

Mehanizam diferencijacije stanica akutne mijeloične leukemije potaknute citarabinom

Smoljo, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:023718>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Tomislav Smoljo

**Mehanizam diferencijacije stanica
akutne mijeloične leukemije
potaknute citarabinom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Tomislav Smoljo

**Mehanizam diferencijacije stanica
akutne mijeloične leukemije
potaknute citarabinom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za staničnu biologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Dora Višnjić

Istraživanje je financirano projektima:

- HRZZ projekt „Signalni mehanizmi i metaboličke promjene u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije” IP 2016-06-4581 i DOK-2020-01-2873., voditeljica: prof.dr.sc. Dora Višnjić

- HRZZ projekt „Oštećenje DNA i diferencijacija akutne mijeloične leukemije” IP 2022-10-9146, voditeljica: prof.dr.sc. Dora Višnjić

- „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“; Znanstveni centar izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, GA KK.01.1.1.01.0007, voditelj: prof. dr. sc. Miloš Judaš

- Sveučilišna potpora znanstvenim istraživanjima, voditeljica projekta: prof.dr.sc. Dora Višnjić

ZAHVALA

Prvo želim zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Dori Višnjić, koja je za mene uzor znanstvenice i profesorice. Tijekom izrade ovog istraživanja profesorica mi je pružila savjete i pomoć, ali me i poticala da razvijam vlastite interese i ideje. Hvala dr. sc. Barbari Tomić mojoj „mlađoj mentorici“ koja me naučila laboratorijske metode korištene u ovom istraživanju i pomogla mi u izradi pokusa. Hvala „braci i seki“, doc. dr. sc. Hrvoju Laliću, našem stručnjaku za protočnu citometriju i doc. dr. sc. Vilmi Dembitz koja je bila izvor svih nedostupnih protokola, informacija i materijala za pokuse, kao i pomoć u analizi podataka. Hvala Marijani Andrijašević koja je uvijek prisutna za pomoć i odgovorna da labos ovako uredno funkcionira. Hvala i ekipi s kata za stručnu pomoć, ali i druženja zbog kojih sam imao tako dobru radnu okolinu. Na kraju, zahvalan sam svim članovima obitelji i prijateljima koji su mi pružili ljubav i podršku prije i tijekom rada na ovom istraživanju.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Akutna mijeloična leukemija.....	1
1.2. Diferencijacijska terapija akutne mijeloične leukemije.....	5
1.2.1. Diferencijacija potaknuta inhibitorima sinteze pirimidina.....	8
1.3. Stanični ciklus.....	10
1.3.1. Signalni put ATR/Chk1.....	12
1.4. Citarabin.....	13
1.4.1. Niske doze citarabina.....	14
1.5. Stroma koštane srži.....	15
1.5.1. Mezenhimalne stromalne stanice i hematopoetske matične stanice.....	16
1.5.2. Mezenhimalne stromalne stanice i maligni blasti.....	17
1.6. Modeli za istraživanje akutne mijeloične leukemije.....	18
2. HIPOTEZA.....	22
3. CILJEVI RADA.....	23
3.1. Opći cilj.....	23
3.2. Specifični ciljevi.....	23
4. MATERIJALI I METODE.....	24
4.1. Kemikalije.....	24
4.2. Stanična kultura i kokultura.....	29
4.3. Analiza staničnog ciklusa i analiza stanične smrti.....	31
4.4. Slobodni radikali kisika.....	31
4.5. Imunofenotipizacija.....	32
4.6. Analiza citokina.....	32
4.7. Morfološka analiza.....	33
4.8. Stanični lizati i Western blot.....	33
4.9. siRNA-transfekcija.....	34
4.10. Sekvenciranje RNA.....	35
4.11. Statistička analiza.....	36
5. REZULTATI.....	37
5.1. Citarabin smanjuje proliferaciju, potiče diferencijaciju i aktivira Chk1 ovisno o dozi.....	37

5.2.	Farmakološka inhibicija signalnog puta ATR/Chk1 sprječava diferencijaciju i zastoj u staničnom ciklusu	41
5.3.	Smanjenje količine proteina Chk1 smanjuje učinke citarabina na izražaj diferencijacijskih biljega i zastoj u S-fazi staničnog ciklusa, a povećava apoptozu	43
5.4.	Citarabin i farmakološki inhibitori signalnog puta ATR/Chk1 imaju slične učinke na proliferaciju i diferencijaciju stanica druge monocitne leukemijske stanične linije	45
5.5.	Stromalne stanice smanjuju učinke niske doze citarabina na diferencijaciju i zastoj u staničnom ciklusu leukemijske stanične linije U937.....	47
5.6.	Učinci stromalnih stanica ne ovise o mutacijskom statusu <i>p53</i> i <i>FLT3</i> leukemijskih staničnih linija.....	52
5.7.	Visoka doza citarabina utječe na broj i fenotip stromalnih stanica	56
5.8.	Stromalne stanice smanjuju aktivaciju citokinskih signalnih puteva potaknutih niskom dozom citarabina.....	58
5.9.	Inhibicija kontakta između stanica i inhibicija signaliziranja putem CXCL12 i TGF- β ne poništavaju učinke stromalnih stanica MS-5 na diferencijaciju stanica U937	60
5.10.	Prisutnost stromalnih stanica MS-5 ne smanjuje razinu slobodnih radikala kisika u stanicama U937 tretiranim niskim dozama citarabina	62
6.	RASPRAVA	65
6.1.	Citarabin u niskoj dozi aktivira Chk1 i uzrokuje diferencijaciju leukemijskih stanica	65
6.2.	Stromalne stanice koštane srži smanjuju učinke niske doze citarabina na diferencijaciju leukemijskih stanica	68
7.	ZAKLJUČCI.....	74
8.	SAŽETAK	75
9.	SUMMARY	76
10.	LITERATURA.....	77
11.	ŽIVOTOPIS	91

POPIS KRATICA

AIKAr	5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleozid
AML	akutna mijeloična leukemija
AMP	adenozin-5'-monofosfat (prema engl. <i>adenosine-5'-monophosphate</i>)
AMPK	kinaza ovisna o AMP-u (prema engl. <i>AMP-activated kinase</i>)
APL	akutna promijelocitna leukemija
AraC	1- β -D-arabinofuranozilcitozin ili citozin-arabinozid ili citarabin
AraCTP	citozin-arabinozid-trifosfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat (prema engl. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
ATR	ataksija telangiektazija-mutirana i povezana s Rad3 kinaza (prema engl. <i>ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related kinase</i>)
ATRA	sve-trans-retinska kiselina (prema engl. <i>all-trans-retinoic acid</i>)
BSA	goveđi serumski albumin (prema engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CD	biljeg diferencijacije (prema engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	protein ciklusa stanične diobe (prema engl. <i>cell division cycle protein</i>)
Cdk1	kinaza ovisna o ciklinima 1 (prema engl. <i>cyclin-dependent kinase 1</i>)
Chk1	kinaza kontrolne točke 1 (prema engl. <i>checkpoint kinase 1</i>)
CXCL12	CXC kemokinski ligand 12
CXCR4	CXC kemokinski receptor 4
DHODH	dihidroorotat-dehidrogenaza
DMSO	dimetil-sulfoksid

EDTA	etilen-diamin tetraoctena kiselina (prema engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELN	Europska mreža za leukemije (prema engl. <i>European Leukemia Network</i>)
FAB-klasifikacija	klasifikacija AML-a francuskih, američkih i britanskih patologa (prema engl. <i>the French-American-British (FAB) classification of AML</i>)
FBS	fetusni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (prema engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FGF2	fibroblastni čimbenik rasta 2 (prema engl. <i>fibroblast growth factor 2</i>)
FITC	fluorescein-izotiocijanat (prema engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FLT3	FMS-u slična tirozinska kinaza 3 (prema engl. <i>feline McDonough sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3</i>)
G-CSF	čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija (prema engl. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	čimbenik stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (prema engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
ICC	Klasifikacija mijeloidnih neoplazmi i akutnih leukemija temeljena na međunarodnom konsenzusu (prema engl. <i>International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias</i>)
IDH	izocitrat-dehidrogenaza
M-CSF	čimbenik stimulacije makrofagnih kolonija (prema engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MFI	srednji intenzitet fluorescencije (prema engl. <i>mean fluorescence intensity</i>)
mTOR	ciljna molekula rapamicina u sisavaca (prema engl. <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i>)

PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatom (prema engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
ROS	slobodni radikali kisika (prema engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SCF	čimbenik matičnih stanica (prema engl. <i>stem cell factor</i>)
SD	standardna devijacija
SDS-PAGE	elektroforeza s natrijevim dodecil-sulfatom na poliakrilamidnom gelu (prema engl. <i>SDS – sodium dodecyl sulfate, PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
siRNA	mala interferirajuća RNA (prema engl. <i>small interfering RNA</i>)
TGF- β	transformirajući čimbenik rasta β (prema engl. <i>transforming growth factor β</i>)
UMP	uridin-5'-monofosfat (prema engl. <i>uridine monophosphate</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. <i>World Health Organization</i>)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Akutna mijeloična leukemija

Akutna mijeloična leukemija (AML) je najčešća akutna leukemija u odraslih obilježena čestim relapsima i niskim preživljenjem. Medijan dobi u trenutku dijagnoze je 68 godina pa većina oboljelih ima komorbiditete koji uz fiziološke, funkcionalne i socijalne čimbenike vezane za stariju dob otežavaju liječenje i povećavaju mortalitet. U oboljelih od AML-a koji su stariji od 60 godina petogodišnje preživljenje je između 5 i 10 %, dok je u mlađih od 60 godina petogodišnje preživljenje do 50 % (1–3).

Odabir najbolje terapijske opcije i ishod bolesti ovise o podtipu AML-a. AML je heterogena skupina malignih bolesti karakteriziranih nekontroliranom proliferacijom i zastojem u mijeloidnoj diferencijaciji. Stanice različitih podtipova AML-a imaju razne citogenetske abnormalnosti i mutacije koje određuju fenotip bolesti, odgovor na terapiju, rizik za relaps i preživljenje oboljelih (3). Analiza bolesti na staničnoj razini i određivanja podtipa AML-a se sve brže mijenja zahvaljujući napretku tehnologije i novim metodama analiziranja molekularnih karakteristika malignih stanica (4). Francusko-američko-britanska (FAB) klasifikacija akutnih leukemija se temelji na morfološkim i citokemijskim metodama za analizu malignih blasta. Prema FAB-klasifikaciji mijeloične leukemije su podijeljene s obzirom na sličnost malignih blasta stanicama normalne hematopoeze prema smjeru diferencijacije (granulocitna, monocitna ili eritroblastna) i stupnju u kojem je došlo do zastoja u diferencijaciji (5). Iako je FAB-klasifikacija nastala 1976. godine, i dalje se koristi za brzu preliminarnu procjenu podtipa AML-a, a u nekim državama kao jedina klasifikacija zbog nedostupnosti opreme za gensku analizu (4). Zahvaljujući novim spoznajama o utjecaju molekularnih karakteristika na terapijski odgovor i ishod bolesti u 2022. godini objavljene su jedna ažurirana i jedna nova klasifikacija AML-a (2,4). Svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. *World Health Organization, WHO*) je objavila 5. izdanje Klasifikacije hematolimfoidnih tumora po kojem se za dijagnozu AML-a prvo napravi analiza prisutnih mutacija, kao što je prikazano u Tablici 1. U slučaju odsutnosti mutacija dijagnoza se postavlja s obzirom na stupanj diferencijacije malignih blasta slično FAB-klasifikaciji (6). Prema WHO-klasifikaciji nema minimalne granice prisutnosti blasta, osim za *BCR::ABL1* za koju je potrebno ≥ 20 % blasta (6).

Tablica 1. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija prema 5. izdanju klasifikacije hematolimfoidnih tumora Svjetske zdravstvene organizacije (6) i prema Francusko-američko-britanskoj klasifikaciji (5)

Akutna mijeloična leukemija definirana genetskim abnormalnostima	
Akutna promijelocitna leukemija s fuzijom <i>PML::RARA</i>	(FAB M3)
Akutna mijeloična leukemija s fuzijom <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	
Akutna mijeloična leukemija s fuzijom <i>CBFB::MYH11</i>	
Akutna mijeloična leukemija s fuzijom <i>DEK::NUP214</i>	
Akutna mijeloična leukemija s fuzijom <i>RBM15::MRTFA</i>	
Akutna mijeloična leukemija s fuzijom <i>BCR::ABL1</i>	
Akutna mijeloična leukemija s preslagivanjem <i>KMT2A</i>	
Akutna mijeloična leukemija s preslagivanjem <i>MECOM</i>	
Akutna mijeloična leukemija s preslagivanjem <i>NUP98</i>	
Akutna mijeloična leukemija s mutacijom <i>NPM1</i>	
Akutna mijeloična leukemija s mutacijom <i>CEBPA</i>	
Akutna mijeloična leukemija povezana s mijelodisplazijom	
Akutna mijeloična leukemija s drugim definiranim genetskim promjenama	
Akutna mijeloična leukemija definirana diferencijacijom (FAB-klasifikacija)	
Akutna mijeloična leukemija s minimalnom diferencijacijom	(FAB M0)
Akutna mijeloična leukemija bez sazrijevanja	(FAB M1)
Akutna mijeloična leukemija sa sazrijevanjem	(FAB M2)
Akutna bazofilna leukemija	
Akutna mijelomonocitna leukemija	(FAB M4)
Akutna monocitna leukemija	(FAB M5)
Akutna eritroidna leukemija	(FAB M6)
Akutna megakarioblastična leukemija	(FAB M7)

Nova klasifikacija za dijagnosticiranje AML-a je Klasifikacija mijeloidnih neoplazmi i akutnih leukemija temeljena na međunarodnom konsenzusu (prema engl. *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias, ICC*) po kojoj je dijagnosticiranje hijerarhijsko s obzirom na prisutnost određenih mutacija (7). Osim mutacije *BCR::ABL1* kod koje je za dijagnozu AML-a potrebno ≥ 20 % blasta jer se inače radi o kroničnoj mijeloidnoj leukemiji, za ostale mutacije prema ICC-klasifikaciji potrebno je ≥ 10 % blasta u koštanoj srži ili u perifernoj krvi (7).

Obje klasifikacije su posebno izdvojile leukemije s genskom predispozicijom i izlaganjem citotoksičnim čimbenicima. Prema WHO-klasifikaciji te su leukemije nazvane sekundarne mijeloidne neoplazme, dok prema ICC-klasifikaciji nisu zasebna grupa nego su jedan od klasificirajućih čimbenika za postavljanje dijagnoze (2). Grupa sekundarnih mijeloidnih neoplazmi obuhvaća izloženost čimbenicima koji potiču mutacije DNA, uključujući radioterapiju i kemoterapiju za druge maligne bolesti, te nasljedne mutacije koje se dijele na: 1. mijeloidne novotvorine s predispozicijskom mutacijom zametne loze bez prethodnog poremećaja trombocita ili disfunkcije organa, 2. mijeloidne novotvorine s predispozicijskom mutacijom zametne loze i prethodnim poremećajem trombocita i 3. mijeloidne novotvorine s predispozicijskom mutacijom zametne loze i potencijalnom disfunkcijom organa. Praćenje oboljelih od AML-a s mutacijama stanica zametne loze je važno zbog povezivanja genskih promjena s fenotipom bolesti i procjenom rizika za nastanak AML-a kod drugih članova obitelji. Prepoznavanje AML-a nastalog nakon citotoksične terapije utječe na liječenje oboljelih, ali može biti korisno i za odabir terapije za druge novotvorine s obzirom na mutageni potencijal lijekova (6).

Osim za postavljanje dijagnoze, postoje i klasifikacije za procjenu stupnja rizika kod određenih podtipova AML-a. Najnovija obnovljena klasifikacija Europske mreže za leukemije (prema engl. *European Leukemia Network, ELN*) je objavljena 2022. godine i po njoj su podtipovi AML-a svrstani u povoljnu, intermedijarnu ili nepovoljnu skupinu rizika koristeći nove molekularne spoznaje, rezultate kliničkih studija i praćenje odgovora na terapiju (8). Klasifikacija je prikazana u Tablici 2.

Tablica 2. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija prema Europskoj mreži za leukemije iz 2022. godine (8)

Kategorija rizika	Genski poremećaj
Povoljni	<p>t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i></p> <p>inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i></p> <p>Mutacija <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i></p> <p><i>bZIP</i> mutacija unutar okvira <i>CEBPA</i></p>
Intermedijarni	<p>Mutacija <i>NPM1</i> s <i>FLT3-ITD</i></p> <p>Divlji tip <i>NPM1</i> s <i>FLT3-ITD</i> (bez mutacija za nepovoljnu kategoriju rizika)</p> <p>t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i></p> <p>Citogenetičke i/ili molekularne abnormalnosti koje ne spadaju u skupinu povoljnog ili nepovoljnog rizika</p>
Nepovoljni	<p>t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i></p> <p>t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i> - preslagivanje</p> <p>t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i></p> <p>t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i></p> <p>inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EV11)</i></p> <p>t(3q26.2;v)/<i>MECOM(EV11)</i> - preslagivanje</p> <p>-5 ili del(5q); -7; -17/abn(17p)</p> <p>Složeni kariotip, monosomalni kariotip</p> <p>Mutacija <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> i/ili <i>ZRSR2</i></p> <p>Mutacija <i>TP53</i></p>

Zanimljivo je da genom AML-a ima značajno manje mutacija nego genom solidnih tumora, međutim te mutacije utječu na tijek bolesti. Poznato je da su t(8;21) i inv(16)/t(16;16) koja uzrokuje translokaciju *RUNX1–RUNX1T1* i *CBFB–MYH11* povezani s boljim odgovorom na citotoksičnu terapiju i posljedično boljim preživljenjem. Lošiju prognozu imaju pacijenti s

kompleksnim kariotipom i određenim aneuploidijama poput -5/-5q, -7 i -17/-17p (3). Međutim, mutacije nude i nove terapijske opcije. Najpoznatiji primjer je translokacija t(15;17) i fuzija gena za receptor retinske kiseline (prema engl. *retinoic acid receptor*, *RAR*) za koji se veže sve-*trans* retinska kiselina (prema engl. *all-trans retinoic acid*, *ATRA*) u liječenju akutne promijelocitne leukemije (APL) (9).

Od 2017. godine je Američka agencija za hranu i lijekove (prema engl. *Food and Drug Administration*, *FDA*) odobrila 11 novih lijekova i formulacija za liječenje AML-a. Neki od novih lijekova djeluju istim mehanizmom u različitim leukemijskim stanicama bez određene mutacije. Primjer je BH3-mimetik venetoklaks koji selektivno inhibira BCL2 i potiče apoptozu (2). Apoptozu reguliraju vanjski i unutarnji put aktivirajući unutarstanične kaspaze koje uzrokuju staničnu smrt. Unutarnji put nadzire obitelj antiapoptotskih bjelančevina BCL2. FDA je 2018. godine odobrio BCL2-inhibitor venetoklaks kao dio kombinirane terapije uz azacitidin ili decitabin ili malu dozu citarabina za novodijagnosticirani AML u oboljelih koji su starijih od 75 godina ili s komorbiditetima zbog kojih ne mogu primati standardnu kemoterapiju. Iako je venetoklaks pokazao dobar učinak, često dolazi do relapsa pa to ipak nije terapija koja omogućuje izlječenje (3).

1.2. Diferencijacijska terapija akutne mijeloične leukemije

Leukemijske stanice, kao i druge maligne stanice, imaju poremećenu kontrolu diobe i sazrijevanja, prikazano na Slici 1, zbog čega je poticanje sazrijevanja stanica obećavajuća terapijska opcija. Kao najbolji primjer diferencijacijske terapije navodi se, već spomenuta, primjena ATRA-e u kombinaciji s arsenovim trioksidom koja dovodi do kompletne remisije u gotovo svih pacijenata s APL-om, dok je dugotrajno preživljenje veće od 98 % (3). ATRA se veže za RAR koji regulira diferencijaciju i proliferaciju matičnih stanica. U APL-u je zbog translokacije t(15;17) i fuzije gena *RAR*, najčešće *RARA* (prema engl. *retinoic acid receptor α*), poremećen opisani signalni put što dovodi do povećane ekspanzije malignih klonova i zastoja u sazrijevanju. Farmakološke koncentracije ATRA-e pospješuju diferencijaciju i koče proliferaciju malignih blasta (9).

Zanimljivo je da je diferencijacija koju uzrokuje ATRA otkrivena na staničnoj liniji HL-60 za koju se inicijalno mislilo da je APL, odnosno FAB M3 (10). Međutim, kasnije je kariotipizacijom otkriveno da stanice HL-60 nemaju translokaciju t(15;17) pa je svrstana u

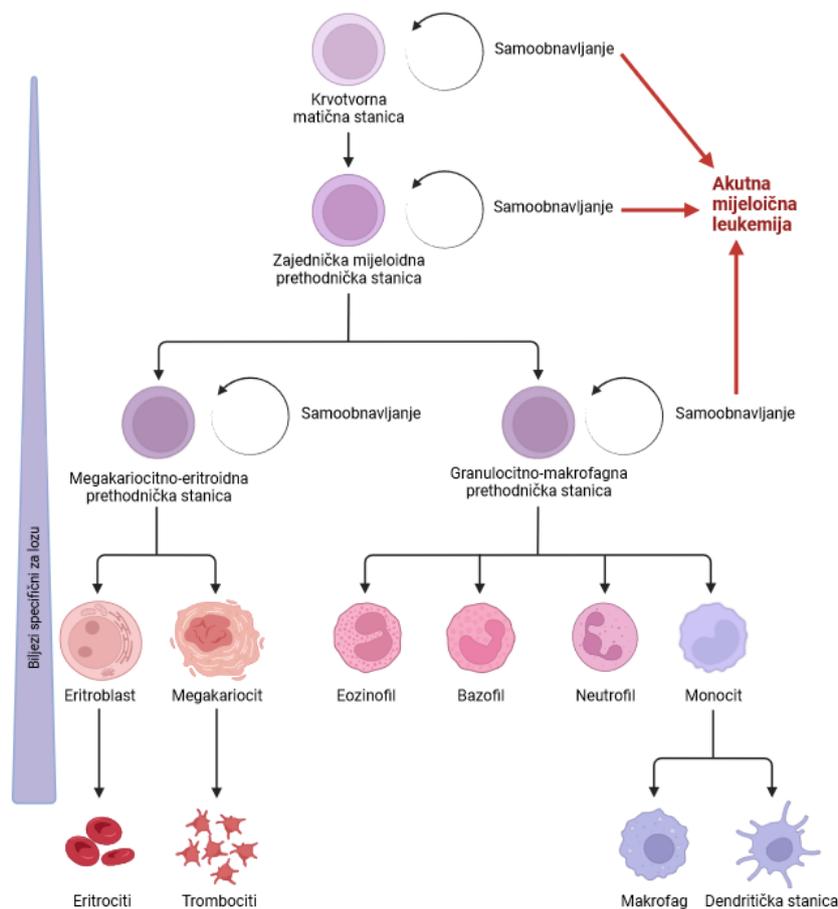
akutnu mijeloblastičnu leukemiju, odnosno FAB M2 (4). Iako ATRA uzrokuje diferencijaciju drugih staničnih linija AML-a u staničnoj kulturi te nekih primarnih uzoraka AML-a *ex vivo* (11), klinički učinak se rijetko primjećuje u oboljelih od AML-a koji nije APL (12). APL je zahvaljujući diferencijacijskoj terapiji podtip AML-a s najvećim preživljenjem (13). Opisani primjer diferencijacijske terapije potiče daljnja istraživanja lijekova koji uzrokuju diferencijaciju malignih stanica jer za ostale oblike AML-a ne postoji tako učinkovito liječenje (14).

Poznato je da brojne tvari mogu potaknuti diferencijaciju leukemijskih stanica u kulturi pa se takav učinak pokušava postići i u oboljelih od AML-a (10). Interes za diferencijacijsku terapiju potaknuli su novi lijekovi koji potiču diferencijaciju, među kojima su inhibitori mutirane izocitrat-dehidrogenaze (IDH) i inhibitori kinaze FLT3 (FMS-u slična tirozinska kinaza 3, prema engl. *feline McDonough sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3, FLT3*) (2). Prvi lijek iz ove skupine je inhibitor IDH2, enasidenib, koji je FDA odobrio 2017. godine. Lijek je odobren kao monoterapija za relapsni/refraktorni AML s mutacijom *IDH2* (15,16). Sljedeći je odobren ivosidenib, inhibitor IDH1, za relapsni/refraktorni AML, ali i za novodijagnosticiranu bolest u pacijenata koji nisu kandidati za standardnu indukcijsku terapiju (17). Oba IDH-inhibitora se primjenjuju peroralno i potiču mijeloidnu diferencijaciju i dugotrajnu remisiju u nekih oboljelih od AML-a s mutacijom *IDH* (2). Novi peroralni inhibitor IDH1, olutasidenib, odobren je 2022. godine kao monoterapija za oboljele od AML-a s mutacijom *IDH1*. Mutacija *IDH* je prisutna u 15-20 % oboljelih od AML-a. U stanicama s mutiranim oblikom enzima IDH poremećena je oksidativna karboksilacija izocitrata u α -ketoglutarat, povećava se koncentracija onkometabolita 2-hidroksiglutarata koji epigenetski inhibira hematopoetsku diferencijaciju. U 10-20 % pacijenata inhibitori IDH uzrokuju diferencijacijski sindrom što potvrđuje da uzrokuju diferencijaciju leukemijskih stanica *in vivo* (2,3).

Mutacije gena za kinazu FLT3 prisutne su u približno trećine oboljelih od AML-a. Najčešća inačica je unutarnja tandemska duplikacija (prema engl. *internal tandem duplication, ITD*) koja je povezana s lošijom prognozom bolesti pa su FLT3-inhibitori u kliničkim ispitivanjima više od 15 godina (3). Midostaurin je FLT3-inhibitor odobren 2017. godine za primjenu u kombinaciji s indukcijskom terapijom u pacijenata s novodijagnosticiranim AML-om s mutacijom *FLT3* (2,3). Gliteritinib je FLT3-inhibitor koji je odobren 2018. godine kao monoterapija za relapsni/refraktorni AML s mutacijom *FLT3* (2). Opisano je da gliteritinib potiče granulocitnu i monocitnu diferencijaciju u polovice pacijenata s mutacijom *FLT3* (18). Terminalna mijeloidna diferencijacija opisana je i u odgovoru na quizartinib, koji inhibira

inaktivni FLT3 pa nije učinkovit za mutaciju unutar tirozin-kinazne domene (prema engl. *tyrosine kinase domain, TKD*) (3,19).

Brojni potencijalni lijekovi, poput inhibitora histonske deacetilaze, inhibitora sinteze pirimidina i regulatora staničnog ciklusa, potiču diferencijaciju u pretkliničkim modelima, ali nisu bili učinkoviti kao monoterapija u kliničkim ispitivanjima (12). Analize mutacija gena otkrivaju nove ciljne molekule i omogućuju razvoj lijekova među kojima su i oni koji potiču diferencijaciju. Istražuju se i tvari koje potiču diferencijaciju leukemijskih stanica neovisno o prisutnim mutacijama, s obzirom na to da neki pacijenti imaju brojne mutacije i kompleksni kariotip. Tako je nedavno otkriveno da inhibitori dihidroorotat-dehidrogenaze (DHODH), jednog od ključnih enzima u sintezi pirimidina, pospješuju diferencijaciju, kočé proliferaciju stanica i povećavaju preživljenje u animalnim modelima AML-a (20).



Slika 1. Shematski prikaz mijeloidne diferencijacije i razvoja akutne mijeloidne leukemije. Krvotvorne matične stanice imaju svojstvo samoobnavljanja i svojstvo diferencijacije u različite linije krvnih stanica. Stanice akutne mijeloidne leukemije karakterizira nekontrolirano samoobnavljanje i zastoj u diferencijaciji. Napravljeno koristeći BioRender.com

1.2.1. Diferencijacija potaknuta inhibitorima sinteze pirimidina

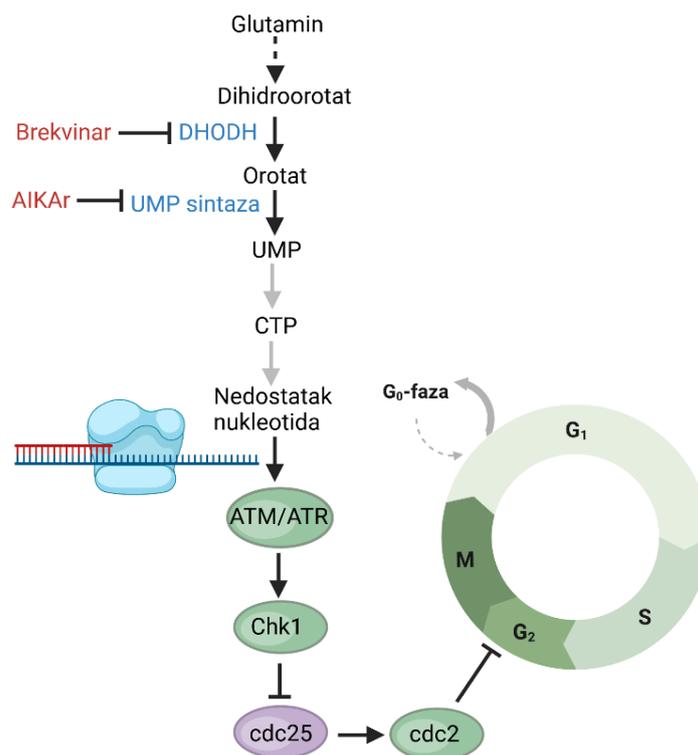
Ključno obilježje malignih stanica je nekontrolirana proliferacija zbog čega su povećane potrebe za izvorima energije i nukleotidima za replikaciju DNA i sintezu RNA. Maligne stanice povećavaju količinu potrebnih nukleotida povećanjem izražaja enzima za sintezu i smanjenjem izražaja enzima za razgradnju purina i pirimidina (21). Stoga je povećan metabolizam nukleotida među glavnim značajkama malignih stanica, a inhibitori sinteze i umetanja nukleotida u DNA se koriste kao kemoterapeutici koji smanjuju rast tumora, uzrokuju oštećenje DNA i staničnu smrt (22,23). Osim što zaustavljaju proliferaciju, inhibitori metabolizma purina i pirimidina te sinteze DNA uzrokuju diferencijaciju malignih stanica (21,22). Antimetabolite purina i pirimidina koji potiču diferencijaciju možemo podijeliti u tri podskupine: 1. tvari koje ometaju *de novo* sintezu prekursora DNA i RNA, 2. inhibitori sinteze DNA i 3. tvari koje utječu na metilaciju DNA (21).

U istraživanju koje je uključivalo 330 000 malih molekula kao potencijalnih terapijskih tvari za liječenje AML-a najučinkovitiji su bili inhibitori enzima DHODH koji su poticali diferencijaciju stanica AML-a (20). Kao što je prikazano na Slici 2, DHODH katalizira četvrti korak u sintezi pirimidina *de novo*, odnosno pretvorbu dihidroorotata u orotat. Mehanizam kojim inhibitori DHODH-a potiču diferencijaciju je manjak uridin monofosfata (prema engl. *uridine monophosphate, UMP*) jer dodatak uridina poništava učinak DHODH-inhibitora na diferencijaciju. S obzirom na to da maligne stanice nemaju mutaciju gena koji kodira DHODH, selektivnost učinka se objašnjava većom osjetljivošću malignih stanica na privremeni manjak nukleotida. Brekvinar, potentni inhibitor DHODH-a, potiče diferencijaciju, a učinak se poništava dodatkom uridina (20). Iako je brekvinar imao obećavajuće rezultate u pretkliničkim studijama, kliničko istraživanje nije pokazalo učinkovitost brekvinara u oboljelih od AML-a te je prekinuto prije završetka predviđenog trajanja studije (24). Novi selektivniji i potentniji inhibitori DHODH-a, primjerice ASLAN003, BAY2402234 i PTC299, su pokazali dobar učinak u pretkliničkim istraživanjima te su uključeni u klinička ispitivanja (12). Otkriće da inhibicija enzima DHODH-a uzrokuje diferencijaciju stanica AML-a potiče istraživanja drugih enzima uključenih u sintezu pirimidina.

Naša prethodna istraživanja uloge kinaze aktivirane AMP-om (prema engl. *AMP-activated kinase, AMPK*) u diferencijaciji stanica AML-a otkrila su da 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (AIKAr) potiče diferencijaciju stanica U937 (25). AMPK je važan regulator

staničnog metabolizma koji se aktivira kad je koncentracija AMP-a visoka u odnosu na ATP, a aktivirani AMPK potiče kataboličke i zaustavlja anaboličke reakcije u stanicama. AIKAr se koristi kao agonist AMPK-a jer se nakon ulaska u stanicu fosforilira u ribonukleotid AIKAR ili ZMP koji oponaša AMP te se veže za γ -podjedinicu enzima AMPK-a, ali je 40 do 50 puta manje učinkovit u aktivaciji enzima (26). Međutim, iako je AIKAr jedan od najčešće korištenih farmakoloških modulatora AMPK-a u istraživanjima, važno je naglasiti da ima brojne učinke koji ne ovise o AMPK-u. U našem prethodnom radu, pokusi s AMPK-agonistima i siRNA (prema engl. *small interfering RNA*) utišavanjem AMPK-a pokazali su da učinci AIKAr-a na diferencijaciju leukemijskih stanica ne ovise o AMPK-u. Dodatno istraživanje mehanizama koji su odgovorni za diferencirajući učinak pokazalo je da AIKAr aktivira autofagiju, ali diferencijacija nije ovisila o prisutnosti bjelančevina klasičnog puta autofagije (27).

AIKAr nije samo agonist AMPK-a, već i endogeni prekursor u sintezi purina. Naše nedavno istraživanje pokazalo je da AIKAr koči sintezu pirimidina tako što koči aktivnost UMP-sintaze, enzima koji djeluje nizvodno od DHODH-a, te da AIKAr i brekvinar, inhibitor DHODH-a, pospješuju diferencijaciju leukemijskih staničnih linija. Dodatno, oba inhibitora sinteze pirimidina aktivirala su signalni put oštećenja DNA koji uključuje kinazu Chk1 (prema engl. *checkpoint kinase 1*), a genska i farmakološka inhibicija kinaze Chk1 zakočila je učinke AIKAr-a i brekvinara na diferencijaciju (28). Ti su rezultati ukazali na ulogu signalnoga puta ATR (prema engl. *ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related kinase*)/Chk1 u diferencijaciji leukemijskih stanica (29).



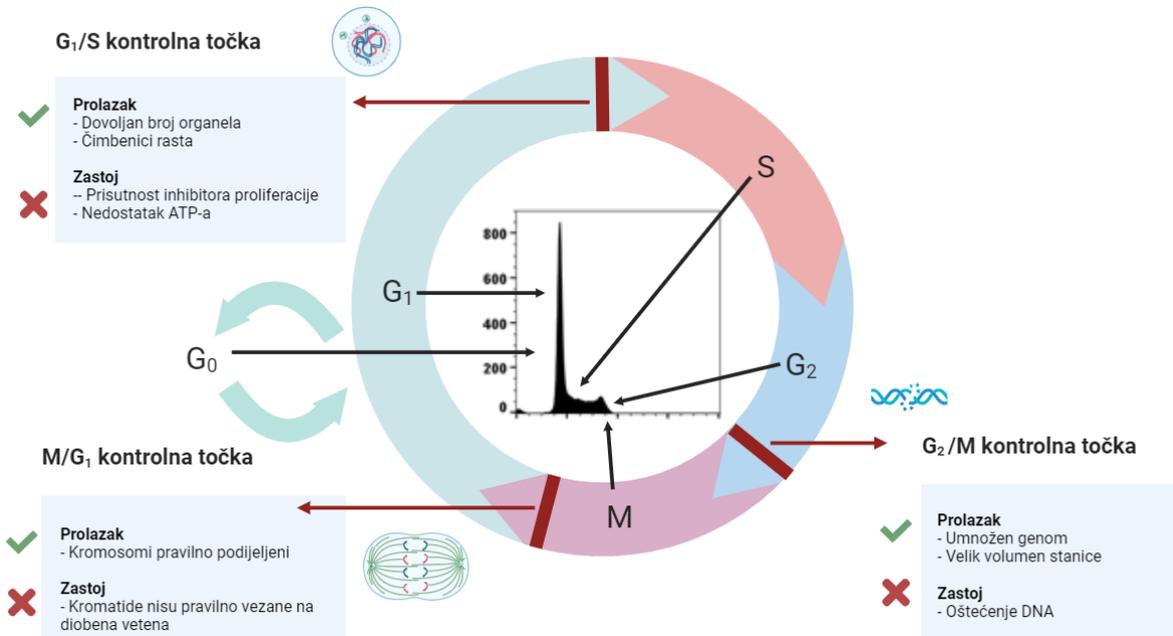
Slika 2. Shematski prikaz djelovanja AIKAr-a i brekvinara na sintezu pirimidina *de novo* i signaliziranje zastoja u staničnom ciklusu. AIKAr i brekvinar inhibiraju enzime koji sudjeluju u sintezi pirimidina *de novo* i uzrokuju nedostatak baza za sintezu DNA i zastoje u staničnom ciklusu. ATM/ATR - prema engl. *ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related kinase*, cdc2 – prema engl. *cell division cycle 2*, cdc25 - prema engl. *cell division cycle 25*, CTP - citidin-trifosfat, DHODH - dihidroorotat-dehidrogenaza, UMP - uridin-5'-monofosfat. Napravljeno koristeći BioRender.com

1.3. Stanični ciklus

Stanični ciklus je niz zbivanja koja uključuju pripremu stanice za diobu i sam proces diobe. Sastoji se od S-faze u kojoj se sintetizira DNA, M-faze koja obuhvaća razdvajanje kromosoma i mitozu, te G-faza (prema engl. *gap*) između njih. G₀-faza je faza mirovanja iz koje stanica može ući u G₁-fazu u kojoj se događa rast stanice i priprema za S-fazu. G₂-faza se događa nakon S-faze i tijekom nje se stanica priprema za mitozu (30). Stanični ciklus je prikazan u Slikama 2 i 3.

Prolazak kroz stanični ciklus reguliran je kontrolnim točkama staničnog ciklusa kojima se kontrolira da je stanica spremna za prijelaz u sljedeću fazu ciklusa. Glavni mehanizam kojim se regulira napredovanje kroz ciklus su serin/treonin-kinaze ovisne o ciklinima (Cdk, prema engl. *cyclin dependent kinase*) koje fosforiliraju proteine ključne za sintezu DNA i mitozu.

Aktivnost kinaza regulirana je malim inhibitornim proteinima i fosforilacijom, te sintezom i razgradnjom ovisnom o ubikvitinu (30). Citotoksična kemoterapija, a pogotovo hipometilirajuće tvari uzrokuju značajno povećanje proteina koji su kontrolne točke prolaska kroz stanični ciklus (3).



Slika 3. Shematski prikaz staničnog ciklusa i kontrolnih točaka i primjer histograma leukemijskih stanica obilježenih propidijevim jodidom i analiziranih protočnom citometrijom. Prilikom prolaska kroz različite kontrolne točke staničnog ciklusa kontrolira se spremnost stanice za ulazak u sljedeću fazu. Napravljeno koristeći BioRender.com

Za analizu staničnog ciklusa u istraživanjima se koristi boja koja se veže za DNA, propidijev jodid, kao što je prikazano na Slici 3. S obzirom na količinu DNA možemo prepoznati stanice koje imaju 2 n, odnosno 46 kromosoma u ljudskim stanicama, a nalaze se u G₀ i G₁-fazi. Stanice koje imaju dvostruko veću količinu DNA, odnosno 4 n, su stanice u G₂ i M-fazi. Stanice koje se nalaze u S-fazi i upravo sintetiziraju novu DNA imaju količinu DNA između 2 n i 4 n. Pojedini kemoterapeutici uzrokuju aktivaciju kontrolnih točaka i zastoj stanica u nekoj od faza staničnog ciklusa pa se to vidi kao povećanje udjela stanica u određenoj fazi. Ako je lijek uzrokovao apoptozu i raspad DNA na fragmente, to možemo vidjeti kao apoptotska tjelešca koja sadrže količinu DNA manju od 2 n, a takve označavamo kao sub-G₁ (28,29).

1.3.1. Signalni put ATR/Chk1

Različita oštećenja DNA aktiviraju signalne puteve kontrolnih točaka čiji je cilj zaustaviti stanicu u prolasku kroz stanični ciklus do otklanjanja oštećenja. Poznate su tri kinaze kojima započinje put oštećenja DNA: ATM (prema engl. *ataxia-telangiectasia mutated*), DNA-PK (prema engl. *DNA-dependent protein kinase*) i ATR. Sve tri kinaze mogu biti aktivirane dvostrukim lomom DNA, ali samo ATR se može aktivirati i zbog poremećaja replikacijskih vilica uzrokovanih oštećenjem DNA, nedostatka deoksinukleotida, nastanka baznih adukata ili poprečnih veza. Važnost ATR-a za stanični ciklus pokazuje podatak da homozigotna mutacija koja uzrokuje gubitak funkcije ATR-a u stanicama sisavaca nije spojiva sa životom (31).

Početak aktivacije signalnog puta koji uključuje ATR je vezanje replikacijskog proteina A na jednolančanu DNA na kojoj se nakupljaju proteini kontrolnih točaka među kojima je i ATR. Kinaza ATR fosforilacijom aktivira kinazu Chk1 koja poticanjem kinaze Wee1 i kočenjem fosfataze Cdc25 (prema engl. *cell-division cycle*) uzrokuje inaktivacijsku fosforilaciju Cdc2 na aminokiselinskom ostatku Tyr15 (30). Kad je kinaza Cdc2, poznata i kao Cdk1, inhibirana, dolazi do zastoja u staničnom ciklusu (32). Za nastavak prolaska kroz stanični ciklus do mitoze potrebna je defosforilacija kinaze Chk1 fosfatazama tipa 1 (30).

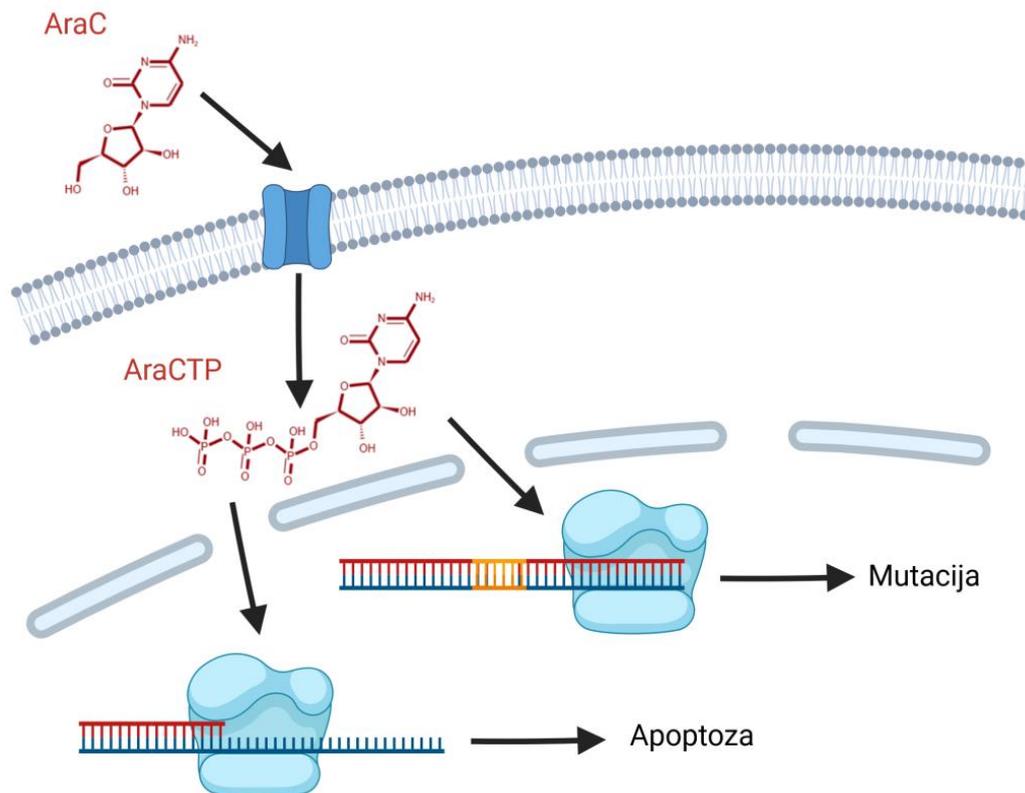
Signalni putevi oštećenja DNA kontrolirani kinazom Chk1 i signalizacija kontrolirana tumorskim supresorom i transkripcijskim faktorom p53 su dvije glavne skupine signalizacije oštećenja DNA. O važnosti signalnog puta kinaze Chk1 svjedoči to što je evolucijski očuvana od kvasaca do ljudi. Kinazu Chk1 aktiviraju različite vrste oštećenja DNA, ali učinkovitije u fazama S i G₂ nego u G₁-fazi (30). Aktivacija kinaze Chk1 uzrokuje zastoj u S-fazi staničnog ciklusa i pomaže preživljenju oštećenih stanica, a inhibicija Chk1-a pomoću SCH 900776 smanjuje zastoj u S-fazi i povećava apoptozu stanica tretiranih citarabinom. Fosforilacijska aktivacija kinaze Chk1 je dokazana i *in vivo* u stanicama oboljelih od AML-a nakon 48 sati kontinuirane infuzije citarabina (33).

Brojni kemoterapeutici uzrokuju oštećenje DNA pa maligne stanice preživljavaju zahvaljujući aktivaciji signalnog puta ATR/Chk1 zbog čega su kinaze ovog signalnog puta potencijalna meta novih lijekova za maligne bolesti (31,33).

1.4. Citarabin

Neki lijekovi za AML koji nisu inicijalno zamišljeni kao diferencijacijska terapija imaju diferencijacijski učinak u AML-u. Citarabin (1- β -D-arabinofuranozilcitozin, citozin-arabinozid ili AraC) je lijek koji se primjenjuje kao dio standardne indukcijske i konsolidacijske terapije u oboljelih od AML-a. Još od 1970-ih se za oboljele od AML-a koji mogu podnijeti intenzivnu kemoterapiju koristi indukcijska terapija koja se sastoji od kombinacije citarabina (100-200 mg/m²) i antraciklina u standardnim koncentracijama, takozvani „7+3 protokol“ (3,34). Citarabin u visokim dozama se primjenjuje i nakon indukcijske terapije kao konsolidacijska terapija za pacijente s povoljnom prognozom kod kojih se postigne remisija bolesti, dok se kod pacijenata koji spadaju u skupinu velikog i srednjeg rizika za relaps bolesti primjenjuje alogenična transplantacija matičnih stanica koštane srži. Međutim, budući da je većina oboljelih starije životne dobi, često s komorbiditetima, zbog čega bi primjena intenzivne kemoterapije bila opasna, liječenje se često provodi decitabinom i azacitidinom ili malim koncentracijama citarabina (20 mg/m²) (34).

Mehanizam djelovanja citarabina (AraC) je pretvorba u citozin-arabinozid-trifosfat (AraCTP) koji utječe na sintezu DNA na više načina, a prvenstveno umetanjem u novosintetiziranu molekulu DNA (35). Prirodni supstrat DNA-polimeraza za sintezu DNA je dCTP s kojim se AraCTP natječe za vezno mjesto i tako inhibira DNA-polimeraze α i β , zaustavlja sintezu DNA i uzrokuje nakupljanje kratkih fragmenata DNA (21). AraCTP koji se pomoću DNA-polimeraza α , δ ili ϵ uspije umetnuti u DNA, uz zastoj u sintezi, dovodi i do loma dvostruke uzvojnice DNA te potiče staničnu smrt u S-fazi staničnog ciklusa. Međutim, DNA-polimeraza η može ugraditi bazu komplementarnu citidinu, gvanin ili nekomplementarni adenin nasuprot AraCTP-a što uzrokuje mutaciju DNA malignih stanica. Opisani mehanizam, prikazan na Slici 4, odgovoran je za veću stopu mutacija leukemijskih stanica liječenih citarabinom te relaps bolesti (35).



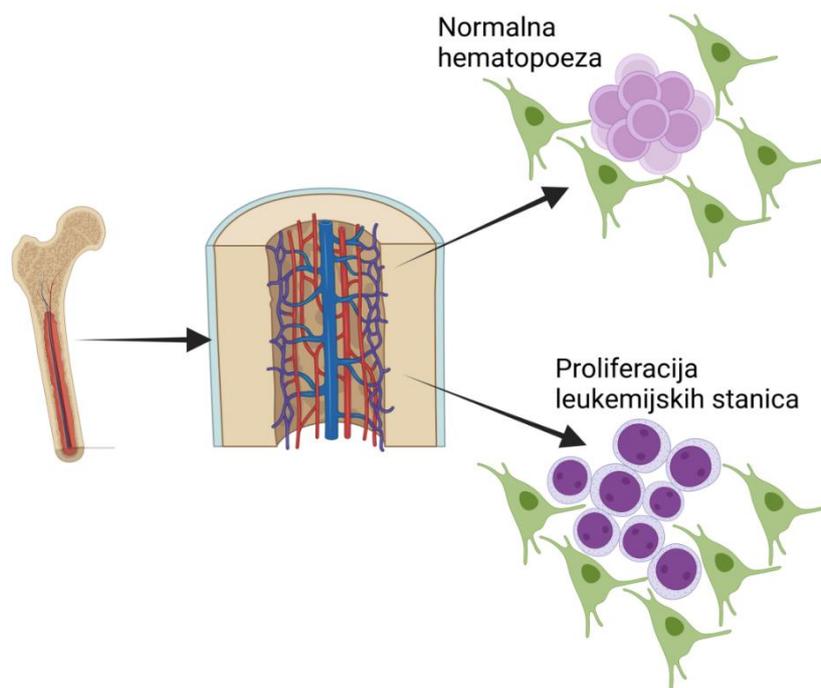
Slika 4. Shematski prikaz ulaska citarabina (AraC) u stanicu, konverzije u AraCTP i utjecaja na sintezu DNA. Ugradnja AraCTP-a u DNA može dovesti do zastoja u replikaciji DNA, loma dvostruke uzvojnice DNA i apoptoze stanice. Ukoliko se nasuprot AraCTP-u umetne nekomplementarna baza adenin može doći do mutacije DNA. Napravljeno koristeći BioRender.com

1.4.1. Niske doze citarabina

Prema smjernicama Američkog hematološkog društva (ASH prema engl. *American Society of Hematology*) iz 2020. godine preporučuje se primjena niske doze citarabina ili hipometilirajućih tvari u monoterapiji za pacijente koji nisu kandidati za intenzivnu kemoterapiju (1). AraC u malim koncentracijama uzrokuje remisiju bolesti bez toksičnog učinka i potiče sazrijevanje stanica *in vivo* (14). Moguće objašnjenje je da AraC u visokim dozama uzrokuje apoptozu stanica AML-a, dok u niskim dozama potiče diferencijaciju (36,37). Međutim, diferencijacija stanica AML-a se rijetko primijeti u pacijenata liječenih niskim dozama AraC-a, pa se citarabin u diferencijacijskoj terapiji većinom koristi kao dodatak drugim lijekovima koji potiču diferencijaciju, kao što su inhibitori kinaze AURORA i FLT3-inhibitori (12).

Monocitna i granulocitna diferencijacija staničnih linija AML-a potaknuta citarabinom se često opisuje *in vitro*, ali mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (36–38). Osim diferencijacije leukemijskih stanica, AraC uzrokuje i maturaciju stanica neuroblastoma, melanoma, karcinoma dojke i teratokarcinoma (21). Opisano je da ugradnja citarabina u DNA uzrokuje oštećenje DNA te da aktivacija signalnog puta ATR/Chk1 pospješuje preživljenje stanica (33,39,40), ali uloga Chk1 u diferencijaciji leukemijskih stanica potaknutoj citarabinom do sada nije istražena. U ovom istraživanju želimo ispitati ulogu Chk1 u diferencijaciji stanica potaknutoj citarabinom te usporediti učinke citarabina s učincima AIKAr-a i DHODH-inhibitora brekvinara. S obzirom na mogući koristan učinak diferencijacijske terapije u osoba oboljelih od leukemije, želimo istražiti mehanizam kojim često korišteni lijek citarabin potiče diferencijaciju.

1.5. Stroma koštane srži



Slika 5. Shematski prikaz proliferacije hematopoetskih i leukemijskih stanica u koštanoj srži. Mikrookoliš koštane srži sadrži različite stanice među kojima su i krvotvorne matične stanice. Leukemijske stanice također proliferiraju u koštanoj srži. Napravljeno koristeći BioRender.com

1.5.1. Mezenhimalne stromalne stanice i hematopoetske matične stanice

Hematopoeza i obnavljanje hematopoetskih matičnih stanica u odraslih se odvija pretežno u koštanoj srži (Slika 5). Mikrookoliš koštane srži sadrži različite stanice, poput endotelnih, perivaskularnih, mezenhimalnih stromalnih, koštanih, živčanih i hematopoetskih (41). Hematopoetske matične stanice u koštanoj srži se nalaze perivaskularno, često u blizini trabekularne kosti uz mezenhimalne stromalne stanice i endotelne stanice (42). Istraživanje na transgeničnim miševima u kojem su osteoblasti u koštanoj srži medikamentozno ubijeni smanjena je hematopoeza u koštanoj srži i aktivirala se ekstramedularna hematopoeza. Ovo istraživanje je pokazalo važnost interakcije osteoblasta i hematopoetskih stanica u koštanoj srži za odvijanje normalne hematopoeze (43). Osim diferenciranih stanica koje imaju određenu funkciju, u koštanoj srži se nalaze i multipotentne stanice nazvane stromalne stanice koštane srži, odnosno mezenhimalne matične stanice. Ove stanice imaju sposobnost diferenciranja u osteoblaste, hondroците i adipocite *ex vivo*. Istražuje se njihova funkcija zamjene oštećenih stanica i parakrinog signaliziranja drugim stanicama unutra koštane srži (44). Istraživanja pokazuju da je signaliziranje putem CXC-kemokinskog liganda 12 (CXCL12) i receptora na kojeg se veže, C-X-C kemokinski receptor tip 4 (CXCR4) ključno za održavanje hematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži (45). Pokusi u kojima su potpuno uklonjeni gen *Cxcl12* ili *Cxcr4*, kao i ciljano uklanjanje *Cxcl12* u perivaskularnim mezenhimalnim stanicama uzrokuju izostanak hematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži (46). Poznato je da stanice U937 imaju visoku razinu receptora CXCR4, poznatog kao vezni receptor za HIV-1 virus (45,47,48).

Na mikrookoliš koštane srži utječe stanje cijelog organizma preko hormona koji cirkuliraju u krvi i izravnom simpatičkom inervacijom perivaskularnih stanica (46), pa tako koštana srž reagira na imunološke i hemostatske potrebe i potrebe organizma za kisikom (41). Parathormon potiče proliferaciju i diferencijaciju stromalnih stanica u osteoblaste, dok čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija (prema engl. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) i β -adrenergička stimulacija zaustavljaju proliferaciju i diferencijaciju (49). Tako fiziološke promjene u tijelu poput cirkadijanog ritma, odgovora na stres, reproduktivnog i nutritivnog statusa utječu na stanice koštane srži. Također je važna signalizacija hematopoetskim citokinima poput trombopoetina (46).

S obzirom na to da se u koštanoj srži nalaze stanice koje proliferiraju i diferenciraju se u različite tipove stanica potrebno je definirati populacije od interesa. Stromalne stanice su

definirane koristeći tri kriterija koje je predložilo Međunarodno društvo za staničnu terapiju. Prvi kriterij je da adheriraju na plastiku tijekom uzgoja u staničnoj kulturi. Drugi kriterij je da izražavaju biljege CD105, CD73 i CD90, a ne izražavaju CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i HLA-DR. Posljednji, treći kriterij je da se *in vitro* mogu diferencirati u osteoblaste, adipocite i hondroblaste (50).

1.5.2. Mezenhimalne stromalne stanice i maligni blasti

Proliferacija malignih stanica AML-a također se odvija u koštanoj srži (Slika 5). Razvoj malignih stanica utječe na druge stanice i mijenja mikrokoliš koštane srži, koji tako postaje manje pogodan za odvijanje normalne hematopoeze (51–54). Stanice AML-a smanjuju lučenje hematopoetskih citokina: CXCL12 i čimbenika matičnih stanica (prema engl. *stem cell factor*, SCF) iz endotelnih stanica, remete osteogenu i adipocitnu diferencijaciju te potiču razvoj mijeloidnih supresorskih stanica koje smanjuju imunski odgovor (41). Promjene koštane srži mogu pogodovati nastanku i proliferaciji leukemijskih stanica. S obzirom na to da se u istraživanjima uglavnom prate mutacije malignih stanica, zanimljiva je ideja da mutacije potpornih stanica mogu potaknuti razvoj maligne bolesti. Primjerice, osteoblasti s konstitutivno aktiviranim β -kateninom signaliziraju preko signalnog puta Notch i uzrokuju zastoj u diferencijaciji hematopoetskih matičnih stanica i razvoj AML-a (41).

Istraživanje stromalnih stanica je važno u kontekstu istraživanja leukemija. Uloga strome koštane srži je jedan od mogućih razloga zašto stvari koje imaju obećavajuće pretkliničke rezultate nemaju kliničkog učinka na diferencijaciju stanica AML-a. Poznat je zaštitni učinak strome na leukemijske stanice tretirane citotoksičnim lijekovima (55). Stromalne stanice koštane srži utječu na proliferaciju i apoptozu leukemijskih stanica te mogu imati ulogu u razvoju malignih blasta koji su otporni na lijekove (56,57). Primjerice, signaliziranje stromalnih stanica putem fibroblastnog čimbenika rasta 2 (prema engl. *fibroblast growth factor 2*, FGF2) i CXCL12 djeluje zaštitno na leukemijske stanice s mutacijom *FLT3* (3).

Osim protektivnog učinka u primjeni citotoksičnih lijekova, stromalne stanice imaju učinak i na diferencijaciju stanica AML-a, ali učinak ovisi o lijeku koji izaziva diferencijaciju. Istraživanja pokazuju da kokultura sa stromalnim stanicama smanjuje ATRA-om potaknutu diferencijaciju stanične linije HL60, koja je AML-M2 (58), a to je mogući razlog zašto ATRA diferencira stanične linije AML-a koji nisu APL *in vitro*, a ima ograničen klinički učinak *in*

vivo. Suprotan učinak stromalnih stanica zamijećen je u odgovoru primarnih blasta na inhibitor mutirane receptorske tirozinske kinaze FLT3. U kokulturi ljudske strome i primarnih blasta izoliranih iz koštane srži oboljelih od AML-a, quizartinib pospješuje diferencijaciju i uzrokuje zastoj u staničnom ciklusu. To je u skladu s opažanjem *in vivo* da terapija quizartinibom uklanja blaste u perifernoj krvi te uzrokuje diferencijaciju u koštanoj srži (19).

Opisan je zaštitni učinak stromalnih stanica MS-5 na leukemijske stanice tretirane citotoksičnim dozama citarabina, ali učinak na diferencijaciju potaknutu citarabinom nije istražen (40,59,60). U istraživanjima interakcija stromalnih i leukemijskih stanica često se rabe mišje i ljudske stanične linije stromalnog podrijetla, kao što su MS-5 (prema engl. *murine stroma-5*) ili HS-5 (prema engl. *human stroma-5*) (57,61). Istraživanje Griessinger i sur. (62) pokazuje da stromalna stanična linija MS-5 bolje pomaže preživljenje stanica AML-a tijekom tjedan dana bez dodatka citokina nego osteoblastna stanična linija SaOS-2 i endotelna stanična linija HUVEC. U navedenom istraživanju su stanice MS-5 bile otporne na citarabin u koncentraciji 3 μ M koja je citotoksična za stanice AML-a. S obzirom na opisana svojstva stanične linije MS-5, mislimo da bi ovaj model bio dobar za istraživanje učinaka stromalnih stanica na diferencijaciju leukemijskih stanica.

1.6. Modeli za istraživanje akutne mijeloične leukemije

AML je heterogena skupina bolesti na koje utječu brojni čimbenici cijelog organizma uključujući mikrokoliš koštane srži, pa postoji više modela za istraživanje AML-a. Istraživanja na staničnim linijama AML-a smatraju se dobrim modelom zbog mogućnosti ponavljanja pokusa i usporedivosti dobivenih rezultata, uz ograničenja, kao što su promjene stanica zbog nakupljanje mutacija tijekom pasaža. S obzirom na različitosti imortaliziranih staničnih linija i leukemijskih stanica izoliranih iz pacijenata, istraživanja na staničnim linijama se mogu kombinirati s *in vitro* istraživanjima na stanicama iz koštane srži ili periferne krvi pacijenata oboljelih od AML-a. Postoje brojne stanične linije AML-a koje se razlikuju po prisutnim mutacijama i imunofenotipu jer je i AML heterogena skupina s različitim mutacijama (4). Svojstva staničnih linija AML-a su dobro poznata jer se stanične linije koriste za istraživanje AML-a više od 50 godina (10).

U ovom istraživanju korištene su stanične linije koje po FAB-klasifikaciji odgovaraju M5 akutnoj monoblastičnoj i monocitnoj leukemiji. Stanična linija U937 se koristi za istraživanje

mehanizma monocitne i makrofagne diferencijacije, istraživanja staničnog ciklusa i apoptoze, te odgovora na nove lijekove za maligne bolesti. Stanice THP-1 su slične stanicama U937, ali su manje zrele, odnosno zaustavljene u ranijoj fazi diferencijacije. Osim za istraživanje monocitne leukemije, stanice THP-1 su često korištene za istraživanja imunološkog i upalnog odgovora. Stanična linija MOLM-13 se razlikuje od U937 i THP-1 po tome što ima divlji tip gena *p53* i mutaciju *FLT3-ITD* zbog čega je ova stanična linija korištena u istraživanjima *FLT3*-inhibitora (4).

Mutacija *p53* je najčešći genski defekt malignih stanica zbog kojeg je poremećena kontrolna točka G_1 i odlazak stanica u apoptozu. Za očekivati je da stanice s nefunkcionalnim *p53*, poput U937 i THP-1, u analizi staničnog ciklusa nemaju zastoje u G_1 -fazi nego u kasnijim fazama, S-fazi i G_2/M -fazi, u kojima se i kinaza Chk1 učinkovitije aktivira (30). Stanične linije U937, THP-1 i MOLM-13 su korištene i u istraživanju u kojem je otkriveno da inhibicija sinteze pirimidina potiče diferencijaciju (20). Navedene linije su korištene i u našim prethodnim istraživanjima diferencijacije stanica AML-a (28,29). Karakteristike korištenih staničnih linija prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Karakteristike korištenih staničnih linija AML-a (4)

Naziv	FAB	Izvor uzorka	Spol i dob	Imunofenotip	Kariogram i prisutne mutacije
U937	M5	Pleuralni izljev (histocitni limfom)	M, 37 godina	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ , CD54 ⁺ , CD64 ⁺	Kompleksni: t(10;11), t(1;5) <i>PICALM-MLLT10</i> , <i>PTEN</i> , <i>PTPN11</i> , <i>WT1</i> , <i>TP53</i>
THP-1	M5	Periferna krv (akutna monocitna leukemija)	M, 1 godina	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD34 ⁻ , cyCD68 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD64 ⁺	Kompleksni: t(9;11) <i>CSNK2A1-DDX39B</i> , <i>KMT2A-MLLT3</i> , <i>NRAS</i> , <i>TP53</i>
MOLM-13	M5a/post MDS	Periferna krv (akutna mijeloična leukemija)	M, 20 godina	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ , cyCD68 ⁺ , HLA-DR ⁻	Kompleksni: ins(11;9), +8, +13 <i>KMT2A-MLLT3</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>CBLdelta</i> exon8

Međusobne interakcije malignih stanica i mikrookoliša koštane srži utječu na nastanak i progresiju AML-a (41). Zbog toga stanična kultura u kojoj uzgajamo samo stanične linije AML-a ili blaste iz primarnih uzoraka pacijenata oboljelih od AML-a ne odgovara razvoju bolesti unutar organizma (4,21). Stanične linije koje se koriste za istraživanje AML-a se razlikuju od primarnih uzoraka leukemijskih stanica jer se mogu uzgajati u kulturi bez citokina i čimbenika rasta (4). Postoji više modela za istraživanje mikrookoliša koštane srži, uključujući korištenje staničnog medija u kojem su uzgajane stromalne stanice, dodavanje citokina ili kokultura stromalnih i leukemijskih stanica. Istraživanja pokazuju da prisutnost stromalnih stanica *in vitro* štiti leukemijske stanice od apoptoze uzrokovane lijekovima što je potencijalni uzrok rezidualne bolesti i razvoja rezistentnih klonova *in vivo* (63). Osim zaštitnog učinka na leukemijske stanice tretirane različitim tvarima, prisutnost stromalnih stanica poboljšava preživljenje stanica primarnih uzoraka AML-a. Primjerice, mišja mezenhimalna stromalna stanična linija MS-5 uz dodatak interleukina 3 (IL-3), G-CSF i trombopoetina omogućuju preživljenje primarnih stanica AML-a tijekom više od 24 tjedna (62).

Model za istraživanje AML-a u živom organizmu je apliciranje leukemijskih stanica intraperitonealno ili supkutano mišu (21). S obzirom na to da ljudske stanice stavljamo u tijelo druge vrste koriste se miševi koji su imunodeficientni kako njihov imunski sustav ne bi odbacio ljudske stanice. Najčešće se koriste NOD/SCID (prema engl. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) miševi koji nemaju funkcionalne limfocite T i B, ni funkcionalan komplement, a novi soj miševa B2m^{-/-} NOD/SCID bez funkcionalnog gena za β 2-mikroglobulin ima i potpuni manjak funkcionalnih NK stanica. Čak i kod tako imunodeficientnih životinja teško je postići proliferaciju ljudskih leukemijskih stanica. Pokazano je da polovica testiranih uzoraka AML-a nije sposobno razviti potpunu bolest u imunodeficientnim miševima, a bolje preživljenje *in vivo* imaju uzorci s kompleksnim kariotipom (64). Istraživanja pokazuju da na diferencijaciju leukemijskih stanica *in vivo* utječu funkcionalni limfociti T i makrofagi pa je to još jedan nedostatak korištenja imunodeficientnih miševa u istraživanju diferencijacije leukemijskih stanica (21).

Diferencijacija stanica u odgovoru na ispitivane tvari može se mjeriti analizom morfoloških promjena, staničnih biljega, enzima i produkata koje stanice izlučuju (21). U ovom istraživanju smo koristili morfološku analizu leukemijskih i stromalnih stanica, Western blot za analizu proteina, protočnu citometriju i RNA-sekvenciranje. Kao pokazatelje monocitno-makrofagne diferencijacije u ovom istraživanju smo analizirali biljege CD11b i CD64. CD11b je integrin, odnosno protein na površini stanice koji služi za adheziju, kemotaksiju i migraciju

makrofaga u područje upale. Pokazano je da signalizacija putem CD11b potiče pro-upalnu polarizaciju makrofaga i tako suprimira rast tumora (65). CD64 je Fc-receptor gama (Fc γ RI) koji veže Fc-fragment protutijela i smatra se monocitnim staničnim biljekom (66).

2. HIPOTEZA

Male koncentracije citarabina pospješuju diferencijaciju stanica AML-a aktivacijom kinaze Chk1, a stromalne stanice koštane srži koče citotoksični učinak citarabina, ali nemaju učinaka na diferencijaciju stanica AML-a u odgovoru na citarabin i inhibitore sinteze pirimidina.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

1. Istražiti mehanizam diferencijacije stanica AML-a potaknute citarabinom.
2. Ispitati učinke stromalnih stanica na citotoksičnost i diferencijaciju stanica AML-a potaknutu citarabinom i inhibitorima sinteze pirimidina.

3.2. Specifični ciljevi

1. Ispitati učinke citarabina na broj živih stanica leukemijskih linija U937 i THP-1, prolazak kroz stanični ciklus, izražaj diferencijacijskih biljega i aktivaciju kinaze Chk1 te usporediti s učincima AIKAr-a i brekvinara.
2. Ispitati učinke farmakoloških inhibitora signalnoga puta ATR/Chk1 na broj živih stanica leukemijskih linija, prolazak kroz stanični ciklus i izražaj diferencijacijskih biljega stanica U937 i THP-1 potaknutih citarabinom, AIKAr-om i brekvinarom.
3. Odrediti ulogu kinaze Chk1 u diferencijaciji i prolasku kroz stanični ciklus leukemijskih stanica U937 pomoću transfekcije siRNA za Chk1.
4. Ispitati učinke stromalnih stanica MS-5 na broj živih stanica, prolazak kroz stanični ciklus i izražaj diferencijacijskih biljega stanica U937 tretiranih citarabinom, AIKAr-om i brekvinarom.
5. Ispitati učinke citarabina, AIKAr-a i brekvinara na broj živih stanica stromalne linije MS-5, prolazak kroz stanični ciklus, izražaj diferencijacijskih biljega i aktivaciju kinaze Chk1.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Kemikalije

Za provedbu ovog istraživanja korišteni su reagensi, protutijela, stanične linije, kitovi i računalni programi navedeni u tablicama 5, 6, 7 i 8.

Tablica 5. Korišteni reagensi

Kemikalije i rekombinantni proteini		
Reagens	Proizvođač	Kataloški broj
1-β-D-arabinofuranozilcitozin	Sigma, St. Louis, MO, SAD	251010
5-aminoimidazol-4-karboksamid (AIKAr)	Sigma, St. Louis, MO, SAD	A9978
Bifenkvinat natrijev hidrat, brekvinar	Sigma, St. Louis, MO, SAD	SML0113
N-acetil-L-cistein	Sigma, St. Louis, MO, SAD	A7250
Pleriksafor	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, SAD	HY-10046
Torin2	Sigma, St. Louis, MO, SAD	SML1224
VE-821	Sigma, St. Louis, MO, SAD	SML1415
Nukleozidi EmbryoMax	Sigma, St. Louis, MO, SAD	ES-008-D
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Honeywell, Muskegon, MI, SAD	472301
Govedi serumski albumin (prema engl. <i>bovine serum albumine</i> , BSA)	Sigma, St. Louis, MO, SAD	A4503
Tween® 20	Sigma, St. Louis, MO, SAD	P7949
Natrijev azid	Sigma, St. Louis, MO, SAD	S8032
Natrijev klorid	Fagron, Krakow, Poljska	1002476
Glicin	Sigma, St. Louis, MO, SAD	G7126
Natrijev hidrogen fosfat dihidrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1410207

Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1406707
Dihidrorodamin 123 (DHR123)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	D632
Propidijev jodid	Sigma, St. Louis, MO, SAD	P4170
Igepal CA	Sigma, St. Louis, MO, SAD	I3021
Pufer za vezanje aneksina 10X	bioWORLD, Dublin, OH, SAD	21720002-1
Pufer za lizu stanica (10x)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	9803S
Fenilmetilsulfonil fluorid (prema engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF</i>)	Sigma, St. Louis, MO, SAD	P7626
Mikrocistin-LR	Enzo, Life Sciences, Farmingdale, NY, SAD	ALX-350-012-C100
Bradfordov reagens	Sigma, St. Louis, MO, SAD	B6916
Bromfenol modriilo	Sigma, St. Louis, MO, SAD	B6131
Trizma® base	Sigma, St. Louis, MO, SAD	T1503
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, SAD	X-100
RNAza	Sigma, St. Louis, MO, SAD	R6513
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	NP0007
NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0–1.5 mm, Mini Protein Gels	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	NP0323BOX
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	26619
Nitrocelulozna membrana Amersham™ Protran® 0.45 µM	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, SAD	GE10600007
Immobilon®-P PVDF membrana	Millipore	IPVH00005

Kemiluminiscencijski supstrat SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	34577
NycoPrep 1.077	Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norveška	1114741
7-AAD	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka	130-111-568
Tripansko modriilo (0.4%)	Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD	15250-061
Giemsa modriilo	Kemika, Zagreb, Hrvatska	0710304
May-Grünwald modriilo	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1322804
Aneksin A5-FITC	BioLegend, San Diego, CA, SAD	640945

Tablica 6. Korištena protutijela

Protutijela	Proizvođač	Kataloški broj
IgG1-FITC (679.1Mc7)	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	A07795, RRID:AB_2832964
IgG1-FITC (MOPC-21)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400110, RRID:AB_2861401
IgG2a-FITC (RTK2758)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400505, RRID:AB_2736919
IgG2b-FITC (RTK4530)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400606, RRID:AB_326550
IgG1-APC (MOPC-21)	BD Biosciences, San Jose, CA, SAD	555751, RRID:AB_398613
IgG2b-PE (RTK4530)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400608, RRID:AB_326552
IgG1-PE (RTK2071)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400407, RRID:AB_326513
IgG1-PE (MOPC-21)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400114, RRID:AB_326435
IgG1-PerCP (559425)	BD Biosciences, San Jose, CA, SAD	559425, RRID:AB_397240

IgG2a-PE/Cyanine7 (RTK2758)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400522, RRID:AB_326542
IgG2a-APC (RTK2758)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	400511, RRID:AB_2814702
IgG2a-eFluor 660 (eBR2a)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	50-4321-82, RRID:AB_1059850 3
CD11b-FITC (Bear1)	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	IM0530, RRID:AB_130987
CD11b-FITC (ICRF44)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	301330, RRID:AB_2561703
CD11b-PE (M1/70)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	101208, RRID:AB_312791
CD64-FITC (22)	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	B49185
CD34-APC (8G12)	BD Biosciences, San Jose, CA, SAD	345804, RRID:AB_2686894
CD45-PerCP (2D1)	BD Biosciences, San Jose, CA, SAD	345809, RRID:AB_2868830
CD45-FITC (30-F11)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	103108, RRID:AB_312973
CD45-PE (2D1)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	368510, RRID:AB_2566370
Ly-6A/E (Sca-1)-FITC (W18174A)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	160907, RRID:AB_2910335
CD44-PE (IM7)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	103024, RRID:AB_493687
CD73-PE (TY/11.8)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	127205, RRID:AB_1089065
CD105-PE/Cyanine7 (MJ7/18)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	120409, RRID:AB_1027702
CD140a-APC (APA5)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	135907, RRID:AB_2043969
CD34-eFluor 660 (RAM34)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	50-0341-82, RRID:AB_1059682 6

Chk1 mišje monoklonsko protutijelo (2G1D5)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	2360, RRID:AB_2080320
p-Chk1 (S345) kunićje monoklonsko protutijelo (133D3)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	2348, RRID:AB_331212
Cdc2 mišje monoklonsko protutijelo (POH1)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	9116, RRID:AB_2074795
p-Cdc2 (Tyr15) protutijelo	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	9111, RRID:AB_331460
β -aktin mišje monoklonsko protutijelo (AC-15)	Sigma, St. Louis, MO, SAD	A5441, RRID:AB_476744
Protu-mišje IgG, HRP-konjugirano protutijelo	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	7076, RRID:AB_330924
Protu-kunićje IgG, HRP- konjugirano protutijelo	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	7074, RRID:AB_2099233
TGF- β 1 protutijelo	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, SAD	MAB2402, RRID:AB_358119
Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking solution	BioLegend, San Diego, CA, SAD	422302, RRID:AB_2818986
TruStain FcX™ PLUS (protu-mišje CD16/32) protutijelo	BioLegend, San Diego, CA, SAD	156604, RRID:AB_2783138

Tablica 7. Korišteni komercijalni kitovi

Komercijalni kitovi	Proizvođač	Kataloški broj
Aneksin A5-FITC kit	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	IM3546, RRID:AB_130885
LEGENDplex™ Mouse HSC Myeloid Panel (7-plex)	BioLegend, San Diego, CA, SAD	740682

Tablica 8. Korišteni računalni programi

Računalni program	Proizvođač	Kataloški broj
FlowJo_v10.8.1	Tree Star Inc. Ashland, OR, SAD	https://www.flowjo.com/solutions/flowjo , RRID:SCR_008520
ZEN software, blue edition	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Njemačka	https://www.zeiss.com/microscopy/en/products/software/zeiss-zen.html , RRID:SCR_013672
R	Bioconductor	www.r-project.org/ RRID:SCR_001905
LEGENDplex™ Data Analysis Software	BioLegend, San Diego, CA, SAD	https://www.biolegend.com/en-us/immunoassays/legendplex/support/software
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, CA, SAD	https://www.graphpad.com/ , RRID:SCR_002798

4.2. Stanična kultura i kokultura

Stanične linije U937, THP-1 i MOLM-13 su uzgajane u mediju RPMI-1640 uz dodatak 10% fetusnog goveđeg seruma (prema engl. *fetal bovine serum*, FBS) inaktiviranog toplinom, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 µg/mL) pri temperaturi od 37 °C u vlažnom okolišu uz 5% CO₂. Broj živih stanica određen je brojanjem pomoću hemocitometra uz isključenje mrtvih stanica obojenih tripanskim modrilom. U pokusima su stanice oprane, resuspendirane u mediju RPMI-1640 uz dodatak FBS-a, L-glutamina, penicilina i streptomicina te zasađene u gustoći 0,2 x 10⁶ stanica/mL (2 mL po jažici promjera 24 mm u ploče sa šest jažica), odnosno 0,3 x 10⁶ stanica/mL prilikom sađenja u pljoskice površine 25 cm² za izolaciju ukupnih staničnih lizata. Stanice su tretirane kako je navedeno u opisima slika.

Tablica 9. Korištene stanične linije

Stanična linija	Proizvođač	Kataloški broj
U937	ECACC, Salisbury, UK	85011440, RRID:CVCL_0007
THP-1	DSMZ, Braunschweig, Germany	ACC 16, RRID:CVCL_0006
MOLM-13	a gift from P. Gallipoli (obtained from Sanger Institute)	Cell Models Passport, RRID:CVCL_2119
MS-5	DSMZ, Braunschweig, Germany	ACC 411, RRID:CVCL_2128

Tablica 10. Korišteni reagensi za staničnu kulturu

Reagens	Proizvođač	Kataloški broj
Medij RPMI 1640	Life Technologies, Grand Island, NY, USA	42401-018
Medij α -MEM Eagle	PAN-Biotech, Aidenbach, Germany	P04-21150
Fetusni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum, FBS</i>)	Life Technologies, Grand Island, NY, USA	10270-106
L-glutamin 200mM	Life Technologies, Grand Island, NY, USA	25030-024
Natrijev piruvat	Sigma, St. Louis, MO, USA	S8636
Penicilin/streptomycin	Life Technologies, Grand Island, NY, USA	15070-063
Tripsin/EDTA (prema engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA</i>)	Sigma, St. Louis, MO, USA	T3924
Poliesterski umetci 0.4 μ M	Corning®, New York, NY, USA	CLS3450-24EA

Mišja stromalna stanična linija MS-5 je uzgajana u mediju α -MEM, koji sadrži ribonukleozide i deoksiribonukleozide, uz dodatak 10% FBS-a inaktiviranog toplinom, L-glutamina (2mM), natrijevog piruvata (2mM), penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 μ g/mL), pri temperaturi od 37 °C u vlažnom okolišu uz 5% CO₂. U pokusima su stanice MS-5 odignute pomoću otopine tripsina i etilendiamintetraoctene kiseline EDTA, oprane i resuspendirane u mediju α -MEM uz dodatak FBS-a, L-glutamina, penicilina i streptomicina te zasađene u gustoći 90×10^3 stanica po jažici promjera 24 mm ploče sa 6 jažica ili 480×10^3 stanica u pljoskice od 25 cm². Stanične linije AML-a su dodane 24 sata nakon zasađivanja stanica MS-5 u mediju RPMI-1640 i tretirane kako je navedeno u opisima slika. Za sprječavanje izravnog kontakta stromalnih i leukemijskih stanica dio pokusa je proveden uz dodavanje poliesterskih umetaka s porama od 0,4 μ m.

4.3. Analiza staničnog ciklusa i analiza stanične smrti

Za analizu staničnog ciklusa tretirane stanice su oprane u puferiranoj fiziološkoj otopini (prema engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) te 20 minuta inkubirane u Vindelovoj otopini koja sadrži propidijev jodid (50 μ g/ml propidijevog jodida, 10 mM Tris, pH 8, 10 mM NaCl, 10 μ g/ml RNaza A, 0,1 % Igepal). Analiza sadržaja DNA provedena je protočnom citometrijom na najmanje 10 000 stanica iz svakog uzorka koristeći uređaje Attune (Life Technologies, ABI, Carlsbad, CA, SAD) i FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Apoptoza je određena uporabom kita aneksin V-FITC (fluorescein-izotiocijanat, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*) prema uputama proizvođača pomoću protočnog citometra FACSLyric (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Određivanje udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa, udjela stanica pozitivnih na propidij jodid i aneksin-FITC i izrada histogramskih grafičkih prikaza napravljeni su pomoću FlowJo v.10 platform.

4.4. Slobodni radikali kisika

Unutarstanični slobodni radikali kisika (prema engl. *reactive oxygen species*, ROS) su određeni u stanicama koje su nakon tretmana oprane u PBS-u te inkubirane s dihidrorodaminom 123 tijekom 15 minuta na 37 °C u tami. Stanice su analizirane pomoću protočnih citometara

FACSCanto II i FACSLytic (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) te računalnog programa FlowJo v.10 platform.

4.5. Imunofenotipizacija

Stanice tretirane ispitivanim tvarima su oprane u PBS-u i inkubirane tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi s odgovarajućim protutijelima koja su razrijeđena u PBS-u s dodatkom natrijevog azida (0,1 %). Leukemijske stanične linije su prije obilježavanja specifičnim protutijelima inkubirane tijekom 10 minuta u tami na sobnoj temperaturi u 2,5 %-tnoj otopini koja blokira Fc- γ receptore (Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking solution) kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje protutijela za Fc-receptore.

Mišje stromalne stanice su za analizu odizane nakon inkubacije s ispitivanim tvarima pomoću otopine tripsina i EDTA te oprane u hladnom PBS-u koji sadrži 1% BSA, na ledu. Stromalne stanice su prije obilježavanja inkubirane tijekom 10 minuta u tami na ledu u 2,5 %-tnoj otopini koja blokira mišje receptore CD16/32 (TruStain FcX™ PLUS Receptor Blocking solution). Nakon inkubacije s protutijelima stanice su oprane u PBS-u s dodatkom natrijevog azida te raspršene u 250 μ L navedene otopine. Stanice su analizirane protočnom citometrijom pomoću uređaja Attune (Life Technologies, ABI, Carlsbad, CA, SAD) i FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) te računalnog programa FlowJo v.10 platform. Na temelju raspršenja laserske svjetlosti prema naprijed (prema engl. *forward scatter*, *FSC*) i u stranu (prema engl. *side scatter*, *SSC*) odabrana je populacija stanica iz koje su isključene zalijepljene stanice koristeći površinu (prema engl. *forward scatter area*, *FSC-A*) i visinu raspršenja laserske svjetlosti prema naprijed (prema engl. *forward scatter high*, *FSC-H*), a mrtve stanice su isključene iz analize pomoću bojenja 7-AAD-om. Za mišje stromalne stanice MS-5 je korištena dodatna analiza CD45 i SSC. Srednji intenzitet fluorescencije (prema engl. *mean fluorescence intensity*, *MFI*), određen je oduzimanjem MFI-vrijednosti izotipske kontrole od MFI-vrijednosti uzorka obilježenog specifičnim protutijelom.

4.6. Analiza citokina

Za analizu citokina korišten je nadtalog stanica MS-5 koje su inkubirane u mediju RPMI-1640 uz dodatak FBS-a, L-glutamina, penicilina i streptomicina same ili uz prisutnost stanica

U937 tijekom 24 sata. Nakon inkubacije medij je centrifugiran 5 minuta na 1000 rpm i nadtalozu su pohranjeni na -20 °C. Za analizu su uzorci otopljeni i analizirani koristeći kit LEGENDplex™ Mouse HSC Myeloid Panel (7-plex) prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci su inkubirani tijekom 2 sata s kuglicama koje vežu citokine, potom oprani i inkubirani tijekom 1 sata s biotiniziranim protutijelima te inkubirani tijekom 30 minuta sa streptavidin-fikoeritriinom (prema engl. *streptavidin-phycoerythrin, SA-PE*). Razine IL-34 (interleukin-34), IL-5 (interleukin-5), čimbenika stimulacije makrofagnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor, M-CSF*), čimbenika stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (prema engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF*), transformirajućeg čimbenika rasta β (prema engl. *transforming growth factor β , TGF- β*), SCF i CXCL12 određene su protočnim citometrom FACSCanto II i računalnim programom LEGENDplex™ Data Analysis Software.

4.7. Morfološka analiza

Za morfološku analizu 50 000 leukemijskih stanica fiksirano je na mikroskopska stakalca rotacijom od 1000 rpm tijekom 2 minute u citospinu StatSpin Cxtofuge 2 (BeckmanCoulter, Marseille, Francuska) i osušeno tijekom noći. Stromalne stanice uzgajane u pločici sa šest jažica su oprane u PBS-u i osušene tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Osušeni razmazi su obojeni May-Grünwald bojom, koja je razrijeđena s PBS-om u omjeru 1:1 tijekom 5 minuta i Giemsa bojom, koja je razrijeđena s PBS-om u omjeru 1:9 tijekom 20 minuta. Mikroskopska analiza je napravljena pomoću AxioVert 200 mikroskopa i AxioCam MRc 5 kamere i računalnog programa ZEN, blue edition (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

4.8. Stanični lizati i Western blot

Nakon inkubacije s ispitivanim tvarima, stanice su oprane u hladnom PBS-u, raspršene u puferu za lizu stanica (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM etilen-glikol-tetraoctena kiselina, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 2,5 mM natrijev pirofosfat, 1 mM natrijev ortovanadat, 1 mM β -glicerol-fosfat, 1 μ M mikrocistin i 1 mM PMSF) te inkubirane na ledu 10 minuta. Stanice su zatim homogenizirane protiskivanjem kroz iglu promjera 23 G sedam puta te ponovno inkubirane na ledu 10 minuta. Nastali homogenat je centrifugiran 10 minuta na 14

000 x g pri temperaturi od 4 °C. Izdvojeni nadtalog pohranjen je na -80 °C. Koncentracija proteina u ukupnim staničnim lizatima izmjerena je spektrofotometrijski pomoću Bradfordovog reagensa i apsorbancije svjetlosti valne duljine 595 nm na spektrofotometru BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Izmjerene vrijednosti uspoređene su s vrijednostima baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija BSA (0,1 – 1,0 mg/mL).

Uzorcima staničnih lizata koji sadrže po 100 µg proteina je dodan 4 x LDS uz 10 % TCEP te su kuhani 10 minuta na 70 °C da bi se denaturirali proteini. Potom je nanoseno 50 µg po jažici 4 – 12 %-tnog SDS-poliakrilamidnog gela i transferirano na PVDF membrane koristeći sustav za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Nakon transfera membrane su inkubirane u otopini za blokiranje koja se sastoji od 5 %-tnog bezmasnog mlijeka u prahu otopljenog u puferu TBS-Tween (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 8,0) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi uz protresanje. Membrane su zatim oprane (3 puta po 5 minuta u 20 mL TBS-Tween-a) te inkubirane s primarnim protutijelima anti-Chk1, anti-pChk1 (S345), anti-CDC2 ili anti-pCDC2 (Tyr15) koja su razrijeđena u TBS-Tween-u s 5 % BSA (1:1000) na 4 °C tijekom noći uz kontinuirano protresanje. Nakon inkubacije su membrane ponovno oprane te potom inkubirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelima razrijeđenima 1:2000 u otopini sastavom jednakoj otopini za blokiranje na sobnoj temperaturi uz kontinuirano protresanje tijekom 2 sata. Na membrane oprane od suviška sekundarnog protutijela (3 puta po 5 minuta u 20 mL TBS-Tween-a), nanosen je kemiluminiscencijski supstrat i signal je zabilježen pomoću sustava ChemiDoc™ XRS+ (BioRad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Za provjeru ujednačenog dodavanja proteina u svaku jažicu gela korišten je signal primarnih protutijela za β-aktin u razrjeđenju 1:60 000 i analiziranih kako je prethodno opisano.

4.9. siRNA-transfekcija

Kako bi tijekom provedbe transfekcije stanice U937 bile u eksponencijalnoj fazi rasta, dan ranije su zasađene u gustoći $0,4 \times 10^6$ stanica/mL. Za transfekciju je 15×10^6 stanica oprano u 3 mL sterilnog PBS-a bez Ca^{2+} i Mg^{2+} te resuspendirano u 600 µL pufera R (komponenta seta za transfekciju Neon, MPK10025100). Polovica dobivene stanične suspenzije pomiješana je s kontrolnom siRNA, a druga polovica sa siRNA za ciljani protein tako da otopina siRNA sačinjava 13-14 % ukupnog volumena. Jedan udar napona 1050 V u trajanju 50 ms pomoću

uređaja Neon Transfection System (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) korišten je za elektroporaciju stanica. Potom je 100 μ L stanične suspenzije pomiješano s 200 μ L medija RPMI-1640 s dodatkom 10 % FBS-a i 2 mM glutamina bez antibiotika, inkubirano tijekom 15 minuta na 37 °C te potom razrijeđeno u ukupnom volumenu od 2,5 mL medija bez antibiotika. Sljedeći dan su stanice pokupljene i zasađene za pokus u kojem se ispitao učinak utišavanja genske ekspresije na proliferaciju, stanični ciklus te diferencijaciju uz inkubaciju s ispitivanim tvarima. Dio stanica je iskorišten za pripremu ukupnih staničnih lizata i Western blot analizu kojom se ujedno provjeravala i uspješnost provedene transfekcije.

4.10. Sekvenciranje RNA

Kontrolne stanice U937 i stanice U937 tretirane 100 nM citarabinom uzgajane su same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, stanice su prikupljene i istaložene centrifugiranjem. Izolaciju RNA, procjenu kvalitete uzorka, pripremu RNA knjižnice, sekvenciranje i djelomičnu analiza podataka (kontrola kvalitete neobrađenih podataka, skraćivanje, mapiranje, usklađivanje i izračunavanje broja pogodaka gena) provedeno je u Novogene UK Company Limited (Cambridge, UK). RNA je pročišćena koristeći poli-(A) obogaćivanje. Nakon fragmentacije je sintetiziran prvi lanac cDNA koristeći smjesu baza za DNA. Potom je sintetiziran drugi lanac cDNA koristeći dUTP za usmjerenu, odnosno dTTP za neusmjerenu cDNA knjižnicu. Nakon pripreme klastera dobiveni podatci su analizirani koristeći sekvenciranje na Illumina NovaSeq 6000 platform. Očitavanja su mapirana prema referentnom genomu koristeći Hisat2, a Featurecounts je korišten za dobivanje broja očitavanja za pojedini gen. Analiza diferencijalne ekspresije je napravljena pomoću računalnog programa DeSeq2 R package, a p-vrijednosti su prilagođene pomoću metoda po Benjaminiju i Hochbergu. Korigirane p-vrijednosti od 0.01 i $|\log_2(\text{Fold Change})|$ od 1 su zadane kao granice statističke značajnosti razlike u ekspresiji gena dobivene pomoću DESeq2 R package. Analiza obogaćenja je dobivena koristeći Gene Ontology (GO) pathways (<http://www.geneontology.org/>) i računalni program clusterProfiler R package.

Dobiveni podatci su pohranjeni u bazi podataka ArrayExpress database pod identifikacijskom oznakom E-MTAB-13192.

4.11. Statistička analiza

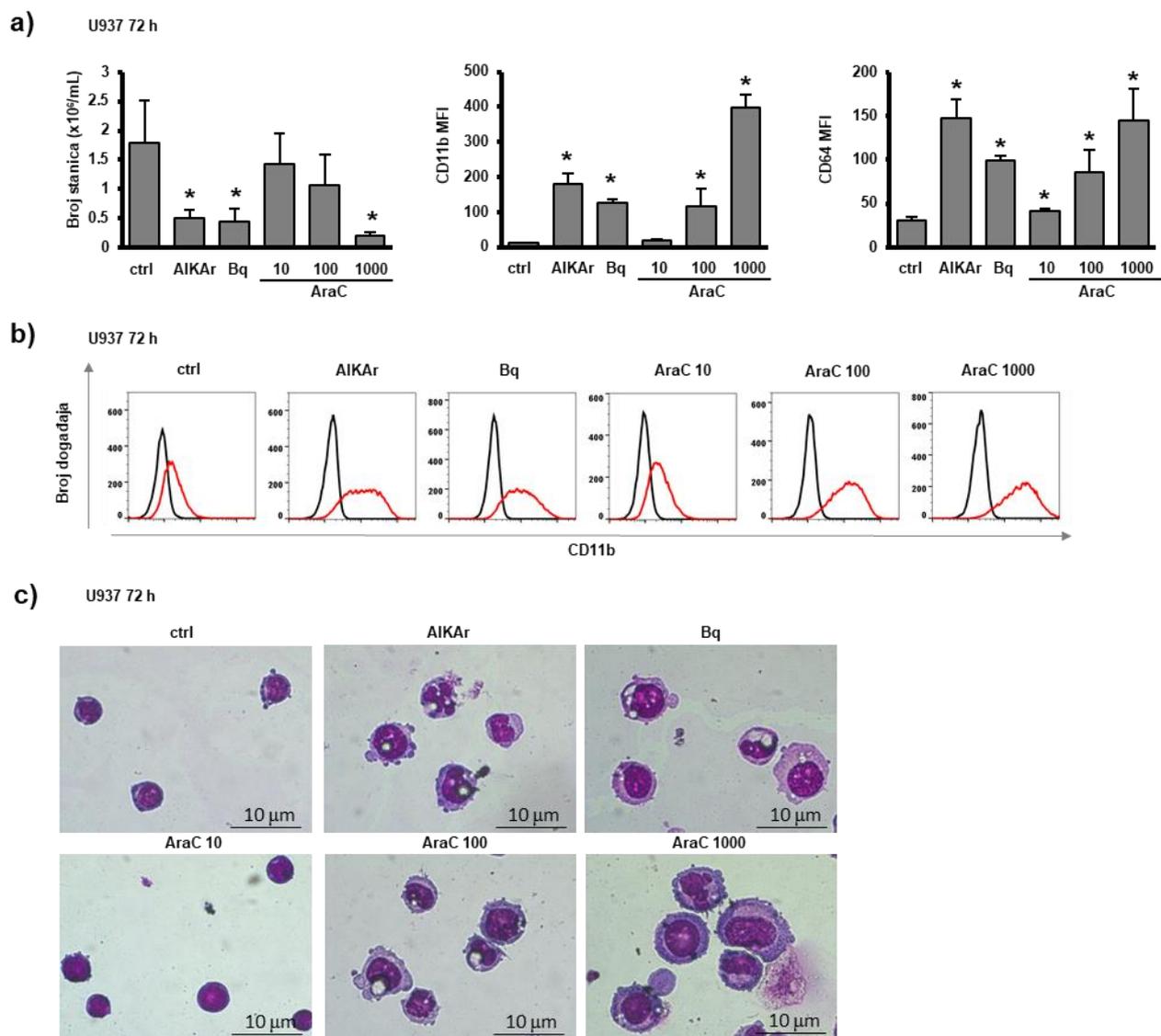
Rezultati temeljeni na najmanje tri nezavisna pokusa su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) te analizirani pomoću Studentovog t-testa. Statistički značajnima se smatraju vrijednosti $p < 0,05$. Za statističku analizu korišteni su programi Microsoft Excel i GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Citarabin smanjuje proliferaciju, potiče diferencijaciju i aktivira Chk1 ovisno o dozi

Prethodne studije pokazale su da koncentracije citarabina manje od 100 nM uzrokuju diferencijaciju leukemijskih stanica *in vitro*, dok veće koncentracije imaju citotoksični učinak (29,36,37). Koncentracije AraC-a između 10 i 100 nM *in vitro* su usporedive s koncentracijama u plazmi pacijenata liječenih dozom od 20 mg/m² dnevno u kontinuiranoj intravenskoj infuziji tijekom prvog i drugog tjedna liječenja (67). Stoga smo ispitali učinke tri različite koncentracije citarabina (10 nM, 100 nM i 1000 nM) na broj i diferencijaciju stanica linije U937 te usporedili s učincima AIKAr-a (0,2 mM) i brekvinara (500 nM).

Kao što je prethodno opisano (28), inkubacija stanica s AIKAr-om i brekvinarom tijekom 72 sata statistički značajno smanjuje broj živih stanica te povećava MFI stanica koje su inkubirane s fluorescentnim protutijelima koja vežu CD11b i CD64 na stanicama U937 (Slika 6.a). Inkubacija stanica s citarabinom smanjuje broj živih stanica i povećava izražaj biljega diferencijacije ovisno o koncentraciji (Slika 6.a). Na Slici 6.b vidljivo je da su primjerni histogrami stanica obilježenih protutijelom koje prepoznaje CD11b te odgovarajućom izotipskom kontrolom striktno unimodalni te da su učinci 100 nM citarabina jednaki učincima 0,2 mM AIKAr-a i 500 nM brekvinara. Ovi su rezultati potkrijepljeni morfološkom analizom koja je otkrila povećanje veličine stanica i vakuolizaciju sa smanjenjem omjera jezgre i citoplazme (Slika 6.c).

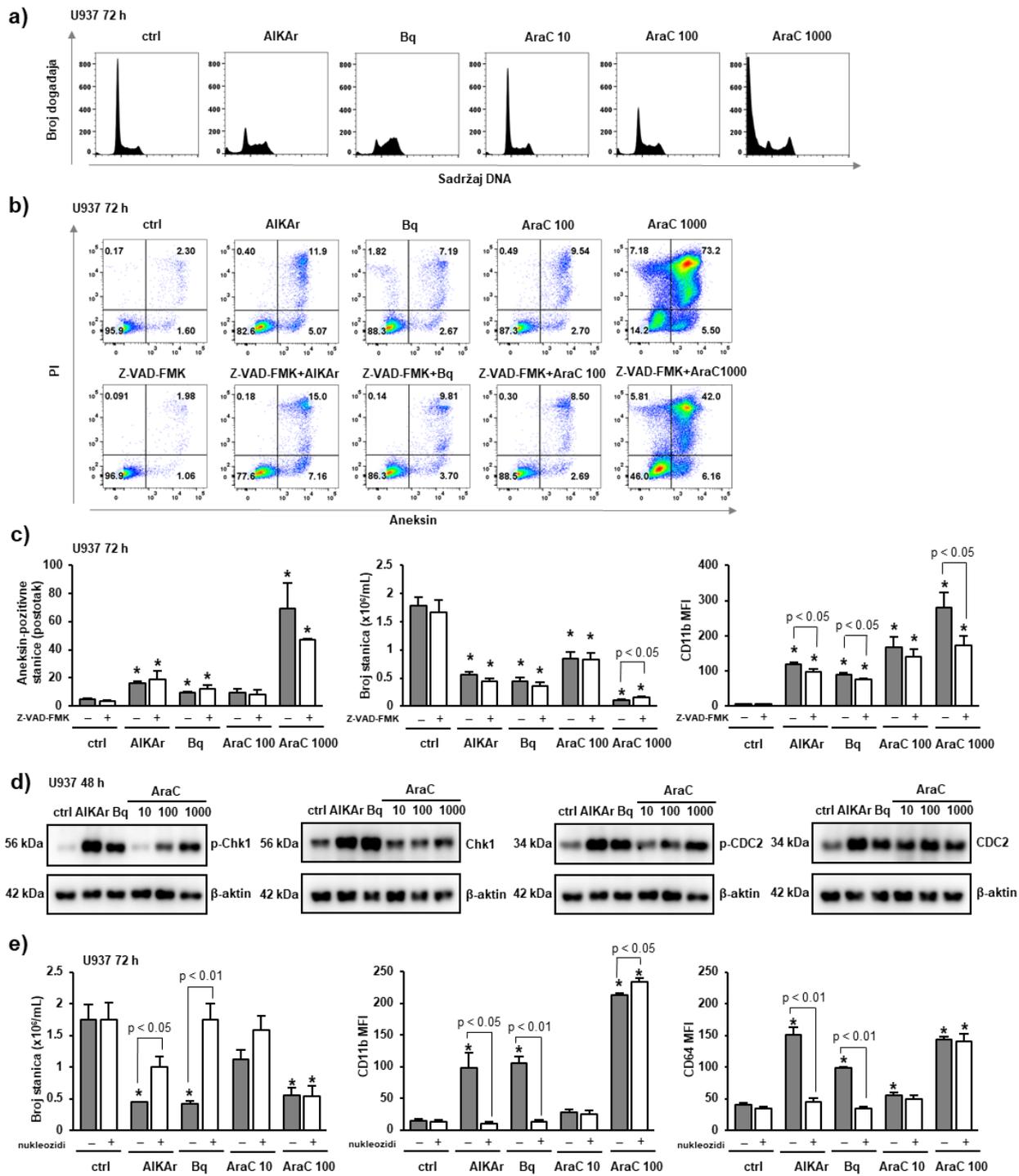


Slika 6. Citarabin smanjuje broj i potiče diferencijaciju leukemijskih stanica U937 ovisno o dozi. Stanice U937 uzgajane su tijekom 72 sata bez (ctrl) ili uz dodatak AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μ M) ili citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM). (a) Broj živih stanica određen pomoću hemocitometra i tripanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). (b) Primjerni histogrami analize izražaja biljega u kojima crna linija predstavlja izotipsku kontrolu, a crvena CD11b. (c) Morfološka analiza U937 stanica obojenih May-Grünwald-Giemsa bojom nakon citospina (uvećanje x100).

Potom smo ispitali učinke tvari na udio stanica U937 u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Kao što je vidljivo na Slici 7.a, AIKAr i brekvinar povećavaju udio stanica u S-fazi staničnog ciklusa, kao što je i prethodno opisano (28). Citarabin je smanjio udio stanica u G₁-fazi i povećao udio stanica u S-fazi u stanicama koje su tretirane manjim koncentracijama citarabina (10 i 100 nM). U stanicama koje se inkubirane s 1000 nM citarabinom, zamjećuje se povećanje udjela stanica u sub-G₁ i G₂/M-fazi staničnog ciklusa (Slika 7.a).

Povećani udio stanica u sub-G₁-fazi upućuje na moguću apoptozu koju smo dodatno provjerili određivanjem vezanja aneksin-V FITC-a. Kao što je vidljivo na Slici 7.b, stanice tretirane 100 nM citarabinom, AIKAr-om i brekvinarom imaju podjednake postotke stanica pozitivnih na aneksin-V FITC, a taj je postotak znatno veći nakon tretmana 1000 nM citarabinom. Kako bismo dodatno ispitali moguću ulogu apoptoze u učincima ispitivanih tvari, stanicama smo prethodno dodali pan-kaspazni inhibitor Z-VAD-FMK u koncentraciji od 10 μM koja nije imala učinak na vijabilnost i diferencijaciju kontrolnih stanica. Kao što je vidljivo na Slici 7.c, Z-VAD-FMK je imao značajne učinke na apoptozu i izražaj biljega u stanicama koje su tretirane velikom koncentracijom citarabina (1000 nM). Međutim, učinci 100 nM citarabina na broj živih stanica i izražaj CD11b nisu spriječeni dodavanjem Z-VAD-FMK što upućuje da je smanjenje broja živih stanica nastalo zbog zastoja u staničnom ciklusu i diferencijacije, a ne zbog umiranja stanica apoptozom.

Rezultati naših prethodnih istraživanja pokazali su da AIKAr i brekvinar potiču diferencijaciju stanica AML-a aktivacijom signalnoga puta ATR/Chk1 (28). Kako bismo ispitali moguću povezanost zastoja u staničnom ciklusu potaknutog citarabinom s aktivacijom kinaze Chk1, odredili smo količinu kinaze Chk1 fosforilirane na serinskom ostatku 345 u ukupnim staničnim lizatima stanica koje su tretirane tvarima tijekom 48 sati. Kao što je vidljivo na primjernom Western blotu na Slici 7.c, citarabin oponaša učinke AIKAr-a i brekvinara te povećava količinu fosforiliranog oblika Chk1 u ovisnosti o koncentraciji. Fosforilacija Chk1 na serinskom ostatku 345 smatra se znakom aktivacije, a aktivirana kinaza Chk1 koči prolazak kroz stanični ciklus inhibicijom kinaze CDK1 (Cdc2). Stoga smo dodatno ispitali učinke tvari na fosforilaciju Cdc2 na tirozinskom ostatku 15, a što se smatra znakom inhibicije. Kao što je vidljivo na Slici 7.d, količina Ser345-fosforiliranog Chk1 u potpunosti odgovara količini Cdc2 fosforiliranoj na tirozinskom ostatku 15. Stoga smo zaključili da citarabin potiče staničnu diferencijaciju usporedno sa zastojem u staničnom ciklusu, aktivacijom Chk1 i inhibicijom CDC2 te da učinci citarabina oponašaju učinke inhibitora sinteze pirimidina.



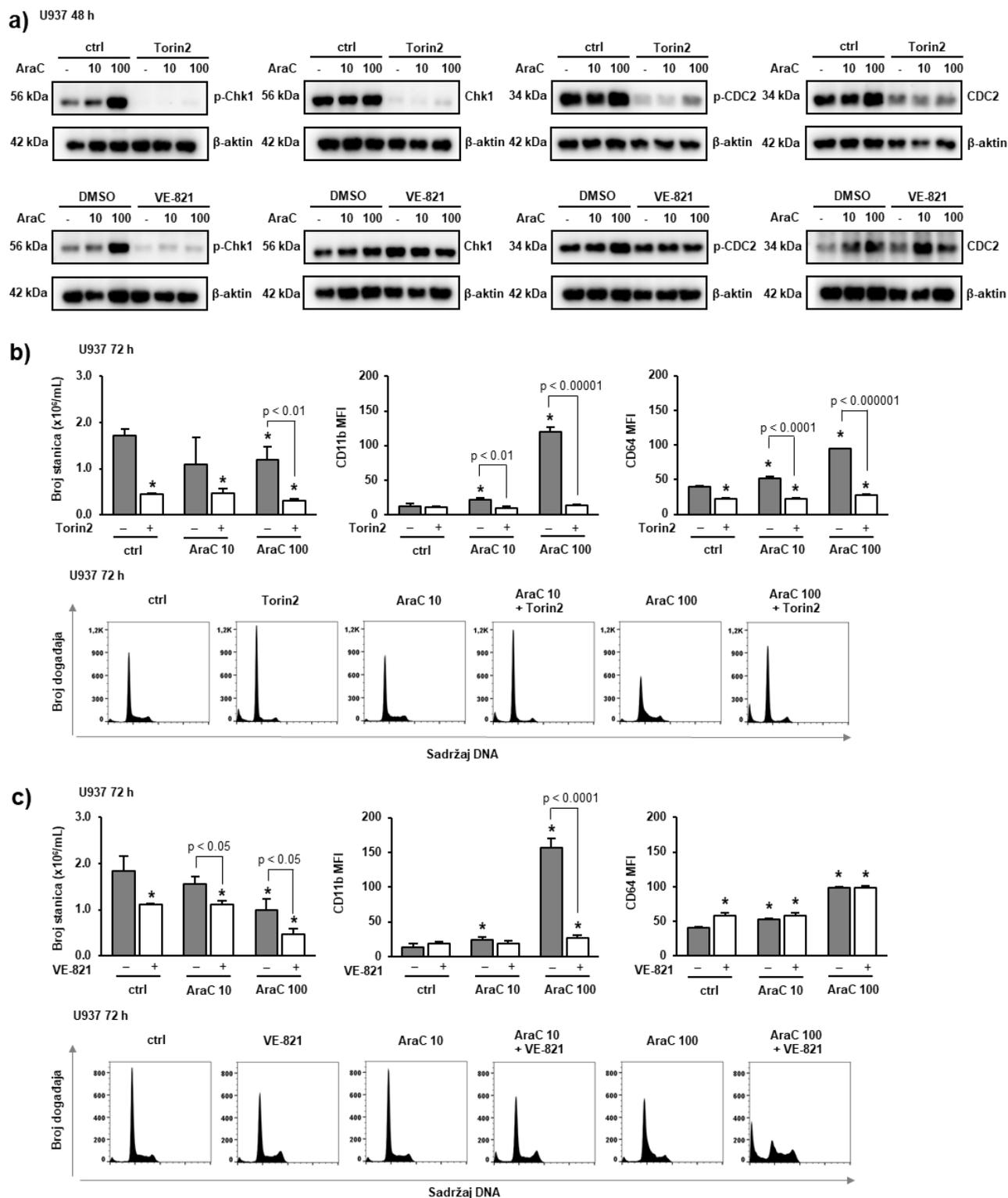
Slika 7. Citarabin uzrokuje zastoj u staničnom ciklusu i aktivira Chk1. Stanice U937 uzgajane su bez (ctrl) ili uz dodatak AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μ M) ili citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. **(a)** Primjerni histogrami analize stanica U937 obojenih propidijevim jodidom (PI). **(b)** Pan-kaspazni inhibitor Z-VAD-FMK (10 μ M) je dodan 30 minuta prije dodavanja ispitivanih tvari. Primjerni točkasti grafikoni stanica obojenih s propidijevim jodidom i aneksin V-FITC-om i analiziranih protočnom citometrijom. **(c)** Postotak aneksin V-FITC-pozitivnih stanica, broj živih stanica i izražaj biljega diferencijacije CD11b su određeni nakon 72 sata. **(d)** Stanice U937 uzgajane su u nazočnosti AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μ M) i citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM). Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot

radi utvrđivanja količine Ser345-fosforiliranog Chk1 (p-Chk1), ukupnog Chk1, Tyr15-fosforiliranog CDC2 i ukupnog CDC2. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa. (e) Broj živih stanica i izražaj diferencijacijskih biljega stanica U937 bez dodatka (-) ili s dodatkom (+) smjese nukleozida (1x) 15 minuta nakon dodavanja ispitivanih tvari. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

Iako se Chk1 aktivira podjednako u odgovoru na citarabin i inhibitore sinteze pirimidina zbog zastoja u replikaciji, uzroci zastoja u replikaciji se vjerojatno razlikuju. AIKAr i brekvinar koče sintezu pirimidina te tako uzrokuju manjak nukleotida koji su nužni za udvostručenje DNA. U skladu s time, naše prethodno istraživanje pokazalo je da se učinci AIKAr-a i brekvinara na aktivaciju Chk1 i diferencijaciju ukidaju dodatkom nukleozida ili uridina (28). S druge strane, smatra se da citarabin uzrokuje zastoj u replikaciji jer se nakon fosforilacije u AraCTP izravno natječe s dCTP za ugradnju u novosintetiziranu DNA. Kako bismo isključili moguću ulogu manjka nukleozida u mehanizmu djelovanja citarabina, stanicama koje su tretirane citarabinom dodana je smjesa nukleozida (Slika 7.e). Kao što je prethodno opisano (28), smjesa nukleozida smanjila je učinke AIKAr-a i brekvinara na broj živih stanica i u potpunosti poništila učinke izražaj biljega CD11b i CD64, ali nije spriječila učinke citarabina na diferencijaciju. Stoga smo zaključili da citarabin i inhibitori sinteze pirimidina podjednako aktiviraju Chk1 i potiču diferencijaciju, ali da učinci citarabina nisu posredovani manjkom nukleozida.

5.2. Farmakološka inhibicija signalnog puta ATR/Chk1 sprječava diferencijaciju i zastoj u staničnom ciklusu

Torin2 i VE-821 su farmakološki inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1 koji su u našem prethodnom istraživanju spriječili učinke AIKAr-a i brekvinara (28). Kako bismo ispitali ulogu kinaze Chk1 u diferencijaciji potaknutoj citarabinom, stanice U937 smo najprije inkubirali s inhibitorima te odredili učinak na fosforilaciju Chk1 u stanicama koje su tretirane citarabinom. Kao što je vidljivo na Slici 8.a, Torin2 i VE-821 smanjuju količinu Chk1 fosforiliranog na serinskom ostatku 345, ali VE-821 nema osobitog učinka na fosforilaciju CDC2 na tirozinskom ostatku 15.



Slika 8. Farmakološki inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1 smanjuju učinke citarabina na diferencijaciju stanica i stanični ciklus. Stanice U937 uzgajane su bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100 nM). Torin2 (100 nM), VE-821 (10 μ M) ili otapalo (DMSO) su dodani 30 minuta prije dodavanja citarabina. (a) Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Ser345-fosforiliranog Chk1 (p-Chk1), ukupnog Chk1, Tyr15-fosforiliranog CDC2 (p-CDC) i ukupnog CDC2. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa. (b-c) Broj živih stanica, izražaj diferencijacijskih biljega i

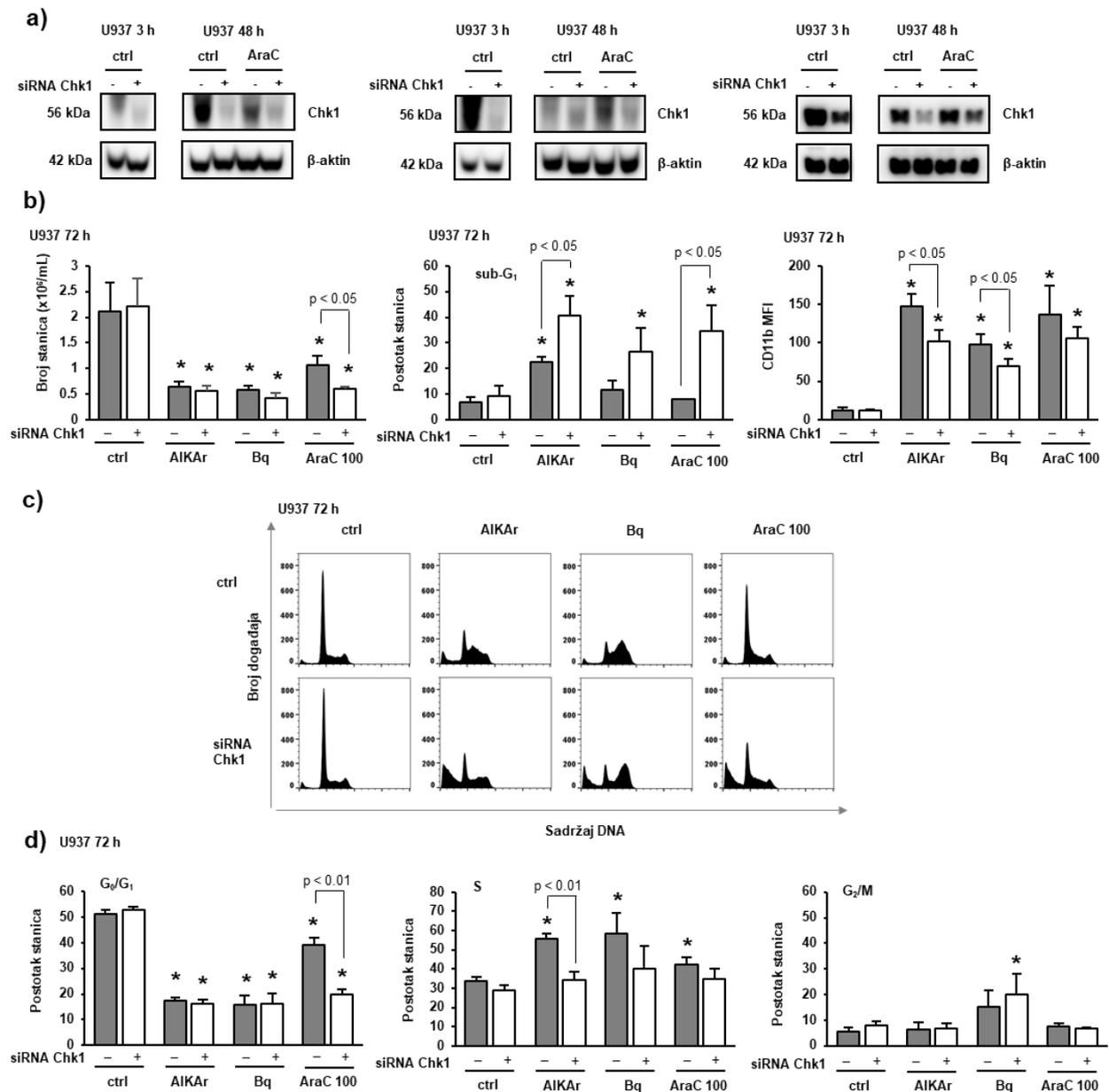
stanični ciklus stanica U937 koje su prethodno tretirane inhibitorima Torin2 (b) i VE-821 (c). Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

Kao što je prikazano na Slici 8.b, Torin 2 (100 nM) je značajno smanjio broj živih stanica, spriječio povećanje izražaja biljega diferencijacije te zaustavio i kontrolne i stanice tretirane citarabinom u G_0/G_1 -fazi staničnog ciklusa. Kao što je prikazano na Slici 8.c, VE-821 (10 μ M) je smanjio broj živih stanica i smanjio izražaj biljega diferencijacije u odgovoru na citarabin. Međutim, sukladno različitim učincima na fosforilaciju CDC2, učinci VE-821 na stanični ciklus različiti su od učinaka Torin2. Iako se učinci dvaju inhibitora na stanični ciklus razlikuju, jednaki učinci na aktivaciju Chk1 i diferencijaciju potaknutu citarabinom upućuju na moguću ulogu Chk1 u posredovanju učinaka citarabina.

5.3. Smanjenje količine proteina Chk1 smanjuje učinke citarabina na izražaj diferencijacijskih biljega i zastoj u S-fazi staničnog ciklusa, a povećava apoptozu

Različiti učinci Torina2 i VE-821 na stanični ciklus pokazuju da farmakološki inhibitori nisu samo specifični inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1, već ostvaruju učinke i na druge ciljane molekule u stanicama. Kako bismo ciljano potvrdili ulogu Chk1 u diferencijaciji potaknutoj citarabinom, ispitali smo učinke tvari u stanicama U937 u kojima je Chk1 posttranslacijski utišan s pomoću RNA-interferencije. U tri nezavisna pokusa transfekcija specifičnom siRNA smanjila je količinu Chk1 u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim s 100 nM AraC-om (Slika 9.a). Smanjenje količine proteina Chk1 smanjilo je broj živih stanica i izražaj CD11b uz povećanje udjela stanica u sub- G_1 -fazi staničnog ciklusa (Slika 9.b). Analiza staničnog ciklusa pokazuje kako utišavanje Chk1 uzrokuje smanjenje udjela stanica u S-fazi u odgovoru na sve testirane tvari te smanjuje G_0/G_1 -fazu u stanicama koje su tretirane citarabinom (Slika 9.c i d).

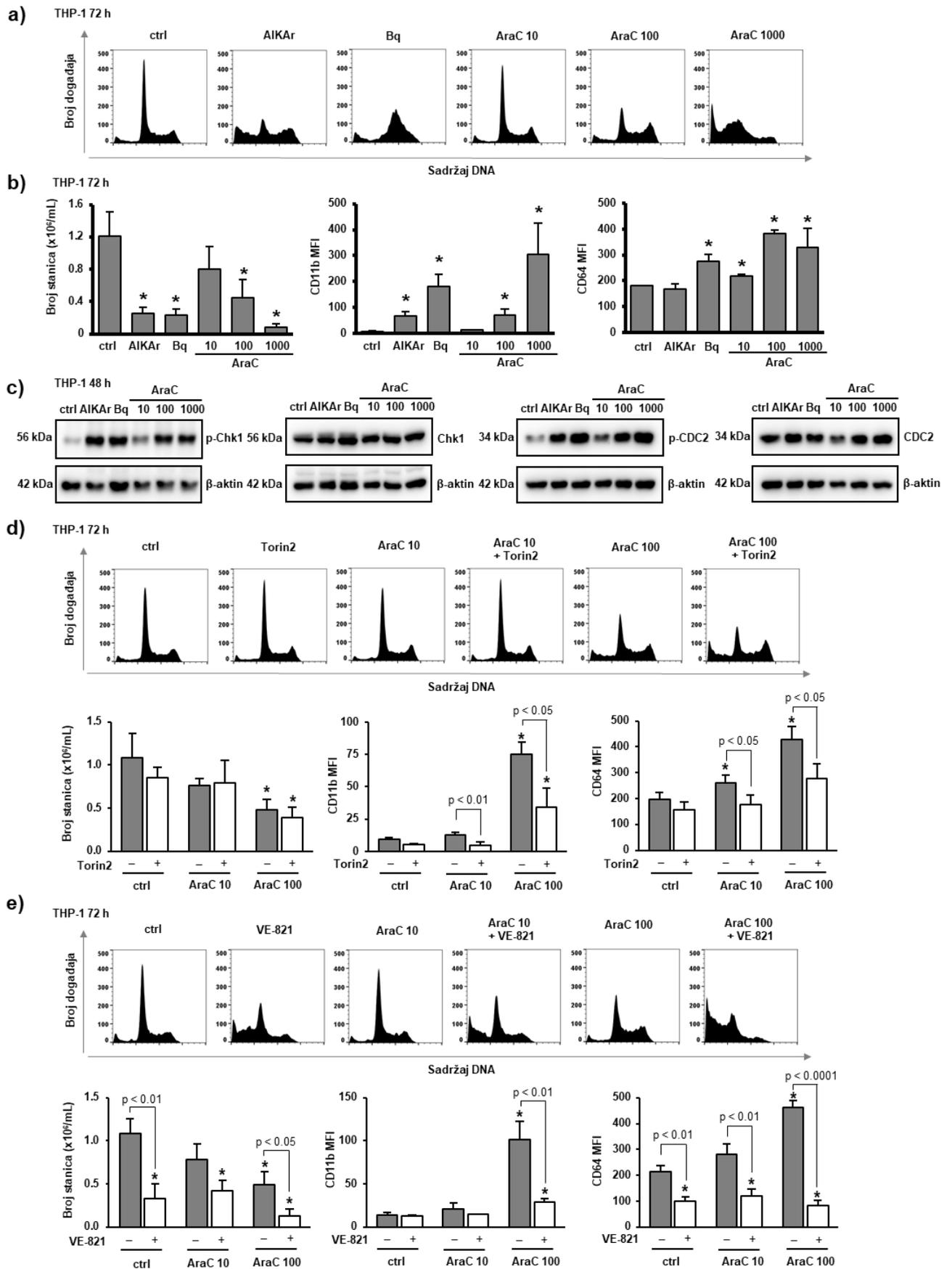
Ovi rezultati upućuju na zaključak da je normalna količina Chk1 nužna za diferencijaciju potaknutu citarabinom, te da smanjenje Chk1 smanjuje diferencijaciju, a povećava apoptozu.



Slika 9. Smanjenje količine proteina Chk1 transfekcijom siRNA smanjuje učinke citarabina na izražaj biljega diferencijacije i zastoja u S-fazi staničnog ciklusa. Stanice U937 transficirane su odgovarajućom kontrolnom siRNA i siRNA usmjerenom protiv Chk1 (kombinacija četiri slijeda). AIKAr (0,2 mM), brekvinar (Bq) (0,5 μ M) ili citarabin (AraC) (100 nM) dodani su 24 sata nakon transfekcije. **(a)** Ukupni stanični lizati izolirani su 3 sata ili 48 sati nakon dodatka ispitivanih tvari te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine ukupnog Chk1. Prikazani su rezultati tri nezavisna pokusa. **(b)** Broj živih stanica određen brojenjem pomoću hemocitometra i tripsanskog modrila te izražaj diferencijacijskog biljega CD11b i postotak stanica u sub- G_1 -fazi staničnog ciklusa određeni su pomoću protočne citometrije 72 sata nakon dodavanja ispitivanih tvari. **(c)** Primjerni histogrami analize stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. **(d)** Postotak stanica u G_0/G_1 , S i G_2/M -fazama staničnog ciklusa. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

5.4. Citarabin i farmakološki inhibitori signalnog puta ATR/Chk1 imaju slične učinke na proliferaciju i diferencijaciju stanica druge monocitne leukemijske stanične linije

Kako bismo provjerili jesu li učinci citarabina ograničeni samo na staničnu liniju U937, ispitali smo učinke inhibitora sinteze pirimidina i različitih koncentracija citarabina na ljudsku monocitnu leukemijsku liniju THP-1. Analiza staničnog ciklusa pokazala je da sve ispitivane tvari povećavaju udio stanica THP-1 u S-fazi staničnog ciklusa, a 1000 nM AraC potiče izraženo nakupljanje stanica u sub-G₁-fazi (Slika 10.a). Sve testirane tvari su smanjile broj živih stanica te povećale izražaj biljega diferencijacije (Slika 10.b). Western blot analiza pokazuje povećanje Ser345-fosforiliranog Chk1 i Tyr15-fosforiliranog CDC2 u odgovoru na testirane tvari (Slika 10.c). Farmakološki inhibitori signalnog puta ATR/Chk1, Torin2 (Slika 10.d) i VE-821 (Slika 10.e), smanjuju povećanje izražaja diferencijacijskih biljega u odgovoru na AraC. Iz toga se može zaključiti kako diferencijacija posredovana citarabinom nije ograničena na liniju U937, već se javlja i u drugim monocitnim leukemijskim linijama.

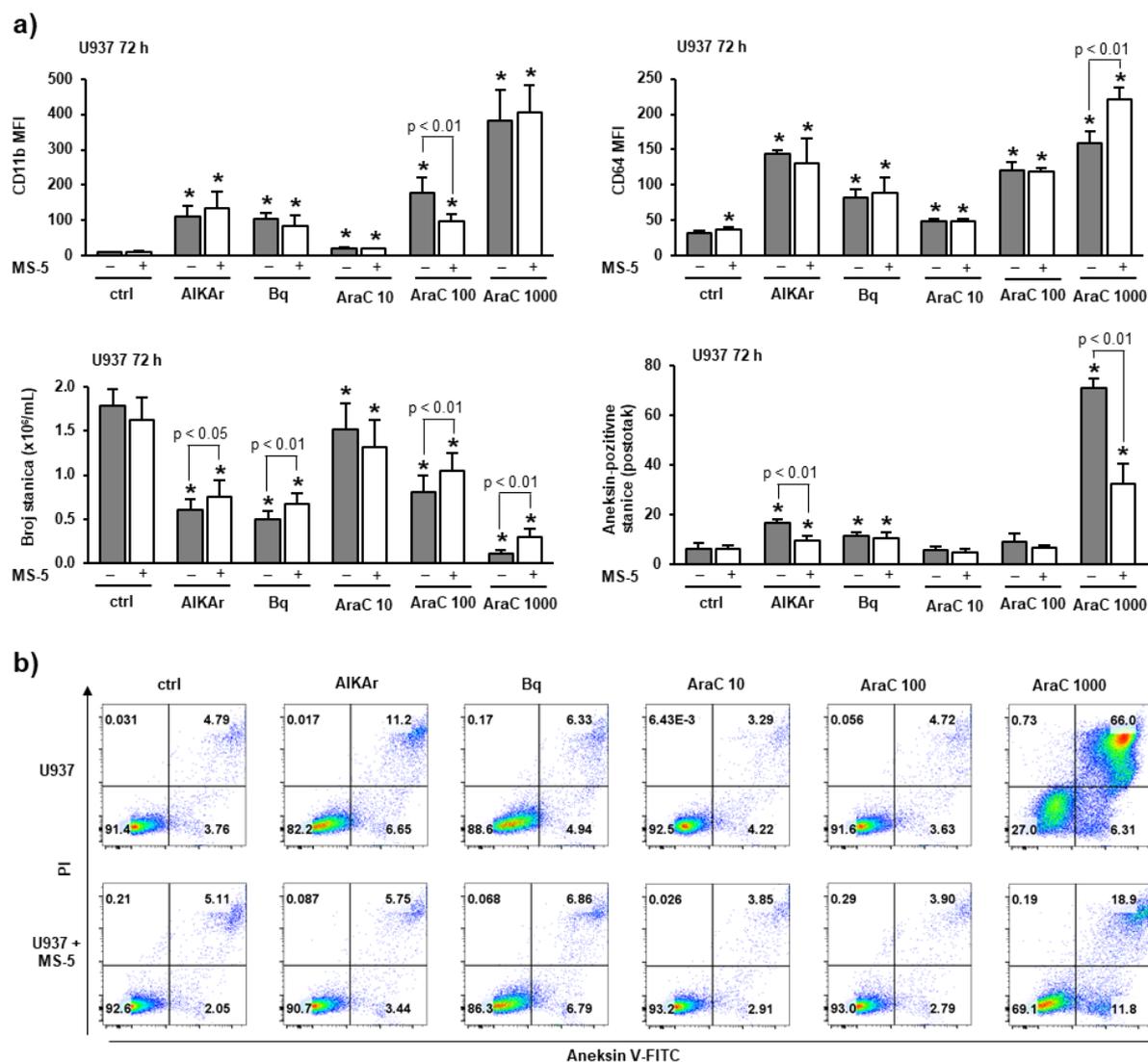


Slika 10. Citarabin ima slične učinke na proliferaciju i diferencijaciju monocitne stanične linije THP-1. Stanice THP-1 uzgajane su bez (ctrl) ili uz dodatak AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μ M) ili citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. (a) Primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. (b) Broj živih stanica određen brojenjem pomoću hemocitometra i tripanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64. (c) Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Ser345-fosforiliranog Chk1 (p-Chk1), ukupnog Chk1, Tyr15-fosforiliranog CDC2 (p-CDC) i ukupnog CDC2. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa. (d) Torin2 (10 nM), (e) VE-821 (2 μ M) ili otapalo (DMSO) su dodani 30 minuta prije dodavanja citarabina. Prikazani su primjerni histogrami analize stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

5.5. Stromalne stanice smanjuju učinke niske doze citarabina na diferencijaciju i zastoj u staničnom ciklusu leukemijske stanične linije U937

Kako bismo bolje oponašali učinke mikrookoliša koštane srži na stanice AML-a *in vitro*, stanice U937 smo inkubirali sa stromalnom staničnom linijom MS-5 za koju je prethodno opisano da najbolje podržava proliferaciju ljudskih leukemijskih stanica (62). Stanična linija MS-5 izolirana je iz koštane srži miša i raste u staničnoj kulturi kao sloj stanica koje adheriraju za plastiku pa se kokultura s leukemijskim stanicama koristi kao model učinaka strome na leukemijske stanice (62). U svrhu ovog istraživanja stromalne stanice su zasađene 24 sata prije leukemijskih stanica kako bi stvorile adherentni sloj koji prekriva dno jažice, a testirane tvari dodane su odmah nakon zasađivanja leukemijskih stanica.

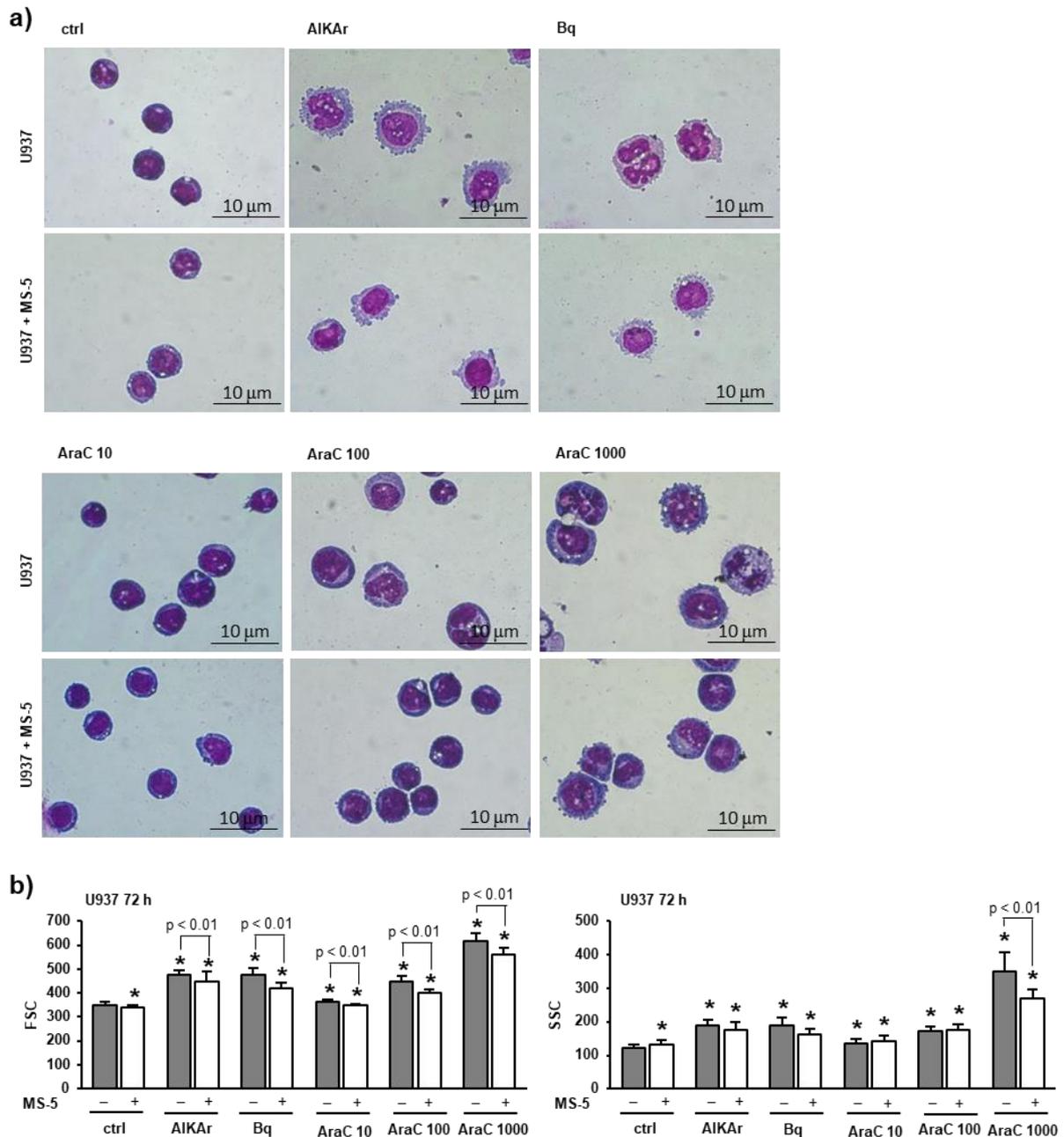
Kao što je prikazano na Slici 11.a i b, prisutnost stanica MS-5 povećala je broj živih stanica U937 tretiranih citarabinom i inhibitorima sinteze pirimidina. Međutim, prisustvo stromalnih stanica smanjilo je izražaj biljega diferencijacije CD11b samo na stanicama koje su tretirane niskom dozom citarabina, a nije imalo učinaka na stanice tretirane inhibitorima sinteze pirimidina. Dodatno, izražaj CD11b ostao je povećan na stanicama koje su preživjele visoku dozu citarabina pa smo nastavili istraživanja učinaka stromalnih stanica na diferencijaciju i citotoksičnost leukemijskih stanica u odgovoru na različite koncentracije citarabina.



Slika 11. Stromalna stanična linija MS-5 smanjuje diferencijaciju stanica U937 potaknutu niskom dozom citarabina. Stanice U937 su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μ M) ili citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. **(a)** Izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 i postotak Aneksin V-FITC pozitivnih stanica određeni su pomoću protočne citometrije, a broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost). **(b)** Primjerna točkasti grafikoni stanica U937 obojenih Aneksin V-FITC i propidijevim jodidom (PI) i analiziranih protočnom citometrijom.

Prethodni pokusi s primjenom pankaspaznog inhibitora (Slika 7.b i c) uputili su na zaključak da smanjenje broja živih stanica u odgovoru na nisku dozu citarabina nastaje zbog zastoja u staničnom ciklusu i diferencijacije, a ne zbog umiranja apoptozom. Kako bismo ispitali učinak stromalnih stanica na apoptozu potaknutu s AraC-om, usporedili smo postotak aneksin-pozitivnih stanica u prisutnosti ili odsutnosti stromalne stanične linije MS-5 (Slika 11).

Kao što smo prethodno zamijetili, prisutnost niske doze (100 nM) AraC-a nije imala značajnih učinaka na postotak aneksin-pozitivnih stanica U937, dok je postotak aneksin-pozitivnih stanica tretiranih s AraC-om u koncentraciji od 1000 nM bio značajno povećan. Prisutnost strome nije imala učinka na apoptozu stanica koje su tretirane niskom dozom AraC-a, ali je spriječila povećanje apoptoze inducirano visokom dozom AraC-a (1000 nM). Ovi rezultati upućuju na zaključak da diferencijacija koju potiče AraC prethodi programiranoj staničnoj smrti.

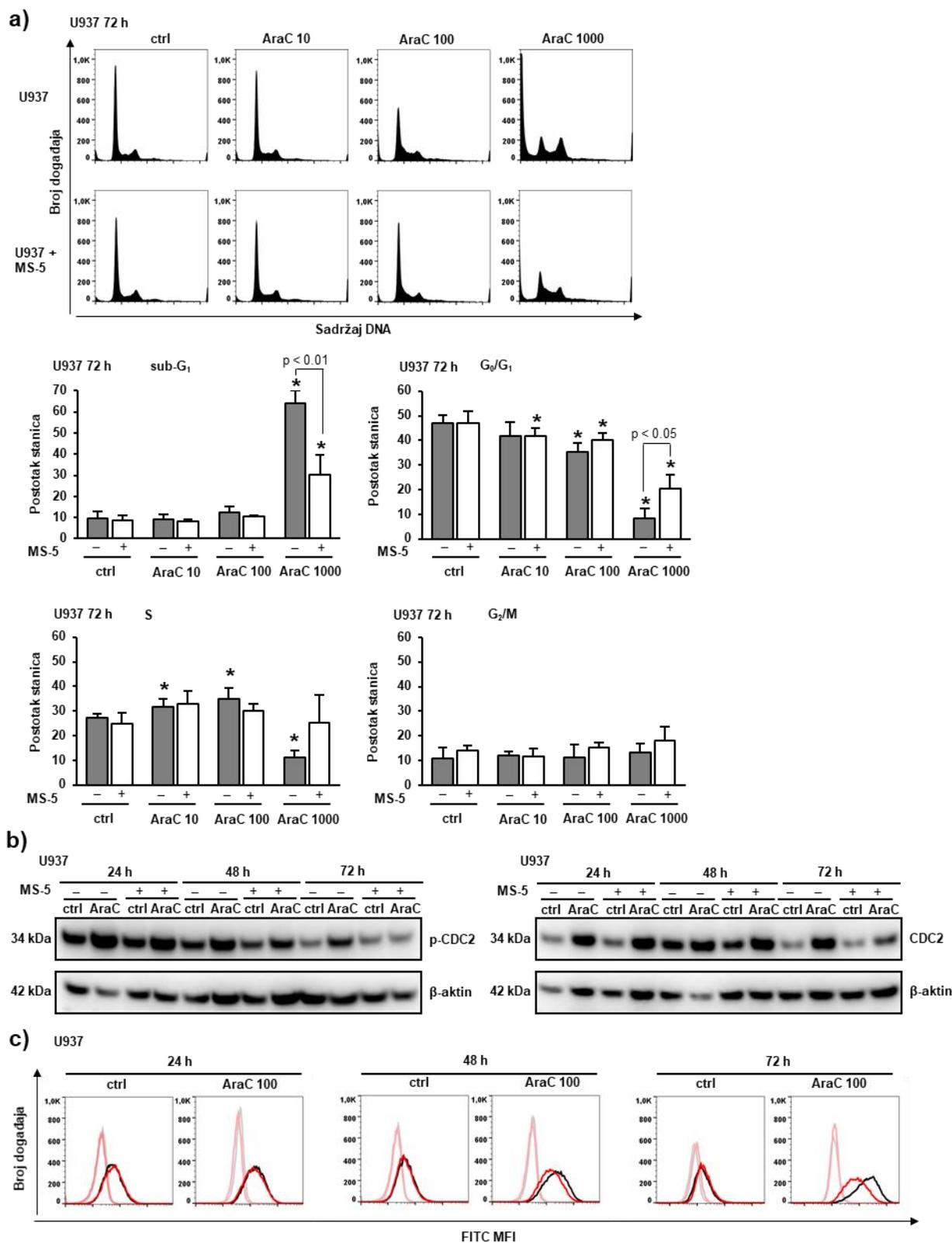


Slika 12. Stromalna stanična linija MS-5 smanjuje morfološke promjene stanica U937 potaknute niskom dozom citarabina. Stanice U937 su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak

AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μ M) ili citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. (a) Morfološka analiza stanica U937 obojenih May-Grünwald-Giemsa bojom nakon citospina (uvećanje x100). (b) Raspršenje laserske svjetlosti prema naprijed (prema engl. *forward scatter*, FSC) i u stranu (prema engl. *side scatter*, SSC) analizirano je protočnom citometrijom. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

Morfološka analiza stanica U937 (Slika 12.a) pokazala je da prisutnost stromalnih stanica sprječava promjenu oblika i omjera veličine jezgre i citoplazme stanica U937 koje su tretirane dvjema različitim koncentracijama AraC-a (100 i 1000 nM). Dodatno smo provjerili inhibicijski učinak strome na povećanje veličine stanica i vakuolizaciju analizom parametara FSC i SSC protočnom citometrijom (Slika 12.b).

Potom smo ispitali učinke strome na prolazak stanica kroz pojedine faze staničnog ciklusa. Kao što je prikazano na Slici 13.a, postotak sub-G₁ dobro je korelirao s postotkom stanica pozitivnih na aneksin, što dodatno potvrđuje da prisustvo strome štiti stanice U937 od apoptoze potaknute visokom dozom citarabina. Niska doza AraC-a (100 nM) smanjila je udio stanica U937 u G₁-fazi i uzrokovala nakupljanje stanica u S-fazi (Slika 13.a), a ti su učinci bili povezani s povećanjem inhibicijske fosforilacije CDC2 (Cdk1) (Slika 13.b). Dobiveni rezultati pokazuju da učinci niske doze citarabina na diferencijaciju koreliraju sa zaustavljanjem staničnog ciklusa i inhibicijom CDC2 te da prisutnost stromalnih stanica smanjuje učinke 72 sata nakon dodavanja citarabina (Slika 13.b i c).



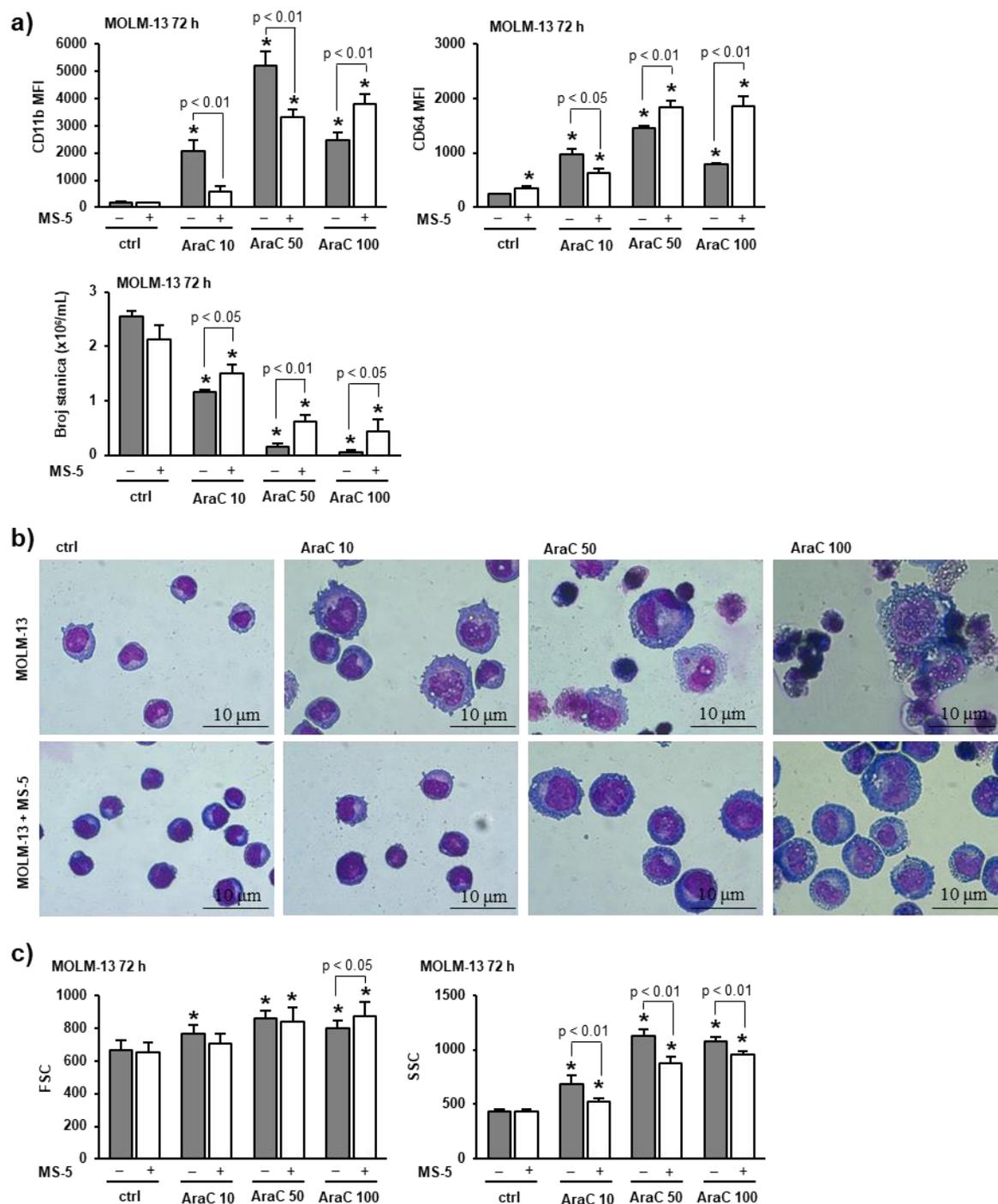
Slika 13. Stromalna stanična linija MS-5 smanjuje nakupljanje stanica U937 u S-fazi staničnog ciklusa i smanjuje inhibitornu fosforilaciju CDC2. Stanice U937 su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. **(a)** Primjerna histogrami staničnog ciklusa stanica U937 obojenih propidijevim jodidom (PI). Udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa je

određen pomoću računalnog programa FlowJo v.10. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost). (b) Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Tyr15-fosforiliranog CDC2 (p-CDC2) i ukupnog CDC2. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa. (c) Primjerni histogrami u kojima crna linija predstavlja izražaj CD11b na stanicama U937, crvena linija izražaj CD11b na stanicama U937 uzgajanim zajedno sa stanicama MS-5, a siva i ružičasta linija prikazuju njihove izotipske kontrole.

5.6. Učinci stromalnih stanica ne ovise o mutacijskom statusu *p53* i *FLT3* leukemijskih staničnih linija

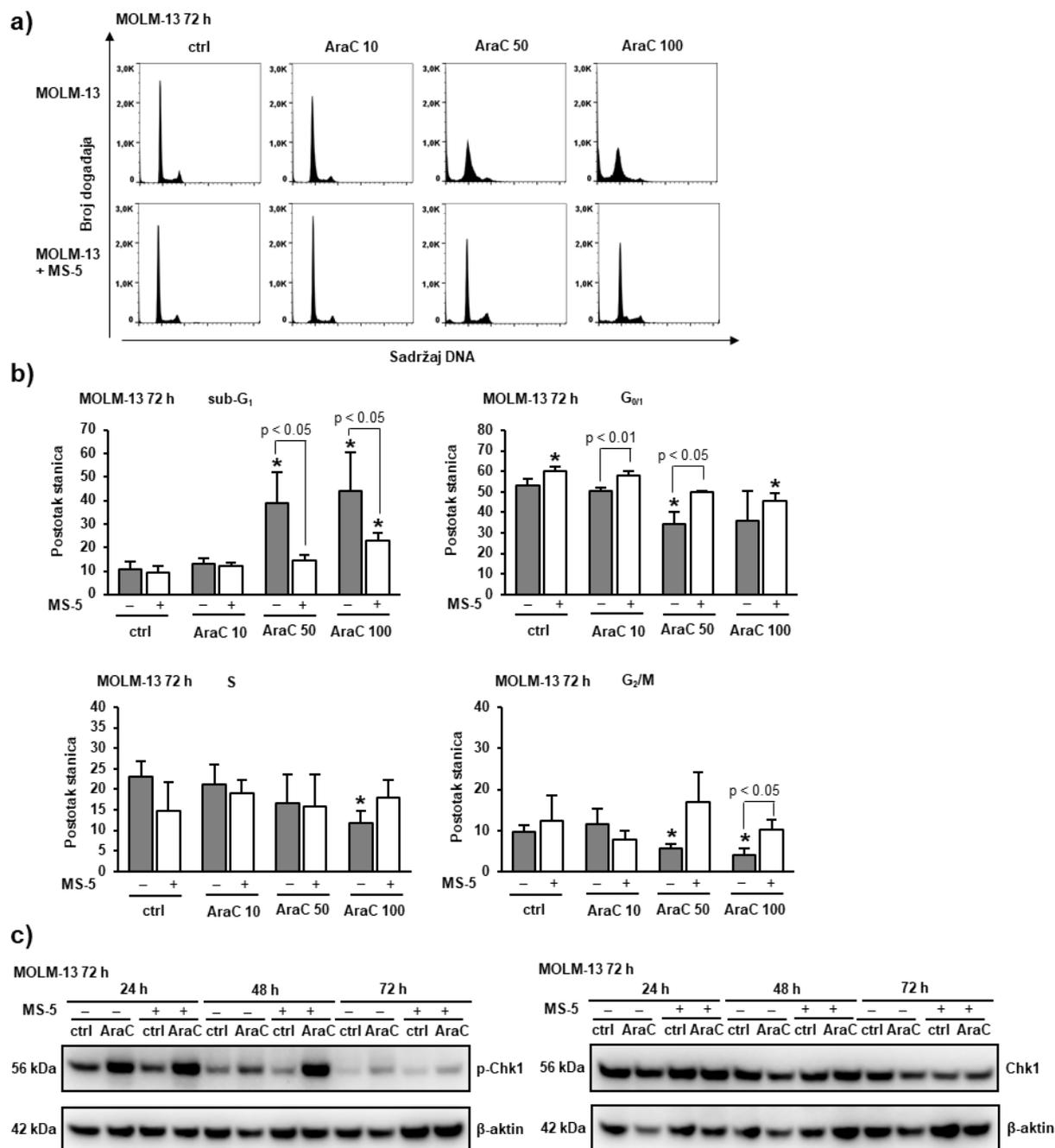
Učinci strome na diferencijaciju mogli bi ovisiti i o genskom statusu leukemijskih stanica. Tako je opisano da stroma pospješuje diferencijaciju stanica AML-a koje imaju mutaciju *FLT3*-ITD u odgovoru na gilteritinib (19). Iako učinci strome na diferencijaciju potaknutu citarabinom nisu dosada istraženi, opisano je da citarabinom potaknuta diferencijacija stanica mišje koštane srži transficiranih onkogenom *MLL-ENL-ER* ovisi o funkcionalnom tumor supresorskom proteinu *p53* (68). Budući da stanična linija U937 ima mutirani gen *p53* i divlji tip gena *FLT3* (69), dodatno smo testirali učinke strome na staničnoj liniji MOLM-13 koja ima divlji tip gena *p53* i mutaciju *FLT3*-ITD (4).

Kao što je prikazano na Slikama 14 i 15, stanice MOLM-13 bile su mnogo osjetljivije na učinke AraC-a nego stanice U937. Broj živih stanica značajno je smanjen čak i nakon inkubacije s AraC-om u koncentraciji 10 nM (Slika 14.a), a povećanje sub- G_1 populacije uočeno je u uzorcima koji su tretirani s AraC-om u koncentraciji 50 i 100 nM (Slika 15.a i b).



Slika 14. Stromalna stanična linija MS-5 smanjuje diferencijaciju stanica MOLM-13 potaknutu niskom dozom citarabina. Stanice MOLM-13 su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 50, 100 nM) tijekom 72 sata. **(a)** Izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određeni su pomoću protočne citometrije, a broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila. **(b)** Morfološka analiza stanica MOLM-13 obojenih May-Grünwald-Giemsa bojom nakon citospina (uvećanje x100). **(c)** Raspršenje laserske svjetlosti prema naprijed (prema engl. *forward scatter*, FSC) i u stranu (prema engl. *side scatter*, SSC) analizirano je protočnom citometrijom. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

Analiza staničnog ciklusa otkrila je da AraC uzrokuje zastoj znatno ranije u S-fazi, što vjerojatno uzrokuje funkcionalni protein p53 (Slika 15.a). Međutim, prisutnost stromalnih stanica imala je učinke na stanice MOLM-13 slične učincima na stanice U937 jer je kočila izražaj CD11b u stanicama koje su tretirane manjim koncentracijama AraC-a, a sprječavala citotoksičnost viših doza (Slika 14.a). Kao što je prikazano na Slici 14.b i c, prisustvo stromalnih stanica smanjilo je morfološke promjene stanične linije MOLM-13 te zakočilo povećanje SSC-a u analizi protočnom citometrijom. Dodatno, prisustvo strome smanjilo je aktivaciju signalnog puta oštećenja DNA jer je smanjilo Ser345-fosforilaciju Chk1 nakon 72 sata inkubacije (Slika 15.c). Ovi rezultati pokazuju da se inhibicijski učinci strome na diferencijaciju potaknutu citarabinom mogu zamijetiti i u drugoj staničnoj liniji te da ne ovise o p53 ili funkcionalnom FLT3.



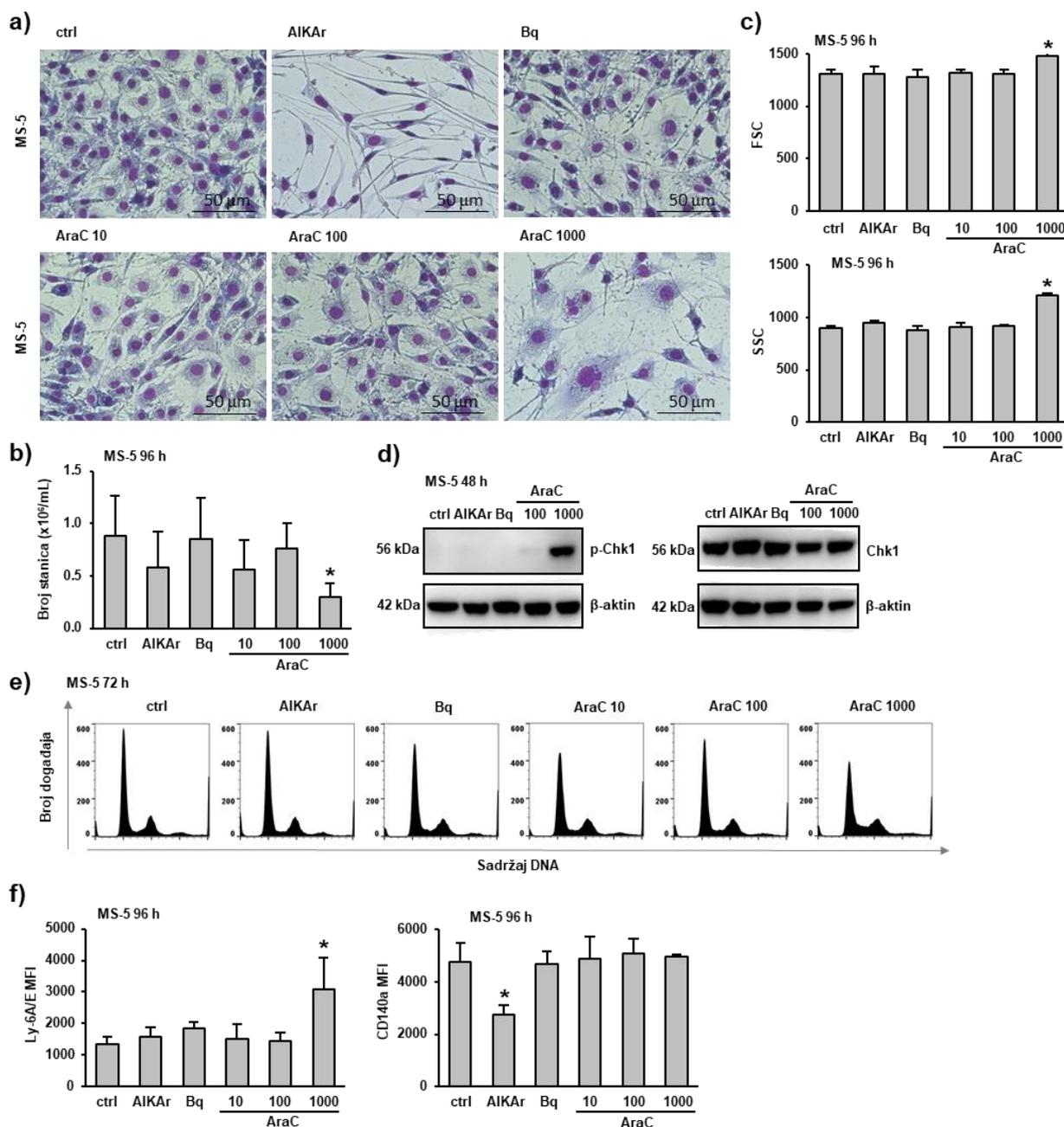
Slika 15. Stromalna stanična linija MS-5 smanjuje nakupljanje stanica MOLM-13 u sub-G₁-fazi staničnog ciklusa i utječe na fosforilaciju Chk1. Stanice MOLM-13 su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 50, 100 nM) tijekom 72 sata. **(a)** Primjerna histograma stanica MOLM-13 obojenih propidijevim jodidom (PI) i analiziranih protočnom citometrijom. **(b)** Udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa određen pomoću računalnog programa FlowJo v.10. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost). **(c)** Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Ser345-fosforiliranog Chk1 (p-Chk1) i ukupnog Chk1. Prikazani su primjerna rezultati tri nezavisna pokusa.

5.7. Visoka doza citarabina utječe na broj i fenotip stromalnih stanica

S obzirom na to da je AraC u većim koncentracijama pokazao citotoksične učinke na stanice AML-a te da je opisano da uzrokuje genotoksičnost u primarnim mezenhimalnim stanicama (70), zanimao nas je učinak AraC-a na stanice MS-5. Zbog toga smo stanice MS-5 inkubirali tijekom 72 sata s AraC-om u koncentracijama koje smo koristili i u ostalim pokusima, ali bez prisutnosti leukemijskih stanica. Morfološka analiza prikazala je izrazito smanjenje broja i povećanje veličine stanica MS-5 inkubiranih s 1000 nM AraC-om (Slika 16.a), a ti su rezultati potvrđeni brojanjem živih stanica (Slika 16.b). Rezultati analize protočnom citometrijom pokazali su da AraC (1000 nM) uzrokuje statistički značajno povećanje FSC-a i SSC-a (Slika 16.c). Međutim, nismo zamijetili statistički značajne promjene broja, FSC i SSC stanica MS-5 koje su tretirane niskim dozama AraC-a. Analiza Ser345-fosforiliranog oblika Chk1 pokazuje izrazitu aktivaciju signalnog puta ATR/Chk1 u stanicama MS-5 koje su inkubirane u velikoj koncentraciji citarabina (Slika 16.d), a analiza staničnog ciklusa povećanje udjela stanica u S-fazi (Slika 16.e).

Kako bismo odredili moguće fenotipske promjene stanica MS-5 koje su izložene različitim koncentracijama AraC-a, izražaj stromalnih i hematopoetskih biljega odredili smo nakon 72 sata inkubacije. Analiza je pokazala da su stanice pozitivne na konvencionalne biljege mezenhimskih stromalnih stanica Ly-6A (Sca-1), CD140a (Slika 16.f), CD44 i CD105, a negativne na CD73, CD34, CD45 i CD11b (rezultati nisu prikazani). Kao što je prikazano na Slici 16.f, visoka koncentracija AraC-a (1000 nM) povećala je izražaj biljega Ly-6A (Sca-1), a niska koncentracija nije imala značajan učinak na izražaj biljega. Stoga smo zaključili da citotoksične doze AraC-a utječu i na stromalne i leukemijske stanice, ali da se učinci stromalnih stanica na diferencijaciju stanica AML-a potaknutu niskim dozama AraC-a ne mogu pripisati citotoksičnim učincima istih koncentracija AraC-a na stromalne stanice.

Osim visoke koncentracije citarabina, i AIKAr je utjecao na stanice MS-5. Morfološka analiza stanica MS-5 inkubiranih s AIKAr-om prikazuje promjenu oblika stanica koje su izdužene poput fibrocita (Slika 16.a). AIKAr je utjecao i na imunofenotip stanica MS-5, prikazano kao značajno smanjenje izražaja biljega CD140a (Slika 16.f).



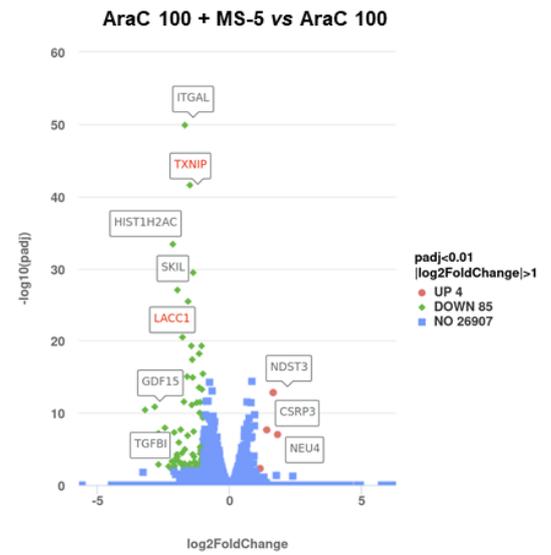
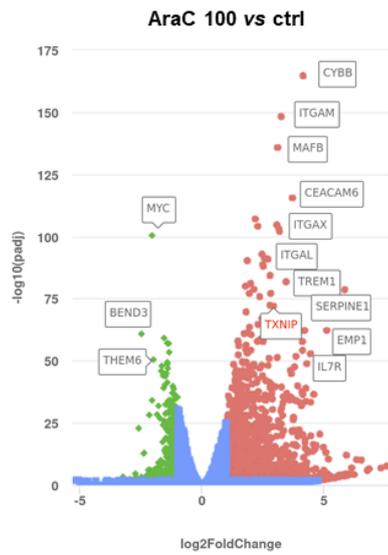
Slika 16. Niska doza citarabina ne utječe na preživljenje i fenotip stromalnih stanica MS-5. Stromalne stanice MS-5 su zasađene 24 sata prije dodavanja AIKAr-a (0,2 mM), brekvinara (Bq) (0,5 μM) ili citarabina (AraC) (10, 50, 100 nM) te analizirane nakon 72 sata. **(a)** Morfološka analiza stromalnih stanica MS-5 obojenih May-Grünwald-Giemsa bojom (uvećanje $\times 40$). **(b)** Raspršenje laserske svjetlosti prema naprijed (prema engl. *forward scatter*, FSC) i u stranu (prema engl. *side scatter*, SSC) analizirano je protočnom citometrijom. **(c)** Broj živih stanica određen pomoću hemocitometra i tripanskog modrila. **(d)** Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Ser345-fosforiliranog Chk1 (p-Chk1) i ukupnog Chk1. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa. **(e)** Primjerni histogrami stanica MS-5 obojenih propidijevim jodidom (PI) i analiziranih protočnom citometrijom. **(f)** Imunofenotip stanica MS-5. Izražaj Ly-6A/E i CD140a analiziran protočnom citometrijom. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

5.8. Stromalne stanice smanjuju aktivaciju citokinskih signalnih puteva potaknutih niskom dozom citarabina

Kako bismo dodatno istražili mehanizam koji je odgovoran za učinak strome na diferencijaciju potaknutu niskim dozama AraC-a prikupili smo uzorke kontrolnih stanica U937 (ctrl) i stanica tretiranih niskom dozom AraC-a (100 nM) koje su inkubirane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 tijekom 24 sata. Rezultati transkriptomске analize potvrdili su rezultate fenotipskih analiza jer su pokazali da su najznačajnije promjene u ekspresiji gena uglavnom povezane s izražajem biljega diferencijacije kao što su: *ITGAM* – kodiranje za CD11b, *CYBB* – kodiranje za p91-phox podjedinicu NADPH oksidaze, *ITGAL* – kodiranje za CD11a, *ITGAX* – kodiranje za CD11c i *MafB* – kodiranje za transkripcijski faktor koji igra važnu ulogu u regulaciji hematopoeze specifične za lozu (Slika 17.a). Kao jedan od različitih različito izraženih gena istaknuo se i *TXNIP* (prema engl. *thioredoxin interacting protein*), koji kodira za protein koji djeluje na tioredoksin. Iako se ne radi o klasičnom biljegu diferencijacije, prethodna studija je pokazala povezanost *TXNIP*-a s indukcijom diferencijacije leukemijskih stanica (71).

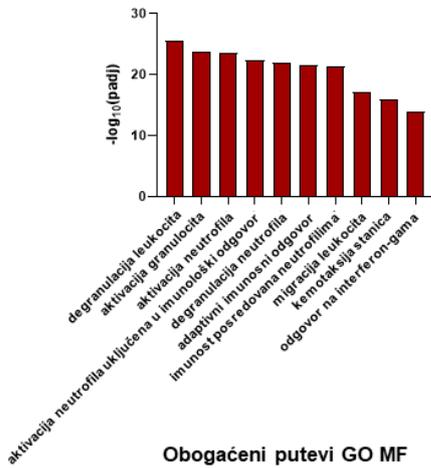
Da bismo odredili biološke procese koji su uključeni u učinke strome na diferencijaciju potaknutu citarabinom, napravili smo analizu obogaćenja ontoloških putova gena. Kao što je prikazano na Slici 17.b i c, signalni putevi citokina i leukocitne aktivacije su najviše povećani u odgovoru na AraC u koncentraciji od 100 nM. Ovi učinci su smanjeni u prisutnosti stromalnih stanica MS-5 što ukazuje na moguću povezanost kočenja diferencijacije i citokinske signalizacije.

a)

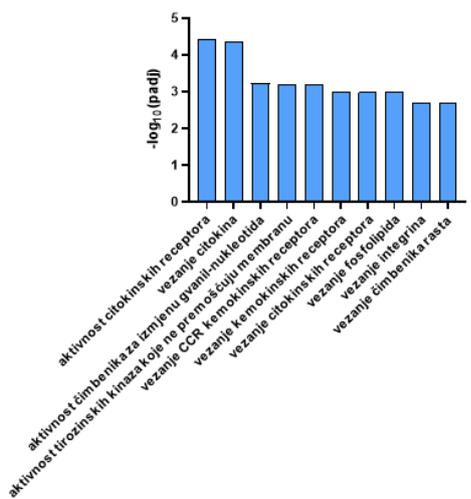


b)

Obogaćeni putevi GO BP
Naviše regulirani procesi
AraC 100 vs ctrl

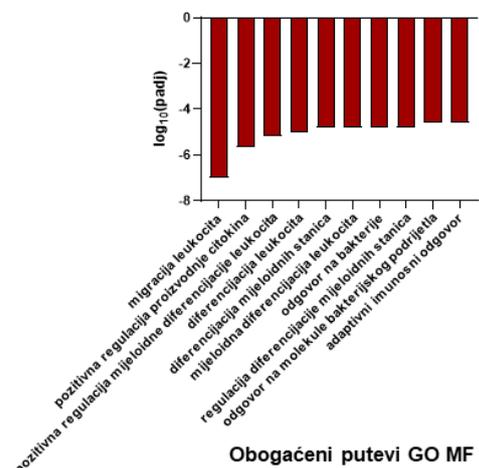


Obogaćeni putevi GO MF
Naviše regulirani procesi
AraC 100 vs ctrl

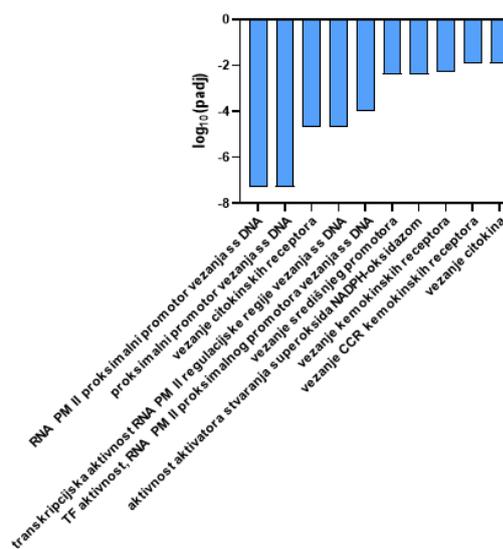


c)

Obogaćeni putevi GO BP
Naniže regulirani procesi
AraC 100 + MS-5 vs AraC 100



Obogaćeni putevi GO MF
Naniže regulirani procesi
AraC 100 + MS-5 vs AraC 100

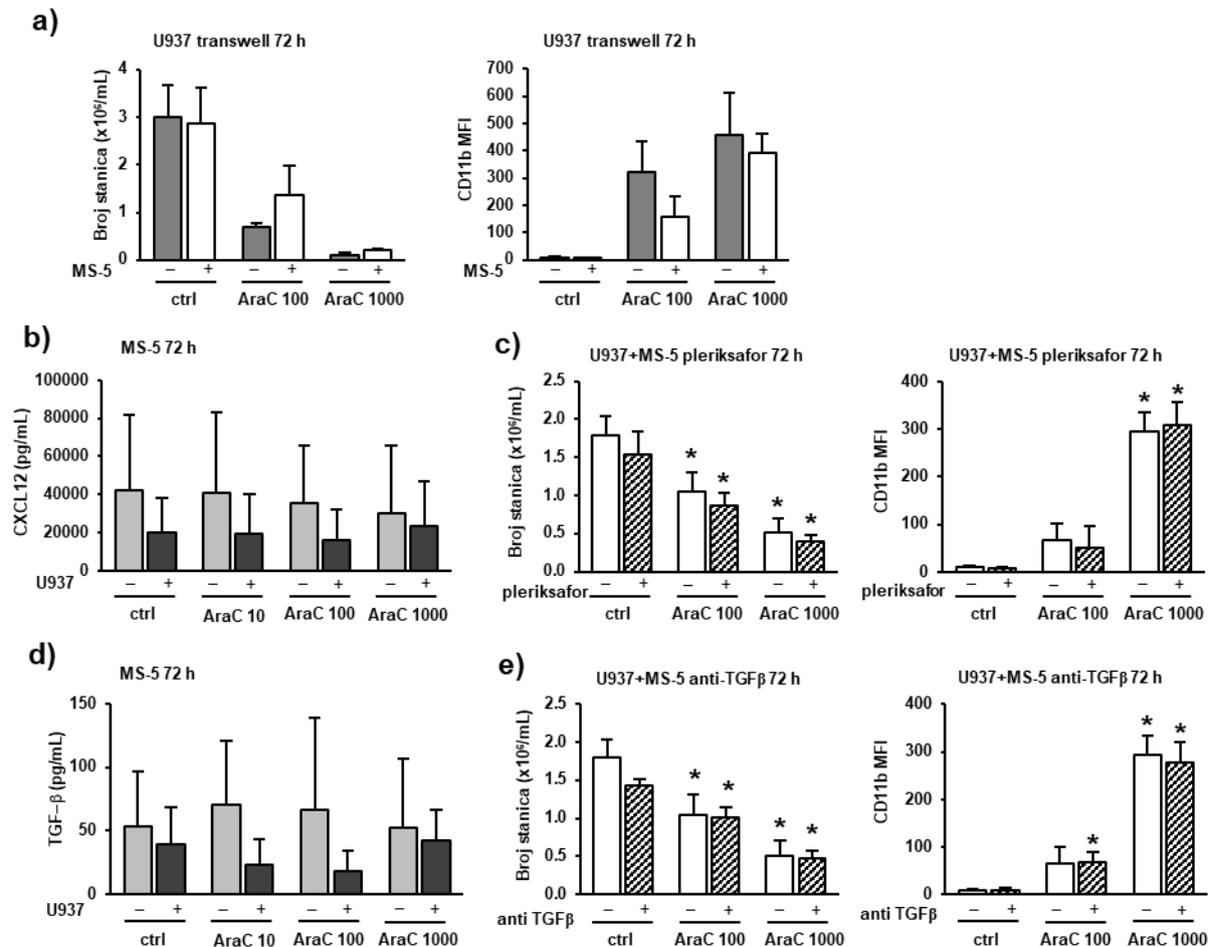


Slika 17. Niska doza citarabina potiče izražaj gena povezanih s diferencijacijom i aktivacijom citokinskih i kemokinskih signalnih puteva, a kokultura sa stromalnim stanicama smanjuje učinak. Stanice U937 su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak 100 nM citarabina (AraC) tijekom 24 sata (a) Točkasti prikaz izražaja gena u stanicama U937 analiziran sekvenciranjem RNA kako je opisano u „Materijali i metode“. (b) Obogaćeni putevi ontologije gena (GO) povezani s biološkim procesima (BP) i molekularnim funkcijama (MF) u stanicama U937. Predstavljene vrijednosti su $|\log(\text{padj})|$ u analizi obogaćivanja. Navise regulirani procesi prikazani su kao pozitivne vrijednosti, dok su naniže regulirani procesi prikazani kao negativne vrijednosti.

5.9. Inhibicija kontakta između stanica i inhibicija signaliziranja putem CXCL12 i TGF- β ne poništavaju učinke stromalnih stanica MS-5 na diferencijaciju stanica U937

Kako bismo istražili ovise li inhibicijski učinci stromalnih stanica MS-5 na diferencijaciju stanica U937 o izravnom kontaktu između stanica, stanice U937 zasadili smo u poliesterske umetke s porama veličine 0,4 μm , same ili u kokulturi sa stanicama MS-5. Kao što je prikazano na Slici 18.a, u prisutnosti poliesterskih umetaka, nisu primijećeni zaštitni učinci strome na broj živih stanica nakon tretmana s citotoksičnom dozom AraC-a (1000 nM). Međutim, uporaba umetaka nije spriječila učinke stanica MS-5 na diferencijaciju stanica U937 tretiranih s AraC-om (100 nM), što upućuje da inhibicijski učinci stromalnih stanica na diferencijaciju stanica U937 potaknutu niskom dozom AraC-a ne ovise o izravnom kontaktu između stanica.

Budući da rezultati analize upućuju na moguću ulogu topljivih čimbenika, izmjerili smo koncentracije sedam glavnih mišjih mijeloidnih citokina u nadtalozima stanica MS-5 koje su inkubirane same ili u kokulturi sa stanicama U937 tijekom 24 sata. Kao što je prikazano na Slici 18.b, izmjerena je najveća koncentracija CXCL12 ili SDF-1 (prema engl. *stromal cell-derived factor 1*). CXCL12 se veže za svoj receptor, C-X-C kemokinski receptor tipa 4 (CXCR4), kojeg stanice U937 izražavaju u visokoj razini (47,48). Dokazano je da su CXCR4 i CXCL12 očuvani između vrsta te da mišje stromalne stanice mogu učinkovito pobuditi signal ljudskim leukemijskim stanicama pomoću CXCL12 i CXCR4 (72). Stoga smo ispitali ulogu citokina CXCL12 tako da smo zakočili CXCR4 pomoću antagonista pleriksafora (AMD3100) u dozi za koju je prethodno pokazano da potiče izražaj biljega CD15 na stanicama U937 nakon devet dana inkubacije (47). Kao što je prikazano na Slici 18.c, dodavanje pleriksafora nije imalo značajnih učinaka na broj živih stanica U937 ili izražaj CD11b u stanicama koje su tretirane s dvije koncentracije citarabina (100 i 1000 nM) u kokulturi sa stanicama MS-5.



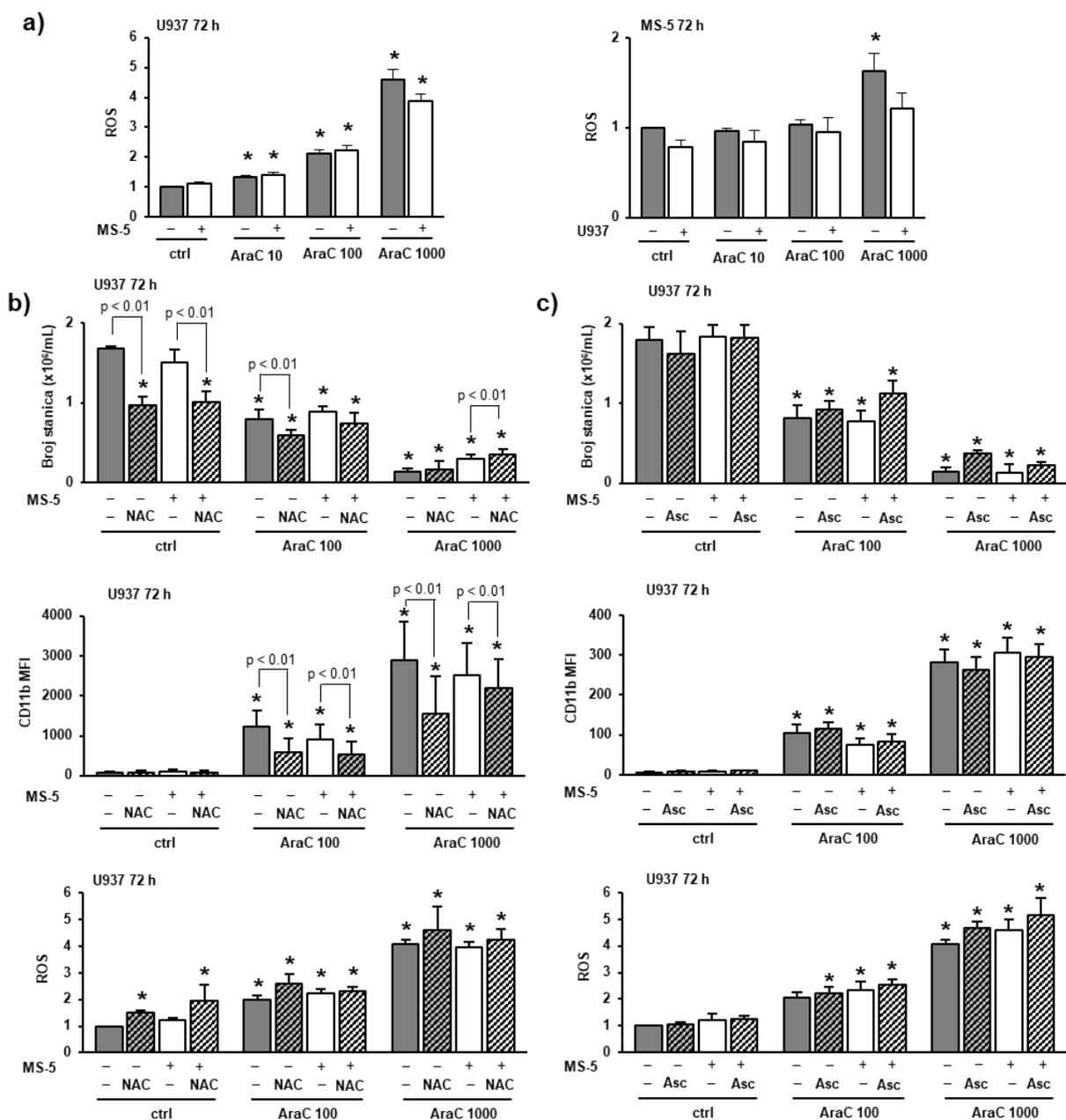
Slika 18. Inhibicija kontakta između stanica i inhibicija signaliziranja putem CXCL12 i TGF- β ne poništavaju učinke stromalnih stanica MS-5 na diferencijaciju stanica U937. Stanice U937 su uzgajane u umetcima s porama veličine 0,4 μ m same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (100, 1000 nM) tijekom 72 sata. (a) Broj živih stanica U937 određen je pomoću hemocitometra i tripsanskog modrila, a izražaj diferencijacijskog biljega CD11b određen je pomoću protočne citometrije. (b) Koncentracija CXCL12 u nadtalozima stanica MS-5 uzgajanih samih ili u kokulturi sa stanicama U937 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 24 sata analiziran LEGENDplex kitom i protočnom citometrijom. (c) Učinak pleriksafora (20 μ M) na broj živih stanica U937 i izražaj CD11b u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (100, 1000 nM) tijekom 72 sata. (d) Koncentracija TGF- β u nadtalozima stanica MS-5 uzgajanih samih ili u kokulturi sa stanicama U937 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 24 sata analiziran LEGENDplex kitom i protočnom citometrijom. (e) Učinak anti-TGF- β protutijela (0,5 μ g/mL) na broj živih stanica U937 i izražaj CD11b u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (100, 1000 nM) tijekom 72 sata. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

U nadtalozima stanica MS-5 dokazana je i nazočnost citokina TGF- β (Slika 18.d). Budući da su rezultati transkriptomске analize (Slika 17.a) pokazali da prisustvo strome značajno

smanjuje izražaj gena *TGF-β1*, dodatno smo ispitali ulogu TGF-β1 pomoću protutijela za mišji TGF-β1 koja su dodana kokulturi stanica U937 i MS-5. Međutim, kao što je prikazano na Slici 18.e, dodavanje blokirajućih protutijela nije imalo značajnih učinaka na broj živih stanica U937 i razinu CD11b u stanicama koje su potaknute AraC-om (100 nM).

5.10. Prisutnost stromalnih stanica MS-5 ne smanjuje razinu slobodnih radikala kisika u stanicama U937 tretiranim niskim dozama citarabina

Dosadašnjim istraživanjem mehanizama odgovornih za inhibicijski učinak stromalnih stanica na diferencijaciju stanica AML-a isključili smo kao moguće mehanizme izravni kontakt stanica te signalizaciju putem TGF-β1 i CXCL12/CXCR4. Osim gena odgovornih za citokinsku signalizaciju, transkriptomaska analiza pokazala je da AraC (100 nM) povećava izražaj gena *TXNIP* te da se *TXNIP* značajno smanjuje u prisustvu stromalnih stanica (Slika 17.a). *TXNIP* se smatra glavnim regulatorom stanične oksidacije budući da regulira ekspresiju i funkciju tioredoksina (Trx), ali ima i daleko širi raspon dodatnih uloga: od regulacije metabolizma glukoze i lipida, do zaustavljanja staničnog ciklusa i upale (73). Budući da je prethodno istraživanje povežalo povećanu ekspresiju *TXNIP*-a kao pokretača diferencijacije s povećanjem razine slobodnih radikala kisika (71), izmjerili smo razinu ROS-a u stanicama U937 i stanicama MS-5 koje su inkubirane same ili u kokulturi. Kao što je prikazano na Slici 19.a, razina ROS-a povećava se u stanicama U937 koje su tretirane citarabinom ovisno o dozi. U stanicama MS-5 značajno povećanje razine ROS-a izmjereno je samo u prisutnosti najveće koncentracije AraC-a. Razina ROS-a je bila smanjena u stanicama U937, ali i u stanicama MS-5 kada su se uzgajale u kokulturi. Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u razini ROS-a koja je izmjerena u stanicama U937 koje su tretirane s AraC-om (100 nM) same u usporedbi sa stanicama koje su uzgajane u prisutnosti stromalnih stanica što upućuje na zaključak da učinak stromalnih stanica nije posredovan smanjenjem ROS-a.



Slika 19. Inhibitorni učinci stromalnih stanica MS-5 na diferencijaciju leukemijskih stanica ne ovise o slobodnim radikalima kisika (prema engl. *reactive oxygen species*, ROS). (a) ROS u stanicama U937 i MS-5 koje su uzgajane same ili u kokulturi bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. (b) Broj živih stanica U937, izražaj diferencijacijskog biljega CD11b i ROS u stanicama U937 koje su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. N-acetil-L-cistein (NAC) (10 mM) je dodan 15 minuta prije citarabina. (c) Broj živih stanica U937, izražaj diferencijacijskog biljega CD11b i ROS u stanicama U937 koje su uzgajane same ili u kokulturi sa stanicama MS-5 bez (ctrl) ili uz dodatak citarabina (AraC) (10, 100, 1000 nM) tijekom 72 sata. Askorbinska kiselina (Asc) (500 μ M) je dodana 15 minuta prije citarabina i nakon 48 sati. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SD iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test). Crtom je dodatno prikazana usporedba između odabranih skupina (uz p-vrijednost).

Uloga ROS-a u diferencijaciji ispitana je dodatkom N-acetil cisteina (NAC) u koncentraciji 10 nM jer je prethodno istraživanje pokazalo da 10 nM NAC u stanicama U937 smanjuje stvaranje ROS-a izazvano kratkotrajnim tretmanom oksidansom H₂O₂ (74). Kao što je prikazano na Slici 19.b, NAC je povećao broj živih stanica tretiranih s 1000 nM AraC-om u kokulturi što ukazuje na zaštitni učinak čistača ROS-a na citotoksične učinke visokih doza AraC-a. Istodobno, NAC je smanjio broj živih kontrolnih stanica U937 i stanica U937 tretiranih niskom dozom AraC-a. Ispitivanje učinaka NAC-a na diferencijaciju pokazalo je da prethodno dodavanje NAC-a koči izražaj CD11b u U937 stanicama koje su tretirane AraC-om same ili u kokulturi. Međutim, budući da učinci na broj stanica i diferencijaciju ukazuju na moguće nespecifične učinke NAC-a kao inhibitora ROS-a, ispitali smo učinke NAC-a na količinu ROS-a u stanicama U937. Kao što je prikazano na Slici 19.b, dodavanje NAC-a nije imalo inhibicijski učinak na razinu ROS-a ni u jednoj od testiranih skupina mjereno unosom DHR123. Dodatno smo testirali potiče li citarabin oksidativni stres stvarajući superoksidge koristeći askorbinsku kiselinu (vitamin C) koja učinkovitije inhibira superoksidge (75). Askorbinska kiselina u koncentraciji od 500 μM, za koju je prethodno pokazano da ima učinak na stanične linije AML-a (76), nije smanjila ni proizvodnju ROS-a, ni izražaj biljega CD11b, kao što je prikazano na Slici 19.c.

Stoga smo zaključili da se inhibicijski učinci strome na izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na niske doze AraC-a ne mogu pripisati smanjenju razine ROS-a.

6. RASPRAVA

6.1. Citarabin u niskoj dozi aktivira Chk1 i uzrokuje diferencijaciju leukemijskih stanica

Citarabin je citotoksični lijek koji se fosforilira u stanici i potom umeće u DNA. Na više modela za istraživanje AML-a je pokazano da umetanje citarabina u DNA uzrokuje oštećenje DNA i aktivaciju signalnog puta za preživljenje stanica ATR/Chk1, ali utjecaj na diferencijaciju nije istražen (39). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da diferencijacija leukemijskih stanica stimulirana malim dozama AraC-a ovisi o aktivaciji Chk1 i stoga dijeli isti put kao i inhibitori sinteze pirimidina *de novo*. Zamijećeno povećanje fosforilacije Chk1 ovisno o dozi potaknuto citarabinom u našem istraživanju slično je prethodno opisanim povećanjima u stanicama HL-60 i ML-1 (39), kao i u stanicama U937 i blastima koštane srži tijekom liječenja oboljelih (33).

Signalni put ATR/Chk1 smatra se ključnim za preživljenje stanica zbog regulacije popravka DNA i sprječavanja ulaska u mitozu i apoptozu (39). Zbog toga se citarabinom potaknuta aktivacija Chk1 smatrala nužnom isključivo za sprječavanje apoptoze pa se inhibitori Chk1 primjenjuju kako bi se pojačao citotoksični učinak citarabina i prevladala rezistencija. Farmakološki inhibitori Chk1 poput SCH 900776 (33), GDC-0575 (40) i MK8776 (77) smanjuju preživljenje stanica tretiranih citarabinom *in vitro* i *in vivo*. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima naše studije koja pokazuje da su farmakološki inhibitori signalnog puta ATR/Chk1 i smanjena ekspresija Chk1 pomoću transfekcije siRNA povećali udio stanica sa sadržajem subdiploidne DNA kada su primijenjene veće doze citarabina *in vitro*. Međutim, rezultati naše studije pokazali su da inaktivacija Chk1 smanjuje diferencijaciju posredovanu citarabinom, čime dodatno pokazuje važnost puta ATR/Chk1 za diferencijaciju leukemijskih stanica.

U ovom istraživanju smo koristili farmakološke inhibitore signalnog puta ATR/Chk1 Torin2 i VE-821. Iako su Torin2 i VE-821 zakočili učinke citarabina na diferencijaciju, rezultati ovog istraživanja pokazali su da su učinci inhibitora na prolazak kroz stanični ciklus kontrolnih stanica U937 i THP1 različiti te su potvrdili naše prethodno opažanje da se učinci Torin2 i VE-821 ne mogu pripisati isključivo inhibiciji Chk1 (28). Torin2, osim na kinazu ATR, inhibicijski djeluje na kinazu mTOR (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*), inhibira fosforilaciju kinaze S6K posredovanu kompleksom mTORC1 (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*) te inhibira ATM i DNA-PK (78). VE-821 selektivnije djeluje na signalni put ATR/Chk1 u usporedbi s Torin2. VE-821 ima

zanemarive inhibicijske učinke na mTOR, ATM i DNA-PK, ali prvenstveno inhibira ATR, a ne kinazu Chk1 (79).

Brojna su prethodna istraživanja koja su pokazala da aktivacija signalnog puta oštećenja DNA može dovesti i do drugih krajnjih točaka osim stanične smrti, a što uključuje zastoj u staničnom ciklusu, senescenciju i diferencijaciju. Diferencijacija izazvana aktivacijom oštećenja DNA opisana je u diferencijaciji stanica neuroblastoma izazvanoj retinoičnom kiselinom (80), diferencijaciji melanocitnih matičnih stanica uzrokovanoj ionizirajućim zračenjem (81), te diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica potaknutoj doksorubicinom (82). Aktivacija ATR/Chk1 je važna za sazrijevanje eritroidnih progenitora pa tako inhibicija Chk1 u stanicama K562 sprječava sazrijevanje u odgovoru na citarabin (83), a farmakološki inhibitor VE-821 smanjuje udio zrelih eritroblasta u odgovoru na p53-signalizaciju (84).

Nedavno istraživanje pokazalo je da aktivacija signalnog puta ATR/Chk1 u stanicama oboljelih od AML-a i liječenih citarabinom uzrokuje reverzibilnu senescenciju malignih stanica, ali izražaj biljega diferencijacije nije istražen (85). Istraživanje Schulera i sur. (86) naglašava ulogu Chk1 u normalnoj hematopoezi zbog važnosti kinaze Chk1 u uspostavljanju i održavanju fetalne i odrasle hematopoeze, te sugerira da strategija liječenja usmjerena na inhibiciju Chk1 kako bi se poboljšalo ubijanje citotoksičnim lijekovima može pojačati toksičnost terapije i uzrokovati tešku mijeloablaciju. S druge strane, opisana je pozitivna uloga aktivacije puta oštećenja DNA u poticanju diferencijacije leukemijskih stanica u odgovoru na smanjenje ATP-a, kao i u diferencijaciji leukemijskih stanica MLL-AF9 u kojima nedostaje *MLL* (87,88).

Naša prethodna istraživanja pokazala su ulogu signalnog puta ATR/Chk1 u diferencijaciji nekoliko staničnih linija AML-a u odgovoru na inhibitore sinteze pirimidina *de novo* (28), kao i primarnih blasta izoliranih iz pacijenata s AML-om (89). U ovom istraživanju su brekvinar, inhibitor DHODH-a, i AIKAr, inhibitor UMP-sintaze, imali učinke slične citarabinu u koncentraciji od 100 nM. Brekvinar i AIKAr su inducirali zastoj u S-fazi, aktivirali Chk1 i poticali diferencijaciju stanica, a navedeni učinci su bili smanjeni inhibicijom kinaze Chk1.

Inhibitori DHODH-a se trenutno smatraju obećavajućom opcijom za diferencijacijsku terapiju AML-a. Iako je klinička primjena brekvinara ograničena zbog ozbiljnih nuspojava, razvijeno je nekoliko novih inhibitora DHODH koji imaju sličan učinak na diferencijaciju stanica AML-a, što uključuje BAY 24023432 i ASLAN00322 (12). Poznato je da AIKAr djeluje antiproliferativno u hematološkim zloćudnim bolestima *in vitro*, a dva klinička

ispitivanja testirala su učinke viših doza AIKAr-a u bolesnika s B-staničnom kroničnom limfocitnom leukemijom (90) i pacijenata s refraktornim MDS/AML-om (91), ali učinci AIKAr-a na diferencijaciju stanica AML-a nisu ispitani *in vivo* (26).

Rezultati ove studije pokazuju da niske doze citarabina imaju sličan učinak kao inhibitori sinteze pirimidina. Bez obzira na to je li zastoj replikacije induciran nedostatkom nukleotida ili dodavanjem AraC-a, pojačava se signaliziranje putem ATR/Chk1 što zaustavlja rast i potiče diferencijaciju stanica AML-a.

Precizan mehanizam koji povezuje aktivaciju Chk1 i diferencijaciju leukemije nije jasan. Opisano je povećanje autofagije u stanicama AML-a tretiranih niskim dozama AraC-a (37), što je slično povećanju autofagije koje smo primijetili u stanicama tretiranim AIKAr-om i ATRA-om, ali naša je studija pokazala da inhibicija ključnih proteina klasičnog puta autofagije nije imala učinak na diferencijaciju stanica AML-a (27).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nakon aktivacije Chk1 slijedi inhibitorna fosforilacija CDK1. Poznato je da farmakološka i genetska inhibicija CDK1 (92) ili inhibicija uzvodne fosfataze CDC25A (93) potiče diferencijaciju putem C/EBP α u stanicama AML-a s aktiviranim FLT3. Međutim, učinci farmakološkog CDK1-inhibitora na diferencijaciju nisu primijećeni u stanicama U937 (92), a mi smo uočili diferencijaciju i u staničnim linijama AML-a kojima nedostaje *FLT3-ITD*. Stanice THP-1 korištene u našoj studiji imaju fuzijski gen *KMT2A-MLL2* nastao translokacijom t(9;11)(p21;q23) (94). Dokazano je da je CDK6 važan za diferencijaciju u stanicama AML-a s preuređenjem *KMT2A*. Međutim, gensko utišavanje *CDK6* u studiji Plackea i sur. (95) induciralo je blagi zastoj u G₀/G₁-fazi povezan s diferencijacijom, a naši rezultati pokazuju zaustavljanje stanica THP-1 u S i G₂/M-fazi. Moguće objašnjenje je to što stanične linije U937 i THP-1 nemaju funkcionalni p53 (96), a poznato je da p53 utječe na odgovor stanica AML-a na kemoterapiju (97,98). Prethodna istraživanja opisala su da gensko utišavanje drugih regulatora staničnog ciklusa, poput CDK2 (99) ili AURKA (100), potiče diferencijaciju. Dodatno, diferencijacija je opisana i nakon povećanja p21 (36,88), odnosno nakupljanja transkripcijskog čimbenika PU.1 (101).

Rezultati našeg istraživanja na staničnim linijama AML-a su u skladu s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da citarabin u dozama do 100 nM inducira diferencijaciju leukemijskih stanica *in vitro*, dok veće koncentracije uzrokuju izraženu citotoksičnost (36,37).

Ispitane koncentracije citarabina (10-100 nM) su usporedive s koncentracijama izmjerenim u plazmi bolesnika u 1. i 2. tjednu od započinjanja terapije s 20 mg/m²/dan AraC-a kontinuiranom intravenskom infuzijom (67). Buduća istraživanja su potrebna kako bi se identificirali bolesnici s AML-om koji nije APL koji bi mogli imati koristi od diferencijacijske terapije niskom dozom citarabina. Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost da je ista skupina bolesnika osjetljiva i na diferencijacijsku terapiju inhibitorima sinteze pirimidina *de novo*. Naša nedavna studija identificirala je AML blaste koji imaju inverziju kromosoma 16 i prisutnost fuzijskih transkripata *CBFB-MYH11* kao podskupinu AML-a koja je osjetljiva na ATRA-u *in vitro* (96). Međutim, zasad nemamo takve konvencionalne dijagnostičke markere za identifikaciju oboljelih od AML-a u kojih se leukemijski blasti diferenciraju u odgovoru na niske doze AraC-a.

6.2. Stromalne stanice koštane srži smanjuju učinke niske doze citarabina na diferencijaciju leukemijskih stanica

Poznato je da AraC uzrokuje diferencijaciju stanica AML-a *in vitro*, ali diferencijacija se rijetko opaža *in vivo*. Indukcija remisije pomoću niske doze AraC-a u starijih bolesnika je često praćena hipoplastičnom ili aplastičnom fazom, što implicira citotoksični mehanizam djelovanja. Međutim, odsutnost aplazije i postupna pojava zrelijih mijeloidnih stanica koje nose izvorne kariotipske abnormalnosti su argumenti u korist diferencirajućeg učinka citarabina (102,103). Uz istraživanje mehanizma diferencijacije stanica AML-a potaknute niskom dozom citarabina, u ovom istraživanju smo proučavali i moguću ulogu stromalnih stanica na opaženu razliku između primjene citarabina *in vivo* i *in vitro*.

Prethodne studije su utvrdile da stanice MS-5 smanjuju citotoksični učinak visokih doza AraC-a (500–3000 nM) na leukemijske stanične linije, kao što su stanice U937 (40,59,104). Međutim, utjecaj stromalnih stanica na diferencijaciju potaknutu niskim dozama AraC-a još nije istražen. U ovom istraživanju koristili smo *in vitro* model koji oponaša mikrookoliš koštane srži uz direktni kontakt leukemijskih i stromalnih stanica MS-5, za koji se ranije pokazalo da najviše podupire stanice AML-a (62). Ova studija je prva koja pokazuje da je diferencijacija staničnih linija AML-a izazvana niskom dozom AraC-a inhibirana prisustvom stromalnih stanica koštane srži. U usporedbi s učincima uočenim u suspenzijskoj kulturi leukemijskih

stanica, model kokulture stromalnih stanica s leukemijskim stanicama u kojima je uočena smanjena diferencijacija trebao bi bolje odgovarati kliničkom odgovoru u pacijenata.

Rezultati dobiveni u modelu kokulture stanica u skladu su s prethodno opisanim mehanizmom diferencijacije potaknute AraC-om jer stromalne stanice učinkovito smanjuju zastoj u S-fazi izazvan AraC-om, inhibiciju CDC2 i aktivaciju CHK1 paralelno sa smanjenjem izražaja biljega diferencijacije CD11b. Budući da su inhibicijski učinci stromalnih stanica primijećeni u staničnim linijama U937 (mutirani gen *p53* i divlji tip gena *FLT3*) i MOLM-13 (divlji tip gena *p53* i mutaciju *FLT3-ITD*), rezultati ukazuju na to da je učinak stromalnih stanica neovisan o statusu mutacije gena *p53* i *FLT3*. Dok precizni čimbenici koji određuju osjetljivost na diferencijaciju izazvanu citarabinom ostaju nepoznati, naši rezultati pokazuju da stromalne stanice smanjuju diferencijaciju bez obzira na podtipove AML-a i genske abnormalnosti. Točan mehanizam odgovoran za inhibiciju diferencijacije stromalnim stanicama u odgovoru na male doze citarabina ostaje nejasan.

Različiti mehanizmi se smatraju odgovornima za zaštitni učinak strome na citotoksičnost posredovanu AraC-om, a većina istraživanja usmjerena je na ulogu adhezijskih molekula i citokina (41). Antiapoptotički učinci stanica MS-5 na stanične linije NB4 i HL-60 izložene AraC-u (1000 nM) oponašaju se kondicioniranim medijem u kojem su uzgajane stanice MS-5, ali specifični topljivi čimbenici nisu identificirani, a i pokusi s umetcima za fizičko razdvajanje stanica nisu u potpunosti isključili moguću ovisnost opisanog učinka o izravnom kontaktu stanica, posebice u nekim primarnim uzorcima AML-a (59).

Među brojnim citokinima koje stvaraju stromalne stanice, citokin CXCL12 ističe se kao citokin za koji je poznato da djeluje inhibitorno na diferencijaciju stanica U937 (47). Stromalne stanice, uključujući MS-5, luče CXCL12 (105), a stanice U937 izražavaju visoke razine receptora CXCR4 (47,48). Budući da su CXCR4 i CXCL12 očuvani između vrsta, pokazano je da mišje stromalne stanice mogu pobuditi signal ljudskim leukemijskim stanicama pomoću CXCL12 i CXCR4 (72). Inhibicija signalizacije putem CXCL12/CXCR4 pomoću pleriksafora (AMD3100) čini stanice AML-a osjetljivijima na citotoksične učinke AraC-a u miševima (106). Iako smo u ovom istraživanju izmjerili CXCL12 u nadtalozima stromalnih stanica MS-5, dodatak pleriksafora nije spriječio inhibitorne učinke strome na izražaj CD11b. Štoviše, pleriksafor nije imao značajan utjecaj na preživljenje stanica AML-a tretiranih s 1000 nM AraC-om u kokulturi tijekom 3 dana. U studiji koju je proveo Tavor i sur. (47), primijećeno je da pleriksafor (10 μ M) povećava izražaj CD15 u stanicama U937 nakon 9 dana *in vitro*

tretmana. Važno je napomenuti da u ovom istraživanju nismo mjerili izražaj CD15. Naime, inhibitorne učinke strome u kokulturi određivali smo nakon inkubacije od 3 dana, a tada nije primijećeno povećanje izražaja CD11b u kontrolnim stanicama. Iako ne možemo isključiti mogućnost da korištena koncentracija pleriksafora nije bila dovoljna za potpuno sprječavanje učinaka CXCL12, naši su nalazi u skladu sa sličnim modelom primarnih blasta u kokulturi s ljudskim mezenhimalnim stromalnim stanicama u kojem pleriksafor nije pokazao značajne učinke na osjetljivost na AraC. U navedenom istraživanju je primjena antitijela protiv TGF- β 1 povećala proliferaciju primarnih uzoraka AML-a u kontrolnoj skupini, ali nije uzrokovalo statistički značajno povećanje broja stanica tretiranih citarabinom (57). Naši rezultati pokazuju da anti-TGF- β 1 antitijela nisu izazvala nikakve značajne učinke na diferencijaciju i citotoksičnost u stanicama U937 koje su uzgajane u kokulturi sa stanicama MS-5. Međutim, moguće je da su učinci citokina koje izlučuju mišje stromalne stanice ipak različiti od učinaka citokina koje izlučuju ljudske stromalne stanice.

Novije studije su više usredotočene na metabolički aspekt stromalne potpore stanicama AML-a. Nekoliko studija je pokazalo da se stanice AML-a oslanjaju na oksidativnu fosforilaciju kao mehanizam otpornosti na kemoterapiju te da je njihov bioenergetski kapacitet pojačan u prisutnosti stromalnih stanica (42). Izravni kontakt stanica koji omogućuje prijenos mitohondrija iz stanica MS-5 u stanice U937 je naveden kao mehanizam povećane otpornosti stanica U937 na AraC u koncentraciji od 3 μ M (60). Prijenos mitohondrija je praćen povećanjem oksidativne fosforilacije i posljedičnim povećanjem slobodnih radikala kisika u stanicama U937. Razina ROS-a igra važnu ulogu u preživljenju stanica AML-a nakon kemoterapije (107,108). Povećanje razine ROS-a koje smo izmjerili u stanicama tretiranim AraC-om je u skladu s prethodnim istraživanjima (42,109). Prisutnost stanica MS-5 smanjila je razinu ROS-a u stanicama AML-a koje su izložene citotoksičnoj dozi AraC-a, ali ovo smanjenje nije primijećeno u stanicama koje su se diferencirale u odgovoru na AraC bez citotoksičnih učinaka.

U našem istraživanju inhibitorni učinci NAC-a na diferencijaciju potaknutu AraC-om nisu praćeni smanjenjem razine ROS-a. Izostanak učinka NAC-a na povećanje razine ROS-a potaknuto AraC-om prethodno je opisan u stanicama U937 u kojima je ista koncentracija NAC-a u potpunosti smanjivala stvaranje ROS-a izazvano kratkotrajnim tretmanom oksidansom H₂O₂ (74). Čak ni dodatak askorbinske kiseline, za koju je prethodno pokazano da smanjuje razinu ROS-a u dvije od četiri stanične linije AML-a (76), nije utjecao na razinu ROS-a u stanicama U937 tretiranih citarabinom tijekom 72 sata. Iako je inhibitorni učinak NAC-a na

izražaj CD11b izmjeren u drugim vrstama stanica (110), naša zapažanja o nedostatku učinaka na razinu ROS-a, zajedno s njegovim antiproliferativnim učincima kada se primjenjuje sam, upućuju da su inhibitorni učinci NAC na izražaj CD11b mogu biti posredovani mehanizmima koji su različiti od regulacije ROS-a.

U ovom istraživanju nismo mjerili promjene u razini metabolita u mediju nakon kokulture. Moguće je da stromalne stanice osiguravaju metabolite koji pomažu leukemijskim stanicama u popravku oštećenja DNA u odgovoru na kemoterapeutike. Tako je nedavno opisano da stromalne stanice daju aspartat za sintezu pirimidina koji omogućuje leukemijskim stanicama popravak oštećenja DNA koje je inducirano AraC-om (107), a to bi moglo imati ulogu u modelu u kojem smo pokazali zajednički mehanizam diferencijacije izazvane citarabinom i inhibitorima sinteze pirimidina. Dodatno, takva uloga stromalnih stanica u opskrbi leukemijskih stanica prekursorom sinteze pirimidina objasnila bi i izostanak učinka stromalnih stanica na izražaj biljega CD11b u stanicama koje su tretirane AIKAr-om i brekvinarom jer je u tim stanicama sinteza pirimidina zakočena zbog inhibicije nizvodnih enzima bez obzira na dostupnost aspartata. Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazali su da sama nadoknada nukleozida ne može ukinuti diferencijaciju potaknutu citarabinom iako učinkovito koči diferencijaciju potaknutu inhibitorima sinteze pirimidina. Naši preliminarni rezultati pokazuju da diferencijacija leukemijskih stanica potaknuta citarabinom izostaje ako se leukemijske stanice uzgajaju u mediju α MEM koji sadrži deoksinukleotide, a to upućuje na moguću regulaciju enzima ribonukleotid-reduktaze koji regulira nastanak deoksinukleotida (111).

U ovom istraživanju nismo istražili niti potencijalnu regulaciju enzima koji metaboliziraju lijekove u stromalnim stanicama. U modelu kokulture stromalnih i leukemijskih stanica koje su diferencirane ATRA-om pokazalo se da prisutnost stromalnih stanica koštane srži smanjuje diferencijaciju induciranjem enzima koji deaktiviraju retinoide (112). Opisano je da liječenje AraC-om povećava enzime koji metaboliziraju lijekove u mikrookolišu koštane srži (112). Stoga je moguće da su učinci stromalnih stanica na diferencijaciju jednostavno posljedica povećanog metaboliziranja AraC-a u stromalnim stanicama, što onda uzrokuje smanjenje njegove efektivne koncentracije u uvjetima kokulture.

Dodatno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da veće koncentracije citarabina uzrokuju promjene samih stromalnih stanica. Iako se citarabin već desetljećima primjenjuje u liječenju AML-a te su poznati protektivni učinci stromalnih linija na citotoksičnost, rijetke su studije

koje opisuju učinke AraC-a na stromu. Primarne mezenhimalne stromalne stanice izolirane iz koštane srži oboljelih koji su tretirani kemoterapijom pokazuju smanjeno preživljenje *ex vivo* i povećanu genotoksičnost. Genotoksičnost se zamjećuje i nakon izlaganja primarnih stromalnih stanica 25 μM AraC-u tijekom 1h *in vitro*, a što odgovara standardnoj kliničkoj dozi od 100-200 mg/m^2 (70). U istraživanju Griessinger i sur. (62) u kojemu su se stanice MS-5 pokazale najboljima u podržavanju dugotrajnog uzgoja primarnih stanica AML-a, AraC je korišten u koncentraciji od 3 μM jer su autori smatrali da je ta koncentracija 3,8 puta manja od IC50 za stanice MS-5 te da nema većeg učinka na stromalne stanice u kokulturi, ali učinci na broj, morfologiju i fenotip stromalnih stanica nisu prikazani. Međutim, u ljudskoj stromalnoj liniji HS-5 nedavno je pokazano da izlaganje stromalnih stanica AraC-u u koncentraciji od 1,6 μM tijekom 24 sata uzrokuje znatno oštećenje DNA (113). Povećani stupanj fosforilacije histona H2AX na serinskom ostatku 139 i povećana razina poli(ADP-riboza) polimeraze 1 (prema eng. *poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1*) u radu Yu i sur. (113) odgovaraju povećanoj aktivaciji signalnog puta ATR/Chk1 koju smo izmjerili u stanicama MS-5 nakon izlaganja AraC-u u koncentraciji od 1 μM tijekom 48 sati. Usprkos oštećenoj DNA, stanice HS-5 sprječavaju citotoksične učinke AraC-a na stanice AML-a, a ti su učinci posredovani promjenom citokinskog profila stromalnih stanica, posebice povećanom sekrecijom FGF-10 (113). I u našem su modelu stanice MS-5 smanjivale citotoksični učinak 1 μM AraC-a na stanice AML-a, iako su bile znatno promijenjenog fenotipa i broja, ali moguću ulogu FGF-10 nismo ispitali. Međutim, učinak na diferencijaciju stromalnih stanica vjerojatno se razlikuje od mehanizma koji je odgovoran za smanjivanje apoptoze jer u našem istraživanju nismo zamijetili značajne učinke niskih koncentracija AraC-a na stromalne stanice. Različito od niskih doza citarabina, AIKAr-a pokazuje izrazite učinke na same stromalne stanice, a sličan učinak ne zamjećuje se u stromalnim stanicama koje su tretirane brekvinarom. Mehanizmi djelovanja AIKAr-a nisu predmet ovog istraživanja, ali naši preliminarni rezultati pokazuju da ti učinci AIKAr-a nisu ovisni o inhibiciji sinteze pirimidina, već su ovisni o aktivaciji AMPK-a. Dodatno, rezultate ovog istraživanja planiramo provjeriti u modelu drugih stromalnih staničnih linija, a posebice ljudske linije HS-5, te u modelu primarnih blasta AML-a i primarnih mezenhimalnih stanica izoliranih iz koštane srži oboljelih od AML-a.

Ukratko, rezultati ovog istraživanja pokazuju da prisutnost stromalnih stanica smanjuje izražaj biljega diferencijacije inducirane niskom dozom citarabina te da malobrojne stanice koje prežive citotoksične doze nastavljaju izražavati CD11b. Iako postoje mnoge studije koje istražuju mehanizme kojima stromalne stanice štite leukemijske stanice od citotoksičnosti, vrlo

je malo studija koje određuju izražaj biljega diferencijacije u živim stanicama tijekom ili nakon tretmana AraC-om (60). Stanice koje prežive kemoterapiju nazivaju se rezistentnim (40,60,109), rezidualnim (107) ili senescentnim leukemijskim stanicama (85) te se vjeruje da su izvor recidiva bolesti. Moguće je da mnoge od tih stanica pokazuju djelomičnu diferencijaciju, ali zadržavaju sposobnost dediferencijacije, slično onome što je uočeno u stanicama u kojima je diferencijacija potaknuta ATRA-om (114). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjeli mehanizmi diferencijacije i dediferencijacije u tim stanicama i njihova uloga u progresiji i recidivu bolesti.

7. ZAKLJUČCI

1. Citarabin smanjuje proliferaciju, potiče diferencijaciju i aktivira Chk1 ovisno o dozi
2. Farmakološka inhibicija signalnog puta ATR/Chk1 sprječava diferencijaciju i zastoj u staničnom ciklusu
3. Smanjenje količine proteina Chk1 smanjuje učinke citarabina na izražaj diferencijacijskih biljega i zastoj u S-fazi staničnog ciklusa, a povećava apoptozu
4. Citarabin i farmakološki inhibitori signalnog puta ATR/Chk1 imaju slične učinke na proliferaciju i diferencijaciju stanica druge monocitne leukemijske stanične linije
5. Stromalne stanice smanjuju učinke niske doze citarabina na diferencijaciju i zastoj u staničnom ciklusu leukemijske stanične linije U937
6. Učinci stromalnih stanica ne ovise o mutacijskom statusu *p53* i *FLT3* leukemijskih staničnih linija
7. Visoka doza citarabina utječe na broj i fenotip stromalnih stanica
8. Stromalne stanice smanjuju aktivaciju citokinskih signalnih puteva potaknutih niskom dozom citarabina
9. Inhibicija kontakta između stanica i inhibicija signaliziranja putem CXCL12 i TGF- β ne poništavaju učinke stromalnih stanica MS-5 na diferencijaciju stanica U937
10. Prisutnost stromalnih stanica MS-5 ne smanjuje razinu slobodnih radikala kisika u stanicama U937 tretiranim niskim dozama citarabina

8. SAŽETAK

Citarabin u malim koncentracijama potiče diferencijaciju stanica akutne mijeloične leukemije (AML), ali mehanizam nije u potpunosti objašnjen. Naša prethodna istraživanja pokazala su da inhibitori sinteze pirimidina potiču diferencijaciju leukemijskih stanica aktivacijom kinaze Chk1 (prema engl. *checkpoint kinase 1*). Cilj ovog istraživanja je ispitati ulogu Chk1 u diferencijaciji leukemijskih stanica potaknutoj citarabinom te ispitati učinke stromalnih stanica na diferencijaciju leukemijskih stanica. Leukemijske stanične linije U937, THP-1 i MOLM-13, te stromalnu staničnu liniju MS-5 smo tretirali citarabinom i inhibitorima sinteze pirimidina. Koristeći Western blot, protočnu citometriju, farmakološke inhibitore i siRNA transfekciju pokazali smo da niska doza citarabina uzrokuje diferencijaciju aktivacijom Chk1. Prisutnost stromalnih stanica smanjuje učinke niskih doza citarabina na zastoj u staničnom ciklusu, signalizaciju oštećenja DNA i diferencijaciju stanica AML-a. Iako je sekvenciranje RNA pokazalo da stroma smanjuje izražaj gena uključenih u signalizaciju citokinima i oksidativni stres, rezultati dobiveni pomoću farmakoloških inhibitora i neutralizirajućih protutijela nisu podržali ulogu CXCL12, TGF- β i slobodnih radikala kisika. Ovi rezultati pokazuju da niska doza citarabina potiče diferencijaciju leukemijskih stanica aktivacijom kinaze Chk1 te da stromalne stanice smanjuju diferencijaciju stanica AML-a potaknutu niskim dozama citarabina *in vitro*.

9. SUMMARY

The mechanism of cytarabine-induced differentiation of acute myeloid leukemia cells

Tomislav Smoljo, 2024

Low-dose cytarabine promotes differentiation of acute myeloid leukemia (AML) cells, but the mechanism is not fully elucidated. Our previous research showed that pyrimidine synthesis inhibitors stimulate the differentiation of AML cells by activating checkpoint kinase 1 (Chk1). This research aims to investigate the role of Chk1 in the cytarabine-induced differentiation of AML cells and to examine the effects of stromal cells on AML differentiation. Leukemia cell lines U937, THP-1, and MOLM-13, and stromal cell line MS-5 were treated with cytarabine and pyrimidine synthesis inhibitors. Using immunoblotting, flow cytometry analyses, pharmacologic inhibitors, and genetic inactivation of Chk1 we show that low-dose cytarabine induces differentiation by activating Chk1. The presence of stromal cells prevented cell cycle arrest, DNA damage signaling, and AML cells differentiation induced by low-dose cytarabine. Although transcriptomic analysis revealed that the stroma reduced the expression of genes involved in cytokine signaling, and oxidative stress, data obtained with pharmacological inhibitors and neutralizing antibodies did not support the role of CXCL12, TGF- β , or reactive oxygen species. This study reveals that that low-dose cytarabine promotes leukemic cell differentiation by activating Chk1 kinase and that stromal cells reduce low-dose cytarabine-induced AML differentiation *in vitro*.

10. LITERATURA

1. Sekeres MA, Guyatt G, Abel G, Alibhai S, Altman JK, Buckstein R, i sur. American Society of Hematology 2020 guidelines for treating newly diagnosed acute myeloid leukemia in older adults. *Blood Adv.* 2020 Aug 6;4(15):3528–49. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001920>
2. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023 Mar 1;98(3):502–26. doi: <https://doi.org/10.1002/ajh.26822>
3. Short NJ, Konopleva M, Kadia TM, Borthakur G, Ravandi F, DiNardo CD, i sur. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov.* 2020 Apr;10(4):506-525. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1011.
4. Skopek R, Palusińska M, Kaczor-Keller K, Pingwara R, Papierniak-Wyglądała A, Schenk T, i sur. Choosing the Right Cell Line for Acute Myeloid Leukemia (AML) Research. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 11;24(6):5377. doi: 10.3390/ijms24065377.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, i sur. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976 Aug 1;33(4):451–8. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
6. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, i sur. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia.* 2022;36(7):1703–19. doi: <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka H-M, i sur. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood.* 2022 Sep 15;140(11):1200–28. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>
8. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, i sur.

- Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345–77. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>
9. Geoffroy M-C, Esnault C, de Thé H. Retinoids in hematology: a timely revival? *Blood*. 2021 May 6;137(18):2429–37. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2020010100>
 10. Koefler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980 Sep 1;56(3):344–50. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V56.3.344.344>
 11. Dembitz V, Lalic H, Tomic B, Smoljo T, Batinic J, Dubravcic K, i sur. All-trans retinoic acid induces differentiation in primary acute myeloid leukemia blasts carrying an inversion of chromosome 16. *Int J Hematol*. 2022;115(1):43–53. doi: <https://doi.org/10.1007/s12185-021-03224-5>
 12. Madan V, Koefler HP. Differentiation therapy of myeloid leukemia: four decades of development. *Haematologica*. 2021 Jan 1;106(1):26-38. doi: [10.3324/haematol.2020.262121](https://doi.org/10.3324/haematol.2020.262121).
 13. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):34–43. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347872>
 14. de Thé H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):117–27. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.103>
 15. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, i sur. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):732–41. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779447>
 16. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, i sur. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):722–31. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779405>
 17. Roboz GJ, DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Mims AS, Prince GT, i sur. Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood*. 2020 Feb 13;135(7):463–71. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-08-884447>

<https://doi.org/10.1182/blood.2019002140>

18. McMahon CM, Canaani J, Rea B, Sargent RL, Qualtieri JN, Watt CD, i sur. Gilteritinib induces differentiation in relapsed and refractory FLT3-mutated acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2019 May 23;3(10):1581–5. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018029496>
19. Sexauer A, Perl A, Yang X, Borowitz M, Gocke C, Rajkhowa T, i sur. Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood.* 2012 Nov 15;120(20):4205–14. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402545>
20. Sykes DB, Kfoury YS, Mercier FE, Wawer MJ, Law JM, Haynes MK, i sur. Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell.* 2016;167(1):171–86. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.057>
21. Hatse S, De Clercq E, Balzarini J. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem Pharmacol.* 1999 Aug 15;58(4):539-55. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00035-0.
22. Siddiqui A, Ceppi P. A non-proliferative role of pyrimidine metabolism in cancer. *Mol Metab.* 2020;35:100962. doi: <http://europepmc.org/abstract/MED/32244187>
23. Mollick T, Laín S. Modulating pyrimidine ribonucleotide levels for the treatment of cancer. *Cancer Metab.* 2020;8(1):12. doi: <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00218-5>
24. A Study of Brequinar in Subjects With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia [Internet]. 2022 [cited 2023 Nov 7]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03760666?cond=>
25. Lalic H, Dembitz V, Lukinovic-Skudar V, Banfic H, Visnjic D. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2014 Oct 1;55(10):2375–83. doi: <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.876633>
26. Višnjić D, Lalić H, Dembitz V, Tomić B, Smoljo T. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review. *Cells.*

- 2021 May 4;10(5):1095. doi: 10.3390/cells10051095.
27. Dembitz V, Lalic H, Visnjic D. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside-induced autophagy flux during differentiation of monocytic leukemia cells. *Cell Death Discov.* 2017;3(1):17066. doi: <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.66>
 28. Dembitz V, Tomic B, Kodvanj I, Simon JA, Bedalov A, Visnjic D. The ribonucleoside AICAr induces differentiation of myeloid leukemia by activating the ATR/Chk1 via pyrimidine depletion. *J Biol Chem.* 2019 Oct 18;294(42):15257-15270. doi: 10.1074/jbc.RA119.009396.
 29. Tomic B, Smoljo T, Lalic H, Dembitz V, Batinic J, Batinic D, i sur. Cytarabine-induced differentiation of AML cells depends on Chk1 activation and shares the mechanism with inhibitors of DHODH and pyrimidine synthesis. *Sci Rep.* 2022;12(1):11344. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15520-z>
 30. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints BT - Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols. In: Noguchi E, Gadaleta MC, editors. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 29–40. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
 31. Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J.* 2011 May 27;436(3):527–36. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20102162>
 32. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(21):4009–21. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1307-3>
 33. Schenk EL, Koh BD, Flatten KS, Peterson KL, Parry D, Hess AD, i sur. Effects of Selective Checkpoint Kinase 1 Inhibition on Cytarabine Cytotoxicity in Acute Myelogenous Leukemia Cells In Vitro. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 1;18(19):5364-73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0961.
 34. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, i sur. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Jan 26;129(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.

35. Rechkoblit O, Johnson RE, Buku A, Prakash L, Prakash S, Aggarwal AK. Structural insights into mutagenicity of anticancer nucleoside analog cytarabine during replication by DNA polymerase η . *Sci Rep*. 2019;9(1):16400. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52703-7>
36. Wang Z, Wang S, Fisher PB, Dent P, Grant S. Evidence of a functional role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1 in leukemic cell (U937) differentiation induced by low concentrations of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine. *Differentiation*. 2000 Aug;66(1):1-13. doi: 10.1046/j.1432-0436.2000.066001001.x.
37. Chen L, Guo P, Zhang Y, Li X, Jia P, Tong J, i sur. Autophagy is an important event for low-dose cytarabine treatment in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res*. 2017 Sep;60:44-52. doi: 10.1016/j.leukres.2017.06.007.
38. Griffin J, Munroe D, Major P, Kufe D. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. *Exp Hematol*. 1982 Oct;10(9):774–81.
39. Mesa RA, Loegering D, Powell HL, Flatten K, Arlander SJH, Dai NT, i sur. Heat shock protein 90 inhibition sensitizes acute myelogenous leukemia cells to cytarabine. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):318–27. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3523>
40. Di Tullio A, Rouault-Pierre K, Abarategi A, Mian S, Grey W, Gribben J, i sur. The combination of CHK1 inhibitor with G-CSF overrides cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia. *Nat Commun*. 2017;8(1):1679. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01834-4>
41. Kokkaliaris KD, Scadden DT. Cell interactions in the bone marrow microenvironment affecting myeloid malignancies. *Blood Adv*. 2020 Aug 11;4(15):3795–803. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002127>
42. Forte D, García-Fernández M, Sánchez-Aguilera A, Stavropoulou V, Fielding C, Martín-Pérez D, i sur. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Support Acute Myeloid Leukemia Bioenergetics and Enhance Antioxidant Defense and Escape from Chemotherapy. *Cell Metab*. 2020 Nov 3;32(5):829-843.e9. doi: 10.1016/j.cmet.2020.09.001.
43. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004 May

- 1;103(9):3258–64. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-4011>
44. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, *i sur.* Endogenous Bone Marrow MSCs Are Dynamic, Fate-Restricted Participants in Bone Maintenance and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2012 Mar 2;10(3):259-72. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.003.
 45. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):977-88. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
 46. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327–34. doi: <https://doi.org/10.1038/nature12984>
 47. Tavor S, Eisenbach M, Jacob-Hirsch J, Golan T, Petit I, BenZion K, *i sur.* The CXCR4 antagonist AMD3100 impairs survival of human AML cells and induces their differentiation. *Leukemia*. 2008;22(12):2151–8. doi: <https://doi.org/10.1038/leu.2008.238>
 48. Zeng Z, Xi Shi Y, Samudio IJ, Wang R-Y, Ling X, Frolova O, *i sur.* Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6215–24. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-158311>
 49. Méndez-Ferrer S, Michurina T V, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, *i sur.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–34. doi: <https://doi.org/10.1038/nature09262>
 50. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *i sur.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
 51. Battula VL, Le PM, Sun JC, Nguyen K, Yuan B, Zhou X, *i sur.* AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight*. 2017 Jul 6;2(13). doi: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90036>
 52. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, *i sur.* Acute myeloid

- leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*. 2018;32(3):575–87. doi: <https://doi.org/10.1038/leu.2017.259>
53. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, i sur. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell*. 2019 Jun 13;177(7):1915-1932.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.040.
 54. Azadniv M, Myers JR, McMurray HR, Guo N, Rock P, Coppage ML, i sur. Bone marrow mesenchymal stromal cells from acute myelogenous leukemia patients demonstrate adipogenic differentiation propensity with implications for leukemia cell support. *Leukemia*. 2020;34(2):391–403. doi: <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0568-8>
 55. Ciciarello M, Corradi G, Forte D, Cavo M, Curti A. Emerging Bone Marrow Microenvironment-Driven Mechanisms of Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia: Tangle or Chance? *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 22;13(21):5319. doi: 10.3390/cancers13215319.
 56. Piya S, Kornblau SM, Ruvolo VR, Mu H, Ruvolo PP, McQueen T, i sur. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Sep 1;128(9):1260–9. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-692244>
 57. Schelker RC, Iberl S, Müller G, Hart C, Herr W, Grassinger J. TGF- β 1 and CXCL12 modulate proliferation and chemotherapy sensitivity of acute myeloid leukemia cells co-cultured with multipotent mesenchymal stromal cells. *Hematology*. 2018 Jul 3;23(6):337–45. doi: <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1402455>
 58. Su M, Alonso S, Jones JW, Yu J, Kane MA, Jones RJ, i sur. All-Trans Retinoic Acid Activity in Acute Myeloid Leukemia: Role of Cytochrome P450 Enzyme Expression by the Microenvironment. *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6):e0127790. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127790>
 59. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev B V, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. 2002;16(9):1713–24. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402608>

60. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, Chiche J, Mary D, Prebet T, i sur. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. 2016 Jul 14;128(2):253–64. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655860>
61. Podszywalow-Bartnicka P, Kominek A, Wolczyk M, Kolba MD, Swatler J, Piwocka K. Characteristics of live parameters of the HS-5 human bone marrow stromal cell line cocultured with the leukemia cells in hypoxia, for the studies of leukemia–stroma cross-talk. *Cytom Part A*. 2018 Sep 1;93(9):929–40. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23580>
62. Griessinger E, Anjos-Afonso F, Pizzitola I, Rouault-Pierre K, Vargaftig J, Taussig D, i sur. A Niche-Like Culture System Allowing the Maintenance of Primary Human Acute Myeloid Leukemia-Initiating Cells: A New Tool to Decipher Their Chemoresistance and Self-Renewal Mechanisms. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Apr 1;3(4):520–9. doi: <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0166>
63. Herbst SA, Kim V, Roider T, Schitter EC, Bruch P-M, Liebers N, i sur. Comparing the value of mono- vs coculture for high-throughput compound screening in hematological malignancies. *Blood Adv*. 2023 Sep 29;7(19):5925–36. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009652>
64. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith L-L, Ridler CM, Preudhomme C, i sur. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1166–73. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2325>
65. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, i sur. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun*. 2018;9(1):5379. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4>
66. Višnjić D, Batinić D, Banfić H. Arachidonic Acid Mediates Interferon- γ -Induced Sphingomyelin Hydrolysis and Monocytic Marker Expression in HL-60 Cell Line. *Blood [Internet]*. 1997 Jan 1;89(1):81–91. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V89.1.81>
67. Spriggs D, Griffin J, Wisch J, Kufe D. Clinical Pharmacology of Low-Dose Cytosine Arabinoside. *Blood [Internet]*. 1985;65(5):1087–9.

68. Meyer M, Rübsamen D, Slany R, Illmer T, Stabla K, Roth P, i sur. Oncogenic RAS Enables DNA Damage- and p53-Dependent Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells in Response to Chemotherapy. *PLoS One*. 2009 Nov 5;4(11):e7768. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007768>
69. Long J, Jia M-Y, Fang W-Y, Chen X-J, Mu L-L, Wang Z-Y, i sur. FLT3 inhibition upregulates HDAC8 via FOXO to inactivate p53 and promote maintenance of FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia. *Blood*. 2020 Apr 23;135(17):1472–83. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2019003538>
70. Gynn LE, Anderson E, Robinson G, Wexler SA, Upstill-Goddard G, Cox C, i sur. Primary mesenchymal stromal cells in co-culture with leukaemic HL-60 cells are sensitised to cytarabine-induced genotoxicity, while leukaemic cells are protected. *Mutagenesis*. 2021 Nov 1;36(6):419–28. doi: <https://doi.org/10.1093/mutage/geab033>
71. Zeng H, Gu H, Chen C, Li M, Xia F, Xie L, i sur. ChREBP promotes the differentiation of leukemia-initiating cells to inhibit leukemogenesis through the TXNIP/RUNX1 pathways. *Oncotarget*. 2016 Jun 21;7(25):38347-38358. doi: [10.18632/oncotarget.9520](https://doi.org/10.18632/oncotarget.9520).
72. Costa MJ, Kudaravalli J, Liu W-H, Stock J, Kong S, Liu S-H. A mouse model for evaluation of efficacy and concomitant toxicity of anti-human CXCR4 therapeutics. *PLoS One*. 2018 Mar 19;13(3):e0194688. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194688>
73. Choi E-H, Park S-J. TXNIP: A key protein in the cellular stress response pathway and a potential therapeutic target. *Exp Mol Med*. 2023;55(7):1348–56. doi: <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01019-8>
74. Wang X, Dawod A, Nachliely M, Harrison JS, Danilenko M, Studzinski GP. Differentiation agents increase the potential AraC therapy of AML by reactivating cell death pathways without enhancing ROS generation. *J Cell Physiol*. 2020 Jan 1;235(1):573–86. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.28996>
75. Schneider MP, Delles C, Schmidt BMW, Oehmer S, Schwarz TK, Schmieder RE, i sur. Superoxide Scavenging Effects of N-Acetylcysteine and Vitamin C in Subjects With Essential Hypertension*. *Am J Hypertens*. 2005 Aug 1;18(8):1111–7. doi: <https://doi.org/10.1002/ajh.20288>

<https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.02.006>

76. Liu J, Hong J, Han H, Park J, Kim D, Park H, *i sur.* Decreased vitamin C uptake mediated by SLC2A3 promotes leukaemia progression and impedes TET2 restoration. *Br J Cancer.* 2020;122(10):1445–52. doi: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0788-8>
77. Vincelette ND, Ding H, Huehls AM, Flatten KS, Kelly RL, Kohorst MA, *i sur.* Effect of CHK1 Inhibition on CPX-351 Cytotoxicity *in vitro* and *ex vivo*. *Sci Rep.* 2019;9(1):3617. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40218-0>
78. Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, Zhang X, Hur W, Liu Y, *i sur.* Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res.* 2013 Apr 15;73(8):2574–86. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1702>
79. Fordham SE, Blair HJ, Elstob CJ, Plummer R, Drew Y, Curtin NJ, *i sur.* Inhibition of ATR acutely sensitizes acute myeloid leukemia cells to nucleoside analogs that target ribonucleotide reductase. *Blood Adv.* 2018 May 22;2(10):1157–69. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017015214>
80. Fernandes ND, Sun Y, Price BD. Activation of the Kinase Activity of ATM by Retinoic Acid Is Required for CREB-dependent Differentiation of Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem.* 2007 Jun 1;282(22):16577-84. doi: 10.1074/jbc.M609628200.
81. Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, *i sur.* Genotoxic Stress Abrogates Renewal of Melanocyte Stem Cells by Triggering Their Differentiation. *Cell.* 2009 Jun 12;137(6):1088-99. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.037.
82. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, *i sur.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* 2005;7(2):165–71. doi: <https://doi.org/10.1038/ncb1211>
83. Takagaki K, Katsuma S, Kaminishi Y, Horio T, Tanaka T, Ohgi T, *i sur.* Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Genes to Cells.* 2005 Feb 1;10(2):97–106. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00821.x>
84. Le Goff S, Boussaid I, Floquet C, Raimbault A, Hatin I, Andrieu-Soler C, *i sur.* p53 activation during ribosome biogenesis regulates normal erythroid differentiation.

- Blood. 2021 Jan 7;137(1):89–102. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2019003439>
85. Duy C, Li M, Teater M, Meydan C, Garrett-Bakelman FE, Lee TC, i sur. Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating AML Recurrence. *Cancer Discov.* 2021 Jun;11(6):1542-1561. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1375.
 86. Schuler F, Afreen S, Manzl C, Häcker G, Erlacher M, Villunger A. Checkpoint kinase 1 is essential for fetal and adult hematopoiesis. *EMBO Rep.* 2019 Aug 1;20(8):e47026. doi: <https://doi.org/10.15252/embr.201847026>
 87. Chakrabarti A, Gupta K, Sharma JP, Yang J, Agarwal A, Glick A, i sur. ATP Depletion Triggers Acute Myeloid Leukemia Differentiation through an ATR/Chk1 Protein-dependent and p53 Protein-independent Pathway. *J Biol Chem.* 2012 Jul 6;287(28):23635-43. doi: 10.1074/jbc.M111.312801.
 88. Santos MA, Faryabi RB, Ergen A V, Day AM, Malhowski A, Canela A, i sur. DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. *Nature.* 2014;514(7520):107–11. doi: <https://doi.org/10.1038/nature13483>
 89. Dembitz V, Lalic H, Kodvanj I, Tomic B, Batinic J, Dubravcic K, i sur. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces differentiation in a subset of primary acute myeloid leukemia blasts. *BMC Cancer.* 2020;20(1):1090. doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07533-6>
 90. Van Den Neste E, Van den Berghe G, Bontemps F. AICA-riboside (acadesine), an activator of AMP-activated protein kinase with potential for application in hematologic malignancies. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 Apr 1;19(4):571–8. doi: <https://doi.org/10.1517/13543781003703694>
 91. Cluzeau T, Furstoss N, Savy C, El Manaa W, Zerhouni M, Blot L, i sur. Acadesine Circumvents Azacitidine Resistance in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 25;21(1):164. doi: 10.3390/ijms21010164.
 92. Radomska HS, Alberich-Jordà M, Will B, Gonzalez D, Delwel R, Tenen DG. Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBP α . *J Clin Invest.* 2012 Aug 1;122(8):2955–66. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI43354>

93. Bertoli S, Boutzen H, David L, Larrue C, Vergez F, Fernandez-Vidal A, i sur. CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):38061-78. doi: 10.18632/oncotarget.5706.
94. Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Internet]. [cited 2024 Jan 3]. Dostupno na: <https://webshop.dsmz.de/index.php?lang=1&>
95. Placke T, Faber K, Nonami A, Putwain SL, Salih HR, Heidel FH, i sur. Requirement for CDK6 in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):13–23. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-558114>
96. Dembitz V, Lalic H, Tomic B, Smoljo T, Batinic J, Dubravcic K, i sur. All-trans retinoic acid induces differentiation in primary acute myeloid leukemia blasts carrying an inversion of chromosome 16. *Int J Hematol*. 2021; doi: <https://doi.org/10.1007/s12185-021-03224-5>
97. Wiederschain D, Kawai H, Shilatifard A, Yuan Z-M. Multiple Mixed Lineage Leukemia (MLL) Fusion Proteins Suppress p53-mediated Response to DNA Damage. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24315-21. doi: 10.1074/jbc.M412237200.
98. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, Zhao Z, Rappaport AR, Luo W, i sur. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):877-89. doi: 10.1101/gad.1771409.
99. Ying M, Shao X, Jing H, Liu Y, Qi X, Cao J, i sur. Ubiquitin-dependent degradation of CDK2 drives the therapeutic differentiation of AML by targeting PRDX2. *Blood*. 2018 Jun 14;131(24):2698–711. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-813139>
100. Jeremy Wen Q, Yang Q, Goldenson B, Malinge S, Lasho T, Schneider RK, i sur. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat Med*. 2015;21(12):1473–80. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.3995>
101. Kueh HY, Champhekar A, Nutt SL, Elowitz MB, Rothenberg E V. Positive Feedback Between PU.1 and the Cell Cycle Controls Myeloid Differentiation. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):670-3. doi: 10.1126/science.1240831.

102. Reilly IA, Sadler J, Russell NH. Hypoplastic acute leukemia: cytogenetic evidence for differentiation in vivo in response to low-dose ara-C. *Br J Haematol.* 1987;65(3):384–5.
103. Degos L. Differentiating agents in the treatment of leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 1990;14(8):731-3. doi: 10.1016/0145-2126(90)90103-g.
104. Moskowitz AJ, Hamlin PA, Perales M-A, Gerecitano J, Horwitz SM, Matasar MJ, i sur. Phase II Study of Bendamustine in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012 Dec 17;31(4):456–60. doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.3308>
105. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, Wortman M, Yachyshin S, Chow LML, i sur. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 28;111(4):E435-44. doi: 10.1073/pnas.1311121111.
106. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Holt MS, Ritchey JK, i sur. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood.* 2009 Jun 11;113(24):6206–14. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162123>
107. van Gastel N, Spinelli JB, Sharda A, Schajnovitz A, Baryawno N, Rhee C, i sur. Induction of a Timed Metabolic Collapse to Overcome Cancer Chemoresistance. *Cell Metab.* 2020;32(3):391-403.e6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.009>.
108. Cai H, Kondo M, Sandhow L, Xiao P, Johansson A-S, Sasaki T, i sur. Critical role of Lama4 for hematopoiesis regeneration and acute myeloid leukemia progression. *Blood.* 2022 May 19;139(20):3040–57. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2021011510>
109. Hosseini M, Rezvani HR, Aroua N, Bosc C, Farge T, Saland E, i sur. Targeting Myeloperoxidase Disrupts Mitochondrial Redox Balance and Overcomes Cytarabine Resistance in Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* 2019 Oct 15;79(20):5191–203. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0515>
110. Roy A, Jana A, Yatish K, Freidt MB, Fung YK, Martinson JA, i sur. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2008 Sep 1;45(5):686-99. doi:

10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.026.

111. Wang H, He X, Zhang L, Dong H, Huang F, Xian J, i sur. Disruption of dNTP homeostasis by ribonucleotide reductase hyperactivation overcomes AML differentiation blockade. *Blood*. 2022 Jun 30;139(26):3752–70. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2021015108>
112. Su M, Chang Y-T, Hernandez D, Jones RJ, Ghiaur G. Regulation of drug metabolizing enzymes in the leukaemic bone marrow microenvironment. *J Cell Mol Med*. 2019 Jun 1;23(6):4111–7. doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.14298>
113. Yu S, Ye J, Wang Y, Lu T, Liu Y, Liu N, i sur. DNA damage to bone marrow stromal cells by antileukemia drugs induces chemoresistance in acute myeloid leukemia via paracrine FGF10-FGFR2 signaling. *J Biol Chem*. 2023 Jan;299(1):102787. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102787.
114. McKenzie MD, Ghisi M, Oxley EP, Ngo S, Cimmino L, Esnault C, i sur. Interconversion between Tumorigenic and Differentiated States in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell*. 2019 Aug 1;25(2):258-272.e9. doi: 10.1016/j.stem.2019.07.001.

11. ŽIVOTOPIS

Tomislav Smoljo rođen je 1.10.1995. godine u Sinju, gdje je završio osnovnu školu. Srednju školu za fizioterapeuskog tehničara je završio u Zdravstvenoj školi Split 2014. godine. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je diplomirao 2020. godine s odličnim uspjehom. Tijekom studija nagrađen je s Rektorovom i Dekanovom nagradom za organizaciju studentskog kongresa Croatian Student Summit, te Rektorovom nagradom za volontiranje u Hrvatskoj liniji za rijetke bolesti. Kao student se bavio znanstvenim radom te je bio na dvije istraživačke studentske razmjene u Madridu i Brnu. Radio je kao liječnik u Zavodu za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije. U studenom 2020. godine upisuje doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te je zaposlen kao asistent na HRZZ projektu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dore Višnjic, dr. med. u sklopu projekta “Signalni mehanizmi i metaboličke promjene u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije” (IP 2016-06-4581). Član je Hrvatskog društva za istraživanje raka, Hrvatskog imunološkog društva, Hrvatskog društva fiziologa i European association for cancer research. Koautor je više znanstvenih publikacija te prvi autor rada „*Bone marrow stromal cells reduce low-dose cytarabine-induced differentiation of acute myeloid leukemia*“. Dobitnik je Travel grant award za sudjelovanje na kongresu EACR 2023 u Torinu, nagrade za usmeno izlaganje na kongresu HDF 2023., nagrada za prezentaciju postera na kongresu HID 2022. godine i na kongresu HDF 2021. godine. Završio je Peerspectives course koji organizira Sveučilište Charite i British Medical Journal. Položilo je Tečaj za rad s laboratorijskim životinjama, kategorija B. U slobodno vrijeme bavi se sportom i ljubičasti je pojas u brazilskoj jiu-jitsi.