-Rad ZOE (Bio-Rad Laboratories, Херкулес, Калифорнија, САД), флуоресцентни микроскоп Zeiss Axiovert (Zeiss, Оберкохен, Немачка), ултрамикротом Leica UltraCut UCT (Leica Microsystems, Вецлар, Немачка), трансмисиони електронски микроскоп Morgagni 268D (FEI, Хилсборо, Орегон, САД), камера MegaView III CCD опремљена iTEM софтвером (Olympus Soft Imaging Solutions, Минстер, Немачка), FACSCalibur са CellQuest Pro софтвером (BD Biosciences, Хајделберг, Немачка), FACS Aria III опремљен FacsDiva 6.0 софтвером (BD Biosciences, Фремонт, Калифорнија, САД), FlowJo софтвер (Tree Star, Inc., Ешланд, Орегон, САД), апаратура за вертикално електрофоретско раздвајање протеина (Hoefer Inc, Холистон, Масачусетс, САД), апаратура за полусуви трансфер (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences, Литл Чалфонт, Велика Британија), ChemiDoc Imaging System (BioRad), iBright™ CL1500 Imaging System (Invitrogen, Карлсбад, Калифорнија, САД), ImageJ рачунарски програм (<https://imagej.nih.gov/ij/>, National Institutes of Health, Бетесда, Мериленд, САД), GeneQuant Pro спектрофотометар (Biochrom Ltd., Кембриџ, Велика Британија), Mastercycler Gradient, Realplex² Mastercycler (оба Eppendorf, Хамбург, Немачка).

3.2. Ћелијске линије, *in vitro* култивација ћелија и третмани

Реагенси, раствори и материјал: RPMI 1640 (енгл. *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*, RPMI), серум фетуса говечета (енгл. *fetal bovine serum*, FBS), L-глутамин, натријум пируват, антибиотик-антимикотик раствор (10⁵ U/L пеницилин, 100 mg/L стрептомицин, 0,25 mg/L амфотерицин Б), трипсин/етилендиамино тетрасирћетна киселина (EDTA) (све Capricorn Scientific GmbH, Ебсдорфергруд, Немачка), трипан плаво (Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД), PBS (енгл. *Phosphate Buffered Saline*, PBS – 10 mM) Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7,4 (Центрохем, Стара Пазова, Србија), аскорбинска киселина, менадион, Z-VAD-FMK, Q-VD-OPh, стауроспорин, 3-метиладенин (ЗМА), амонијум-хлорид (NH₄Cl), бафиломицин А1 (BAF), трехалоза (TREN), N-ацетилцистеин (NAC), 1,9 пиразолонатрон (SP600125) (све Sigma-Aldrich), 10-DEBC хидрохлорид (10-DEBC) (Tocris Biosciences, Бристол, Велика Британија), инсулин (Novartis, Базел, Швајцарска). У експериментима су коришћене Петријеве посуде пречника 100 mm и 60 mm, полистиренске плоче са различитим бројем бунара равног дна, као и полипропиленске тубе конусног дна запремина 15 ml и 50 ml произвођача Sarstedt (Нимбрехт, Немачка).

Као модели за испитивање потенцијалног цитотоксичног дејства различитих третмана коришћене су адхерентна ћелијска линија хуманог глиобластома U251, купљена од Европске колекције ћелијских култура (Салсбури, Велика Британија) и адхерентна ћелијска линија феталних плућних фибробласта MRC5, купљена од Америчке колекције ћелијских линија (American Type Culture Collection, АТСС, Манасас, Винсконсин, САД). Ћелијске линије су чуване у течном азоту (на температури -196°C). Ћелије су одмрзаване у складу са стандардним протоколом. Култура ћелија је одржавана у инкубатору у условима влажне атмосфере температуре 37°C, са концентрацијом CO₂ од 5% (у даљем тексту инкубација).

За култивацију ћелија и израду експеримената коришћене су полистиренске Петријеве посуде и полистиренске плоче са различитим бројем бунара равног дна, предвиђене за рад са адхерентним ћелијским линијама. Након одмрзавања, ћелије су култивисане у Петријевим посудама пречника 100 mm, а као медијум за култивацију коришћен је RPMI 1640 са додатком 5% (за U251) или 10% FBS (за MRC5), 2 mM L-глутамин, 1 mM натријум пирувата и 1% антибиотик-антимикотик раствора. По достизању 80% конфлуентности ћелије су са површине Петријеве посуде за коју су адхерирале одлепљиване употребом раствора трипсин/EDTA. Потом су центрифугиране (500 g/5 минута/22°C) и ресуспендоване у медијуму. Након тога је одређиван број ћелија у суспензији култивационог медијума како би, за потребе даљих експеримената, ћелије биле засејане у одговарајућем броју у односу на површину суда у коме су гајене. Узорак ћелијске суспензије бојен је 0,1% раствором боје трипан плаво у PBS, суправиталне боје која улази у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док живе ћелије остају необојене. Овим је омогућено визуелно разликовање живих и мртвих ћелија током бројања. Обојени узорак ћелијске суспензије је наливан на мрежицу хемоцитометра и живе ћелије су пребројаване под увеличањем светлосног микроскопа са фазним контрастом.

За тестове вијабилности ћелије су засејаване у плоче са 96 бунара у густини 1×10^4 ћелија по бунару. Анализе на проточном цитофлуориметру рађене су на ћелијама претходно засејаним у плоче са 6 бунара у густини $2,5 \times 10^5$ ћелија по бунару. За електронску микроскопију, RT-qPCR и имуноблот анализу засејавано је 1×10^6 ћелија у Петријеве посуде пречника 60 mm. Засејане ћелије су након 24 часа мировања третиране аскорбинском киселином, менадионом и њиховом комбинацијом. За детаљније испитивање ефеката наведених третмана ћелије су излагане дејствима инхибитора каспаза (Z-VAD-FMK и Q-VD-OPh), активатора апоптозе (стауроспорин), инхибитора аутофагије (3MA; NH_4Cl ; BAF), активатора аутофагије (TREN), инхибитора АКТ киназе (10-DEBC, перифозин), активатора АКТ киназе (инсулин), инхибитора JNK киназе (SP600125) или антиоксиданса NAC. Детаљни описи третмана наведени су у оквиру графичких приказа добијених резултата.

3.3. Тестови за одређивање ћелијске вијабилности

Реагенси и раствори: 3-(4,5-диметилтиазол-2)-2, 5-дифенилтетразолијум бромид (MTT), кристал виолет, диметилсулфоксид (DMSO) (све Sigma-Aldrich), метанол, сирћетна киселина (Zorka, Шабац, Србија).

Потенцијални цитотоксични ефекат различитих третмана испитан је колориметријским тестовима ћелијске вијабилности, односно одређивањем стопе преживљавања ћелија исказане кроз однос броја живих ћелија присутних у културама инкубираним у присуству и одсуству испитиваних третмана. Број живих ћелија одређиван је индиректно – одређивањем метаболичке активности ћелија помоћу MTT теста и директно – бојењем ћелија кристал виолет бојом која се везује за протеине и ДНК. Резултати MTT и кристал виолет теста су приказани као процентуална заступљеност живих ћелија у одговарајућим третманима у односу на нетретиране, контролне ћелије, чија је вијабилност арбитарно узета као 100%.

3.3.1. MTT тест

MTT тест се заснива на реакцији редукције MTT, тетразолијумске соли жуте боје, до нерастворљивих, љубичасто обојених кристала формазана. Катализатори ове реакције су дехидрогеназе митохондрија које су активне у живим ћелијама. Стога,

интензитет развијене љубичасте боје, добијене растварањем кристала формастана, указује на метаболичку активност анализираних ћелија и директно је пропорционалан броју живих ћелија (Mosmann, 1983).

По истеку инкубације ћелија са одговарајућим третманима, одстрањен је медијум и бунари су испрани PBS пуфером како би се избегле неспецифичне реакције између аскорбинске киселине и МТТ раствора, који је потом додат у бунаре у концентрацији 0,5 mg/ml. Инкубација ћелија у МТТ раствору је трајала 1 сат на температури 37°C. Након тога, раствор МТТ је уклоњен и додат је DMSO, поларни растварач којим су растворени добијени кристали формастана. Интензитет развијене боје је мерен помоћу аутоматског читача микротитарских плоча, при таласној дужини светлости 570 nm.

3.3.2. Кристал виолет тест

Кристал виолет је катјонска боја која се везује за негативно наелектрисане ћелијске молекуле као што су ДНК и протеини. Овај тест се користи за одређивање ћелијске вијабилности адхерентних ћелијских линија. Заснива се на њиховој особини да, када су живе, остају залепљене за подлогу микротитарске плоче, док се ћелије које умиру од ње одлепљују и бивају испране у корацима који претходе бојењу. Тако је интензитет развијене боје директно пропорционалан броју живих ћелија у култури.

Након истека третмана из бунара микротитарске плоче је уклоњен медијум са ћелијама које су се одлепиле од подлоге, а преостале мртве ћелије су уклоњене испирањем бунара PBS пуфером. Монослој адхерентних ћелија је затим фиксиран метанолом током 15 минута на собној температури, након чега су ћелије бојене 10% раствором кристал виолет боје, такође 15 минута на собној температури. Боја која се није везала је темељно испрана водом, а након сушења бунара боја која се везала за ћелијске структуре растворена је 33% раствором сирћетне киселине у води. Интензитет развијене плаво-љубичасте боје је одређен мерењем апсорбанце светлости таласне дужине 570 nm на аутоматском читачу плоча за микротитрацију и директно је пропорционалан броју адхерентних, живих ћелија.

3.4. Математичка анализа интеракције аскорбинске киселине и менадиона

Ефекат третмана који подразумева истовремену примену два агенса огледа се у врсти интеракције коју они међусобно остварују, а која може бити антагонистичка, адитивна или синергистичка. У случају антагонистичког типа интеракције, ефикасност једног агенса се умањује у присуству другог, док адитивни тип интеракције подразумева да је укупни ефекат заједнички примењених агенаса једнак суми њихових појединачних ефеката. Дејство два агенса је синергистичко када ефекат њихове комбинације превазилази суму ефеката које остварују када се примене као појединачни третмани (Chou, 2006) .

У циљу квантитативне анализе узајамног дејства АК и МД, ћелије су третиране појединачним дозама сваког агенса и њиховим одговарајућим комбинацијама. Број живих ћелија је одређен кристал виолет тестом а вредности комбинаторног индекса (енгл. *combination index*, CI) које указују на синергистичку (CI<1), адитивну (CI=1) или антагонистичку (CI>1) интеракцију израчунате су помоћу Чо-Талалај методе (Chou и Talalay, 1984), употребом CompuSyn софтвера (<https://www.combosyn.com>).

3.5. Светлосна микроскопија

Морфолошке промене ћелија хуманог глиобластома U251 су анализиране на инверзном микроскопу са фазним контрастом Leica DMIL који је опремљен Leica Application Suite софтвером (верзија 2.8.1) и Leica Microsystems DF320 камером, или помоћу Bio-Rad ZOE уређаја за снимање ћелија.

3.6. Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)

Реагенси и раствори: глутаралдехид, какодилатни пуфер, осмијум тетроксид, уранил ацетат, епоксидна смола, толуидин-плаво, олово цитрат (све Sigma-Aldrich), етанол (Zorka).

Анализа морфолошких карактеристика и ултраструктурних промена U251 ћелија хуманог глиобластома изложених третманима АК, МД и АК+МД урађена је помоћу трансмисионог електронског микроскопа. Након истека одговарајућих третмана ћелије су испране помоћу PBS, трипсинизоване и центрифугиране у одговарајућим епруветама (500 g/5 минута/22°C). Талози су ресуспендовани у 1 ml PBS и поново центрифугирани при истим условима. Поступак испирања ћелија у PBS је поновљен укупно три пута, при чему су ћелије током последњег испирања центрифугиране у микротубама, при мањој брзини (200 g/5 минута/22°C). Супернатант је пажљиво одстрањен, а на ћелијски талог је наливен 3% глутаралдехид, што је био први корак фиксације ћелија. Фиксирање у глутаралдехиду је трајало најмање 48 h и прекинуто је петоминутним центрифугирањем при брзини 150 g. Супернатант је уклоњен, а талог са ћелијама је испран 5 минута какодилатним пуфером (1 ml, pH 7,3) и затим је поново центрифугиран (150 g/5 минута/22°C). Након троструког испирања уследио је други корак фиксације и то помоћу 1% раствора осмијум тетроксида који је наливен на талог и инкубиран сат времена на 4°C, а потом три пута испран наизменичним наливањем какодилатног пуфера и центрифугирањем (150 g/5 минута/22°C). Талози су преливени са по 1 ml 0,5% уранил ацетата и инкубирани преко ноћи на 4°C. Уранил ацетат је служио као контраст. У наставку процедуре талози су дехидратисани применом градијента растућих концентрација етанола (50%, 70%, 90%, 100%). Овако дехидратисани узорци су даље калупљени у епоксидној смоли, сушени на 60°C током 24 h и потом сечени на ултрамикротому Leica UltraCut UCT. Најпре су направљени семитанки исечци који су после бојења толуидин-плавим коришћени за одабир делова од којих ће бити направљени ултратанки исечци. Ултратанки исечци су позиционирани на бакарне мрежице и контрастирани уранил ацетатом и олово цитратом. Добијени узорци су анализирани помоћу трансмисионог електронског микроскопа Morgagni 268D. Микрографије су направљене камером MegaView III CCD опремљеном iTEM софтвером.

3.7. Проточна цитофлуориметрија

Реагенси и раствори: анексин V коњугован са флуоресцеин изотиоцијанатом, у даљем тексту анексин V-FITC (енгл. *fluorescein isothiocyanate*, FITC; BD Biosciences, Хајделберг, Немачка), пропидијум јодид (енгл. *propidium iodide*, PI), JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензимидазол карбоцијанин јодид), (оба Sigma-Aldrich), ApoStat (R&D Systems, Минеаполис, Минесота, САД), дихидрородамин 123 (енгл. *dihydrorhodamine 123*, DHR), MitoSox Red и лизотрекер црвено (енгл. *LysoTracker Red DND-99*, LTR) (сва три од Thermo Fisher Scientific, Волтам, Масачусетс, САД).

Активација каспаза, транслокација фосфатидилсерина са цитосолне на спољашњу страну ћелијске мембране и оштећења мембране, као догађаји карактеристични за ћелијску смрт, затим, акумулација РВК у цитосолу и у митохондријама, промене потенцијала мембране митохондрија и појава киселих везикула у U251 ћелијама, испитивани су методом проточне цитофлуориметрије (енгл. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS). Коришћени су апарати FACSCalibur са CellQuest Pro софтвером и FACS Aria III опремљен FACS Diva 6.0 софтвером, а добијени резултати су анализирани помоћу FlowJo софтвера. Анализа сваког појединачног узорка обухватала је 10000 ћелија претходно обележених одговарајућим флуорохромима који су, услед екситације упадним зраком светлости одређене таласне дужине, током враћања у основно стање емитовали флуоресценцу одговарајућег интензитета.

3.7.1. Анализа апоптозе и некрозе ћелија

Присуство ћелија у којима су испитивани третмани покренули процес апоптозе или некрозе одређивано је истовременим обележавањем ћелија флуорохромима PI и анексин V-FITC и анализом емитованих флуоресцентних сигнала помоћу проточног цитофлуориметра. Истовремено бојење ћелија флуоресцентним бојама које имају афинитет везивања за различите молекуле пружа могућност разликовања ћелија које пролазе кроз рану фазу апоптозе, касну фазу апоптозе (у литератури позната и као секундарна некроза) или кроз некрозу, као и могућност одређивања њихове заступљености у укупној популацији ћелија анализираних узорка. Протеински део анексин V-FITC комплекса, анексин V, се високим афинитетом везује за остатке фосфатидилсерина на спољашњој страни ћелијске мембране очуваног интегритета (рана фаза апоптозе), или за оне на унутрашњој страни када је интегритет ћелијске мембране нарушен. До оштећења и пермеабилizације ћелијске мембране долази у каснијим фазама апоптозе, као и током процеса некрозе. Оштећења на ћелијској и једарној мембрани омогућавају да PI уђе у ћелије и веже се за ДНК (касна фаза апоптозе/некроза). Услед екситације кохерентним, монохроматским зраком светлости, анексин V-FITC флуоресцира зелено (FL1), док PI емитује црвену (FL2) флуоресценцу. На овај начин је могуће, у оквиру укупне популације ћелија, разликовати ћелије које се у квадрантима тачкастог дијаграма (енгл. *dot plot*) приказују као здраве (анексин⁻/PI⁻), рано апоптотичне (анексин⁺/PI⁻) и касно апоптотичне или некротичне (анексин⁺/PI⁺).

По истеку одговарајућих третмана ћелије су одлепљене од подлоге помоћу трипсин/EDTA, пребачене у одговарајуће FACS епрувете у којима су центрифугиране (500 g/5 минута/22°C) и испране у 1 ml PBS. Анексин V-FITC (2 µg/ml) и PI (20 µg/ml) су припремљени у 100 µl анексин везујућег пуфера и инкубирани са ћелијама у мраку, 15 минута на 37°C. Непосредно пре анализе на проточном цитофлуориметру у суспензију ћелија је додато још по 400 µl пуфера. Резултати су приказани у виду тачкастог дијаграма, уз процентуалну заступљеност одговарајућих ћелијских популација у укупном броју анализираних ћелија.

3.7.2. Мерење активности каспаза

Активација каспаза представља кључни догађај у процесу апоптозе, неопходан за контролисано одвијање ћелијске смрти. Способност третмана који су били предмет овог истраживања да изазову активацију каспаза је анализирана помоћу проточне цитофлуориметрије, након обележавања ћелија пермеабилним пан-каспазним инхибитором ApoStat-ом коњугованим са FITC флуорохромом. ApoStat се селективно везује за све типове каспаза у активној форми, тако да је интензитет зелене

флуоресценце коју емитује FITC (FL1), детектоване на проточном цитофлуориметру, директно пропорционалан активности каспаза у ћелији.

Након што су инкубирани са одговарајућим третманима, ћелије су испране у PBS, одлепљене од подлоге помоћу трипсин/EDTA и центрифугиране (500 g/5 минута) у одговарајућим FACS епруветама. Талог је ресуспендован у 100 μ l медијума за култивацију у ком је растворен ApoStat (0,5 μ g/ml). Након 30 минута инкубације у мраку на 37°C, сваком узорку је додат PBS и боја која се није везала за активне каспазе испрана је центрифугирањем. Добијени ћелијски талог је ресуспендован у 500 μ l PBS и овако припремљени узорци су анализирани на проточном цитофлуориметру. Пораст интензитета зелене флуоресценце третираних, у односу на контролне, нетретиране ћелије, представљао је меру активности каспаза изазвану примењеним третманима. Резултати су приказани у виду процентуалне заступљености ћелија са активним каспазама или као релативна промена интензитета флуоресценце у односу на вредности добијене анализом контролних, нетретираних ћелија, којима је арбитарно додељена вредност 1.

3.7.3. Мерење унутарћелијске продукције слободних кисеоничних радикала

Укупна унутарћелијска продукција PVK и продукција $O_2^{\cdot-}$ у митохондријама одређиване су цитофлуориметријском анализом ћелија обележених редокс сензитивним флуорохромима DHR и MitoSox Red. Неселективна, липофилна боја DHR дифундује кроз ћелијску мембрану и у присуству унутарћелијских PVK се оксидује и прелази из нефлуоресцентне, нејонизоване, у високо флуоресцентну катјонску форму родамин 123. Родамин 123 се накопља у митохондријама и емитује зелену флуоресценцу. MitoSox Red у митохондријама живих ћелија улази у реакцију оксидације са $O_2^{\cdot-}$. У присуству других кисеоничних или азотних слободних радикала MitoSox Red остаје неизмењен, тако да је интензитет црвене флуоресценце коју емитује директно сразмеран нивоу $O_2^{\cdot-}$ у митохондријама.

DHR је додат у културу ћелија заједно са третманима, на почетку инкубације, у финалној концентрацији 2 μ M, док је MitoSox Red у финалној концентрацији 5 μ M додат током последњих 10 минута третмана. По истеку инкубације, ћелије су одлепљене од подлоге помоћу трипсин/EDTA, центрифугиране (500 g/5 минута) и након тога додатним центрифугирањем испране у PBS. Добијени талог је ресуспендован у 500 μ l PBS и суспензија је анализирана на проточном цитофлуориметру. Резултати су представљени на два начина: као релативна промена интензитета флуоресценце DHR (FL1) и MitoSox (FL2) у односу на флуоресценцу коју су емитовале нетретиране ћелије, а за коју је арбитарно узета вредност 1, или у виду хистограма расподеле интензитета флуоресценце емитоване од стране DHR и MitoSox. На хистограмима, померај интензитета флуоресценце третираних ћелија удесно у односу на нетретиране, контролне ћелије, указује на повећану производњу укупних PVK у ћелијама, односно $O_2^{\cdot-}$ у митохондријама.

3.7.4. Мерење потенцијала мембране митохондрија

Промена потенцијала мембране митохондрија анализирана је проточном цитофлуориметријом, након бојења ћелија флуорохромом JC-1. У условима хомеостазе, када је мембрански потенцијал митохондрија очуван, JC-1 услед своје липофилне природе и позитивног наелектрисања пролази кроз негативно наелектрисану митохондријску мембрану. Када се нађе у матриксу митохондрија интактних ћелија, JC-1 се групише у агрегате који емитују интензивну црвено-наранџасту флуоресценцу

(FL2). Када је мембрански потенцијал митохондрија нарушен, а тиме и улазак JC-1 у митохондрије онемогућен, JC-1 остаје у цитоплазми у мономерном облику који флуоресцира зелено (FL1). Пораст интензитета црвене у односу на зелену флуоресценцу (FL2/FL1) указује на хиперполаризацију мембране, односно пораст мембранског потенцијала. Уколико је овај однос (FL2/FL1) смањен, односно уколико постоји повећање зелене у односу на црвену флуоресценцу, дошло је до деполаризације митохондрија, односно пада мембранског потенцијала.

Након истека времена предвиђеног за третмане, ћелије су трипсинизоване и центрифугиране (500 g/5 минута/22°C). Ћелијски талог је ресуспендован и ћелије су инкубиране (20 минута, 37°C) у 100 µl JC-1 везујућег пуфера у ком је растворена боја JC-1 у финалној концентрацији 5 µg/ml. Када је завршена инкубација, ћелије су испране два пута (1 ml PBS) како би се уклонила боја која није ушла у ћелије, затим су ресуспендоване у 500 µl PBS и анализиране на проточном цитофлуориметру. Резултати су приказани као однос црвене флуоресценце агрегата JC-1 (FL2) и зелене флуоресценце мономерних форми (FL1). Пад вредности FL2/FL1 у односу на вредност контроле, арбитрарно узете као 1, указује на смањење потенцијала, односно деполаризацију мембране митохондрија.

3.7.5. Детекција киселих унутарћелијских везикула

Киселе везикуле у живим ћелијама, за које је карактеристично да се јављају у повећаном броју или волумену током процеса аутофагије, детектоване су цитофлуориметријском анализом ћелија обележених флуорохромом LTR и посматрањем ћелија обележених бојом акридин оранж (AO; Sigma-Aldrich) помоћу флуоресцентног микроскопа Zeiss Axiovert.

Боја LTR се састоји од хидрофобне црвене флуорофоре DND-99 која је везана за лизотрекер, слабо базно једињење које је делимично протоновано на неутралном pH и слободно дифундује кроз интактне мембране живих ћелија. У киселој средини лизозома, LTR се протонује и губи способност дифузије кроз мембрану, што обезбеђује локализовану акумулацију овог флуорохрома у киселим везикулама попут лизозома. Након побуђивања ласерским зраком, LTR емитује црвену флуоресценцу чији интензитет корелира са бројем и волуменом киселих везикула у ћелији. По истеку третмана, LTR је додат у медијум за култивацију ћелија у финалној концентрацији 100 nM и ћелије су додатно инкубиране 1 h на 37°C. Након уклањања медијума са раствором бојом, ћелије су испране у PBS, одлепљене од подлоге помоћу трипсина и пребачене у одговарајуће FACS епрувете у којима су центрифугиране 5 минута на 500 g. Добијени талог је ресуспендован у 500 µl PBS. Степен унутарћелијске киселости одређен је мерењем црвене (FL2) флуоресценце помоћу FACSCalibur проточног цитофлуориметра и анализом резултата помоћу CellQuest Pro софтвера. Резултати су приказани као промена средње вредности интензитета флуоресценце у поређењу са нетретираним, контролним ћелијама којима је приписана јединична вредност.

Акридин оранж је метахроматска суправитална боја која се такође протонује и акумулира у киселој средини лизозома. У зависности од киселости средине у којој се налази, акридин оранж емитује различиту флуоресценцу. На неутралном pH једра и цитоплазме овај флуорохром флуоресцира зелено, док у киселој средини лизозома и аутолизозома АО емитује наранџасто-црвену флуоресценцу. Бојење ћелија урађено је по истеку третмана, након испирања бунара у PBS. Ћелије су додатно инкубиране 15 минута у медијуму за култивацију са раствором бојом АО у финалној концентрацији 1 µM и након тога анализиране и фотографисане помоћу флуоресцентног микроскопа.

3.8. Имуноблот анализа

Реагенси, раствори и материјал: инхибитори фосфатаза натријум флуорид (NaF) и натријум ортованадат (Na_2VO_4), инхибитор протеаза фенилметилсулфонил флуорид (PMSF), смеша протеазних инхибитора (енгл. *protease inhibitor cocktail*, PIC), детерџент NP-40 (енгл. *Nonidet P-40*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), Ponceau S, луминол, кумаринска киселина (све Sigma-Aldrich), Tris, албумин серума говечета (енгл. *bovine serum albumine*, BSA), бромфенол плаво, 2-меркаптоетанол, натријум додецил сулфат (енгл. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), акриламид/бисакриламид, глицерол, амонијумперсулфат (APS), N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин (TEMED), глицин (све SERVА, Хајделберг, Немачка), детерџент Tween 20, млеко у праху са 0% млечне масти (Carl Roth, Карлсруе, Немачка), хлороводонична киселина (HCl), натријум хлорид (NaCl), фосфорна киселина (H_3PO_4), метанол, етанол, сирћетна киселина, H_2O_2 (све Zorka), смеша референтних протеина познатих молекулских маса (10-250 kDa, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific), зечја антела на: активну – исечену каспазу 3, p-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, p-p38 (Thr180/Tyr182), p38, p-ERK (Thr202/Tyr204), ERK, p-p70S6K (Thr389), p70S6K, LC3B, PARP1, беклин-1, p-AKT (Ser473), AKT, p-AMPK α (Thr172), AMPK α , p-mTOR (Ser2448), mTOR, p-ULK1 (Ser317), ULK1, β -актин, козје антизечје IgG антители коњуговано са пероксидазом рена (сва Cell Signaling Technology, Данверс, Масачусетс, САД), p-Bcl2 (Ser70) (Santa Cruz Biotechnology, Далас, Тексас, САД), мишја антители специфична за p62 (Novus Biologicals, Литлтон, Колорадо, САД) и TFEB (Santa Cruz Biotechnology), козје антимишје IgG1 (H+L) коњуговано са пероксидазом рена (Southern Biotech, Бермингхам, Алабама, САД). За имобилизацију протеина су коришћене нитроцелулозне мембране (Amersham™ Protran® 0,45 NC nitrocellulose membrane, GE Healthcare, Фрајбург, Немачка). Састав раствора и пуфера коришћених у експериментима наведен је у **Табели 2**.

Заступљеност, активност и посттранслационе модификације циљних протеина у укупном ћелијском екстракту праћени су имуноблот (Western blot) техником. Ова техника је заснована на раздвајању протеина на основу молекулских маса денатуришућом електрофорезом на полиакриламидном гелу, њиховом пребацавању и имобилизацији на нитроцелулозној мембрани која има висок афинитет за везивање протеина, специфичном препознавању протеинског антигена од стране антители и детекцији награђеног комплекса.

3.8.1. Припрема укупног ћелијског екстракта

Ћелије хуманог глиобластома U251 које су претходно изложене одговарајућим третманима су лизирани на леду *пуфером за лизирање ћелија (Табела 2)* припремљеним непосредно пре употребе. Суспензија је инкубирана 15 минута на леду уз повремено мешање на вортексу. Укупан ћелијски екстракт је издвојен у виду супернатанта након центрифугирања (14000 g/15 минута/4°C), прикупљен и складиштен на -20°C до даље анализе.

3.8.2. Одређивање концентрације протеина у ћелијским екстрактима

За квантификацију протеинског садржаја у појединачним ћелијским лизатима примењена је метода по Брадфорду (Bradford, 1976), која се заснива на колориметријској промени боје CBB G-250 услед везивања за протеине у киселој средини. Везивање протеина стабилизује плаву анјонску форму CBB G-250, што је праћено померањем максимума апсорбанце са 465 nm у црвеној на 595 nm у плавој области видљивог дела спектра. Интензитет развијене плаве боје је директно пропорционалан броју изграђених

комплекса између протеина и боје, а самим тим и концентрацији протеина присутних у узорку.

Тест је урађен мешањем *Брадфордовог реагенса* (Табела 2) и узорака протеина укупног ћелијског лизата у односу 1:1000. Абсорбанце су очитаване након 10 минута на читачу за микротитрационе плоче на таласној дужини 590 nm. Абсорбанце раствора познатих концентрација BSA у Брадфордовом реагенсу (5, 10, 15 и 20 mg/ml) искоришћене су за конструисање стандардне криве на основу које су израчунате концентрације протеина у ћелијским екстрактима.

Табела 2. Пуфери и раствори коришћени током имуноблота.

Пуфер/раствор	Састав
Пуфер за лизирање ћелија (енгл. <i>Lysis Buffer</i>)	30 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 20 µl/ml PIC, 2 mM Na ₃ VO ₄ , 50 mM NaF
Брадфордов реагенс	0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% етанол, 10% H ₃ PO ₄ у води
Редукујући пуфер за припрему узорака	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% глицерол, 2 mM 2-меркаптоетанол, 0,002% бромфенол плаво (финалне концентрације након кувања узорака)
Пуфер за електрофорезу (енгл. <i>Running Buffer</i>)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM глицин, 0,1% SDS
Анодни пуфер I	300mM Tris (pH 10,4), 20% метанол
Анодни пуфер II	25mM Tris (pH 10,4), 20% метанол
Катодни пуфер	25 mM Tris-HCl (pH 9,4), 3% глицин, 20% метанол
Раствор Ронсеау S боје	0,2% Ponceau S у 1% сирћетној киселини
TBS пуфер (енгл. <i>Tris Buffer Saline</i>)	20 mM Tris (pH 7,6), 137 mM NaCl
TBS-T пуфер (енгл. <i>Tris Buffer Saline-Tween 20</i>)	20 mM Tris (pH 7,6), 137 mM NaCl, 0,05% Tween 20
Супстрат за пероксидазу	Tris-HCl (pH 8,5), 1,25 mM луминол, 0,2 mM кумаринска киселина, 0,009% H ₂ O ₂
Пуфер за стриповање мембрана (енгл. <i>Stripping Buffer</i>)	100 mM 2-меркаптоетанол, 2% SDS, 62,5 mM Tris (pH 6,8)

3.8.3. Припрема узорака и денатуришућа гел електрофореза

Узорци за електрофорезу су припремљени додавањем одговарајућих запремина *редукујућег пуфера* (Табела 2) ћелијским екстрактима и кувањем 5 минута на 95°C. Кувањем на високој температури протеини се денатуришу, а спречавање формирања дисулфидних веза у денатурираним протеинима постигнуто је додавањем редукујућег агенса 2-меркаптоетанола. Негативно наелектрисани SDS молекули облажу протеине,

обезбеђујући им негативно наелектрисање, након чега се они међусобно разликују само на основу својих молекулских маса.

Протеини из овако припремљених узорак су раздвојени на основу молекулских маса методом денатуришуће електрофорезе у 8%, 10% или 12% полиакриламидном гелу у присуству детергента натријум додецил сулфата (енгл. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Гелови за вертикалну електрофорезу су припремљени тако да је на гел за раздвајање протеина нанет гел за поравнање протеина. Полимеризација гелова је катализована дејством APS као иницијатора и TEMED као акцелератора реакције. У формиране бунаре у гелу за поравнање наливани су узорци у запреминама еквивалентним међусобно једнакој количини протеина (30-50 μg у зависности од анализираног протеина). На сваки гел је нанета и смеша референтних протеина познатих молекулских маса у циљу одређивања молекулских тежина протеина од интереса. Гелови су преливени *пуфером за електрофорезу* (**Табела 2**). Електрофоретско раздвајање протеина у укупном трајању од 90 минута одвијало се при константном напону. Проласком узорак кроз гел за поравнање (при напону 100 V) постигнуто је да протеини буду у истој хоризонталној равни у тренутку уласка у гел за раздвајање, када је напон повећан на 150 V. По изласку фронта боје бромфенол плаво из гела, електрофореза је прекинута.

3.8.4. Електротрансфер протеина са полиакриламидног гела на нитроцелулозну мембрану

Непосредно по завршетку електрофорезе извршен је пренос („блотоване“) протеина са гелова на нитроцелулозне мембране електроелуцијом, помоћу апаратуре за полусуви трансфер (TE 70 Semi-dry transfer unit) и филтер папира натопљених пуферима за трансфер. Коришћена су три различита пуфера, означена према позицији у односу на аноду и катоду – *анодни пуфер I*, *анодни пуфер II* и *катодни пуфер* (**Табела 2**). Нитроцелулозна мембрана и полиакриламидни гел са протеинима били су у директном контакту, постављени између филтер папира натопљених анодним и катодним пуферима, оријентисани тако да је мембрана била ближа аноди, док се гел са протеинима налазио ближе негативној електроди, односно катоди. Проток струје константне јачине (0,8 mA/cm² мембране) омогућио је кретање негативно наелектрисаних протеина ка аноди, односно њихов прелазак из гела на нитроцелулозну мембрану, за чију су се површину везали хидрофобним и електростатичким интеракцијама. Трансфер протеина је трајао 90 минута и одвијао се на собној температури. Успешност трансфера је потврђивана петоминутним бојењем мембрана Ронсеау S бојом. Боја која се није везала за протеине испрана је 1% сирћетном киселином. Потпуно одбојавање пре даљих корака имуноблота постигнуто је испирањем мембрана PBS пуфером.

3.8.5. Детекција протеина од интереса

Након имобилизације протеина на мембранама, мембране су инкубирани у 10% раствору немасног млека у *TBS-T пуферу* (**Табела 2**), 30 минута на собној температури. На тај начин су површине мембрана за које се нису везали протеини током трансфера блокиране протеинима млека, чиме је спречено неспецифично везивање антитела током наредних корака имуноблота. Блокиране мембране су током ноћи инкубирани са примарним антителима у 5% раствору млека у *TBS-T пуферу*, на температури 4°C, уз благо мешање на ротирајућој подлози. Коришћена су зечја антитела која специфично препознају епитопе следећих протеина: активна – исечена каспаза 3 (1:500), p-JNK (1:600), p-p70S6K (1:600), p-p38 (1:800), LC3B (1:900), PARP1 (1:1000), беклин-1 (1:1000), p-AKT (1:1000), AKT (1:1000), JNK (1:1000), p-AMPK α (1:1000), AMPK α (1:1000),

p-mTOR (1:1000), mTOR (1:1000), p-ULK1 (1:1000), ULK1 (1:1000), p70S6K (1:1000), p38 (1:1000), p-Bcl2 (1:1000), p-ERK (1:2000), ERK (1:2000), β -актин (1:2000) и мишја антитела специфична за p62 (1:2000) и TFEB (1:500). Префикс „p-“ испред ознаке протеина означава да је реч о фосфорилисаним (енгл. *phosphorylated*) формама, док су у заградама наведени запремински односи антитела и раствора млека у *TBS-T пуферу*. Антитела која се нису везала су по завршетку инкубације испрана *TBS-T пуфером*. Испирање на ротирајућој подлози у трајању од 10 минута поновљено је 3 пута, након чега су мембране даље инкубиране са одговарајућим секундарним антителом коњугованим са пероксидазом рена, 75 минута на собној температури. Коришћено је козје антизечје IgG или козје антимишје IgG1 (H+L) секундарно антитело разблажено у 5% раствору млека у *TBS-T пуферу*, у односу 1:2000. По завршетку инкубације мембране су испране у *TBS-T пуферу* (3×10 минута). Уследило је преливање мембрана *супстратом* за пероксидазу (**Табела 2**). Пероксидаза везана за секундарно антитело разграђује H₂O₂ до кисеоника и воде. Кисеоник, даље, реагује са луминолом, а продукт ове реакције је 3-аминофталат који емитује фотон. Интензитет хемилуминисцентног сигнала, пропорционалан количини циљног протеина имобилисаног на мембрани, детектован је помоћу ChemiDoc Imaging System и iBright™ CL1500 Imaging System апарата, а релативне оптичке густине добијених имунореактивних трака интерпретиране су помоћу ImageJ рачунарског програма. Активност AMPK α , AKT, JNK, mTOR, p70S6K, p38, ERK ULK1 и Bcl2 изражена је кроз однос фосфорилисаних и одговарајућих тоталних форми наведених протеина, док је ниво беклин-1, LC3-II и p62 изражен у односу на β -актин. β -актин је коришћен и као показатељ да је у свим испитиваним узорцима била присутна једнака количина укупних протеина. Резултати су приказани у односу на интензитет сигнала у контролним узорцима, којима је арбитрарно додељена вредност 1.

3.8.6. Стриповање мембрана

Након визуелизације трака и детекције хемилуминисцентног сигнала са фосфорилисаних форми протеина од интереса, мембране су подвргнуте тзв. стриповању (енгл. *stripping*), односно излагању условима у којима се са мембрана уклањају комплекси примарног антитела, секундарног антитела и супстрата. На тај начин се мембрана враћа у основно стање, а епитопи на њој имобилисаних протеина се ослобађају за нову интеракцију са примарним антителом. Овај приступ је коришћен за одређивање тоталних форми протеина за које су претходно, на истим мембранама, детектовани фосфорилисани облици.

Протокол је подразумевао инкубацију мембрана у *пуферу* за *стриповање* (**Табела 2**), 30 минута у воденом купатилу на температури 50°C. Затим су мембране испране у *TBS пуферу* (**Табела 2**), након чега је поновљена процедура блокирања, инкубације са примарним и секундарним антителом и, коначно, детекције хемилуминисцентног сигнала тоталних форми протеина од интереса.

3.9. Квантификовање експресије гена укључених у процес аутофагије

Реагенси, раствори и материјал: TRIzol реагенс за изолацију РНК (Invitrogen), хлороформ, изопропанол (оба SERVA), насумични хексамерни прајмери, мешавина dNTP (дезоксирибонуклеотид-трифосфат), 5× пуфер за реверзну транскрипцију, RiboLock инхибитор рибонуклеазе, M-MuLV реверзна транскриптаза (енгл. *Moloney Murine Leukemia Virus RevertAid Reverse Transcriptase*, M-MuLV), полимераза и пуфер за полимеразу (Maxima Hot start PCR Master Mix), *TaqMan* прајмери/пробе за *ATG3*, *ATG13*, *FOXO1*, *FOXO3*, *UVRAG*, *SH3GLB1*, *AMBRA1*, *GABARAP*, *PIK3C3*, *BECN1*, *SQSTM1*, *RNA18S* (све Thermo FisherScientific, Волтам, Масачусетс, САД), оптичке плоче и адхезивни филм

за плоче са 96 бунара (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорнија, САД).

Нивои информационог РНК преписаних са гена за протеине укључене у процес аутофагије су одређени методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену којој је претходила реверзна транскрипција (енгл. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR). Ова метода је заснована на преписивању РНК помоћу реверзне транскриптазе у комплементарну ДНК (cDNA) која се даље користи као матрица за термостабилну ДНК полимеразу у ланчаној реакцији полимеразе у реалном времену, током које се добија умножени ДНК продукт. У току qPCR, количина амплификованог продукта се помоћу флуоресцентно обележених проба мери у сваком PCR циклусу, при чему је детекција умноженог ДНК продукта у ранијем циклусу показатељ виших нивоа почетне информационе РНК.

3.9.1. Изоловање и мерење концентрације РНК

Изолација укупних рибонуклеинских киселина из U251 ћелија урађена је помоћу TRIzol реагенса. Ћелије су најпре пола сата инкубирани са АК, МД и њиховом комбинацијом (АК+МД). По истеку третмана, ћелије су одлепљене од подлоге трипсинизацијом, центрифугиране и пребројане тако да је за следеће кораке из сваког узорка издвојен исти број ћелија (2×10^6). Након поновног центрифугирања одстрањен је супернатант, а ћелије у талогу су лизирани TRIzol реагенсом (500 μ l). Ћелијски лизати су прикупљени и пребачени у полипропиленске епрувете запремине 1,5 ml (Eppendorf) и инкубирани 15 минута на собној температури. Затим је у лизате додато 100 μ l хлороформа и након мешања на вортекс апарату узорци су инкубирани 10 минута на 4°C. Уследило је центрифугирање (12000 g/15 минута/4°C) током ког су се узорци раслојили у три фазе: горња, водена фаза је садржала РНК, у интермедијарној фази се налазила ДНК, док је доња, хлороформска фаза била испуњена липидима и протеинима. Горња, водена фаза је пребачена у празне епрувете са конусним дном у које је потом додата једнака запремина изопропанола. Под утицајем изопропанола долази до преципитације РНК. Садржај епрувета је измешан и остављен 30 минута на собној температури, а потом центрифугиран (12000 g/15 минута/4°C). Супернатанти су одстрањени, а талог РНК је два пута опран у 1 ml 75% хладног етанола, петоминутним центрифугирањем при брзини 7500 g на 4°C. Узорци су након испирања остављени на собној температури до потпуног упаравања остатака етанола и достизања стакласте конзистенције, када су ресуспендовани у 20-50 μ l ултрачисте дестиловане воде (ddH₂O). Концентрација РНК у изолатима добијеним на описан начин мерена је спектрофотометријски, помоћу GeneQuant Pro спектрофотометра, сходно упутствима произвођача. Молекули РНК су детектовани мерењем апсорбанце на таласној дужини 260 nm, док је за детекцију протеина примењена таласна дужина 280 nm, а соли и органских растварача 230 nm. Чистоћа раствора је процењена одређивањем односа измерених апсорбанци: A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . Однос A_{260}/A_{280} већи од 1,8 указује да протеини нису присутни у раствору РНК, док однос A_{260}/A_{230} између 2,0 и 2,4 указује на одсуство соли и органских растварача. Изолати РНК свих узорка су задовољавали наведене критеријуме.

3.9.2. Реверзна транскрипција

За реакцију реверзне транскрипције издвојен је по 1 μ g РНК сваког узорка и растворен је у 13 μ l ddH₂O. У водени раствор РНК је додата *реакциона смеша 1* чији је састав наведен у **Табели 3**. Могућност контаминације узорка отклоњена је употребом „негативне контроле“ која је анализирана заједно са узорцима од интереса, али је уместо РНК садржала ddH₂O. Реверзна транскрипција је урађена на апарату Mastercycler Gradient

(Eppendorf), а програм примењених термалних циклуса је описан у оквиру **Табеле 3**. По завршетку првог програма узорци су остављени на леду 5 минута. Сваком узорку је додата *реакциона смеша 2* (**Табела 3**) и 1 μl (200 U/ μl) M-MuLV реверзне транскриптазе. Затим је примењен наредни програм по чијем су завршетку добијени узорци који су представљали комплементарну ДНК преписану са РНК третираних ћелија. Узорци су остављени на температури 4°C до употребе за циклус ланчане полимеразне реакције.

Табела 3. Термални циклуси и реакционе смеше реверзне транскрипције.

1 μg РНК у 13 μl ddH₂O + реакциона смеша 1 (1 μl 100 μM насумичних хексамерних прајмера + 0,5 μl 100 mM dNTP) ↓			
Циклус 1	70°C	10 минута	„топљење“ секундарне структуре РНК
+ реакциона смеша 2* (4 μl пуфера за реверзну транскрипцију + 0,5 μl (40 U/μl) инхибитора рибонуклеазе) + 1 μl (200 U/μl) M-MuLV реверзне транскриптазе* ↓			
Циклус 2	25°C	15 минута	везивање прајмера за РНК
Циклус 3	42°C	60 минута	реверзна транскрипција
Циклус 4	70°C	10 минута	прекидање реакције
Циклус 5	95°C	3 минута	деактивација реверзне транскриптазе
Циклус 6	4°C	неодређено	хлађење узорака

*Додаје се узорцима на леду, по завршетку циклуса 1

3.9.3. Ланчана реакција полимеразе у реалном времену

Квантификација експресије гена који кодирају протеине значајне за процес аутофагије урађена је методом ланчане реакције полимеразе са детекцијом производа у реалном времену након сваког појединачног циклуса, помоћу апарата Realplex² Mastercycler. Реакциона смеша се састојала од 2,5 μl смеше полимеразе и пуфера за полимеразу *Maxima Hot start PCR Master Mix*, 0,25 μl прајмера/проба и 2,25 μl cDNK (cDNK преписана са РНК реверзном транскрипцијом, претходно разблажена 10× у ddH₂O). Сви састојци реакционе смеше су додавани на леду. Коришћени су комерцијално доступни *TaqMan* прајмери и пробе, наведени у **Табели 4**.

Реакциона смеша је инкубирана у оптичким плочама са 96 бунара које су прелепљене адхезивним филмом како би се избегло испаравање узорака. Иницијална денатурација комплементарне ДНК је постигнута инкубацијом узорака на 95°C 4 минута, што је био почетни корак у програму Realplex2 Mastercycler апарата. Потом је уследила

реакција ланчаног умножавања која је имала 40 циклуса у којима су се смењивали денатурација (95°C, 15 секунди) и хибридизација прајмера са матрицом и елонгација, односно синтеза ДНК ланца (60°C, 1 минут). Све реакције су урађене у трипликату, а циклус у току којег је забележено значајно повећање флуоресценце изнад прага од 0,1 релативних флуоресцентних јединица означен је као праг циклуса (енгл. *cycle of threshold*, Ct). Релативна експресија гена изражена је као функција вредности ΔCt ($2^{-\Delta Ct}$), која се добија одузимањем просечних Ct вредности триplikата конститутивно експримираног гена за 18s РНК од просечних Ct вредности триplikата гена од интереса. Резултати су представљени као релативни у односу на вредности добијене анализом експресије гена у контролним ћелијама, арбитрарно подешене на вредност 1.

Табела 4. Преглед коришћених прајмера/проба у RT-qPCR.

Симбол гена	Назив гена на енглеском језику	Протеин	Ознака есеја (<i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>)
<i>ATG3</i>	<i>autophagy related 3</i>	ATG3	Hs00223937_m1
<i>ATG13</i>	<i>autophagy related 13</i>	ATG13	Hs00207186_m1
<i>FOXO1</i>	<i>forkhead box O1</i>	FOXO1	Hs01054576_m1
<i>FOXO3</i>	<i>forkhead box O3</i>	FOXO3	Hs00921424_m1
<i>UVRAG</i>	<i>UV radiation resistance associated</i>	UVRAG	Hs00163433_m1
<i>SH3GLB1</i>	<i>SH3 domain containing GRB2 like; endophilin B1</i>	endophilin-B1; алтернативни назив: Bax-interacting factor 1 (BIF1)	Hs00211220_m1
<i>AMBRA1</i>	<i>autophagy and beclin 1 regulator 1</i>	AMBRA1	Hs00387943_m1
<i>GABARAP</i>	<i>GABA type A receptor - associated protein</i>	GABARAP	Hs00925899_g1
<i>PIK3C3</i>	<i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i>	PIK3C3; алтернативни назив: VPS34	Hs00176908_m1
<i>BECN1</i>	<i>beclin 1</i>	беклин 1	Hs00186838_m1
<i>SQSTM1</i>	<i>sequestosome 1</i>	p62	Hs00177654_m1
<i>RNA18S</i>	<i>18s ribosomal RNA</i>	/	Hs03928985_g1

3.10. Трансфекција ћелија малом интерферирајућом РНК и плазмидним вектором

Реагенси и раствори: липофектамин 2000 (енгл. *Lipofectamine 2000*, Thermo Fisher Scientific), Opti-MEM (енгл. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*, Capricorn Scientific GmbH), мале интерферирајуће РНК (енгл. *small interfering RNA*, siRNA) за *LC3*, *BECN1*, *JNK* и контролна siRNA (све Santa Cruz Biotechnology). Плазмидни вектори су добијени љубазношћу др Виктора И. Королчука (Универзитет у Њукаслу; TFEB, pcDNA3) и професора Марка Питерс-Голдена (Универзитет у Мичигену; муг-АКТ).

У циљу дефинисања улоге аутофагије или одређених протеина у смрти U251 ћелија изазваној примењеним третманима, експресија гена од интереса је позитивно и негативно модулисана. Утишавање експресије гена за *LC3*, беклин-1 и *JNK* постигнуто је ко-транскрипционим генетичким утишавањем, односно РНК интерференцијом помоћу siRNA. Прекомерна експресија гена за TFEB и конститутивно активну миристиловану

АКТ киназу (муг-АКТ) омогућена је убацивањем плазмидног ДНК вектора као носача наведених гена у ћелије. Улазак siRNA и плазмидног вектора у једро омогућен је применом реагенса за трансфекцију – липофектамина 2000 (ЛФ). Липофектамин садржи катјонске липидне субјединице и у воденом раствору формира једнослојне липозомске структуре окружујући негативно наелектрисан генетички материјал. Позитивно наелектрисани липозоми интерагују са негативно наелектрисаном мембраном и ендоцитозом убацују свој садржај у ћелију. Процедура је урађена према упутствима произвођача. За потребе анализе ћелијске вијабилности, U251 ћелије су култивисане и трансфекција је урађена у плочама са 96 бунара, док су за цитофлуориметријску и имуноблот анализу ћелије трансфековане у полистиренским плочама са 6 бунара. Ћелије су култивисане у RPMI 1640 медијуму са 5% FBS, без антибиотика и антимикотика. По достизању 60% конфлуентности, U251 ћелије су трансфековане употребом siRNA (за *LC3*, *BECN1*, *JNK* или контролном siRNA) или ДНК плазмидом (вектором гена за TFEB, муг-АКТ или празним, контролним pcDNA3 вектором). Олигомери siRNA су, према упутствима произвођача, најпре растворени у дејонизованој води у концентрацији 10 μM , а затим су у Opti-MEM трансфекционом медијуму без антибиотика инкубирани 5 минута на собној температури. Истовремено је инкубиран и ЛФ, такође у Opti-MEM медијуму без антибиотика, 5 минута на собној температури. Потом су ова два раствора помешана у једнаким запреминама и инкубирана 20 минута (собна температура) како би се формирали siRNA-ЛФ комплекси. Медијум у ком су ћелије култивисане је замењен медијумом са изграђеним siRNA-ЛФ комплексима, тако да су финалне концентрације биле 100 nm siRNA, 10 ng/ μl TFEB и 1 ng/ μl муг-АКТ, док је ЛФ био разблажен 600 пута, како је препоручено од стране произвођача. Ћелије су наредних 8 h инкубиране у медијуму за трансфекцију који је затим замењен комплетним медијумом за култивацију ћелија и инкубација је настављена током наредних 24 h. Затим су ћелије подвргнуте третманима, детаљно описаним у легендама слика, и даље припремане за анализу вијабилности, проточну цитофлуориметрију и имуноблот анализу.

3.11. Статистичка обрада резултата

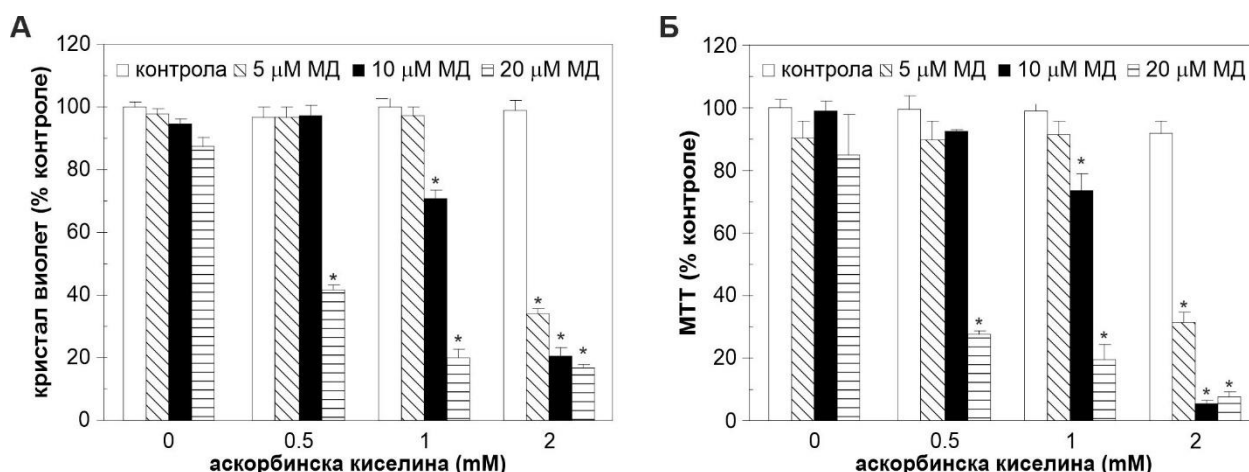
Приликом статистичке обраде података коришћене су методе аналитичке статистике. За процену значајности разлике независних узорака коришћени су параметарски тест – Студентов т-тест, а за анализу статистичке значајности разлике између резултата добијених различитим третманима, коришћена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA), праћена Student-Newman-Keuls тестом за вишеструка поређења. Вредност p мања од 0,05 је сматрана статистички значајном ($p < 0,05$).

4. Результати

4.1. Комбинација АК и МД смањује вијабилност U251 ћелија на дозно- и временски-зависан начин

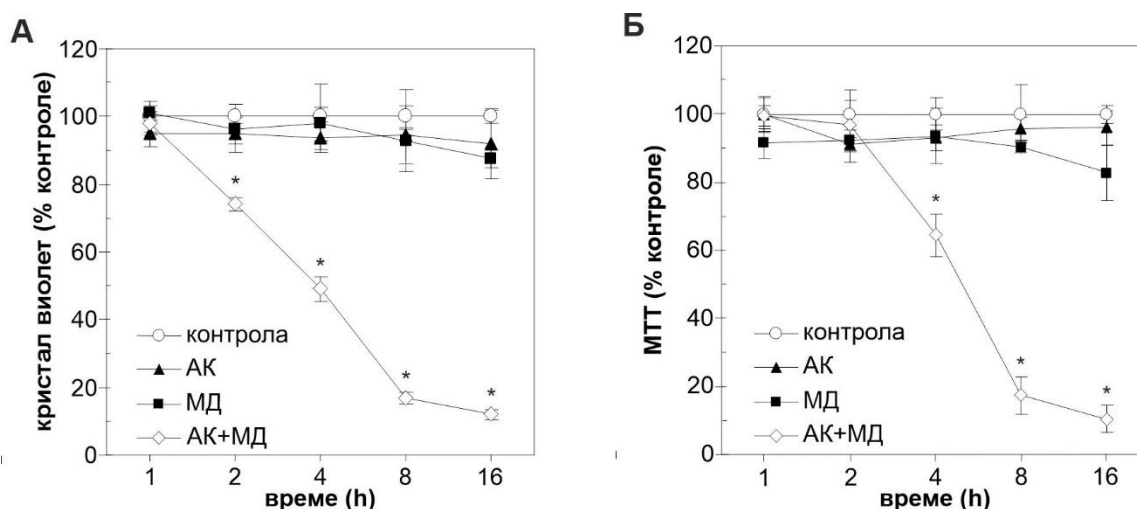
Могуће цитотоксично дејство комбинације АК и МД испитивано је *in vitro*, на ћелијама хуманог глиобластома U251. Ћелије U251 носе мутацију у гену за PTEN, тако да су погодан модел глиобластома код којих PTEN није функционалан. Ћелије су инкубиране 24 h у присуству различитих концентрација АК (0-2 mM), МД (5-20 μ M) и њихових комбинација, након чега је вијабилност одређена колориметријским тестовима кристал виолет и МТТ. Примењене концентрације АК и МД су изабране на основу претходних истраживања (Bakalova и сар., 2020; Semkova и сар., 2020). Живим су сматране ћелије које услед третмана нису изгубиле способност да се причврсте за подлогу и ћелије код којих је активност митохондрија остала очувана.

Ћелије U251 нису биле осетљиве на појединачно примењене дозе АК, док је највиша концентрација МД (20 μ M) благо, али без статистичке значајности, смањила број живих адхерентних (Слика 1А) и број ћелија са активним митохондријама (Слика 1Б). Значајно смањење броја вијабилних ћелија запажено је у култури U251 ћелија на које су истовремено примењени АК и МД. Цитотоксични потенцијал комбинације АК и МД је растао са повећањем њихових појединачних концентрација, тако да је при концентрацији АК од 1 mM значајно смањење ћелијске вијабилности постигнуто и у комбинацији са 10 μ M, и у комбинацији са 20 μ M МД, док је 2 mM АК стимулисао токсичност све три примењене концентрације МД (Слика 1).



Слика 1. Дозно-зависно цитотоксично дејство комбинације АК и МД на ћелије хуманог глиобластома U251. U251 ћелије су инкубиране у присуству различитих концентрација аскорбинске киселине (0,5 – 2 mM) и менадиона (МД; 5 – 20 μ M) примењених појединачно и у комбинацијама, током 24 h. Вијабилност ћелија је одређена кристал виолет и МТТ тестовима. Резултати су приказани као средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног репрезентативног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ представља статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама.

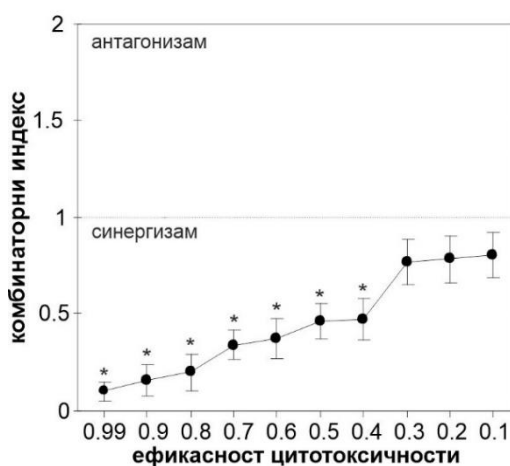
Утицај дужине третмана на вијабилност U251 ћелија испитан је инкубацијом ћелија са 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом током различитих временских интервала (1-16 h). Тестови кристал виолет (Слика 2А) и МТТ (Слика 2Б) су показали да цитотоксичност комбинације АК и МД расте током времена. Заједничким дејством 1 mM АК и 20 μ M МД, смањење вијабилности U251 ћелија за више од 80% достигнуто је већ након 8 h (Слика 2), због чега су ове концентрације АК и МД одабране за третман ћелија у експериментима који су уследили.



Слика 2. Временски-зависно цитотоксично дејство комбинације АК и МД на ћелије хуманог глиобластома U251. U251 ћелије су инкубирани у присуству 1 mM АК, 20 μ M МД и њихове комбинације (АК+МД) током различитих временских интервала назначених на графиконима. Вијабилност ћелија је измерена кристал виолет и MTT тестовима. Резултати једног од три независно спроведена експеримента приказани су као средње вредности $\pm$ стандардне девијације триplikата. * $p < 0,05$ представља статистички значајну разлику у поређењу са нетретираним, контролним ћелијама.

4.2. АК и МД остварују интеракцију синергистичког типа у култури U251 ћелија

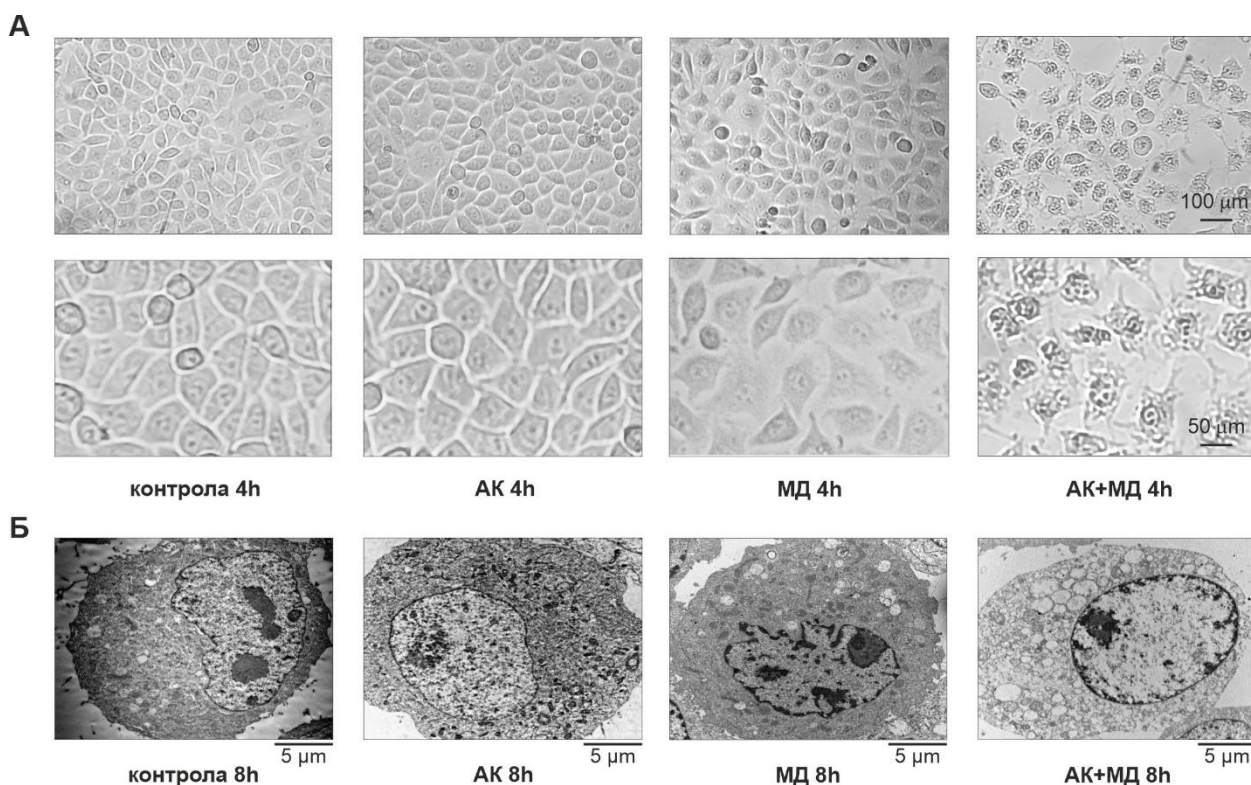
Значајно смањење броја живих ћелија изазвано комбинованим дејством АК и МД, без њиховог појединачног утицаја на вијабилност U251 ћелија, указује да би АК и МД могли остваривати интеракцију синергистичког типа. Коришћењем софтвера CompuSyn, који се заснива на Чо-Талалај методи за одређивање врсте интеракције различитих молекула, израчунат је комбинаторни индекс за комбинације различитих концентрација АК и МД. Вредност комбинаторног индекса је била мања од 1 при распону цитотоксичне ефикасности од 0,1 до 0,99 за сваку од примењених комбинација, што потврђује претпоставку да АК и МД синергистички убијају U251 ћелије глиобластома (Слика 3).



Слика 3. Синергистичко цитотоксично дејство АК и МД у култури U251 ћелија хуманог глиобластома. U251 ћелије су инкубирани у присуству АК и МД, самостално и у комбинацијама. Комбинаторни индекс је израчунат Чо-Талалај методом. Резултати једног од три независно спроведена експеримента приказани су као средње вредности $\pm$ стандардне девијације триplikата. * $p < 0,05$ представља статистички значајну разлику у односу на нетретирание ћелије.

4.3. Комбинација АК и МД изазива морфолошке промене U251 ћелија

Морфологија U251 ћелија изложених дејствима АК, МД и АК+МД посматрана је помоћу инвертног микроскопа са фазним контрастом, а ултраструктурне промене третираних ћелија анализиране су применом трансмисионе електронске микроскопије. Четворочасовни третман појединачним дозама АК и МД није имао утицај на морфолошке карактеристике ћелија: ћелије су задржале полигонални облик и конфлуентност која је била слична контролним, нетретираним ћелијама. У култури третираној АК+МД је већ након 4 h запажено смањење броја ћелија и изразита вакуолизација цитоплазме у скоро свим ћелијама у култури (Слика 4А).

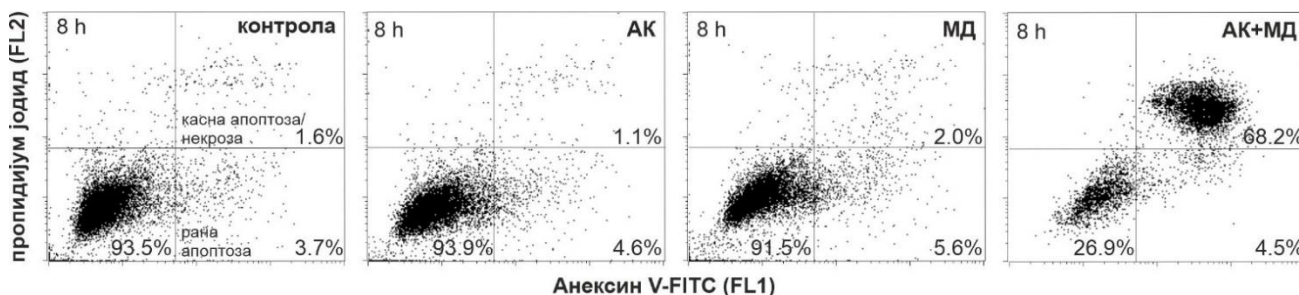


Слика 4. АК+МД утиче на морфолошке и ултраструктурне карактеристике U251 ћелија. U251 ћелије су третиране АК (1 mM), МД (20 μM) и АК+МД. Морфологија ћелија је посматрана након 4 h помоћу инвертног микроскопа са фазним контрастом (А), а ултраструктура ћелија је анализирана трансмисионом електронском микроскопијом након 8 h третмана (Б).

Даљом анализом ћелија трансмисионом електронском микроскопијом (Слика 4Б) након осмочасовног третмана потврђено је да АК не утиче на структуру U251 ћелија. Међутим, ћелије изложене дејству МД претрпеле су промене у виду вакуолизације цитоплазме уз присуство вакуола испуњених ћелијским садржајем, али без јасних знакова који би указивали на ћелијску смрт. Након комбинованог третмана АК+МД биле су очигледне ултраструктурне карактеристике ћелија подлеглих некрози. Дезинтеграција ћелијске мембране, губитак електронске густине и присуство великог броја вакуола у цитосолу, дилатиране митохондрије са просветљеним матриксом и дисконтинуираним кристама, као и очувана једра, указивали су да комбинација АК и МД изазива некрозу U251 ћелија глиобластома. Запажене морфолошке и ултраструктурне промене ћелија третираних АК+МД и одсуство сличног ефекта у културама изложеним појединачним третманима АК и МД били су у складу са резултатима тестова вијабилности и претходно описаном синергистичком интеракцијом АК и МД.

4.4. Комбинација АК и МД изазива некрозу U251 ћелија

Имајући у виду да ултраструктурне промене U251 ћелија третираних АК+МД указују на некрозу, употребом проточне цитофлуориметрије је детаљније истражен тип ћелијске смрти коју изазива комбиновани третман АК и МД. Ћелије су обојене флуорохромима анексином V-FITC и PI, након третмана који је трајао 8 h.



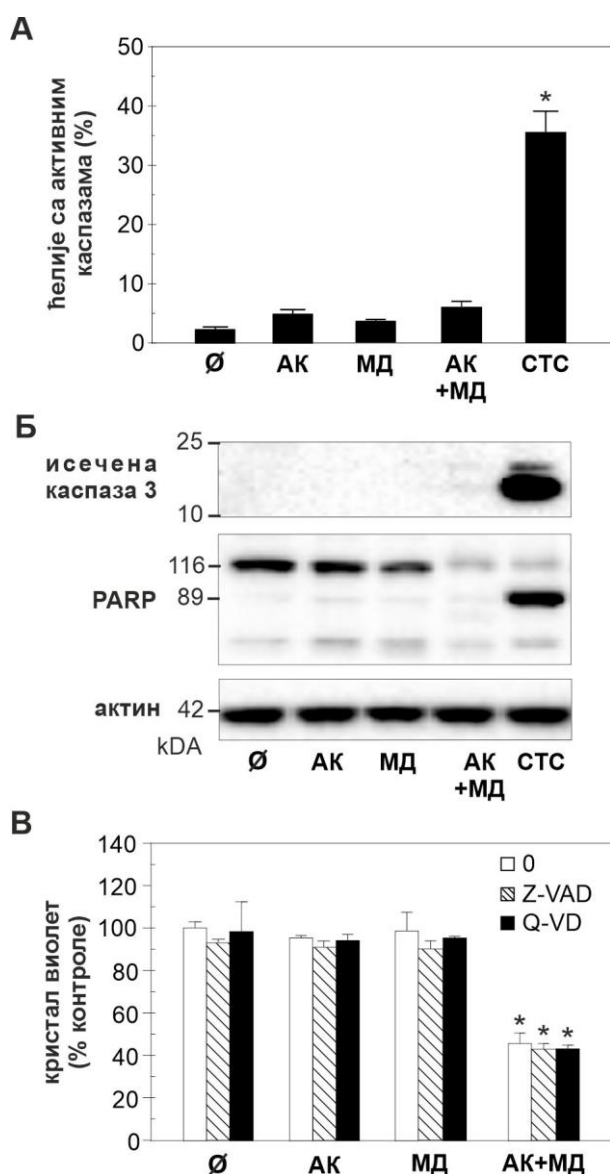
Слика 5. АК+МД изазива некрозу U251 ћелија глиобластома. U251 ћелије су третиране АК (1 mM), МД (20 μ M) и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 8 h и анализиране на проточном цитофлуориметру након бојења флуорохромима анексином V-FITC и пропидијум јодидом. Резултати су приказани као процентуална заступљеност субпопулација ћелија у виду тачкастог дијаграма из једног, од три независно спроведена експеримента.

У складу са претходно добијеним резултатима, анализа ћелија проточном цитофлуориметријом је показала да АК и МД, примењени појединачно, нису утицали на промену положаја фосфатидилсерина на ћелијским мембранама, нити на њихов интегритет (**Слика 5**). Комбинација АК+МД је значајно повећала број ћелија за које су се везала оба флуорохрома (анексин⁺/PI⁺ ћелије), односно ћелија које се налазе у касној фази апоптозе/некрози и позициониране су у горњем десном квадранту тачкастог графика. Број ћелија са екстернализованим фосфатидилсерином и очуваном ћелијском мембраном, односно ћелија у раној апоптози (анексин⁺/PI⁻, доњи десни квадрант) у комбинованом третману остао је непромењен у односу на контролу. Одсуство анексин⁺/PI⁻ ћелија након третмана комбинацијом АК и МД искључује могућност преласка ћелија из ране у касну апоптозу и присуство секундарне некрозе, што указује на то да комбинација АК+МД изазива примарну некрозу ћелија хуманог глиобластома U251.

4.5. Комбинација АК и МД не утиче на активност каспаза у U251 ћелијама

Потврда да комбинација АК+МД изазива примарну некрозу U251 ћелија добијена је испитивањем активности каспаза под утицајем наведеног третмана. Након истека 4 h третмана, ћелије су обележаване пан-каспазним инхибитором ApoStat-ом коњугованим са флуоресцентним молекулом FITC. Цитофлуориметријска анализа је показала да АК и МД, ни појединачно, ни у комбинацији, не утичу на активност каспаза у U251 ћелијама глиобластома. Проапоптотски агенс стауроспорин, који је служио као позитивна контрола за индукцију апоптозе, драстично је повећао број ћелија са активним каспазама (**Слика 6А**). Изостанак активације каспазе 3, главне егзекуторске каспазе процеса апоптозе, потврђен је имуноблот анализом. Стауроспорин је изазвао активацију каспазе 3 и протеолитичко исецање њеног супстрата PARP до изоформе молекулске масе 89 kDa. За разлику од стауроспорина, АК и МД, ни независно, ни у комбинацији, нису повећавали ниво исеченог фрагмента (17/19 kDa) активне каспазе 3, нити протеолитичку разградњу PARP протеина (**Слика 6Б**). Поред тога, каспазни инхибитори Z-VAD-FMK и Q-VD-OPh нису предупредили смрт ћелија изазвану АК+МД

(Слика 6В), што потврђује да каспазно-зависна апоптоза није механизам ћелијске смрти који се покреће у U251 ћелијама као последица комбинованог дејства АК и МД.

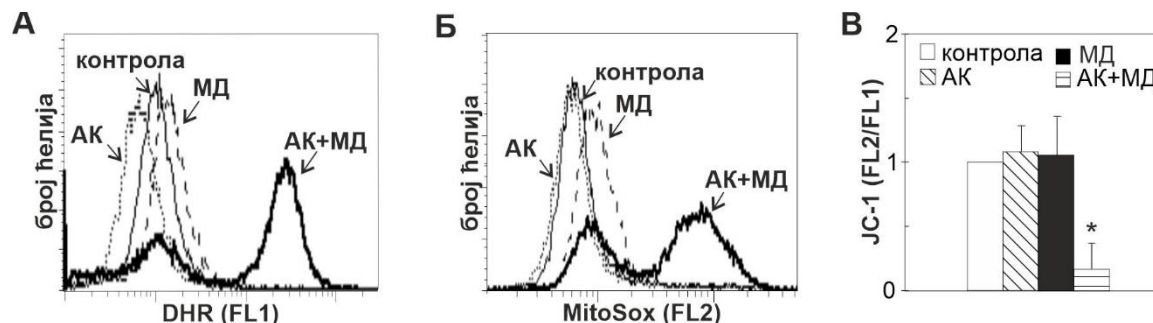


Слика 6. АК+МД не активира каспазе у U251 ћелијама. U251 ћелије су третирале АК (1 mM), МД (20 μ M), њиховом комбинацијом (АК+МД) (А-В) или стауроспорином (СТС; 1 μ M; А, Б), у одсуству или присуству каспазних инхибитора Z-VAD-FMK и Q-VD-OPh (Z-VAD; Q-VD; 10 μ M; В), током 4 h (А, Б, В). Активација каспаза праћена је цитофлуориметријском анализом ћелија обележених пан-каспазним инхибитором Apoptat-ом (А), имуноблот методом су анализирани нивои фрагмената исечене каспазе 3 и протеолитичка разградња PARP (Б) док је ћелијска вијабилност мерена кристал виолет тестом (В). Резултати су приказани као репрезентативни имуноблотови (Б), средње вредности $\pm$ стандардне девијације три независно спроведена експеримента (А) или триplikата једног од три независна експеримента (В). * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним (Ø) ћелијама.

4.6. АК+МД повећава производњу РВК и изазива деполаризацију мембране митохондрија у U251 ћелијама

Познато је да комбинација АК и МД покреће смрт ћелија услед прекомерне производње РВК, оксидативног стреса и иреверзибилног дисбаланса оксидо-редукционог потенцијала у ћелијама (Semkova и сар., 2020). Нивои РВК у U251 ћелијама хуманог глиобластома које су изложене дејству АК, МД и њихове комбинације (АК+МД) мерени су цитофлуориметријски, анализом ћелија обојених редокс-осетљивом бојом дихидрородамин 123 (DHR). Ниво укупних РВК у ћелијама је био благо снижен услед третмана АК, благо повећан након дејства самог МД, док је изразито повећање производње РВК у U251 ћелијама постигнуто комбинацијом ова два третмана (АК+МД) (Слика 7А). Имајући у виду чињеницу да митохондрије имају кључну улогу у производњи РВК и оксидо-редукционим процесима у ћелији (Kang и Pervaiz, 2012), испитано је на који начин наведени третмани утичу на стварање $O_2^{\cdot -}$ у митохондријама и на њихов мембрански потенцијал. Појединачним дејством МД, а посебно његовом комбинацијом са АК, стварање $O_2^{\cdot -}$ у митохондријама је појачано

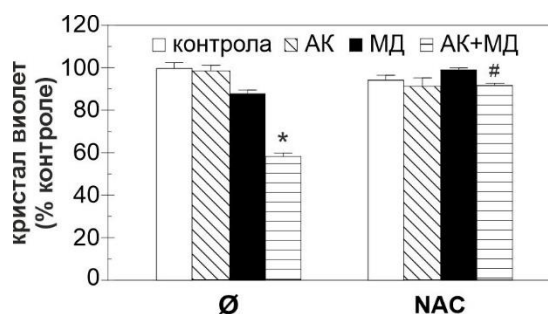
(Слика 7Б), што је показано цитофлуориметријском анализом ћелија обојених бојом MitoSox Red. Као индикатор промене потенцијала мембране митохондрија коришћена је катјонска боја JC-1. Анализа на проточном цитофлуориметру је показала да је после излагања ћелија појединачним третманима АК и МД мембрански потенцијал митохондрија остао очуван, док је комбиновани третман АК+МД довео до деполаризације митохондријске мембране (Слика 7В).



Слика 7. АК+МД изазива оксидативни стрес и деполаризацију мембране митохондрија. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 4 h, након чега су обележаване флуорохромима DHR (А), MitoSox Red (Б) или JC-1 (В). Интензитет флуоресценце, као индикатор нивоа укупних РВК у ћелијама (А), $O_2^{\cdot -}$ у митохондријама (Б) или мембранског потенцијала митохондрија (В), мерен је помоћу проточног цитофлуориметра. Резултати су приказани у виду репрезентативних хистограма (А, Б) или као средње вредности $\pm$ стандардне девијације три независно спроведена експеримента (В). * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама.

4.7. АК+МД изазива смрт U251 ћелија посредством оксидативног стреса

На који начин оксидативни стрес, изазван комбинацијом АК и МД, утиче на ћелијску смрт која наступа као последица овог третмана, испитано је упоредном применом антиоксиданса N-ацетил цистеина (NAC) заједно са третманима АК, МД и АК+МД и одређивањем ћелијске вијабилности кристал виолет тестом. NAC је дериват аминокиселине цистеин и, као прекурсор глутатиона, учествује у обнављању депоа овог важног антиоксиданса или директно уклања слободне радикале у ћелијама (Aldini и сар., 2018).

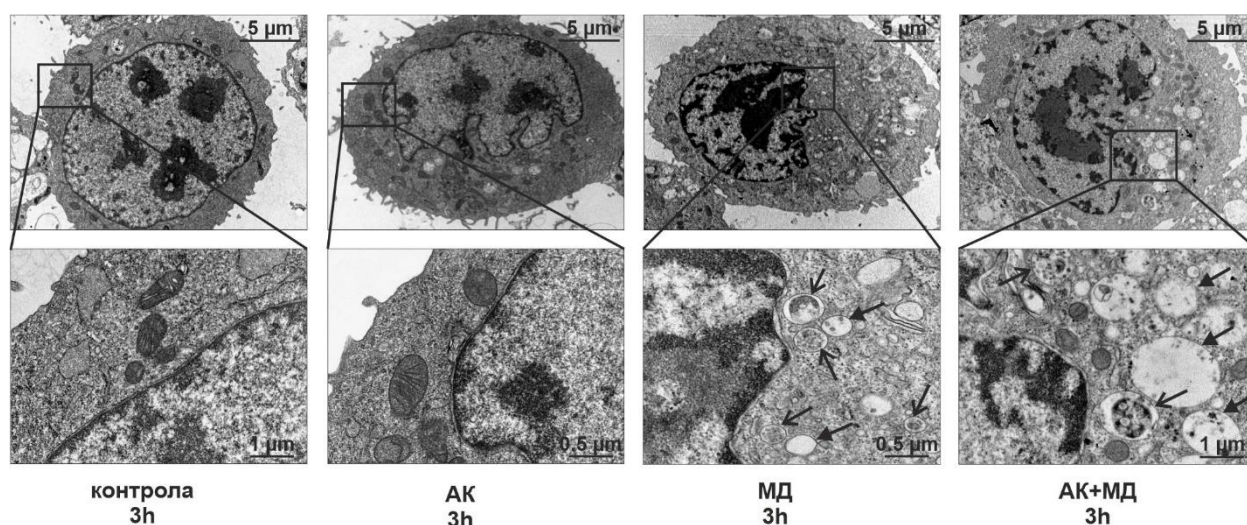


Слика 8. Оксидативни стрес је узрок цитотоксичног дејства АК+МД на U251 ћелије хуманог глиобластома. U251 ћелије су третиране АК (1 mM), МД (20 μ M) и АК+МД током 4 h, у одсуству ($\emptyset$) или присуству антиоксиданса N-ацетил цистеина (NAC; 2 mM). Вијабилност ћелија је мерена кристал виолет тестом, а резултати су приказани као средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама, а # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД.

Тест вијабилности је још једном потврдио да самостално примењени АК и МД немају цитотоксично дејство, док њихова комбинација значајно смањује број живих ћелија. Вијабилност ћелија које су истовремено изложене дејству АК+МД и НАС је остала очувана и није се разликовала од контролних ћелија (**Слика 8**). С обзиром на то да НАС елиминише РВК у цитоплазми, добијени резултат указује на то да прекомерна производња РВК и унутарћелијски оксидативни стрес имају кључну улогу у цитотоксичном дејству АК+МД.

4.8. МД и АК+МД изазивају накупљање киселих аутофагних везикула у U251 ћелијама

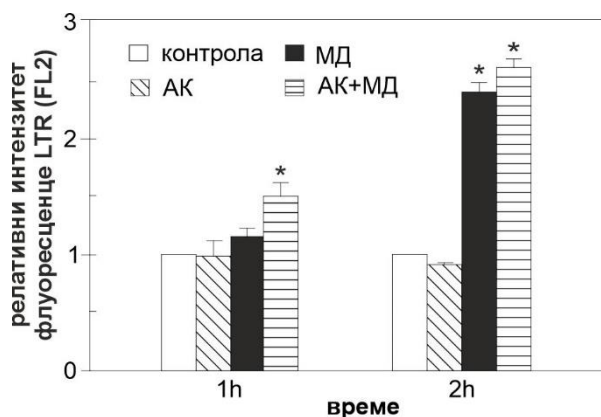
Уочене ултраструктурне промене у виду вакуолизације цитоплазме U251 ћелија третираних МД и АК+МД (**Слика 4Б**) су биле подстицај за испитивање способности наведених третмана да изазову аутофагију. Ћелије су изложене трочасовном дејству АК, МД и АК+МД и након тога је њихова ултраструктура анализирана помоћу трансмисионог електронског микроскопа. Сходно претходно добијеним резултатима, изглед и електронска густина цитоплазме и митохондрија у ћелијама третираним АК нису били промењени (**Слика 9**). Са друге стране, у цитоплазми ћелија третираних појединачном дозом МД, као и његовом комбинацијом са АК, уочене су вакуоле испуњене деловима цитоплазме које су изгледом подсећале на аутофагне везикуле (аутофагозоме и аутолизозоме).



Слика 9. МД и АК+МД изазивају накупљање аутофагних везикула у U251 ћелијама. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 µM МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 3 h, након чега је њихова ултраструктура анализирана трансмисионом електронском микроскопијом. Пуним стрелицама су означене цитоплазматске вакуоле, док једноставне стрелице означавају везикуле налик аутофагозомима и аутолизозомима, испуњене неразграђеним цитоплазматским материјалом. Приказане су репрезентативне микрографије.

Појава аутофагних везикула је даље посредно анализирана помоћу проточног цитофлуориметра, бојењем ћелија рН-сензитивним флуорохромом лизотрекер црвено (LTR), који се селективно акумулира у лизозомима/аутолизозомима. Повећан интензитет флуоресценце LTR детектован је већ након сат времена инкубације ћелија са АК+МД и његов пораст је забележен након 2 h третмана, када је и појединачни третман МД изазвао значајно повећање интензитета флуоресценце LTR (**Слика 10**).

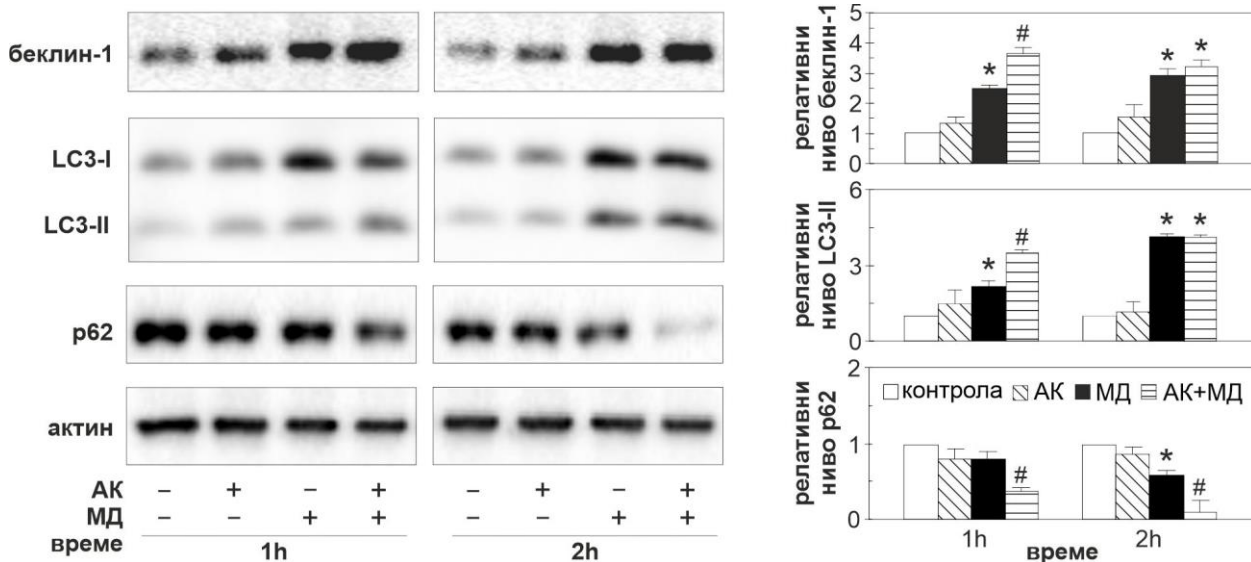
Добијени резултат указује на то да су вакуоле уочене у цитоплазми U251 ћелија изложених дејству МД и АК+МД биле испуњене киселим садржајем, односно да наведени третмани повећавају број/волумен киселих вакуола налик аутолизозомима и лизозомима. Овај резултат такође указује на то да се аутофагне везикуле у комбинованом третману појављују раније у односу на третман самим МД.



Слика 10. МД и АК+МД повећавају број/волумен киселих везикула у ћелијама. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД). Присуство и волумен киселих унутарћелијских везикула су праћени након 1 h и 2 h, цитофлуориметријском анализом ћелија обележених бојом лизотрекер црвено (LTR). Резултати су приказани као средње вредности $\pm$ стандардне девијације три независно спроведена експеримента. * $p < 0,05$ у односу на контролне, нетретиране ћелије, чија је вредност арбитарно узета као 1.

4.9. МД и АК+МД утичу на ниво протеинских маркера аутофагије

С обзиром на то да МД и АК+МД имају потенцијал да повећају број и величину аутофагних везикула, њихова способност да изазову аутофагију у U251 ћелијама је даље испитивана имуноблот анализом протеина који представљају типичне маркере овог процеса.

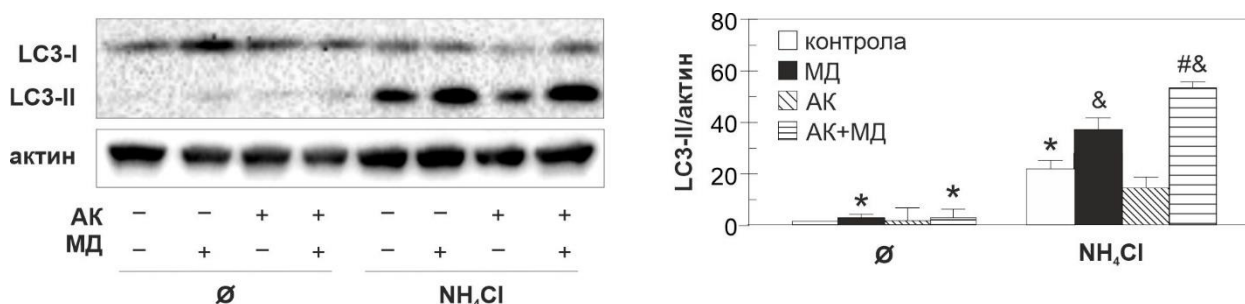


Слика 11. МД и АК+МД повећавају ниво беклина-1, прелазак LC3-I у LC3-II и разградњу p62. Беклин-1, LC3-I, LC3-II и p62 су анализирани имуноблот методом након третмана ћелија 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД), дугих 1 h и 2 h. Релативни ниво анализираних протеина је изражен у односу на актин који је био показатељ једнаке количине укупних протеина у свим испитиваним узорцима. Приказани су репрезентативни имуноблотови из једног од три независна експеримента, заједно са резултатима дензитометријске квантификације који су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са нетретираним ћелијама којима је арбитарно додељена вредност 1; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД.

Ниво беклина-1, протеина са важном улогом у индукцији аутофагије, био је повећан у ћелијама третираним МД и АК+МД. Повећање нивоа беклина-1 је уочено већ након првог сата третмана U251 ћелија са МД и било је израженије када је МД примењен у комбинацији са АК. Након два сата третмана, ефекат МД на ниво беклина-1 је достигао ефекат који је остварила његова комбинација са АК (**Слика 11**). Други важан маркер за праћење аутофагије је конверзија протеина LC3 из LC3-I у LC3-II форму. Протеолитичком разградњом солубилне, цитоплазматске форме (LC3-I) настаје LC3-II форма која се уграђује у мембрану аутофагозома, те је повећање нивоа LC3-II у директној вези са покретањем процеса аутофагије у ћелијама. МД је повећао прелазак LC3-I у LC3-II форму протеина, што је изразито појачано у присуству АК након 1 h, док су се након 2 h третмана ефекти МД и комбинације АК+МД на ниво LC3-II протеина изједначили. Комбинација АК+МД је већ након 1 h третмана изазвала смањење нивоа p62, протеина који допрема убиквитиним обележене молекуле до аутофагозома и са њима бива разграђен током процеса аутофагије. Процес разградње p62 под дејством комбинације АК+МД је настављен, те је ниво овог протеина био нижи након 2 h, док је значајна деградација p62 под дејством МД забележена тек у овом временском интервалу (након 2 h третмана) (**Слика 11**). Ови резултати указују да и МД и комбинација АК+МД покрећу аутофагију у U251 ћелијама, али да се аутофагни процес у ћелијама изложеним само дејству МД одвија различитом динамиком у поређењу са третманом АК+МД.

4.10. МД и АК+МД стимулишу аутофагни флуks у U251 ћелијама

Као што је раније наведено, активација процеса аутофагије је праћена липидацијом цитосолне, LC3-I форме и њеним преласком у LC3-II форму која се регрутује на фагофорну мембрану и остаје закачена за мембрану аутофагозома. Након настанка аутолизозома, аутофагозомални садржај и LC3-II протеини се деградују. Мера деградационе активности аутофагије која подразумева одвијање комплетног процеса, почевши од формирања фагофоре, преко сазревања аутофагозома до деградације и рециклирања материјала у аутолизозомима, дефинисана је као **аутофагни флуks** (Klionsky и сар., 2021).

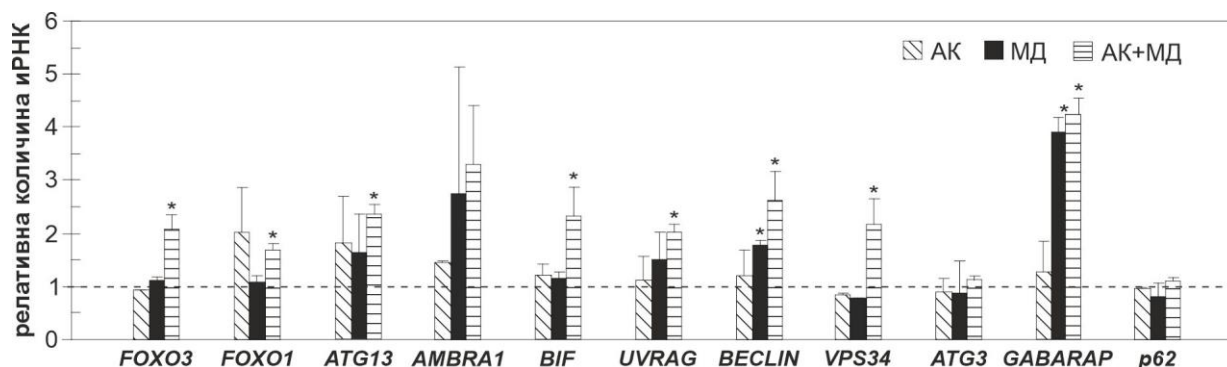


Слика 12. МД и АК+МД појачавају аутофагни флуks у U251 ћелијама. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД), у одсуству (Ø) или присуству амонијум-хлорида (NH₄Cl; 50 mM), инхибитора протеолизе. Конверзија LC3 је испитана имуноблотом након 2 h третмана. Јачина добијених трака квантификована је дензитометријом, а ниво LC3-II форме протеина изражен је у односу на актин, контролни протеин који је указивао на једнообразност количине укупних протеина међу испитиваним узорцима. Приказани су репрезентативни имуноблотови (лево) и средње вредности $\pm$ стандардне девијације резултата дензитометрије из три независна експеримента (десно). * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са нетретираним ћелијама којима је арбитарно додељена вредност 1; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним NH₄Cl+МД; & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним само NH₄Cl.

Да би се повећање нивоа LC3-II са сигурношћу могло интерпретирати као показатељ појачане активације аутофагије, било је неопходно урадити анализу аутофагног флуksа и на тај начин елиминисати могућност да до нагомилавања LC3-II долази услед блокаде његове разградње у аутолизозомима. То је постигнуто двочасовном инкубацијом ћелија са АК, МД и њиховом комбинацијом у присуству и одсуству лизозомалног инхибитора амонијум-хлорида (NH_4Cl) и анализом LC3 протеина имуноблотом. Сâм МД, а нарочито у комбинацији са АК, повећава нагомилавање LC3-II које изазива NH_4Cl , што потврђује да МД и АК+МД повећавају аутофагни флуks, односно имају способност да индукују процес аутофагије у ћелијама хуманог глиобластома U251, а не да блокирају разградњу LC3-II (Слика 12).

4.11. МД и АК+МД појачавају транскрипцију аутофагних гена у U251 ћелијама

Поред анализе аутофагних маркера на посттранслационом нивоу, анализирана је и транскрипција гена који кодирају протеине укључене у регулацију аутофагије. Ефекат АК, МД и АК+МД на ниво информационе РНК одређених гена испитан је RT-qPCR методом. Сама АК није имала утицај на експресију анализираних гена, док је МД појачао транскрипцију *BECN1* и *GABARAP*. Комбиновани третман АК+МД је, поред *BECN1* и *GABARAP*, стимулисао и експресију гена *FOXO1* и *FOXO3* који кодирају транскрипционе факторе укључене у регулацију аутофагије, као и експресију *ATG13*, *BIF*, *UVRAG* и *VPS34*, гена чији протеински производи позитивно регулишу аутофагију. Експресија гена за *ATG3* и *p62* није била промењена под утицајем испитиваних третмана (Слика 13). Добијени резултати указују на то да МД, а посебно комбинација АК+МД, након два сата дејства позитивно регулишу аутофагију и на транскрипционом нивоу, активацијом транскрипције гена за транскрипционе факторе и протеине који учествују у иницијацији, елонгацији и завршним фазама процеса аутофагије.

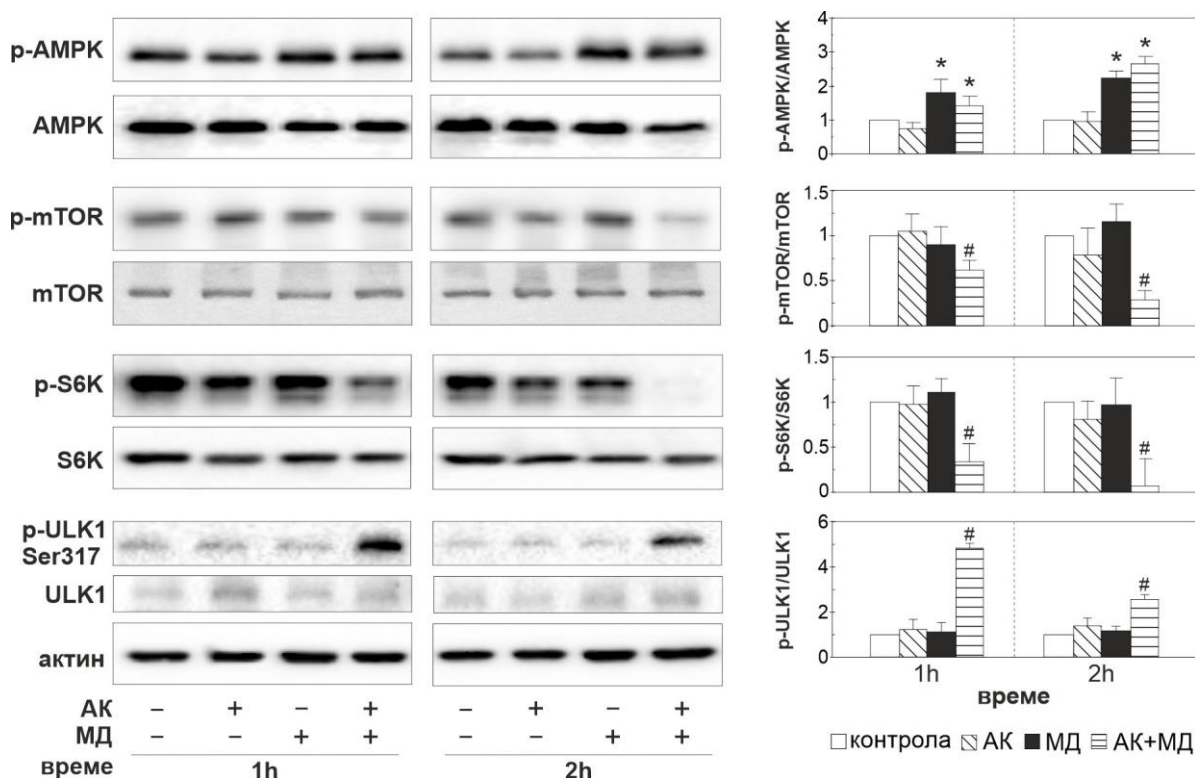


Слика 13. МД и АК+МД појачавају транскрипцију гена чији производи имају важну улогу у процесу аутофагије. U251 ћелије су изложене дејству 1 mM АК, 20 μM МД и њихове комбинације (АК+МД) током пола сата, након чега је анализирана експресија гена повезаних са аутофагијом RT-qPCR методом. Приказани резултати представљају средње вредности $\pm$ стандардне девијације резултата добијених у три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у односу на вредност добијену анализом контролних, нетретираних ћелија која је арбитарно подешена као 1, а на графику је означена хоризонталном испрекиданом линијом.

4.12. АК+МД у U251 ћелијама активира сигналне путеве повезане са аутофагијом

У условима богатим нутријентима, mTORC1 омета формирање функционалног ULK1 комплекса и тако инхибира почетни корак стварања аутофагозома (Amaravadi и сар., 2019). У стању енергетског стреса, AMPK покреће процес аутофагије индиректно – инхибицијом mTORC1, или директно – фосфорилацијом ULK1 (Ser317) и беклина-1, протеина који учествују у иницијацији аутофагије (Amaravadi и сар., 2019).

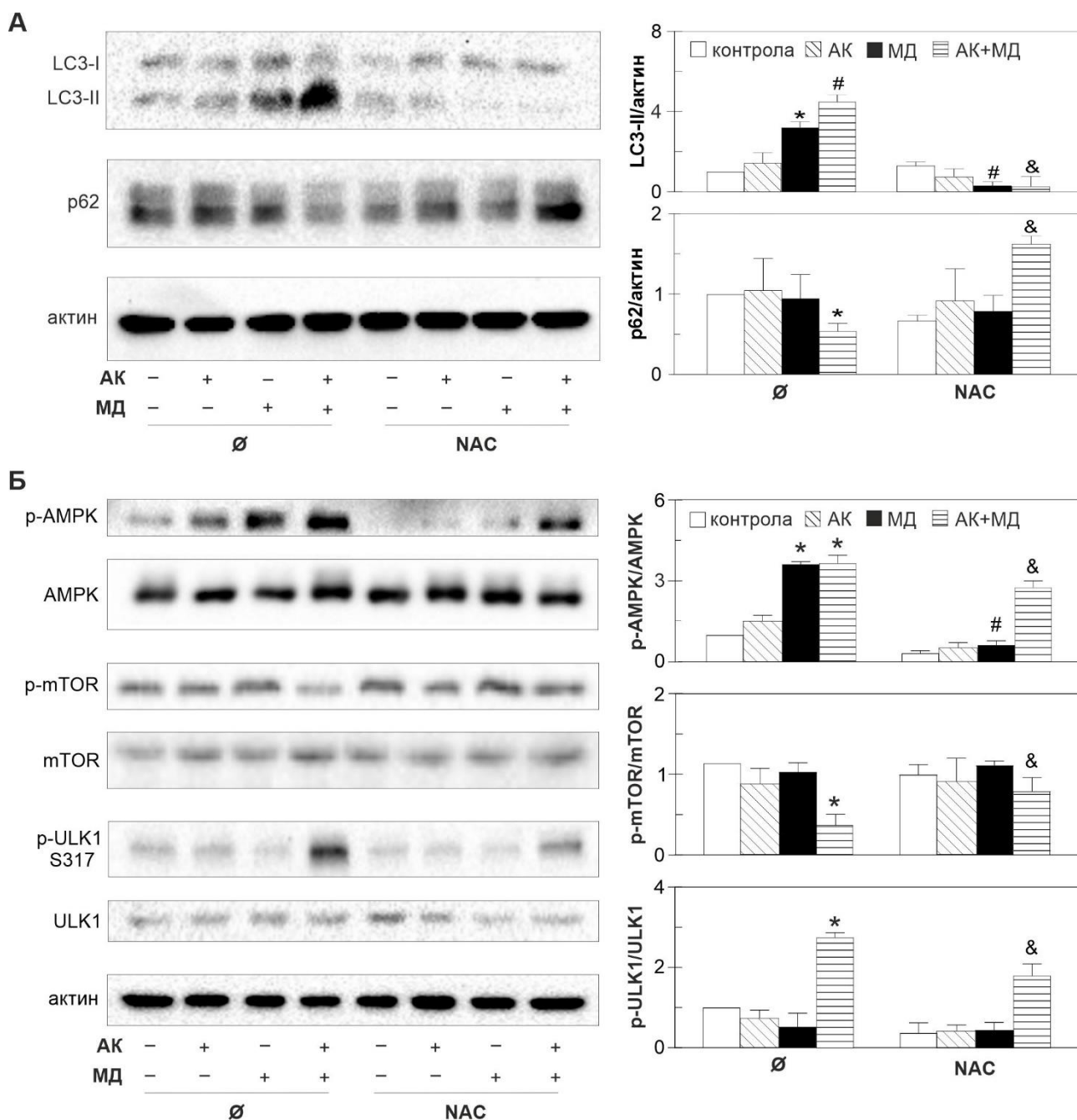
У наредним корацима истраживања је испитивано на који начин АК, МД и АК+МД утичу на степен фосфорилације (маркер активности) протеина AMPK/mTOR сигналног пута. Имуноблот анализа је урађена након третмана дугих 1 h и 2 h. Као и у претходним експериментима, ефекат АК на степен фосфорилације испитиваних протеина је изостао, док су МД и АК+МД значајно повећали фосфорилацију AMPK. Интересантно је то да је једино комбиновани третман АК+МД смањив ниво фосфорилисане форме mTOR и његовог нисходног супстрата S6K и стимулисао AMPK-зависну фосфорилацију ULK1 на позицији Ser317 (Слика 14). Ови резултати сугеришу да је слаб аутофагни одговор изазван третманом МД повезан само са активацијом AMPK, док АК+МД покреће аутофагију јачег интензитета у U251 ћелијама посредством стимулације AMPK/mTOR/ULK1 сигналног пута.



Слика 14. АК+МД активира AMPK/mTOR/ULK1 сигнални пут у ћелијама глиобластома U251. Ћелије хуманог глиобластома U251 су инкубиране са 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 1 h и 2 h. Нивои фосфо-AMPK (p-AMPK), AMPK, фосфо-mTOR (p-mTOR), mTOR, фосфо-S6K (p-S6K), S6K, фосфо-ULK1 на позицији Ser317 (p-ULK1 Ser317), ULK1 и актина су анализирани имуноблот методом и квантификовани дензитометријом. Актин је послужио као контролни протеин који указује да је у свим узорцима присутна иста количина укупних протеина. Приказани су репрезентативни имуноблотови и резултати дензитометрије (ниво фосфорилисане форме у односу на укупни ниво протеина), представљени као средње вредности $\pm$ стандардне девијације резултата добијених у три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама чија је вредност арбитарно узета као 1; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД.

4.13. Оксидативни стрес изазван комбинацијом АК+МД активира сигнални пут AMPK/mTORC1/ULK1 и аутофагију у U251 ћелијама

С обзиром на то да РВК имају важну улогу у индукцији аутофагије (Ornatowski и сар., 2020), као и чињеницу да АК и МД у комбинацији имају снажан прооксидативни потенцијал и изазивају оксидативни стрес у овом експерименталном систему (Слика 7А, 7Б), испитана је веза између ова два догађаја која у U251 ћелијама изазивају МД и АК+МД.

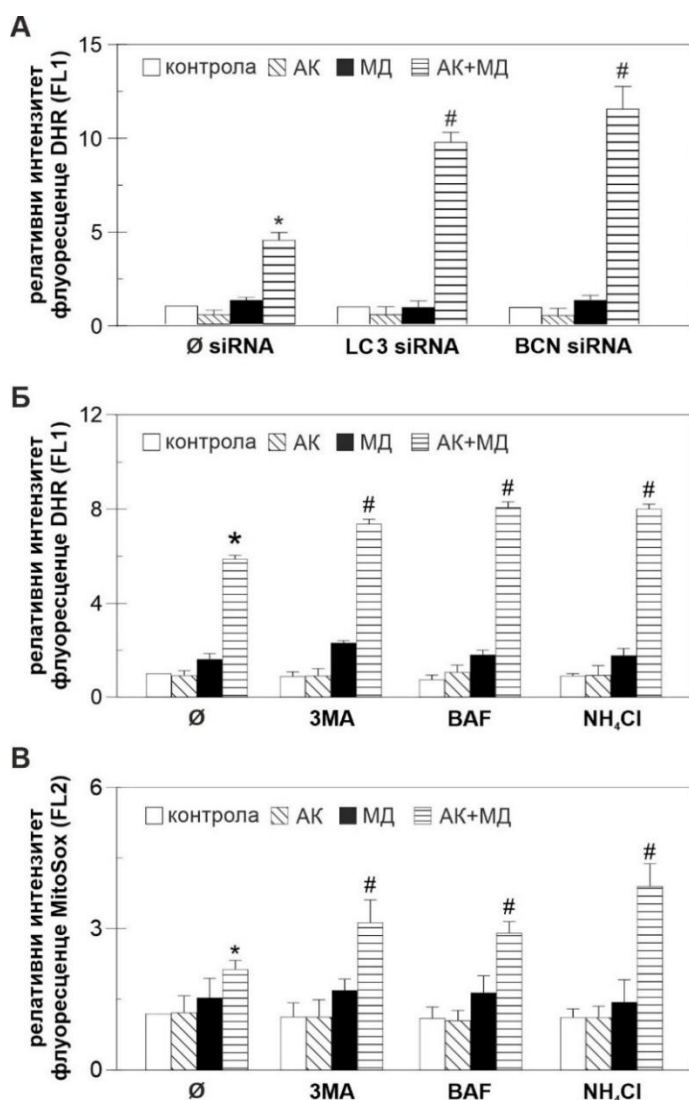


Слика 15. Аутофагија посредована активацијом сигналног пута AMPK/mTOR/ULK1 је последица оксидативног стреса. Ћелије хуманог глиобластома U251 су најпре инкубиране са N-ацетилцистеином (NAC, 2 mM) 30 минута, а потом третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и АК+МД. Алтернативно, ћелије су инкубиране само са АК, МД и АК+МД (Ø). Нивои LC3-I, LC3-II, p62, фосфо-AMPK (p-AMPK), AMPK, фосфо-mTOR (p-mTOR), mTOR, фосфо-ULK1 Ser317 (p-ULK1), ULK1 и актина су испитани имуноблотом након 2 h третмана. Јачина добијених трака квантификована је дензитометријом. Нивои LC3-II и p62 (А) изражени су у односу на актин, контролни протеин који је указивао на једнообразност количине укупних протеина међу испитиваним узорцима. Степен фосфорилације AMPK, mTOR и ULK1 изражен је кроз однос нивоа фосфо-форми и укупног нивоа одговарајућих протеина (Б). Приказани су репрезентативни имуноблотови (лево) и средње вредности $\pm$ стандардне девијације резулата дензитометрије из три независна експеримента (десно). * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола) којима је арбитарно додељена вредност 1; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД; & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису изложене пре-третману NAC (Ø).

Испитивани третмани (АК, МД и АК+МД) примењени су у присуству и одсуству антиоксиданса NAC и након 2 сата њиховог дејства је урађена упоредна анализа нивоа аутофагних маркера имуноблот методом. NAC је предупредио прелазак LC3-I у LC3-II форму који, у одсуству овог антиоксиданса, изазивају МД и АК+МД. Такође, способност комбинације АК+МД да појача разградњу p62 била је спречена у ћелијама које су, поред овог третмана, биле изложене и дејству NAC (Слика 15А). Имуноблот анализа је такође показала да NAC смањује активацију AMPK коју изазивају МД и АК+МД. Овај антиоксиданс је предупредио и инхибицију mTORC1 и активацију ULK1 које изазива комбинација АК и МД (Слика 15Б). Из добијених резултата може се уочити постојање узрочно-последичне везе између прекомерног стварања РВК и активације аутофагије посредством AMPK/mTORC1/ULK1 сигналног пута под утицајем комбинације АК и МД. Такође, ови резултати упућују на то да благо повећање нивоа РВК које је изазвао МД није било довољно за активацију ULK1, нити за инхибицију mTORC1 у U251 ћелијама.

4.14. Аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД смањује ниво РВК у цитосолу и митохондријама U251 ћелија

Имајући у виду чињеницу да се аутофагија активира као механизам антиоксидативне заштите у одговору ћелије на прекомерне количине РВК (Ornatowski и сар., 2020), испитано је на који начин аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД утиче на количину укупних и РВК присутних у митохондријама U251 ћелија.

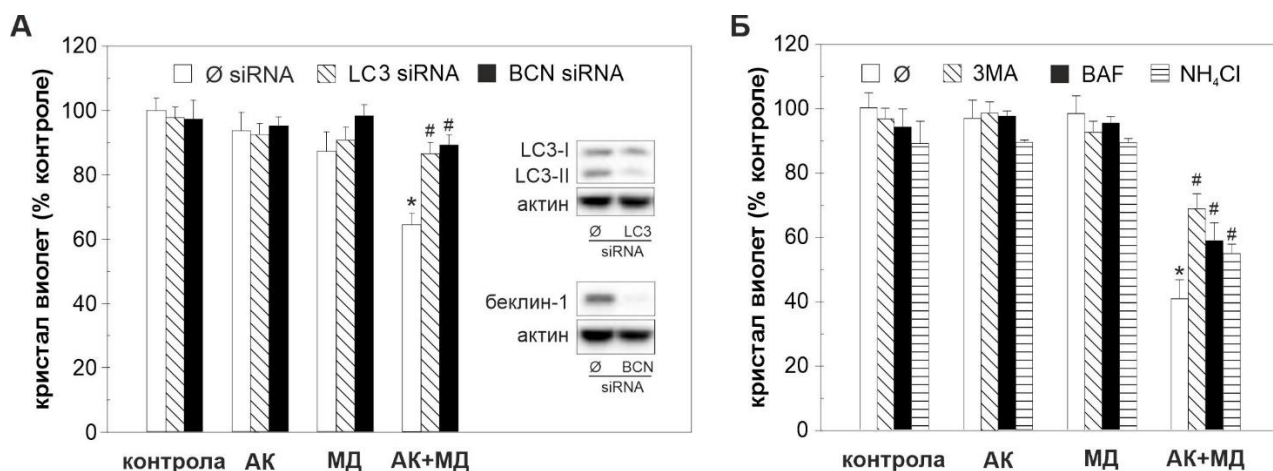


Слика 16. Аутофагија коју изазива АК+МД доприноси уклањању РВК из цитосола и митохондрија U251 ћелија. Ћелије глиобластома U251 су најпре трансфековане контролном (Ø) или малом интерферирајућом РНК (siRNA) за LC3 и беклин-1 (BCN) (А) или су пре третмана инкубиране у присуству 3-метиладенина (3MA; 5 mM), бафиломицина А1 (BAF; 10 nM) или амонијум-хлорида (NH₄Cl; 12 mM) (Б, В), а потом третиране 1 mM АК, 20 µM МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 4 h. Ниво унутарћелијских РВК (А, Б) и O₂⁻ у митохондријама (В) одређен је методом проточне цитофлуориметрије, по обележавању ћелија бојама DHR (А, Б) и MitoSox (В). Резултати су представљени као средње вредности ± стандардне девијације триplikата једног од три независна експеримента. *p<0,05 означава статистички значајну разлику у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола), #p<0,05 у поређењу са ћелијама третираним АК+МД.

Ћелије хуманог глиобластома U251, код којих је процес аутофагије компромитован РНК интерференцијом и применом фармаколошких инхибитора, изложене су четворочасовном дејству АК, МД и АК+МД, а потом су обележене флуорохромима DHR и MitoSox. Флуоресценца ових редокс сензитивних боја мерена је проточном цитофлуориметријом. Резултати показују да утишавање гена за LC3 и беклин-1, постигнуто РНК интерференцијом, за последицу има повећање нивоа РВК у ћелијама третираним комбинацијом АК+МД, док је количина РВК у ћелијама које су биле изложене дејству МД остала непромењена. Такође, инхибитори аутофагије ЗМА, BAF и NH_4Cl нису утицали на унутарћелијску производњу РВК запажену у присуству МД, док је акумулација митохондријског O_2^- и РВК у ћелијама третираним АК+МД била значајно повећана њиховим додавањем. Из добијених резултата може се увидети да аутофагија, активирана у U251 ћелијама услед комбинованог дејства АК и МД, има улогу у уклањању РВК које се стварају у цитосолу и у митохондријама, односно да постоји негативна повратна спрега између оксидативног стреса и аутофагије које изазива комбинација АК+МД (Слика 16).

4.15. Инхибиција аутофагије штити ћелије од цитотоксичног дејства АК+МД

С обзиром на то да је аутофагија процес који може имати двојаку улогу у ћелији, односно може деловати цитопротективно, као вид адаптације ћелије на услове стреса, или пак може представљати алтернативни пут ћелијске смрти, испитана је улога аутофагије у смрти ћелија глиобластома коју изазива комбинација АК+МД. Пре примене третмана који су трајали осам сати, аутофагија је у ћелијама инхибирана утишавањем експресије гена за LC3 и беклин-1 РНК интерференцијом (Слика 17А), применом ЗМА који инхибира стварање аутофагозома зависно од активности PI3K или применом лизозомалних инхибитора аутофагије BAF и NH_4Cl (Слика 17Б).

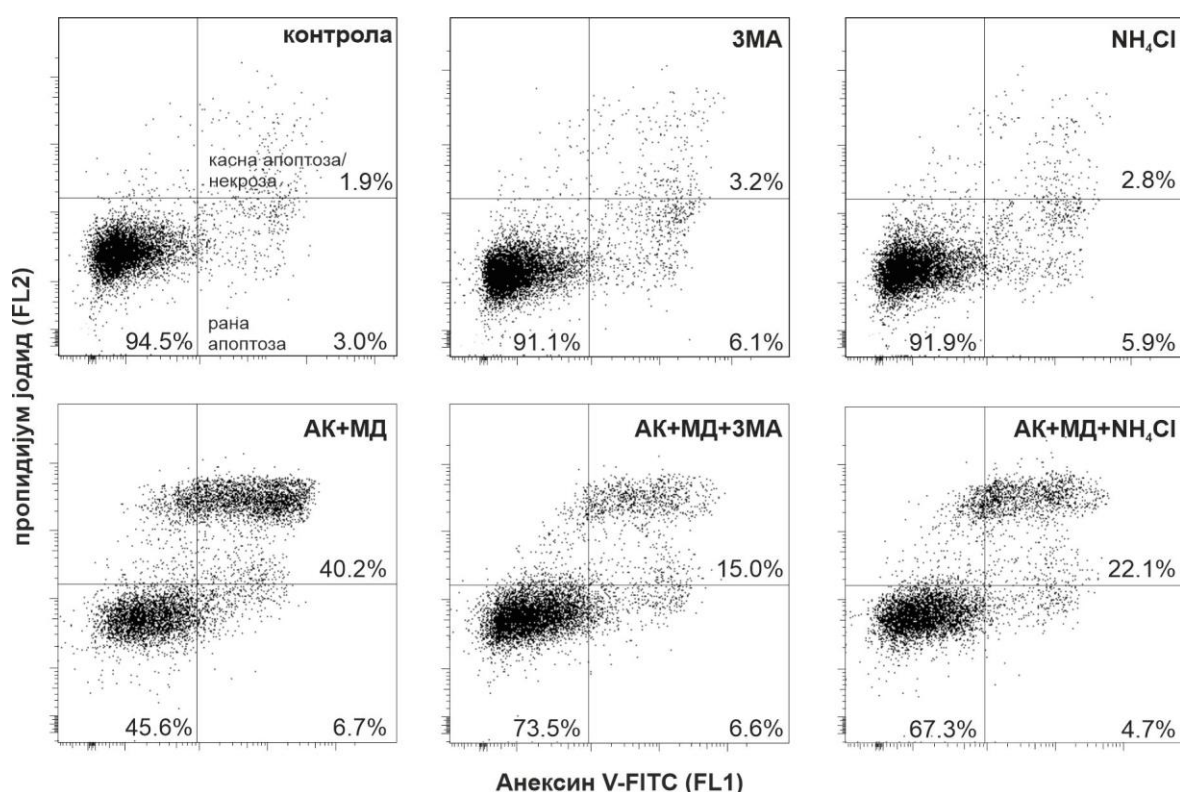


Слика 17. Фармаколошка и генетичка инхибиција аутофагије штите U251 ћелије од цитотоксичног дејства АК+МД. Ћелије хуманог глиобластома U251 су трансфековане контролном (Ø) или малом интерферирајућом РНК (siRNA) за LC3 и беклин-1 (BCN) (А), или су пре третмана инкубирани са 3-метиладенином (ЗМА; 5 mM), бафиломицином А1 (BAF; 10 nM) или амонијум-хлоридом (NH_4Cl ; 12 mM) (Б), а потом третиране 1 mM АК, 20 μM МД и њиховом комбинацијом (АК+МД). Број живих ћелија након третмана дугог 8 h одређен је кристал виолет тестом. Резултати су представљени као средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које су трансфековане Ø siRNA (А) или нису пре-третиране фармаколошким инхибирима аутофагије (Ø, Б). Ефикасност трансфекције (А) је одређена имуноблот методом; приказани су репрезентативни имуноблотови.

Тестови вијабилности су показали да утишавање гена за LC3 и беклин-1 смањује смрт ћелија у третману АК+МД, док се утицај МД на број живих ћелија не мења у условима нефункционалне аутофагије (Слика 17А). Такође, ЗМА, ВАФ и NH_4Cl су делимично спречили смрт U251 ћелија коју изазива АК+МД, док у случају МД, који *per se* није био токсичан, ови фармаколошки инхибитори аутофагије нису утицали на вијабилност ћелија (Слика 17Б). Добијени резултати указују да аутофагија коју изазива МД (Слика 11, Слика 12) није токсична, а да у присуству АК постаје цитотоксичан процес.

4.16. Инхибиција аутофагије спречава некрозу U251 ћелија третираних АК+МД

Улога аутофагије у ћелијској смрти коју изазива АК+МД детаљније је испитана цитофлуориметријском анализом ћелија изложених пре-третману фармаколошким инхибиторима аутофагије. Анализа ћелија обележених анексином V-FITC и PI показује да су ЗМА и NH_4Cl спречили оштећења ћелијске мембране и некрозу U251 ћелија третираних АК+МД током 4 h, односно смањили су процентуалну заступљеност ћелија које су биле обојене и анексином и PI (Слика 18). Дакле, нефункционалност аутофагије, било да је изазвана ометањем стварања аутофагозома (ЗМА) или блокадом фузије аутофагозома и лизозома (NH_4Cl), као исход има смањену цитотоксичност АК+МД. Овим је потврђено да је аутофагија изазвана АК+МД цитотоксична, односно да доприноси некрози U251 ћелија. Узимајући у обзир претходно добијене резултате (Слика 16), може се извести закључак да, упркос томе што уклања РВК и смањује оксидативни стрес, аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД представља механизам који доприноси смрти U251 ћелија.

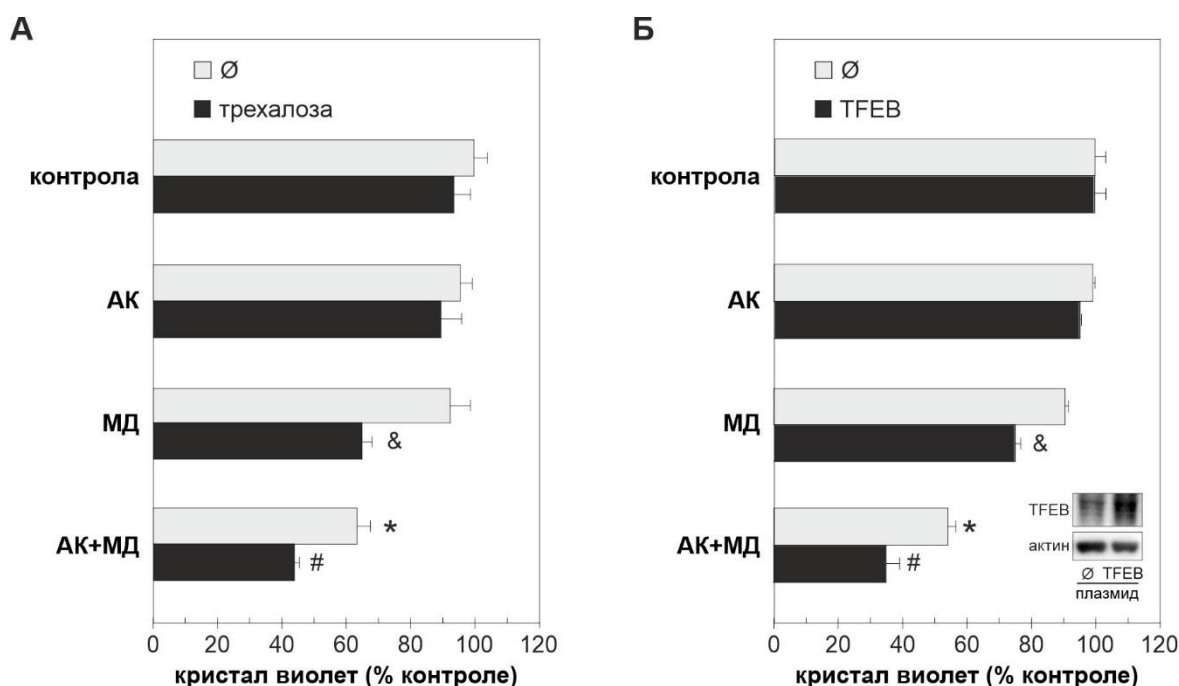


Слика 18. Аутофагија коју изазива комбинација АК+МД доприноси некрози U251 ћелија. Ћелије су третиране комбинацијом 1 mM АК и 20 μM МД (АК+МД), без или са претходним излагањем дејству 3-метиладенина (ЗМА; 5 mM) или амонијум-хлорида (NH_4Cl ; 12 mM). Након 4 h третмана ћелије су обележене анексином V-FITC и пропидијум јодидом, а интензитет флуоресценце (FL1 и FL2) је мерен проточном цитофлуориметријом. Приказани су тачкасти

дијаграми из једног од три независна експеримента на којима је назначена процентуална заступљеност субпопулација ћелија.

4.17. Активатори аутофагије стимулишу цитотоксично дејство МД и АК+МД на U251 ћелије хуманог глиобластома

Коначно, цитотоксична природа аутофагије је потврђена мерењем вијабилности ћелија које су третиране након фармаколошке активације аутофагије применом дисахарида трехалозе (Sarkar и сар., 2007) или генетичке активације аутофагије применом плазмидног вектора који носи ген за TFEB (Слика 19). И трехалоза (Слика 19А) и TFEB (Слика 19Б) су деловали као стимулатори цитотоксичног дејства АК+МД. Активација аутофагије трехалозом и плазмидним вектором који носи ген за TFEB изазвала је смрт U251 ћелија третираних иначе нетоксичним МД. Поред тога што је и на овај начин потврђено да аутофагија коју изазива АК+МД доприноси ћелијској смрти, ови резултати указују на то да додатна активација аутофагије узрокује токсичност МД, који *per se* није цитотоксичан.

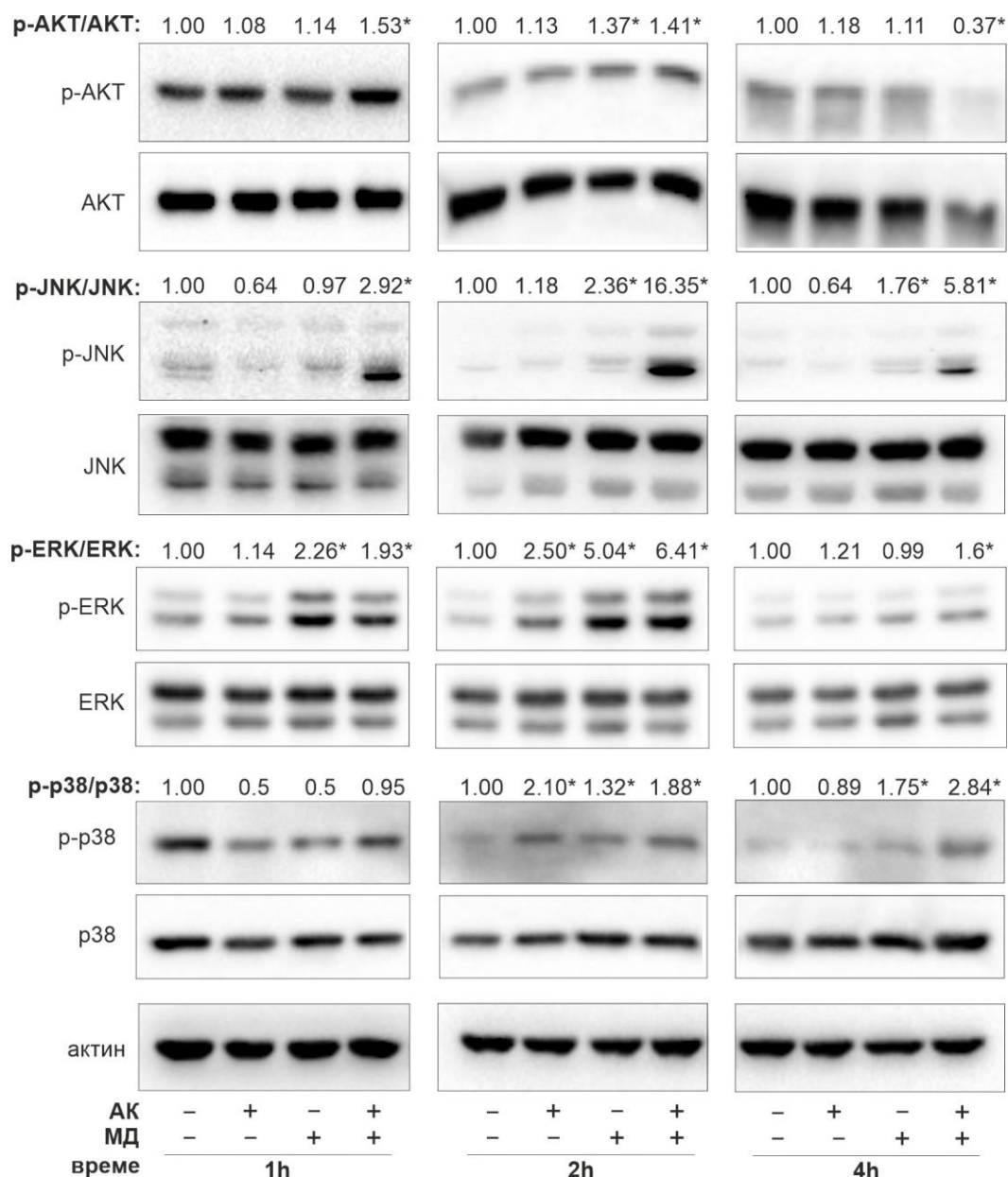


Слика 19. Фармаколошки и генетички активатори аутофагије иницирају цитотоксичност МД и појачавају цитотоксично дејство АК+МД. U251 ћелије су најпре третиране 50 mM трехалозом (А) или су трансфековане контролним (Ø) или плазмидним вектором који носи ген за транскрипциони фактор ЕБ (TFEB; Б), а потом су инкубиране са 1 mM АК, 20 µM МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 4 h. Вијабилност ћелија је мерена кристал виолет тестом. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису пре-третиране трехалозом (А) или трансфековане Ø плазмидом (Б); & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД које нису пре-третиране трехалозом (А) или трансфековане Ø плазмидом (Б). Ефикасност трансфекције (Б) је одређена имуноблот методом; приказани су репрезентативни имуноблотови.

4.18. АК+МД инхибира АКТ и активира MAPK сигналне путеве у U251 ћелијама

У даљем току истраживања испитиване су улоге АКТ и MAPK у одговору U251 ћелија глиобластома на третман МД и АК+МД. Поред важне улоге у ћелијском

метаболизму, расту и пролиферацији, АКТ је киназа која индиректно или директно активира mTORC1 и последично доводи до инхибиције аутофагије (Кта и сар., 2021). Митогеном активирани протеин киназе (МАРК) – ERK, JNK и p38 у одговору на екстраћелијске сигнале регулишу различите биолошке процесе, као што су ћелијско преживљавање, пролиферација, диференцијација, апоптоза и аутофагија (Sui и сар., 2014). Утицај наведених третмана на активност АКТ и МАРК је најпре испитан имуноблот анализом степена фосфорилације ових киназа.

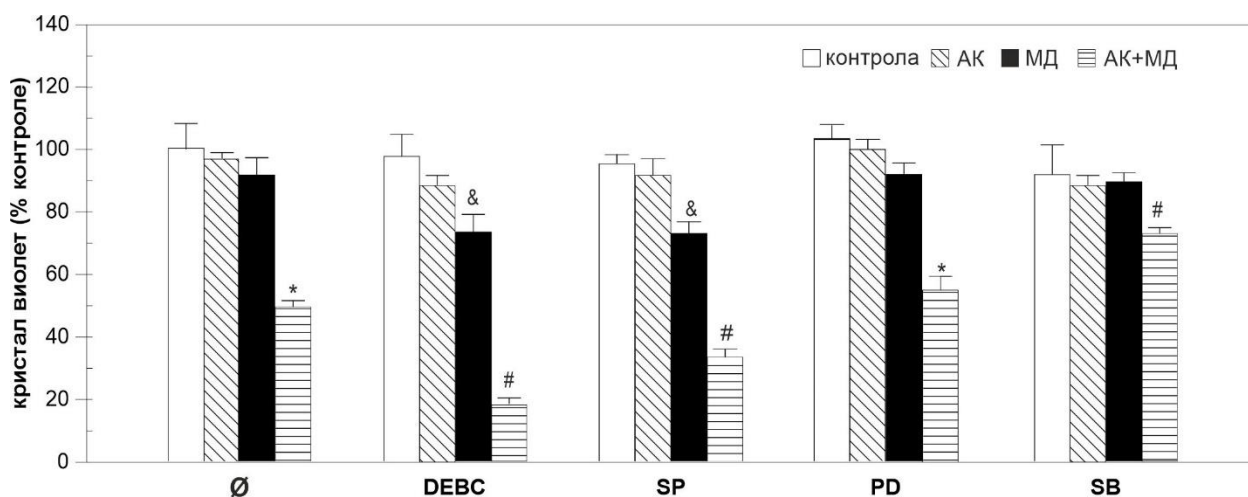


Слика 20. АК+МД инхибира АКТ и активира МАРК. U251 ћелије су инкубирани са 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом током назначених временских интервала. Фосфо-АКТ (p-AKT), АКТ, фосфо-JNK (p-JNK), JNK, фосфо-ERK (p-ERK), ERK, фосфо-p38 (p-p38), p38 и актин су анализирани имуноблотом и квантификовани дензитометријом. Актин је служио као контролни протеин који указује да сви узорци садрже исту количину укупних протеина. Приказани су репрезентативни имуноблотови и резултати дензитометрије (ниво фосфорилисаних у односу на укупни ниво одговарајућих протеина) једног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама чија је вредност арбитрарно узета као 1.

Имуноблот анализом активности АКТ киназе показано је пролазно повећање фосфорилације АКТ након 1 h и 2 h третмана комбинацијом АК+МД, које се након дуже инкубације (4 h) претвара у снажну инхибицију. Активација АКТ под утицајем МД се јавила касније (након 2 h) и вратила се на ниво приближан контроли већ након 4 h. Истовремено, МД је изазвао благо повећање фосфорилације JNK након 2 h и 4 h, док је АК+МД изазвала јаку активацију JNK која је и након 4 h третмана била вишеструко повећана у односу на контролу и активност JNK у третману МД. У случају ERK, и МД и АК+МД су значајно активирали ову киназу након 1 h и 2 h третмана. Већ након 4 h, ниво фосфорилисаних форми се значајно смањило и ERK је остао благо активиран само под дејством АК+МД, што указује на пролазну активацију овог протеина. Највиши степен фосфорилације био је достигнут након 2 h третмана, када је и АК активирала ERK киназу. Образац фосфорилације p38 након 2 h био је сличан као код ERK: сва три примењена третмана (АК, МД и АК+МД) су изазвала активацију овог протеина, која се касније (4 h) задржала само у ћелијама изложеним дејству МД и АК+МД (**Слика 20**). Дакле, АК+МД најпре изазива активацију АКТ која касније прелази у снажну инхибицију, док MAPK остају активне и након 4 h дејства АК+МД. Са друге стране, сâм МД изазива активацију свих испитиваних киназа већ након 2 h, али је у случају АКТ и ERK овај ефекат пролазан, док JNK и p38 остају активне и након четворочасовног третмана U251 ћелија.

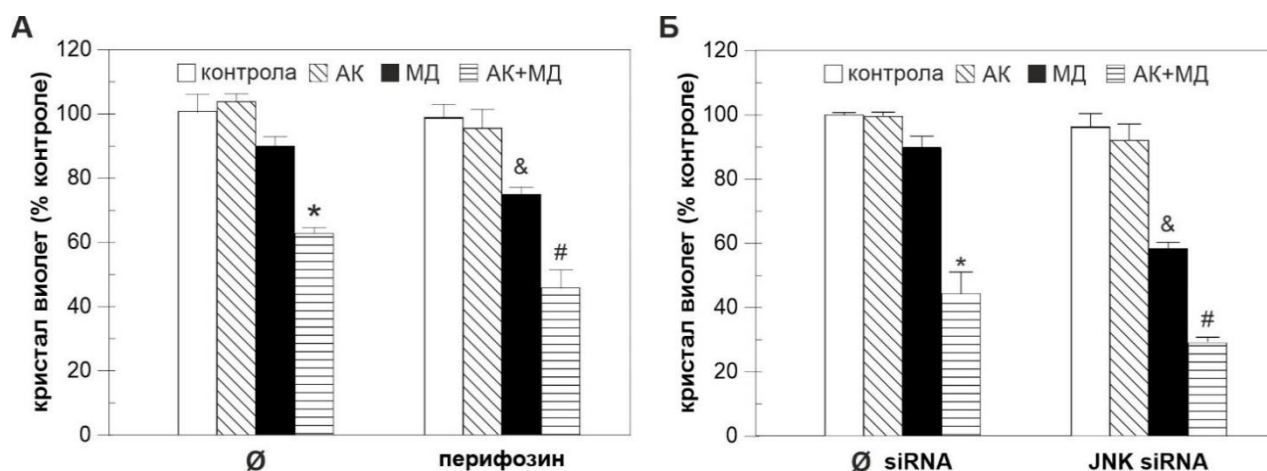
4.19. Различит утицај инхибиције АКТ и MAPK на вијабилност U251 ћелија третираних МД и комбинацијом АК+МД

Очигледна активација и АКТ и MAPK (JNK, ERK, p38), изазвана третманом МД примењеним самостално и у комбинацији са АК, усмерила је истраживања ка одређивању улоге АКТ и MAPK у одговору U251 ћелија на МД и АК+МД. Са тим циљем, активност АКТ, JNK, ERK и p38 у ћелијама је најпре смањена применом фармаколошких инхибитора ових киназа, након чега су ћелије изложене третманима АК, МД и АК+МД у трајању од 16 h. Вијабилност ћелија је мерена кристал виолет тестом.



Слика 21. Инхибитори АКТ, JNK, ERK и p38 на различите начине утичу на осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и комбинацијом (АК+МД) без (Ø) или са претходним излагањем инхибитору АКТ – 10-DEBC (DEBC; 10 μ M), инхибитору JNK – SP600125 (SP; 10 μ M), инхибитору ERK – PD098059 (PD; 10 μ M) или инхибитору p38 – SB203580 (SB; 5 μ M). Пре-третмани инхибиторима су трајали 30 минута, а третмани АК, МД и АК+МД 16 h. Третмани самим инхибиторима су трајали такође 16 h. Ћелијска вијабилност је мерена кристал виолет тестом. Резултати су приказани као средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са нетретираним ћелијама; & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД, а # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису пре-третиране инхибиторима.

Инхибитор АКТ (10-DEBC), као и инхибитор JNK (SP600125), значајно смањују број ћелија које су биле живе након третмана АК+МД, за разлику од инхибитора ERK (PD098059) који није имао никакав утицај на ћелијску смрт и инхибитора активности p38 (SB203580), услед чијег је дејства број живих ћелија након третмана АК+МД био значајно повећан (Слика 21). Поред утицаја на ефекат АК+МД, 10-DEBC и SP600125 су изазвали значајно смањење броја живих ћелија и након третмана МД, који самостално није остваривао цитотоксично дејство. Из добијених резултата се може увидети да АК+МД своју токсичност према U251 ћелијама испољава независно од активности ERK, док p38 киназа доприноси цитотоксичности АК+МД. Са друге стране, активацијом АКТ и JNK ћелије се супротстављају цитотоксичном дејству АК+МД. Значајно је нагласити да инхибиција АКТ и JNK, поред тога што појачава дејство АК+МД, повећава и осетљивост ћелија на МД, односно омогућава МД да испољи цитотоксичан ефекат на U251 ћелије глиобластома.

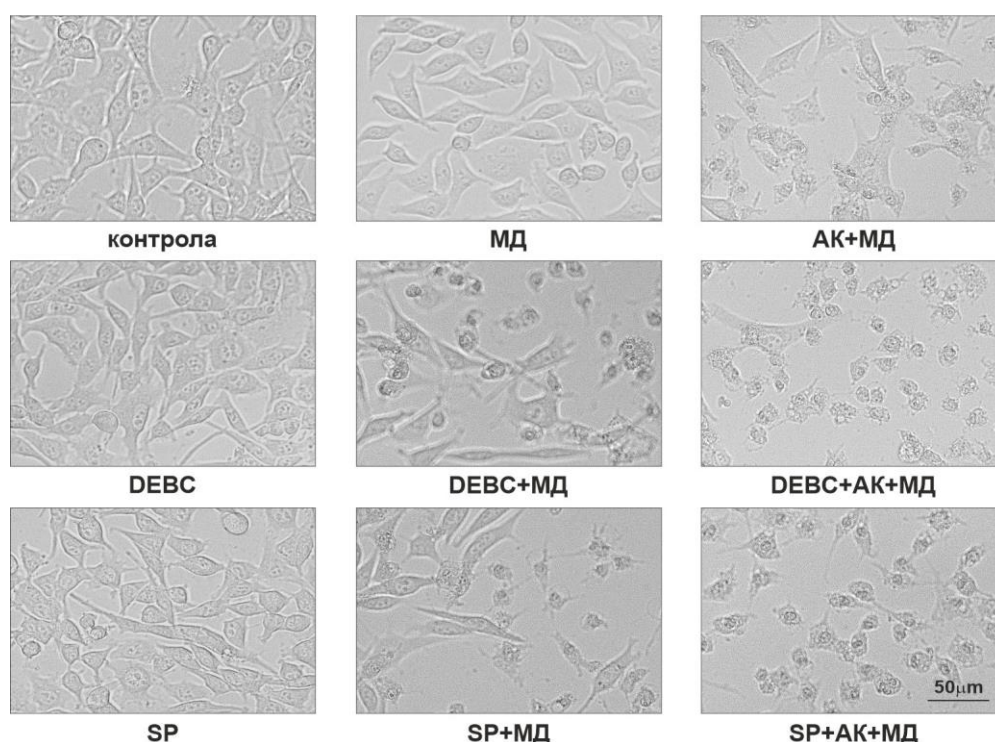


Слика 22. Перифозин и генетичка инхибиција JNK потенцирају токсичност МД и АК+МД. АКТ киназа је инхибирана применом пре-третмана перифозином (10 μ M) (А), а инхибиција JNK је урађена генетички, трансфекцијом ћелија малом интерферирајућом РНК за JNK (JNK siRNA) (Б). Третмани АК (1 mM), МД (20 μ M) и АК+МД су трајали 16 h. Вијабилност U251 ћелија је одређена кристал виолет тестом. Резултати (средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента) су приказани у виду графика. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД а # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису пре-третиране перифозином (Ø) или трансфековане контролном siRNA (Ø siRNA).

Способност малих молекулских инхибитора 10-DEBC и SP600125 да појачају дејство АК+МД и да буду окидачи за испољавање токсичне природе МД, која је показана у претходном експерименту, указују на важну улогу инхибиције АКТ и JNK киназа у модулацији, односно појачавању цитотоксичности МД и АК+МД према U251 ћелијама. Имајући у виду да наведени феномен може бити изузетно користан у потенцијалној терапији глиобластома, у циљу његове потврде ћелије су изложене дејству још једног инхибитора АКТ киназе – алкил-фосфолипидног инхибитора перифозина (Слика 22А), а експресија гена који кодира JNK је утишана применом РНК интерференције (Слика 22Б). Мерењем ћелијске вијабилности кристал виолет тестом, након третмана дугог 16 h, добијени су слични резултати као у претходном експерименту: цитотоксичност МД и АК+МД је појачана када се у ћелијама инхибирају АКТ и JNK киназе. На овај начин је потврђено да уочени феномен није повезан само са применом 10-DEBC и SP600125, већ да смањивање активности ове две киназе представља механизам за потенцирање токсичности МД и комбинације АК+МД у култури U251 ћелија.

4.20. 10-DEBC и SP600125 утичу на морфолошке промене U251 ћелија третираних МД и комбинацијом АК+МД

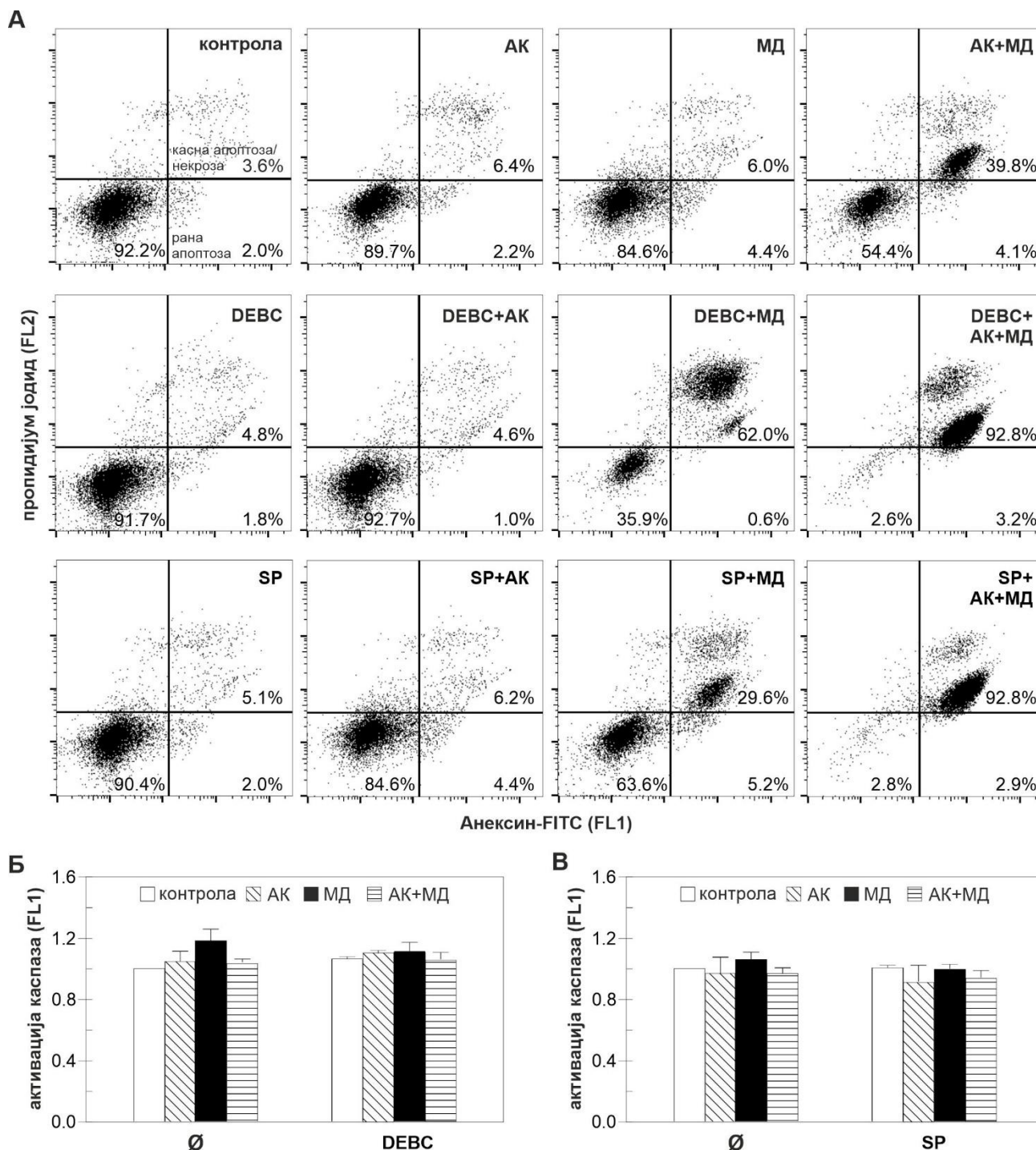
У оквиру детаљнијег испитивања потенцијала малих молекулских инхибитора 10-DEBC и SP600125 у модулацији ефеката МД и комбинације АК+МД, помоћу светлосног микроскопа је посматрано како ови инхибитори утичу на морфолошке карактеристике U251 ћелија третираних МД и АК+МД. У складу са претходним резултатима (Слика 4), након шесточасовног третмана је била видљива вакуолизација цитоплазме изазвана комбинацијом АК+МД, а запажено је и смањење броја живих ћелија. Истовремени третман инхибиторима киназа и АК+МД је значајно смањио број живих ћелија у односу на културу третирану само комбинацијом АК+МД. Самостално, МД није испољио ефекат на морфологију ћелија, али је у културама које су инкубиране са МД и 10-DEBC, односно SP600125, дошло до појаве цитоплазматских вакуола и значајног смањења броја живих ћелија. Важно је напоменути да ни 10-DEBC ни SP600125, примењени самостално, нису утицали на морфолошке карактеристике ћелија након 6 сати инкубације (Слика 23).



Слика 23. 10-DEBC и SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД: утицај на ћелијску морфологију. U251 ћелије су најпре инкубиране (пре-третман 30 минута) са 10-DEBC (DEBC; 10 μ M) и SP600125 (SP; 10 μ M), а затим третиране МД (20 μ M) и АК+МД (1 mM+20 μ M). Ћелије су посматране и фотографисане након 6 сати третмана помоћу уређаја за сликање ћелија.

4.21. 10-DEBC и SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД потенцирањем некрозе, без утицаја на активацију каспаза

Познато је да АКТ киназа у ћелијама делује као антиапоптотски сигнал (Nitulescu и сар., 2018), што сугерише да би смањена отпорност ћелија на МД и АК+МД у присуству инхибитора АКТ, 10-DEBC, могла бити повезана управо са покретањем овог типа ћелијске смрти. Са друге стране, JNK, зависно од типа ћелија, врсте и дужине стимулуса и активације других сигналних путева, може позитивно или негативно регулисати апоптозу (Liu и Lin, 2005).



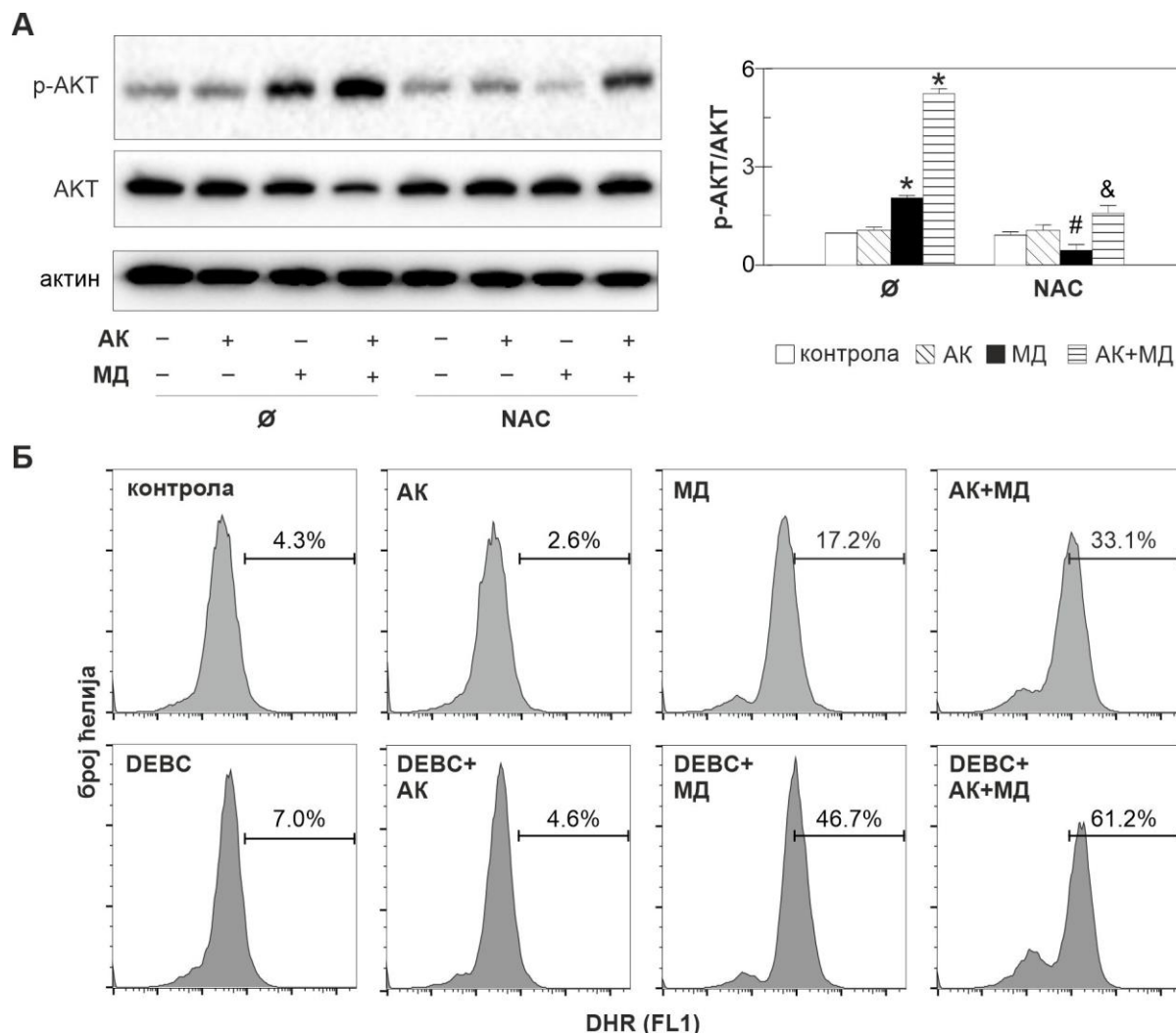
Слика 24. 10-DEBC и SP600125 повећавају удео некротичних ћелија у третманима МД и АК+МД, без утицаја на активацију каспаза. U251 ћелије су инкубиране са АК (1 mM), МД (20 μ M) и АК+МД током 6 h, у присуству или одсуству 10-DEBC (DEBC; 10 μ M) или SP600125 (SP; 10 μ M), примењених као пре-третмана (30 минута). Ћелије су обележене анексином V-FITC и пропидијум јодидом (А) или Apostat-ом (Б, В), а интензитет флуоресценце (FL1 и FL2) је анализиран проточном цитофлуориметријом. Приказани су тачкасти дијаграми, из једног од три независна експеримента, на којима је назначена процентуална заступљеност одређених субпопулација ћелија (А), или средње вредности $\pm$ стандардне девијације три независно спроведена експеримента (Б, В).

Применом проточне цитофлуориметрије ћелија, претходно обележених анексином V-FITC и PI или ApoStat-ом, испитано је да ли појачавање цитотоксичног ефекта МД и комбинације АК+МД које се дешава у присуству 10-DEBC или SP600125 зависи од регулације процеса апоптозе. Примењени самостално, 10-DEBC и SP600125 нису утицали на број ћелија у раној и касној апоптози. Иначе нетоксичан, МД је у садејству са 10-DEBC, односно SP600125, драстично повећао број ћелија са оштећеном мембраном (анексин⁺/PI⁺). Сличан ефекат је забележен и у културама изложеним дејству комбинације АК+МД, где је, након шесточасовног третмана у присуству 10-DEBC или SP600125, заступљеност анексин⁺/PI⁺ ћелија повећана више од два пута (**Слика 24А**). Даље, проточна цитометрија ћелија обојених пан-каспазним инхибитором ApoStat-ом показала је да ни 10-DEBC (**Слика 24Б**), нити SP600125 (**Слика 24В**), немају способност да активирају каспазе у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД. Добијени резултати још једном потврђују да апоптоза није један од механизма цитотоксичности комбинације АК+МД и искључују могућност да је повећање осетљивости ћелија на МД и АК+МД у присуству 10-DEBC или SP600125 повезано са активацијом овог типа ћелијске смрти.

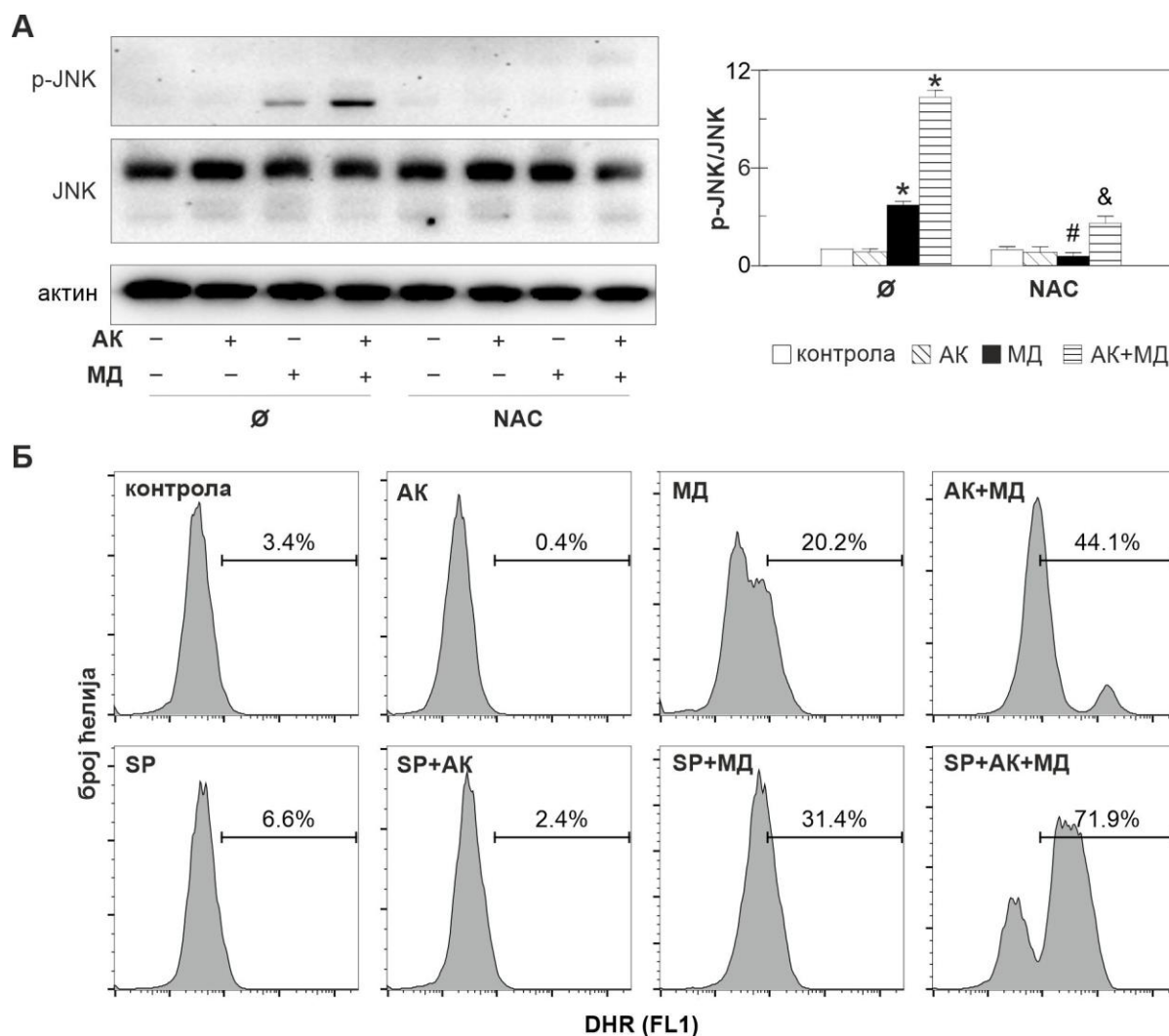
4.22. Негативна повратна спрега између производње РВК и активације АКТ и JNK у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД

У даљем проучавању механизма којим мали молекулски инхибитори 10-DEBC и SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД, испитани су параметри оксидативног стреса као важне полуге помоћу које наведени третмани остварују своје дејство. С обзиром на то да РВК могу утицати на сигналне путеве у које су укључене АКТ и JNK киназе (Zhang и сар., 2016; Koundouros и Poulgiannis, 2018), најпре је испитана повезаност акумулације РВК са активацијом ових киназа под утицајем третмана МД и АК+МД.

Имуноблот анализом степена фосфорилације АКТ, још једном је потврђено да се ова киназа активира под утицајем третмана МД и АК+МД (**Слика 25А**). У присуству антиоксиданса NAC, значајно је смањена активација АКТ киназе изазвана наведеним третманима. Са друге стране, када је АКТ киназа инхибирана применом 10-DEBC, а потом примењени двочасовни третмани АК, МД и АК+МД, у ћелијама које су третиране МД и АК+МД детектована је повећана количина РВК (**Слика 25Б**). Исти феномен уочен је и у случају JNK киназе. Вишеструко повишена фосфорилација овог протеина, изазвана двочасовним третманима МД и АК+МД, значајно је смањена када су ћелије пре третмана биле изложене дејству NAC (**Слика 26А**). Истовремено је селективни инхибитор JNK, SP600125, у комбинацији са МД и АК+МД додатно повисио ниво РВК чија је производња већ била повећана у третманима МД и АК+МД (**Слика 26Б**). Из добијених резултата може се увидети следеће: повишен ниво РВК у U251 ћелијама глиобластома, изазван третманима МД и АК+МД, активира АКТ и JNK киназе. Са друге стране, активација АКТ и JNK се супротставља производњи РВК, јер је у присуству инхибитора ових киназа забележено значајно повећање њихове количине. Такође, ови резултати сугеришу да 10-DEBC и SP600125 изазивају токсичност иначе нетоксичног МД и потенцирају токсичност АК+МД, највероватније захваљујући способности да појачају производњу РВК и оксидативни стрес у ћелијама глиобластома.



Слика 25. Реципрочна регулација активности АКТ и производње РВК под утицајем МД и АК+МД. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 2 h, без или са применом пре-третмана антиоксидансом N-ацетилцистеином (NAC) (2 mM) или селективним инхибитором АКТ, 10-DEBC (DEBC; 10 μ M). Нивои фосфо-АКТ (p-AKT), АКТ и актина су анализирани имуноблотом. Приказани су репрезентативни имуноблотови и резултати денситометријске квантификације, дати као средње вредности $\pm$ стандардне девијације три независно спроведена експеримента. Степен фосфорилације АКТ исказан је кроз однос нивоа фосфо-АКТ форме и укупног нивоа АКТ (А). Интензитет флуоресценце DHR (FL1), као показатељ количине РВК у ћелијама, мерен је проточном цитофлуориметријом. Приказани су хистограми из репрезентативног, од три независна експеримента (Б). * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД, а & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису изложене пре-третману NAC.

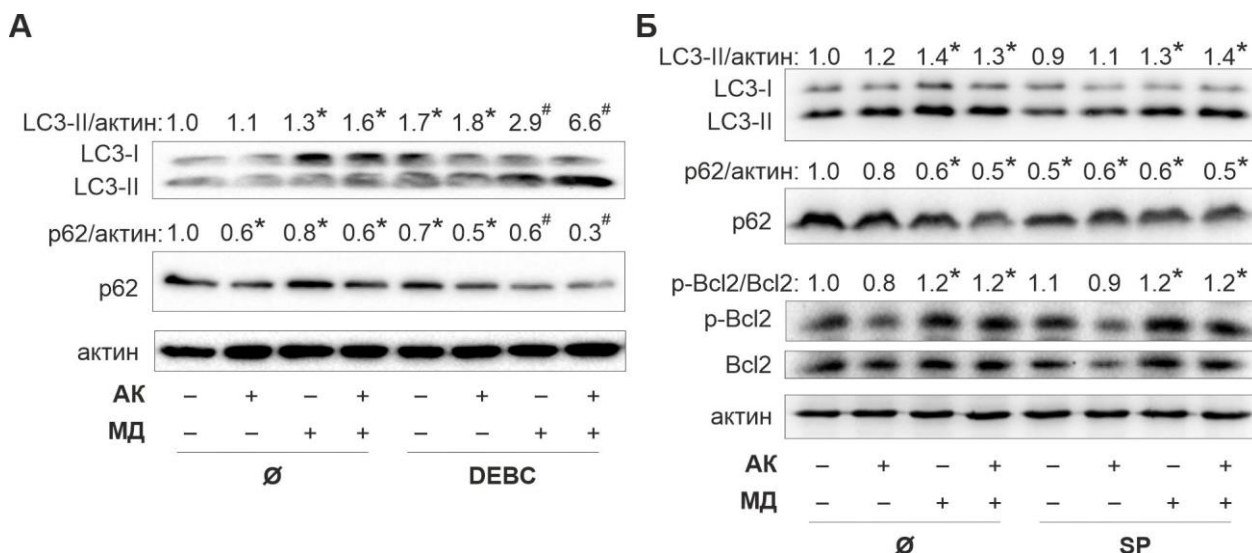


Слика 26. Реципрочна регулација активности JNK и производње РВК под утицајем МД и АК+МД. U251 ћелије су третиране 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 2 h, у одсуству или присуству N-ацетилцистеина (NAC; 2 mM) или SP600125 (SP; 10 μ M). Фосфо-JNK (p-JNK), JNK и актин су анализирани имуноблот методом. Приказани су репрезентативни имуноблотови и резултати дензитометријске квантификације, дати као средње вредности $\pm$ стандардне девијације три независно спроведена експеримента. Степен фосфорилације JNK исказан је кроз однос нивоа фосфо-JNK форме и укупног нивоа JNK (A). Интензитет флуоресценце DHR (FL1) мерен је проточном цитофлуориметријом. Приказани су хистограми из репрезентативног, од три независна експеримента (Б). * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД, а & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису пре-третиране NAC.

4.23. 10-DEVC појачава, док SP600125 не утиче на претварање LC3-I у LC3-II форму и деградацију p62 у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД

Досадашњи резултати су показали да и МД и АК+МД изазивају аутофагију као последицу појачаног стварања РВК (Слика 15A), као и да додатна активација аутофагије потенцира токсичност оба третмана (Слика 19). Применом малих молекулских инхибитора АКТ (10-DEVC) или JNK (SP600125) уз МД и АК+МД, производња РВК у ћелијама се додатно повећава, достижући ниво који третман МД чини цитотоксичним, а комбинацији АК+МД даје још снажнији токсични ефекат. Дакле, акумулација РВК и

повећање маркера аутофагије су присутни и у ћелијама третираним МД и, у знатно већој мери, у ћелијама третираним комбинацијом АК+МД, а додавање 10-DEBC или SP600125 овим третманима је вишеструко повећало стварање РВК. С обзиром на то, поставља се питање да ли и процес аутофагије учествује у смрти U251 ћелија која је поспешена у присуству 10-DEBC и SP600125. Имуноблот методом су анализирани главни маркери аутофагије и степен фосфорилације Bcl2, протеина који је укључен у два главна пута програмиране ћелијске смрти, а његова фосфорилација од стране JNK може бити предуслов за активацију аутофагије (Wei и сар., 2008).



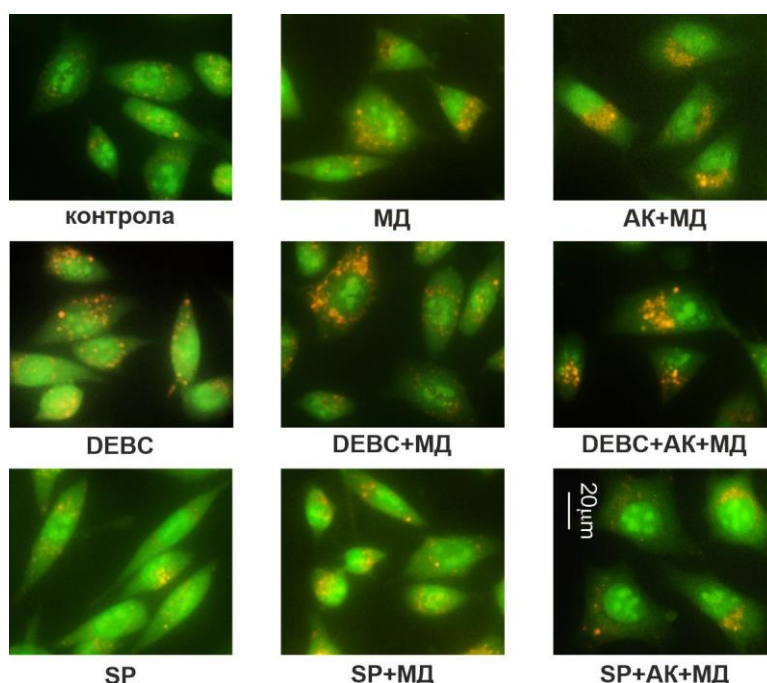
Слика 27. 10-DEBC појачава конверзију LC3 и деградацију p62, док SP600125 нема утицај на ове догађаје у U251 ћелијама третираним МД и комбинацијом АК+МД. U251 ћелије су пре третмана 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (1 h) третиране селективним инхибитором АКТ – 10-DEBC (DEBC; 20 μ M; А) или селективним инхибитором JNK – SP600125 (SP; 10 μ M; Б). Нивои LC3-I, LC3-II, p62, фосфо-Bcl2 (p-Bcl2), Bcl2 и актина анализирани су имуноблот методом, а добијене траке су квантификоване дензитометријом. Нивои LC3-II и p62 изражени су у односу на актин, контролни протеин који указује на униформност количине укупних протеина међу испитиваним узорцима. Степен фосфорилације Bcl2 изражен је кроз однос његове фосфорилисане форме и укупног нивоа овог протеина у ћелијама. Приказани су репрезентативни имуноблотови и резултати дензитометријске квантификације једног од три независно спроведена експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; # $p < 0,05$ у поређењу са одговарајућим третманима без пре-третмана DEBC.

Резултати су још једном потврдили да, у одсуству 10-DEBC и SP600125, МД и АК+МД након 1 h повећавају ниво LC3-II изоформе која је везана за аутофагозоми и смањују ниво аутофагног супстрата p62. Пре-третман ћелија 10-DEBC довео је до пораста нивоа LC3-II у поређењу са одговарајућим третманима примењеним без 10-DEBC. Такође, ниво специфичног аутофагног супстрата p62 је био значајно нижи у ћелијама које су третиране МД и АК+МД у присуству 10-DEBC, у односу на ћелије код којих су ови третмани примењени самостално (**Слика 27А**). Анализом је такође утврђено да су и МД и АК+МД појачали фосфорилацију Bcl2, али, изненађујуће, селективни инхибитор JNK – SP600125 није испољио значајан утицај на ниво фосфорилисаног облика Bcl2. Такође, SP600125 није утицао ни на промене нивоа LC3-II и p62 које су изазвали третмани МД и АК+МД примењени без овог инхибитора (**Слика 27Б**). Добијени резултати упућују на то да се аутофагија коју изазивају МД и АК+МД одвија независно од активности JNK, те да овај процес највероватније није део механизма којим SP600125 изазива, односно појачава цитотоксичност МД и АК+МД. Са друге стране, 10-DEBC би

управо модулацијом аутофагије могао повећати осетљивост U251 ћелија на МД и АК+МД, тако да је даљи ток истраживања усмерен ка додатним потврдама ове претпоставке.

4.24. 10-DEBC повећава, док SP600125 не утиче на број киселих везикула у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД

Утицај 10-DEBC и SP600125 на процес аутофагије праћен је и помоћу флуоресцентног микроскопа, посматрањем ћелија обележених суправиталном бојом акридин оранж. Као што се може видети на приложеним фотомикрографијама, заступљеност киселих цитоплазматских везикула које подсећају на аутолизозоме, повећана под утицајем једночасовног третмана МД и АК+МД, била је додатно повећана у ћелијама код којих је, непосредно пре примене МД и АК+МД, АКТ киназа инхибирана употребом 10-DEBC. У случају када је као пре-третман примењен SP600125, није уочена јасна разлика у количини киселих везикула у односу на ћелије код којих су МД и АК+МД примењени самостално (**Слика 28**). Ови резултати потврђују да 10-DEBC позитивно делује на процес аутофагије, док SP600125 не утиче на овај процес у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД.

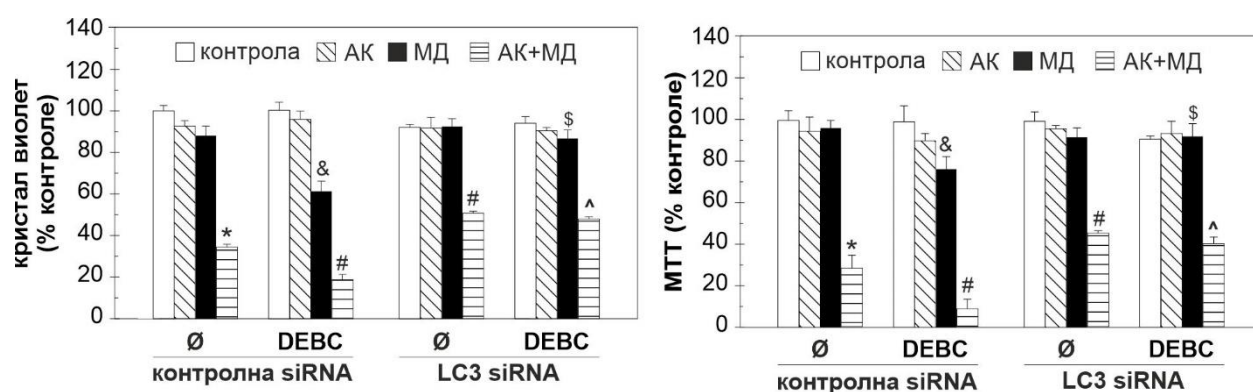


Слика 28. SP600125 не утиче, док 10-DEBC повећава заступљеност киселих везикула унутар U251 ћелија третираних МД и АК+МД. Ћелије глиобластома U251 су пре третмана МД (20 μ M) и његовом комбинацијом са АК (1mM) изложене дејству селективног инхибитора АКТ – 10-DEBC (DEBC; 10 μ M) или селективног инхибитора JNK – SP600125 (SP; 10 μ M). Након третмана дугог 1 h, ћелије обележене бојом акридин-оранж су посматране помоћу флуоресцентног микроскопа. Приказане су репрезентативне фотомикрографије.

4.25. 10-DEBC изазива токсичност МД и појачава токсичност АК+МД потенцирањем цитотоксичне аутофагије у U251 ћелијама

У овој студији је показано да се, након додавања АК, аутофагија коју изазива МД претвара из нетоксичног у цитотоксични процес, односно да доприноси смрти U251 ћелија под утицајем комбинације АК+МД. Сличан феномен догађа се и када се ћелије пре третмана МД изложе дејству 10-DEBC: индикатори аутофагије су израженији, а исход третмана 10-DEBC+МД је ћелијска смрт. Поред тога, U251 ћелије у присуству

10-DEBC постају осетљивије и на третман АК+МД, што се одражава кроз повећање броја мртвих ћелија у односу на комбинацију АК+МД примењену без 10-DEBC. Зато је даље испитана природа аутофагије коју изазива 10-DEBC у комбинацији са третманима МД и АК+МД. То је урађено анализом вијабилности ћелија код којих процес аутофагије није експериментално компромитован (трансфековане контролном siRNA) и оних код којих је одвијање овог процеса онемогућено РНК интерференцијом гена за LC3 (трансфековане LC3 siRNA). У оквиру ове две групе, један део ћелија је третиран АК, МД или АК+МД у трајању од 16 h, док је другом делу уз наведене третмане додат и 10-DEBC. Резултати су потврдили да МД постаје токсичан и да се цитотоксични ефекат АК+МД појачава у присуству 10-DEBC, као и да токсичност АК+МД слаби у условима инхибиране аутофагије. Најважније, генетичко утишавање аутофагије је спречило смрт ћелија коју изазива комбинација 10-DEBC+МД и опоравило вијабилност ћелија третираних 10-DEBC+АК+МД, у оној мери у којој је то постигнуто у случају третмана АК+МД. Другим речима, у условима инхибиране аутофагије 10-DEBC губи способност да изазове токсичност МД и повећа ћелијску смрт коју изазива АК+МД (Слика 29). Резултат спроведеног експеримента јасно говори да 10-DEBC појачава токсичност третмана МД и АК+МД потенцирањем цитотоксичне аутофагије.

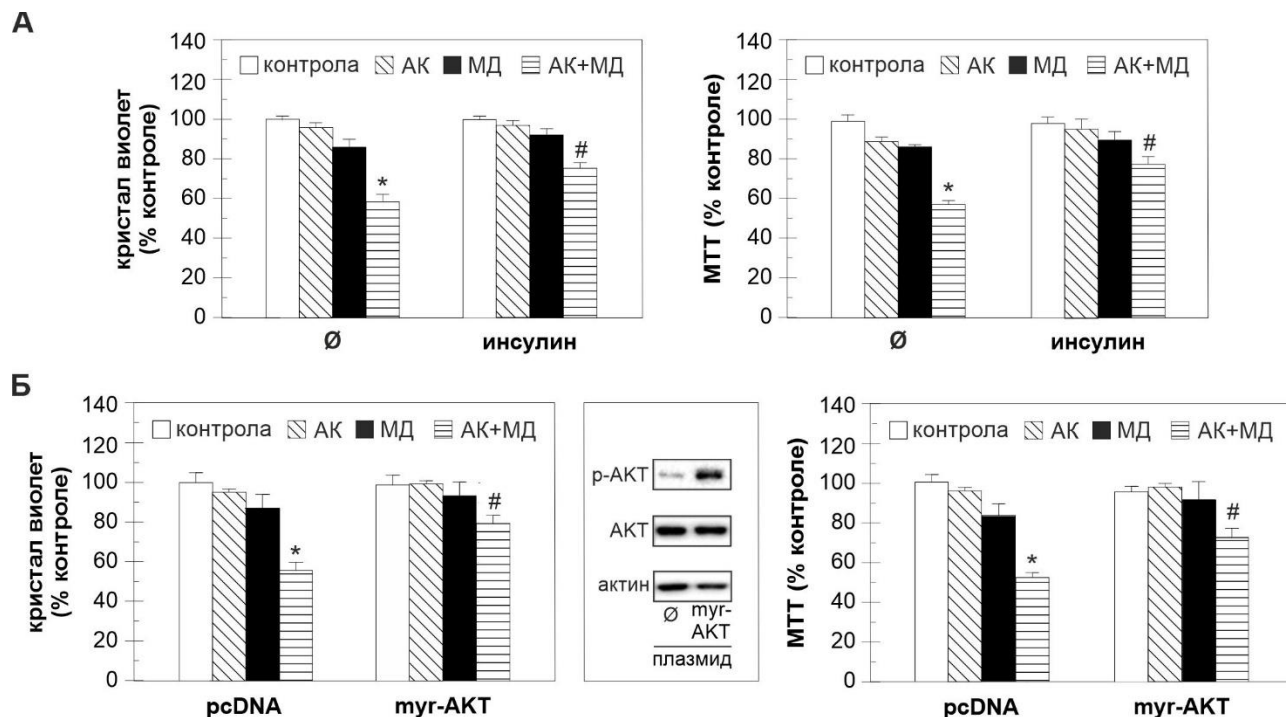


Слика 29. 10-DEBC потенцира цитотоксичну аутофагију у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД. Ћелије су трансфековане контролном или LC3 малом интерферирајућом РНК (siRNA) и пре-третиране селективним инхибитором АКТ – 10-DEBC (DEBC; 10 μ M), или су без пре-третмана ($\emptyset$) инкубирани са 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД). Након третмана дугог 16 h мерена је ћелијска вијабилност кристал виолет (лево) и МТТ (десно) тестовима. Резултати (средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента) су приказани у виду графикана. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; & $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним МД, а # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису пре-третиране DEBC ($\emptyset$); \$ $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним DEBC+МД, а ^ $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним DEBC+АК+МД које су трансфековане контролном siRNA.

4.26. Активација АКТ киназе смањује осетљивост U251 ћелија на АК+МД

Како би у потпуности била разјашњена улога АКТ киназе у ћелијској смрти коју изазива комбинација АК+МД, поред инхибиције АКТ, параметри ћелијске смрти су праћени и у условима када је АКТ киназа експериментално активирана. Активација АКТ је постигнута на два начина: фармаколошки, применом познатог PI3K/АКТ активатора инсулина (Слика 30А) или убацивањем плазмидног вектора са геном за конститутивно активну миристиловану форму АКТ (myr-АКТ; Слика 30Б) у U251 ћелије (Bellacosa и сар., 1998; Nitulescu и сар., 2018). Кристал виолет и МТТ тестови, рађени након третмана ћелија АК, МД и АК+МД дугог 16 сати, су показали да је присуство инсулина делимично спречило смрт коју изазива третман АК+МД (Слика 30А). Ћелије

трансфековане плазмидним вектором који носи ген за муг-АКТ су такође биле значајно отпорније на АК+МД у односу на оне које су биле трансфековане контролним pcDNA плазмидом (**Слика 30Б**). Резултати овог експеримента показују да појачана активност АКТ, било да је изазвана фармаколошки или на нивоу експресије гена, у значајној мери предупредује смрт U251 ћелија изазвану комбинацијом АК+МД, односно смањује њихову осетљивост на АК+МД.

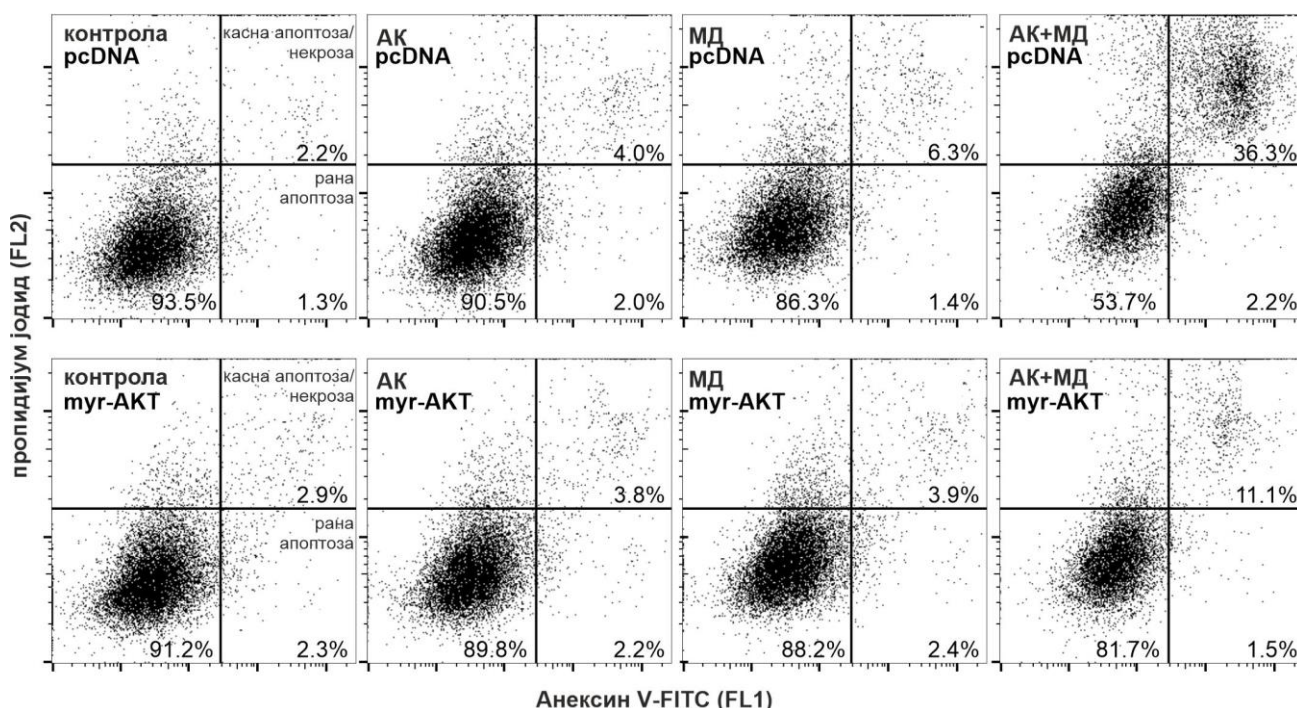


Слика 30. Фармаколошка и генетичка активација АКТ смањују осетљивост U251 ћелија на АК+МД. U251 ћелије су пре-третиране инсулином (40 mU/mL) (А) или су трансфековане контролним (pcDNA) или плазмидним вектором који носи ген за миристиловани АКТ (myr-AKT) (Б), а затим инкубиране са 1 mM АК, 20 μ M МД и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 16 h. Број живих, адхерентних ћелија и ћелија са активним митохондријама је мерен кристал виолет и МТТ тестовима. Резултати су приказани у виду графикана, као средње вредности $\pm$ стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама; # $p < 0,05$ у поређењу са ћелијама третираним АК+МД које нису пре-третиране инсулином (Ø; А) или су трансфековане са pcDNA (Б). Ефикасност трансфекције (Б) је одређена имуноблот методом; приказани су репрезентативни имуноблотови (Б, исечак у средини).

4.27. Генетичка активација АКТ киназе спречава некрозу U251 ћелија третираних комбинацијом АК+МД

Детаљније испитивање утицаја АКТ киназе на тип ћелијске смрти изазване комбинацијом АК+МД урађено је цитофлуориметријском анализом ћелија код којих је прекомерно експримирана активна форма АКТ киназе и ћелија које су трансфековане контролним pcDNA плазмидом, након обележавања бојама анексин V-FITC и PI. Резултати приказани на **Слици 31** показују да комбинација АК+МД, након шест сати дугог третмана, значајно повећава заступљеност некротичних анексин⁺/PI⁺ ћелија (горњи десни квадрант) у контролно трансфекованим ћелијама. Овај ефекат комбинације на проценат анексин⁺/PI⁺ ћелија је значајно мањи у ћелијама са експримираном конститутивно активном формом АКТ киназе. Пропорционално томе, повећан је удео живих ћелија које нису обојене ниједном од две флуоресцентне боје и на

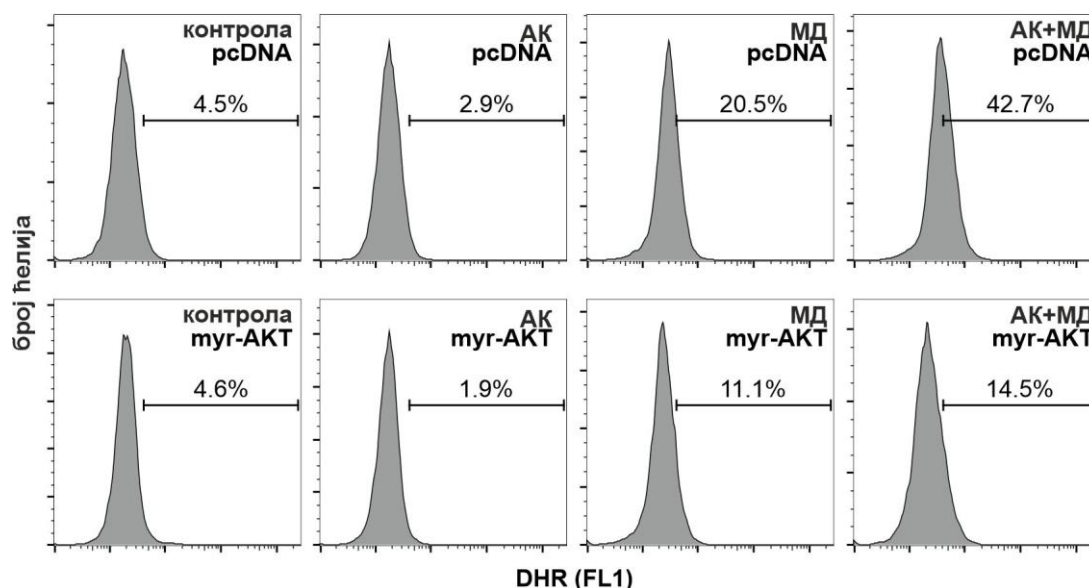
дијаграму су позициониране у доњем левом квадранту. Резултати спроведеног експеримента указују на то да прекомерна експресија АКТ киназе у активном облику спречава оштећење ћелијских мембрана које настаје деловањем АК+МД и штити U251 ћелије од цитотоксичног дејства комбинације АК+МД.



Слика 31. Експресија конститутивно активне форме АКТ киназе смањује удео некротичних U251 ћелија у култури третираној АК+МД. U251 ћелије су трансфековане контролним (pcDNA) или плазмидним вектором који носи ген за миристиловани АКТ (myr-AKT), а затим инкубиране са АК (1 mM), МД (20 μ M) и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 6 h. Истовременим обележавањем ћелија анексином V-FITC и PI и мерењем флуоресценце (FL1 и FL2) на проточном цитофлуориметру, праћен је удео апоптотичних/некротичних ћелија након третмана. Приказани су тачкасти дијаграми на којима је назначена процентуална заступљеност одређених субпопулација ћелија, из једног од три независна експеримента.

4.28. Генетичка активација АКТ киназе смањује количину РВК у U251 ћелијама третираним МД и комбинацијом АК+МД

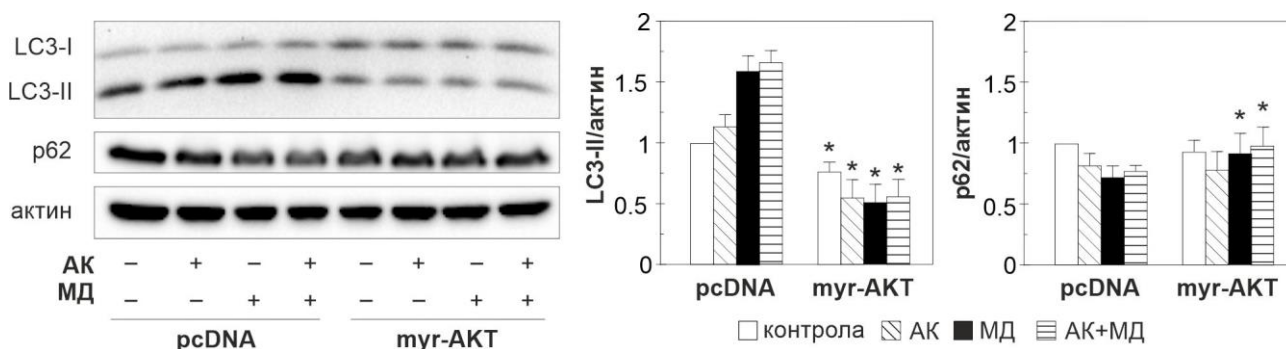
Раније добијени резултати су показали да комбинација АК и МД цитотоксични ефекат остварује посредством оксидативног стреса (**Слика 8**), као и то да инхибиција АКТ киназе као последицу има додатно накупљање РВК и потенцирање ћелијске смрти (**Слике 21; 22; 24А; 25Б**). Са циљем да се детаљније проучи веза између АКТ киназе и оксидативног стреса, анализиран је утицај третмана на ниво РВК у ћелијама са експримираном конститутивно активном формом АКТ киназе. Цитофлуориметријском анализом U251 ћелија обојених DHR бојом је показано да двочасовни третмани МД и АК+МД нису повећали ниво РВК у ћелијама у којима је била експримирана активна форма АКТ, у оној мери у којој је ниво РВК повећан у ћелијама трансфекованим контролним плазмидом (pcDNA). Овај резултат је у корелацији са резултатима добијеним у условима када је активност АКТ инхибирана применом 10-DEBC (**Слика 25Б**). Заједно, ови резултати упућују на то да активација АКТ делимично блокира повећање количине РВК у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД и да се на тај начин супроставља цитотоксичном ефекту комбинације АК+МД.



Слика 32. Експресија конститутивно активне форме АКТ киназе смањује количину РВК у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД. U251 ћелије су трансфековане контролним (pcDNA) или плазмидним вектором који носи ген за миристиловану форму АКТ киназе (myr-AKT), а потом инкубирани са АК (1 mM), МД (20 μM) и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 2 h. По истеку третмана ћелије су обележаване флуоресцентном бојом DHR и анализирани проточном цитофлуориметријом. Резултати су представљени у виду хистограма из репрезентативног, од три независна експеримента.

4.29. Генетичка активација АКТ киназе поништава ефекат МД и АК+МД на конверзију LC3 и деградацију p62 у U251 ћелијама

Имајући у виду да повећан ниво РВК узрокује активацију аутофагије, као и да селективни инхибитор АКТ – 10-DEBC изазива токсичност МД и појачава цитотоксични ефекат АК+МД управо поспешивањем цитотоксичне аутофагије, праћено је на који начин прекомерна активација АКТ киназе утиче на промену нивоа протеинских маркера аутофагије.

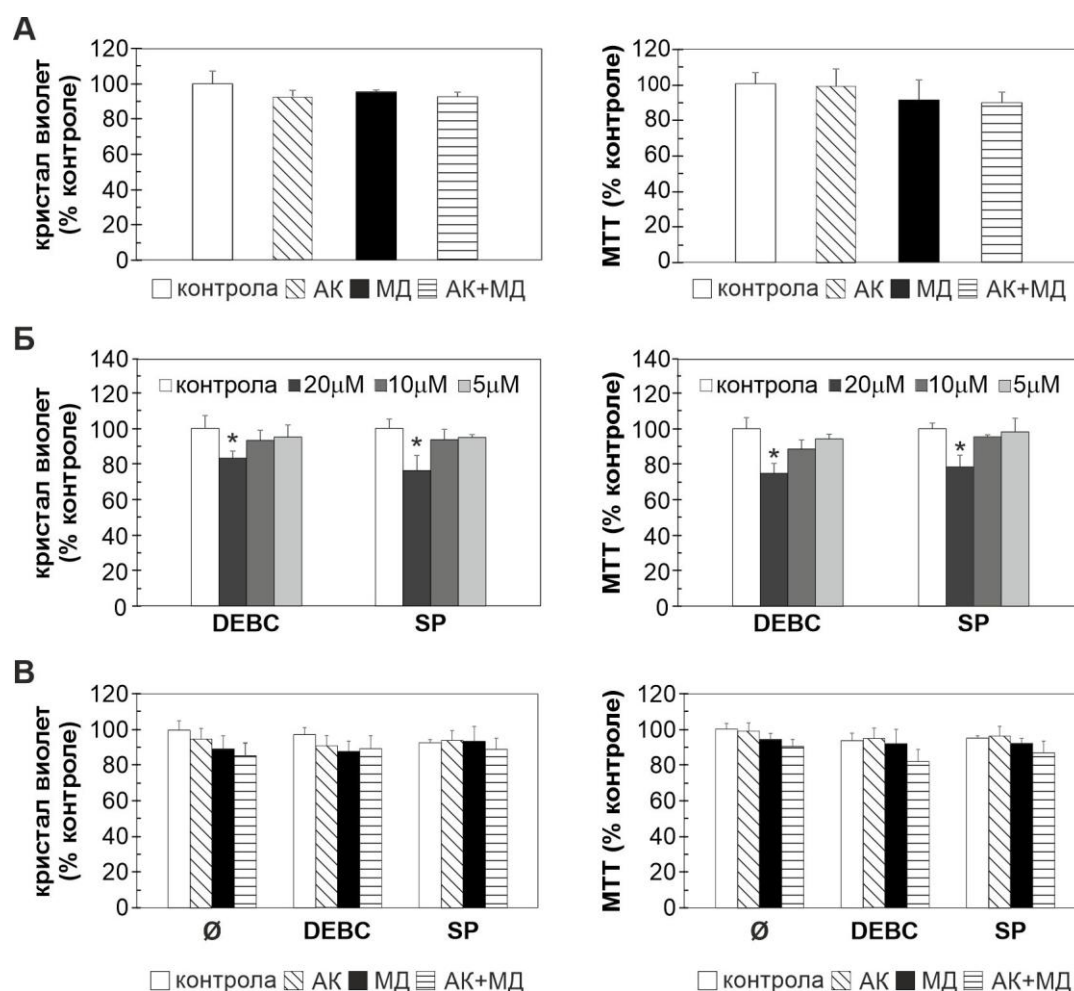


Слика 33. Експресија конститутивно активне форме АКТ киназе спречава МД и АК+МД да изазову аутофагију у U251 ћелијама. U251 ћелије трансфековане контролним (pcDNA) или плазмидним вектором који носи ген за конститутивно активну форму АКТ киназе (myr-AKT) су инкубирани са АК (1 mM), МД (20 μM) и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 1 h. Конверзија LC3-I у LC3-II и деградација p62 су анализирани имуноблотом, а јачина добијених имунореактивних трака је квантификована дензитометријом. Нивои LC3-II и p62 изражени су у односу на актин, контролни протеин који указује на униформност количине укупних протеина међу испитиваним узорцима. * $p < 0,05$ означава статистички значајну разлику у поређењу са одговарајућим третманима примењеним на ћелије које су трансфековане са pcDNA.

Имуноблот анализа нивоа LC3-II и p62 протеина након једночасовних третмана показала је да активација АКТ, постигнута трансфекцијом U251 ћелија плазмидним вектором који носи ген за мур-АКТ, спречава конверзију LC3 и деградацију p62, коју МД и АК+МД изазивају у ћелијама трансфекованим контролним плазмидом. Добијени резултат показује да активирана АКТ киназа спречава индукцију аутофагије у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД, што сугерише да би заштита коју ова киназа пружа ћелијама глиобластома могла бити последица инхибиције аутофагије.

4.30. Инхибитори киназа, АК, МД и њихове комбинације не утичу на вијабилност ћелијске линије хуманих плућних фибробласта MRC5

Селективност терапије према малигним у односу на малигно неизмењене, здраве ћелије организма, основни је предуслов за успешност хемиотерапије. Стога је било неопходно утврдити да ли третмани који су били предмет истраживања ове докторске дисертације имају утицај на вијабилност малигно неизмењених ћелија.



Слика 34. Испитивани третмани нису токсични за здраве, неизмењене ћелије фибробласта плућа. Ћелије фибробласта MRC5 су третиране АК (1 mM), МД (20 µM) и њиховом комбинацијом (АК+МД) током 24 h (А), различитим концентрацијама 10-DEBC (DEBC), односно SP600125 (SP), или су најпре изложене дејству DEBC/SP (10 µM, 30 минута пре-третман), а потом инкубиране са АК, МД или АК+МД (В). Ћелијска вијабилност је мерена кристал виолет и MTT тестовима. Резултати су приказани као средње вредности ± стандардне девијације трипликата једног од три независна експеримента. *p<0,05 означава статистички значајну разлику у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама.

У ту сврху су употребљене ћелије везивног ткива плућа, плућни фибробласти MRC5, чија је вијабилност, након третмана дугих 24 сата, мерена и кристал виолет и МТТ тестовима. Ова ћелијска линија се рутински користи за проверу селективности нових, потенцијалних лекова за терапију малигних болести, тако да се за агенсе који не смањују вијабилност MRC5 ћелија сматра да имају прихватљив токсиколошки профил и да нису штетни за здраве ћелије организма (Duarte и сар., 2022). Најпре је испитиван утицај АК, МД и АК+МД, као полазних третмана који су коришћени током целе студије. Тестови вијабилности кристал виолет и МТТ су показали да ниједан од ових третмана не утиче на вијабилност MRC5 ћелија (**Слика 34А**). Када су инхибитори 10-DEBC и SP600125 примењени као самостални третмани, само је њихова највећа доза (20 μ M) изазвала смањење вијабилности MRC5 ћелија, док остале концентрације нису биле токсичне (**Слика 34Б**). Коначно, испитана је токсичност АК, МД и АК+МД у комбинацији са 10-DEBC или SP600125. Без обзира што је раније показано да 10-DEBC и SP600125 појачавају цитотоксично дејство АК+МД и иницирају токсичност МД у култури ћелија хуманог глиобластома U251, ниједна од испитиваних комбинација није била токсична за здраве фибробласте MRC5 (**Слика 34В**). Резултати спроведеног експеримента сугеришу да су третмани примењени у овој студији селективни према U251 ћелијама хуманог глиобластома и нису токсични за неизмењене, здраве ћелије плућних фибробласта.

5. Дискусија

У овој докторској дисертацији је приказано да АК и МД, у концентрацијама које појединачно нису токсичне, синергистичком интеракцијом изазивају некрозу U251 ћелија хуманог глиобластома посредовану оксидативним стресом и деполаризацијом мембране митохондрија. Иако примењен појединачно не остварује цитотоксични ефекат, МД појачава стварање РВК и тиме активира АМПК и аутофагију у ћелијама U251. У присуству АК, исход аутофагије коју изазива МД се мења: комбинација АК+МД драстично повећава количину РВК, што доводи до инхибиције АКТ/mTOR, активације АМПК/ULK1 и покретања аутофагије која, иако доприноси уклањању РВК, као крајњи исход има ћелијску смрт. Такође, спроведено истраживање открива значај малих молекулских инхибитора у појачавању антиглиобластомског потенцијала МД и АК+МД: инхибитора АКТ киназе – 10-DEBC и инхибитора JNK киназе – SP600125. Додавањем 10-DEBC или SP600125 повећава се стварање РВК у ћелијама, услед чега МД стиче способност да изазове ћелијску смрт, а АК+МД испољава још јачу цитотоксичност. Иако је повећање оксидативног стреса механизам којим оба инхибитора остварују свој ефекат, разлика у ћелијском одговору огледа се у њиховом утицају на процес аутофагије: 10-DEBC има способност да нетоксичну аутофагију коју изазива МД претвори у механизам ћелијске смрти, као и да поспешује цитотоксичну аутофагију изазвану комбинацијом АК+МД, док SP600125 своје дејство остварује независно од овог процеса. Ниједан од испитиваних третмана није испољио цитотоксични ефекат на здраве ћелије фибробласта MRC5, што је посебно важно с обзиром на то да МД, иначе нетоксичан, има способност да повећа осетљивост U251 ћелија глиобластома на агенсе са којима је примењен у комбинацији (АК, 10-DEBC или SP600125).

Комбинација АК и МД, као изузетно јак редокс активни пар, била је предмет бројних истраживања током последњих неколико деценија. Цитотоксични потенцијал ове комбинације, остварен у културама различитих типова малигних ћелија, није уочен у случају ћелија истог порекла које нису малигно трансформисане (Semkova и сар., 2020). Цитотоксично дејство АК+МД на ћелије хуманог глиобластома U251, приказано у овој дисертацији, у складу је са резултатима других истраживања у којима је токсичност АК+МД показана на различитим ћелијским линијама глиобластома, примарним ћелијским културама изолованим из пацијената оболелих од овог типа малигнитета, као и *in vivo* моделима глиобластома (Vita и сар., 2011; Ren и сар., 2019; Sumiyoshi и сар., 2022; Sumiyoshi и сар., 2023). Преживљавање мишева са глиобластомом је продужено, а раст тумора је супримиран услед администрације АК+МД (Sumiyoshi и сар., 2023). Важно је истаћи да је у претходним истраживањима цитотоксичност АК+МД била селективна, јер, упркос токсичности коју је испољила на ћелијску линију глиома (DBTRG-05MG) и примарне ћелије глиобластома изоловане из осам пацијената, комбинација АК+МД није утицала на репликацију ДНК у деловима кортекса здравих пацова који су изложени њеном дејству (Vita и сар., 2011).

Синергизам између АК и МД је последица низа реакција оксидације и редукције које се остварују током њихове интеракције у ћелијама. АК улази у ћелију у редукованом облику преко SVCT2, или се у виду оксидоване форме, ДНА, транспортује путем глукозних транспортера који су веома заступљени у мембранама малигних ћелија (Ngo и сар., 2019). Са друге стране, МД захваљујући својој хидрофобној природи, пролази кроз плазмамембрану пасивном дифузијом. У унутарћелијском простору се одвија једноелектронска редукција МД у присуству аскорбата и ствара се велика количина $O_2^{\cdot-}$, који се даље преводи до H_2O_2 . Услед тога, ћелија улази у стање оксидативног стреса, праћеног низом оштећења која се окончавају ћелијском смрти (Ren и сар., 2019; Semkova и сар., 2020). Биолошки ефекти саме АК, која може имати и антиоксидативно и прооксидативно дејство, детерминисани су њеним концентрацијама. Наиме, АК самостално испољава прооксидативно дејство уколико се

примени у високим концентрацијама (до 15 mM) које омогућавају њену интеракцију са јонима прелазних метала пореклом из крви, екстраћелијске течности и/или туморског ткива (Pawlowska и сар., 2019). Међутим, и ниже концентрације АК, примењене у комбинацији са једињењима хинонске структуре као што је МД, довољне су за отпочињање низа редокс циклуса у којима се производи H_2O_2 , чак и у одсуству прелазних метала (Silveira-Dorta и сар., 2015). Бројне студије су показале да се у различитим типовима малигних ћелија, међу којима су ћелије леукемије, карцинома дојке, дебелог црева, панкреаса, простате, као и ћелије глиобластома, током редокс реакција између јонизованог облика АК – аскорбата и МД ослобађа велика количина РВК које даље на различите начине оштећују ћелијске структуре и доводе до смрти малигних ћелија (Verrax и сар., 2005; Verrax и сар., 2006; Beck и сар., 2009; Ren и сар., 2019; Semkova и сар., 2020; Sumiyoshi и сар., 2022). Комбинација АК и МД остварује терапијски ефекат у *in vivo* моделима и при концентрацијама ових агенаса које се могу достићи оралним уносом, а које су ниже од фармаколошких концентрација постигнутих интравенском или интраперитонеалном администрацијом (Jamison и сар., 2001; Bakalova и сар., 2020). Ефикасност ниских доза АК и МД у *in vivo* системима може бити последица, не само њиховог комбинованог дејства посредованог оксидативним стресом, већ и појединачних антиинфламаторних ефеката АК и МД који могу да сузбију прогресију и инвазију малигних ћелија (Bakalova и сар., 2020).

Важна последица оксидативног стреса у ћелијама је смањење потенцијала мембране митохондрија (Wen и сар., 2013; Kosić и сар., 2016), органела са централном улогом у енергетском метаболизму ћелије. У овој студији је показано да сама АК не повећава ниво РВК у цитосолу и $O_2^{\cdot-}$ у митохондријама U251 ћелија глиобластома. Напротив, антиоксидативна својства АК су изазвала благо смањење количине цитосолних РВК. Са друге стране, самостално примењен МД је незнатно повећао производњу РВК, а његово прооксидативно дејство је поспешено у присуству АК, тако да је ниво унутарћелијских РВК у U251 ћелијама третираним комбинацијом АК+МД вишеструко повећан. Изразито висока производња РВК у цитоплазми и $O_2^{\cdot-}$ у митохондријама под утицајем комбинације АК+МД изазвала је деполаризацију мембране митохондрија. Оксидативни стрес и деполаризација митохондрија доводе до смањења производње АТР услед оштећења респираторног ланца и губитка електрохемијског градијента неопходног за функционисање АТР-синтазе и могу бити главни медијатори процеса апоптозе и некрозе (Festjens и сар., 2006; Sinha и сар., 2013). Оштећења ћелијске мембране, евидентно одсуство апоптотичних ћелија обојених само анексином (анексин⁺/PI⁻), као и одсуство каспазне активности и протеолитичког исецања PARP протеина, уочени у овој студији, упућују на то да комбинација АК+МД изазива смрт U251 ћелија налик некрози, а не апоптози. Цитотоксичност АК+МД, независна од учешћа каспазе 3 и исецања PARP, описана је и у студијама спроведеним на ћелијама хепатоцелуларног карцинома и еритромијелоидне леукемије (Verrax и сар., 2004; Verrax и сар., 2006). Будући да је апоптоза врста програмиране ћелијске смрти и да захтева утрошак АТР, њен изостанак може бити последица инхибиције оксидативне фосфорилације изазване дејством МД или губитка каспазне активности у условима јаког оксидативног стреса (Azad и сар., 2009; Kushnareva и Newmeyer, 2010; Fukui и сар., 2012; Majiene и сар., 2019).

Присуство великог броја оштећених митохондрија са дезинтегрисаном мембраном и дисконтинуираним кристама, поред јасних знакова нарушавања њихове хомеостазе услед накупљања велике количине супероксида у матриксу и расипања потенцијала између две стране унутрашње мембране, указује на то да комбинација АК+МД може значајно да ослаби енергетске ресурсе у ћелијама глиобластома. Наиме, у туморским ткивима, нарочито у централним и слабо васкуларизованим регијама,

владају услови хипоксије и слабе доступности нутријената, а хипогликемијска средина је карактеристична и за глиобластома (Tanaka и сар., 2021). У условима ограниченог приступа глукози, ћелије овог тумора се ослањају на митохондрије, односно стварају енергију кроз оксидативну фосфорилацију и циклус трикарбоксилних киселина (Кребсов циклус или циклус лимунске киселине) (Griguer и Oliva, 2011; Oppermann и сар., 2016; Miki и сар., 2022). Управо ове ћелије, присутне у хипоксичним зонама тумора, које као примарни извор енергије користе оксидативну фосфорилацију, могу бити одговорне за рецидивирање глиобластома и развој резистенције на стандардну терапију (Wu и сар., 2021). Оксидативни метаболизам у митохондријама је енергетски ефикаснији од метаболичких путева који се одвијају у цитоплазми. Тако се, уз повећану производњу АТР, покрећу унутарћелијски сигнални путеви који омогућавају прогресију ћелијског циклуса, што ћелијама глиома омогућава висок пролиферативни капацитет и инвазивност (Griguer и Oliva, 2011). Митохондрије, дакле, имају важну улогу у развоју резистентних и метаболички хетерогених фенотипова глиобластома. Занимљиво је и то да, током комуникације малигних ћелија глиома са околним неизмењеним астроцитима, долази до хоризонталног трансфера митохондрија из здравих у малигне ћелије и метаболичког репрограмирања у смеру оксидативне фосфорилације, што је још једна у низу адаптивних способности које овај тумор чине неизлечивим (Watson и сар., 2023). Зато би својство АК+МД да изазива оштећења митохондрија и, следствено, биоенергетски дисбаланс, могло имати посебан значај за развој ефикасне стратегије у борби против глиобластома.

Оксидативни стрес као основни механизам цитотоксичног дејства комбинације АК+МД представља аксиом који је опште прихваћен у научној литератури. Цитотоксично дејство АК+МД на U251 ћелије хуманог глиобластома, показано у овој докторској дисертацији, потпуно је елиминисано у присуству NAC. Тиме је потврђена кључна улога унутарћелијског оксидативног стреса у токсичности комбинације АК+МД. Подударно овом резултату, и резултати студија урађених на леукемијским и ћелијама карцинома дојке показали су исти ефекат (Beck и сар., 2009; Bonilla-Porras и сар., 2011). Као један од механизма цитотоксичности МД (Wiraswati и сар., 2016) и АК+МД (Ren и сар., 2019; Bakalova и сар., 2020) наводи се смањење залиха GSH у малигним ћелијама. Стога, способност NAC да се супротстави цитотоксичном дејству АК+МД може бити приписана његовој особини да, као извор цистеина који је прекурсор GSH, посредно допуњава унутарћелијске резерве GSH и тиме појачава редукциону снагу ћелија (Aldini и сар., 2018). Доношење оваквог закључка подстакнуто је већ постојећим подацима који сведоче о капацитету других донора тиол група, попут самог L-цистеина и дитиотреитола, да пониште цитотоксични ефекат МД у ћелијама карцинома дојке и глиобластома (Delwar и сар., 2011; Yamada и сар., 2015).

Поред тога што је штитио ћелије од токсичног дејства АК+МД, NAC је предупредио и разградњу p62 и прелазак LC3-I у LC3-II, које у U251 ћелијама покрећу и МД и АК+МД. Наиме, МД и АК+МД, поред других показатеља аутофагије, изазивају нагомилавање липидоване форме LC3 протеина. Узрок повишеног нивоа LC3-II разјашњен је анализом аутофагног флуksа. Накупљање LC3-II изазвано МД и комбинацијом АК+МД додатно је појачано применом лизозомалног инхибитора, чиме је недвосмислено потврђено да су третмани МД, а посебно АК+МД, појачали флуks аутофагије у U251 ћелијама глиобластома (Loos и сар., 2019; Klionsky и сар., 2021). Ефекат који је NAC испољио на аутофагне маркере указује на то да је за појаву аутофагије под утицајем третмана МД и АК+МД одговорно нагомилавање унутарћелијских РВК. Сходно томе, додатно повећање производње РВК изазвано комбинованим третманом АК и МД, у односу на самостално примењени МД, праћено је појачаним аутофагним одговором. Добијени резултати нису изненађујући, имајући у виду чињеницу да је оксидативни стрес добро познат као

позитиван регулатор процеса аутофагије (Filomeni и сар., 2014; Ornatowski и сар., 2020). Свој утицај на аутофагију оксидативни стрес испољава на различитим нивоима: стимулацијом формирања фагофора, посттранслационим модификацијама протеинских киназа које контролишу овај процес (АКТ/mTOR, AMPK, MAPK), као и регулацијом транскрипционих фактора укључених у транскрипцију гена чији су производи важни за одвијање аутофагије, што је показано и у овој докторској дисертацији (Схема 5). Познато је да, у одговору на третман H_2O_2 , интегрални мембрански протеин кавеолин-1 интерагује са беклин-1/VPS34 комплексом и поспешује стварање аутофагозома (Nah и сар., 2017). Егзогени оксиданси или повишен ниво митохондријских РВК активирају канале на мембрани лизозома кроз које јони Ca^{2+} излазе у цитоплазму, услед чега TFEB прелази у једро и регулише транскрипцију *ATG* гена (Zhang и сар., 2016). Реактивне врсте кисеоника могу да утичу и на MAPK да активирају AP-1, FOXO и NF- κ B, транскрипционе факторе који такође регулишу експресију *ATG* гена (Redza-Dutordoir и Averill-Bates, 2021). Такође, РВК смањују активност главног репресора аутофагије, mTOR киназе, утицајем на његове усходне регулаторе – директном оксидативном модификацијом и инактивацијом АКТ или активацијом AMPK киназе (Ornatowski и сар., 2020).

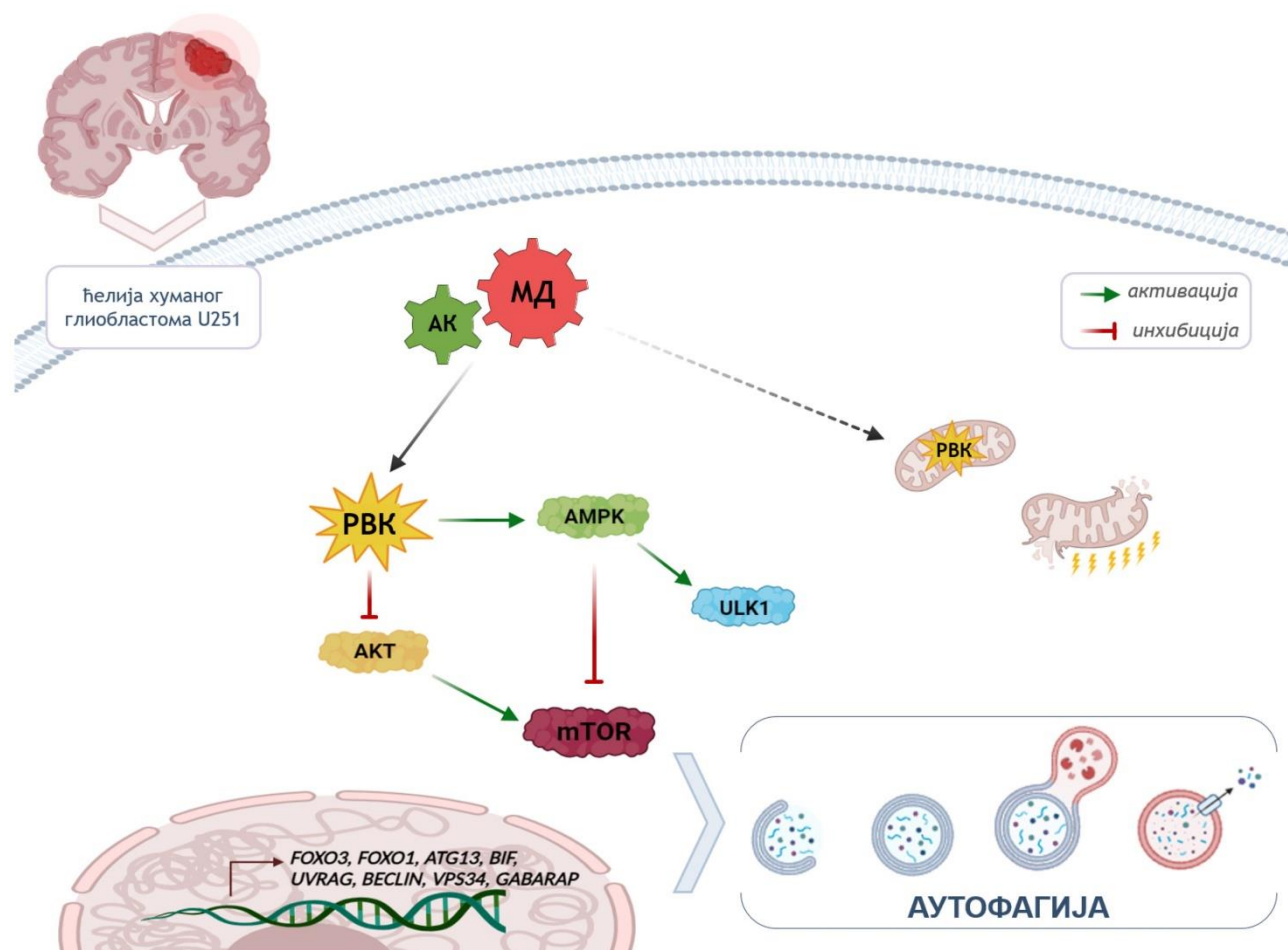


Схема 5. Утицај комбинације АК и МД на процес аутофагије у U251 ћелијама хуманог глиобластома.

Целокупно одвијање аутофагног процеса, почевши од формирања фагофоре, преко њеног сазревања у аутофагозом и, напослетку, до фузије аутофагозома са лизозомом, регулисано је протеинским производима *ATG* гена (Levine и Kroemer, 2019). Ефекат АК+МД на U251 ћелије евидентан је и на транскрипционом нивоу: од 11 анализираних *ATG* гена, сâм МД је позитивно утицао на транскрипцију два, док је комбиновани третман АК+МД значајно повећао експресију чак осам гена који кодирају

протеине укључене у иницијацију и реализацију аутофагије (**Схема 5**). Међу њима су гени за транскрипционе факторе FOXO1 и FOXO3 (Klionsky и сар., 2021), као и гени за чланове иницијационог комплекса (VPS34, беклин-1, ATG13, BIF и UVRAG) и протеине који учествују у фази елонгације аутофагије (GABARAP) (Kirkin и сар., 2009). Способност самог МД да изазове аутофагију у малигним ћелијама већ је документована у научној литератури (Singh и Czaja, 2008; Wang и сар., 2010; Czaja, 2011; Yu и сар., 2012; Borgne и сар., 2017; Galati и сар., 2019; Miyai и сар., 2019; Guizzardi и сар., 2020). Са друге стране, мањи број студија указује на активацију аутофагије под утицајем комбинације АК+МД (Beck и сар., 2009; Tomasetti и сар., 2012; Gilloteaux и сар., 2014). Наведена истраживања се нису бавила аспектом транскрипционе регулације аутофагије. Стога, откриће да АК+МД позитивно регулише аутофагију на нивоу транскрипције *ATG* гена, односно да се ефекат комбинације не одражава само на цитоплазматске структуре, већ се преноси и у једро, употпуњује знања о механизмима дејства ове комбинације и отвара додатна питања о начину на који АК+МД покреће процес аутофагије. Познато је да, у условима енергетског стреса, АМРК која се том приликом активира, фосфорилише FOXO3 (Greer и сар., 2007) и друге транскрипционе факторе који потом прелазе у једро, где утичу на транскрипцију гена укључених у биогенезу лизозома и регулацију аутофагије (Tamargo-Gómez и Mariño, 2018). Ово би могло послужити као посредно објашњење добијеног резултата, с обзиром на то да у експерименталној поставци овог истраживања и МД и АК+МД изазивају активацију АМРК.

Повишен степен фосфорилације енергетског сензора АМРК у присуству МД може бити последица слабљења енергетских ресурса у ћелијама под утицајем овог третмана (Fukui и сар., 2012; Мајене и сар., 2019). Способност МД да активира АМРК запажена је и у ћелијама леукемије, карцинома простате и у ћелијама бубрега младих пацова (Jin и сар., 2004; Jung и сар., 2008; Davies и сар., 2014). Међутим, опречни су подаци о утицају АК на фосфорилацију АМРК коју индукује МД: за разлику од налаза да АК ублажава активацију АМРК коју изазива МД (Davies и сар., 2014), резултати представљени у овој докторској дисертацији показали су да степен фосфорилације АМРК није значајно промењен комбиновањем МД са АК. Уочена неподударност би могла бити последица специфичности сигналног пута карактеристичног за тип ћелије, посебно због тога што су глиобластоми, из којих потичу U251 ћелије, солидни тумори, док је студија у којој је комбинација АК и МД активирала АМРК у мањој мери у односу на сâм МД урађена на ћелијама моноцитне леукемије. Такође, примењена концентрација АК је била неколико десетина пута нижа у односу на ону која је коришћена у овом истраживању. То може бити још један од разлога за различитост добијених резултата, због тога што АК, у зависности од концентрације, остварује супротне ефекте на ниво РВК у ћелијама. И заиста, у наведеној студији је количина H₂O₂ коју је МД произвео у леукемијским ћелијама значајно смањена додавањем АК (Davies и сар., 2014).

Повезаност активације АМРК и аутофагије у овој докторској дисертацији није директно потврђена циљаном манипулацијом (активацијом или инхибицијом) активности АМРК, али постоје индикације на основу којих се ова два догађаја, изазвана третманима МД и АК+МД, могу довести у везу. И аутофагија и активација АМРК су биле последице накупљања унутарћелијских РВК под утицајем МД и АК+МД. Познато је да АМРК, између осталог, може активирати аутофагију директном фосфорилацијом ULK1 на позицији Ser317 (Kim и сар., 2011). У овој докторској дисертацији је уочено да само комбинација АК+МД повећава степен фосфорилације ULK1 (Ser317), иако су и МД и АК+МД изазвали активацију АМРК (**Схема 5**, **Схема 6**). Антиоксиданс НАС је неутралисао активацију АМРК коју је изазвао МД и делимично смањео ефекат АК+МД на фосфорилацију АМРК и ULK1. На основу ових резултата може се претпоставити да је само у ћелијама третираним комбинацијом АК+МД, под утицајем јаког оксидативног стреса,

дошло до активације AMPK/ULK1 сигналног пута. Још један од ефеката АК+МД на регулаторне протеине укључене у процес аутофагије, који је повезан са прекомерним стварањем РВК, била је инхибиција mTOR/S6K. Познато је да ULK1 може да инхибира mTOR (Akers и сар., 2012), али и да mTOR, фосфорилацијом ULK1 на позицији Ser757, омета интеракцију AMPK и ULK1 (Kim и сар., 2011). У експерименталној поставци ове докторске дисертације, за разлику од третмана АК+МД који је инхибирао, третман МД није утицао на активност mTOR и његовог нисходног супстрата S6K. Дакле, постоји могућност да је та базална активност mTOR киназе у ћелијама изложеним дејству МД била довољна да спречи интеракцију AMPK и ULK1 и тиме онемогући активацију ULK1. Утицај комбинације АК+МД на сигнални пут mTOR киназе до сада није испитиван. Ипак, показано је да постоји синергизам између ниских доза АК+МД и познатог инхибитора mTOR – еверолимуса у изазивању смрти леукемијских туморских ћелија (Ivanova и сар., 2018). То указује на значај инхибиције mTOR киназе у цитотоксичном потенцијалу АК+МД, односно у повећавању осетљивости малигних ћелија на дејство АК+МД. Ипак, у поменутој студији није анализиран утицај АК+МД и еверолимуса на процес аутофагије, тако да није разјашњено да ли је повећање цитотоксичности АК+МД повезано са активацијом аутофагије или укључује и неке друге механизме независне од овог процеса. У овој дисертацији, поред активације AMPK (негативног регулатора mTORC1), комбинација АК+МД у почетку повећава, а затим снажно инхибира активност АКТ киназе, веома важног активатора mTORC1. Одржавање mTOR у статусу инхибиције током кратког периода повећане активности АКТ може да буде резултат компензаторног дејства AMPK киназе. Добијени резултат наводи на закључак да је аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД зависна од АКТ киназе као негативног регулатора, што је делимично потврђено и инхибицијом аутофагије у ћелијама које експримирају конститутивно активну форму АКТ, а третиране су комбинацијом АК+МД. Свакако, откриће да АК+МД инхибира и АКТ и mTOR/S6K, без обзира на механизме који до тога доводе, има изузетну важност, с обзиром на неоспорну улогу прекомерно активираних PTEN/PI3K/АКТ/mTORC1 сигналне каскаде у иницијацији и прогресији глиобластома (Colardo и сар., 2021).

Један од најзначајнијих феномена откривених у овој докторској дисертацији јесте способност АК да промени исход аутофагије коју изазива МД (**Схема 6**). Аутофагија која се јавља као одговор на третман МД није механизам који U251 ћелије води у смрт, јер МД *per se* није био цитотоксичан. Када се дејству МД придружи АК, аутофагија постаје део цитотоксичног механизма и доприноси некрози ћелија. Насупрот овом резултату, до сада објављене студије сугеришу да аутофагија коју покрећу и МД и АК+МД пружа ћелијама заштиту уклањањем погрешно савијених протеина, одржавањем интегритета ДНК и обнављањем биомолекула који представљају градивне блокове и енергетске ресурсе у ћелијама (Wang и сар., 2010; Tomasetti и сар., 2012; Yu и сар., 2012; Galati и сар., 2019). У истраживању спроведеном на ћелијама карцинома дојке, аутофагија изазвана комбинацијом АК+МД коинцидира са појавом ћелијске смрти, али је утврђено да ова два процеса нису међусобно повезана (Beck и сар., 2009). Функционална различитост аутофагног процеса, показана у истраживањима чији је предмет био ефекат АК+МД на разне типове малигних ћелија, може бити последица управо специфичног ћелијског одговора који потиче од различитости молекуларних, односно генетичких профила малигних ћелија, разлике у концентрацијама АК и МД, али и експерименталног дизајна примењеног за одређивање улоге аутофагије у одговору ћелија на дејство АК+МД. Важно је напоменути да су у наведеним студијама протективна улога аутофагије или одсуство њеног учешћа у ћелијској смрти изазваној комбинацијом АК+МД изведени из резултата добијених инхибицијом овог процеса искључиво применом фармаколошких агенаса који инхибирају формирање аутофагозома (3-метиладенин) или аутофагну протеолизу

(хлорокин) (Beck и сар., 2009; Tomasetti и сар., 2012). Ниједан од наведених агенаса није специфичан инхибитор аутофагије. Штавише, 3-метиладенин може да индукује аутофагију у одређеним условима (Wu и сар., 2010), док хлорокин остварује цитотоксично дејство независно од процеса аутофагије (Harhaji-Trajković и сар., 2012; Stamenković и сар., 2019). Таква сумња је у експерименталној поставци ове докторске дисертације отклоњена применом генетичке инхибиције, утишавањем гена за беклин-1 и LC3, протеине који представљају кључне компоненте аутофагне машинерије. На тај начин је недвосмислено показано да комбинација АК+МД активира цитотоксичну аутофагију у U251 ћелијама глиобластома. Поред тога, фармаколошка и генетичка супресија аутофагије довеле су до додатног накопљања РВК у цитосолу и митохондријама ћелија третираних комбинацијом АК+МД. Ови резултати упућују на то да најпре долази до акумулације РВК, а затим се нисходно активира аутофагија. Упркос томе што у одређеној мери доприноси уклањању РВК, активирана аутофагија представља део механизма цитотоксичног дејства АК+МД. Претпостављени механизам деловања комбинације АК+МД у култури U251 ћелија, почевши од оксидативног стреса преко инхибиције mTORC1, активације аутофагије и, на крају, смрти U251 ћелија, представљен је на **Схеми 6**. И други агенси, као што су H₂O₂, урсолинска киселина, хонокиол и синоменин хидрохлорид, имали су сличан образац дејства у различитим ћелијским моделима глиобластома: повишен ниво РВК је изазивао mTOR-зависну аутофагију чији је исход била ћелијска смрт (Seo и сар., 2010; Shen и сар., 2014; Lin и сар., 2016; Jiang и сар., 2017).

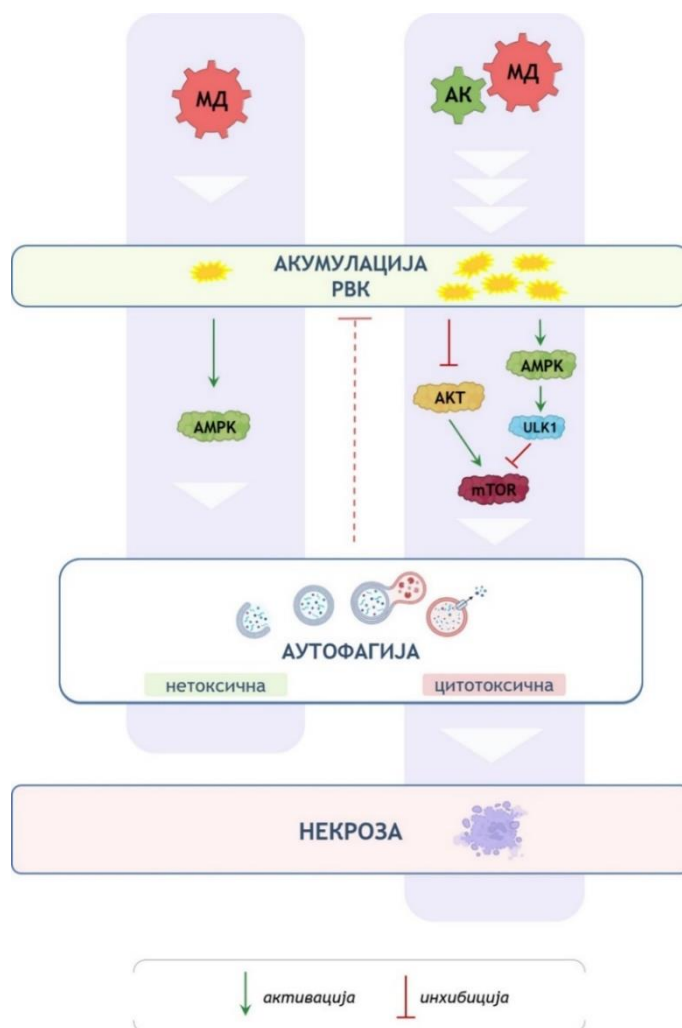


Схема 6. Приказ главних догађаја које изазивају МД и АК+МД у U251 ћелијама и њихова међусобна повезаност.

Капацитет МД да повећа количину РВК није био довољан за инхибицију mTOR, док је интеракција АК и МД била праћена јаким оксидативним стресом који је довео до модулације сигналних путева AMPK и АКТ и следствене инхибиције mTOR. Услед ових промена, аутофагни одговор је појачан у мери која превазилази границу нетоксичности, што може бити основа за синергистичку цитотоксичност АК и МД према U251 ћелијама. Ова претпоставка је поткрепљена резултатима добијеним приликом стимулације аутофагије трехалозом, или појачавањем експресије гена за TFEB, услед чега је поновљен исти феномен: нетоксична аутофагија изазвана третманом МД мења своју функцију, изазивајући ћелијску смрт. Промена исхода аутофагије забележена је и у студији рађеној на ћелијама карцинома дојке, где се као последица зрачења ћелија активирала аутофагија као механизам заштите, а додатно излагање витамину Д₃ је узроковало њену транзицију у цитотоксични механизам (Wilson и сар., 2011). Дакле, способност АК да аутофагију коју изазива МД усмери ка ћелијској смрти, може бити у основи њиховог синергистичког цитотоксичног дејства. Међутим, не би требало у потпуности искључити могућност да је АК окидач неких догађаја независних од процеса аутофагије који у синергизму са аутофагијом, већ покренутом под утицајем МД, изазивају ћелијску смрт.

Када је реч о измењеном молекуларном профилу ћелија глиобластома који им даје предност у погледу пролиферације, миграције и преживљавања, поред PI3K/AKT/mTOR, промене у Ras/MEK/MAPK сигналном путу су међу најчешће помињаним (Nakada и сар., 2011). Студија урађена на ћелијском моделу карцинома дојке показала је да комбинација АК+МД смањује активацију ERK, појачава активацију p38 и не утиче на активност JNK, али да ни ERK нити p38 немају утицај на преживљавање MCF7 ћелија (Beck и сар., 2009). Резултати представљени у овој докторској дисертацији се делимично разликују: АК+МД изазива активацију ERK, али је то секундарни догађај у односу на механизме који су довели до ћелијске смрти, будући да инхибитор ове киназе (PD098059) није утицао на ћелијску вијабилност. Са друге стране, под утицајем инхибитора p38 – SB203580 вијабилност U251 ћелија третираних АК+МД је значајно повећана, што указује на то да је активација p38 била део сигналног пута који је доприносио ћелијској смрти изазваној комбинацијом АК и МД. Важно је истаћи да је концентрација МД која је примењена на MCF7 ћелије била двоструко нижа у односу на концентрацију која је коришћена у овој докторској дисертацији, те би то могао бити узрок различитих образаца фосфорилације MAPK, као и њихове улоге у одговору ћелија на дејство АК+МД. Поред тога, U251 и MCF7 ћелије потичу из различитих ткива, тако да разлике у њиховим молекуларно-биолошким профилима могу бити још један разлог за различит одговор на третман АК+МД. Даљим испитивањем улоге АКТ и MAPK протеина у одговору ћелија на третмане коришћене у овој докторској дисертацији, уочен је важан ефекат инхибитора АКТ киназе – 10-DEBC хидрохлорида и инхибитора JNK киназе – SP600125: иницирање цитотоксичног дејства иначе нетоксичног МД и додатно појачавање већ евидентиране цитотоксичности комбинације МД и АК. Овај резултат је посебно значајан због тога што је активност АКТ и JNK појачана у одговору стабилних и примарних ћелијских линија глиобластома на стандардни терапијски протокол, а познато је да ове киназе доприносе малигној трансформацији, инвазивности и развоју резистенције глиобластома на зрачну и хемиотерапију (Yacoub и сар., 2004; Li и сар., 2009; Munoz и сар., 2014; Ueno и сар., 2015; Yu и сар., 2015; Singh и сар., 2021). Зато су у даљем току овог истраживања испитивани молекуларни механизми путем којих 10-DEBC и SP600125 утичу на коначни исход третмана МД и АК+МД у U251 ћелијама глиобластома.

Поспешивање смрти U251 ћелија утишавањем активности АКТ и JNK киназа АТР-компетитивним инхибиторима 10-DEBC и SP600125, редом, у складу је са ефектима других инхибитора ових киназа који су документовани у научној литератури.

Инхибитори АКТ киназе, као што су алостерни инхибитори МК-2206 и SC66, алкил-фосфолипидни инхибитор перифозин, АТР-компетитивни инхибитор IV и пан-АКТ инхибитор А-443654, су или појачали ћелијску смрт, или деловали антипролиферативно на глиобластомске ћелије и туморске ћелије пореклом из других ткива које су служиле као модел кранијалних метастаза (Gallia и сар., 2009; Chautard и сар., 2010; Cheng и сар., 2012; Narayan и сар., 2017; Ramezani и сар., 2017; Gao и сар., 2020; Taniguchi и сар., 2021). Перифозин је у овој докторској дисертацији коришћен као потврда да инхибиција АКТ киназе појачава ефекат МД и комбинације АК+МД, док су ефекти 10-DEBC детаљније истражени. Студије других аутора такође су показале да АТР-компетитивни инхибитори JNK киназе, AS602801 и SP600125 (који је био предмет истраживања ове докторске дисертације), спречавају раст и изазивају смрт ћелија глиома (Vo и сар., 2014; Zhang и сар., 2021). Међу наведеним инхибиторима, они који су примењивани заједно са другим облицима терапије, попут зрачне терапије, ТМЗ, гефитиниба, винкристина и бевацизумаба, потенцирали су дејства терапеутика са којима су истовремено примењивани. Тако су, поред успоравања пролиферације ћелија и раста тумора, инхибитори АКТ и JNK киназа испитивани у наведеним студијама, углавном изазвали апоптотску ћелијску смрт у различитим *in vitro* и *in vivo* моделима глиобластома (Cheng и сар., 2012; Vo и сар., 2014; Ramezani и сар., 2017; Gao и сар., 2020; Zhang и сар., 2021). Појачање ефекта примарног третмана (МД и АК+МД) применом инхибитора АКТ и JNK киназа показано је и у овој докторској дисертацији: потенцирање некрозе (а не апоптозе) применом 10-DEBC и SP600125 највероватније је последица енергетског колапса ћелије услед јаког оксидативног стреса и способности хинонских једињења, какав је МД, да ослабе енергетске ресурсе неопходне за одвијање апоптозе (Мајјене и сар., 2019). Такође, важно је имати у виду да различити инхибитори АКТ и JNK остварују биолошке ефекте у зависности од својих фармаколошких особина, профила селективности и механизма којима инхибирају активност ових киназа и њихових нисходних циљних молекула (Kostaras и сар., 2020; Wu и сар., 2020). Уз то, молекуларно-биолошки и метаболички профил самих глиобластома у великој мери утиче на ефекте терапије. Примера ради, у туморским ћелијама у којима је АКТ киназа конститутивно активна уочен је висок степен аеробне гликолизе (Elstrom и сар., 2004). У глиобластомима, АКТ киназа функционише као метаболички прекидач. Наиме, повишен унос глукозе и појачана аеробна гликолиза у ћелијама глиобластома посредовани су овом киназом, а њену експерименталну инхибицију прате смањен унос глукозе и производња лактата (Elstrom и сар., 2004). Зато би смањење доступности енергетских супстрата изазвано инхибицијом АКТ, заједно са инхибицијом гликолизе и процеса производње енергије у митохондријама под утицајем АК+МД (која је показана у студијама других аутора), могло бити разлог за потенцирање некрозе ћелија глиобластома (Verrax и сар., 2006; Beck и сар., 2009; Semkova и сар., 2021). Мали молекулски инхибитори 10-DEBC и SP600125 заправо убрзавају или појачавају процесе који су већ покренути у U251 ћелијама под утицајем МД и АК+МД као примарних третмана: МД постаје цитотоксичан, а АК+МД изазива смрт U251 ћелија у још већој мери. Даље испитивање механизма путем којих ови инхибитори утичу на исход третмана МД и комбинације АК+МД подразумевало је праћење главних догађаја које МД и АК+МД покрећу у U251 ћелијама, а то су производња РВК и аутофагија (**Схема 7**).

Проучавањем везе оксидативног стреса са фосфорилационим обрасцем АКТ и JNK уочено је да је акумулација РВК у U251 ћелијама окидач за активацију ових киназа. Насупрот активацији JNK која је била континуирана, након почетне активације АКТ киназе наступила је изразита дефосфорилација, односно инхибиција њене киназне активности. Активација JNK може бити последица губитка функције негативних регулатора ове киназе осетљивих на оксидативни стрес (GSH-S трансфераза и JNK

фосфатаза) (Martindale и Holbrook, 2002). Са друге стране, познато је да током накупљања РВК у ћелијама АКТ подлеже конформационој промени која доводи до њене пролазне активације. Услед тога, блокирано је формирање комплекса између АКТ и шаперона Hsp90 (енгл. *heat shock protein 90 kDA*) и омогућен је контакт АКТ и фосфатазе А2 (Сао и сар., 2009). Дакле, промена у обрасцу фосфорилације АКТ, под утицајем јаког оксидативног стреса који се јавља током продуженог третмана АК+МД, може бити проузрокована блиском интеракцијом између АКТ и фосфатазе А2 која је дефосфорилише и инактивира (Сао и сар., 2009; Zhang и сар., 2016; Koundouros и Roulogiannis, 2018). Ово се не дешава под утицајем третмана МД, где долази до благог повећања РВК у ћелијама. Другим речима, у условима јаког оксидативног стреса, негативни регулатори АКТ и JNK киназа супротно реагују: инхибиција JNK се губи, а инхибиција АКТ се појачава. Управо ово може бити узрок различитог фосфорилационог (активационог) статуса АКТ и JNK киназа, показаног у овој докторској дисертацији.

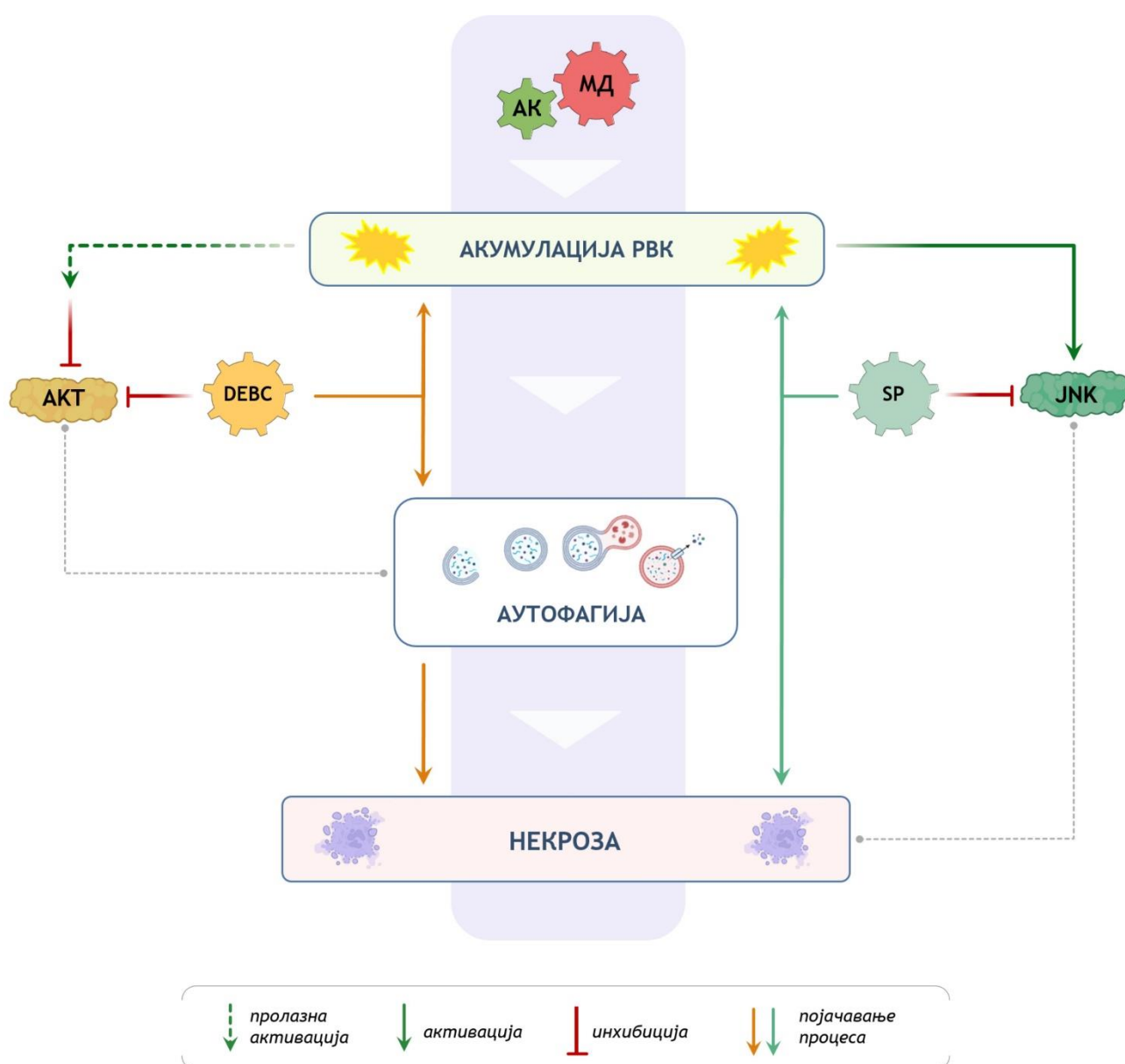


Схема 7. Утицај малих молекулских инхибитора АКТ и JNK киназа (10-DEBC и SP600125) на процесе које комбинација АК+МД покреће у ћелијама хуманог глиобластома U251.

Појачана активност АКТ киназе даје ћелијама глиома адаптивну предност и могућност да избегну штетне ефекте хемиотерапеутика регулацијом чланова фамилије Bcl2 протеина укључених у процес апоптозе, или регулацијом транскрипционих фактора одговорних за експресију гена за ензиме антиоксидативне заштите (HIF-1, FOXO3, NF- κ B и Nrf2) (Singh и сар., 2021). Краткотрајна активација АКТ под утицајем МД и АК+МД, уочена у овој студији, повећава антиоксидативни капацитет ћелија. И резултати других истраживања су показали да се АКТ супротставља штетном ефекту оксидативног стреса (Koundouros и Poulogiannis, 2018; Goetting и сар., 2022). Међутим, убрзо након активације АКТ киназе у одговору на третман АК+МД уследила је њена инхибиција, тако да почетна активност АКТ није била довољна да спречи оксидативни стрес и његове штетне ефекте. У условима када је АКТ киназа селективно инхибирана применом 10-DEBC, МД је испољио токсичну природу производњом РВК до нивоа који је превазишао одбрамбене капацитете ћелија. У ћелијама које су након инхибиције АКТ третиране АК+МД, додатно накопљање РВК је условило још јачу цитотоксичност ове комбинације. Обратно, када је експерименталном манипулацијом постигнута хиперактивност АКТ киназе, количина РВК је била смањена у оба третмана, а цитотоксичност АК+МД је спречена. Добијени резултати указују на постојање повратне спреге између оксидативног стреса и активације АКТ киназе. Такође, ови резултати делимично откривају механизам којим 10-DEBC појачава дејство МД и АК+МД, али су неопходни додатни експерименти да би се разјаснило на који начин 10-DEBC ремети системе антиоксидативне заштите у ћелијама глиобластома.

Поред претпостављеног утицаја АКТ на систем антиоксидативне заштите, у овој дисертацији је први пут установљено да је смањење активности АКТ у корелацији са цитотоксичном природом АК+МД. Цитотоксично дејство бројних синтетичких или природних антитуморских агенаса на различите типове малигних ћелија, међу којима су и ћелије глиома, засновано је на инхибицији АКТ под утицајем РВК (Сао и сар., 2009; Li и сар., 2015; Arooi и сар., 2016; Wang и сар., 2018; Pang и сар., 2019; Wen и сар., 2019). Аскорбат комбинован са другим 1,4-нафтохиноним инхибира АКТ у ћелијама карцинома дојке и у *in vivo* мишјем моделу аденокарцинома дојке (Ourique и сар., 2015). Када је у питању појединачно дејство МД, активациони профил АКТ киназе забележен у студијама других аутора није једнообразан. У ћелијама карцинома дојке и 3T3-L1 мишјим преадипоцитима, МД је инхибирао АКТ (Sajadimajd и Yazdanparast, 2015; Funk и сар., 2021), док је у малигним ћелијама простате и пацовског модела карцинома дебелог црева изазивао умерени оксидативни стрес, праћен пролазном активацијом АКТ (Pandur и сар., 2007; Yoshikawa и сар., 2007). Супротни ефекти које МД има на активност АКТ киназе, показани у наведеним студијама, највероватније су последица примене различитих експерименталних услова и различитих типова ћелија. Поред тога, ове студије говоре у прилог чињеници да се АКТ киназа активира као одбрамбени механизам у одговору нетрансформисаних и малигних ћелија на оксидативни стрес који изазива МД, а да инхибиција АКТ корелира са цитотоксичним ефектима МД (Pandur и сар., 2007; Lim и сар., 2008; Clark и сар., 2009).

Улога JNK у смрти малигних ћелија током оксидативног стреса је сложена. Јака, непрекидна активација JNK изазвана високим нивоима РВК покреће апоптозу, некрозу или оба типа смрти. Са друге стране, нижи степен активности JNK омогућава поправку оштећења ДНК и повећава синтезу молекула антиоксидативне заштите и тако ћелијама тумора обезбеђује преживљавање стресних услова (Shaukat и сар., 2016; Chesca и Aran, 2020). У овој докторској дисертацији забележена су оба случаја: блага активација JNK у ћелијама третираним МД које, при томе, нису испоиле знаке ћелијске смрти и јака активација JNK изазвана комбинацијом АК+МД, праћена некрозом ћелија. Међутим, селективна инхибиција JNK киназе применом SP600125 или утишавањем експресије

JNK гена имала је сличан утицај на преживљавање U251 ћелија као и третман 10-DEBC – подстицање токсичности иначе нетоксичног МД и појачавање цитотоксичног дејства комбинације АК+МД. Истовремено, приликом примене SP600125, уочен је тренд повећавања количине РВК у ћелијама третираним и МД и АК+МД. Способност SP600125 да поспешу стварање РВК документована је и у другим студијама. Показано је да се *JNK* својом активношћу супротставља акумулацији РВК у ћелијама шванома које су расле у одсуству серума, као и у фибробластима озраченим UV светлом (López-Sánchez и сар., 2007; Courtial и сар., 2017). У овој докторској дисертацији, применом SP600125 или инхибицијом експресије *JNK* гена постигнут је цитотоксични ефекат МД. Такође, додатком SP600125 је повећана производња РВК у ћелијама. Уочени ефекти наводе на закључак да је активација *JNK* под утицајем МД била део механизма заштите U251 ћелија, те да би се њеном инхибицијом могла повећати осетљивост ових ћелија на МД. Ово је у складу са студијом урађеном на U87 ћелијама глиобластома, која је показала да SP600125 има потенцијал да појача токсичност ТМЗ (Vo и сар., 2014). Сличан резултат добијен је и у култури RALA пацовских хепатоцита, у којој је SP600125 појачао осетљивост ћелија на МД (Amir и сар., 2012). Са друге стране, улога *JNK* у одговору U251 ћелија на третман АК+МД је мање јасна. Изузетно висока, продужена активација *JNK* киназе би могла указивати на њену улогу у индукцији некрозе. Слично томе, активација *JNK* је корелисала са индукцијом смрти глиобластомских ћелија које су третиране трипиролским пигментом продигиозином и наночестицама ресвератрола, као и након излагања примарних глиобластомских ћелија зрачењу и терапији цитокином GST-MDA-7 (Yacoub и сар., 2004; Cheng и сар., 2018; Lin и сар., 2021). Међутим, генетичка и фармаколошка инхибиција *JNK* у спроведеним истраживањима нису спречиле ћелијску смрт, штавише, повећале су је. Постоји могућност да је рана активација *JNK* укључена у механизме заштите ћелија, а да би се у потпуности испољио њен допринос ћелијском преживљавању, неопходно је да истовремено буде активирана и АКТ киназа (Lamb и сар., 2003). Инхибиција АКТ која наступа касније током третмана ћелија комбинацијом АК и МД, као и инхибиција *JNK* помоћу SP600125 или *JNK* siRNA, могу пореметити баланс механизма који омогућавају ћелијама да преживе и дати предност механизмима ћелијске смрти, као финалном исходу дејства АК+МД. Однос између PI3K/АКТ и MAPK/*JNK* сигналних путева у малигним ћелијама је сложен. Познато је да, у ћелијама глиобластома третираним ТМЗ, *JNK* фосфорилише АКТ киназу на позицији Thr450 и на тај начин омогућава фосфорилацију АКТ на другим местима, што је неопходно за њену стабилизацију и потпуну активацију (Vo и сар., 2014; Zhao и сар., 2015). Узевши све наведено у обзир, не може се искључити могућност међусобне интеракције ових сигналних путева, иако њихова повезаност овде није испитивана.

У овој докторској дисертацији је показано да су оксидативни стрес, аутофагија и ћелијска смрт главни догађаји који прате третман АК+МД, као и да 10-DEBC и SP600125 појачавају капацитет МД и АК+МД да произведу РВК и тиме снижавају праг осетљивости U251 ћелија (**Схема 7**, **Схема 8**). Зато се намеће питање да ли је, и на који начин, процес аутофагије укључен у ћелијски одговор на 10-DEBC и SP600125. Насупрот SP600125 који није изменио утицај МД и АК+МД на главне показатеље аутофагије, 10-DEBC је значајно повећао број везикула налик аутофагним везикулама, ниво LC3-II форме асоциране са аутофагозомима, као и разградњу p62 протеина које су изазвали МД и АК+МД. Другим речима, *JNK* киназа није укључена у регулацију аутофагије у овој експерименталној поставци, док инхибиција АКТ доводи до појачања аутофагног процеса. Подударно томе, прекомерна експресија активне форме АКТ ослабила је аутофагни одговор на МД и АК+МД, што потврђује да је у испитиваном систему аутофагија последица инхибиције ове киназе. С обзиром на то да је АКТ познати инхибитор аутофагије, о чему је већ дискутовано, као и да су у присуству 10-DEBC ефекти МД и АК+МД на U251 ћелије

пренаглашени, долази се до претпоставке да 10-DEBC инхибицијом АКТ убрзава стварање услова за формирање аутофагозома. Повећана производња РВК услед третмана МД и АК+МД представља додатни импулс за прогресију аутофагије, што резултује појачаним аутофагним одговором U251 ћелија на третмане МД и АК+МД у присуству 10-DEBC. Поспешивање процеса аутофагије у ћелијама глиобластома употребом различитих инхибитора АКТ киназе је познато и из других студија, али је улога аутофагије изазване на овај начин контроверзна, јер се јавља и као протективни и као механизам који има штетни ефекат на ћелије (Cheng и сар., 2011; Cheng и сар., 2012; Qin и сар., 2013; Ríos-Marco и сар., 2015; Feng и сар., 2019). У овој докторској дисертацији је улога појачаног аутофагног одговора на МД и АК+МД у присуству 10-DEBC одређена инхибицијом експресије гена за LC3. Блокада аутофагије извршена на овај начин је поништила утицај 10-DEBC на примарне третмане, указујући на то да је 10-DEBC стимулисао цитотоксичну аутофагију. Овај резултат сугерише да би инхибиција PI3K/АКТ могла послужити као полазни сигнал за активацију аутофагије. Тиме би се могли појачати ефекти стимулуса који посредством РВК изазивају ћелијску смрт, односно снижити праг осетљивости ћелија глиобластома на пратеће терапеутике. Управо ово би могао бити механизам којим МД, једињење са прооксидативним својствима без капацитета да изазове смрт U251 ћелија, у присуству 10-DEBC постаје цитотоксичан. Појачана аутофагија која прати овај ефекат могла би учествовати у селективној деградацији ензима антиоксидативне заштите као што је каталаза или селективних аутофагних рецептора p62 и BNIP3, а самим тим би могла бити разлог за смањену отпорност малигних ћелија на РВК (Fulda и Kögel, 2015).

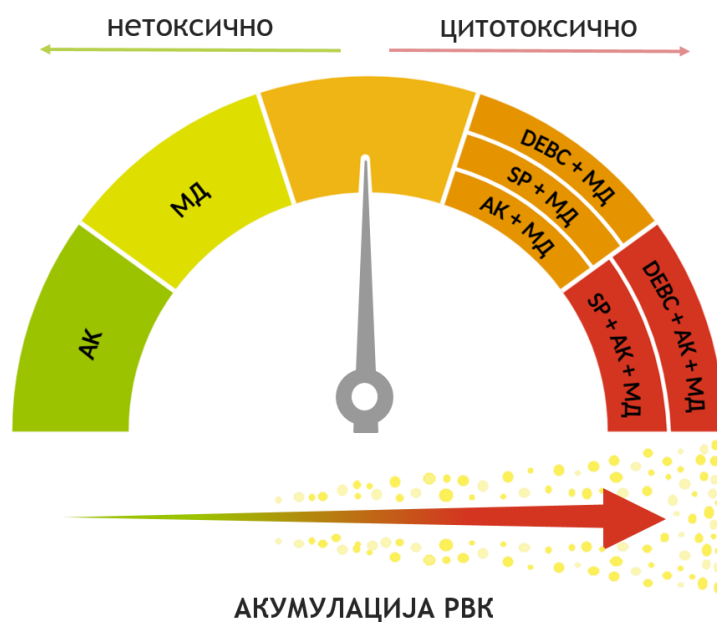


Схема 8. Токсичност различитих комбинација МД, АК, 10-DEBC и SP600125 расте са повећањем производње РВК у U251 ћелијама.

Уколико се унутарћелијски одговори праћени у овој студији посматрају као један систем, где су улазне компоненте примењени третмани, а коначни исход ћелијска смрт, може се уочити тренд да појединачни третмани не остварују утицај на ћелијску вијабилност, док се њиховим комбиновањем постиже цитотоксични ефекат као пожељан исход потенцијалне антитуморске терапије (Схема 9). То је најпре уочено у случају МД и АК, који заједничким дејством самостално нетоксичних концентрација изазивају смрт U251 ћелија. Слично томе, мали молекулски инхибитори АКТ и JNK киназа, 10-DEBC и SP600125, појединачно нису утицали на вијабилност U251 ћелија,

али су омогућили да МД испоји токсичан ефекат, појачали осетљивост ћелија на комбинацију АК и МД, док на третман АК нису остварили никакав утицај. Очигледно да је у овом систему МД био компонента третмана неопходна за изазивање смрти ћелија глиобластома, због чега би му се могла приписати особина успешног хемосензитизера у терапији малигних болести. Без обзира на тип интеракције међу агенсима примењеним у комбинацији, резултати ове дисертације откривају потенцијал удруженог дејства АК, МД и малих молекулских инхибитора АКТ или JNK киназе као ефикасне стратегије у борби против глиобластома. Ова тврдња има добру основу у чињеници да и МД и мали молекули могу да прођу крвно-моздану баријеру, као и да су SVCT и GLUT транспортери, путем којих АК из крви доспева до церебро-спиналне течности и даље се преузима од стране ћелија ЦНС, прекомерно експримирани у глиобластомима (May, 2012; Vita и сар., 2011; Grasso и сар., 2014; Ngo и сар., 2019; Benn и Dawson, 2020; Renner и сар., 2021; Wu и сар., 2023). Поред великог броја преклиничких истраживања чији резултати указују на терапијски значај SP600125 као инхибитора JNK киназе (Wu и сар., 2020), овде се први пут истиче потенцијал 10-DEBC, инхибитора АКТ киназе, који је вредан даљих изучавања у циљу развоја ефикасне антитуморске терапије.

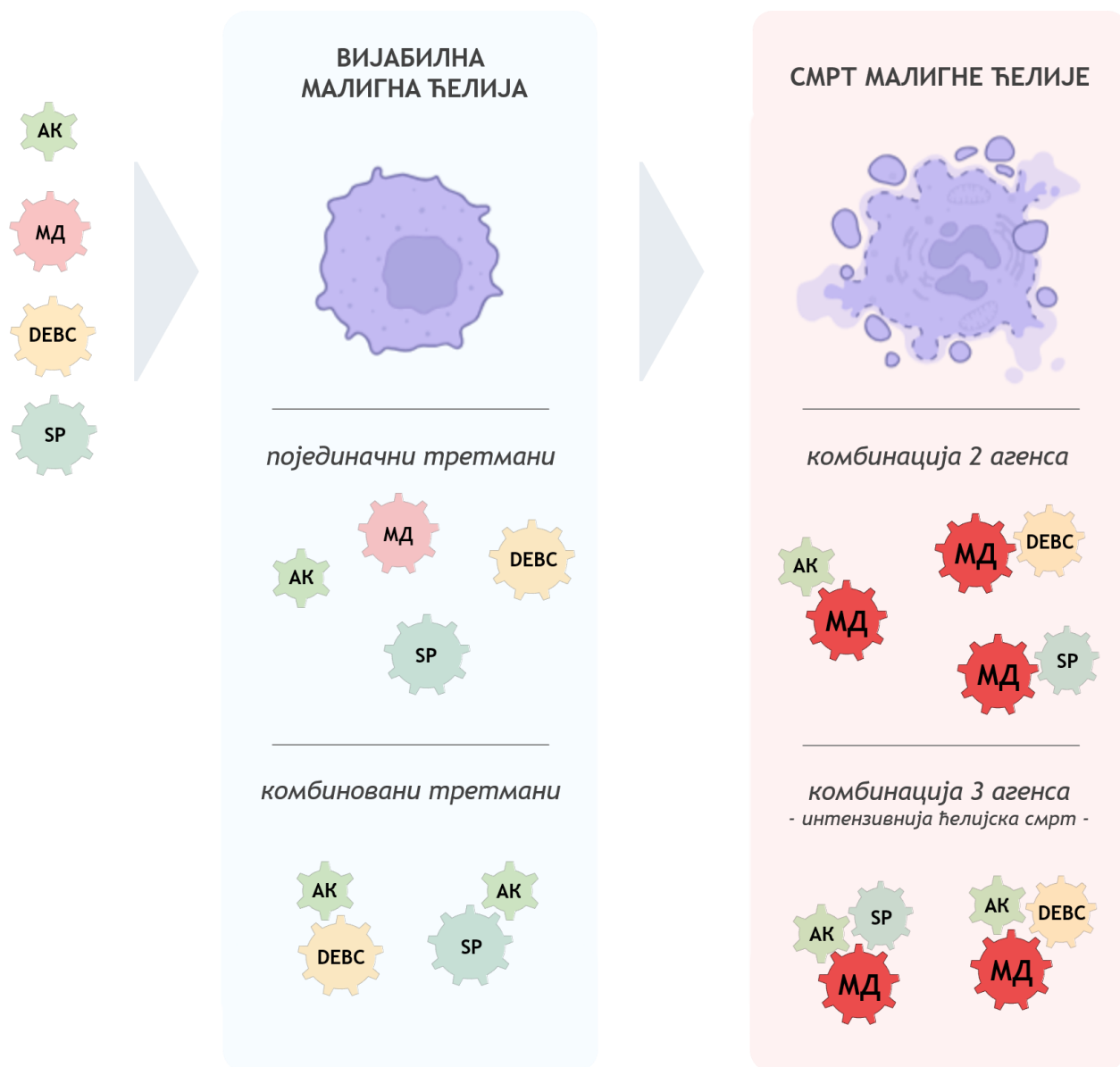


Схема 9. Комбиновањем МД са АК и/или инхибиторима АКТ и JNK киназа (10-DEBC и SP600125) постиже се цитотоксичност примењених третмана.

Conditio sine qua non у проналажењу успешних хемиотерапијских решења јесте селективност према малигно трансформисаним ћелијама у односу на здраве ћелије организма. Агенси који су изучавани у оквиру ове докторске дисертације нису били токсични за здраве ћелије фибробласта плућа, у дозама у којима су испојили токсичност према U251 ћелијама глиобластома. Неизмењене ћелије су, слично U251 ћелијама, биле отпорне на све појединачне третмане. Најважније, здрави фибробласти нису били осетљиви ни на испитиване комбинације, без обзира на то што је МД у комбинацијама са АК, 10-DEBC или SP600125 био токсичан за ћелије глиобластома, као и да се цитотоксични ефекат појачавао троструким комбиновањем АК и МД са 10-DEBC или SP600125. Бројне студије показују да је комбинација АК и МД селективна према различитим типовима малигнућ ћелија, укључујући и ћелије глиобластома (Sumiyoshi и сар., 2021; Sumiyoshi и сар., 2022), у односу на неизмењене ћелије истог порекла (Verrax и сар., 2005; Beck и сар., 2009; Beck и сар 2010; Bonilla-Porras и сар., 2011; Ivanova и сар., 2018; Bakalova и сар., 2020; Semkova и сар., 2020). Способност комбинације АК+МД да селективно оштећује малигне ћелије приписује се производњи велике количине митохондријског супероксида у току оксидо-редукционог циклуса између АК и МД. Имајући у виду да и 10-DEBC и SP600125 своје ефекте остварују стимулацијом стварања РВК изазваног третманима МД и АК+МД, може се претпоставити да је селективност ових комбинација према малигнућ ћелијама последица сниженог прага њихове осетљивости на прооксидативне агенсе. Акумулација велике количине РВК узрок је смањења залиха енергетских супстрата у виду АТФ и NADH/NAD⁺, као и залиха сукцината, главног метаболита у туморским, али не и у неизмењеним ћелијама (Semkova и сар., 2020; Sumiyoshi и сар., 2022). Поред тога, ћелије тумора, укључујући и глиобластома (Grasso и сар., 2014), селективно преузимају аскорбат захваљујући прекомерно експримираним генима за глукозне транспортере GLUT1 и котранспортере натријума и АК – SVCT1 и SVCT2 (Ngo и сар., 2019), чиме је у малигно трансформисаним ћелијама омогућено одвијање редокс циклуса између липосолубилног МД и аскорбата. Са друге стране, појава оксидативног стреса и ћелијске смрти у здравим ћелијама превенирана је пренилацијом МД до витамина К₂, која се дешава искључиво у ћелијама које нису малигно измењене (Nakagawa и сар., 2019; Bakalova и сар., 2020). Конверзијом МД у витамин К₂, смањује се доступност МД за производњу РВК у комбинацији са АК и/или 10-DEBC и SP600125. Такође, ниски нивои антиоксидативних ензима, попут каталазе (Beck и сар., 2010) и глутатион пероксидазе (Ren и сар., 2019), могу допринети већој осетљивости неопластичних ћелија на оштећења изазвана оксидативним стресом. Поред тога, поставља се и питање утицаја испитиваних третмана на процес аутофагије у здравим ћелијама. Раније студије су показале да аутофагија посредована оксидативним стресом има различит исход у ћелијама глиобластома, у односу на одговарајуће неизмењене ћелије (Matteoni и сар., 2021). Поред тога, малигне и здраве ћелије имају различит капацитет за активацију аутофагије у одговору на бројне прооксидативне агенсе (Chen и сар., 2007a; Chen и сар., 2007b). На основу ових података се може претпоставити да ће и аутофагија бити усмерена у цитотоксичном смеру само у малигно трансформисаним ћелијама. Хлорпромазин, познати неуролептик са прооксидативним својствима, у T98G, U251 и U87 ћелијама глиобластома изазива цитотоксичну, док у нетуморским RPE-1 епителним ћелијама изазива цитопротективну аутофагију (Matteoni и сар., 2021). Даље, неколико прооксидативних агенаса, као што су H₂O₂, 2-метоксиестрадиол и инхибитори транспортног ланца електрона у митохондријама, изазвали су ћелијску смрт посредовану аутофагијом у U87 ћелијама глиобластома, али нису успели да утичу на редокс хомеостазу или индукују аутофагију у примарним мишићим астроцитима (Chen и сар., 2007a; Chen и сар., 2007b).

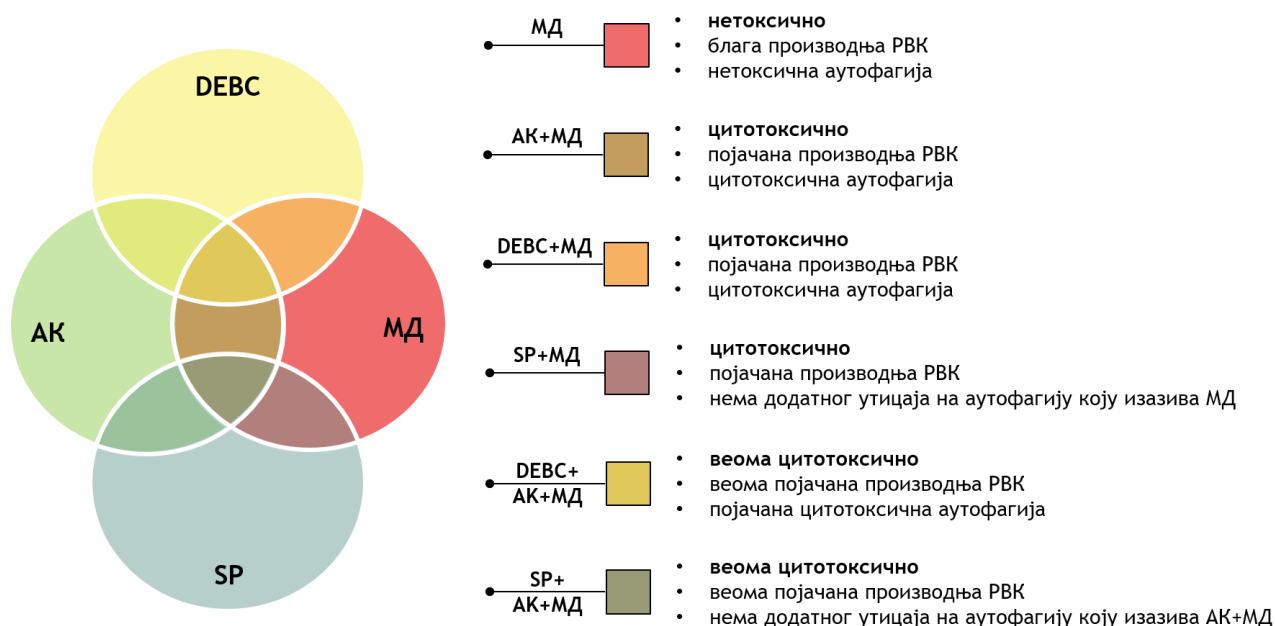


Схема 10. Преглед ефеката које остварује МД у комбинацији са АК и/или инхибиторима АКТ и JNK киназа (10-DEBC и SP600125) на ћелије хуманог глиобластома U251.

Ова докторска дисертација показује да модулација активности mTOR киназе и ULK1 протеина, изазвана великом количином РВК, активира јак аутофагни одговор у U251 ћелијама. Покренута аутофагија доприноси некрози U251 ћелија коју АК и МД синергистички изазивају. Даље, инхибиција АКТ и JNK сигналних путева применом фармаколошких инхибитора ових киназа, 10-DEBC и SP600125, редом, значајно повећава прооксидативни потенцијал МД и АК+МД и тиме иницира цитотоксичност МД и појачава цитотоксични ефекат АК+МД. Док 10-DEBC стимулише антиглиобластомски ефекат МД и АК+МД потенцирањем цитотоксичне аутофагије, SP600125 своје дејство испољава независно од овог процеса (**Схема 10**). Подаци добијени на малигно неизмењеним ћелијама показују да ниједан од испитиваних третмана није токсичан за здраве ћелије фибробласта плућа. Ови резултати нуде решење којим би се превазишао проблем агресивности глиобластомских ћелија резистентних на стандардну терапију, који је повезан са дефектним апоптотским механизмом и измењеним PI3K/AKT и MAPK/JNK сигналним путевима (Blahovcova и сар., 2015; De Los Reyes Corrales и сар., 2021; Liu и сар., 2022). Такође, резултати ове докторске дисертације представљају изузетно корисну основу за конструисање нових облика терапије и дефинисање потенцијалних терапијских мета за ефикасну борбу против глиобластома.

6. Закључци

У складу са дефинисаним циљевима ове докторске дисертације, из добијених резултата се могу извести следећи закључци:

- Појединачни третмани АК и МД немају цитотоксично дејство, док у комбинацији АК и МД синергистички убијају ћелије хуманог глиобластома U251 *in vitro*.
- Комбинација АК+МД изазива оштећење ћелијске мембране, повећање унутарћелијских РВК и деполаризацију мембране митохондрија, што резултира некрозом U251 ћелија зависном од оксидативног стреса.
- Комбинација АК+МД појачава транскрипцију аутофагних гена, изазива појаву маркера аутофагије и AMPK/mTOR/ULK1 зависну аутофагију у U251 ћелијама. Изазвана аутофагија је последица оксидативног стреса и има цитотоксичну улогу, односно доприноси некрози U251 ћелија.
- Мали молекулски инхибитори АКТ киназе – 10-DEBC и JNK киназе – SP600125 повећавају осетљивост U251 ћелија на примењене третмане и подстичу некрозу у U251 ћелијама третираним МД и АК+МД. 10-DEBC појачава оксидативни стрес и потенцира цитотоксичну аутофагију у ћелијама глиобластома третираним МД и АК+МД. SP600125 потенцира токсичност МД и АК+МД појачавањем оксидативног стреса, независно од процеса аутофагије.
- Ниједан од испитиваних третмана не утиче на вијабилност малигно неизмењене ћелијске линије хуманих фибробласта MRC5.

7. Литература

- Akiyoshi, T., Matzno, S., Sakai, M., Okamura, N., & Matsuyama, K. (2009). The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(1), 143–150.
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., & Sergio, F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research*, 52(7), 751–762.
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-MTOR-ULK1/2 in the regulation of Autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 2–11.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., & Debnath, J. (2019). Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions. *Cancer Discovery*, 9(9), 1167–1181.
- Amir, M., Liu, K., Zhao, E., & Czaja, M. J. (2012). Distinct functions of JNK and c-Jun in oxidant-induced hepatocyte death. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(10), 3254–3265.
- Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M., & Hemmings, B. A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31515–31524.
- Antonyak, M. A., Kenyon, L. C., Godwin, A. K., James, D. C., Emlet, D. R., Okamoto, I., Tnani, M., Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., & Wong, A. J. (2002). Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene*, 21(33), 5038–5046.
- Aroui, S., Dardevet, L., Najlaoui, F., Kammoun, M., Laajimi, A., Fetoui, H., De Waard, M., & Kenani, A. (2016). PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to Human cell glioblastoma apoptosis by platinum-maurocalcin conjugate. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 77, 15–22.
- Azad, M. B., Chen, Y., & Gibson, S. B. (2009). Regulation of autophagy by reactive Oxygen Species (ROS): Implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 777–790.
- Baek, M., Cho, H., Kim, S., Kim, W., & Jung, J. (2016). Ascorbic acid induces necrosis in human laryngeal squamous cell carcinoma via ROS, PKC, and calcium signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 232(2), 417–425.
- Bakalova, R., Semkova, S., Ivanova, D., Zhelev, Z., Miller, T., Takeshima, T., Shibata, S., Lazarova, D., Aoki, I., & Higashi, T. (2020). Selective targeting of cancerous mitochondria and suppression of tumor growth using Redox-Active Treatment adjuvant. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–30.
- Beck, R., Pedrosa, R. C., Dejeans, N., Glorieux, C., Levêque, P., Gallez, B., Taper, H., Eeckhoudt, S., Knoop, L., Calderon, P. B., & Verrax, J. (2010). Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. *Investigational New Drugs*, 29(5), 891–900.
- Beck, R., Verrax, J., Dejeans, N., Taper, H., & Calderon, P. B. (2009). Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells. *International Journal of Toxicology*, 28(1), 33–42.
- Benn, C. L., & Dawson, L. A. (2020). Clinically predated protein kinases: Rationale for their use in neurodegenerative disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12.

- Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., & Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*, 17(3), 313–325.
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O’Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., & Anderson, D. W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13681–13686.
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167–223.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology* (181–197).
- Blahovcova, E., Richterova, R., Kolarovszki, B., Dobrota, D., Racay, P., & Hatok, J. (2015). Apoptosis-related gene expression in tumor tissue samples obtained from patients diagnosed with glioblastoma multiforme. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(6), 1677–1684.
- Bonilla-Porras, A. R., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2011). Vitamin K3 and vitamin C alone or in combination induced apoptosis in leukemia cells by a similar oxidative stress signalling mechanism. *Cancer Cell International*, 11(1).
- Borgne, F. L., Ravaut, G., Bernard, A., & Demarquoy, J. (2017). L-carnitine protects C2C12 cells against mitochondrial superoxide overproduction and cell death. *World Journal of Biological Chemistry*, 8(1), 86.
- Božič, J., Bidovec, K., Vizovišek, M., Dolenc, I., & Stoka, V. (2019). Menadione-induced apoptosis in U937 cells involves Bid cleavage and stefin B degradation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(6), 10662–10669.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030.
- Byun, J., Yoon, C., An, S., Park, I., Kang, C., Kim, M., & Lee, S. (2009). The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras. *Carcinogenesis*, 30(11), 1880–1888.
- Cao, J., Xu, D., Wang, D., Wu, R., Zhang, L., Zhu, H., He, Q., & Yang, B. (2009). ROS-driven Akt dephosphorylation at Ser-473 is involved in 4-HPR-mediated apoptosis in NB4 cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(5), 536–547.
- Calderon, P., Verrax, J., & Taper, H. (2008). Targeting cancer cells by an Oxidant-Based therapy. *Current Molecular Pharmacology*, 1(1), 80–92.
- Chan, T. S., Teng, S., Wilson, J. X., Galati, G., Khan, S., & O’Brien, P. J. (2002). Coenzyme Q Cytoprotective mechanisms for mitochondrial complex I cytopathies involves NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1(NQO1). *Free Radical Research*, 36(4), 421–427.
- Chautard, E., Loubeau, G., Tchirkov, A., Chassagne, J., Vermot-Desroches, C., Morel, L., & Verrelle, P. (2010). Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro-oncology*.

- Checa, J., & Aran, J. M. (2020). Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *Journal of Inflammation Research*, Volume 13, 1057–1073.
- Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Khosh, D. B., Drisko, J., & Levine, M. (2008). Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), 11105–11109.
- Chen, W., Sun, Y., Liu, K., & Sun, X. (2014). Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*, 9(12), 1210.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2007a). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 15(1), 171–182.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2007b). Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*, 120(23), 4155–4166.
- Cheng, S., Chen, N., Kuo, H., Yang, S., Sung, C., Sung, P., Wen, Z., & Chen, W. (2018). Prodigiosin stimulates endoplasmic reticulum stress and induces autophagic cell death in glioblastoma cells. *Apoptosis*, 23(5–6), 314–328.
- Cheng, Y., Ren, X., Zhang, Y., Patel, R., Sharma, A., Wu, H., Robertson, G. P., Yan, L., Rubin, E., & Yang, J. (2011). eEF-2 Kinase Dictates Cross-Talk between Autophagy and Apoptosis Induced by Akt Inhibition, Thereby Modulating Cytotoxicity of Novel Akt Inhibitor MK-2206. *Cancer Research*, 71(7), 2654–2663.
- Cheng, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, X., Huber-Keener, K. J., Liu, X., Zhou, L., Liao, J., Keihack, H., Yan, L., Rubin, E., & Yang, J. (2012). MK-2206, a Novel Allosteric Inhibitor of Akt, Synergizes with Gefitinib against Malignant Glioma via Modulating Both Autophagy and Apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(1), 154–164.
- Chlebowski, R. T., Akman, S. A., & Block, J. B. (1985). Vitamin K in the treatment of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 12(1), 49–63.
- Chou, T. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681.
- Clark, C. B., Rane, M. J., Mehdi, D. E., Miller, C. J., Sachleben, L. R., & Gozal, E. (2009). Role of oxidative stress in geldanamycin-induced cytotoxicity and disruption of Hsp90 signaling complex. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(10), 1440–1449.
- ClinicalTrials.gov. GBM Pers. Trial. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05432518> (accessed on 6 September 2024).
- ClinicalTrials.gov. A Trial Ipatasertib Comb. With Atezolizumab. Available online: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03673787> (accessed on 6 September 2024).
- Colardo, M., Segatto, M., & Di Bartolomeo, S. (2021). Targeting RTK-PI3K-MTOR axis in Gliomas: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4899.
- Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. (2008). *Nature*, 455(7216), 1061–1068.
- Courtial, L., Picco, V., Grover, R., Cormerais, Y., Rottier, C., Labbe, A., Pagès, G., & Ferrier-Pagès, C. (2017). The c-Jun N-terminal kinase prevents oxidative stress induced by UV and thermal stresses in corals and human cells. *Scientific Reports*, 7(1).
- Cruz, J. V. R., Batista, C., De Holanda Afonso, B., Alexandre-Moreira, M. S., Dubois, L. G., Pontes, B., Neto, V. M., & De Almeida Mendes, F. (2022). Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers*, 14(13), 3203.

- Cui, J., Han, S., Wang, C., Su, W., Harshyne, L., Holgado-Madruga, M., & Wong, A. J. (2006). C-Jun NH2-Terminal kinase 2A2 promotes the tumorigenicity of human glioblastoma cells. *Cancer Research*, 66(20), 10024–10031.
- Czaja, M. J. (2011). Two types of autophagy are better than one during hepatocyte oxidative stress. *Autophagy*, 7(1), 96–97.
- Davies, N. A., Watkeys, L., Butcher, L., Potter, S., Hughes, M. G., Moir, H., Morris, K., Thomas, A. W., & Webb, R. (2014). The contributions of oxidative stress, oxidised lipoproteins and AMPK towards exercise-associated PPAR γ signalling within human monocytic cells. *Free Radical Research*, 49(1), 45–56.
- De Los Reyes Corrales, T., Losada-Pérez, M., & Casas-Tintó, S. (2021). JNK pathway in CNS pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3883.
- Delwar, Z. M., Avramidis, D., Follin, E., Hua, Y., Siden, Å., Cruz, M., Paulsson, K. M., & Yakisich, J. S. (2011). Cytotoxic effect of menadione and sodium orthovanadate in combination on human glioma cells. *Investigational New Drugs*, 30(4), 1302–1310.
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364.
- Duarte, D., Nunes, M., Ricardo, S., & Vale, N. (2022). Combination of Antimalarial and CNS Drugs with Antineoplastic Agents in MCF-7 Breast and HT-29 Colon Cancer Cells: Biosafety Evaluation and Mechanism of Action. *Biomolecules*, 12(10), 1490.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 3(11), 859–868.
- Elshazly, A. M., & Gewirtz, D. A. (2023). Is Autophagy Inhibition in Combination with Temozolomide a Therapeutically Viable Strategy? *Cells*, 12(4), 535.
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2004). AKT stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Research*, 64(11), 3892–3899.
- Feng, F., Zhang, M., Yang, C., Heng, X., & Wu, X. (2019). The dual roles of autophagy in gliomagenesis and clinical therapy strategies based on autophagic regulation mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 120, 109441.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1757(9–10), 1371–1387.
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2014). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 377–388.
- Food & Drug Administration U. S., Search Orphan Drug Designations and Approvals page, Apatone® search, 2024, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting>
- Fukui, M., Choi, H. J., & Zhu, B. T. (2012). Rapid generation of mitochondrial superoxide induces mitochondrion-dependent but caspase-independent cell death in hippocampal neuronal cells that morphologically resembles necroptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262(2), 156–166.
- Fulda, S., & Kögel, D. (2015). Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*, 34(40), 5105–5113.
- Funk, M. I., Conde, M. A., Piwien-Pilipuk, G., & Uranga, R. M. (2021). Novel antiadipogenic effect of menadione in 3T3-L1 cells. *Chemico-biological Interactions*, 343, 109491.

- Galati, S., Boni, C., Gerra, M. C., Lazzaretti, M., & Buschini, A. (2019). Autophagy: A Player in response to Oxidative Stress and DNA Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–12.
- Gallia, G. L., Tyler, B. M., Hann, C. L., Siu, I., Giranda, V. L., Vescovi, A. L., Brem, H., & Riggins, G. J. (2009). Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2), 386–393.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J. M. B., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., . . . Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J., Bianchi, K., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541.
- Gao, L., Liu, J., Xu, P., Deng, G., Liu, B., Yuan, F., Tan, Y., Sun, Q., Xu, Y., Zhang, H., Qi, Y., Han, S., Yang, K., Geng, R., & Jiang, H. (2020). AKT inhibitor SC66 inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma through Down-Regulating AKT/B-Catenin pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
- Gewirtz, D. A. (2014). The Four Faces of Autophagy: Implications for Cancer therapy. *Cancer Research*, 74(3), 647–651.
- Gilbar, P. J., Pokharel, K., & Mangos, H. M. (2020). Temozolomide-induced aplastic anaemia: Case report and review of the literature. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 107815522096708.
- Gilloteaux, J., Jamison, J. M., Arnold, D., Taper, H. S., & Summers, J. L. (2001). Ultrastructural aspects of autoschizis: a new cancer cell death induced by the synergistic action of Ascorbate/Menadione on human bladder carcinoma cells. *Ultrastructural Pathology*, 25(3), 183–192.
- Gilloteaux, J., Jamison, J. M., Neal, D. R., Loukas, M., Doberzstyn, T., & Summers, J. L. (2010). Cell Damage and Death by Autoschizis in Human Bladder (RT4) Carcinoma Cells Resulting from Treatment with Ascorbate and Menadione. *Ultrastructural Pathology*, 34(3), 140–160.
- Gilloteaux, J., Jamison, J. M., & Summers, J. L. (2014). Pro-oxidant Treatment of Human Prostate Carcinoma (DU145) Induces Autoschizis Cell Death: Autophagosomes Build up out of Injured Endomembranes and Mitochondria. *Ultrastructural Pathology*, 38(5), 315–328.
- Goetting, I., Larafa, S., Eul, K., Kunin, M., Jakob, B., Matschke, J., & Jendrossek, V. (2022). Targeting AKT-Dependent regulation of antioxidant defense sensitizes AKT-E17K expressing cancer cells to ionizing radiation. *Frontiers in Oncology*, 12.
- Grasso, C., Fabre, M., Collis, S. V., Castro, M. L., Field, C. S., Schleich, N., McConnell, M. J., & Herst, P. M. (2014). Pharmacological Doses of Daily Ascorbate Protect Tumors from Radiation Damage after a Single Dose of Radiation in an Intracranial Mouse Glioma Model. *Frontiers in Oncology*, 4.
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian

- FOXO3 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30107–30119.
- Griguer, C. E., & Oliva, C. R. (2011). Bioenergetics Pathways and Therapeutic Resistance in Gliomas: Emerging role of mitochondria. *Current Pharmaceutical Design*, 17(23), 2421–2427.
- Guizzardi, S., Picotto, G., Rodriguez, V., Welsh, J., Narvaez, C., Bohl, L., & De Talamoni, N. T. (2020). Combined treatment of menadione and calcitriol increases the antiproliferative effect by promoting oxidative/nitrosative stress, mitochondrial dysfunction, and autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(8), 548–556.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Harhaji-Trajkovic, L., Arsikin, K., Kravic-Stevovic, T., Petricevic, S., Tovilovic, G., Pantovic, A., Zogovic, N., Ristic, B., Janjetovic, K., Bumbasirevic, V., & Trajkovic, V. (2012). Chloroquine-Mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation. *Pharmaceutical Research*, 29(8), 2249–2263.
- Hirota, Y., Tsugawa, N., Nakagawa, K., Suhara, Y., Tanaka, K., Uchino, Y., Takeuchi, A., Sawada, N., Kamao, M., Wada, A., Okitsu, T., & Okano, T. (2013). Menadione (Vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (Vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (Vitamin K2) in rats. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33071–33080.
- Hoang-Minh, L. B., Siebzehnrubl, F. A., Yang, C., Suzuki-Hatano, S., Dajac, K., Loche, T., Andrews, N., Massari, M. S., Patel, J., Amin, K., Vuong, A., Jimenez-Pascual, A., Kubilis, P., Garrett, T. J., Moneypenny, C., Pacak, C. A., Huang, J., Sayour, E. J., Mitchell, D. A., . . . Deleyrolle, L. P. (2018). Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. *EMBO Journal*, 37(23).
- Holczer, M., Hajdú, B., Lőrincz, T., Szarka, A., Bánhegyi, G., & Kapuy, O. (2020). Fine-tuning of AMPK–ULK1–mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. *Scientific Reports*, 10(1).
- Huang, J., Agus, D. B., Winfree, C. J., Kiss, S., Mack, W. J., McTaggart, R. A., Choudhri, T. F., Kim, L. J., Mocco, J., Pinsky, D. J., Fox, W. D., Israel, R. J., Boyd, T. A., Golde, D. W., & Connolly, E. S. (2001). Dehydroascorbic acid, a blood–brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11720–11724.
- Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., & Komatsu, M. (2008). Structural Basis for Sorting Mechanism of p62 in Selective Autophagy. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 283(33), 22847–22857.
- Ilić, R. Prognostički faktori i savremeni terapijski pristup lečenju pacijenata obolelih od multififormnog glioblastoma. 2018
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9), 648–657.
- Ivanova, D., Zhelev, Z., Lazarova, D., Getsov, P., Bakalova, R., & Aoki, I. (2018). Vitamins C and K3: a powerful redox system for sensitizing leukemia lymphocytes to everolimus and barasertib. *Anticancer Research/Anticancer Research*, 38(3).
- Jamison, J. M., Summers, J. L., Gilloteaux, J., & Taper, H. S. (2001). Evaluation of the In Vitro and In Vivo Antitumor Activities of Vitamin C and K-3 Combinations against Human Prostate Cancer. *The Journal of Nutrition*, 131(1), 158S–160S.

- Jemaà, M., Vitale, I., Kepp, O., Berardinelli, F., Galluzzi, L., Senovilla, L., Mariño, G., Malik, S. A., Rello-Varona, S., Lissa, D., Antocchia, A., Tailler, M., Schlemmer, F., Harper, F., Pierron, G., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Selective killing of p53-deficient cancer cells by SP600125. *EMBO Molecular Medicine*, 4(6), 500–514.
- Jiang, Y., Jiao, Y., Wang, Z., Li, T., Liu, Y., Li, Y., Zhao, X., & Wang, D. (2017). Sinomenine Hydrochloride Inhibits Human Glioblastoma Cell Growth through Reactive Oxygen Species Generation and Autophagy-Lysosome Pathway Activation: An In Vitro and In Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1945.
- Jin, Q., Jhun, B. S., Lee, S. H., Lee, J., Pi, Y., Cho, Y. H., Baik, H. H., & Kang, I. (2004). Differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, mitogen-activated protein kinase, and AMP-activated protein kinase pathways during menadione-induced oxidative stress in the kidney of young and old rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(3), 555–561.
- Jo, G. H., Böglér, O., Chwae, Y., Yoo, H., Lee, S. H., Park, J. B., Kim, Y., Kim, J. H., & Gwak, H. (2014). Radiation-Induced autophagy contributes to cell death and induces apoptosis partly in malignant glioma cells. *Cancer Research and Treatment/Cancer Research and Treatment*, 47(2), 221–241.
- Jung, S., Yang, W. K., Kim, J., Kim, H. S., Kim, E. J., Yun, H., Park, H., Kim, S. S., Choe, W., Kang, I., & Ha, J. (2008). Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(4), 713–721.
- Kaldis, P. (2016). Quo vadis cell growth and division? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4.
- Kaley, T. J., Panageas, K. S., Mellinghoff, I. K., Nolan, C., Gavrilovic, I. T., DeAngelis, L. M., Abrey, L. E., Holland, E. C., & Lassman, A. B. (2019). Phase II trial of an AKT inhibitor (perifosine) for recurrent glioblastoma. *Journal of Neuro-oncology*, 144(2), 403–407.
- Kang, J., & Pervaiz, S. (2012). Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. *Biochemistry Research International*, 2012, 1–14.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., & Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 448–457.
- Karin, M., Liu, Z., & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 240–246.
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(6), 365–381.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141.
- Kim, Y. J., Shin, Y. K., Sohn, D. S., & Lee, C. S. (2014). Menadione induces the formation of reactive oxygen species and depletion of GSH-mediated apoptosis and inhibits the FAK-mediated cell invasion. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(9), 799–809.
- Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I., & Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular Cell*, 34(3), 259–269.
- Klionsky, D., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I., Adeli, K., Adolph, T., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B., Agnello, M., . . .

- Schlattner, U. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, 17(1), 1–382.
- Klotz, L., Hou, X., & Jacob, C. (2014). 1,4-Naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and Inter-Cellular signaling. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 19(9), 14902–14918.
- Kma, L., & Baruah, T. J. (2021). The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. *Biotechnology and Applied Biochemistry Online/Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 248–264.
- Kosic, M., Arsikin-Csordas, K., Paunovic, V., Firestone, R. A., Ristic, B., Mircic, A., Petricevic, S., Bosnjak, M., Zogovic, N., Mandic, M., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., & Harhaji-Trajkovic, L. (2016). Synergistic anticancer action of lysosomal membrane permeabilization and glycolysis inhibition. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 291(44), 22936–22948.
- Kostaras, E., Kaserer, T., Lazaro, G., Heuss, S. F., Hussain, A., Casado, P., Hayes, A., Yandim, C., Palaskas, N., Yu, Y., Schwartz, B., Raynaud, F., Chung, Y., Cutillas, P. R., & Vivanco, I. (2020). A systematic molecular and pharmacologic evaluation of AKT inhibitors reveals new insight into their biological activity. *British Journal of Cancer*, 123(4), 542–555.
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2018). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer. *Frontiers in Oncology*, 8.
- Kushnareva, Y., & Newmeyer, D. D. (2010). Bioenergetics and cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 50–57.
- Lamb, J. A., Ventura, J., Hess, P., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2003). JUND mediates survival signaling by the JNK Signal Transduction Pathway. *Molecular Cell*, 11(6), 1479–1489.
- Lasalvia-Prisco, E., Cucchi, S., Vázquez, J., Lasalvia-Galante, E., Golomar, W., & Gordon, W. (2003). Serum Markers Variation Consistent with Autoschizis Induced by Ascorbic Acid-Menadione in Patients with Prostate Cancer. *Medical Oncology*, 20(1), 45–52.
- Lawson, D. A., Kessenbrock, K., Davis, R. T., Pervolarakis, N., & Werb, Z. (2018). Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nature Cell Biology*, 20(12), 1349–1360.
- Lei, Y., & Klionsky, D. J. (2021). The emerging roles of autophagy in human diseases. *Biomedicines*, 9(11), 1651.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 99–111.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1–2), 11–42.
- Li, D., Wang, L., Deng, R., Tang, J., Shen, Y., Guo, J., Wang, Y., Xia, L., Feng, G., Liu, Q. Q., Huang, W., Zeng, Y., & Zhu, X. (2008). The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene*, 28(6), 886–898.
- Li, H., Chen, L., Li, J., Zhou, Q., Huang, A., Liu, W., Wang, K., Gao, L., Qi, S., & Lu, Y. (2018). miR-519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1).
- Li, H., Kim, J., & Waldman, T. (2009). Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiation Oncology*, 4(1).
- Li, X., Zhu, F., Jiang, J., Sun, C., Wang, X., Shen, M., Tian, R., Shi, C., Xu, M., Peng, F., Guo, X., Wang, M., & Qin, R. (2015). Synergistic antitumor activity of withaferin A combined with

- oxaliplatin triggers reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, 357(1), 219–230.
- Lim, D., Morgan, R. J., Akman, S., Margolin, K., Carr, B. I., Leong, L., Odujinrin, O., & Doroshow, J. H. (2005). Phase I trial of menadiol diphosphate (vitamin K3) in advanced malignancy. *Investigational New Drugs*, 23(3), 235–239.
- Lim, J. A., Woo, J. H., & Kim, H. S. (2008). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling is responsible for the differential susceptibility of myoblasts and myotubes to menadione-induced oxidative stress. *Free Radical Research*, 42(9), 798–806.
- Lin, C., Chen, T., Tseng, Y., Wu, G., Hsieh, M., Lin, Y., & Chen, R. (2016). Honokiol induces autophagic cell death in malignant glioma through reactive oxygen species-mediated regulation of the p53/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 304, 59–69.
- Lin, X., Shi, X., Xiong, L., Nie, J., Ye, H., Du, J., & Liu, J. (2021). Construction of IL-13 Receptor $\alpha 2$ -Targeting Resveratrol Nanoparticles against Glioblastoma Cells: Therapeutic Efficacy and Molecular Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10622.
- Liu, H., Qiu, W., Sun, T., Wang, L., Du, C., Hu, Y., Liu, W., Feng, F., Chen, Y., & Sun, H. (2022). Therapeutic strategies of glioblastoma (GBM): The current advances in the molecular targets and bioactive small molecule compounds. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(4), 1781–1804.
- Liu, J., & Lin, A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Research/Cell Research*, 15(1), 36–42.
- Liu, J., & Wang, Z. (2015). Increased oxidative stress as a selective anticancer therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–12.
- Liu, P., Li, P., Lei, T., Qu, L., Huang, H., & Mu, Q. (2018). Acute lymphoblastic leukemia following temozolomide treatment in a patient with glioblastoma: A case report and review of the literature. *Oncology Letters*.
- Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J. M., Chandel, N. S., Vanden Hoek, T. L., & Schumacker, P. T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(12), 1925–1936.
- Loos, B., Klionsky, D. J., Du Toit, A., & Hofmeyr, J. S. (2019). On the relevance of precision autophagy flux control in vivo—Points of departure for clinical translation. *Autophagy*, 16(4), 750–762.
- López-Sánchez, N., Rodríguez, J., & Frade, J. M. (2007). Mitochondrial c-Jun NH2-Terminal Kinase Prevents the Accumulation of Reactive Oxygen Species and Reduces Necrotic Damage in Neural Tumor Cells that Lack Trophic Support. *Molecular Cancer Research*, 5(1), 47–60.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Majiene, D., Kuseliauskyte, J., Stimbirys, A., & Jekabsone, A. (2019). Comparison of the effect of native 1,4-Naphthoquinones plumbagin, menadione, and lawsone on viability, redox status, and mitochondrial functions of C6 glioblastoma cells. *Nutrients*, 11(6), 1294.
- Malorni, W., Iosi, F., Santini, M. T., & Testa, U. (1993). Menadione-induced oxidative stress leads to a rapid down-modulation of transferrin receptor recycling. *Journal of Cell Science*, 106(1), 309–318.
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274.

- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: Navigating the network. *Cell*, 169(3), 381–405.
- Marin-Valencia, I., Yang, C., Mashimo, T., Cho, S., Baek, H., Yang, X., Rajagopalan, K. N., Maddie, M., Vemireddy, V., Zhao, Z., Cai, L., Good, L., Tu, B. P., Hatanpaa, K. J., Mickey, B. E., Matés, J. M., Pascual, J. M., Maher, E. A., Malloy, C. R., . . . Bachoo, R. M. (2012). Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metabolism*, 15(6), 827–837.
- Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M., & Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, 8(6), 903–914.
- Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival*. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1–15.
- Matsuda, K., Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Seino, S., Suzuki, K., Watanabe, E., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., & Kitanaka, C. (2012). Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells. *Scientific Reports*, 2(1).
- Matteoni, S., Matarrese, P., Ascione, B., Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Villani, V., Pace, A., Paggi, M. G., & Abbruzzese, C. (2021). Chlorpromazine induces cytotoxic autophagy in glioblastoma cells via endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1).
- May, J. M. (2012). Vitamin C transport and its role in the central nervous system. In *Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry* (pp. 85–103).
- McDowell, K. A., Riggins, G. J., & Gallia, G. L. (2011). Targeting the AKT pathway in glioblastoma. *Current Pharmaceutical Design*, 17(23), 2411–2420.
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), 673–682.
- Miki, K., Yagi, M., Yoshimoto, K., Kang, D., & Uchiumi, T. (2022). Mitochondrial dysfunction and impaired growth of glioblastoma cell lines caused by antimicrobial agents inducing ferroptosis under glucose starvation. *Oncogenesis*, 11(1).
- Miyai, T., Vasanth, S., Melangath, G., Deshpande, N., Kumar, V., Benischke, A., Chen, Y., Price, M. O., Price, F. W., & Jurkunas, U. V. (2019). Activation of PINK1-Parkin-Mediated mitophagy degrades mitochondrial quality control proteins in fuchs endothelial corneal dystrophy. *the American Journal of Pathology*, 189(10), 2061–2076.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of ATG proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 107–132.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S. J., Ramkissoon, S. H., Ligon, K. L., & Rameshwar, P. (2014). Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell Death and Disease*, 5(3), e1145.
- Nah, J., Yoo, S., Jung, S., Jeong, E. I., Park, M., Kaang, B., & Jung, Y. (2017). Phosphorylated CAV1 activates autophagy through an interaction with BECN1 under oxidative stress. *Cell Death and Disease*, 8(5), e2822.
- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V., & Hamada, J. (2011). Aberrant signaling pathways in Glioma. *Cancers*, 3(3), 3242–3278.

- Nakagawa, K., Fujiwara, K., Nishimura, A., Murakami, C., Kawamoto, K., Ichinose, C., Kunitou, Y., Suhara, Y., Okano, T., & Hasegawa, H. (2019). UBIAD1 plays an essential role in the survival of pancreatic acinar cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1971.
- Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N., Watanabe, M., Uchino, Y., Okuda, N., Shimomura, Y., Suhara, Y., & Okano, T. (2010). Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, 468(7320), 117–121.
- Narayan, R. S., Fedrigo, C. A., Brands, E., Dik, R., Stalpers, L. J., Baumert, B. G., Slotman, B. J., Westerman, B. A., Peters, G. J., & Sminia, P. (2017). The allosteric AKT inhibitor MK2206 shows a synergistic interaction with chemotherapy and radiotherapy in glioblastoma spheroid cultures. *BMC Cancer*, 17(1).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5280483, Vitamin K. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin-K>. Accessed Sept. 6, 2024.
- Ngo, B., Van Riper, J. M., Cantley, L. C., & Yun, J. (2019). Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nature Reviews. Cancer*, 19(5), 271–282.
- Nitulescu, G., Van De Venter, M., Nitulescu, G., Ungurianu, A., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O., Grădinaru, D., Tsatsakis, A., Tsoukalas, D., Spandidos, D., & Margina, D. (2018). The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *International Journal of Oncology*.
- Noch, E. K., Ramakrishna, R., & Magge, R. (2018). Challenges in the treatment of Glioblastoma: Multisystem mechanisms of therapeutic resistance. *World Neurosurgery*, 116, 505–517.
- Ogura, M., Todo, T., Tanaka, M., Nannya, Y., Ichikawa, M., Nakamura, F., & Kurokawa, M. (2011). Temozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 154(5), 663–665.
- Oh, E., & Park, H. J. (2015). Implications of NQO1 in cancer therapy. *BMB Reports*, 48(11), 609–617.
- Oliva, C. R., Moellering, D. R., Gillespie, G. Y., & Griguer, C. E. (2011). Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production. *PloS One*, 6(9), e24665.
- Oppermann, H., Ding, Y., Sharma, J., Paetz, M. B., Meixensberger, J., Gaunitz, F., & Birkemeyer, C. (2016). Metabolic response of glioblastoma cells associated with glucose withdrawal and pyruvate substitution as revealed by GC-MS. *Nutrition & Metabolism*, 13(1).
- Ornatowski, W., Lu, Q., Yegambaram, M., Garcia, A. E., Zemskov, E. A., Maltepe, E., Fineman, J. R., Wang, T., & Black, S. M. (2020). Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biology*, 36, 101679.
- Osada, S., Tomita, H., Tanaka, Y., Tokuyama, Y., Tanaka, H., Sakashita, F., & Takahashi, T. (2008, January 1). The Utility of Vitamin K3 (Menadione) against Pancreatic Cancer. *Anticancer Research*.
- Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2023). CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2016—2020. *Neuro-oncology*, 25(Supplement_4), iv1–iv99.
- Ouriq, F., Kwiecinski, M. R., Felipe, K. B., Correia, J. F. G., Farias, M. S., Castro, L. S. E. P. W., Grinevicius, V. M. a. S., Valderrama, J., Rios, D., Benites, J., Calderon, P. B., & Pedrosa, R. C. (2015). DNA Damage and Inhibition of Akt Pathway in MCF-7 Cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in Combination with Ascorbate. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–10.

- Padayatty, S. J., Sun, H., Wang, Y., Riordan, H. D., Hewitt, S. M., Katz, A., Wesley, R. A., & Levine, M. (2004). Vitamin C pharmacokinetics: Implications for oral and intravenous use. *Annals of Internal Medicine*, 140(7), 533.
- Palmieri, M., Pal, R., Nelvagal, H. R., Lotfi, P., Stinnett, G. R., Seymour, M. L., Chaudhury, A., Bajaj, L., Bondar, V. V., Bremner, L., Saleem, U., Tse, D. Y., Sanagasetti, D., Wu, S. M., Neilson, J. R., Pereira, F. A., Pautler, R. G., Rodney, G. G., Cooper, J. D., & Sardiello, M. (2017). mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nature Communications*, 8(1).
- Palumbo, S., Pirtoli, L., Tini, P., Cevenini, G., Calderaro, F., Toscano, M., Miracco, C., & Comincini, S. (2012). Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(7), 2308–2318.
- Pandur, S., Pankiv, S., Johannessen, M., Moens, U., & Huseby, N. (2007). γ -Glutamyltransferase is upregulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radical Research*, 41(12), 1376–1384.
- Pang, D., Li, C., Yang, C., Zou, Y., Feng, B., Li, L., Liu, W., Geng, Y., Luo, Q., Chen, Z., & Huang, C. (2019). Polyphyllin VII promotes apoptosis and autophagic cell death via ROS-Inhibited AKT activity, and sensitizes glioma cells to temozolomide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–19.
- Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., & Codogno, P. (2009). Role of JNK1-dependent BCL-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2719–2728.
- Pawlowska, E., Szczepanska, J., & Blasiak, J. (2019). Pro- and Antioxidant Effects of Vitamin C in Cancer in correspondence to Its Dietary and Pharmacological Concentrations. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–18.
- Poon, M. T. C., Sudlow, C. L. M., Figueroa, J. D., & Brennan, P. M. (2020). Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1).
- Popa, D., Bigman, G., & Rusu, M. E. (2021). The role of Vitamin K in humans: Implication in aging and Age-Associated Diseases. *Antioxidants*, 10(4), 566.
- Portela, M., Venkataramani, V., Fahey-Lozano, N., Seco, E., Losada-Perez, M., & Winkler, F. (2019). Glioblastoma cells vampirize WNT from neurons and trigger a JNK/MMP signaling loop that enhances glioblastoma progression and neurodegeneration. *PLoS Biology*, 17(12), e3000545.
- Qin, L., Yu, Z., Zhang, S., Sun, G., Zhu, J., Xu, J., Guo, J., & Fu, L. (2013). The short chain cell-permeable ceramide (C6) restores cell apoptosis and perifosine sensitivity in cultured glioblastoma cells. *Molecular Biology Reports*, 40(10), 5645–5655.
- Ramezani, S., Vouseoghi, N., Kapourchali, F. R., & Joghataei, M. T. (2017). Perifosine enhances bevacizumab-induced apoptosis and therapeutic efficacy by targeting PI3K/AKT pathway in a glioblastoma heterotopic model. *Apoptosis*, 22(8), 1025–1034.
- Rangel, M., Kong, J., Bhatt, V., Khayati, K., & Guo, J. Y. (2021). Autophagy and tumorigenesis. *The FEBS Journal*, 289(22), 7177–7198.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C. O., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow,

- A. R., & Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 90(4), 1383–1435.
- Reang, J., Sharma, P. C., Thakur, V. K., & Majeed, J. (2021). Understanding the therapeutic potential of ascorbic acid in the battle to overcome cancer. *Biomolecules*, 11(8), 1130.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2021). Interactions between reactive oxygen species and autophagy. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1868(8), 119041.
- Ren, X., Santhosh, S. M., Coppo, L., Ogata, F. T., Lu, J., & Holmgren, A. (2019). The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 134, 350–358.
- Renner, O., Burkard, M., Michels, H., Vollbracht, C., Sinnberg, T., & Venturelli, S. (2021). Parenteral high-dose ascorbate - A possible approach for the treatment of glioblastoma (Review). *International Journal of Oncology*, 58(6).
- Ríos-Marco, P., Ríos, A., Jiménez-López, J. M., Carrasco, M. P., & Marco, C. (2015). Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 96(1), 10–19.
- Roa, F. J., Peña, E., Gatica, M., Escobar-Acuña, K., Saavedra, P., Maldonado, M., Cuevas, M. E., Moraga-Cid, G., Rivas, C. I., & Muñoz-Montesino, C. (2020). Therapeutic use of vitamin C in cancer: physiological considerations. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
- Sajadimajd, S., & Yazdanparast, R. (2015). Differential behaviors of trastuzumab-sensitive and -resistant SKBR3 cells treated with menadione reveal the involvement of Notch1/Akt/FOXO1 signaling elements. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 408(1–2), 89–102.
- Salazar, O. M., Rubin, M. P., Feldstein, M. L., & Pizzutiello, R. (1979). High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: Final Report. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 5(10), 1733–1740.
- Salazar-Ramiro, A., Ramírez-Ortega, D., De La Cruz, V. P., Hernández-Pedro, N. Y., González-Esquivel, D. F., Sotelo, J., & Pineda, B. (2016). Role of Redox status in development of glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., & Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel MTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and A-Synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5641–5652.
- Sasaki, R., Suzuki, Y., Yonezawa, Y., Ota, Y., Okamoto, Y., Demizu, Y., Huang, P., Yoshida, H., Sugimura, K., & Mizushima, Y. (2008). DNA polymerase γ inhibition by vitamin K3 induces mitochondria-mediated cytotoxicity in human cancer cells. *Cancer Science*, 99(5), 1040–1048.
- Sato, D., Takami, H., Takayanagi, S., Taoka, K., Tanaka, M., Matsuura, R., Tanaka, S., & Saito, N. (2023). Lymphoproliferative disorder during temozolomide therapy; a representative case of a formidable complication and management challenges. *BMC Neurology*, 23(1).
- Segawa, K., & Nagata, S. (2015). An apoptotic ‘Eat me’ signal: phosphatidylserine exposure. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 639–650.
- Seker-Polat, F., Degirmenci, N. P., Solaroglu, I., & Bagci-Onder, T. (2022). Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers*, 14(2), 443.
- Semkova, S., Ivanova, D., Nikolova, B., Zlateva, G., Bakalova, R., Zhelev, Z., & Aoki, I. (2021). Inhibition of ATP-synthase potentiates cytotoxicity of combination drug menadione/ascorbate in leukaemia lymphocytes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1738–1744.

- Semkova, S., Zhelev, Z., Miller, T., Sugaya, K., Aoki, I., Higashi, T., & Bakalova, R. (2020). Menadione/Ascorbate induces overproduction of mitochondrial superoxide and impairs mitochondrial function in cancer: Comparative study on cancer and normal cells of the same origin. *Anticancer Research/Anticancer Research*, 40(4), 1963–1972.
- Seo, G., Kim, S. K., Byun, Y. J., Oh, E., Jeong, S., Chae, G. T., & Lee, S. (2010). Hydrogen peroxide induces Beclin 1-independent autophagic cell death by suppressing the mTOR pathway via promoting the ubiquitination and degradation of Rheb in GSH-depleted RAW 264.7 cells. *Free Radical Research*, 45(4), 389–399.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Arencibia, M. G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C., & Ballabio, A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, 332(6036), 1429–1433.
- Shaukat, Z., Liu, D., Hussain, R., Khan, M., & Gregory, S. L. (2016). The role of JNK signalling in responses to oxidative DNA damage. *Current Drug Targets*, 17(2), 154–163.
- Shen, S., Zhang, Y., Zhang, R., Tu, X., & Gong, X. (2014). Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. *Chemico-biological Interactions*, 218, 28–41.
- Shenoy, N., Bhagat, T., Nieves, E., Stenson, M., Lawson, J., Choudhary, G. S., Habermann, T., Nowakowski, G., Singh, R., Wu, X., Verma, A., & Witzig, T. E. (2017). Upregulation of TET activity with ascorbic acid induces epigenetic modulation of lymphoma cells. *Blood Cancer Journal*, 7(7), e587.
- Shi, F., Guo, H., Zhang, R., Liu, H., Wu, L., Wu, Q., Liu, J., Liu, T., & Zhang, Q. (2017). The PI3K inhibitor GDC-0941 enhances radiosensitization and reduces chemoresistance to temozolomide in GBM cell lines. *Neuroscience*, 346, 298–308.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383.
- Silveira-Dorta, G., Monzón, D. M., Crisóstomo, F. P., Martín, T., Martín, V. S., & Carrillo, R. (2015). Oxidation with air by ascorbate-driven quinone redox cycling. *Chemical Communications*, 51(32), 7027–7030.
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., & Mittal, S. (2021). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist.*
- Singh, R., & Czaja, M. J. (2008). Compensatory mechanisms and the type of injury determine the fate of cells with impaired macroautophagy. *Autophagy*, 4(4), 516–518.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1157–1180.
- Song, M., Bode, A. M., Dong, Z., & Lee, M. (2019). AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer Research*, 79(6), 1019–1031.
- Stoyanov, G., & Dzhenkov, D. L. (2018). On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. *Folia Medica/Folia Medica*, 60(1), 48–66.
- Stamenkovic, M., Janjetovic, K., Paunovic, V., Ciric, D., Kravic-Stevovic, T., & Trajkovic, V. (2019). Comparative analysis of cell death mechanisms induced by lysosomal autophagy inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, 859, 172540.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine/the æNew England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996.

- Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., & Pan, H. (2014). p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Letters*, 344(2), 174–179.
- Sumiyoshi, A., Shibata, S., Lazarova, D., Zhelev, Z., Aoki, I., & Bakalova, R. (2023). Tolerable treatment of glioblastoma with redox-cycling ‘mitocans’: a comparative study in vivo. *Redox Report*, 28(1).
- Sumiyoshi, A., Shibata, S., Zhelev, Z., Miller, T., Lazarova, D., Aoki, I., Obata, T., Higashi, T., & Bakalova, R. (2022). Targeting glioblastoma via selective alteration of mitochondrial redox state. *Cancers*, 14(3), 485.
- Sumiyoshi, A., Shibata, S., Zhelev, Z., Miller, T., Lazarova, D., Zlateva, G., Aoki, I., & Bakalova, R. (2021). Pharmacological strategy for selective targeting of glioblastoma by Redox-active combination drug – comparison with the chemotherapeutic standard-of-care Temozolomide. *Anticancer Research/Anticancer Research*, 41(12), 6067–6076.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
- Takemura, Y., Satoh, M., Satoh, K., Hamada, H., Sekido, Y., & Kubota, S. (2010). High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), 249–253.
- Tamargo-Gómez, I., & Mariño, G. (2018). AMPK: Regulation of Metabolic Dynamics in the context of Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3812.
- Tanaka, K., Sasayama, T., Nagashima, H., Irino, Y., Takahashi, M., Izumi, Y., Uno, T., Satoh, N., Kitta, A., Kyotani, K., Fujita, Y., Hashiguchi, M., Nakai, T., Kohta, M., Uozumi, Y., Shinohara, M., Hosoda, K., Bamba, T., & Kohmura, E. (2021). Glioma cells require one-carbon metabolism to survive glutamine starvation. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1).
- Taniguchi, K., Suzuki, T., Okamura, T., Kurita, A., Nohara, G., Ishii, S., Kado, S., Takagi, A., Tsugane, M., & Shishido, Y. (2021). Perifosine, a bioavailable alkylphospholipid AKT inhibitor, exhibits antitumor activity in murine models of cancer brain metastasis through favorable tumor exposure. *Frontiers in Oncology*, 11.
- Tareen, B., Summers, J. L., Jamison, J. M., Neal, D. R., McGuire, K., Gerson, L., & Diokno, A. (2008). A 12 week, open label, Phase I/IIA study using Apatone® for the treatment of prostate cancer patients who have failed standard therapy. *International Journal of Medical Sciences*, 62–67.
- Tetef, M., Margolin, K., Ahn, C., Akman, S., Chow, W., Coluzzi, P., Leong, L., Morgan, R. J., Raschko, J., Shibata, S., Somlo, G., & Doroshow, J. H. (1995). Mitomycin C and menadione for the treatment of advanced gastrointestinal cancers: a phase II trial. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 121(2), 103–106.
- Thimmaiah, K. N., Easton, J. B., Germain, G. S., Morton, C. L., Kamath, S., Buolamwini, J. K., & Houghton, P. J. (2005). Identification of N10-Substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of AKT signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31924–31935.
- Tomasetti, M., Nocchi, L., Neuzil, J., Goodwin, J., Nguyen, M., Dong, L., Manzella, N., Staffolani, S., Milanese, C., Garrone, B., Alleva, R., Borghi, B., Santarelli, L., & Guerrieri, R. (2012). Alpha-Tocopheryl succinate inhibits autophagic survival of prostate cancer cells induced by vitamin K3 and ascorbate to trigger cell death. *PloS One*, 7(12), e52263.

- Torres, S., Lorente, M., Rodríguez-Fornés, F., Hernández-Tiedra, S., Salazar, M., García-Taboada, E., Barcia, J., Guzmán, M., & Velasco, G. (2011). A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(1), 90–103.
- Ueno, H., Tomiyama, A., Yamaguchi, H., Uekita, T., Shirakihara, T., Nakashima, K., Otani, N., Wada, K., Sakai, R., Arai, H., & Mori, K. (2015). Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase–paxillin axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(1–2), 240–247.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(5), 329–341.
- Vaz-Salgado, M. A., Villamayor, M., Albarrán, V., Alía, V., Sotoca, P., Chamorro, J., Rosero, D., Barrill, A. M., Martín, M., Fernandez, E., Gutierrez, J. A., Rojas-Medina, L. M., & Ley, L. (2023). Recurrent Glioblastoma: A review of the treatment options. *Cancers*, 15(17), 4279.
- Verrax, J., Cadrobbi, J., Marques, C., Taper, H., Habraken, Y., Piette, J., & Calderon, P. B. (2004). Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. *Apoptosis*, 9(2), 223–233.
- Verrax, J., Delvaux, M., Beghein, N., Taper, H., Gallez, B., & Calderon, P. B. (2005). Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An in vitro comparative study. *Free Radical Research*, 39(6), 649–657.
- Verrax, J., Stockis, J., Tison, A., Taper, H. S., & Calderon, P. B. (2006). Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. *Biochemical Pharmacology*, 72(6), 671–680.
- Villano, J. L., Letarte, N., Yu, J. M., Abdur, S., & Bressler, L. R. (2011). Hematologic adverse events associated with temozolomide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69(1), 107–113.
- Vita, M. F., Nagachar, N., Avramidis, D., Delwar, Z. M., Cruz, M. H., Siden, Å., Paulsson, K. M., & Yakisich, J. S. (2011). Pankiller effect of prolonged exposure to menadione on glioma cells: potentiation by vitamin C. *Investigational New Drugs*, 29(6), 1314–1320.
- Vitucci, M., Karpinich, N. O., Bash, R. E., Werneke, A. M., Schmid, R. S., White, K. K., McNeill, R. S., Huff, B., Wang, S., Van Dyke, T., & Miller, C. R. (2013). Cooperativity between MAPK and PI3K signaling activation is required for glioblastoma pathogenesis. *Neuro-oncology*, 15(10), 1317–1329.
- Vo, V. A., Lee, J., Lee, H. J., Chun, W., Lim, S. Y., & Kim, S. (2014). Inhibition of JNK potentiates temozolomide-induced cytotoxicity in U87MG glioblastoma cells via suppression of AKT phosphorylation. *Anticancer Research*.
- Wang, R., Deng, D., Shao, N., Xu, Y., Xue, L., Peng, Y., Liu, Y., & Zhi, F. (2018). Evodiamine activates cellular apoptosis through suppressing PI3K/AKT and activating MAPK in glioma. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 1183–1192.
- Wang, Y., Singh, R., Xiang, Y., & Czaja, M. J. (2010). Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology*, 52(1), 266–277.
- Watson, D. C., Bayik, D., Storevik, S., Moreino, S. S., Sprowls, S. A., Han, J., Augustsson, M. T., Lauko, A., Sravya, P., Røslund, G. V., Troike, K., Tronstad, K. J., Wang, S., Sarnow, K., Kay, K., Lunavat, T. R., Silver, D. J., Dayal, S., Joseph, J. V., . . . Lathia, J. D. (2023). GAP43-

- dependent mitochondria transfer from astrocytes enhances glioblastoma tumorigenicity. *Nature Cancer*, 4(5), 648–664.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-Mediated phosphorylation of BCL-2 regulates Starvation-Induced autophagy. *Molecular Cell*, 30(6), 678–688.
- Wen, C., Wang, H., Wu, X., He, L., Zhou, Q., Wang, F., Chen, S., Huang, L., Chen, J., Wang, H., Ye, W., Li, W., Yang, X., Liu, H., & Peng, J. (2019). ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antigastric cancer effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin. *Cell Death and Disease*, 10(11).
- Wen, P. Y., Weller, M., Lee, E. Q., Alexander, B. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Barthel, F. P., Batchelor, T. T., Bindra, R. S., Chang, S. M., Chiocca, E. A., Cloughesy, T. F., DeGroot, J. F., Galanis, E., Gilbert, M. R., Hegi, M. E., Horbinski, C., Huang, R. Y., Lassman, A. B., Rhun, E. L., . . . Van Den Bent, M. J. (2020). Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-oncology*, 22(8), 1073–1113.
- Wen, Y., Wang, H., Kho, S., Rinkiko, S., Sheng, X., Shen, H., & Zhu, Y. (2013). Hydrogen Sulfide Protects HUVECs against Hydrogen Peroxide Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *PloS One*, 8(2), e53147.
- Wilson, E. N., Bristol, M. L., Di, X., Maltese, W. A., Koterba, K., Beckman, M. J., & Gewirtz, D. A. (2011). A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radiosensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D. *Hormones & Cancer*, 2(5), 272–285.
- Wiraswati, H. L., Hangen, E., Sanz, A. B., Lam, N., Reinhardt, C., Sauvat, A., Mogha, A., Ortiz, A., Kroemer, G., & Modjtahedi, N. (2016). Apoptosis inducing factor (AIF) mediates lethal redox stress induced by menadione. *Oncotarget*, 7(47), 76496–76507.
- Wolf, D. A. (2014). Is reliance on mitochondrial respiration a “Chink in the armor” of Therapy-Resistant cancer? *Cancer Cell*, 26(6), 788–795. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.001>
- Wong, S. C., Kamarudin, M. N. A., & Naidu, R. (2021). Anticancer mechanism of curcumin on human glioblastoma. *Nutrients*, 13(3), 950.
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1).
- Wu, F. Y., & Sun, T. P. (1999). Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase. *European Journal of Cancer*, 35(9), 1388–1393.
- Wu, Q., Wu, W., Jacevic, V., Franca, T. C. C., Wang, X., & Kuca, K. (2020). Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 574–583.
- Wu, Y., Tan, H., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M. R., Ong, C., Codogno, P., & Shen, H. (2010). Dual role of 3-Methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on Class I and III phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10850–10861.
- Wu, Z., Ho, W. S., & Lu, R. (2021). Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation in glioblastoma therapy. *NeuroMolecular Medicine*, 24(1), 18–22.
- Yacoub, A., Mitchell, C., Hong, Y., Gopalkrishnan, R. V., Su, Z., Gupta, P., Sauane, M., Lebedeva, I. V., Curiel, D. T., Mahasreshti, P. J., Rosenfeld, M. R., Broaddus, W. C., James, C. D., Grant, S., Fisher, P. B., & Dent, P. (2004). MDA-7 regulates cell growth and radiosensitivity in vitro of primary (Non-Established) human glioma cells. *Cancer Biology & Therapy*, 3(8), 739–751.

- Yamada, A., Osada, S., Tanahashi, T., Matsui, S., Sasaki, Y., Tanaka, Y., Okumura, N., Matsuhashi, N., Takahashi, T., Yamaguchi, K., & Yoshida, K. (2015). Novel therapy for locally advanced triple-negative breast cancer. *International Journal of Oncology*, 47(4), 1266–1272.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/JUN N-Terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 8469–8478.
- Yoshikawa, K., Nigorikawa, K., Tsukamoto, M., Tamura, N., Hazeki, K., & Hazeki, O. (2007). Inhibition of PTEN and activation of Akt by menadione. *Biochimica Et Biophysica Acta. G, General Subjects/Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects (Online)*, 1770(4), 687–693.
- Yu, C., Huang, X., Xu, Y., Li, H., Su, J., Zhong, J., Kang, J., Liu, Y., & Sun, L. (2012). Lysosome Dysfunction Enhances Oxidative Stress-Induced Apoptosis through Ubiquitinated Protein Accumulation in Hela Cells. *The Anatomical Record*, 296(1), 31–39.
- Yu, H., Wu, C., Wang, X., Ban, Q., Quan, C., Liu, M., Dong, H., Li, J., Kim, G., Choi, Y. H., Wang, Z., & Jin, C. (2019). SP600125 enhances C-2-induced cell death by the switch from autophagy to apoptosis in bladder cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1).
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7 - beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science*, 304(5676), 1500–1502.
- Yu, Z., Xie, G., Zhou, G., Cheng, Y., Zhang, G., Yao, G., Chen, Y., Li, Y., & Zhao, G. (2015). NVP-BEZ235, a novel dual PI3K–mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells. *Cancer Letters*, 367(1), 58–68.
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510.
- Zhang, J., Stevens, M. F. G., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: Mechanisms of Action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–18.
- Zhang, K., Chen, D., Ma, K., Wu, X., Hao, H., & Jiang, S. (2018). NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) as a therapeutic and diagnostic target in cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(16), 6983–7003.
- Zhang, S., Gong, Y., Wang, H., Li, Z., Huang, Y., Fu, X., Xiang, P., & Fan, T. (2021). AS602801 sensitizes glioma cells to temozolomide and vincristine by blocking gap junction communication between glioma cells and astrocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(8), 4062–4072.
- Zhang, X., Yu, L., & Xu, H. (2016). Lysosome calcium in ROS regulation of autophagy. *Autophagy*, 12(10), 1954–1955. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1212787>
- Zhao, H., Wang, J., & To, S. T. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *International Journal of Oncology*, 47(2), 429–436.
- Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., & Zhu, W. (2010). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nature Cell Biology*, 12(7), 665–675.

- Zhuang, W., Li, B., Long, L., Chen, L., Huang, Q., & Liang, Z. (2011). Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *International Journal of Cancer*, 129(11), 2720–2731.
- Zhuang, W., Qin, Z., & Liang, Z. (2009). The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 41(5), 341–351.

Биографија аутора

Ана Деспотовић је рођена 12. фебруара 1992. године у Ужицу. Основну школу је похађала на Златибору, а после завршене Ужичке гимназије уписује Биолошки факултет Универзитета у Београду, смер Молекуларна биологија и физиологија. Дипломирала је 2016. године, након чега је уписала мастер академске студије на Биолошком факултету, студијски програм Молекуларна биологија и физиологија, модул Експериментална биомедицина. Мастер тезу насловљену „Синергистички антитуморски ефекат витамина Ц и Кз на ћелије хуманог глиобластома U251 *in vitro*“ одбранила је 2017. године. Исте године је уписала докторске академске студије, такође на Биолошком факултету.

Од 2018. године је запослена као истраживач у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институту од националног значаја за Републику Србију. Године 2021. стиче звање истраживач сарадник. Била је ангажована на пројектима „Улога аутофагије у регулацији смрти туморских ћелија“ (173053) и „Модулација сигналних путева који контролишу интрацелуларни баланс у терапији тумора и неуро-имуно-ендокриних поремећаја“ (ИИИ41025). Оба пројекта су била финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Као део ангажмана на пројекту билатералне сарадње између Републике Србије и Народне Републике Кине (451-02-818/2021-09/20) током априла 2023. године је боравила у институтима у оквиру Медицинског факултета Фуђијан у Кини. Тренутно свој научно-истраживачки рад реализује под покровитељством Министарства Науке, технолошког развоја и иновација, у оквиру пројекта Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Ана Деспотовић је аутор и коаутор пет научних радова објављених у часописима међународног значаја (један из категорије M21a, три из категорије M21 и један из категорије M22) и једног рада објављеног у врхунском часопису националног значаја (M51), као и бројних конгресних саопштења на скуповима међународног и националног значаја. Збирни импакт фактор објављених научних радова износи 26,784. Из докторске дисертације „Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома“ проистекла су два рада, оба објављена у часописима категорије M21.

Ана Деспотовић је члан Српског биолошког друштва, Српског друштва за митохондријалну и слободно-радикалску физиологију, Друштва за неуронауке Србије, Српског друштва за молекуларну биологију, Српског друштва истраживача рака, Федерације европских друштава за неуронауке (*Federation of European Neuroscience Societies*) и Европског друштва за истраживање слободних радикала (*Society for Free Radical Research Europe*).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Р. Деспотовић

број индекса Б3024/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона
у култури U251 ћелија хуманог глиобластома

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 6. септембра 2024.

Потпис докторанда



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Ана Р. Деспотовић

Број индекса Б3024/2017

Студијски програм Биологија–Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске
киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома

Ментор др Гордана Товиловић Ковачевић и др Ива Лакић

Потписани/а Ана Р. Деспотовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 6. септембра 2024.

Потпис докторанда

Ана Деспотовић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларни механизми цитотоксичног дејства аскорбинске киселине и менадиона у култури U251 ћелија хуманог глиобластома

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

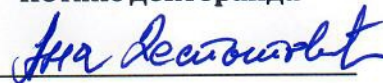
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 6. септембра 2024.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.