

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar Č. Pantović

**Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-  
kinaze i mTOR kompleksa 1 u *in vitro* citotoksičnom  
dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na  
ćelije glioma**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Aleksandar Č. Pantović

**The role of adenosine monophosphate-activated  
protein kinase and mTOR complex 1 in the cytotoxic  
effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on  
glioma cells *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

**MENTOR:**

Prof. dr Vladimir Trajković

Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**KOMENTOR:**

Dr Mihajlo Bošnjak

Naučni saradnik, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

Prof. dr Aleksandra Isaković

Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ivanka Marković

Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Evica Dinčić

Redovni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije  
Univerzitet odbrane Beograd

## Zahvalnica

*Istraživanja čiji su rezultati objavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji urađena su na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Klinici za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Naučno istraživački rad na ovoj disertaciji omogućen je posredstvom projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja “Modulacija unutarćelijskog energetskog balansa - kontrola signalnih puteva u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja”, rukovodilac projekta je prof. dr Vladimir Trajković i “Uloga autofagije u smrti tumorskih ćelija” čiji je rukovodilac naučni savetnik dr Ljubica-Harhaji Trajković.*

*Zahvaljujem se:*

*Mentoru i učitelju pristupa i razmišljanja o istraživačkom radu Prof. dr Vladimiru Trajkoviću za mogućnost da učestvujem na projektima čiji je rukovodilac, kao i zbog rukovođenja pri planiranju istraživanja i izradi doktorke disertacije.*

*Komentoru dr Mihajlu Bošnjaku zbog velikog doprinosa istraživanju, posvećenog pristupa u eksperimentalnom radu kao i za savete pri oblikovanju disertacije.*

*Dr Ljubici Harhaji-Trajković na svakodnevnom nesebičnom prenošenju saznanja, prijateljskom pristupu i rukovođenju pri planiranju eksperimenata i izradi doktorke disertacije.*

*Članovima komisije, Prof. dr Aleksandri Isaković, prof. dr Ivanki Marković i prof. dr Evici Dinčić na dragocenoj podršci i savetima.*

*Svojim dragim kolegicama dr Kristini Janjetović, dr Ljubici Vučićević, dr Maji Misirkić-Marjanović, Dr Biljani Ristić, dr Katarini Arsikin i ostalim zaposlenima u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta na zajedničkom radu, savetima o metodologiji istraživačkog rada i prijateljskom pristupu.*

*Zahvalnost dugujem svojoj porodici na razumevanju i neizmernoj podršci koju mi pružaju.*

## **Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u *in vitro* citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije glioma**

### **REZIME**

Gliomi su najčešći primarni tumori centralnog nervnog sistema. Glioblastom je gliom gradusa IV, terapijski rezistentan maligni tumor centralnog nervnog sistema. Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIL) su strukturno različite grupe molekula sa anti-inflamatornim i analgetskim dejstvom koji ispoljavaju i jak antitumorski efekat kako *in vitro* tako i *in vivo*. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivano je citotoksično dejstvo NSAIL na ćelije humane linije glioma U251 i ćelije primarne kulture glioblastoma izolovane iz tkiva obolelih pacijenata. Takođe, istraživali smo ulogu signalnog puta adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze (AMPK) i mTOR kompleksa 1 (mTORC1 - *engl.* mammalian target of rapamycin complex 1) u antigliomskom dejstvu NSAIL. Indometacin je snažnije od ostalih NSAIL (diklofenaka, naproksena i ketoprofena) smanjivao vijabilitet U251 ćelija humanog glioblastoma. Antigliomski efekat indometacina je bio povezan sa ekspresijom tumor supresorskog proteina p21 i zastojem ćelijskog ciklusa u G<sub>2</sub>M fazi, indukcijom oksidativnog stresa, depolarizacijom mitohondrija, aktivacijom kaspaza i indukcijom apoptoze. Indometacin je jedini od ispitivanih NSAIL povećavao fosforilaciju AMPK i nishodnih molekula koje ona fosforiliše, Raptor-a i acetil-CoA karboksilaze (ACC). Aktivaciju AMPK pratilo je smanjenje fosforilacije mTOR i molekula čiju aktivnost mTORC1 reguliše, kao što su ribozomalna p70S6 kinaza (S6K) i PRAS40 (Ser183). Genetska inhibicija AMPK RNK interferencijom, kao i tretman ćelija aktivatorom mTORC1 leucinom doveli su do delimičnog poništavanja citotoksičnih efekata izazvanih indometacinom. Sa druge strane, farmakološki aktivatori AMPK metformin i AICAR su poput indometacina ispoljavali antigliomski efekat inhibicijom mTORC1. Aktivacija AMPK u ćelijama tretiranim indometacinom korelirala je sa smanjenjem ćelijskog ATP i porastom AMP/ATP odnosa, ali je bila nezavisna od inhibicije COX i povećanja intraćelijskog nivoa kalcijuma. Takođe, citotoksični efekat indometacina na ćelije primarne kulture glioblastoma bio je posredovan aktivacijom AMPK/Raptor/ACC i inhibicijom mTORC1/S6K signalnih molekula. Konačno, istraživana je i sposobnost

indometacina da indukuje autofagiju u ćelijskoj liniji glioma U251. Nije detektovano povećanje markera autofagije, kao što su acidifikacija ćelijske citoplazme, ekspresija beklina-1 i konverzija lakog lanca 3-I (LC3-I) u autofagozomnu formu LC3-II u prisustvu lizozomalnih inhibitora (autofagni fluks). U skladu sa tim, genetska i farmakološka inhibicija autofagije nisu uticale na citotoksični efekat indometacina, što je potvrdilo da je antigliomski efekat leka bio nezavisan od autofagije. Pokazujući ulogu AMPK/mTORC1 signalnog puta u antigliomskom delovanju indometacina, naši rezultati podržavaju dalje istraživanje ovog nesteroidnog anti-inflamatornog leka u terapiji glioma.

**Ključne reči:** gliom, NSAIL, indometacin, AMPK, mTOR, apoptoza, autofagija

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

UDK broj:

**The role of adenosine monophosphate-activated protein kinase and mTOR complex 1 in the cytotoxic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on glioma cells *in vitro***

**SUMMARY**

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system. Glioblastoma is grade IV glioma, therapy-resistant malignant tumor of the central nervous system. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are structurally different groups of molecules with anti-inflammatory and analgesic effects that exert strong antitumor effect, both *in vitro* and *in vivo*. In this doctoral dissertation, the cytotoxic effect of NSAID on U251 human glioma cell line and the primary culture of glioblastoma cells isolated from patients has been examined. The role of the intracellular energy-sensing AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway in the *in vitro* antiglioma effect of NSAID has been investigated. Indomethacin was more potent than other NSAID (diclofenac, naproxen, and ketoprofen) in reducing the viability of U251 human glioma cells. Antiglioma effect of indomethacin was associated with p21 increase and G<sub>2</sub>M cell cycle arrest, as well as with oxidative stress, mitochondrial depolarization, caspase activation, and the induction of apoptosis. Indomethacin increased the phosphorylation of AMPK and its targets Raptor and acetyl-CoA carboxylase (ACC), and reduced the phosphorylation of mTOR and mTORC1 substrates p70S6 kinase and PRAS40 (Ser183). AMPK knockdown by RNA interference, as well as the treatment with the mTORC1 activator leucine, prevented indomethacin-mediated mTORC1 inhibition and cytotoxic action. On the other hand, AMPK activators metformin and AICAR mimicked mTORC inhibition-dependent cytotoxic effects of the drug. AMPK activation by indomethacin correlated with intracellular ATP depletion and increase in AMP/ATP ratio, and was apparently independent of COX inhibition or the increase in intracellular calcium. The toxicity of indomethacin towards primary human glioblastoma cells was also associated with the activation of AMPK/Raptor/ACC and subsequent suppression of mTORC1/S6K. Finally, the ability of indomethacin to induce autophagy in U251

human glioma cells has been investigated. However, indomethacin failed to stimulate intracellular acidification, expression of proautophagic protein beclin-1, and conversion of microtubule-associated protein light chain 3-I (LC3-I) to autophagosome-associated LC3-II, in the presence of lysosomal inhibitors (autophagic flux). Accordingly, genetic and pharmacological down-regulation of autophagy did not change cytotoxic effect of indomethacin, confirming that antiglioma effect of the drug was autophagy-independent. By demonstrating the involvement of AMPK/mTORC1 pathway in the antiglioma action of indomethacin, our results support further exploration of this non-steroidal anti-inflammatory drug in glioma therapy.

**Keywords:** glioma, NSAID, indomethacin, AMPK, mTOR, apoptosis, autophagy

**Research area:** Medicine

**Research field:** Molecular medicine

UDC number:



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	13
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	14
3.1. Rastvori i reagensi .....	14
3.2. Čelije i ćelijske kulture .....	15
3.2.1. U251 ćelijska linija humanog glioma .....	15
3.2.2. Primarna ćelijska kultura glioblastoma .....	16
3.3. Testovi vijabiliteta .....	16
3.3.1. Test aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza .....	16
3.3.2. Kristal violet test .....	17
3.3.3. Test oslobađanja laktat dehidrogenaze .....	18
3.4. Protočna citofluorimetrija .....	18
3.4.1. Određivanje apoptoze .....	19
3.4.2. Analiza ćelijskog ciklusa .....	19
3.4.3. Analiza aktivacije kaspaza .....	20
3.4.4. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta .....	21
3.4.5. Analiza membranskog potencijala mitohondrija .....	21
3.4.6. Merenje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom .....	22
3.5. Fazno kontrastna mikroskopija .....	22
3.6. Imunoblot analiza .....	23
3.7. RNK interferencija .....	24
3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za inhibitor ciklin zavisne kinaze p21 .....	25
3.8.1. RNK izolacija .....	25
3.8.2. Reverzna transkripcija .....	26
3.8.3. Kvantitativni PCR .....	26
3.9. HPLC analiza sadržaja AMP i ATP u ćeliji .....	27
3.10. Određivanje unutarćelijskog nivoa AMP i ATP bioluminiscentnim esejem .....	28
3.11. Statistička analiza .....	28

<b>4. REZULTATI</b> .....	29
4.1. <i>Indometacin i dikolfenak smanjuju vijabilitet U251 ćelija glioma na dozno zavisan način</i> .....	29
4.2. <i>Indometacin jedini od ispitivanih NSAIL aktivira AMPK</i> .....	30
4.3. <i>Indometacin smanjuje vijabilitet U251 ćelija glioma na vremenski zavisan način</i> ...	31
4.4. <i>Indometacin menja morfologiju U251 ćelija</i> .....	31
4.5. <i>Indometacin indukuje zastoj ćelijskog ciklusa u ćelijama glioma U251</i> .....	33
4.6. <i>Apoptoza ćelija glioma U251 izazvana indometacinom zavisi od kaspaza</i> .....	34
4.7. <i>Apoptoza indukovana indometacinom je posredovana oksidativnim stresom i depolarizacijom mitohondrija</i> .....	35
4.8. <i>Indometacin aktivira AMPK i inhibira mTORC1 u U251 ćelijama</i> .....	37
4.9. <i>Inhibicija mTORC1 u ćelijama glioma U251 tretiranih indometacinom je zavisna od AMPK aktivacije</i> .....	39
4.10. <i>Genetska inhibicija AMPK smanjuje antiproliferativno i proapoptotsko delovanje indometacin</i> .....	40
4.11. <i>AMPK aktivatori metformin i AICAR inhibiraju mTOR i smanjuju vijabilitet U251 ćelija</i> .....	41
4.12. <i>Aktivacija mTOR leucinom smanjuje citotoksičnost indometacina na ćelije glioma U251</i> .....	41
4.13. <i>Inhibitor mTOR rapamicin smanjuje vijabilitet U251 ćelija</i> .....	43
4.14. <i>Indometacin ne indukuje autofagiju u U251 ćelijama glioma</i> .....	44
4.15. <i>Genetska i farmakološka inhibicija autofagije ne utiču na vijabilitet U251 ćelija tretiranih indometacinom</i> .....	46
4.16. <i>Indometacin aktivira AMPK povećanjem odnosa AMP/ATP</i> .....	48
4.17. <i>Indometacin aktivira AMPK nezavisno od intracelularnog nivoa Ca<sup>2+</sup></i> .....	49
4.18. <i>Indometacin smanjuje vijabilitet primarnih ćelija glioblastoma</i> .....	50
4.19. <i>Indometacin modifikuje aktivnost AMPK/mTORC1 signalnog puta u primarnim ćelijama glioblastoma</i> .....	50
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	52

<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>65</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>66</b>

# 1. UVOD

Gliomi su najčešći primarni tumori centralnog nervnog sistema. Neuropatološki kriterijumi Svetske zdravstvene organizacije definišu četiri gradusa određena prema stepenu maligniteta, stepenu ćelijske atipije, mitotskoj aktivnosti i specifičnim obeležjima kao što su mikrovaskularna proliferacija i pseudopalisadna nekroza, koja je karakteristika IV gradusa – glioblastoma (Louis i sar., 2016). Glioblastom je najčešći maligni tumor centralnog nervnog sistema sa godišnjom incidencom od 3,1 na 100 000 stanovnika i udelom od 45% u ukupnom broju malignih tumora centralnog nervnog sistema (Ostrom i sar., 2014). Visok stepen zaštite mozga od genotoksičnog stresa, mehanički i filtracijom kroz krvno-moždanu barijeru, mogao bi delimično da objasni nisku frekvencu glioblastoma i primarnih tumora mozga u poređenju sa tumorima drugih lokalizacija. Međutim, ovaj tumor je veoma agresivan, o čemu govori činjenica da je petogodišnje preživljavanje 5% od trenutka postavljanja dijagnoze, a u populaciji starijih od 65 godina pet godina preživi samo 2% obolelih (Ostrom i sar., 2014). Većina glioblastoma (~ 90%) razvijaju se *de novo* kao primarni glioblastomi i karakteristični su za stariju populaciju. Sekundarni glioblastomi nastaju od glioma nižeg gradusa, kao što su difuzni astroцитom ili anaplastični astroцитom, i javljaju se u mlađoj životnoj dobi (Ohgaki i sar., 2013). Osobe muškog pola obolevaju češće od osoba ženskog pola (1,6:1), a učestalost obolevanja je duplo veća u beloj u odnosu na crnu populaciju (Ostrom i sar., 2014). Jedini dokazani egzogeni faktor rizika za obolevanje od glioblastoma je zračenje niskom dozom radioterapije od 1-6 Gi (Ron i sar., 1988; Sadetzki i sar., 2005). Ostali faktori rizika karakteristični za druga maligna oboljenja u slučaju glioblastoma nisu dokazani (Brada i sar., 1992; INTERPHONE Study Group i sar., 2010; Minniti i sar., 2005).

Poreklo ćelija glioblastoma i dalje se istražuje. Nedovoljno poznavanje porekla i mehanizma maligne transformacije je jedan od osnovnih razloga neuspeha terapije. Postoje dve osnovne teorije o poreklu ćelija glioblastoma: klasični stohastički model i teorija kancerskih matičnih ćelija. Prema starijem stohastičkom modelu klonalne evolucije, kumulativni efekat genskih mutacija nagomilanih tokom vremena u

normalnoj ćeliji glije (astrocit, oligodendrocit) vodi u nastanak maligne ćelije koja formira klon identičnih kopija sa istim malignim potencijalom (Adams i sar., 2008; Salk i sar., 2010). Prema ovoj teoriji, kontinuirane genetske promene u ćelijama glije mogu dovesti do nastanka *de novo* glioblastoma (primarni glioblastom) ili se dalja onkogeneza dešava u ćelijama glioma II i III stadijuma (sekundarni glioblastom) (Arjona i sar., 2006). Saznanje da ćelije glioblastoma izolovane iz primarnih tumora dele karakteristike sa matičnim ćelijama smatra se najznačajnijim pomakom u istraživanju glioblastoma tokom poslednje dve dekade (Singh i sar., 2003). Istraživanja sugerišu da primarni glioblastomi vode poreko od adultnih neuronalanih matičnih i progenitornih ćelija (NSPC, *engl.* Neural Stem and Progenitor Cells), koje su lokalizovane u subkortikalnoj beloj masi, subventrikularnoj zoni i girusu dentatusu hipokampusa (Nunes i sar., 2003; Sanai i sar., 2004). NSPC su zadržale sposobnost mitoze i igraju glavnu ulogu u plastičnosti mozga, učenju i memoriji (Sanai i sar., 2005). Za subpopulaciju NSPC, koje su još nazvane i gliom-inicirajuće ćelije, opisani su markeri: CD133 (prominin) (Singh i sar., 2004), integrin alfa 6 (Lathia i sar., 2010), CD44 (Pietras i sar., 2014) i CD15 (Son i sar., 2009) ali se njihovo prisustvo značajno razlikuje među jedinkama i u zonama tkiva unutar samog tumora (Yan i sar., 2013). Gliom-inicirajućim ćelijama se pripisuje ključna uloga u rastu, angiogenezi, invaziji u okolno tkivo i otpornosti na radioterapiju (Bao i sar., 2006) i hemoterapiju (Beier i sar., 2008; Chen i sar., 2012). Najčeće *in vitro* korišćen model glioma/glioblastoma je U251 ćelijska linija. Upravo na ovim ćelijama je detektovan marker CD133<sup>+</sup>, koji je karakterističan za neuronalne matične ćelije. Osim u ćelije glije, U251 ćelije mogu *in vitro* biti diferencirane i u neurone (Qiang i sar., 2009).

Klinički tok glioblastoma određuje lokalizacija tumora i dinamika širenja u moždanom tkivu (Weller i sar., 2015). Senzo-motorni deficit je početna klinčka prezentacija kod 20% pacijenata sa glioblastomom, a približno 5% pacijenata ima afaziju zbog tumora koji nastaju u dominantnoj hemisferi za govor (najčešće leva hemisfera) (Yuile i sar., 2006). Promene ličnosti i poremećaji raspoloženja javljaju se kod pacijenata sa lokalizacijom tumora u frontalnom režnju. Kortikalna lokalizacija omogućuje dobar operativni pristup, kao i bržu dijagnozu zbog ranih kliničkih ispoljavanja (Chaichana i sar., 2009; Yuile i sar., 2006). Glavobolje predstavljaju prvi

simptom bolesti kod manje od jedne trećine svih pacijenata sa glioblastomom (Yuile i sar., 2006), bol je tup i često prisutan noću ili tokom i nakon buđenja. Simptomatska epilepsija se češće javlja kod glioblastoma lociranih u temporalnom režnju (Chaichana i sar., 2009). Epileptički napad je početni klinički događaj kod 25-70% pacijenata i ponavlja se u 20-40% u daljem toku bolesti (Chaichana i sar., 2009; Kerkhof i sar., 2013; van Breemen i sar., 2009; Wick i sar., 2005). Znaci povećanog intrakranijalnog pritiska kao što su mučnina, povraćanje, vrtoglavica, umor i kognitivne promene mogu biti prisutni na početku i pogoršavaju se tokom bolesti (Yuile i sar., 2006). Većina glioblastoma se javlja u frontalnom (26%), temporalnom (20%) i parijetalnom (12%) režnju. Ređe se javljaju u okcipitalnom režnju, malom mozgu, moždanom stablu i kičmenoj moždini (Ostrom i sar., 2014). Slučajevi udaljenih metastaza koje potiču od glioblastoma su veoma retko opisani u plućima, pleuri, limfnim čvorovima, kostima i jetri (Schweitzer i sar., 2001).

Prvi pokazatelji bolesti su novonastali neurološki znaci i simptomi, a za dalju dijagnozu potrebna je neuroradiološka dijagnostika magnetnom rezonancom (MR) ili kompjuterizovanom tomografijom (KT) (La Fougère i sar., 2011). Histopatološke osobine koje u odnosu na druge gliome karakterišu samo glioblastome su nekroza i mikrovaskularna proliferacija (Louis i sar., 2016). Analize genetskih i epigenetskih podataka sve više doprinose razumevanju biologije i podklasifikaciji glioblastoma nezavisno od histoloških karakterika. Tokom 2008. godine nađene su promene u signalnom putu RTK/RAS/PI3K/AKT (88%), p53 proteinu (87%) i pRb retinoblastoma proteinu (78%). Iste godine otkrivena je mutacija za izocitrat dehidrogenazu (IDH-1/2) kao marker koji je povezan sa sekundarnim glioblastomom, mlađim životnim dobom i boljim ishodom u odnosu na dužinu života nakon dijagnoze (Parsons i sar., 2008; Yan i sar., 2009).

Uticaj terapije glioblastoma na dužinu života nakon dijagnoze je skroman. Nekoliko je razloga za terapijski neuspeh: limitirana operabilnost ovih tumora uzrokovana nepristupačnom lokalizacijom, nemogućnost velikog broja potencijalnih lekova da prođu kroz krvno-moždanu barijeru, velika osetljivost normalnih ćelija nervnog sistema na terapiju, kao i pojava brojnih rezistentnih klonova unutar samog tumora. Osnovni princip lečenja je hirurški ukoliko je resekcija moguća. Standardna

terapija koja se danas koristi u lečenju je radioterapija ili kombinovana radioterapija i hemioterapija pre i posle hirurškog lečenja. Istovremena primena citostatika temozolomida sa radioterapijom prolongira preživljavanje u poređenju sa grupom pacijenata koja je lečena samo radioterapijom (Stupp i sar., 2005). Međutim, terapijski učinak temozolomida primetan je samo kod pacijenata sa metilovanim promotorom gena za O-6-metilguanil DNK metiltransferazu (Hegi i sar., 2005). Za lečenje recidiva se koristi protokol koji uz bevacizumab, monoklonsko antitelo koje se vezuje za vaskularni endotelijalni faktor rasta, uključuje i sistemska primena citostatika nitrozoureje (lomustine) i temozolomida (Weller i sar., 2013). Primena električnog polja naizmenične struje preko elektroda na skalpu pacijenata sa recidivom glioblastoma (Stupp i sar., 2012) je takođe odobren metod lečenja od strane FDA (*engl.* Food and Drug Administration) i Evropske agencije za lekove (Stupp i sar., 2014). Navedeni konvencionalni terapijski modaliteti pokazuju ograničene rezultate, pa se za istraživanja farmakoterapije glioblastoma izdvajaju velika finansijska sredstva.

Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIL), strukturno različite grupe molekula sa anti-inflamatornim i analgetskim dejstvom, spadaju među najčešće korišćene lekove (Singh i sar., 2004). Svoje anti-inflamatorno i analgetsko delovanje ostvaruju inhibicijom ciklooksigenaze 1 i 2 (COX1 i COX2), enzima uključenih u sintezu prostanglandina (FitzGerald i sar., 2001). NSAIL su pokazali ne samo preventivni uticaj na nastanak i preživljavanje nakon dijagnoze maligne bolesti (Rothwell i sar., 2010), već i direktno antitumorsko dejstvo. Epidemiološke studije pokazuju povezanost između upotrebe NSAIL i smanjenog rizika za obolevanje od glioma (Scheurer i sar., 2008). Mnogi lekovi iz ove grupe ispoljavaju jak antitumorski efekat kako *in vitro* tako i *in vivo* (Elwood i sar., 2016, Elwood i sar 2018). Pokazano je da antitumorsko dejstvo NSAIL može biti COX zavisno (Howe i sar., 2002) i COX nezavisno (Smith i sar., 2000) kao i da je posledica sposobnosti ovih lekova da indukuju apoptozu, inhibiraju proliferaciju tumorskih ćelija, suprimiraju angiogenezu i utiču na imuni odgovor (Jukić i sar., 2010; Smith i sar., 2000).

Indometacin je indolski NSAIL korišćen prvenstveno za lečenje bolnih stanja kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis, giht i drugi bolni sindromi (Suleyman i sar., 2010). Deluje kao neselektivni inhibitor ciklooksigenaze 1 (COX-1) i ciklooksigenaze 2

(COX-2), enzima za sintezu prostanglandina, hormonima-sličnih molekula uključenih u nastanak bolnog nadražaja, povećane telesne temperature i zapaljenja (Guo i sar., 2013). Bioraspoloživost indometacina je 98%, vezivanje za proteine plazme je 90% a lek se metaboliše preko jetre (Helleberg i sar., 1981). Poluvreme eliminacije je 3 – 10 h, a maksimalna koncentracija u plazmi postiže se dva sata nakon oralne primene (Alván i sar., 1975). Ovaj lek bolje prolazi kroz krvno-moždanu barijeru u poređenju sa drugim NSAIL (Parepally i sar., 2006), što ga čini pogodnim za ispitivanje efekata na CNS. Jedinstven i potpun učinak na otklanjanje bola u lečenju dve vrste glavobolja iz grupe trigemino-autonomnih cefalalgija izdvaja indometacin od svih drugih lekova iz grupe NSAIL (VanderPluym i sar., 2015). Za mnoge NSAIL epidemiološke studije pokazuju da je njihova upotreba povezana sa smanjenjem rizika za nastanak tumora (Bosetti i sar., 2012; Johannesdottir i sar., 2012; Takkouche i sar., 2008). Za indometacin je pokazano da ispoljava snažne antitumorske efekte inhibicijom proliferacije i indukcijom apoptoze u *in vitro* modelu kolorektalnog karcinoma, karcinoma pluća, T ćelijske leukemije i *in vivo* modelu karcinoma pluća mišijeg soja C57BL/6J (Brunelli i sar., 2012; Eli i sar., 2001; Hojka-Osinska i sar., 2012). Takođe, pokazano je da ovaj lek svoje anti-tumorsko delovanje ostvaruje modulacijom imunskog odgovora (Jukić i sar., 2010; Morecki i sar., 2000), kao i inhibicijom angiogeneze i metastatske diseminacije ćelija melanoma (Bigda i sar., 1998; Levin i sar., 2000). Nekoliko istraživanja potvrdilo je sposobnost indometacina da inhibira rast ćelija glioma *in vitro* i *in vivo*, samostalno ili u kombinaciji sa hemioterapijom (Amin i sar., 2003; Benyahia i sar., 2004; Bernardi i sar., 2013, 2008; Ishibashi i sar., 2005; Pekmez i sar., 2015; Sun i sar., 2006). Osim toga, indometacin je u kombinaciji sa hemioterapijom pokazao efekat u lečenju novodijagnostikovanih pacijenata obolelih od glioblastoma (Weiler i sar., 2010). Ipak, mehanizmi antitumorskog dejstva indometacina nisu dovoljno istraženi.

Tokom poslednje dekade raste interesovanje za istraživanja antitumorskog efekta aktivacije AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) supstancama iz grupe NSAIL *in vitro* ali i u kliničkim istraživanjima (Chi i sar., 2011; Din i sar., 2012; Hawley i sar., 2012; Si i sar., 2013; Sung i sar., 2011). AMPK je serin/treonin protein kinaza koja ima glavnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze u ćeliji (Hardie, 2014), a reguliše i mitohondrijsku fisiju, epitelizaciju i angiogenezu ( Toyama i sar., 2016; Nagata i sar.,



2003; Zibrova i sar., 2017). AMPK je heterotrimerni kompleks sastavljen od katalitičke  $\alpha$  subjedinice i regulatornih  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinica, sa izoformama  $\alpha 1/\alpha 2$ ,  $\beta 1/\beta 2$  i  $\gamma 1/\gamma 2/\gamma 3$  (Cheung i sar., 2000; Stapleton i sar., 1996; Thornton i sar., 1998). Osnovni put aktivacije AMPK je posredovan porastom ćelijskog odnosa AMP/ATP u odgovoru na nizak nivo glukoze, hipoksiju, ishemiju, visoku temperaturu ili aktivnost hormona i citokina (Hardie i sar., 2015). Vezivanje AMP za  $\gamma$  subjedinicu alosteričkom modifikacijom aktivira kompleks, olakšavajući fosforilaciju na Thr172 - aktivacionom mestu  $\alpha$  subjedinice delovanjem serin/treonin kinaze LKB1 (Hardie i sar., 2015). Osim toga, AMPK može biti direktno fosforilisana na Thr172 kalmodulin zavisnom protein kinazom- $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) u odgovoru na porast intracelularne koncentracije kalcijuma (Hardie i sar., 2015). Novija istraživanja ukazuju i na druge moguće puteve aktivacije AMPK. Deprivacija glukoze dovodi do aktivacije mehanizmom koji je nezavisan od nivoa AMP i ATP, a podrazumeva formiranje kompleksa između adapterskog proteina Aksina i LKB1 na površini lizozoma, koji se vezuje za AMPK i aktivira je. Jedan od načina aktivacije je vezivanje alosteričkih aktivatora i metabolita (ADaM, *engl.* allosteric drug and metabolite) za mesto (ADaM site) nezavisno od veznog mesta AMP na  $\gamma$  subjedinici AMPK. Na ovaj način AMPK aktiviraju različite sintetičke supstance i hipoglikemijski agensi koji su prošli sve faze predkliničkog ispitivanja (Langendorf i sar., 2015). Paradoksalno, sorafenib je inhibitor kinaza koji se koristi za lečenje hepatocelularnog karcinoma, karcinoma bubrega i štitaste žlezde, a aktivira AMPK indirektno inhibicijom mitohondrijskog metabolizma i povećanjem AMP/ADP i ADP/ATP odnosa (Ross i sar., 2017). Aktivirana AMPK fosforiliše brojne nishodne molekule u ćeliji. Najznačajniju ulogu AMPK ostvaruje fosforilacijom supstrata kao što su Raptor i acetil-koenzim A karboksilaza (ACC) (Gwinn i sar., 2008; Sim i sar., 1988), favorizujući kataboličke procese kao što su oksidacija masnih kiselina, ulazak glukoze u ćeliju i glikoliza. Cilj ovih procesa je obnova energetske rezervi u ćeliji sintezom ATP. Nasuprot tome, anabolički procesi koji troše energiju poput sinteze masnih kiselina i holesterola su inhibirani (Hardie i sar., 2015). Kao metabolički senzor, AMPK dopušta odvijanje energetski zahtevnih procesa kao što su rast i proliferacija samo u slučajevima kada u ćeliji postoji dovoljno energije (Fogarty i sar., 2010). Sa druge strane, pokazano je da aktivacija AMPK indukuje zastoje ćelijskog ciklusa i/ili apoptozu u različitim tumorskim ćelijama, među kojima su ćelije hronične limfocitne leukemije, karcinoma

kolona, ovarijuma, pankreasa, dojke, melanoma kao i ćelije glioma (Campàs i sar., 2003; Chen i sar., 2013; Isakovic i sar., 2007; Ji i sar., 2010; Leclerc i sar., 2013; Nieminen i sar., 2013; Vucicevic i sar., 2009; Wang i sar., 2013). Antitumorsko dejstvo AMPK delimično ostvaruje preko uticaja na aktivnost drugih tumor-supresorskih proteina. Naime, aktivacija AMPK može da indukuje fosforilaciju p53 i ekspresiju njegovog supstrata, ciklin-zavisnog inhibitora kinaza p21<sup>cip1</sup> u ćelijama hepatocelularnog karcinoma i glioma (Liu i sar., 2019; Zhang i sar., 2010). p53 i p21 su funkcionalno povezani i imaju ulogu u inhibiciji nastanka kompleksa između ciklin zavisnih kinaza (CDK) i ciklina (Saegusa i sar., 2004; Wolter i sar., 2001). Poznato je da p21 može da zaustavi prelazak G<sub>1</sub> u S i G<sub>2</sub> u M fazu ćelijskog ciklusa inhibirajući komplekse CDK4,6/ciklin-D i CDK2/ciklin-E (Karimian i sar., 2016). Osim toga, *in vitro* eksperimenti pokazuju da indometacin može da inhibira proliferaciju preko povećanja ekspresije p21<sup>WAF1/CIP1</sup> u ćelijama karcinoma kolona (Chu i sar., 2004).

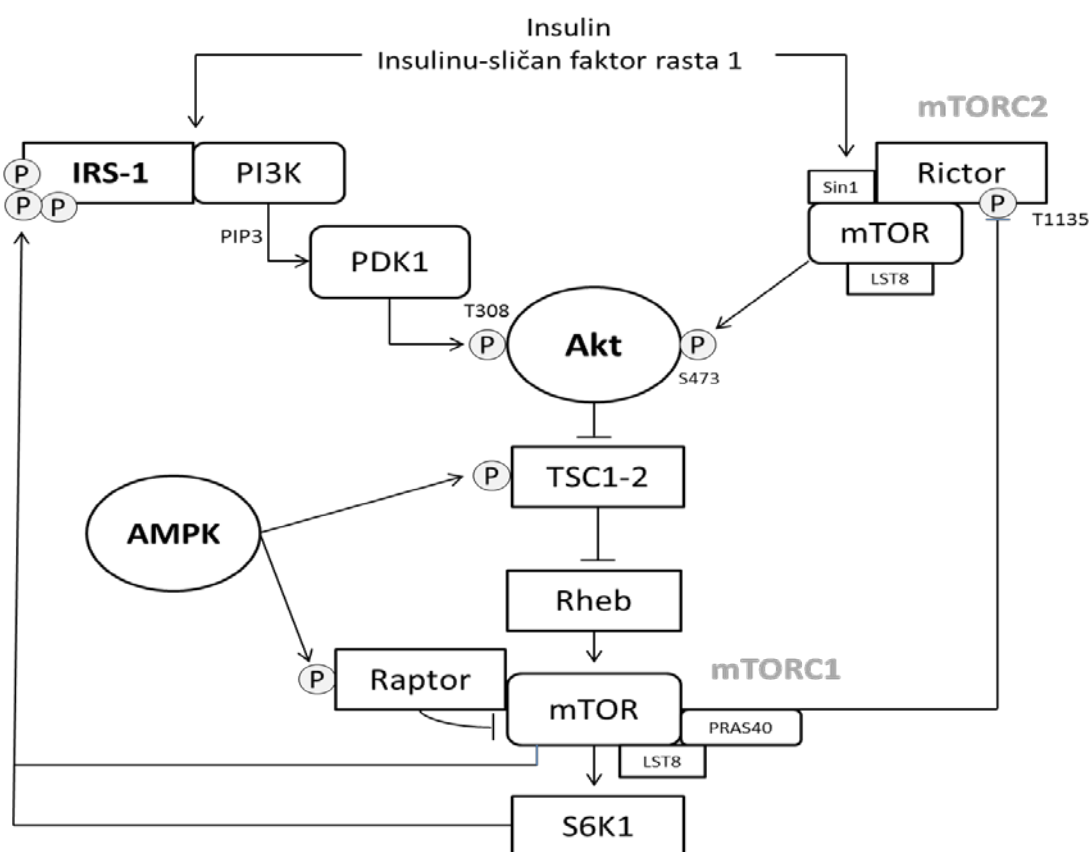
Uticaj AMPK na ćelijsku proliferaciju može biti posredovan i inhibicijom mTOR (*engl.* Mammalian target of rapamycin). mTOR ima ulogu katalitičkog jezgra sačinjenog od dva kompleksa. Prvi, mTOR kompleks 1 (mTORC1) se sastoji od četiri subjediničice: Raptor (regulatorni protein), prolinom-bogat Akt supstrat od 40 kDa PRAS40 (*engl.* the proline-rich Akt substrate of 40 kDa), mLST8 i mTOR (Yip i sar., 2010). Drugi, mTOR kompleks 2 (mTORC2) sadrži adapterski molekul Rictor, mSIN1, PRR5/Protor, mLST8 i mTOR (Gaubitz i sar., 2016). AMPK inhibira mTORC1 fosforilacijom Raptora i/ili preko tuberozno-skleroznog kompleksa (TSC), koji inhibira stimulaciju mTOR posredovanu Ras homologom RHEB (*engl.* Ras homolog enriched in brain) (Inoki i sar., 2012). Ovaj kompleks preko nishodnih molekula ribozomalne p70S6 kinaze (S6K) i translacionog represora 4EBP1 (*engl.* Eukaryotic translation initiation factor 4E - binding protein 1), LARP1 (*engl.* La-related protein 1), Atg13 (*engl.* The Autophagy-related gen 13) i ULK1/2 (*engl.* Unc-51 like autophagy activating kinase) kontroliše anaboličke procese (sinteza proteina i lipida), ćelijski rast i proliferaciju, angiogenezu i autofagiju (Morita i sar., 2015). Iako se ranije verovalo da je mTORC2 rezistentan na rapamicin, postoje saznanja da prolongiran tretman rapamicinom u pojedinim ćelijskim linijama može da inhibira ovaj kompleks (Sarbasov i sar., 2006). Takođe, mTORC1 može preko S6K da inhibira mTORC2 (Sparks i sar., 2010). Sa

druge strane, mTORC2 kompleks fosforiliše i aktivira Akt (Ser473) (Copp i sar., 2009), a Akt direktno ili posredno aktivira mTORC1, što je stimulus za proliferaciju, ćelijsku migraciju i glikolizu (Chiang i sar., 2007). mTORC2 fosforiliše i druge kinaze kao što su glukokortikoidima-indukovana protein kinaza i protein kinaza C, regulišući organizaciju citoskeleta i degradaciju nosivih sintetičkih polipeptida (Oh i sar., 2011). Za mTOR je pokazano da ima regulatornu ulogu u apoptotskoj smrti ćelije, što je posredovano nishodnim molekulima p53, Bcl-2 (*engl.* B-cell lymphoma 2), Bad (*engl.* The BCL2 associated agonist of cell death), p21, p27 i c-Myc7 (Castedo i sar., 2002).

Ključna uloga mTOR u ćelijskom rastu i proliferaciji ukazuje na povezanost između mTOR signalnog puta i mnogih patoloških stanja uključujući maligne tumore. Brojne ćelijske linije i *in vivo* modeli pokazuju da aberantna aktivacija mTOR signalnog puta posredovana onkogenom stimulacijom ili gubitkom funkcije tumor-supresora doprinosi rastu tumora, angiogenezi i metastatskom širenju (Pópulo i sar., 2012). Mutacije u genima za mTOR su pronađene u karcinomu pluća, melanomu, karcinomu ovarijuma, adenokarcinomu tankog creva, karcinomu bubrega i gliomima (Sato i sar., 2010). Prekomerna ekspresija mTOR supstrata kao što su S6K, 4EBP1 i eIF4E (*engl.* Eukaryotic translation initiation factor 4E) je povezana sa lošom prognozom (De Benedetti i sar., 2004; Nakamura i sar., 2008). Pokazana je hiperaktivacija mTOR signalnog puta u tkivu glioblastoma (Laplante i sar., 2012), a njegova inhibicija u ćelijama glioma *in vitro* povećava antigliomski efekat i smanjuje rezistenciju na dejstvo citostatika *in vivo* (Yu i sar., 2015). Paralelno sa favorizovanjem anaboličkih procesa, mTOR inhibira autofagiju koja je glavni katabolički proces u ćeliji.

Akt je serin/treonin kinaza koja aktivira mTORC1 preko fosforilacije PRAS40 (Thr246) i/ili preko negativne regulacije TSC, koji zatim inhibira mTOR stimulator RHEB (Huang i sar., 2009; Sancak i sar., 2007). Sa druge strane, poznato je da inhibicija mTOR rapamicinom u nekim tumorskim ćelijama dovodi do kompenzatorne aktivacije Akt zbog gubitka povratne sprege preko dva paralelna mehanizma. Naime, mTORC1 i njegov nishodni supstrat S6K mogu da fosforilišu i tako inhibiraju supstrat insulinskog receptora 1 (IRS-1), koji preko fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K) aktivira Akt (O'Reilly i sar., 2006). Sa druge strane, S6K u nekim ćelijama direktno inhibitorno fosforiliše Rictor subjedinicu kompleksa mTORC2 (Dibble i sar., 2009), koji fosforiliše

i aktivira Akt (S473) (Shema 1). Hiperaktivacija PI3K/Akt signalnog puta u tumorima je posledica nekoliko mehanizama uključujući povećanu ekspresiju receptora za faktore rasta kao što su receptor za humani epidermalni faktor rasta (HER-2, *engl.* Epidermal growth factor receptor 2) i receptor za insulinu-sličan faktor rasta (IGFR, *engl.* Insulin-like growth factor receptor), kao i mutacije gena za PI3K i Akt (Chung i sar., 2002; Stemke-Hale i sar., 2008; Zhou i sar., 2000). PTEN (*engl.* Phosphatase and tensin homolog), negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta je suprimiran u mnogim tumorskim ćelijama (Sansal i sar., 2004). Nedavno je pokazano da modulacija signalnog puta Akt/p21/p27 može da utiče na ćelijsku proliferaciju i da indukuje apoptozu u ćelijama glioma (Zhou i sar., 2019).



**Shema 1.** Model mTORC1- zavisne inhibicije AKT mehanizmima povratne sprege. (Modifikovano prema Dibble, C.C., Asara, J.M., Manning, B.D., 2009. *Characterization of Rictor Phosphorylation Sites Reveals Direct Regulation of mTOR Complex 2 by S6K1.* *Mol. Cell. Biol.* 29, 5657–5670.)

Cilj svake antitumorske terapije je ubijanje tumorskih ćelija. Tumorske ćelije umiru programiranom ćelijskom smrću tipa I - apoptozom, programiranom ćelijskom smrću tipa II - autofagijom ili nekrozom. Nekroza je ćelijska smrt koja uglavnom nije programirana i indukovana je spoljašnjim faktorima kao što su infekcija, hipoksija, radijacija, toksini ili trauma. Nekrozu karakteriše naglo narušavanje integriteta ćelijske membrane, oslobađanje sadržaja u međućelijski prostor i lokalna zapaljenska reakcija (Ouyang i sar., 2012).

Apoptoza je proces programirane ćelijske smrti koji se dešava aktivno uz utrošak energije neophodne za niz biohemijskih i morfoloških promena u ćeliji (Kerr i sar., 1972). U fiziološkim okolnostima apoptoza učestvuje u procesima kao što su održavanje normalnog broja ćelija u organizmu, funkcionisanje imunskog sistema i embrionalni razvoj. Neadekvatna aktivnost apoptoze detektovana je u nizu patoloških stanja uključujući i malignu transformaciju (Ouyang i sar., 2012). Apoptoza je glavni put ćelijske smrti kada je ćelijska DNK oštećena bez mogućnosti popravke. Apoptotska smrt ćelije se najčešće dešava preko dva osnovna puta: spoljašnji put posredstvom tzv. receptora smrti na površini ćelijske membrane i unutrašnji ili mitohondrijski put koji je iniciran promenama potencijala na membrani mitohondrija (Eum i sar., 2011). Spoljašnji put počinje vezivanjem Fas membranskog receptora za ligand Fas-L ili TNF (*engl.* Tumor necrosis factor) receptora (TNFR) za TNF. Kompleks Fas/Fas-L ili TNFR/TNF privlači protein koji nosi domen smti FADD (*engl.* Fas-associated death domain) i pro-kaspazu 8, formirajući proteinski kompleks DISC (*engl.* Death-Inducing Signalling Complex). Kompleks aktivira pro-kaspazu-8 koja aktivira ekzekutorske kaspaze 3, 6 i 7 (Kerr i sar., 1972; Sun i sar., 2011). Mnogobrojni unutrašnji i spoljašnji faktori kao što su zračenje, hemioterapija, toksini, hipoksija, genotoksični stres, virusi, hipertermija i slobodni radikali izazivaju promene na unutrašnjoj membrani i promenu potencijala mitohondrijske membrane (Saelens i sar., 2004). Molekuli Bcl-2 familije su osnovni regulatori apoptoze (Llambi i sar., 2011). Pojedini članovi Bcl-2 familije deluju proapoptotski, dok je za druge pokazano da imaju antiapoptotski efekat. Prvi događaj kao posledica proapoptotskog delovanja proteina Bcl-2 familije je depolarizacija membrane mitohondrija (Engel i sar., 2009; Shamas-Din i sar., 2011), koja dovodi do povećanja njene propustljivosti i oslobađanja citohroma C koji sa molekulom Apaf-1

(*engl.* Apoptotic protease activating factor 1) inicira sukcesivnu aktivaciju kaspaza. Kaspaza 9 je prva aktivirana, ova inicijatorska kaspaza aktivira efektorske kaspaze 3, 6 i 7, enzime koji svojom proteolitičkom aktivnošću razgrađuju ćelijski sadržaj i indukuju fragmentaciju DNK. Tumor-supresorski protein p53 favorizuje apoptozu aktiviranjem molekula koji su pozitivni regulatori apoptoze (Benchimol i sar., 2001). Morfološke promene koje prate proces apoptoze su: kondenzacija hromatina, smanjenje zapremine ćelije (piknoza) i formiranje apoptotskih tela. Procesom fagocitoze apoptotične ćelije mozga bivaju fagocitovane od strane ćelija glije (Bogner i sar., 2010). Pokazano je da aspirin i indometacin mogu da indukuju apoptozu u kulturi ćelija glioma (Amin i sar., 2003).

Autofagija je proces kojim ćelija razgrađuje organele i nefunkcionalne proteine citoplazme u autofagolizozomima. Autofagolizozom nastaje spajanjem lizozoma i autofagozoma, vezikula sa dvoslojnom membranom u kojima se nalazi deo sadržaja citoplazme koji će biti razgrađen. Makromolekulski sadržaj autofagolizozoma se razgrađuje pomoću kiselih proteaza (Mizushima i sar., 2011). Neadekvatno ili prekomerno aktivirana autofagija može biti mehanizam ćelijske smrti. Sa druge strane, autofagija dovodi do recikliranja ćelijskog sadržaja i čuvanja energije, što omogućuje ćeliji da preživi pod nepovoljnim okolnostima kao što su hipoksija, gladovanje, zračenje, infekcija i dejstvo toksičnih supstanci (He i sar., 2009). Ovaj ćelijski proces je kontrolisan produktima ATG gena (*engl.* autophagy related genes) i odvija se u sledećim fazama: inicijacija, nastajanje autofagozoma (nukleacija i elongacija), formiranje ili maturacija autofagozoma, spajanje autofagozoma i lizozoma i proteoliza sadržaja (Kung i sar., 2011). AMPK aktivira autofagiju direktno (Egan i sar., 2011) i indirektno aktivirajući ULK1, homolog ATG1 proteina kod sisara. ULK1 serin/treonin kinaza je prvi molekul koji se aktivira u procesu inicijacije formiranja autofagozoma. AMPK indirektno aktivira ULK1 inhibicijom mTORC1, glavnog negativnog regulatora autofagije (Yang i sar., 2010) koji fosforiliše i inhibira ULK1 (Ser757) (Kim i sar., 2011). Takođe, nezavisno od procesa formiranja autofagozoma, mTORC1 inhibira autofagiju inhibicijom translokacije transkripcionog faktora EB (TFEB) u nukleus, što za posledicu ima modulaciju transkripcije i blokiranje sinteze lizozoma (Martina i sar., 2012). Osim ATG1, niz drugih ATG proteina (produkata ATG gena) reguliše proces

autofagije. Neki od ovih proteina koriste se i kao markeri autofagije, prevashodno ATG6/beklin-1 i ATG8/LC3 (LC3 - *engl.* light chain of the microtubule associated protein 3). Beklin-1 interaguje sa nekoliko kofaktora formirajući kompleks Beklin1-Vps34-Vps15 u inicijalnoj fazi formiranja autofagozoma (Xie i sar., 2008). Citosolna forma LC3 (LC3-I) se vezuje za fosfatidiletanolamin i formira LC3-fosfatidiletanolamin konjugat (LC3-II) koji je deo membrane autofagozoma i razgrađuje se u autofagolizozomu dejstvom proteaza. Detekcija LC3-I-LC3-II konverzije imunoblotom je najčešći metod za praćenje autofagije (Tanida i sar., 2008).

Indometacin zaustavlja proliferaciju ćelija glioma i indukuje njihovu apoptozu (Amin i sar., 2003). U ćelijama kolorektalnog karcinoma pokazano je da nimesulide i indometacin inhibiraju proliferaciju inhibicijom mTOR (Zhang i sar., 2011). Mada je za neke NSAIL pokazano da aktiviraju AMPK (Chi i sar., 2011; Din i sar., 2012; Hawley i sar., 2012; King i sar., 2015; Si i sar., 2013), uticaj lekova iz ove grupe (indometacin, diklofenak, naproksen, ketoprofen) na aktivnost AMPK u ćelijama glioma nije ispitivan do sada. Imajući u vidu ulogu AMPK u inhibiciji mTOR i indukciji apoptoze, pretpostavili smo da bi NSAIL svoje antigliomsko delovanje mogli ostvariti modulacijom AMPK/mTORC1 signalnog puta. Da bismo ispitali ovu pretpostavku, analizirali smo uticaj NSAIL na AMPK i mTORC1, kao i ulogu AMPK/mTORC1 signalnog puta u citotoksičnim efektima NSAIL na ćelije glioma *in vitro*.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su sledeći:

1. Ispitati uticaj NSAIL na vijabilitet ćelija humane ćelijske linije glioma U251 i primarnih tumorskih ćelija izolovanih iz uzoraka tkiva pacijenata obolelih od glioblastoma.
2. Ispitati tip i mehanizme ćelijske smrti indukovane NSAIL u ćelijama glioma.
3. Ispitati uticaj NSAIL na aktivaciju AMPK/mTOR signalnog puta u ćelijama glioma.
4. Ispitati ulogu AMPK/mTOR signalnog puta u antitumorskom dejstvu NSAIL na ćelije glioma



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Rastvori i reagensi

Za eksperimentalni rad u ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su navedeni reagensi: medijum za kultivaciju ćelijskih kultura – Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640), L-glutamin, natrijum piruvat (GIBCO), hidroksietil piperazin methan sulfanilna kiselina (HEPES), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich), PBS (engl. phosphate buffered saline) (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4), kristal violet, tripsin (Invitrogen), MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, Thermo Fisher Scientific), metanol,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , p-nitrofenil fosfat, Tris hidrohlorid, triton X-100, Coomassie Brilliant Blue G-250, 2,5-difeniloksazol (PPO), Tween 20, mlečna kiselina, rastvor antibiotika i antimikotika (PAA), jodonitrotetrazolijum hlorid, N-metilfenazonijum metil-sulfat (PMS) (sve Sigma Aldrich),  $\beta$ -nikotinamid dinukleotid, natrijum acetat, indometacin (Sigma-Aldrich), leucin,  $\text{Ca}^{2+}$  helator BAPTA-AM, bafilomicin A1, hlorokin i amonijum hlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), diklofenak, naproksen, ketoprofen (sve od Sigma-Aldrich), metformin (Hemofarm), aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR) (Tocris Bioscience), aneksin V konjugovan za FITC, propidijum jodid (PI), ApoStat (BD Pharmingen), FITC-konjugovani inhibitor kaspaze 9 (LEHDFMK) (BioVison), 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFDA) (Invitrogen), askorbinska kiselina, ACK pufer (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7,4), albumin seruma govečeta (BSA, *engl.* bovine serum albumin) glutaraldehid, Kolumbija agar (bioMérieux), paraformaldehid, N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED) (Serva), akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), natrijum fluorid, fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), koktel inhibitora proteaza, natrijum dodecil sulfat (SDS, *engl.* sodium dodecyl sulfate,), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, natrijum ortovanadat, glicin (sve od Sigma-Aldrich), Folin-Ciocalteu fenol reagens, 1,4-bis-(5-feniloksazol-2-il)-benzen (POPOP) (Backman Instruments), mleko u prahu (Carl Roth), zečja antitela protiv LC3 (Cell Signaling Technology),  $\beta$ -aktina (Abcam), AMPK $\alpha$ , fosfo-AMPK $\alpha$  (Thr172), Raptor, fosfo-

Raptor (Ser792), ACC, fosfo-ACC (Ser79), mTOR, fosfo-mTOR (Ser2448), S6K, fosfo-S6K (Thr389), Akt, fosfo-Akt (Ser473), PRAS40, fosfo-PRAS40 (Ser183, Thr246), kaspaze-3, PARP (*engl.* poly(ADP-ribose) polymerase 1) (sva navedena antitela od Cell Signaling Technology), kozji anti-zečji IgG konjugovan sa peroksidazom rena (SouthernBioteck) i prajmeri TaqMan za humani p21 (CDKN1A; Hs00355782) i 18s rRNA (RN18S; Hs03928985) (Thermo Fisher Scientific), mala interferirajuća ribonukleinska kiselina (Santa Cruz), Lipofektamin 2000, RNA Isolator (Invitrogen). Vreme inkubacije i koncentracije supstanci navedeni su na slikama ili u legendama slika.

### 3.2. Čelije i ćelijske kulture

#### 3.2.1. *U251 ćelijska linija humanog glioma*

Dejstvo NSAIL je ispitivano na ćelijama U251 humanog glioma. Čelijska linija U251 pribavljena je od Evropske zbirke autentičnih ćelijskih kultura (European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC 09063001). Za gajenje ćelija korišćen je inkubator u kojem je vlažna atmosfera sa 5% CO<sub>2</sub> a temperatura se održava na 37°C. Za gajenje ćelija korišćen je 20 mM HEPES, puferizovani medijum RPMI 1640 sa dodatkom rastvora antibiotik/antimikotik (1%) (PAA), FCS (5%) i 2 mM L-glutamin. Nakon odmrzavanja ćelije su prebačene iz kontejnera sa tečnim azotom u flaskove od plastike za ćelijske kulture površine 25 cm<sup>2</sup>. Nakon dostizanja konfluentnosti adherentne ćelije su odvojene od podloge uz pomoć rastvora tripsina, istaložene centrifugiranjem i potom resuspendovane u rastvoru PBS i FCS. Da bi se ispitao vijabilitet ćelije su zasejavane u ploče od polistirena koje imaju 96 bunara (2×10<sup>4</sup> ćelija po bunaru), dok su za ispitivanje protočnom citofluorimetrijom ćelije zasejavne u ploče koje imaju 24 bunara (1×10<sup>5</sup> ćelija po bunaru). Za RNK interferenciju korišćene su polistirenske ploče sačinjene od 6 bunara (2×10<sup>5</sup> ćelija po bunaru) dok su za immunoblot analizu korišćene ploče (Petrijeve posude) prečnika 9 cm (2×10<sup>6</sup> ćelija po ploči). Postupci i dinamika tretiranja ćelija opisani su u legendama slika.

### 3.2.2. *Primarna ćelijska kultura glioblastoma*

Primarna kultura ćelija glioblastoma je izolovana iz tumorskog tkiva uzetog od operisanih pacijenata sa dijagnozom IV gradusa glioma – glioblastoma prema kriterijumima SZO (Klinika za neurohirurgiju, Odeljenje za neuroonkologiju, Klinički centar Srbije), uz informisani pristanak pacijenata u pisanoj formi i odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu. Uzeti uzorak tkiva je bio stavljen u rastvor PBS (+4° C, pH 7.25) sa 10% FCS, potom je sečen na delove prečnika 2-3 mm koji su nakon toga bili centrifugirani (1 min, 1000 g), potom je PBS bio odstranjen. Razdvajanje ćelija je bilo postignuto sa 0.05% tripsin-EDTA rastvorom (10 min na 37° C). Pre i odmah nakon enzimskog razdvajanja delovi tkiva su bili nežno propušteni kroz nastavak pipete od 1 ml tokom 1-2 minuta, kako bi se oslobodio što veći broj pojedinačnih ćelija iz tkiva. Dodavanjem medijuma za ćelijsku kultivaciju enzimsko delovanje je bilo prekinuto. Nakon taloženja delova tkiva uzeti supernatant je centrifugiran (5 min, 200 g). Pelet koji sadrži prvu frakciju pojedinačnih ćelija glioblastoma bio je resuspendovan u medijumu za ćelijsku kulturu. Druga frakcija pojedinačnih ćelija glioblastoma je bila dobijena enzimskom razgradnjom preostalih delova tkiva na isti način kao i u prethodnom postupku. Ćelije izdvojene iz obe frakcije su bile zasejane u Petri posude čije dno je bilo obloženo poli-L-lizinom i održavane u medijumu za kultivaciju na 37° C uz optimizovanu vlažnost i 5% CO<sub>2</sub>. Ćelije su bile gajene u medijumu do dostizanja konfluentnosti od 80%. Pre eksperimentalne procedure ćelije su pasažirane 2-3 puta.

### 3.3. **Testovi vijabiliteta**

Efekti NSAIL na vijabilitet ćelija mereni su metodom kolorimetrije zasnovanom na detekciji aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza, laktat dehidrogenaze, kao i merenjem broja ćelija koje su vezane za podlogu testom kristal violet.

#### 3.3.1. *Test aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza*

MTT testom se meri stepen redukcije 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida dehidrogenazama koje se nalaze u ćelijskom zidu

mitohondrija. Cepanjem tetrazolijumskog prstena delovanjem dehidrogenaza dolazi do nastanka formazana, koji poseduje karakterističnu boju. U vitalnim mitohondrijama nalaze se oksidoreduktaze koje vrše dehidrogenaciju MTT što ovom testu koji je zasnovan na principu kolorimetrije omogućuje da se koristi za određivanje stepena proliferacije i ćelijskog vijabiliteta. Posle predviđene inkubacije tretiranih ćelija i kontrolne grupe medijum je bio odstranjen a na ćelije je dodat MTT rastvor do koncentracije od 0,5 mg/ml u medijumu. Inkubacija rastvorom sa MTT trajala je sat vremena na temperaturi 37°C, supernatanti su odvojeni a DMSO je korišćen za razgradnju ćelijske membrane i rastvaranje formazana nastalog u reakciji dehidrogenaza sa MTT. Intenzitet ljubičasto-crvene boje određivan je merenjem apsorbancije pomoću spektrofotmetra (570 nm; Sunrise; Tecan). Vrednosti za tretirane i kontrolne (netretirane) ćelije umanjene su za vrednosti apsorbancija samog rastvora MTT. Izmereni kolorimetrijski parametri srazmerno jačini boje mera su broja živih ćelija. Rezultati MTT testa su prikazani kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolne ćelijske kulture čija je vijabilnost arbitrarno predstavljena kao 100%.

### 3.3.2. *Kristal violet test*

Testom kristal violet (CV) moguće je odrediti relativni broj ćelija određene ćelijske kulture koje su vezane za dno bunarića polistirenske ploče (Flick i sar., 1984). Ćelije koje su se odvojile od podloge nakon tretiranja bile su uklonjene ispiranjem sa rastvorom PBS dok su ćelije koje su ostale vezane za podlogu fiksirane pomoću metilalkohola desetominutnom inkubacijom na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije su potom bile bojene 1% rastvorom boje kristal violet tokom 15-20 minuta na temperaturi 20 C<sup>0</sup>. Višak boje koji se nije vezao za ćelije vezane za podlogu ispiran je vodom. Boja koja se vezala za fiksirane ćelije rastvorena je sirćetnom kiselinom (33% rastvor) a intenzitet boje rastvora meren je spektrofotometrijski (570 nm; Sunrise; Tecan). Broj vijabilnih ćelija koje su ostale vezane za podlogu proporcionalan je izmerenim apsorbancijama. Izmerene vrednosti apsorbancija u bunarićima sa ćelijama umanjene su za vrednost apsorbancije iz bunara u kojem je rastvor boje bio bez ćelija. Vrednosti kristal violet testa izražene su kao procenat živih ćelija u odnosu na netretirane ćelije gde je za vijabilitet arbitrarno uzeta vrednost 100%.

### 3.3.3. *Test oslobađanja laktat dehidrogenaze*

Ćelijska smrt je analizirana testom koji određuje nivo enzima laktat dehidrogenaze (LDH) oslobađenog u medijum nakon narušavanja integriteta membrane tretiranih ćelija. Broj ćelija sa narušenim integritetom membrane srazmeran je aktivnosti LDH u medijumu za kultivaciju ćelija. U testu se koriste dve kontrole, prva ili negativna kontrola su netretirane ćelije (citotoksičnost 0%), druga ili pozitivna kontrola su ćelije koje su tretirane deterdžentom triton X-100 (mrtve ćelije, citotoksičnost 100%). Supstrat za LDH sadrži: N-metilfenazonijum metilsulfat 0,28 mM, jodonitrotetrazolijum hlorid 0,66 mM, mlečnu kiselinu 54 mM, β-nikotinamid adenin dinukleotid 1,3 mM u Tris puferu 0,2 M. Test se zasniva na principu oksido-redukcije. Naime, LDH je katalizator oksidacije laktata do piruvata pri čemu dolazi do oslobađanja H<sup>+</sup>. Crvena boja formazana nastaje nakon redukcije jodonitrotetrazolijuma uz pomoć N-metilfenazonijum metilsulfata koji prenosi nastali H<sup>+</sup>. Supernatant iz svakog bunara se prenosi u novu ploču i meša sa istom zapreminom supstrata za LDH. Nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbancija je automatski očitana na 570 nm (Sunrise, Tecan). Rezultati su predstavljeni u procentima citotoksičnosti, za izračunavanje se koristi sledeća formula:

$$\%D = [(A-B)/(C-B)] \times 100, \text{ gde je:}$$

A - apsorbancia tretiranih ćelija

B - apsorbancia kontrolnih (netretiranih) ćelija

C - apsorbancia mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa triton X-100

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

### 3.4. **Protočna citofluorimetrija**

Protočnom citofluorimetrijom analiziran je ćelijski ciklus, produkcija kiseoničnih radikala, apoptoza i autofagija. Za analizu dobijenih kvantitativnih i kvalitativnih podataka na ćelijama linije U251 korišćen je softver BD Cell Quest Pro na aparatu

FACSCalibur (BD Biosciences). Ova tehnologija omogućuje analizu nekoliko hiljada događaja, tj. ćelija po uzorku u realnom vremenu.

#### 3.4.1. *Određivanje apoptoze*

Za analizu nekrotičnih i apoptotičnih ćelija na protočnom citofluorimetru nakon tretiranja ćelije su istovremeno bile bojene sa dve fluorescentne boje propidijum jodidom (PI) i aneksinom V vezanim za fluorescein (aneksin V-FITC). Proteinski molekul Aneksin obeležen fluorescentnom bojom (FITC) biva pobuđen delovanjem spektra svetlosti argonskog lasera i emituje zelenu boju - FL1 detektor. Na površini ćelijske membrane kod ćelija koje su u ranoj fazi apoptoze Aneksin V-FITC se povezuje sa fosfatidilserinom, molekulom koji se u ovoj fazi apoptoze nalazi na spoljašnjoj strani ćelijske membrane. Princip vezivanja i detektovanja PI zasniva se na vezivanju boje za DNK molekul ćelija čija je membrana oštećena. Nakon pobuđivanja svetlošću argonskog lasera PI emituje crvenu fluorescencu – FL2 detektor. PI se vezuje za molekul DNK kada se ćelija nalazi u kasnoj fazi apoptoze ili nekrozi. Kada se ćelije oboje sa obe boje istovremeno mogu se razlikovati grupe ćelija u kvadrantima raspodele: žive ćelije (nema niti vazivanja aneksina niti PI), rana apoptoza (vezivanje aneksina, nema vezivanja PI) i kasna apoptoza i nekroza ćelija (vezivanje i aneksina i PI). Ćelije su bojene po protokolu navedenom u deklaraciji proizvođača. Nakon tripsinizacije i odvajanja od podloge ćelije su bile prenešene iz bunara u epruvete za FACS analizu. Ćelije su centrifugirane centrifugalnom silom 500 g tokom 5 min. na 22°C i isprane rastvorom PBS-a. Talog sa ćelijama je resuspendovan sa 150 µl deset puta razblaženim aneksin-vezujućim puferom u koji je dodat PI do koncentracije 20 µg/ml i aneksin V-FITC do koncentracije 2 µg/ml. Nakon pola sata na temperaturi 37°C bez svetlosti inkubirane ćelije su resuspendovane i dodat je pufer (400 µl). Nakon softverske analize dobijeni podaci su izraženi kao procenat subpopulacija ćelija (aneksin<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>, aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> i aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) u odnosu na celokupnu grupu analiziranih ćelija.

#### 3.4.2. *Analiza ćelijskog ciklusa*

Količina DNK u različitim fazama ćelijskog ciklusa je ispitivana protočnom citofluorimetrijom. Ćelije su bile fiksirane u etanolu i bojene PI na standardizovan način

(Raicevic i sar., 2005). Analizom na protočnom citofluorimetru mogu se razlikovati faze ćelijskog ciklusa i uočiti zastoj u pojedinim kontrolnim tačkama. Apoptoza se može analizirati merenjem kvantitativnih (hipodiploidni sadržaj) i kvalitativnih promena (fragmentacija) DNK u ćelijskim populacijama. Mera vezanog PI za DNA odgovara sadržaju DNK u ćeliji. Molekul DNK biva razgrađen dejstvom enzima endonukleaza a nastali fragmenti se nagomilavaju. Ovi fragmenti se uklanjaju nakon fiksiranja etanolom i ispiranja. Ćelije u apoptozu sadrže manju količinu DNK i proporcionalno emituju manju količinu svetlosti fluorohroma od vijabilnih ćelija formirajući na histogramu sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hipodiploidnu zonu. Takođe, povećan procenat ćelija sa zastojem u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa može se meriti preko povećanja fluorescence. Enzim RNA-za se koristi za razgradnju RNK u cilju izbegavanja vezivanja PI za ovaj molekul. Nakon odvajanja od podloge, ispiranja i resuspendovanja ćelije su bile fiksirane uz pomoć etanola. Epruvete sa resuspendovanim sadržajem su ostavljene na +4°C preko noći. Ćelije su nakon toga bile istaložene centrifugalnom silom od 800 g tokom deset minuta na temperaturi 22°C, oprane u FCS, a u suspenziju ćelija nastalu dodavanjem 500 µl PBS bilo je dodato 1 µg/ml RNA-ze. Suspenzija sa RNK-om je inkubirana 15 minuta na 37°C, potom je u epruvete bio dodat PI u koncentraciji 20 µg/ml. Nakon tridesetominutne inkubacije na 37°C bez svetlosti uzorci su analizirani. Softverska analiza koju koristi aparat za protočnu citometriju prikazuje rezultate kao procentni udeo ćelija u određenoj fazi ciklusa u odnosu na celokupan broj ćelija.

### 3.4.3. *Analiza aktivacije kaspaza*

Za analizu aktivacije kaspaza ćelije su prvo obeležene ćelijski permeabilnim inhibitorom pan-kaspaza ApoStat ili inhibitorom kaspaze-9 koji su konjugovani sa FITC prema protokolu kompanije koja proizvodi reagense. Za aktivirane kaspaze u ćeliji selektivno se vezuje ApoStat, mera vezivanja odnosno emitovanja fluorescentne boje odgovara aktivnosti kaspaza. Ćelije su odvojene od podloge delovanjem tripsina, istaložene silom centrifuge od 500g tokom pet minuta na 22°C i oprane rastvorom PBS. Talog je resuspendovan sa medijumom u kojem je koncentracija ApoStat-a 0,5 µg/ml. Ćelije su inkubirane na 37°C tokom 30 min., potom oprane a suspenzija ćelija za analizu dobijena je dodavanjem 500 µl PBS-a. Softverski obradjeni podaci su prikazani kao histogrami raspodele zelene fluorescence. Mera aktivacije kaspaza prikazana je

procentualno i srazmerna je intenzitetu vezane fluorescentne boje. Promena intenziteta fluorescence tretiranih ćelija u poređenju sa netretiranom (kontrolnom) grupom ćelija je relativna mera aktivacije kaspaza. Nivo aktivirane kaspaze-3 je meren imunoblotom.

#### 3.4.4. *Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta*

Za analizu produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV), ćelije su bojene neselektivnom redoks senzitivnom bojom dihlorofluorescin diacetat (DCFDA). Ovaj molekul prolazi kroz ćelijsku membranu i u citoplazmi biva deacetilovan delovanjem esteraza u dihlorodihidro-fluorescin (H<sub>2</sub>DCF). Oksidacijom H<sub>2</sub>DCF u kontaktu sa RKV produkuje se 2',7'dihlorofluorescin (DCF) koji fluorescira zelenom bojom. Prema instrukciji proizvođača DCFDA je u kulturu U251 dodavan istovremeno sa tretmanom do finalne koncentracije 2 μM, nakon čega su ćelije odvojene od podloge, prebačene u epruvete i istaložene dejstvom centrifugalne sile 500 g tokom pet minuta na 21°C, a zatim oprane u rastvoru PBS-a. Neposredno pred analizu suspenzija ćelija je uspostavljena mešanjem sa 500 μl PBS-a. Nakon analize na protočnom citofluorimetru softver omogućuje prikaz rezultata u formi histograma raspodele fluorescence (FL1). Promena intenziteta fluorescence u odnosu na kontrolnu grupu ćelija je mera povećanja produkcije RKS.

#### 3.4.5. *Analiza membranskog potencijala mitohondrija*

Katijonska boja DePsipher prolazi kroz ćelijsku i mitohondrijalnu membranu zbog lipofilnog karaktera molekula i koristi se za ispitivanje membranskog potencijala mitohondrija. Kada je membrana mitohondrija hiperpolarisana, boja formira agregate koji fluoresciraju crveno (FL2). Aktivacijom unutrašnjeg puta apoptoze dolazi do gubitka mitohondrijskog membranskog potencijala pri čemu DePsipher ne prolazi u međumembranski prostor, ne menjajući monomernu formu molekula koja emituje zelenu boju (FL1). Promena odnosa zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2) tretiranih i kontrone grupe (netretiranih) ćelija je mera promene membranskog potencijala između ćelijskih populacija. Odnos FL1/FL2 kontrolne grupe je uzet za jediničnu vrednost. Kada je unutrašnja membrana mitohondrija depolarisana vrednost FL1/FL2 odnosa raste, nasuprot tome kada je membrana hiperpolarisana vrednost FL1/FL2 odnosa se smanjuje. Tretirane ćelije su tripsinizovane, istaložene centrifugiranjem na 500 g,



oprane a nakon toga je talog resuspendovan u rastvoru DePsipher boje u koncentraciji 5  $\mu\text{g/ml}$ . Nakon bojenja prema uputstvu proizvođača uzorci su inkubirani pola sata na temperaturi od  $37^\circ\text{C}$  bez svetlosti, isprani rastvorom PBS i konačno resuspendovani sa 500  $\mu\text{l}$  PBS. Detekcija obe fluorecente boje na protočnom citofluorimetru analizirana je i prikazana korišćenjem CellQuest Pro softvera.

#### 3.4.6. *Merenje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom*

Autofagija je ispitivana protočnom citofluorimetrijom pomoću pH-senzitivne boje akridin oranž koja je lipofilni molekul. Nakon prolaska kroz ćelijsku membranu boja se vezuje za organele sa kiselim sadržajem. U kontaktu sa sadržajem autofagolizozoma niske pH vrednosti akridin oranž menja fluorescencu iz narandžasto-crvene (FL3) kada je u neutralnoj pH sredini citoplazme u zelenu fluorescencu (FL1). Intenzitet detektovane fluorescentne boje srazmeran je broju i veličini kiselih vezikula u citoplazmi. Mera sadržaja kiselih vezikula je određena odnosom emitovane narandžasto-crvene (FL3) i zelene (FL1) fluorescence. Aktivnost autofagije je proporcionalna promeni FL3/FL1 odnosa između tretiranih ćelija i kontrolne grupe ćelija gde je ovaj odnos arbitrarno uzet za jediničnu vrednost. Nakon inkubacije tretirane ćelije su odvojene od podloge, istaložene centrifugiranjem i isprane u PBS-u. Prema uputstvu proizvođača ćelije su resuspendovane rastvorom sa bojom akridin oranž u finalnoj koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ . Nakon pola sata inkubacije na  $37^\circ\text{C}$  ćelije su ponovo oprane a suspenzija ćelija nakon dodavanja 500  $\mu\text{l}$  PBS je korišćena za analizu na protočnom citofluorimetru.

### 3.5. **Fazno kontrastna mikroskopija**

Za analizu morfoloških promena na ćelijama linije U251 humanog glioma, korišćen je faznokontrastni mikroskop (Leica DMIL) sa Leica DFC320 kamerom.

### 3.6. Imunoblot analiza

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom korišćena je imunoblot analiza u cilju određivanja ekspresije i aktivnosti proteina. Ukupna koncentracija proteina nakon liziranja ćelija određivana je metodom po Bradfordu (Bradford i sar., 1976). Po završetku inkubacije ćelije su lizirane puferom koji sadrži inhibitore proteolitičkih enzima i fosfataza (150 mM NaCl, 1 mM PMSF, koktel proteaznih inhibitora koncentracije 20 µl/ml, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40, 50 mM NaF, 30 mM Tris, pH 8,0). Liziranje a nakon toga i inkubacija tokom 15 min vrši se na ledu a proces se nastavlja taloženjm proteina nakon dejstva centrifugalne sile 14000 G na 4°C, tokom 15 minuta. Izdvojeni supernatanti čuvaju se u zamrzivaču na -20°C. Pre elektroforeze uzorci se termički obrade na tački ključanja tokom 3-5 minuta. U uzorke se dodaje pufer koji sadrži sledeće koncentracije sastojaka: 10% glicerol, 2% SDS, 0,002% bromfenol plavo, 2,5 mM merkaptoetanol, 62,5 mM Tris, pH rastvora 6,8. Na ovaj način postignuta je denaturicija i oblaganje proteina negativno naelektrisanim SDS molekulima. Merkaptoetanol koji sadrži pufer onemogućuje ponovni nastanak disulfidnih veza nakon prethodne pripreme proteina. Negativno naelektrisanje nakon dodatog SDS omogućuje da proteini budu razdvojeni elektroforezom na osnovu mase molekula. Na deo gela koji omogućuje sabijanje proteina nanešene su jednake količine ispitivanog proteina. Iz 4% akrilamidnog gela za sabijanje, proteini tokom elektroforeze migriraju u 10% ili 12% akrilamidni gel (SDS-PAGE) koji razdvaja proteine. Katalizatori za proces polimerizacije su 0,033% TEMED i 0,05% amonijumsulfat. Elektroforeza se odvija u puferu koji sadrži: 0,1% SDS, 190 mM glicina i 25 mM Tris, pH pufera je 8,3. Elektroforeza proteina traje oko 90 minuta pri konstantnom naponu. Paralelno sa uzorcima teče i elektroforeza nekoliko komercijalno obeleženih proteina različite mase molekula (Dual Color Standards; BioRad) koji omogućuju praćenje elektroforeze i lokalizaciju traženog molekula na membrani prema poznatoj masi. Kada se proces razdvajanja proteina okonča gelovi sa proteinima se prebacuju u sistem za transfer proteina na nitoceluloznu membranu (Hybond Nitrocellulose membranes; GE Healthcare Amersham™ Protran™), koristeći sistem za polusuvi tranfer (TE 70, Amersham Biosciences). Nakon dva minuta inkubacije u transfer puferu membrane se premeštaju u transfer sistem na filter papir. Transfer pufer sadrži 20% metil-alkohol,

190 mM glicin i 25 mM Tris a finalna vrednost pH pufera je 8,3. Nitrocelulozna membrana na koju će proteini biti tranferovani je orijentisana ka pozitivnoj a gel sa proteinima ka negativnoj elektrodi. Delovanjem konstantne jačine struje ( $0,8 \text{ mA/cm}^2$ ) proteini koji su negativno naelektisani kreću se ka pozitivnoj elektrodi. Nakon transfera koji prosečno traje 90 minuta membrane se seku a trake sa proteinima čija se aktivnost ili ekspresija meri bivaju inkubirane sat vremena u 5% rastvoru mleka u Tris puferu sa 0,05% Tween deterdženta. Ovaj postupak omogućuje blokiranje i smanjuje verovatnoću da se antitelo na protein od interesa veže za druge proteine. Nitrocelulozne membrane su potom prebačene u kade za inkubaciju sa primarnim antitelom na sledeće molekule: AMPK $\alpha$ , fosfo-AMPK $\alpha$  (Thr172), ACC, fosfo-ACC (Ser79), Akt, fosfo-Akt (Ser473), Raptor, fosfo-Raptor (Ser792), mTOR, fosfo-mTOR (Ser2448), S6K, fosfo-S6K (Thr389), PRAS40, fosfo-PRAS40 (Ser183 i Thr246), kaspazu-3, PARP, aktin, beclin i LC3. Inkubacija je trajala tokom noći na temperaturi od 4°C. Membrane su ispirane u Tween detedžentu potom inkubirane sa sekundarnim antitelom 75 min na sobnoj temperaturi. Da bi se proteinski signal sa membrane vizuelizovao membrane su prelivene hemiluminiscentnim reagensom. Sekundarno antitelo sadrži enzim peroksidazu koja vodonikperoksid koji se nalazi u supstratu oksiduje do kiseonika i vode. Supstrat sadrži luminol koji sa kiseonikom reaguje do nastanka jedinjenja koje oslobađa foton. Foton se detektuje na filmu a intenzitet izmerene svetlosti je mera količine eksprimiranog ili aktiviranog proteina. Densitometrijski uz pomoć ImageJ softvera kvantifikovana je gustina imunoreaktivnih traka proteina u odnosu na totalnu formu odgovarajućeg proteina ili aktin. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (proteini iz netretiranih ćelija) kojoj je arbitrarno deodeljena jedinična vrednost.

### 3.7. RNK interferencija

Inhibicija ekspresije AMPK za obe forme ( $\alpha 1/\alpha 2$ ) u ćelijama linije U251 postignuta je metodom transfekcije sa malom interferirajućom ribonukleinskom kiselinom (siRNA; *engl.* small interfering ribonucleic acid). Za ćelijske kulture korišćen je serum za kultivaciju bez antibiotika (RPMI, 5% FCS). Konfluentnost ćelija nakon 24h je bila 60% a nakon dostizanja konfluentnosti ćelije su transfektovane sa siRNA

molekulima koji onemogućuju ekspresiju AMPK (AMPK siRNA) i kontrolnom siRNA. Komercijalni medijum Opti-MEM je korišćen za rastvaranje oligomera siRNA kao i za rastvaranje Lipofektamina 2000. Za nastanak oligomer-lipofektamin kompleksa bilo je potrebno pomešati jednake zapremine rastvora lipofektamina i siRNA, inkubacija je trajala 20 minuta. Prema uputstvu proizvođača zamenjen je medijum (RPMI, 5% FCS, bez antibiotika) u koji je dodat kompleks koji sadrži komercijalni Lipofektamin 2000 i siRNA, sa finalnom koncentracijom siRNA 100 nM i razblaženjem lipofektamina 600 puta. Nakon 8 sati inkubacije medijum za transfekciju zamenjen je uobičajenim medijumom za kultivaciju ćelija (RPMI sa 5% FCS i antibioticima). Nakon 24 sata transfektovane ćelije su kultivisane u polistirenske ploče i Petri posude a nakon 24h bile su tretirane.

### **3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za inhibitor ciklin zavisne kinaze p21**

#### *3.8.1. RNK izolacija*

Za izolovanje RNK iz U251 ćelija korišćen je komercijalni RNA Isolator (Invitrogen, Paisley). Supernatant je odvojen iz kulture, a na ćelije je dodat komercijalni reagens za izolaciju. Lizirani sadržaj je stavljen u epruvete i inkubiran na sobnoj temperaturi, nakon pet minuta u svaku epruvetu dodat je hloroform (50  $\mu$ L). Sadržaj lizata sa hloroformom je inkubiran 15 minuta na ledu a potom istaložen centrifugalnom silom 12000 g na temperaturi +4°C tokom 15 minuta. Faza koja se izdvojila u gornjem sloju sadržala je RNK, donja faza u kojoj je hloroform sadržala je proteine i lipide a faza u sredini sadržala je DNK. Gornja ili vodena faza je odvajana a zatim joj je dodavana ista količina izopropanola. Sadržaj je mešan, inkubiran pola sata na sobnoj temperaturi i istaložen silom centrifuge 12000g na +4°C tokom petnaest minuta. Nakon aspiracije supernatanta pipetom preostali talog u kojem je RNK je opran u etil-alkoholu (70%). Etil-alkohol je aspiriran vrhom pipete a talog ostavljen nekoliko minuta na sobnoj temperaturi dok preostali alkohol ne ispari. U talog RNK nakon isparavanja etil-alkohola dodato je 20  $\mu$ l destilovane vode.

### 3.8.2. *Reverzna transkripcija*

Koncentracija RNK je merena na Gene Quant kolorimetru. Nakon merenja koncentracije RNA uzeta je količina u kojoj je 1 µg RNK i rastvorena sa 15 µl vode, dodati su komercijalni prajmeri i deoksinukleotitidi (dNTPs; *engl.* deoxynucleotide triphosphates) u koncentraciji 1mM. Kontaminacija tokom eksperimentalnog rada je kontrolisana korišćenjem vode umesto uzorka sa RNK. Tokom deset minuta inkubacije rastvora na + 70°C heksamer prajmeri su se nasumice vezivali za RNK, uzorci su nakon inkubacije prebačeni na led. Posle pet minuta na ledu dodata su 4 µl pufera za reakciju reverzne transkripcije i 1 µl (200 U/µl) M-MuLV enzima reverzne transkriptaze. Reakcija reverzne transkripcije se desila tokom inkubacije uzoraka prvo deset minuta na + 25°C potom sat vremena na temperaturi + 40°C. Nakon deset minuta inkubacije na 70°C reakcija je prekinuta a sintetisana komplementarna DNK (cDNK) je do korišćenja za reakciju lančanog umnožavanja (PCR; *engl.* polymerase chain reaction) ostavljena na temperaturi + 4°C.

### 3.8.3. *Kvantitativni PCR*

Za kvantitativni PCR posle reverzne transkripcije (RT-PCR; *engl.* reverse transcription polymerase chain reaction) korišćen je aparat Realplex2 Mastercycler, Eppendorf. Analiza je urađena po Qiagen-ovom protokolu za SYBR Green RT-PCR, u ploči sa 96 bunara sa komercijalnim PCR Master Mix-om i TaqMan prajmerima za humani p21 gen (CDKN1A; Hs00355782) i 18s rRNK konstitutivni gen (RN18S; Hs03928985) koji se kontinuirano ekspirira. Vremenski intervali, temperature i broj ciklusa su sledeći: 2 minuta/50°C - jedan ciklus; 10 minuta/95°C - jedan ciklus; faza topljenja 15s/95 °C se smenjuje sa fazom vezivanja prajmerea i sinteze DNK 1 minut/60°C – četrdeset ciklusa; 1 minut/60°C - poslednji ciklus. Za dalju analizu podataka uzet je prag ciklusa (Ct) 0.1 jedinica (relativna vrednost). Oduzimanjem aritmetičke srednje Ct vrednosti triplikata konstitutivnog gena RN18S od aritmetičke srednje Ct vrednosti triplikata p21 gena izračunata je  $\Delta Ct$ , a relativna mera ekspresije izražena je eksponencijalnom funkcijom  $2^{-\Delta Ct}$ . Za kontrolu je uzeta vrednost 1 a rezultati su izraženi kao relativna vrednost u odnosu na kontrolu.

### 3.9. HPLC analiza sadržaja AMP i ATP u ćeliji

Sadržaj AMP i ATP u ćelijama linije U251 je analiziran gradijentnom tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC, *engl.* high-performance liquid chromatography). Ova metoda omogućuje razdvajanje uzorka na komponente na osnovu razlike u njihovom polaritetu. Pod kontinuiranim pritiskom mobilne faze (tečni uzorak) kroz kolonu odnosno stacionarnu fazu dolazi do razdvajanja unešenog sadržaja uzorka na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija. Ako je stacionarna faza nepolarna, mobilna je polarna, i obrnuto. Brzina izlaska iz kolone (elucija) zavisi od afiniteta prema stacionarnoj fazi, što veći afinitet kasnija elucija. Vreme od unosa uzorka u kolonu do izlaska određenog molekula sa kolone je retenciono vreme. Za svaki molekul ili supstancu postoji određeno retenciono vreme koje zavisi od vrste kolone i sastava mobilne faze. Određivanje retencionog vremena služi kao princip za detektovanje i merenje količine određene supstance iz uzorka. Vrsta supstance može se odrediti poređenjem dobijenog retencionog vremena sa retencionim vremenom poznatih standarda kada se eksperimenti izvedu pod istim uslovima. Druga važna karakteristika HPLC metoda je merenje koncentracije/nivoa molekula ili supstance u ovom slučaju ATP i AMP. Površina ispod vrha na hromatogramu direktno je srazmerna količini analizirane supstance u uzorku.

Nakon tretmana, U251 su bile lizirane u 3% Triton X-100 i istaložene dejstvom centrifugalne sile 1400 g tokom 15 minuta na 4°C. Supernatanti su potom inkubirani sa 0.1 M hlorovodoničnom kiselinom u metanolu tokom 5 minuta na -20°C. Dodata je 0.3 M perhlorna kiselina i 1 mM EDTA a uzorci su centrifugirani silom od 12000 g tokom 5 minuta na 4°C. Supernatanti su neutralizovani sa rastvorom K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> koncentracije 1.5 M i centrifugirani na 12000 g tokom 5 minuta na temperaturi 4°C. Uzorci su podeljeni na jednake delove i zamrznuti na -80°C.

AMP i ATP koncentracije su bile merene na aparatu Agilent Technologies 1200 series HPLC system, koršćena je kolona Zorbax SB C18, 4.6 x 250 mm, veličina partikule 5 µm. Hromatografsko razdvajanje je omogućeno pomoću mobilne faze koja sadrži kombinaciju rastvora A (0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM [nBu<sub>4</sub>N]-[H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], pH 6.0) i rastvora B (metanol). Protok mobilne faze bio je 1.5 ml/min. Program je gradiran na

sledeći način: 0-6 min 75% A, 6-8 min 75% - 60% A, 8-13 min 60% A, 13-15 min 60% - 57% A, 15-18 min 57% - 55% A, i 55% A 18-20 min. Ekvilibrisanje kolone je vršeno pet minuta pre dodavanja uzorka. Dodavano je 50 ml uzorka a očekivana komponenta je praćena na 254 nm. Maksimalne vrednosti ATP i AMP na hromatogramu su ustanovljene na osnovu retencionih vremena i kvantifikovane pomoću poređenja sa standardima. Rezultati za dobijene koncentracije AMP i ATP su predstavljeni procentualno u odnosu na vrednosti netretirane kontrole. AMP/ATP odnos je bio izražen kao relativna vrednost u odnosu na vrednost dobijenu u kontroli za koju je arbitrarno uzeta vrednost 1.

### **3.10. Određivanje unutarćelijskog nivoa AMP i ATP bioluminiscentnim esejem**

Za određivanje količine unutarćelijskog AMP i ATP u U251 ćelijama korišćenjen je metod bioluminiscence. Eksperimentalna procedura je izvedena prema uputstvu proizvođača korišćenjem komercijalnog kita - ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Applied Science. Test je zasnovan na reakciji D-luciferina sa ATP-om oslobođenim iz ćelije nakon lize uz katalitičku aktivnost enzima luciferaze nakon lize ćelije. U ovoj reakciji pored produkata oksiluciferina, ugljen dioksida i AMP nastaje i zelena svetlost talasne dužine 562 nm, količina detektovne svetlosti je mera intraćelijskog nivoa ATP uzorka. Korišćen je čitač mikrotitarskih ploča (Chameleon microplate reader, Hidex). Koncentracija AMP i ATP u ćelijama izražena je procentualno u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnoj (netretiranoj) kulturi ćelija (100%).

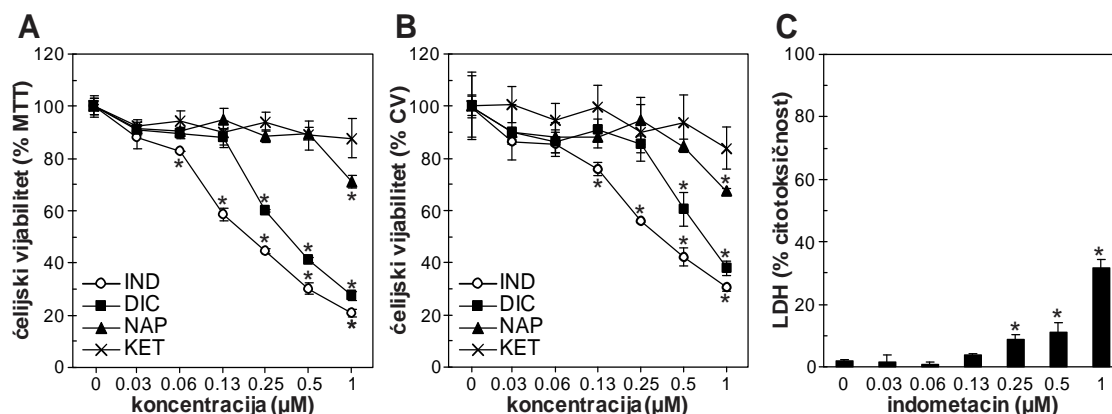
### **3.11. Statistička analiza**

Za statističku analizu značajnosti razlike između uzoraka korišćeni su t-test ili analiza varijanse (ANOVA) i Newman Keuls-ov test za višestruka upoređivanja. Vrednost p manja od 0,05 se smatrala statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Indometacin i diklofenak smanjuju vijabilitet U251 ćelija glioma na dozo zavisnan način

Istraživanje je otpočeto merenjem citotoksičnosti različitih NSAIL prema U251 ćelijskoj liniji humanog glioma. Kako bi se ispitali citotoksični efekti, U251 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama lekova (25 - 1000  $\mu\text{M}$ ), a za procenu vijabiliteta korišćeni su testovi MTT i CV. Pokazano je da je citotoksični efekat indometacina izraženiji u odnosu na preostala tri leka - diklofenak, ketoprofen i naproksen.  $\text{IC}_{50}$  vrednosti izračunate na osnovu rezultata MTT i CV testa su manje za indometacin (24 h  $\text{IC}_{50}$  =  $244 \pm 29$   $\mu\text{M}$  za MTT i  $229 \pm 22$   $\mu\text{M}$  za CV esej) nego diklofenak ( $\text{IC}_{50}$  =  $347.5 \pm 31$  i  $368.7 \pm 38$   $\mu\text{M}$ ), a za preostala dva leka, ketoprofen i naproksen,  $\text{IC}_{50}$  koncentracije su bile veće od 1 mM (Slika. 1A, B). Nivo oslobođene LDH iz ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane se nakon tretmana indometacinom takođe povećavao na dozo zavisnan način (Slika 1C). Približna  $\text{IC}_{50}$  koncentracija 250  $\mu\text{M}$  bila je u skladu sa dozama upotrebljavanim u drugim publikacijama (Bernardi i sar., 2006; Pekmez i sar., 2015) i bila je korišćena u narednim eksperimentima.

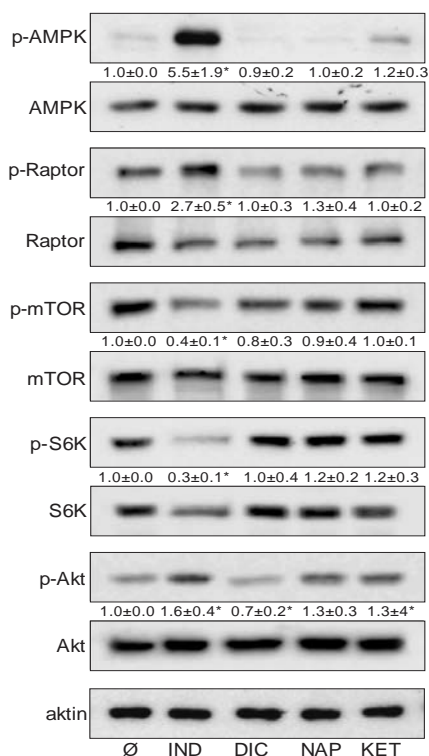


**Slika 1. Indometacin i diklofenak smanjuju vijabilitet U251 ćelija glioma u zavisnosti od doze leka.** (A, B) U251 ćelije su bile inkubirane 24 h sa različitim koncentracijama indometacina (IND), diklofenaka (DIC), naproksena (NAP) i ketoprofena (KET), a ćelijski vijabilitet je ispitivan MTT (A) ili CV (B) esejom. (C) U251 ćelije su bile tretirane 24 h sa različitim koncentracijama indometacina, nakon čega je citotoksičnost ispitivana testom oslobađanja LDH. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0,05 poređeno sa kontrolnim ćelijama).



## 4.2. Indometacin jedini od ispitivanih NSAIL aktivira AMPK

U narednom eksperimentu ispitivan je stepen aktivacije AMPK nakon tretmana ćelija glioma U251 sa NSAIL. Indirektno, ovim eksperimentom ispitivana je i povezanost inhibicije COX sa aktivacijom AMPK. Nasuprot indometacinu, ostali NSAIL koji su kao i indometacin COX inhibitori kao što su diklofenak, naproksen i ketoprofen nisu uticali na fosforilaciju AMPK, Raptor, mTOR ili S6K (Slika 2). Dakle, indometacin je jedini ispitivani NSAIL koji je aktivirao AMPK a aktivacija AMPK indometacinom nezavisna je od inhibicije COX. Kako je indometacin jedini NSAIL koji je aktivirao AMPK ovaj lek je korišćen u daljem istraživanju.

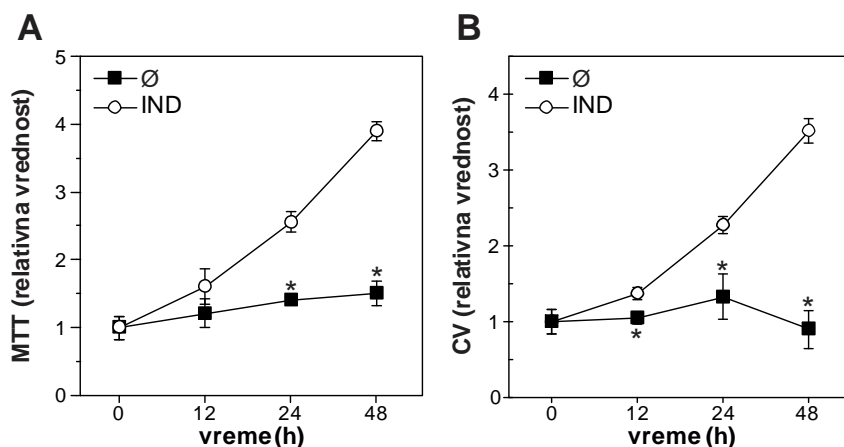


**Slika 2. Indometacin jedini od ispitivanih NSAIL aktivira AMPK/mTORC1 signalni put.**

U251 ćelije su bile tretirane indometacinom 2h (IND; 250  $\mu$ M), diklofenakom (DIC; 200  $\mu$ M), naproksenom (NAP; 500  $\mu$ M) i ketoprofenom (KET; 1000  $\mu$ M). Fosforilacija AMPK, Raptor, mTOR, S6K i Akt je analizirana imunoblotom (denzitometrijski rezultati su prikazani ispod reprezentativnih blotova). Prikazani su reprezentativni blotovi, a rezultati su izračunati kao srednja vrednost  $\pm$ SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa netretiranim ćelijama).

### 4.3. Indometacin smanjuje vijabilitet U251 ćelija glioma na vremenski zavisan način

U cilju ispitivanja kinetike toksičnog delovanja indometacina U251 ćelije su inkubirane 12 h, 24 h i 48 h u medijumu sa 250  $\mu$ M ovog leka. Testovi vijabiliteta MTT i CV pokazali su sposobnost leka da inhibira proliferaciju ćelija tumora na vremenski zavisn način. Očekivano, najintenzivniji antiproliferativni efekat je izmeren u terminu nakon 48 h. (Slika 2).

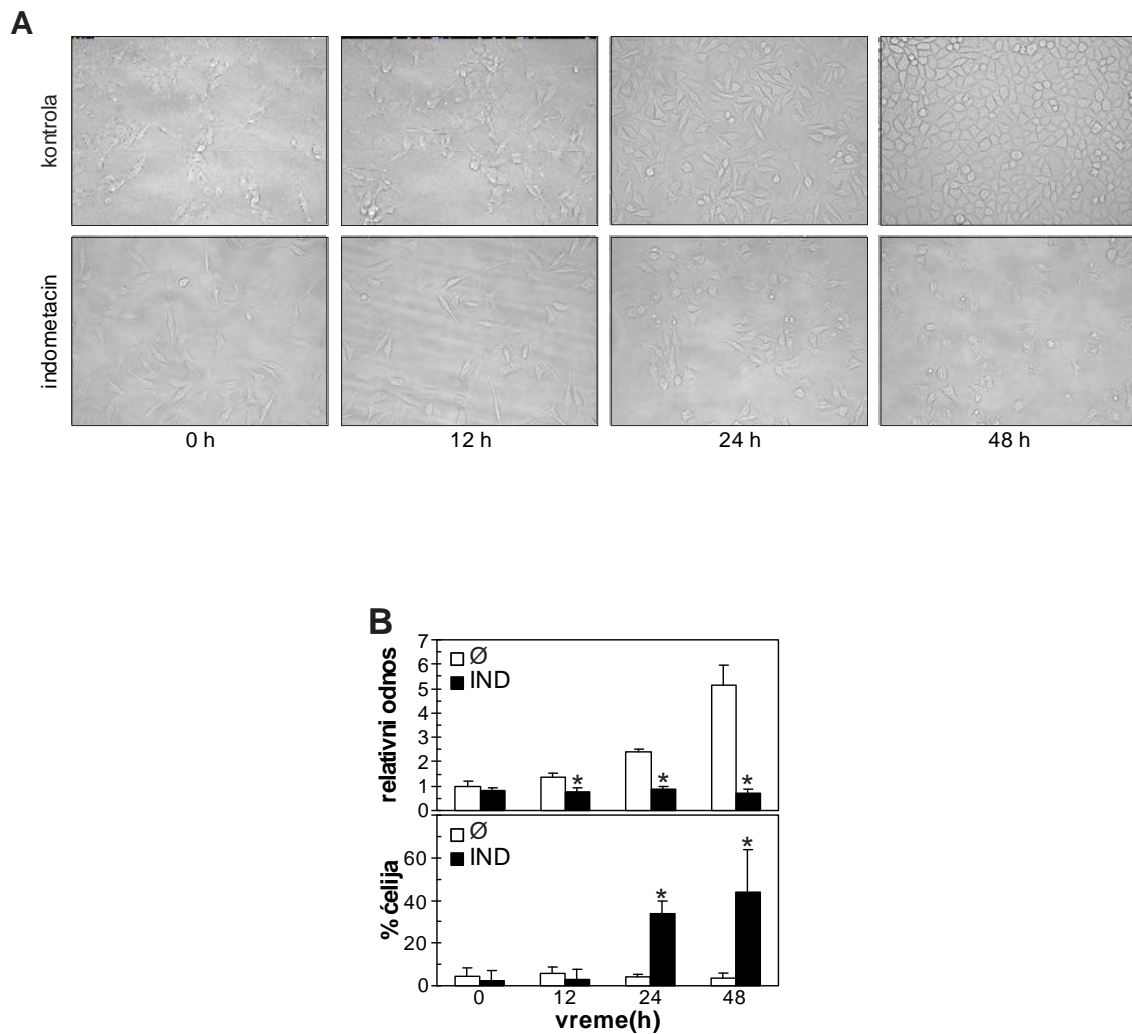


**Slika 3. Indometacin smanjuje vijabilitet U251 ćelija glioma na vremenski zavisn način.** U251 ćelije su bile inkubirane sa i bez indometacina (250  $\mu$ M). Ćelijski vijabilitet je ispitivan MTT (A) i CV (B) esejom nakon 12 h, 24 h i 48 h. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa kontrolnim ćelijama).

### 4.4. Indometacin menja morfologiju U251 ćelija

U narednom eksperimentu analizirana je kinetika morfoloških promena U251 ćelija tretiranih indometacinom nakon 12 h, 24 h i 48 h. Uočeno je da indometacin na vremenski zavisn način indukuje smanjenje broja ćelija, što je bilo u skladu sa rezultatima testova vijabiliteta koji pokazuju smanjenje ćelijske proliferacije. Takođe, uočeno je nekoliko promena: promena iz poligonalnog u kružni oblik, ivice ćelija su postale nejasne, kao i odlepljivanje ćelija od dna bunara u kojima su bile zasejane, što je ukazivalo na morfološke promene karakteristične za indukciju ćelijske smrti. Kvantifikacija ukupnog broja ćelija u kontrolnoj i grupi tretiranoj indometacinom, kao i

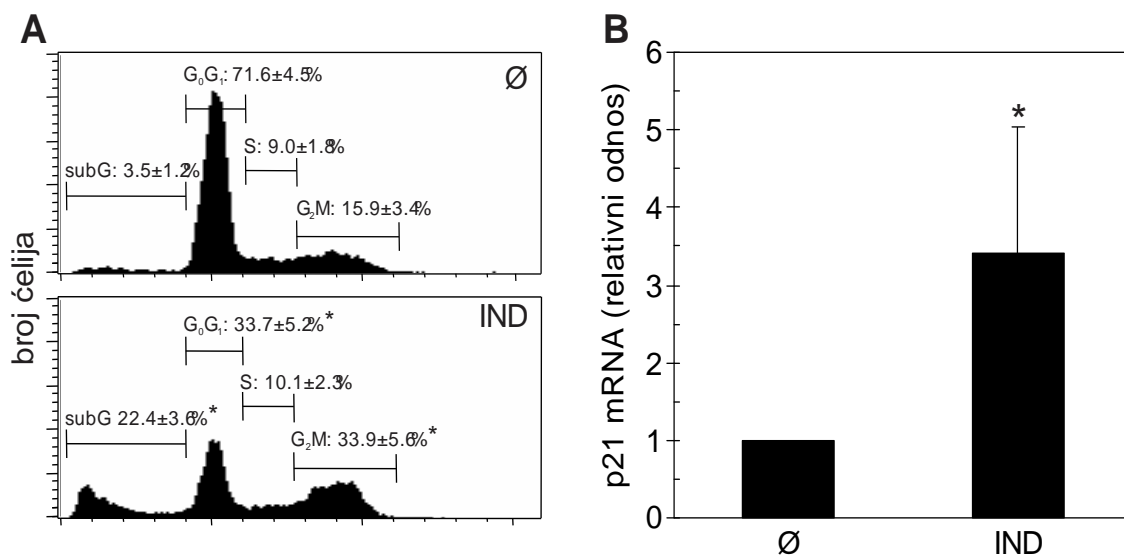
udeo ćelija sa izmenjenom morfologijom u odnosu na ukupan broj ćelija, prikazana je na slici 3.



**Slika 4. Promena morfologije ćelija tretiranih indometacinom.** U251 ćelije su bile inkubirane sa i bez indometacina (250  $\mu$ M) tokom 48h. (A) Ćelijska morfologija je posmatrana invertnim mikroskopom. (B) Prikazan je relativni odnos ukupnog broja ćelija (gornji red) i udeo ćelija sa izmenjenom morfologijom (okrugao oblik i/ili nejasne ivice; donji red). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa kontrolom).

#### 4.5. Indometacin indukuje zastoj ćelijskog ciklusa u ćelijama glioma U251

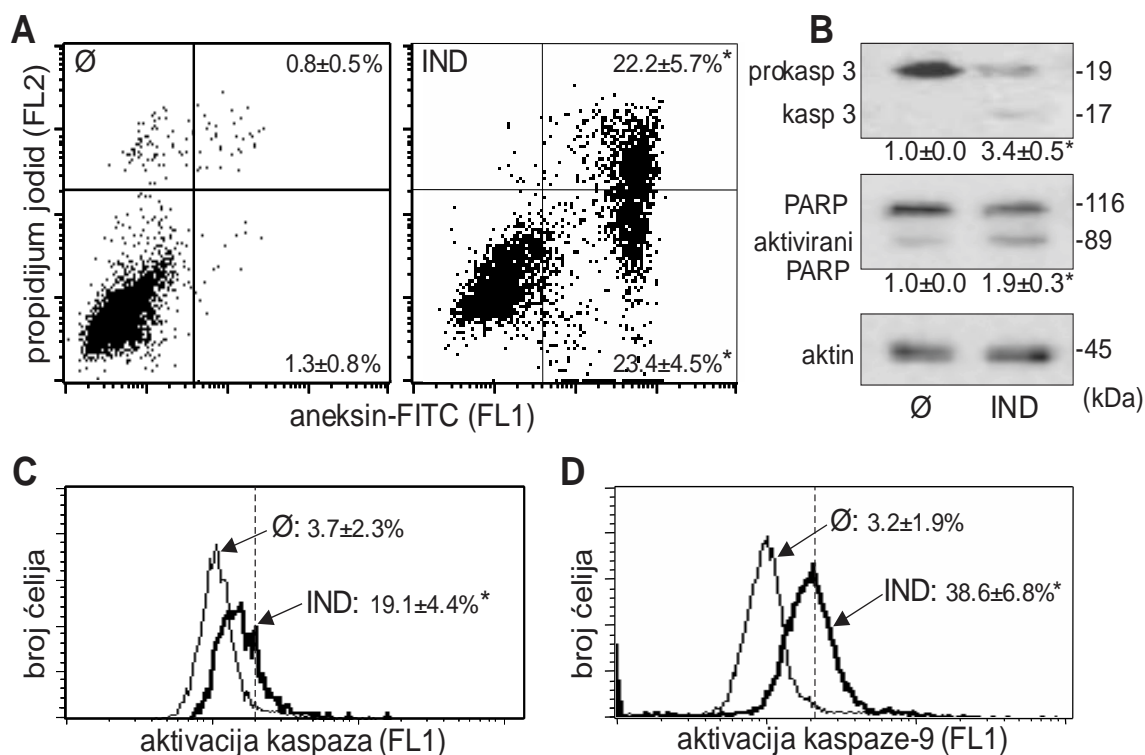
U narednim eksperimentima ispitivan je mehanizam citotoksičnog delovanja indometacina. Protočnom citometrijom analiziran je sadržaj DNK u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Nakon 24 h tretmana indometacinom bilo je uočeno povećanje procenta U251 ćelija u G<sub>2</sub>M fazi ciklusa u odnosu na ukupnu populaciju ćelija U251 (Slika 4A). Povećanje procenta ćelija u G<sub>2</sub>M fazi ćelijskog ciklusa ukazuje da te ćelije ne ulaze u ćelijsku deobu. Ispitivana je povezanost povećanja procenta ćelija u G<sub>2</sub>M fazi ćelijskog ciklusa sa ekspresijom pojedinih tumor-supresorskih gena. U ćelijama tretiranim indometacinom izmereno je povećanje ekspresije iRNK koja kodira CDK inhibitor p21 (Slika 4B). Povećanje ekspresije ovoga gena može dovesti do zastoja u prelazu iz G<sub>1</sub> u S i G<sub>2</sub> u M fazu ćelijskog ciklusa inhibicijom CDK4,6/ciklina-D i CDK2/ciklina-E (Karimian i sar., 2016). Analizom ciklusa nakon bojenja sa PI pokazan je porast procenta apoptotičnih ćelija koje sadrže manju količinu DNK. Ova subpopulacija ćelija srazmerno smanjenoj količini DNK odaje manju količinu svetlosti fluorescentne boje od vijabilnih ćelija formirajući na histogramu sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hipodiploidni region. (Slika 4A).



**Slika 5. Indometacin indukuje zastoj ćelijskog ciklusa u U251 ćelijama glioma.** U251 ćelije su bile tretirane indometacinom (250  $\mu$ M) tokom 24 h (A) ili 1 h (B). Ćelijski ciklus/DNK fragmentacija (A), analizirana je protočnom citometrijom. Nivo p21 iRNK meren je kvantitativnim RT-PCR-om (B). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa kontrolnim ćelijama).

#### **4.6. Apoptoza ćelija glioma U251 izazvana indometacinom zavisi od kaspaza**

Pošto su prethodni rezultati pokazali citotoksične efekte indometacina i zastoj u ćelijskom ciklusu, dalje je ispitan tip i mehanizam ćelijske smrti. Protočnom citometrijom analizirane su U251 ćelije obojene aneksin-FITC/PI fluorescentnom bojom nakon tretiranja indometacinom. Pokazan je značajan porast udela ćelija u ranoj fazi apoptoze sa očuvanim integritetom membrane i fosfatidil serinom na spoljašnjoj strani membrane (annexin<sup>+</sup>/PI). Takođe, pokazano je i povećanje udela kasnih apoptotičnih ćelija (annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) koje karakteriše narušenost integriteta ćelijske membrane i vezivanje propidijum jodida za ćelijsku DNK (Slika 5A). Imunoblotom je pokazano da su ovi događaji bili povezani sa aktivacijom egzekutorske kaspaze-3 i PARP, enzima koji učestvuje u reparaciji DNK i predstavlja marker apoptoze (Slika 5B). Metodom protočne citofluorimetrije, upotrebom ApoStat pan-kaspaznog inhibitora koji se selektivno vezuje za aktivirane kaspaze i FITC-konjugovanog inhibitora kaspaze-9, dokazano je da u ćelijama tretiranim indometacinom dolazi do aktivacije kaspaza, uključujući i inicijatorsku kaspazu-9 povezanu sa unutrašnjim putem apoptoze (Kuida i sar., 2000) (Slika 5C, D). Navedeni rezultati nedvosmisleno su pokazali da indometacin indukuje apoptozu u U251 ćelijama.

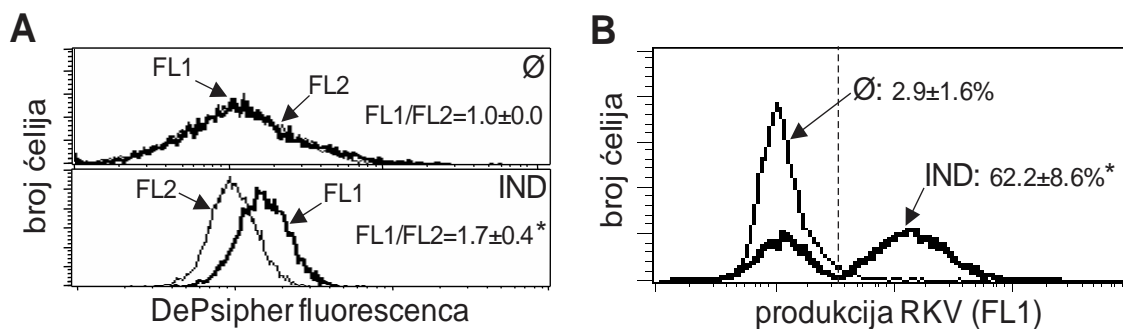


**Slika6. Indometacin aktivira unutrašnji put apoptoze u U251 ćelijama glioma.** U251 ćelije su bile tretirane indometacinom (250  $\mu$ M) tokom 12 h (D) ili 24 h (A, B, C). Prisustvo fosfatidil-serina na spoljašnjoj membrani ćelije, integritet ćelijske membrane (A), pan-kaspazna i aktivacija kaspaze-9 (C, D) bili su analizirani protočnom citometrijom. Aktivacija kaspaze-3 i PARP bila je merena imunoblotom (B), a prikazani su reprezentativni blotovi ispod kojih su rezultati denzitometrije. (A-D) Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa kontrolnim ćelijama).

#### 4.7. Apoptoza indukovana indometacinom je posredovana oksidativnim stresom i depolarizacijom mitohondrija

Unutrašnji put apoptotske smrti najčešće je iniciran promenom potencijala na unutrašnjoj membrani mitohondrija i indukcijom oksidativnog stresa (Chandra i sar., 2000). Ispitivana je povezanost apoptoze indukovane indometacinom sa navedenim unutarćelijskim promenama. Analiza ćelija obojenih fluorescentnom bojom DePsipher na protočnom citometru pokazala je povećanje zelene fluorescence u odnosu na crvenu, odnosno povećanje odnosa FL1/FL2 u ćelijama koje su bile tretirane indometacinom. Ovo ukazuje na depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija, što je obično rani događaj u inicijalnoj fazi apoptoze (Slika 6A). Citofluorimetrijskom analizom ćelija

obojenih fluorohromom DCFDA pokazano je da tretman indometacinom dovodi do povećanja produkcije RKV u U251 ćelijama (Slika 6B). Rezultati ovih eksperimenata ukazuju da je apoptoza indukovana indometacinom posredovana oksidativnim stresom i depolarizacijom mitohondrija.

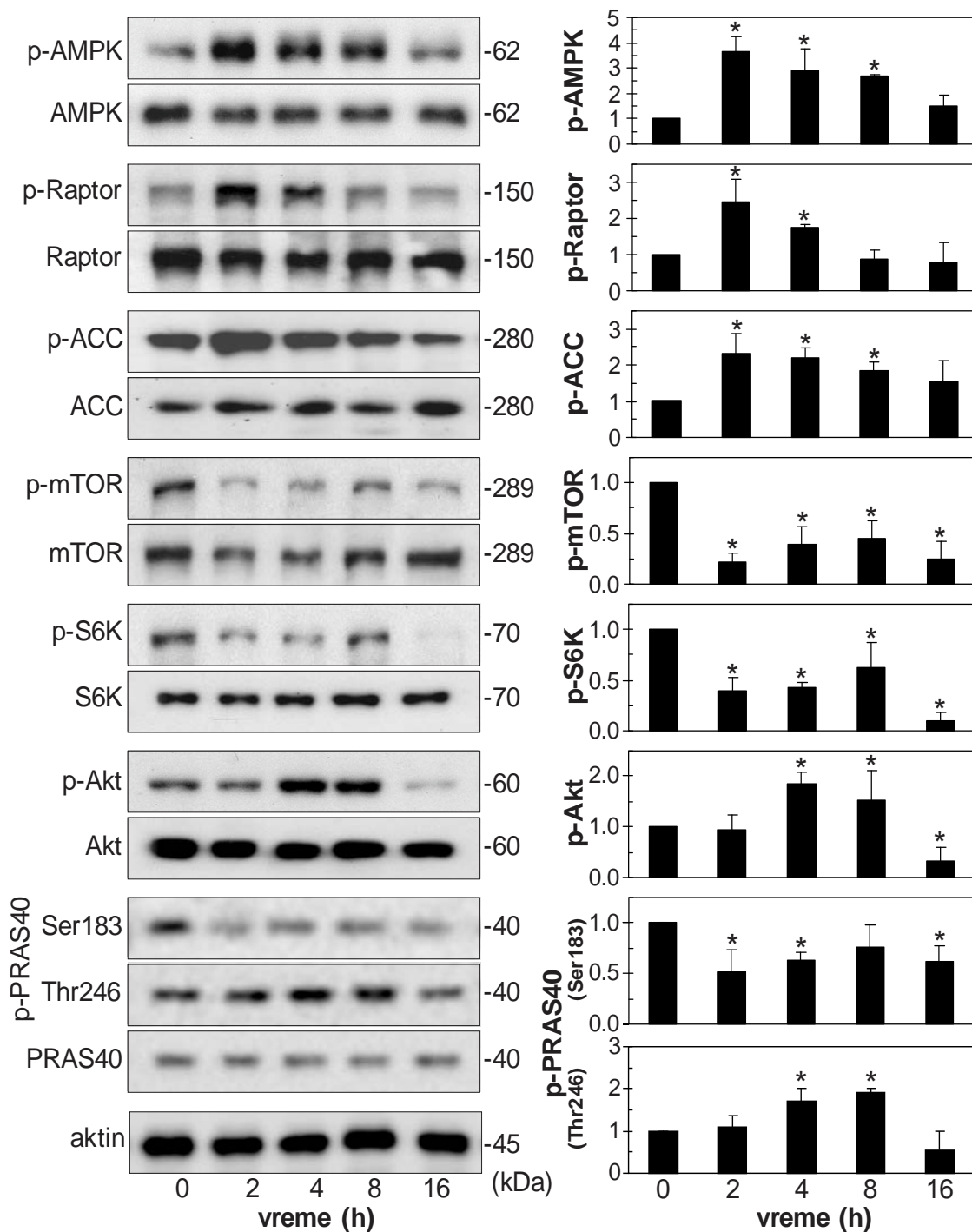


**Slika 7. Indometacin indukuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres u U251 ćelijama glioma.** U251 ćelije su bile tretirane indometacinom (250  $\mu$ M) tokom 12 h (A) ili 2 h (B). Depolarizacija mitohondrija ćelija obojenih fluorescentnom bojom DePsipher (A) i produkcija RKS ćelija obojenih DCFDA (B) bili su analizirani protočnom citometrijom. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa kontrolnim ćelijama).

#### **4.8. Indometacin aktivira AMPK i inhibira mTORC1 u U251 ćelijama**

U sledećim eksperimentima istraživani su efekti indometacina na aktivnost signalnog puta AMPK/mTORC1. Imunoblot analizom je pokazan porast fosforilacije AMPK i njegovih nishodnih molekula Raptor i ACC dva sata nakon tretmana, sa postepenim opadanjem nivoa fosforilisane forme navedenih molekula u kasnijim terminima (Slika 7). Aktivacija AMPK je bila povezana sa smanjenjem fosforilacije mTOR i molekula koje mTORC1 fosforiliše - S6K i PRAS40 (Ser183) (Slika 7). Poznato je da kinaza Akt aktivira mTORC1 direktno ili posredno smanjujući aktivnost njegovog inhibitora PRAS40 fosforilacijom na Thr246 (Wiza i sar., 2012). Imajući u vidu da je fosforilacija Akt i PRAS40 na Thr246 bila povećana u četvrtom i osmom satu nakon tretiranja (Slika 7), može se zaključiti da Akt nije inicijalno bio uključan u početnu inhibiciju aktivnosti mTORC1/S6K. Sa druge strane, nakon 16 h od početka tretmana fosforilacija Akt je bila smanjena, dok je za PRAS40 na Thr246 postojala tendencija smanjenja, koja nije dosegla statističku značajnost, sugerišući da je inhibicija Akt/PRAS40 mogla doprineti kasnoj supresiji mTORC1. Dakle, indometacin najverovatnije inhibira aktivnost mTORC1 signalnog puta ranom aktivacijom AMPK, dok se kasna supresija mTORC1 održava kasnom inhibicijom Akt.

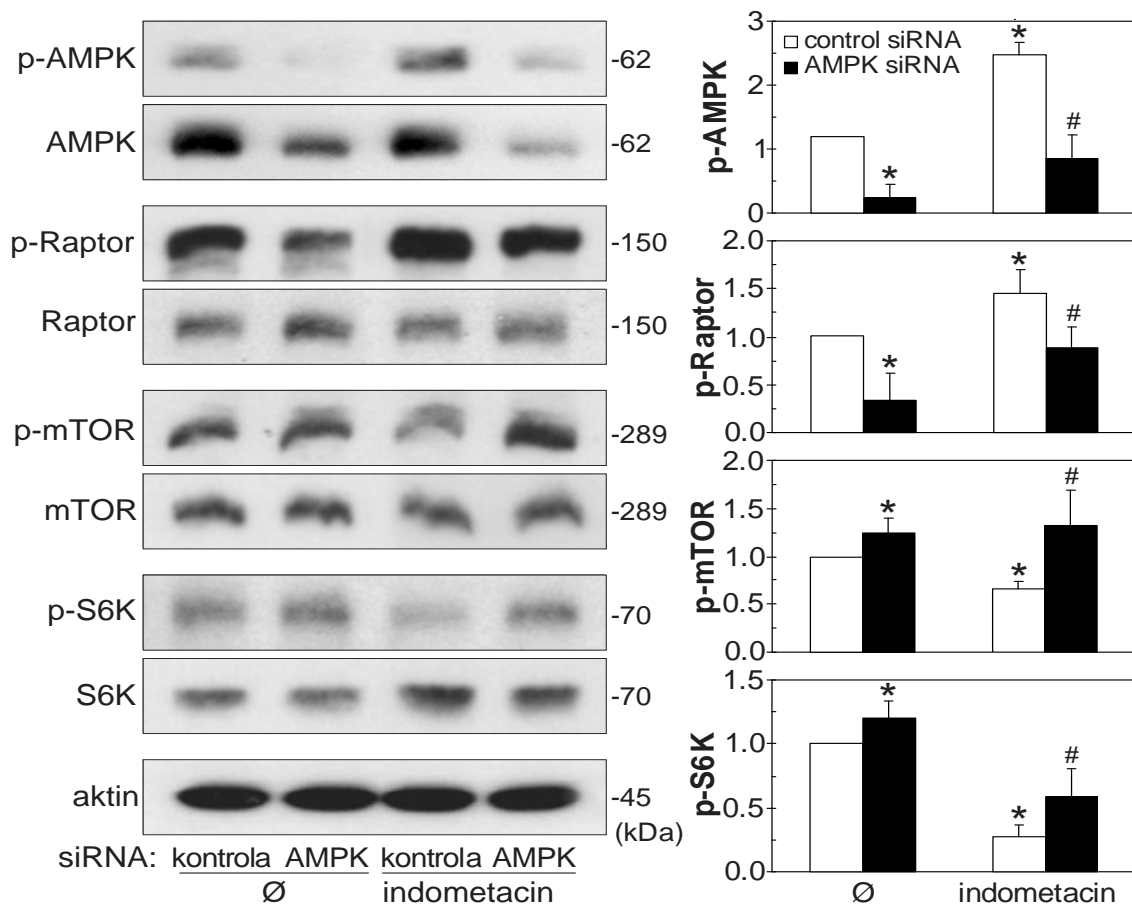




**Slika 8. Indometacin povećava AMPK i smanjuje mTOR aktivnost u U251 ćelijama.** U251 ćelije su bile inkubirane sa indometacinom (250 μM), a nivo fosforilisane/ukupne forme molekula: AMPK, Raptor, ACC, mTOR, S6K, Akt, i PRAS40 meren je imunoblot metodom pre (0 h) i nakon 2 h, 4 h, 8 h i 16 h tretmana. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD (n =3, \*p < 0.05 poređeno sa kontrolnim netretiranim ćelijama).

#### 4.9. Inhibicija mTORC1 u ćelijama glioma U251 tretiranih indometacinom je zavisna od AMPK aktivacije

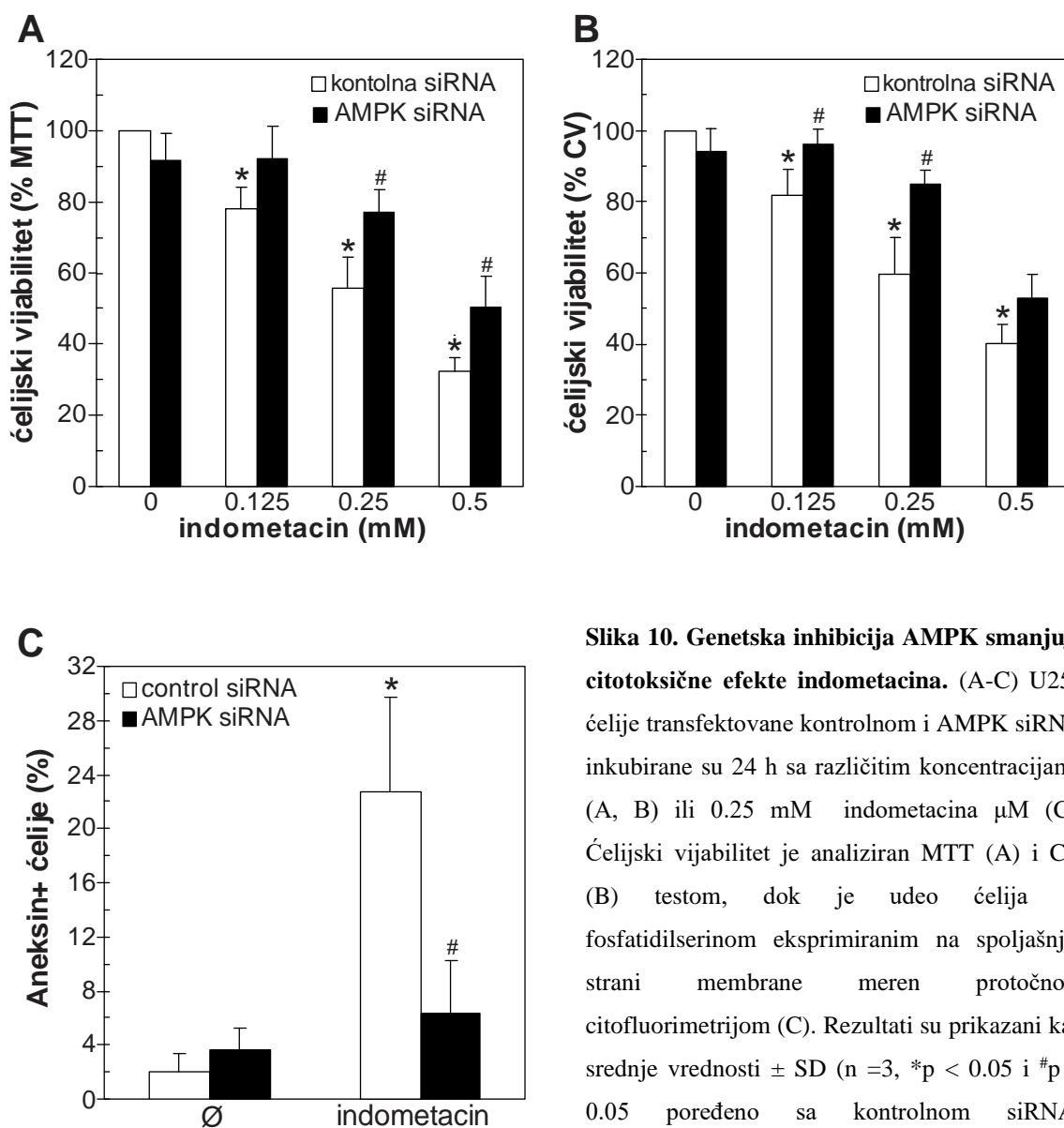
Za ispitivanje uloge AMPK u inhibiciji mTORC1 signalnog puta indometacinom korišćen je metod genetske inhibicije molekula AMPK RNK interferencijom. Imunoblotom je potvrđeno smanjenje ekspresije AMPK u kulturi u kojoj su ćelije bile transfektovane sa AMPK siRNA u odnosu na kontrolnu kulturu U251 u kojoj su ćelije transfektovane kontrolnom siRNA. Supresija AMPK delimično je sprečila aktivaciju Raptor indometacinom, kao i sposobnost ovog molekula da inhibira aktivnost mTOR i S6K (Slika 8), što dokazuje da je inhibicija mTORC1 posredovana aktivacijom AMPK.



**Fig. 9. Inhibicija mTORC1 indometacinom je posredovana aktivacijom AMPK.** U251 ćelije transfektovane sa AMPK siRNA i kontrolnom siRNA su bile inkubirane 2 h u prisustvu indometacina (250  $\mu$ M), a nivo fosforilisanog/ukupnog AMPK, Raptor, mTOR i S6K je meren imunoblotom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n =3, \*p < 0.05 i #p < 0.05 poređeno sa kontrolnom siRNA-transfektovanim ćelijama sa\* i bez# indometacina).

#### 4.10. Genetska inhibicija AMPK smanjuje antiproliferativno i proapoptotsko delovanje indometacina

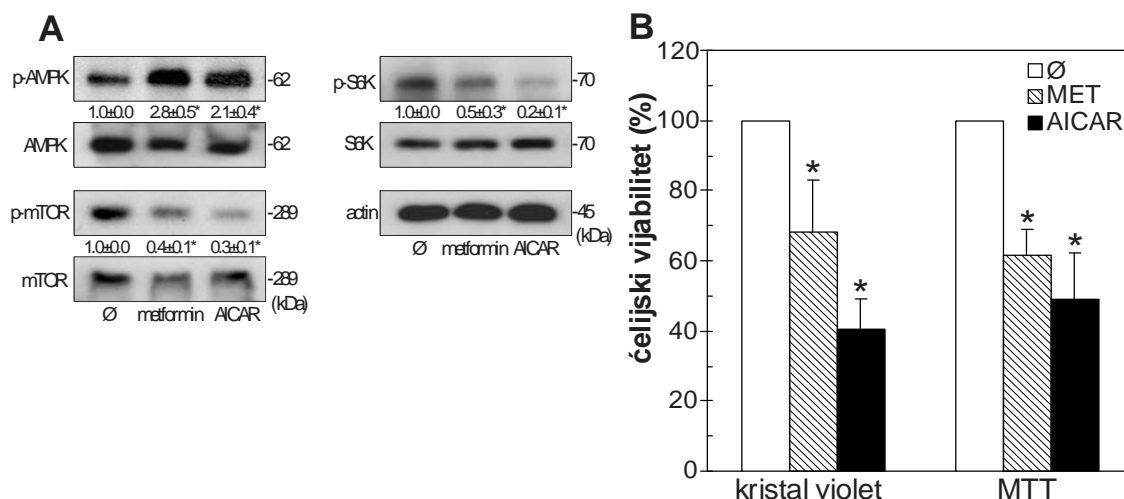
Da bi se istražila povezanost citotoksičnog efekta indometacina sa povećanom aktivnošću AMPK, ponovo su korišćene ćelije u kojima je AMPK inhibirana RNK interferencijom. MTT i CV testom pokazano je da inhibicija AMPK delimično oporavlja vijabilitet U251 ćelija tretiranih indometacinom (Slika 9A, B). U skladu sa tim, ćelije koje su imale inhibiranu ekspresiju AMPK bile su manje senzitivne na indukciju apoptoze dejstvom indometacina (Slika 9C). Dakle, citotoksično proapoptotsko delovanje indometacina posredovano je aktivacijom AMPK.



**Slika 10. Genetska inhibicija AMPK smanjuje citotoksične efekte indometacina.** (A-C) U251 ćelije transfektovane kontrolnom i AMPK siRNA inkubirane su 24 h sa različitim koncentracijama (A, B) ili 0.25 mM indometacina  $\mu$ M (C). Ćelijski vijabilitet je analiziran MTT (A) i CV (B) testom, dok je udeo ćelija sa fosfatidilserinom ekspimiranim na spoljašnjoj strani membrane meren protočnom citofluorimetrijom (C). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n =3, \*p < 0.05 i #p < 0.05 poređeno sa kontrolnom siRNA-transfektovanim ćelijama sa\* i bez# indometacina).

#### 4.11. AMPK aktivatori metformin i AICAR inhibiraju mTOR i smanjuju vijabilitet U251 ćelija

Da bi se potvrdila uloga AMPK u citotoksičnom dejstvu indometacina, u daljem istraživanju ispitivano je da li metformin i AICAR, supstance koje se koriste kao farmakološki aktivatori AMPK (Corton i sar., 1995; Zhou i sar., 2001), ostvaruju iste efekte kao indometacin. Imunoblot metodom je pokazano da metformin i AICAR u aktiviraju AMPK u U251 ćelijama. Kao i kod indometacina, aktivacija AMPK je bila praćena inhibicijom mTOR (Slika 10A). I u ovom slučaju, aktivacija AMPK/mTOR signalnog puta metforminom i AICAR, imala je citotoksični efekat (Slika 10B). Dakle, poput indometacina, aktivacija AMPK metforminom i AICAR preko inhibicije mTOR deluje toksično na ćelije glioma.

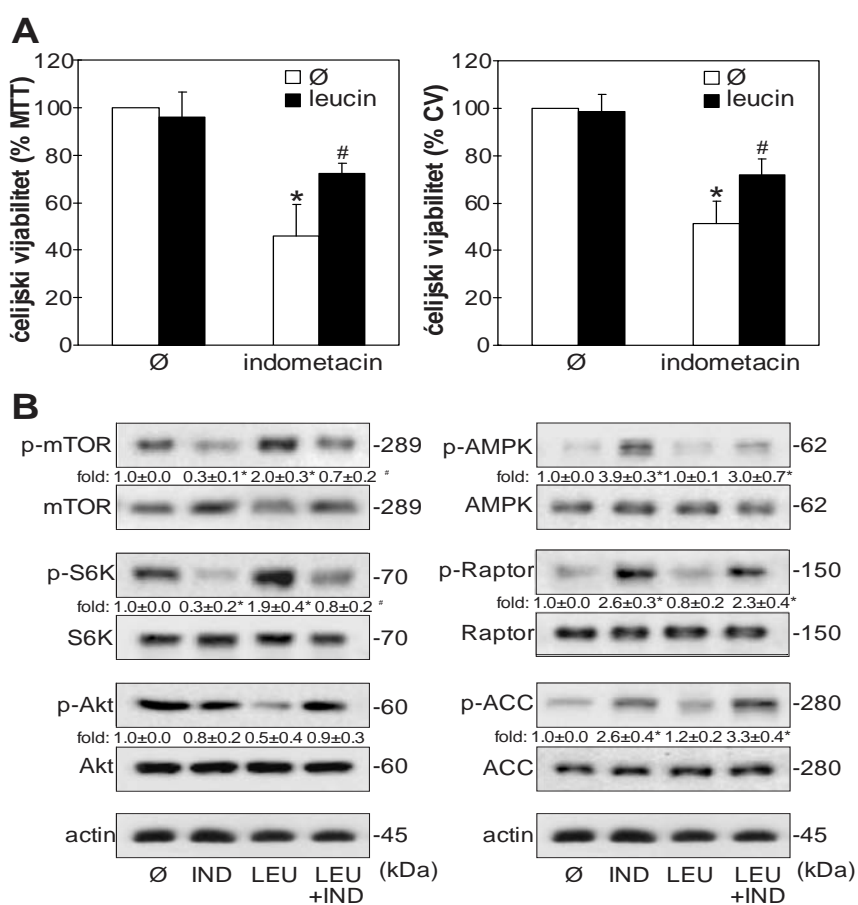


**Slika 11. AMPK aktivatori metformin i AICAR inhibiraju mTOR i smanjuju vijabilitet U251 ćelija.** U251 ćelije su bile tretirane sa aktivatorima AMPK metforminom (8 mM) i AICAR (800 µM). Fosforilacija AMPK, mTOR i S6K je merena imunoblotom 2h nakon tretmana indometacinom (A). Ćelijski vijabilitet je bio analiziran posle 24h MTT ili CV testom (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD (n =3, \*p < 0.05 poređeno sa netretiranim ćelijama).

#### 4.12. Aktivacija mTOR leucinom smanjuje citotoksičnost indometacina na ćelije glioma U251

Nastavak istraživanja je usmeren na dokazivanje povezanosti inhibicije mTORC1 sa citotoksičnim dejstvom indometacina, pri čemu je korišćen farmakološki

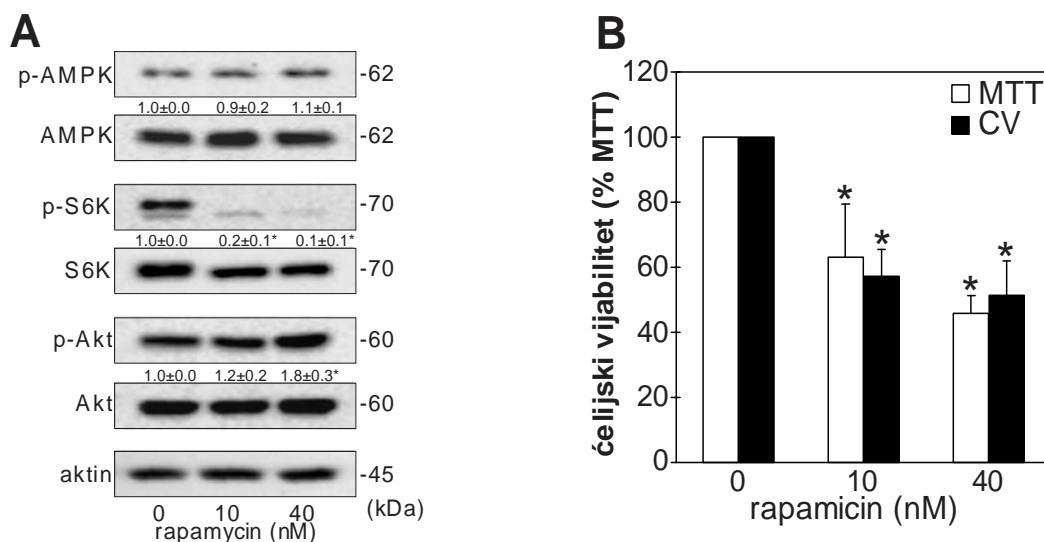
aktivator mTOR leucin. Uočeno je da leucin delimično oporavlja vijabilitet U251 ćelija tretiranih indometacinom (Slika 11A). Imunoblotom je pokazano da je leucin zaista aktivirao mTOR/S6K u netretiranim i u ćelijama tretiranim indometacinom (Slika 11B). Aktivacija mTOR leucinom nije imala uticaja na fosforilaciju Akt, AMPK, Raptor i ACC kod ćelija tretiranih indometacinom (Slika 11B). Dakle, aktivacija AMPK indometacinom delimično ostvaruje svoje citotoksične efekte na ćelije glioma inhibicijom mTORC1.



**Slika 12. Citotoksično delovanje indometacina suprimirano je farmakološkom aktivacijom mTORC1 leucinom.** U251 ćelije su bile inkubirane 24 h (A) ili 4 h (B) sa indometacinom (0.25 mM) u prisustvu ili odsustvu mTORC1 aktivatora leucina (5 mM). Ćelijski vijabilitet je meren MTT ili CV testom (A), dok je fosforilacija AMPK, Raptor, ACC, mTOR, S6K i Akt merena imunoblotom (B; densitometrijski podaci su prikazani ispod blotova). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD (n = 3, \*p < 0.05 i #p < 0.05 poređeno sa netretiranim\* i ćelijama tretiranim indometacinom#).

#### 4.13. Inhibitor mTOR rapamicin smanjuje vijabilitet U251 ćelija

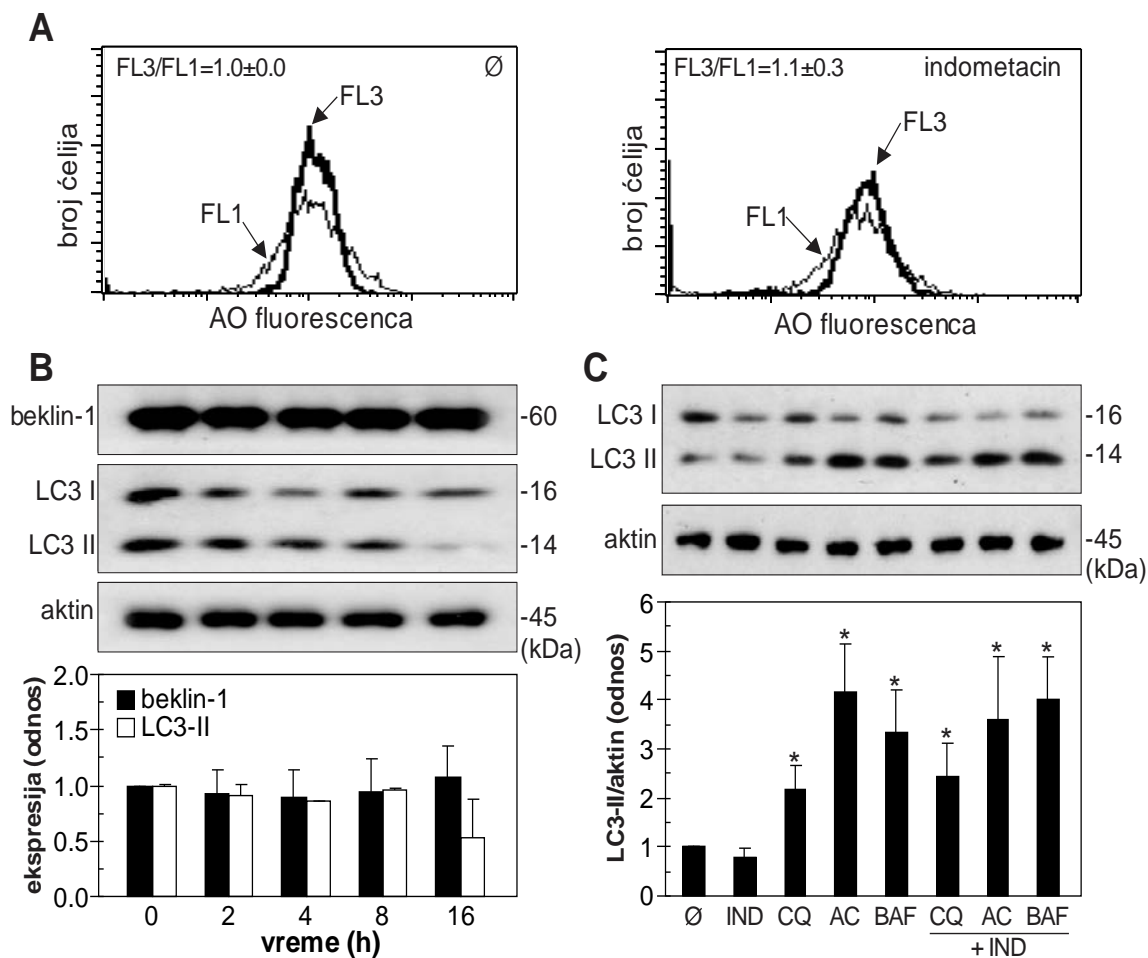
Da bi se istražilo da li poput indometacina i farmakološka inhibicija mTOR ima citotoksično dejstvo na U251 ćelije, korišćen je rapamicin koji se selektivno vezuje za mTOR i inhibira niz njegovih funkcija (Ballou i sar., 2008). Očekivano, rapamicin je smanjio fosforilaciju S6K. Osim toga, rapamicin je povećao fosforilaciju Akt, dok na status AMPK nije imao uticaja (Slika 12A). MTT i kristal violet test pokazali su da inhibicija mTOR rapamicinom ima citotoksično dejstvo (Slika 12B). Dakle, selektivna inhibicija mTOR ima citotoksični efekat na ćelije U251 i jedan je od mehanizama antigliomskog delovanja.



**Slika 13. Farmakološka inhibicija mTOR rapamicinom smanjuje vijabilitet U251 ćelija.** U251 ćelije su bile inkubirane 4 h (A) ili 24h (B) sa mTORC1 inhibitorom rapamicinom. Fosforilacija AMPK, S6K i Akt merena je imunoblotom. Denzitometrijski podaci su prikazani ispod izabranih blotova (A), dok je ćelijski vijabilitet meren MTT ili CV testom (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa netretiranim i ćelijama tretiranim rapamicinom).

#### 4.14. Indometacin ne indukuje autofagiju u U251 ćelijama glioma

U nastavku istraživanja ispitivana je uloga autofagije u citotoksičnom delovanju indometacina na U251 ćelije. S obzirom da indometacin smanjuje aktivaciju glavnog inhibitora autofagije mTORC1, ispitan je uticaj ovoga leka na proces autofagije. U tom cilju analizirano je dejstvo indometacina na markere autofagije: promenu intracelularne kiselosti, ekspresiju beklina-1 i konverziju LC3-I u LC3-II. Prvo je metodom protočne citoflorimetrije analizirano prisustvo kiselih vezikula, autofagolizozoma, nakon tretmana indometacinom. Ćelije su bojene akridin oranžom, pH-senzitivnom fluorescentnom bojom koja u kiseloj sredini autofagolizozoma emituje narandžasto-crvenu boju (FL3), a pri kontaktu sa neutralnim pH sadržajem ćelije emituje zelenu boju (FL1). Citofluorimetrijska analiza pokazala je da indometacin nije povećao odnos crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1), odnosno nije menjao kiselost citoplazme (Slika 13A). Imunoblotom je utvrđeno da u ćelijama tretiranim indometacinom nije došlo do povećanja ekspresije proautofagnog proteina beklina-1 ili promene u stepenu konverzije citosolne forme LC3-I u LC3-II formu koja se nalazi u membrani autofagozoma (Slika 13B). Kako izostanak porasta LC3-II može biti posledica njegove povećane razgradnje u autofagolizozomima (Mizushima i sar., 2010), analiziran je autofagni fluks, odnosno nivo LC3-II u uslovima kada je njegova razgradnja u autofagolizozomima inhibirana lizozomalnim inhibitorima bafilomicinom A1, hlorokinom ili amonijum hloridom (Blommaart i sar., 1997; Mauthe i sar., 2018). Navedeni inhibitori smanjuju razgradnju LC3-II, pa je očekivano da njegov nivo raste (Slika 13C). Medjutim, nije bilo dodatnog porasta nivoa LC3-II nakon kombinovanog tretmana lizozomalnim inhibitorima i indometacinom (Slika 13C), što potvrđuje da indometacin ne povećava autofagni fluks

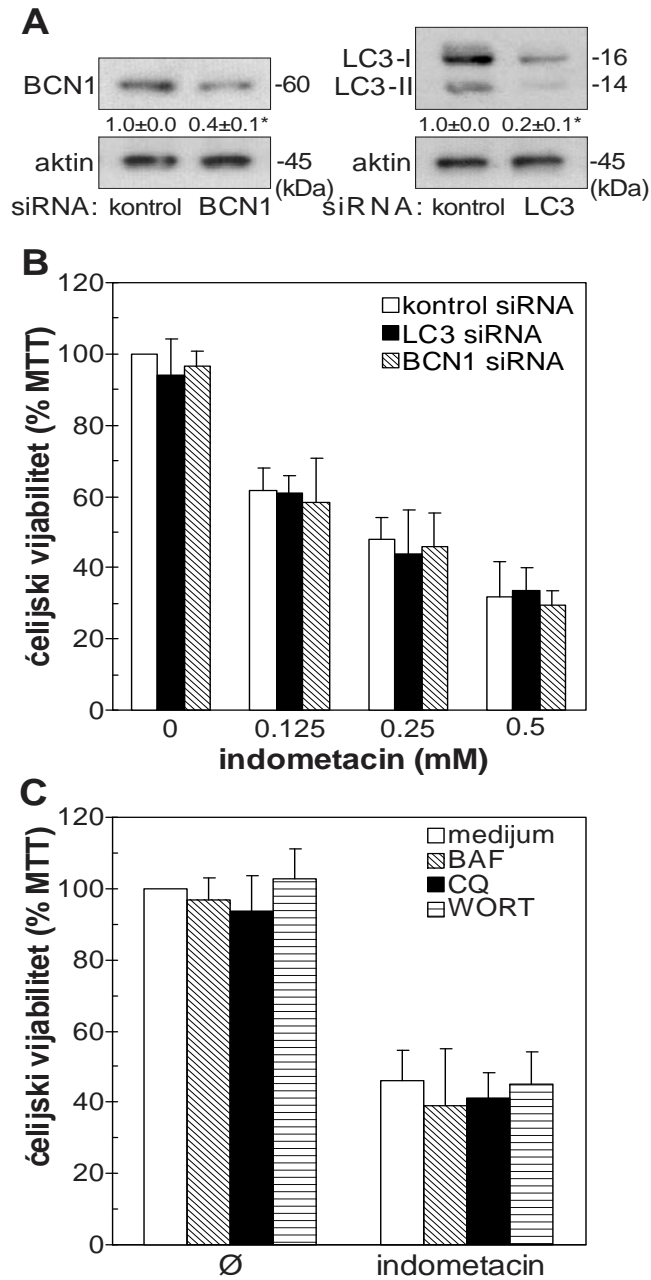


**Slika 14. Efekat indometacina autofagiju u U251 ćelijama.** U251 ćelije su bile inkubirane sa indometacinom (250  $\mu$ M) 24 h (A) ili 2-16 h (B). (A) Intraćelijska acidifikacija je merena protočnom citofluorimetrijom kao odnos intenziteta crveno i zelene (FL3/FL1) fluorescenca ćelija obojenih akrdin oranžom (AO), a prikazani su reprezentativni histogrami. (B) Koncentracije beklina-1 i LC3 su bile analizirane imunoblotom. (C) Autofagni fluks je meren stepenom konverzije LC3 u ćelijama U251 inkubiranih 8 h sa indometacinom (250 mM), u prisustvu ili odsustvu lizozomalnih inhibitora hlorokina (CQ; 20  $\mu$ M), amonijum hlorida (AC; 20 mM), ili bafilomicina A1 (BAF; 20 nM). (B, C) Prikazani su reprezentativni blotovi, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa netretiranim ćelijama).



#### **4.15. Genetska i farmakološka inhibicija autofagije ne utiču na vijabilitet U251 ćelija tretiranih indometacinom**

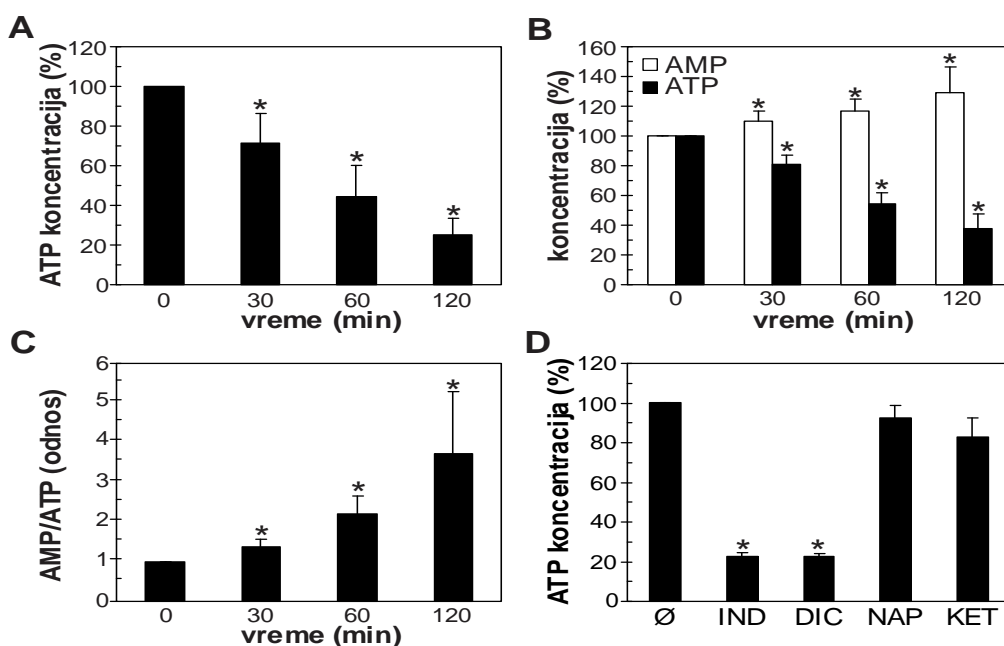
Imajući u vidu da indometacin ne indukuje autofagiju u U251 ćelijama, očekivano je da inhibicija autofagije neće uticati na antigliomsko dejstva indometacina. Da bi se to povrdilo, u U251 ćelijama je RNK interferencijom inhibirana ekspresija beklina-1, molekula ključnog za inicijaciju formiranja autofagozoma i LC3, neophodnog za maturaciju autofagozoma. Uspešnost genetske inhibicije potvrđena je imunoblotom (Slika 14A). Genetska inhibicija beklina-1 i LC3 nije imala efekta na vijabilitet ćelija tretiranih indometacinom (Slika 14B). U skladu sa tim, supresija autofagije lizosomalnim inhibitorima bafilomicinom A1 i hlorokinom ili vortmaninom, inhibitorom fosfoinozimid 3-kinaze koja učestvuje u inicijaciji formiranja autofagozoma (Mizushima i sar., 2010), nije imala uticaja na vijabilitet ćelija tretiranih indometacinom (Slika 14C). Ovi rezultati potvrdili su da autofagija nema uticaja na citotoksično delovanje indometacina u ćelijama U251 glioma.



**Slika 15. Efekat genetske i farmakološke inhibicije autofagije na vijabilitet ćelija tretiranih indometacinom.** (A, B) U251 ćelije su transfektovane kontrolnom, beclin-1 (BCN1) ili LC3 siRNA i uspešnost inhibicije ekspresije procenjena je imunoblotom (A). Transfektovane ćelije su inkubirane sa 125-500  $\mu$ M indometacina tokom 24 h, a ćelijski vijabilitet je meren MTT testom (B). (C) U251 ćelije su tretirane indometacinom (250  $\mu$ M) tokom 24 h u prisustvu i odsustvu inhibitora autofagije bafilomicina A1 (BAF; 20 nM), hlorokina (CQ; 20  $\mu$ M) ili vortmanina (WORT; 200 nM), a ćelijski vijabilitet je analiziran MTT testom. (A-C) Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n = 3$ , \* $p < 0.05$ ).

#### 4.16. Indometacin aktivira AMPK povećanjem odnosa AMP/ATP

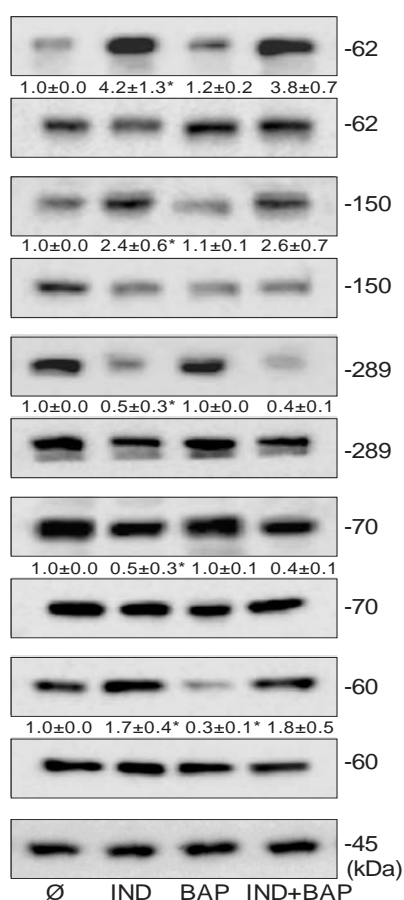
U narednim eksperimentima istraživana je mehanizam kojim indometacin aktivira AMPK u ćelijama U251 glioma. Imajući u vidu da je povećan odnos AMP/ATP glavni signal za aktivaciju AMPK (Hardie i sar., 2015), ispitivano je da li i indometacin smanjenjem zaliha energije u ćeliji aktivira AMPK. Za dokazivanje promene nivoa ATP i AMP u tretiranim ćelijama korišćen je metod bioluminiscentnog esejaja i HPLC. Tretman indometacinom povećao je intracelularni nivo AMP, a smanjio nivo ATP i tako doveo po povećanja odnosa AMP/ATP u U251 ćelijama (Slika 15A-C). U skladu sa njegovim toksičnim delovanjem (Slika 1A), pokazano je da NSAIL diklofenak takodje smanjuje ATP nivo u ćelijama glioma. Ketoprofen i naproksen, koji nisu imali značajan citotoksični efekat (Slika 1A), nisu uticali na odnos AMP/ATP (Slika 15D). Prema tome, povećanje odnosa AMP/ATP mogao bi da bude jedan od mehanizama aktivacije AMPK u U251ćelijama.



**Slika 16. Indometacin povećava AMP/ATP odnos u ćelijama glioma.** (A-C) U251 ćelije su bile inkubirane sa indometacinom (250  $\mu$ M) tokom 30-120 min. Intracelularni nivoi ATP i AMP su mereni bioluminiscentnim esejom (A, D) ili HPLC (B). AMP/ATP odnos je izračunat iz izmerenih HPLC vrednosti (C). (D) U251 ćelije su bile tretirane indometacinom (IND; 250  $\mu$ M), diklofenakom (DIC; 200  $\mu$ M), naproksenom (NAP; 500  $\mu$ M) ili ketoprofenom (KET; 1000  $\mu$ M), a nakon 24 h koncentracija intracelularnog ATP je merena bioluminiscentnim esejom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n = 3, \* $p$ <0.05 poređeno sa netretiranim ćelijama).

#### 4.17. Indometacin aktivira AMPK nezavisno od intracelularnog nivoa Ca<sup>2+</sup>

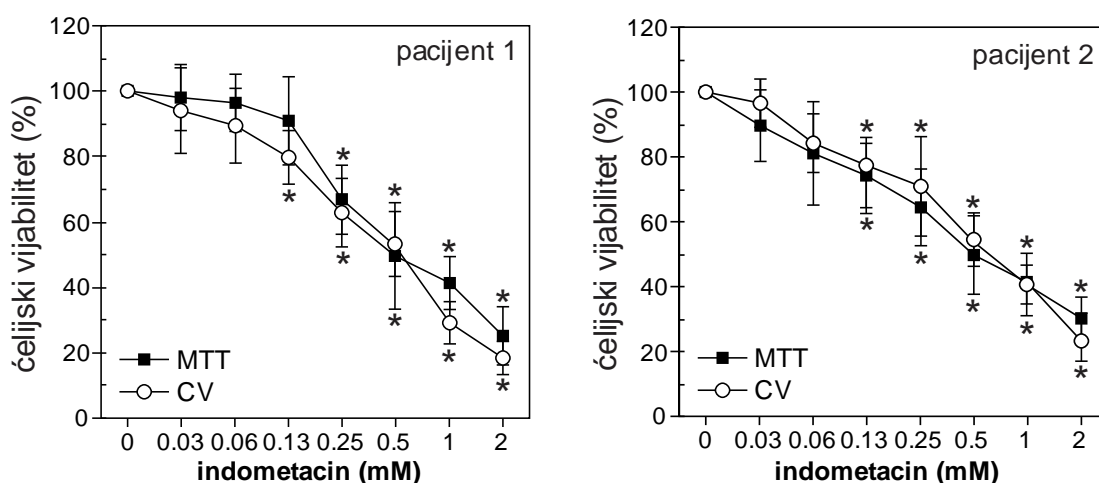
Da bi se ispitaio potencijalni uticaj Ca<sup>2+</sup>, čiji porast koncentracije aktivira kinazu CaMKKβ, koja je poznati aktivator AMPK (Woods i sar., 2005), korišćen je helator Ca<sup>2+</sup> BAPTA-AM. U ćelijama U251 tretiranim indometacinom u prisustvu BAPTA-AM nije došlo do značajne promene aktivacije AMPK, Raptor, mTOR, S6K ili Akt (Slika 17), što ukazuje da promena koncentracije unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup> i posledična aktivacija CaMKKβ nisu učestvovali u aktivaciju AMPK.



**Slika 17. Indometacin aktivira AMPK nezavisno od nivoa unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup>.** U251 ćelije su bile tretirane indometacinom 2 h (IND; 250 μM) u prisustvu ili odsustvu helatora kalcijuma BAPTA-AM (10 μM). Fosforilacija AMPK, Raptor, mTOR, S6K i Akt je analizirana imunoblotom (denzitometrijski rezultati su prikazani ispod reprezentativnih blotova). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa netretiranim ćelijama).

#### 4.18. Indometacin smanjuje vijabilitet primarnih ćelija glioblastoma

Kako bi se potvrdilo da citotoksični efekti indometacina nisu ograničeni samo na ćelijsku liniju glioma U251, ispitivan je efekat ovog leka na vijabilitet primarnih ćelija glioblastoma izolovanih iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata. Oba korišćena testa vijabiliteta, MTT i CV, pokazali su da indometacin smanjuje vijabilitet izolovanih primarnih ćelija glioblastoma (Slika 18), mada je efikasnost bila manja nego prema U251 ćelijskoj liniji. Naime, izračunate  $IC_{50}$  vrednosti su bile  $547 \pm 59 \mu\text{M}$  (MTT) i  $477 \pm 92 \mu\text{M}$  (CV) za pacijenta 1, i  $518 \pm 87 \mu\text{M}$  (MTT) i  $531 \pm 91 \mu\text{M}$  (CV) za pacijenta 2.

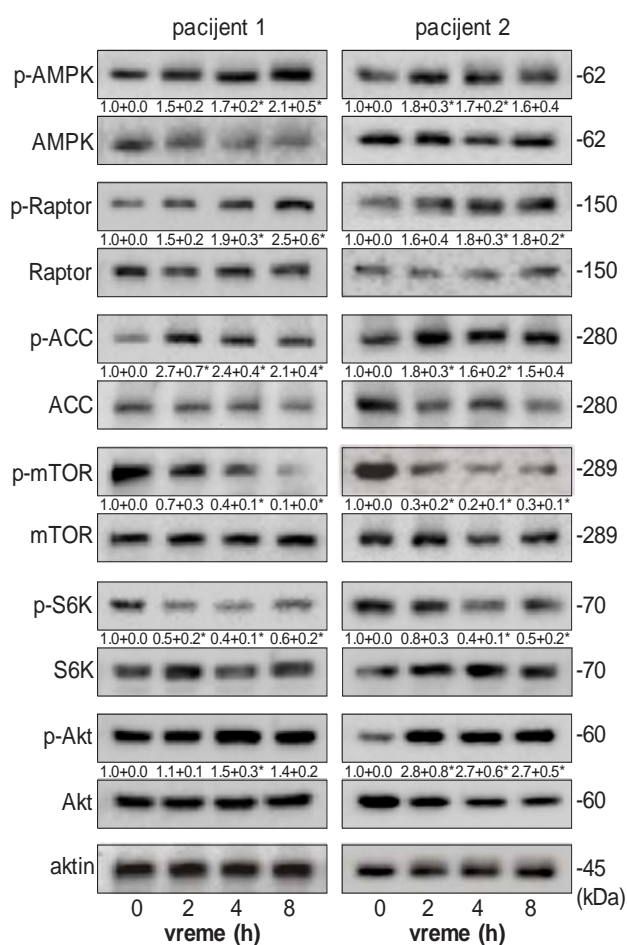


**Slika 18. Indometacin smanjuje vijabilitet primarnih ćelija glioblastoma.** Primarne ćelije izolovane iz tumorskog tkiva pacijenata obolelih od glioblastoma su inkubirane 24 h sa različitim koncentracijama indometacina, a zatim je ćelijski vijabilitet meren MTT i CV testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $*p < 0.05$  poređeno sa netretiranim ćelijama).

#### 4.19. Indometacin modifikuje aktivnost AMPK/mTORC1 signalnog puta u primarnim ćelijama glioblastoma

U narednom eksperimentu ispitivani su molekularni mehanizmi citotoksičnog dejstva indometacina na primarne ćelije glioblastoma izolovane iz tumorskog tkiva pacijenata. Imunoblot analiza je potvrdila da je nakon tretmana indometacinom aktivacioni status AMPK/mTORC1 signalnog puta u primarnim ćelijama glioma sličan onom u U251 ćelijskoj liniji, sa malim varijacijama u vremenskoj kinetici. Indometacin je u primarnim ćelijama glioblastoma aktivirao AMPK, kao i nishodne molekule Raptor

i ACC, a smanjio fosforilaciju mTOR i S6K (Slika 19). Slično rezultatima dobijenim na U251 ćelijama, indometacin je povećao fosforilaciju Akt, što ukazuje da inhibicija mTORC1 u primarnim ćelijama glioma nije bila posredovana supresijom Akt. Ovi podaci pokazuju da bi, kao i kod U251 ćelijske linije glioma, aktivacija AMPK i posledična inhibicija mTORC1 mogla da bude osnovni mehanizam citotoksičnog dejstva indometacina na primarne ćelije glioblastoma izolovanih iz tumorskog tkiva pacijenata.



**Slika 19. Citotoksični efekti indometacina na ćelije primarne kulture glioblastoma su povezani sa modulacijom AMPK/mTORC1 signalnog puta.** Primarne ćelije glioblastoma su bile inkubirane sa indometacinom (250  $\mu$ M) 2-8 h. Fosforilacija AMPK, Raptor, ACC, mTOR, S6K i Akt je merena imunoblotom. Prikazani su reprezentativni blotovi, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$ SD (n = 3, \*p < 0.05 poređeno sa netretiranim ćelijama).

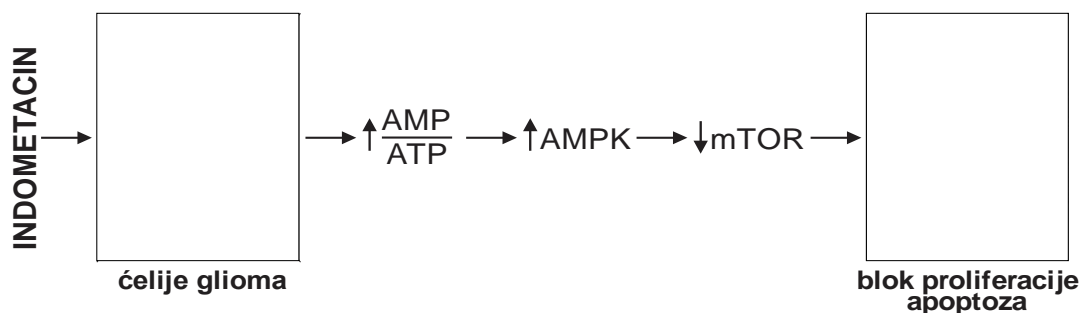
## 5. DISKUSIJA

Epidemiološke studije pokazuju povezanost između upotrebe nesteroidnih anti-inflamatornih lekova (NSAIL) i smanjenog rizika za obolevanje od malignih bolesti uključujući i gliome (Rothwell i sar., 2010; Scheurer i sar., 2008). Ovi lekovi mogu povećati dužinu života nakon dijagnoze maligne bolesti, mogu imati direktno antitumorsko dejstvo ili uticati na pojačanje efekta postojećih konvencionalnih antitumorskih lekova (Elwood i sar., 2016; Elwood i sar., 2018; Bernardi i sar., 2009). Mehanizmi delovanja objašnjeni su aktivacijom većeg broja nezavisnih signalnih puteva.

Za prednost indometacina u odnosu na druge NSAIL i odabir ovog leka u nastavku istraživanju postoji nekoliko razloga. Prvo, indometacin je jedini od ispitivanih lekova u ovom istraživanju aktivirao AMPK/mTORC1 signalni put u ćelijama glioma. Drugo, indometacin je pokazao snažan antitumorski efekat na ćelije glioma, jači od antitumorskog delovanja drugih NSAID kao što su diklofenak, ketoprofen i naproksen. Sa druge strane, na prednost indometacina za ispitivanje na ćelijama glioma ukazuju i važne farmakološke karakteristike kao što su povoljna farmakokinetika i distribucija leka kroz krvno-moždanu barijeru. Naime, indometacin se brzo apsorbuje i mada postoje interindividualne razlike, maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže u drugom satu nakon intramuskularne primene. Brz prodor kroz hematoencefalnu barijeru i visoka koncentracija u likvoru su posledica lipofilnosti molekula i visoke stope vezivanja za proteine plazme (90 %) (Bannwarth i sar., 1990). Indometacin se po učinku na centralni nervni sistem izdvaja od drugih lekova iz grupe NSAIL po jedinstvenom efektu na bol kod grupe glavobolja koje su po navednoj karakteristici nazvane indometacin senzitivne glavobolje (VanderPluym i sar., 2015).

U ovoj disertaciji pokazano je da nesteroidni anti-inflamatorni lek indometacin ostvaruje citotoksični efekat na ćelije U251 linije humanog glioma i primarne ćelije glioblastoma izolovane iz tkiva pacijenata. Citotoksični efekti indometacina su posledica modulacije AMPK/mTORC1 signalnog puta, bloka u ćelijskom ciklusu i

apoptotske smrti ćelija. Indometacin je u prethodnim istraživanjima pokazao toksično dejstvo na ćelije tumora *in vitro* i *in vivo* (Amin i sar., 2003; Bernardi i sar., 2006, Bernardi i sar. 2009, Bernardi i sar. 2013). Međutim, ovo je prvo istraživanje u kojem je pokazana uloga AMPK/mTORC1 signalnog puta u indukciji ćelijske smrti indometacinom u liniji glioma U251 i ćelijama izolovanim iz tkiva pacijenata obolelih od glioblastoma (slika 20). Osim toga, utvrđeno je i da indometacin citotoksične efekte na ćelije glioma U251 ostvaruje nezavisno od procesa autofagije na čiju aktivnost nije imao uticaj.



**Shema 2.** Modulacija AMPK/mTORC1 signalnog puta učestvuje u indukciji smrti ćelija glioma tretiranih indometacinom.

Prvi rezultati su u skladu sa prethodno publikovanim istraživanjima pokazali su da indometacin smanjuje vijabilitet U251 ćelijske linije glioma i primarne kulture ćelija glioblastoma izolovanih iz tkiva obolelih pacijenata (Amin i sar., 2003; Bernardi i sar., 2013; Bernardi i sar., 2009; Bernardi i sar., 2006). Važno je još jednom istaći da je indometacin pokazao najjači antigliomski efekat od svih ispitivanih lekova iz grupe NSAID. Izračunate  $IC_{50}$  vrednosti nakon 24 h inkubacije bile su  $244 \pm 29 \mu\text{M}$  u MTT testu i  $229 \pm 22 \mu\text{M}$  u kristal violet testu. Drugi po jačini toksičnog deovanja na vijabilitet U251 ćelija bio je diklofenak ( $IC_{50} = 347.5 \pm 31$  u MTT testu, i  $368.7 \pm 38 \mu\text{M}$  u kristal violet testu), dok su za toksično delovanje ketoprofena i naproksena na gliomske ćelije bile potrebne koncentracije veće od 1mM. U studiji Leidgensa i saradnika (Leidgens i sar., 2015), diklofenak je takođe ubijao ćelije glioma, pri čemu je  $IC_{50} = 100 \mu\text{M}$  bila manja od  $IC_{50}$  vrednosti dobijenih u našem istraživanju, ali važno je istaći da je period inkubacije bio četiri dana. Sa druge strane, ketoprofen je blago smanjivao rast sferoida, odnosno proliferaciju gliomskih ćelija u istraživanju Gatija i saradnika (Gàti i sar., 1990).



Posle rezultata koji su pokazali jasan efekat na ćelijski vijabilitet ispitivano je da li je smanjenje vijabiliteta posledica inhibicije proliferacije, indukcije ćelijske smrti ili oba efekta. Posmatranjem ćelijskih kultura tretiranih indometacinom pod svetlosnim mikroskopom mogli smo da uočimo smanjen broj ćelija, od kojih su neke bile izmenjenog okruglog oblika i odlepljene od dna bunara, što je ukazivalo na istovremenu inhibiciju proliferacije i indukciju ćelijske smrti. Istraživanje smo zatim usmerili na ispitivanje mehanizama kojima indometacin dovodi do zaustavljanja deobe ćelija. Uočeno je da indometacin inicira zastoje u G<sub>2</sub>M fazi ćelijskog ciklusa i dovodi do povećanja ekspresije tumor-supresorskog proteina p21. Blok u G<sub>2</sub>M fazi se može dovesti u vezu sa povećanjem ekspresije p21 u tretiranim ćelijama. Naime, poznato je da p21 može zaustaviti prelazak G<sub>1</sub> u S i G<sub>2</sub> u M fazu ćelijskog ciklusa inhibirajući CDK4,6/cyclin-D i CDK2/cyclin-E komplekse (Karimian i sar., 2016). I drugi istraživači su pokazali da indometacin može izazvati zastoje ćelijskog ciklusa u ćelijama glioma u G<sub>2</sub>/M i G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi (Bernardi i sar., 2006). Osim toga, u modelu u kojem su ćelije glioma U138-MG tretirane indometacinom vezanim za lipidno jezgro u nanokapsulama takođe je došlo do zastoja u ćelijskom ciklusu u G<sub>2</sub>/M i u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi. U istom istraživanju pokazano je da navedeni blok ćelijskog ciklusa prethodi apoptozi (Bernardi i sar., 2013). Da je povećanje ekspresije p21, a smanjenje ekspresije CDK2 i CDK4 proteina značajno za antiproliferativno delovanje indometacina pokazano je i na ćelijskoj liniji karcinoma kolona SW480. Naime, smanjenje vijabiliteta SW480 ćelija koreliralo je sa inhibicijom ekspresije CDK2, CDK4 proteina i povećanjem ekspresije p21<sup>WAF1/PIC1</sup> u liniji u kojoj je transfektovan wild type p53 gen odnosno postoji funkcionalan p53 protein. Ovaj efekat izostao je u ćelijskoj liniji karcinoma kolona sa aberantnom formom p53, ukazujući da je za antiproliferativno dejstvo indometacina posredovano p21 proteinom bilo neophodno prisustvo funkcionalnog p53 (Xu i sar., 2005).

U narednom nizu eksperimenata ispitivani su mehanizmi ćelijske smrti indukovane indometacinom. Pokazano je da indometacin aktivira depolarizaciju mitohondrijalne membrane, povećava aktivnost kaspaza 3 i 9 i dovodi do eksternalizacije fosfatidil-serina i DNK fragmentacije. Morfološke i molekularne promene detektovane u ćelijama ukazale su da indometacin indukuje apoptozu u

gliomskim ćelijama. Proapoptosko delovanje indometacina na ćelije glioma je prethodno pokazano u svega nekoliko publikacija. Bernardi i saradnici su pokazali da indometacin indukuje apoptozu nezavisno od inhibicije COX. U pomenutom istraživanju apoptoza izazvana indometacinom bila je inhibirana farmakološkim inhibitorima proto-onkogeno c-Src kinaze, protein fosfataze-2A (PP2A) i mitogenima aktivirane protein kinaze MEK (Bernardi i sar., 2006). U drugom istraživanju apoptozu indukovanu indometacinom u ćelijama glioma pratile su promene u sintezi ceramida, defosforilaciji Akt, ekspresiji Bax gena i aktivaciji kaspaze 3 (Chang i sar., 2018). Oksidativni stres oštećuje ćeliju i aktivira niz signalnih puteva koji utiču na proliferaciju i apoptozu (Roberts i sar., 2010). Pokazano je da indometacin indukuje snažnu produkciju ROS u ćelijama mukoze želuca i ćelijskoj liniji kolorektalnog karcinoma (Giardina i sar., 1998; Naito i sar., 2006). Slično, antiproliferativno/antiapoptosko dejstvo indometacina je u ovom istraživanju bilo povezano sa porastom produkcije ROS, ukazujući na ulogu oksidativnog stresa u antitumorskom dejstvu leka na ćelije glioma.

Pošto je utvrđeno da indometacin indukuje apoptozu u gliomskim ćelijama, a imajući u vidu ranije pokazano proapoptosko delovanje AMPK (Vučićević i sar., 2009) i sposobnost drugih NSAIL kao što su aspirin, ibuprofen, flufenamička, mefenamička i tolfenamička kiselina da aktiviraju AMPK *in vitro* (Chi i sar., 2011; Din i sar., 2012; Hawley i sar., 2012; King i sar., 2015; Si i sar., 2013; Sun i sar., 2011; Sung i sar., 2011), ispitivano je da li i indometacin ostvaruje svoje antigliomsko delovanje aktivacijom AMPK. Ova hipoteza se pokazala tačnom. U ovoj disertaciji pokazano je po prvi put da indometacin aktivira AMPK i nishodne molekule Raptor i ACC. Uprkos tome što je pokazano da diklofenak smanjuje energetske status ćelije (Syed i sar., 2016) u ovom istraživanju izostao je efekat diklofenaka na aktivaciju AMPK i ova nepodudarnost ostaje da bude razjašnjena.

Poznato je da aktivacija AMPK u tumorima predstavlja protektivni mehanizam u uslovima hipoksije, deprivacije nutrijenata, niskog pH ili pri tretmanu određenim lekovima (Chuang i sar., 2015). Regulišući aktivnost nishodnih molekula, u prvom redu mTOR, tumor-supresorskih proteina, molekula koji regulišu sintezu masnih kiselina i povezane metaboličke procese, AMPK kontroliše energetske nivo ćelije, ćelijski rast i

proliferaciju. Takođe, aktivnost ovog enzima utiče na najvažnije biološke procese u ćeliji kao što su ćelijski ciklus, starenje, autofagija i apoptoza (Hardie i sar., 2016). U uslovima energetske deplecije aktivacija AMPK zaustavlja rast i proliferaciju ćelije (Fogarty i sar., 2010). Takođe, pokazano je da aktivacija AMPK različitim stimulusima indukuje zastoj u ćelijskom ciklusu i apoptozu u gliomskim, ali i drugim ćelijama (Campàs i sar., 2003; Chen i sar., 2013; Isakovic i sar., 2007; Ji i sar., 2010; Leclerc i sar., 2013; Nieminen i sar., 2013; Vucicevic i sar., 2009; Wang i sar., 2013).

Kako bi bila ispitana povezanost aktivacije AMPK sa antiproliferativnim i citotoksičnim delovanjem na ćelije glioma, korišćena je metoda genske inhibicije RNK interferencijom u cilju smanjenja ekspresije AMPK. Smanjenje ekspresije AMPK umanjilo je citotoksične i antiproliferativne efekte indometacina, što je bio dokaz učešća AMPK u efektima indometacina. Uloga AMPK je bila posredno pokazana i na drugi način - naime farmakološki aktivatori AMPK metformin i AICAR izazvali su isti mTOR-zavisni citotoksični efekat kao i indometacin u kulturi ćelija glioma. Međutim, nedavno je pokazano da obe supstance mogu da inhibiraju mTORC1 nezavisno od AMPK (Liu i sar., 2014). Pored dokazanog dejstva indometacina na aktivaciju AMPK, doprinos ove disertacije je u potvrdi uloge AMPK u antitumorskom dejstvu indometacina. Jeon i Hay predlažu da je za preživljavanje tumorskih ćelija neophodna precizna regulacija AMPK, te da i njena inhibicija i preterana aktivacija mogu biti toksične (Jeon i sar., 2015). U skladu sa tim, indometacin je indukovao snažnu i postojanu aktivaciju AMPK (u prvih 8 sati), kako u U251 ćelijama tako i u gliomskim ćelijama izolovanim iz pacijenata.

Slično kao i u ovoj studiji, u ćelijama karcinoma jednjaka aktivacija AMPK berberinom dovela je do inhibicije mTOR i p70S6K, što je bilo praćeno zastojem u G<sub>2</sub>/M fazi ćelijskog ciklusa i povećanjem ekspresije inhibitora ciklin-zavisne kinaze p21<sup>cip1</sup> (Jiang i sar., 2017). Pored dokazane antitumorske uloge na brojnim tumorskim ćelijskim linijama i životinjskim modelima bolesti, objavljeno je i nekoliko publikacija koje dovode u vezu aktivaciju AMPK sa inhibicijom proliferacije i citotoksičnim efektom na ćelije glioma *in vitro* i *in vivo* (Isakovic i sar., 2007; Lee i sar., 2012; Liu i sar., 2014; Stupp i sar., 2012; Zhao i sar., 2017). Osim toga, supstance koje u eksperimentalnom modelu glioma *in vitro* i *in vivo* aktiviraju AMPK/mTOR signalni

put pokazale su sinergistički efekat kada se koriste uz hemioterapeutik temozolomid (Yuan i sar., 2012). Prema istraživanju Liu i saradnika, selektivna farmakološka aktivacija AMPK nije dovoljna da utiče na ćelijsku proliferaciju (Liu i sar., 2014). Pošto je inhibicija AMPK samo delimično oporavila vijabilitet gliomskih ćelija tretiranih indometacinom, može se pretpostaviti da je antigliomski efekat ovog leka verovatno postignut dejstvom AMPK zavisnih i AMPK nezavisnih mehanizama.

Za ulogu ACC u ćelijskoj biologiji tumora postoji veliki istraživački interes. Maligni tumori imaju povećan energetske bilans što im omogućuje da sintetišu masne kiseline neophodne za tumorski rast. Primećeno je da je ekspresija ACC povišena u tumorskim ćelijama (Furuta i sar., 2010), a smanjenje ekspresije RNK interferencijom ili farmakološkim putem dovelo je do zastoja ćelijskog ciklusa i apoptoze (Bandyopadhyay i sar., 2006). U ovom istraživanju pokazano je da nakon tretiranja ćelija glioma indometacinom, aktivaciju AMPK prati inhibitorna fosforilacija njegovog supstrata ACC. Navedeno sugerše da bi inhibitorna fosforilacija ACC pokazana u ovoj disertaciji i posledična inhibicija sinteze masnih kiselina mogle da budu još jedan mogući mehanizam antitumorske aktivnosti indometacina.

Smanjenje fosforilacije mTORC1 i nishodnih molekula S6K i PRAS40 je vremenski sledilo aktivaciju AMPK, što ukazuje da je efekat na proliferaciju bar delimično posledica inhibicije mTOR. Dokaz u prilog ovoj tvrdnji je rezultat koji pokazuje da mTORC1 aktivator leucin (Han i sar., 2012) smanjuje stepen indometacinom-indukovane mTORC1 supresije i povećava ćeljski vijabilitet. Slično navedenom efektu u ovom istraživanju, pokazano je da indometacin i nimesulid u ćelijama kolorektalnog karcinoma mogu smanjiti rast tumora i indukuju apoptozu inhibicijom mTOR (Zhang i sar., 2011a). AMPK je negativni regulator mTOR, a uloga mTOR u ćelijskoj homeostazi mozga ima posebnu važnost. Prema podacima The Cancer Genome Atlas Network u kojem su opisane karakteristike gena eksprimiranih u ćelijama glioblastoma i stepen aktivacije signalnih puteva, povećana aktivacija PI3K/mTOR signalnog puta je prisutna u 90% uzoraka ćelija glioblastoma. Rapamycin i njegovi analozi temsirolimus, everolimus i deforolimus su mTOR inhibitori koji su pokazali izvestan stepen antiproliferativne i antitumorske aktivnosti pri pojedinačnoj upotrebi *in vitro* (Yuan i sar., 2009). Međutim, dometi dosadašnjih kliničkih studija na

obolelima od glioblastoma u terapijskom smislu su veoma skromni, pored ograničenih radioloških promena u smislu smanjenja zapremine tumora, ove supstance nisu uticale na dužinu životnog veka lečenih (Georger i sar., 2012; Wang i sar., 2015). Bez povoljnog rezultata na preživljavanje su bile i studije u kojima su inhibitori mTOR korišćeni kao augmentacija uz standardnu terapiju (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00613132, NCT01019434). Nekoliko je objašnjenja za ovakav ishod. mTOR ulazi u sastav dva različita kompleksa, mTORC1 i mTORC2, što je detaljnije objašnjeno u uvodu. mTORC1 kompleks fosforiliše nishodne molecule S6K na Thr389 i EIF4E na Ser209 i senzitivna je na dejstvo rapamicina. Iako se ranije verovalo da je mTORC2 rezistentan na rapamicin, nedavni radovi pokazali su da dugotrajni tretman rapamicinom u nekim ćelijskim linijama inhibira aktivnost ovog kompleksa (Schreiber i sar., 2015). Osim toga, pokazano je da aktivacija mTORC1 može preko S6K da suprimira aktivnost mTORC2 (Sparks i sar., 2010). Sa druge strane, mTORC2 kompleks fosforiliše Akt na S473 i tako ga aktivira (Copp i sar., 2009), a Akt direktno ili posredno aktivira mTORC1, što je stimulus za proliferaciju, ćelijsku migraciju i glikolizu (Chiang i sar., 2007). Zbog ove pozitivne povratne sprege, isiptivani su ATP-kompetitivni inhibitori oba mTOR kompleksa, pri čemu inhibicija mTORC2 dovodi do izostanka aktivacije Akt i mTORC1 (Feldman i sar., 2009; Thoreen i sar., 2009). Ovi molekuli su pre uočenog efekta na mTOR korišćeni kao inhibitori PI3K, a kako je njihov efekat usmeren na više signalnih tačaka uočeno je da imaju izraženiji antiproliferativni efekat od rapamicina, ali i značajne neželjene efekte, što je bio razlog prekida kliničkog ispitivanja u prvoj fazi (Wise-Draper i sar., 2017). U kliničkim studijama trenutno se ispituje dvostruka mTORC1 inhibicija, odnosno kombinovana modulacija usmerena na nekoliko signalnih puteva uključenih u preživljavanje ćelije, uključujući i AMPK-Akt-mTOR signalni put (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01353625, NCT03243851).

PI3K/Akt signalni put je u ćelijama glioblastoma aberantno aktiviran kao posledica mutacija u tumor-supresorskom genu za PTEN (Sansal i sar., 2004) i zato je potencijalna meta za terapiju ovog oboljenja. U ovom istraživanju je pokazano da indometacin aktivira Akt nakon 4 i 8 h, dok je nakon 16 h došlo do smanjenja njegove aktivnosti. Za razliku od promenljive kinetike aktivnosti Akt pokazane u ovoj studiji na U251 ćelijama, indometacin je u dva istraživanja kontinuirano smanjivao fosforilaciju

Akt u H4 i U87, odnosno C6 i U138-MG gliomskim ćelijama (Bernardi i sar., 2013; Chang i sar., 2018). Serin/treonin kinaza Akt se fosforiliše na Ser475 pod dejstvom mTORC2. Imajući u vidu da mTORC1 u određenim okolnostima inhibira mTORC2 (Sparks i sar., 2010), moglo bi se pretpostaviti da je indometacin preko inhibicije mTORC1 doveo do reaktivacije mTORC2 i sledstvene stimulacije Akt. Porast fosforilacije Akt u prisustvu rapamicina takođe se podudara sa ranije pokazanim rezultatima u kojima je inhibicija mTOR dovela do kompenzatorne aktivacije Akt zbog gubitka povratne sprege (Sparks i sar., 2010). Akt aktivira mTORC1 preko fosforilacije PRAS40 na Thr246 i/ili preko negativne regulacije TSC koji inhibira mTOR stimulator RHEB (Huang i sar., 2009; Sancak i sar., 2007). Naši rezultati pokazali su da je aktivacija Akt u četvrtom i osmom satu nakon tretmana praćena delimičnom reaktivacijom mTORC1 u šesnaestom satu. Međutim, stimulatorno dejstvo Akt nije uspelo da nadjača inhibicioni efekat AMPK, tako da je nivo fosforilisane forme mTOR i dalje bio niži nego u kontroli. Takođe, fosforilacija Akt i PRAS40 (Thr24) se smanjuje u šesnaestom satu inkubacije indometacinom, što sugeriše da kasno smanjenje aktivnosti Akt može doprineti održavanju inhibicije mTORC1.

Lekovi iz grupe NSAIL mogu da indukuju autofagiju aktivacijom AMPK u tumorskim ćelijama. Grupa Dina i saradnika je pokazala da AMPK aktivacija acetilsalicilnom kiselinom suprimira mTOR u ćelijama kolorektalnog karcinoma, što bi mogao da bude osnovni mehanizam antitumorskog dejstva ovog leka (Din i sar., 2012). U istom istraživanju mTOR inhibicija acetilsalicilnom kiselinom indukovala je autofagiju u ćelijama kolorektalnog karcinoma. Autofagija je takođe bila indukovana u ćelijama kolorektalnog karcinoma tretiranim NSAIL celekoksibom i sulindak sulfidom (Bauvy i sar., 2001; Huang i sar., 2010), dok je za celekoksib pokazano i da indukuje autofagiju u ćelijama glioma (Kang i sar., 2009). Međutim, indometacinom indukovana mTORC1 supresija i citotoksičnost prema ovom istraživanju nisu bili povezani sa aktiviranjem procesa autofagije. Ovo smo nedvosmisleno pokazali merenjem različitih markera autofagije: intracelularne acidifikacije, ekspresije beklina-1 i konverzije LC3. Kako izostanak povećanja LC3 II može biti i posledica njegove povećane razgradnje u autofagolizozomima, ispitavano je i šta se dešava sa njegovom koncentracijom kada se autofagolizozomalna razgradnja inhibira. Potvrđeno je da ne dolazi do povećanja

autofagnog fluksa u prisustvu blokatora protonске pumpe na membrani lizozomoma bafilomicina A1, kao i u prisustvu hlorokina i amonijum hlorida koji protonacijom smanjuju kiselost lizozoma. U skladu sa tim, inhibicija autofagije nije uticala na vijabilitet ćelija glioma tretiranih indometacinom. Izostanak značajnog uticaja na ćelijski vijabilitet indometacinom tretiranih ćelija ponovio se i nakon genske inhibicije AMPK. S druge strane, prethodno je pokazano da indometacin smanjuje autofagni fluks u ćelijama karcinoma želuca remeteći funkciju lizozoma nezavisno od aktivnosti mTOR (Vallecillo-Hernández i sar., 2018). Ova nepodudarnost rezultata u ovoj i pomenutoj studiji mogla bi se objasniti ćelijskom specifičnošću i različitim eksperimentalnim uslovima.

Pošto je nedvosmisleno utvrđena ključna uloga AMPK u antigliomskom delovanju indometacina, u nastavku je istraživano koji su to mehanizmi odgovorni za njenu aktivaciju. Iako je prethodno pokazano da drugi COX inhibitori kao što su aspirin, diklofenak i ibuprofen stimulišu AMPK (King i sar., 2015), činjenica da diklofenak, ketoprofen, naproksen u ovoj studiji nisu aktivirali AMPK indirektno sugerise da mehanizam njene aktivacije nije zavisna od inhibicije COX. Takođe, u literaturi su objavljeni i drugi COX nezavisni efekti indometacina kao što su: inhibicija proliferacije indukovane epidermalnim faktorom rasta, mTOR inhibicija u ćelijama kolorektalnog karcinoma, indukcija apoptoze u ćelijama ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća (Kokoska i sar., 1999; Sánchez-Alcázar i sar., 2003; Zhang i sar., 2011b).

Kalcijim-kalmodulin zavisna kinaza (CaMKK $\beta$ ) je poznati AMPK aktivator čija aktivnost zavisi od intracelularnog nivoa jona kalcijuma (Green i sar., 2011). U istraživanju Kinga i saradnika, inhibitor CaMKK $\beta$  nije imao uticaj na aktivaciju AMPK indukovanu aspirinom, diklofenakom i ibuprofenom, što sugerise da je aktivacija AMPK ovim NSAIL bila nezavisna od signalnog puta Ca<sup>2+</sup>/CaMKK $\beta$ /AMPK (King i sar., 2015). Sa druge strane, nedvosmisleno je pokazano da neki NSAIL, kao što je flufenamička kiselina, povećavaju koncentraciju intracelularnog Ca<sup>2+</sup> i aktiviraju CaMKK $\beta$ , koja zatim fosforiliše AMPK (Chi i sar., 2011). Zbog svega navedenog ispitali smo da li povećanje aktivnosti AMPK indukovano indometacinom zavisi od nivoa intraćelijskog Ca<sup>2+</sup> i aktivacije CaMKK $\beta$ . Nemogućnost Ca<sup>2+</sup> helatora BAPTA-

AM da utiče na fosforilaciju AMPK ukazala je da  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{CaMKK}\beta$  nisu bili uključeni u aktivaciju AMPK indometacinom.

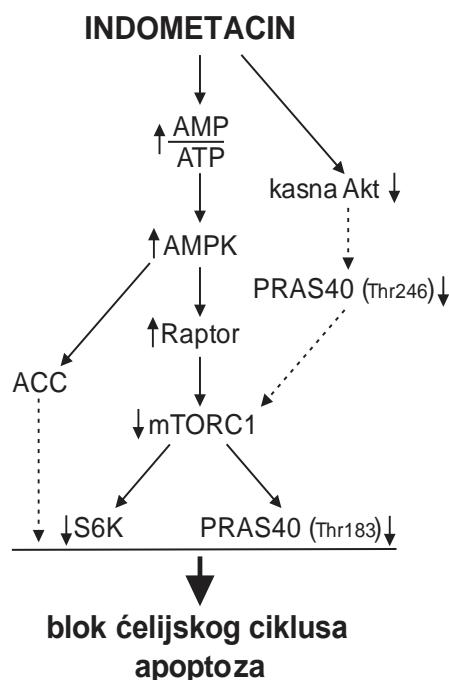
Porast AMP/ATP odnosa je jedan od glavnih signala za aktivaciju AMPK. U uslovima povoljnog energetskeg statusa, ATP onemogućava vezivanje AMP za AMPK i njegovu aktivaciju (Hardie i sar., 2014). Međutim, u prethodno objavljenim publikacijama je pokazano da indometacin inhibira oksidativnu fosforilaciju i stimuliše ATP hidrolizu, što dovodi do energetske deplecije u gliomskim i drugim maligno transformisanim i netransformisanim ćelijama (Bernardi i sar., 2007; Cooney i sar., 1979; Jacob i sar., 2001). Takođe, u ovom istraživanju je pokazano da indometacin indukuje smanjenje nivoa ATP i porast AMP. Iako nije nedvosmisleno dokazano, pretpostavljamo da bi porast odnosa AMP/ATP mogao biti glavni mehanizam aktivacije AMPK u ćelijama tretiranim indometacinom.

Istraživanja kulture primarnih tumorskih ćelija omogućila su niz fundamentalnih saznanja iz oblasti biologije tumora. Podaci dobijeni istraživanjima na komercijalnim tumorskim ćelijskim linijama, uključujući i glioblastom, ukazuju da ove ćelije ne odražavaju u potpunosti genotipske i fenotipske karakteristike primarnih tumora. Sa druge strane, primarne kulture ćelija izolovanih iz humanog tumorskog tkiva vernije predstavljaju heterogenu ćelijsku organizaciju unutar tumora, koja je posledica različitog stepena diferencijacije ćelija (Singh i sar., 2003). Stoga, primarne kulture se smatraju verodostojnijim modelom za istraživanje mehanizama kancerogeneze, ćelijske organizacije, invazivnosti i terapijske rezistencije (Seidel i sar., 2014). Deo eksperimenata u ovom istraživanju bio je urađen upravo na primarnim kulturama ćelija glioblastoma, koje su takođe bile osetljive na citotoksično dejstvo indometacina. Važno je istaći da je imunoblot analiza pokazala sličan obrazac aktivacije signalnog puta AMPK/mTORC1 u poređenju sa rezultatima u kulturi U251. Indometacin je aktivirao AMPK i molekule koje ona fosforiliše, Raptor i ACC, i smanjio aktivnost mTOR i S6K u primarnim ćelijama glioblastoma. Slično rezultatima na ćelijama U251, u primarnim glioblastomskim ćelijama tretiranim indometacinom došlo je do povećanja fosforilacije Akt, što sugeriše da inhibicija mTORC1 u prvih osam sati nije zavisila od Akt. Dakle, analogno rezultatima na U251 ćelijama, aktivacija AMPK i sledstvena inhibicija mTOR



mogle bi da budu mehanizam citotoksičnog delovanja indometacina na primarne ćelije glioblastoma.

Prvi podaci o antitumorskom dejstvu hemioterapeutika koji se danas koriste u terapiji glioma, kao što je temozolomid, potiču od *in vitro* eksperimenata na ćelijskim linijama glioma (Wedge i sar., 1997). Pre kliničkog istraživanja, novi terapijski pristup mora da bude ispitan u relevantnom predkliničkom modelu. Ispitivanje i dokazivanje novih farmakoloških efekata i mehanizama dejstava postojećih, ponekad starih i zaboravljenih lekova podstaknuto je zapažanjima nakon godina kliničke upotrebe. Sa druge strane, tehnološki napredak i nove molekularne tehnike omogućile su uvid u sasvim nova saznanja o mehanizmima delovanja, ali i novim mogućnostima njihove primene i načina isporuke u određeno tkivo. Posebno su značajni rezultati za lekove koji se u kliničkoj praksi najčešće i dugo koriste, među kojima su i NSAIL. Indometacin je lek koji ima jedinstvene farmakološke i terapijske karakteristike dejstva na centralni nervni sistem koje ga izdvajaju od drugih NSAIL. Svoje biološke efekte ostvaruje aktivacijom brojnih mehanizama koji su samo delimično poznati. Multipli mehanizmi koje smo dokazali u ovom istraživanju pokazuju da indometacin svoje citotoksične efekte na ćelije glioma ostvaruje ranom promenom energetskeg statusa u ćeliji, aktivacijom intracelularnog energetskeg senzora AMPK i nishodnih molekula ACC i Raptor. Takođe, u ranoj fazi indometacin je inhibirao aktivnost mTORC1 i molekula čiju aktivnost mTORC1 reguliše, S6K i PRAS40 (Thr183). Inhibicija mTORC1 nije bila sprečena aktivacijom kinaze Akt i njenog supstrata PRAS40 (Thr246), ali se verovatno dodatno održavala kasnom inhibicijom ovog enzima. Ovakav odnos aktivacije i međusobnog uticaja signalnih molekula doveo je do citotoksičnih efekata na ćelija glioma povećanjem ekspresije tumor-suresorskog proteina p21, blokom ćelijskog ciklusa i aktivacijom programirane apoptotske ćelijske smrti (Slika 20).



**Shema 3.** Hipotetički model citotoksičnog dejstva indometacina.

Dalja istraživanja citotoksičnih efekata indometacina na ćelije glioma treba upotpuniti translacionim modelima *in vivo*. Naime, citotoksična koncentracija leka korišćena u ovom i drugim istraživanjima bila je značajno veća od maksimalno dostignute bezbedne doze u krvi (Helleberg i sar., 1981). Savremenim tehnološkim i eksperimentalnim dostignućima u polju nanomedicine moguće je koristiti lipidne nanočestice sa indometacinom u unutrašnjosti, što omogućava postizanje većih lokalnih koncentracija leka u ciljnom tkivo (Bernardi i sar., 2013, Bernardi i sar., 2008) i dovodi do smanjenja rasta tumora u nekim animalnim modelima (Bernardi i sar., 2009; Rodrigues i sar., 2016). Mogući pravci antitumorske primene indometacina uključuju aditivno ili sinergističko delovanje sa konvencionalnim modalitetima lečenja temozolomidom i radijacionom terapijom. Takođe, kombinovana modulacija različitih signalnih puteva koji regulišu ćelijsku proliferaciju ili indukuju ćelijsku smrt intenzivno se ispituje u cilju prevazilaženja terapijske rezistencije (Choi i sar., 2014). Uticaj na više različitih molekula koji regulišu aktivnost mTORC1 je jedna od mogućih strategija u pokušaju da se terapijski deluje na visoko rezistentne tumore. Kako inhibitori mTORC1 mogu povratnom spregom da indukuju aktivaciju PI3K/Akt signalnog puta, lekovi koji istovremeno inhibiraju PI3K, Akt i mTOR mogli da budu od posebnog značaja

(Luchman i sar., 2014). Imajući u vidu da je aktivacija AMPK i inhibicija mTOR koincidirala sa aktivacijom anti-apoptotske Akt kinaze, bilo bi opravdano ispitati da li neki od Akt inhibitora može da pospeši antigliomsko delovanje indometacina. Dakle, indometacin, samostalno lokalno apliciran u većoj dozi ili u kombinaciji sa drugim lekovima mogao bi biti dobar kandidat za dalja ispitivanja u terapiji glioma visokog gradusa.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i rezultata ovoga istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Indometacin intenzivnije od ostalih ispitivanih NSAIL (diklofena, naproksena i ketoprofena) smanjuje vijabilitet U251 ćelija humane ćelijske linije glioma.
2. Indometacin smanjuje vijabilitet primarnih tumorskih ćelija izolovanih iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata obolelih od glioblastoma.
3. U U251 ćelijama glioma indometacin indukuje povećanje ekspresije tumorsupresorskog proteina p21, blok ćelijskog ciklusa i aktivaciju apoptotske ćelijske smrti povezane sa oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza.
4. Indometacin jedini od ispitivanih NSAIL (diklofenak, naproksen, ketoprofen) aktivira AMPK i inhibira mTORC1 u U251 ćelijama glioma.
5. Indometacin aktivira AMPK i inhibira mTORC1 u primarnim ćelijama glioblastoma.
6. Citotoksični efekti indometacina u ćelijama glioma su posredovani modulacijom AMPK/mTORC1 signalnog puta.

## 7. LITERATURA

- Adams, J.M., Strasser, A., 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 68(11), 4018-21.
- Alvan, G., Orme, M., Bertilsson, L., Ekstrand, R., Palmer, L., 1975. Pharmacokinetics of indomethacin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18(3), 364-73.
- Amin, R., Kamitani, H., Sultana, H., Taniura, S., Islam, A., Sho, A., Ishibashi, M., Eling, T.E., Watanabe, T., 2003. Aspirin and indomethacin exhibit antiproliferative effects and induce apoptosis in T98G human glioblastoma cells. *Neurol. Res.* 25, 370–376.
- Arjona, D., Antonio Rey, J., Taylor, S., 2006. Early Genetic Changes Involved in Low-Grade Astrocytic Tumor Development. *Curr. Mol. Med.* 6, 645–650.
- Ballou, L.M., Lin, R.Z., 2008. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J. Chem. Biol.* 1(1-4), 27-36.
- Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Wang, Y., Pai, S.K., Hirota, S., Hosobe, S., Takano, Y., Saito, K., Furuta, E., Iizumi, M., Mohinta, S., Watabe, M., Chalfant, C., Watabe, K., 2006. Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res.* 66(11), 5934-40.
- Bannwarth, B., Netter, P., Lopicque, F., Pere, P., Thomas, P., Gaucher, A., 1990. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indomethacin in humans - Relationship to analgesic activity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38, 343–346.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 444, 756–760.
- Bauvy, C., Gane, P., Arico, S., Codogno, P., Ogier-Denis, E., 2001. Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line

HT-29. *Exp. Cell Res.* 268, 139–149.

Beier, D., Röhl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., Beier, C.P., 2008. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res.* 68, 5706–15.

Benchimol, S., 2001. p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ.* 8(11), 1049-51.

Benyahia, B., Huguet, S., Declèves, X., Mokhtari, K., Crinière, E., Bernaudin, J.F., Scherrmann, J.M., Delattre, J.Y., 2004. Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: Chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J. Neurooncol.* 66, 65–70.

Bernardi, A., Bavaresco, L., Wink, M.R., Jacques-Silva, M.C., Delgado-Cañedo, A., Lenz, G., Battastini, A.M.O., 2007. Indomethacin stimulates activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 569, 8–15.

Bernardi, A., Braganhol, E., Jäger, E., Figueiró, F., Edelweiss, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M.O., 2009. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett.* 281(1), 53-63.

Bernardi, A., Frozza, R.L., Hoppe, J.B., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Battastini, A.M.O., Guterres, S.S., 2013. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int. J. Nanomedicine.* 8, 711–729.

Bernardi, A., Frozza, R.L., Jäger, E., Figueiró, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M.O., 2008. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* 586(1-3), 24-34.

- Bernardi, A., Jacques-Silva, M.C., Delgado-Cañedo, A., Lenz, G., Battastini, A.M.O., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 532(3), 214-22.
- Bigda, J., Mysliwski, A., 1998. Indomethacin inhibits kidney metastasis in Bomirski melanoma-bearing hamsters, and modulates natural killer cytotoxic activity of tumor hosts in vivo and in vitro. *Anticancer Res.* 18(5A), 3549-54.
- Blommaert, E.F.C., Krause, U., Schellens, J.P.M., Vreeling-Sindelarova, H., Meijer, A.J., 1997. The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243, 240–246.
- Bogner, C., Leber, B., Andrews, D.W., 2010. Apoptosis: Embedded in membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(6), 845-51.
- Bosetti, C., Rosato, V., Gallus, S., Cuzick, J., La Vecchia, C., 2012. Aspirin and cancer risk: A quantitative review to 2011. *Ann. Oncol.* 23(6), 1403-15.
- Brada, M., Ford, D., Ashley, S., Bliss, J.M., Crowley, S., Mason, M., Rajan, B., Traish, D., 1992. Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *Br. Med. J.* 304, 1343–1346.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brunelli, C., Amici, C., Angelini, M., Fracassi, C., Belardo, G., Santoro, M.G., 2012. The non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin activates the eIF2 $\alpha$ kinase PKR, causing a translational block in human colorectal cancer cells. *Biochem. J.* 443(2), 379-86.
- Campàs, C., López, J.M., Santidrián, A.F., Barragán, M., Bellosillo, B., Colomer, D., Gil, J., 2003. Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood.* 101(9), 3674-80.
- Castedo, M., Ferri, K.F., Kroemer, G., 2002. Mammalian target of rapamycin (mTOR):

Pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ.* 9(2), 99-100.

Chaichana, K.L., Parker, S.L., Olivi, A., Quiñones-Hinojosa, A., 2009. Long-term seizure outcomes in adult patients undergoing primary resection of malignant brain astrocytomas. Clinical article. *J. Neurosurg.* 111, 282–92.

Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29(3-4), 323-33.

Chang, C.Y., Li, J.R., Wu, C.C., Wang, J. Der, Yang, C.P., Chen, W.Y., Wang, W.Y., Chen, C.J., 2018. Indomethacin induced glioma apoptosis involving ceramide signals. *Exp. Cell Res.* 365(1), 66-77.

Chen, M. Bin, Zhang, Y., Wei, M.X., Shen, W., Wu, X.Y., Yao, C., Lu, P.H., 2013. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) mediates plumbagin-induced apoptosis and growth inhibition in cultured human colon cancer cells. *Cell. Signal.* 25(10). 1993-2002.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., Parada, L.F., 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522–526.

Cheung, P.C.F., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., Carling, D., 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase  $\gamma$ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* 346(Pt 3), 659–669.

Chi, Y., Li, K., Yan, Q., Koizumi, S., Shi, L., Takahashi, S., Zhu, Y., Matsue, H., Takeda, M., Kitamura, M., Yao, J., 2011. Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMP-activated protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339 (1), 257-66

Chiang, G.G., Abraham, R.T., 2007. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol. Med.* 13 (10), 433-42.

Choi, E.J., Cho, B.J., Lee, D.J., Hwang, Y.H., Chun, S.H., Kim, H.H., Kim, I.A., 2014. Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: Targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases.



BMC Cancer. 14: 17.

- Chu, E.C., Chai, J., Tarnawski, A.S., 2004. NSAIDs activate PTEN and other phosphatases in human colon cancer cells: Novel mechanism for chemopreventive action of NSAIDs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (3), 875-9.
- Chuang, H.-C., Chou, C.-C., Kulp, S., Chen, C.-S., 2015. AMPK as a Potential Anticancer Target - Friend or Foe? *Curr. Pharm. Des.* 78(12), 3401.
- Chung, J., Bachelder, R.E., Lipscomb, E.A., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., 2002. Integrin ( $\alpha 6\beta 4$ ) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: A survival mechanism for carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 158 (1), 165-74.
- Cooney, G.J., Dawson, A.G., 1979. Effects of indomethacin on respiration and the  $\alpha$ -glycerolphosphate shuttle in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 28, 1067–1070.
- Copp, J., Manning, G., Hunter, T., 2009. TORC-Specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser 2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res.* 69 (5), 1821-7.
- Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., Hardie, D.G., 1995. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside: A Specific Method for Activating AMP-Activated Protein Kinase in Intact Cells? *Eur. J. Biochem.* 229 (2), 558-65.
- De Benedetti, A., Graff, J.R., 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene.* 23 (18), 3189-99.
- Dibble, C.C., Asara, J.M., Manning, B.D., 2009. Characterization of Rictor Phosphorylation Sites Reveals Direct Regulation of mTOR Complex 2 by S6K1. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5657–5670.
- Din, F.V.N., Valanciute, A., Houde, V.P., Zibrova, D., Green, K.A., Sakamoto, K., Alessi, D.R., Dunlop, M.G., 2012. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology.* 142 (7), 1504-15.e3.

- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 331 (6016), 456-61.
- Eli, Y., Przeddecki, F., Levin, G., Kariv, N., Raz, A., 2001. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 61 (5), 565-71.
- Elwood, P.C., Morgan, G., Pickering, J.E., Galante, J., Weightman, A.L., Morris, D., Kelson, M., Dolwani, S., 2016. Aspirin in the treatment of cancer: Reductions in metastatic spread and in mortality: A systematic review and meta-analyses of published studies. *PLoS One*. 11 (4), e0152402.
- Elwood, P.C., Pickering, J.E., Morgan, G., Galante, J., Weightman, A.L., Morris, D., Longley, M., Mason, M., Adams, R., Dolwani, S., John Chia, W.K., Lanas, A., 2018. Systematic review update of observational studies further supports aspirin role in cancer treatment: Time to share evidence and decision-making with patients? *PLoS One*. 13(9), e0203957.
- Engel, T., Henshall, D.C., 2009. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: The ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 1 (2), 97-115.
- Eum, K.H., Lee, M., 2011. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 348 (1-2), 61-8.
- Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., Shokat, K.M., 2009. Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 7, e1000038.
- FitzGerald, G.A., Patrono, C., 2001. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* 345(6), 433-42.

- Flick, D.A., Gifford, G.E., 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 68, 167–175.
- Fogarty, S., Hardie, D.G., 2010. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1805 (2), 141-52.
- Furuta, E., Okuda, H., Kobayashi, A., Watabe, K., 2010. Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1805 (2), 141-52.
- Gàti, I., Bergström, M., Westerberg, G., Csòka, K., Muhr, C., Carlsson, J., 1990. Effects of prostaglandin and leukotriene inhibitors on the growth of human glioma spheroids. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 26 (7), 802-7.
- Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., Loewith, R., 2016. TORC2 Structure and Function. *Trends Biochem. Sci.* 41 (6), 532-545.
- Georger, B., Kieran, M.W., Grupp, S., Perek, D., Clancy, J., Krygowski, M., Ananthakrishnan, R., Boni, J.P., Berkenblit, A., Spunt, S.L., 2012. Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *Eur. J. Cancer*. 48(2), 253-62.
- Giardina, C., Inan, M.S., 1998. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1401(3), 277-88
- Green, M.F., Anderson, K.A., Means, A.R., 2011. Characterization of the CaMKK $\beta$ -AMPK signaling complex. *Cell. Signal.* 23(12), 2005-12.
- Guo, Y.C., Chang, C.M., Hsu, W.L., Chiu, S.J., Tsai, Y.T., Chou, Y.H., Hou, M.F., Wang, J.Y., Lee, M.H., Tsai, K.L., Chang, W.C., 2013. Indomethacin inhibits cancer cell migration via attenuation of cellular calcium mobilization. *Molecules*. 18(6), 6584-96.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J., 2008. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a

- Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell.* 30(2), 214-26.
- Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., Kim, S., 2012. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410–424.
- Hardie, D.G., 2015. AMPK: Positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 1-7.
- Hardie, D.G., Ashford, M.L.J., 2014. AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels. *Physiology* 29, 99–107.
- Hardie, D.G., Schaffer, B.E., Brunet, A., 2016. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* 26(3), 190-201.
- Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Peggie, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., Kemp, B.E., Sakamoto, K., Steinberg, G.R., Hardie, D.G., 2012. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science.* 336(6083), 918-22.
- He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67-93.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., De Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352(10), 997-1003.
- Helleberg, L., 1981. Clinical Pharmacokinetics of Indomethacin. *Clin. Pharmacokinet.* 6(4):245-58.
- Hojka-Osinska, A., Ziolo, E., Rapak, A., 2012. Combined treatment with fenretinide and indomethacin induces AIF-mediated, non-classical cell death in human acute T-cell leukemia Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419(3), 590-5.
- Howe, L.R., Dannenberg, A.J., 2002. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the

- prevention and treatment of cancer, in: *Seminars in Oncology*. 29(3 Suppl 11), 111-9
- Huang, J., Manning, B.D., 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 37(Pt 1), 217-22.
- Huang, S., Sinicrope, F.A., 2010. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy* 6, 256–269.
- Inoki, K., Kim, J., Guan, K.-L., 2012. AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 381-400.
- INTERPHONE Study Group, 2010. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 39, 675–94.
- Isakovic, A., Harhaji, L., Stevanovic, D., Markovic, Z., Sumarac-Dumanovic, M., Starcevic, V., Micic, D., Trajkovic, V., 2007. Dual antglioma action of metformin: Cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(10), 1290-302.
- Ishibashi, M., Bottone, F.G., Taniura, S., Kamitani, H., Watanabe, T., Eling, T.E., 2005. The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein laminin  $\gamma$ 1 in human glioblastoma cells. *Exp. Cell Res.* 302(2), 244-52.
- Jacob, M., Bjarnason, I., Rafi, S., Wrigglesworth, J., Simpson, R.J., 2001. A study of the effects of indometacin on liver mitochondria from rats, mice and humans. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 1837–1842.
- Jeon, S.M., Hay, N., 2015. The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications. *Arch. Pharm. Res.* 38 (3), 346-57.
- Ji, C., Yang, B., Yang, Y.L., He, S.H., Miao, D.S., He, L., Bi, Z.G., 2010. Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition.

Oncogene. 29 (50), 6557-68.

- Jiang, S.X., Qi, B., Yao, W.J., Gu, C.W., Wei, X.F., Zhao, Y., Liu, Y.Z., Zhao, B.S., 2017. Berberine displays antitumor activity in esophageal cancer cells in vitro. *World J. Gastroenterol.* 23 (14), 2511-2518.
- Johannesdottir, S.A., Chang, E.T., Mehnert, F., Schmidt, M., Olesen, A.B., Saørensen, H.T., 2012. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of skin cancer: A population-based case-control study. *Cancer.* 118 (19), 4768-76
- Jukić, M.K., Luetič, A.T., Škudar-Lukinović, V., Andreis, I., 2010. The antimetastatic effect of macrophages restored by indomethacin: Concomitant tumor immunity model. *Coll. Antropol.* 34(3), 899-904.
- Kang, K., Zhu, C., Yong, S., Gao, Q., Wong, M., 2009. Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy. *Mol. Cancer* 8, 66.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B., 2016. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 42, 63-71.
- Kerkhof, M., Dielemans, J.C.M., van Breemen, M.S., Zwinkels, H., Walchenbach, R., Taphoorn, M.J., Vecht, C.J., 2013. Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro. Oncol.* 15, 961–7.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26(4), 239–257.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- King, T.S., Russe, O.Q., Möser, C. V., Ferreirós, N., Kynast, K.L., Knothe, C., Olbrich, K., Geisslinger, G., Niederberger, E., 2015. AMP-activated protein kinase is activated by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 762, 299-305.

- Kokoska, E.R., Smith, G.S., Wolff, A.B., Deshpande, Y., Miller, T.A., 1999. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs attenuate epidermal growth factor- induced proliferation independent of prostaglandin synthesis inhibition. *J. Surg. Res.* 84 (2), 186-92.
- Kuida, K., 2000. Caspase-9. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 (2), 121-4.
- Kung, C.P., Budina, A., Balaburski, G., Bergenstock, M.K., Murphy, M.E., 2011. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 21 (1), 71-100.
- La Fougère, C., Suchorska, B., Bartenstein, P., Kreth, F.W., Tonn, J.C., 2011. Molecular imaging of gliomas with PET: Opportunities and limitations. *Neuro. Oncol.* 13(8), 806–819.
- Langendorf, C.G., Kemp, B.E., 2015. Choreography of AMPK activation. *Cell Res.* 25 (1), 5-6.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149 (2), 274-93.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2010. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421–32.
- Leclerc, G.M., Leclerc, G.J., Kuznetsov, J.N., DeSalvo, J., Barredo, J.C., 2013. Metformin Induces Apoptosis through AMPK-Dependent Inhibition of UPR Signaling in ALL Lymphoblasts. *PLoS One.* 8 (8), e74420.
- Lee, D.H., Lee, T.H., Jung, C.H., Kim, Y.H., 2012. Wogonin induces apoptosis by activating the AMPK and p53 signaling pathways in human glioblastoma cells. *Cell. Signal.* 24, 2216–2225.
- Leidgens, V., Seliger, C., Jachnik, B., Welz, T., Leukel, P., Vollmann-Zwerenz, A., Bogdahn, U., Kreutz, M., Grauer, O.M., Hau, P., 2015. Ibuprofen and diclofenac restrict migration and proliferation of human glioma cells by distinct molecular mechanisms. *PLoS One.* 10 (10), e0140613.

- Levin, G., Kariv, N., Khomiak, E., Raz, A., 2000. Indomethacin inhibits the accumulation of tumor cells in mouse lungs and subsequent growth of lung metastases. *Chemotherapy*. 46 (6), 429-37.
- Liu, X., Chhipa, R.R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L.M.L., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., McPherson, C., Warnick, R.E., Kendler, A., Giri, S., Poels, J., Norga, K., Viollet, B., Grabowski, G.A., Dasgupta, B., 2014. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (4), E435-44.
- Liu, Y., Hu, X., Shan, X., Chen, K., Tang, H., 2019. Rosiglitazone metformin adduct inhibits hepatocellular carcinoma proliferation via activation of AMPK/p21 pathway. *Cancer Cell Int.* 19, 13.
- Llambi, F., Green, D.R., 2011. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 12–20.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131 (6), 803-20.
- Luchman, H.A., Stechishin, O.D.M., Nguyen, S.A., Lun, X.Q., Cairncross, J.G., Weiss, S., 2014. Dual mTORC1/2 blockade inhibits glioblastoma brain tumor initiating cells in Vitro and in Vivo and synergizes with temozolomide to increase orthotopic xenograft survival. *Clin. Cancer Res.* 20 (22), 5756-67.
- 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), 903-14.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., Reggiori, F., 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455.
- Minniti, G., Traish, D., Ashley, S., Gonsalves, A., Brada, M., 2005. Risk of second



brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update after an additional 10 years. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 800–4.

Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B., 2010. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 140 (3), 313-26.

Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107-32.

Morecki, S., Yacovlev, E., Gelfand, Y., Trembovler, V., Shohami, E., Slavin, S., 2000. Induction of antitumor immunity by indomethacin. *Cancer Immunol. Immunother.* 48 (11), 613-20.

Morita, M., Gravel, S.P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., Topisirovic, I., 2015. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity. *Cell Cycle.* 14 (4), 473-80.

Nagata, D., Mogi, M., Walsh, K., 2003. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J. Biol. Chem.* 278 (33), 31000-6.

Naito, Y., Yoshikawa, T., 2006. Oxidative stress involvement and gene expression in indomethacin-induced gastropathy. *Redox Rep.* 11 (6), 243-53.

Nakamura, J.L., Garcia, E., Pieper, R.O., 2008. S6K1 plays a key role in glial transformation. *Cancer Res.* 68 (16), 6516-23.

Nieminen, A.I., Eskelinen, V.M., Haikala, H.M., Tervonen, T.A., Yan, Y., Partanen, J.I., Klefström, J., 2013. Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (20), E1839-48.

Nunes, M.C., Roy, N.S., Keyoung, H.M., Goodman, R.R., McKhann, G., Jiang, L., Kang, J., Nedergaard, M., Goldman, S.A., 2003. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat. Med.* 9, 439–47.

- O'Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., Baselga, J., Rosen, N., 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 66 (3), 1500-8.
- Oh, W.J., Jacinto, E., 2011. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle.* 10 (14), 2305-16.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19 (4), 764-72.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., Wrensch, M.R., Barnholtz-Sloan, J.S., 2014. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro. Oncol.* 16 (7), 896-913.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B., Bao, J.K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45 (6), 487-98.
- Parepally, J.M.R., Mandula, H., Smith, Q.R., 2006. Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin. *Pharm. Res.* 23 (5), 873-81.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K.N., Shinjo, S.M.O., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 321 (5897), 1807-12.
- Pekmez, M., Önay-Uçar, E., Arda, N., 2015. Effect of  $\alpha$ -tocopheryl succinate on the molecular damage induced by indomethacin in C6 glioma cells. *Exp. Ther. Med.* 9 (2), 585-590.

- Pietras, A., Katz, A.M., Ekström, E.J., Wee, B., Halliday, J.J., Pitter, K.L., Werbeck, J.L., Amankulor, N.M., Huse, J.T., Holland, E.C., 2014. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell* 14, 357–69.
- Pópulo, H., Lopes, J.M., Soares, P., 2012. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2), 1886-918.
- Qiang, L., Yang, Y., Ma, Y.J., Chen, F.H., Zhang, L.B., Liu, W., Qi, Q., Lu, N., Tao, L., Wang, X.T., You, Q.D., Guo, Q.L., 2009. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 279, 13–21.
- Raicevic, N., Mladenovic, A., Perovic, M., Harhaji, L., Miljkovic, D., Trajkovic, V., 2005. Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology* 48, 720–731.
- Roberts, R.A., Smith, R.A., Safe, S., Szabo, C., Tjalkens, R.B., Robertson, F.M., 2010. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology.* 276 (2), 85-94
- Rodrigues, S.F., Fiel, L.A., Shimada, A.L., Pereira, N.R., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Farsky, S.H., 2016. Lipid-core nanocapsules act as a drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administration. *J. Biomed. Nanotechnol.* 12, 986–1000.
- Ron, E., Modan, B., Boice, J.D., Alfandary, E., Stovall, M., Chetrit, A., Katz, L., 1988. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N. Engl. J. Med.* 319, 1033–9.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P., Meade, T.W., 2010. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 376, 1741–1750.
- Sadetzki, S., Chetrit, A., Freedman, L., Stovall, M., Modan, B., Novikov, I., 2005. Long-Term Follow-up for Brain Tumor Development after Childhood Exposure to Ionizing Radiation for Tinea Capitis. *Radiat. Res.* 163, 424–432.

- Saegusa, M., Hashimura, M., Kuwata, T., Hamano, M., Okayasu, I., 2004.  $\beta$ -Catenin Simultaneously Induces Activation of the p53-p21WAF1 Pathway and Overexpression of Cyclin D1 during Squamous Differentiation of Endometrial Carcinoma Cells. *Am. J. Pathol.* 164 (5), 1739-49.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., Van Gorp, M., Van Loo, G., Vandenabeele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23 (16), 2861-74.
- Salk, J.J., Fox, E.J., Loeb, L.A., 2010. Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 51–75.
- Sanai, H., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, H., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Verdugo, J.M.G., Berger, M.S., Alvarez-Buylla, A., 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., Berger, M.S., 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* 353, 811–22.
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., Sabatini, D.M., 2007. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol. Cell.* 25 (6), 903-15.
- Sánchez-Alcázar, J.A., Bradbury, D.A., Pang, L., Knox, A.J., 2003. Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer.* 40 (1), 33-44.
- Sansal, I., Sellers, W.R., 2004. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J. Clin. Oncol.* 22 (14), 2954-63.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., Sabatini, D.M., 2006. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159–168.
- Sato, T., Nakashima, A., Guo, L., Coffman, K., Tamanoi, F., 2010. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human

- cancer. *Oncogene*. 29 (18), 2746-52.
- Scheurer, M.E., Amirian, E.S., Davlin, S.L., Rice, T., Wrensch, M., Bondy, M.L., 2011. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int. J. Cancer*. 129 (9), 2290-6.
- Scheurer, M.E., El-Zein, R., Thompson, P.A., Aldape, K.D., Levin, V.A., Gilbert, M.R., Weinberg, J.S., Bondy, M.L., 2008. Long-term anti-inflammatory and antihistamine medication use and adult glioma risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (5), 1277-81.
- Schreiber, K.H., Ortiz, D., Academia, E.C., Anies, A.C., Liao, C.Y., Kennedy, B.K., 2015. Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell*. 14 (2), 265-73.
- Schweitzer, G.H., Vince, C., Roosen, H.K., Tonn, J.C., 2001. Extraneural metastases of primary brain tumors. *J. Neurooncol.* 53 (2), 107-14.
- Seidel, S., Garvalov, B.K., Acker, T., 2014. Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. *Methods Mol. Biol.* 1235, 263-75
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., Andrews, D.W., 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813 (4), 508-20.
- Si, M., Yan, Y., Tang, L., Wu, Honghai, Yang, B., He, Q., Wu, Haoshu, 2013. A novel indole derivative compound GY3 improves glucose and lipid metabolism via activation of AMP-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 698(1-3):480-488.
- Sim, A.T.R., Hardie, D.G., 1988. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 233 (2), 294-8.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B., 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63

(18), 5821-8.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.

Smith, M.L., Hawcroft, G., Hull, M.A., 2000. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cellsevidence of different mechanisms of action. *Eur. J. Cancer.* 36(5), 664-74.

Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.-H., Lee, J., Fine, H.A., 2009. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440–52.

Sparks, C.A., Guertin, D.A., 2010. Targeting mTOR: Prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene.* 29 (26), 3733-44

Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A., Kemp, B.E., 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J. Biol. Chem.* 271 (2), 611-4.

Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Lluch, A., Neve, R.M., Kuo, W.L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., Symmans, W.F., Pusztai, L., Nolden, L.K., Horlings, H., Berns, K., Hung, M.C., Van De Vijver, M.J., Valero, V., Gray, J.W., Bernards, R., Mills, G.B., Hennessy, B.T., 2008. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 68 (15), 6084-91.

Stupp, R., Mason, W.P., Van Den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., 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. *N. Engl. J. Med.* 352(10), 987-96.

Stupp, R., Wong, E., Scott, C., Taillibert, S., Kanner, A., Kesari, S., Ram, Z., 2014. NT-40 \* Interim Analysis of the EF-14 Trial: A Prospective, Multi-center Trial of

NovoTTF-100A Together With Temozolomide Compared to Temozolomide Alone in Patients with Newly Diagnosed GBM. *Neuro. Oncol.* 16, v167-v167.

Stupp, R., Wong, E.T., Kanner, A.A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E.D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., Ram, Z., Villano, J.L., Rainov, N., Weinberg, U., Schiff, D., Kunschner, L., Raizer, J., Honnorat, J., Sloan, A., Malkin, M., Landolfi, J.C., Payer, F., Mehdorn, M., Weil, R.J., Pannullo, S.C., Westphal, M., Smrcka, M., Chin, L., Kostron, H., Hofer, S., Bruce, J., Cosgrove, R., Paleologous, N., Palti, Y., Gutin, P.H., 2012. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur. J. Cancer.* 48(14), 2192-202

Suleyman, H., Albayrak, A., Bilici, M., Cadirci, E., Halici, Z., 2010. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. *Inflammation.* 33, 224–234.

Sun, J. jun, Wang, Z. yu, Liu, B., Zhong, Y. feng, Du, J., Chen, Y. yu, Ma, C. cheng, Chen, X. dong, 2006. Inhibiting cerebral glioma growth with continuous low-dose chemotherapy and cyclooxygenase-2 inhibitor in nude mice. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 38(3), 252-6.

Sun, S.Y., 2011. Understanding the role of the death receptor 5/FADD/caspase-8 death signaling in cancer metastasis. *Mol. Cell. Pharmacol.* 3(1), 31-34.

Sung, J.Y., Choi, H.C., 2011. Aspirin-induced AMP-activated protein kinase activation regulates the proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 312–317.

Syed, M., Skonberg, C., Hansen, S.H., 2016. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicol. Vitr.* 31, 93-102.

Takkouche, B., Regueira-Méndez, C., Etmnan, M., 2008. Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 100(20), 1439-47.

- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., 2008. LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.* 445, 77–88.
- Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., Gray, N.S., 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284, 8023–8032.
- Thornton, C., Snowden, M.A., Carling, D., 1998. Identification of a novel AMP-activated protein kinase  $\beta$  subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 273(20), 12443-50.
- Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L., Losón, O.C., Hellberg, K., Young, N.P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D.C., Shaw, R.J., 2016. Metabolism: AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science.* 351(6270), 275-281.
- van Breemen, M.S.M., Rijsman, R.M., Taphoorn, M.J.B., Walchenbach, R., Zwinkels, H., Vecht, C.J., 2009. Mèlanie S. M. van Breemen Affiliated with Neuro-oncology Unit, Department of Neurology, Medical Center The Hague , R. M. Rijsman, M. J. B. Taphoorn, R. Walchenbach, H. Zwinkels, Charles J. Vech. *J. Neurol.* 256, 1519–26.
- VanderPluym, J., 2015. Indomethacin-Responsive Headaches. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 15(2), 516.
- Vucicevic, L., Misirkic, M., Janjetovic, K., Harhaji-Trajkovic, L., Prica, M., Stevanovic, D., Isenovic, E., Sudar, E., Sumarac-Dumanovic, M., Micic, D., Trajkovic, V., 2009. AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms underlying in vitro antiglioma action of compound C. *Biochem. Pharmacol.* 77(11), 1684–1693.
- Wang, B., Wang, X. bao, Chen, L. yu, Huang, L., Dong, R. zen, 2013. Belinostat-induced apoptosis and growth inhibition in pancreatic cancer cells involve activation of TAK1-AMPK signaling axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437(1), 1-6.



- Wang, H., Xu, T., Jiang, Y., Xu, H., Yan, Y., Fu, D., Chen, J., 2015. The Challenges and the Promise of Molecular Targeted Therapy in Malignant Gliomas. *Neoplasia*. 17(3), 239-55.
- Wedge, S.R., Porteous, J.K., Glaser, M.G., Marcus, K., Newlands, E.S., 1997. In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer. Drugs*. 8(1), 92-7.
- Weiler, M., Hartmann, C., Wiewrodt, D., Herrlinger, U., Gorlia, T., Bähr, O., Meyermann, R., Bamberg, M., Tatagiba, M., von Deimling, A., Weller, M., Wick, W., 2010. Chemoradiotherapy of Newly Diagnosed Glioblastoma With Intensified Temozolomide. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 77(3), 670-6.
- Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R., Wick, W., 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we there yet? *Neuro. Oncol.* 15(1), 4-27.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R., Reifenberger, G., 2015. Glioma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 15017.
- Wick, W., Menn, O., Meisner, C., Steinbach, J., Hermisson, M., Tatagiba, M., Weller, M., 2005. Pharmacotherapy of epileptic seizures in glioma patients: who, when, why and how long? *Onkologie* 28, 391-6.
- Wise-Draper, T.M., Moorthy, G., Salkeni, M.A., Karim, N.A., Thomas, H.E., Mercer, C.A., Beg, M.S., O'Gara, S., Olowokure, O., Fathallah, H., Kozma, S.C., Thomas, G., Rixe, O., Desai, P., Morris, J.C., 2017. A Phase Ib Study of the Dual PI3K/mTOR Inhibitor Dactolisib (BEZ235) Combined with Everolimus in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Target. Oncol.* 12, 323-332.
- Wiza, C., Nascimento, E.B.M., Ouwens, D.M., 2012. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 302(12), E1453-60.
- Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A., Stein, J., 2001. Downregulation of the Cyclin D1/Cdk4 Complex Occurs during Resveratrol-Induced Cell Cycle Arrest in Colon

Cancer Cell Lines. *J. Nutr.* 131, 2197–2203.

- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., Carling, D., 2005. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2, 21–33.
- Xie, Z., Nair, U., Klionsky, D.J., 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell.* 19(8), 3290–3298.
- Xu, M.H., Zhang, G.Y., 2005. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. *World J. Gastroenterol.* 11, 1693–1696.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Bigner, D.D., 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 26, 701–7.
- Yan, K., Yang, K., Rich, J.N., 2013. The evolving landscape of glioblastoma stem cells. *Curr. Opin. Neurol.* 26(6), 701-7.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(2), 124-31
- Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., Kang, S.A., 2010. Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. *Mol. Cell* 38, 768–774.
- 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 Lett.* 367(1), 58-68.
- Yuan, R., Kay, A., Berg, W.J., Lebowitz, D., 2009. Targeting tumorigenesis: Development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* 2, 45.

- Yuan, Y., Xue, X., Guo, R., Sun, X., Hu, G., 2012. Resveratrol Enhances the Antitumor Effects of Temozolomide in Glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR Signaling Pathway. *CNS Neurosci. Ther.* 18, 536–546.
- Yuile, P., Dent, O., Cook, R., Biggs, M., Little, N., 2006. Survival of glioblastoma patients related to presenting symptoms, brain site and treatment variables. *J. Clin. Neurosci.* 13, 747–751.
- Zhang, W. Bin, Wang, Z., Shu, F., Jin, Y.H., Liu, H.Y., Wang, Q.J., Yang, Y., 2010. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *J. Biol. Chem.* 285(52), 40461-71.
- Zhang, Y.J., Bao, Y.J., Dai, Q., Yang, W.Y., Cheng, P., Zhu, L.M., Wang, B.J., Jiang, F.H., 2011a. MTOR signaling is involved in indomethacin and nimesulide suppression of colorectal cancer cell growth via a COX-2 independent pathway. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 580–588.
- Zhao, W., Peng, F., Shu, M., Liu, H., Hou, X., Wang, X., Ye, J., Zhao, B., Wang, K., Zhong, C., Xue, L., Gao, M., Liu, Y., Zhao, S., 2017. Isogambogenic Acid Inhibits the Growth of Glioma Through Activation of the AMPK-mTOR Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 44, 1381–1395.
- Zhou, B.P., Hu, M.C.T., Miller, S.A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S.Y., Hung, M.C., 2000. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF- $\kappa$ B pathway. *J. Biol. Chem.* 275(11), 8027-31.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108(8), 1167-74.
- Zhou, X., Yang, Y., Ma, P., Wang, N., Yang, D., Tu, Q., Sun, B., Xiang, T., Zhao, X., Hou, Z., Fang, X., 2019. TRIM44 is indispensable for glioma cell proliferation and cell cycle progression through AKT/p21/p27 signaling pathway. *J. Neurooncol.*

145(2), 211-222.

Zibrova, D., Vandermoere, F., Göransson, O., Peggie, M., Mariño, K. V., Knierim, A., Spengler, K., Weigert, C., Viollet, B., Morrice, N.A., Sakamoto, K., Heller, R., 2017. GFAT1 phosphorylation by AMPK promotes VEGF-induced angiogenesis. *Biochem. J.* 474, 983–1001.

## Biografija kandidata

Dr Aleksandar Pantović je rođen 27.09.1982. godine u Baru. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2008. godine. Nakon osnovnih studija medicine bio je zaposlen na Medicinskom fakultetu u Beogradu na projektima Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: Imunomodulatorno, citoprotektivno i citotoksično dejstvo nanočestica (broj projekta 145073) i Modulacija unutarćelijskog energetskeg balansa – kontrola signalnih puteva u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja (broj projekta 41025). Rukovodilac navednih projekata i mentor kandidata za doktorsku disertaciju je prof. dr Vladimir Trajkovic, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Specijalistički ispit iz neurologije položio je u decembru 2016. godine na Klinici za neurologiju Vojnomedicinske akademije, mentor tokom specijalističkog staža bila je prof. dr Evica Dinčić. Dr Aleksandar Pantović je zaposlen na Klinici za neurologiju Vojnomedicinske akademije. Član je Društva mladih neurologa Srbije, Društva za neuronauke Srbije, Međunarodnog udruženja za neuroimunologiju i Međunarodnog udruženja za nevoljne pokrete.

### **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: “Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u in vitro citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije glioma” koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

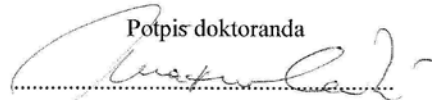
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

#### 1. Autorstvo

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

U Beogradu, 18.06.2020.

Potpis doktoranda



Dr Aleksandar Pantović

**Izjava o autorstvu**

Potpisani: Dr Aleksandar Pantović

Broj upisa: 5118/16

Izjavljujem

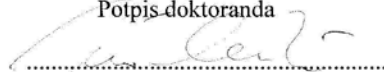
Da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u in vitro citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije glioma”

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

U Beogradu, 18.07.2020.

Potpis doktoranda



Dr Aleksandar Pantović

### **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: “Uloga adenozin-monofosfatom aktivirane protein-kinaze i mTOR kompleksa 1 u in vitro citotoksičnom dejstvu nesteroidnih anti-inflamatornih lekova na ćelije glioma” koja je moje autorsko delo.

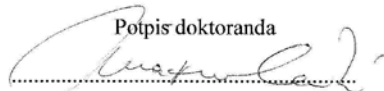
Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

#### 1. Autorstvo

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

U Beogradu, 18.06.2020.

Potpis doktoranda  


Dr Aleksandar Pantović