

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Драгослава А. Ђикић

**Утицај реактивних врста кисеоника
на активност mTOR сигналног пута
код пацијената са
мијелопролиферативним
неоплазмама**

докторска дисертација

Београд, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY**

Dragoslava A. Đikić

**The impact of reactive oxygen species
on the mTOR signaling pathway activity
in patients with
myeloproliferative neoplasms
doctoral dissertation**

Belgrade, 2018.

МЕНТОРИ

Проф др Андрија Богдановић, ванредни професор
Медицински факултет, Универзитет у Београду

др Драгана Марковић, виши научни сарадник
Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

КОМИСИЈА

Проф др Марија Пљеша Ерцеговац, ванредни професор
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Проф др Ана Видовић, ванредни професор
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Др Владан Чокић, научни саветник
Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Датум одбране:

Истраживање у овој дисертацији изведено је у оквиру научноистраживачког пројекта под називом „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“ (ОИ 175053, 2011-2017), којим руководи Др сци мед Владан Чокић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под покровитељством Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (област Биомедицина, пројектни период 2011-2017).

Докторска дисертација је урађена у Лабораторији за хематолошке малигнитете, Групе за молекуларну онкологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

Експериментални део ове дисертације који се односи на испитивање молекуларно-генетских карактеристика Филадельфија-негативних мијелопролиферативних неоплазми, урађен је у генетској лабораторији Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, Клиничког центра Србије.

Свом ментору др Андрији Богдановићу, ванредном професору Медицинског факултета Универзитета у Београду захваљујем се на несебичној подршци и стручној помоћи током израде докторске дисертације.

Коментору Др Драгани Марковић, вишем научном сараднику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, захваљујем се на конструктивном усмеравању, стрпљењу и помоћи током рада на докторској тези.

Посебну захвалност дугујем др Владану Чокићу, научном саветнику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, без чије стручне подршке, непресушне енергије и ентузијазма не би било ове дисертације.

Члановима комисије, др Марији Пљеши Ерцеговац, ванредном професору Медицинског факултета Универзитета у Београду и др Ани Видовић ванредном професору Медицинског факултета Универзитета у Београду захваљујем се на корисним сугестијама током уобличавања рада.

Колегама из Групе за молекуларну онкологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, захваљујем се на помоћи у реализацији истраживања и пријатељској атмосфери која је рад учинила пријатнијим.

Мојој породици дугујем захвалност за љубав, подршку и бескрајно стрпљење.

Утицај реактивних врста кисеоника на активност mTOR сигналног пута код пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама

Сажетак

Увод: Заједничка карактеристика малигнитета је повећана концентрација реактивних врста кисеоника (ROS) и реактивних врста азота (RNS) које могу да проузрокују оштећења макромолекула у ћелији и доведу до нарушавања њене структуре и функције. Оксидативно оштећење ДНК сматра се иницијалним догађајем у развоју канцерогенезе. ROS утичу на функцију хематопоетских матичних ћелија, доводе до промена ћелијског циклуса, убрзаног старења ћелија или до настанка хематолошких малигнитета. *BCR/ABL* онкоген и *JAK2V617F* мутација индукују стварање ROS у хематопоетским матичним ћелијама што води геномској нестабилности и оштећењу ДНК. Под утицајем *JAK2V617F* мутације и *BCR/ABL* онкогена код хроничних мијелопролиферативних неоплазми (ХМН) долази до конститутивне активације PI3K/AKT/mTOR сигналног пута, који регулише метаболизам и стимулише раст и пролиферацију ћелија. С обзиром да ROS и RNS могу утицати на активност mTOR киназе, испитани су параметри антиоксидативне заштите и оксидативно измењених липида и протеина у циркулацији, као и степен активације AKT/mTOR сигналног пута у гранулоцитима болесника са ХМН и хуманој еритролеукемијској ћелијској линији (енг. *Human erythroleukemia cell line*, HEL) са *JAK2V617F* мутацијом.

Метод: У студију је укључено 110 *de novo* ХМН болесника: 30 са полицитемијом вером (ПВ), 24 са есенцијалном тромбоцитимијом (ЕТ), 34 са примарном мијелофиброзом (ПМФ), 22 болесника са дијагнозом хроничне мијелоидне леукемије (ХМЛ) и 10 здравих испитаника. Маркери оксидативног и нитрозативног стреса у плазми и лизатима еритроцита одређени су колориметријском методом. Количина интрацелуларне продукције ROS одређена је употребом флуорогеног реагенса H₂DCF-DA. Ниво нитротирозина, индуцибилне NO синтазе (iNOS) и степен активације AKT/mTOR/p70S6K киназа одређени су у гранулоцитима болесника са ХМН имуноцитохемијском методом и методом имуноблота. У *in vitro* условима испитан је утицај водоник пероксида (H₂O₂) и N-ацетил цистеина на активацију mTOR и експресију iNOS и нитротирозина. Утицај два различита оксиданса, H₂O₂ и 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дихидрохлорида

(AAPH), на активацију АКТ/mTOR сигналног пута, преживљавање и ћелијски циклус HEL ћелија, у *in vitro* условима, испитан је методом имуноблота, FACS методом и МТТ тестом.

Резултати: Активност ензима супероксид дисмутазе и глутатион пероксидазе била је смањена у еритроцитима већине подтипова ХМН, док је активност каталазе смањена једино код болесника са ХМЛ. Укупан антиоксидативни капацитет у плазми и активност каталазе у еритроцитима имали су највеће вредности у ПМФ. Концентрације малондиалдехида и протеин карбонила, показатеља оксидативних оштећења липида и протеина у циркулацији, биле су повишене у ХМН. Концентрација укупних нитрита и нитрата (NOx) била је повећана код ПМФ болесника у поређењу са здравим испитаницима и другим ХМН ентитетима. Експресија ROS, нитротрозина и iNOS били су повећани у гранулоцитима већине болесника са ХМН. Експресија pS6K, ефектора mTOR киназе, позитивно је корелирала са повећаном активацијом АКТ/mTOR у гранулоцитима. У *in vitro* условима H₂O₂ је стимулисао активност mTOR и повећао експресију нитротрозина и iNOS у гранулоцитима болесника и здравих контрола. Гранулоцити болесника испољили су већу отпорност на цитотоксично деловање H₂O₂ у односу на здраве испитанике. Третман HEL ћелија H₂O₂ довео је до активације АКТ и mTOR киназе, док је дуготрајни третман са ААРН проузроковао пораст активности једино mTOR киназе. Инхибиција mTOR киназе рапамицином значајно је смањила број HEL ћелија у S фази ћелијског циклуса и допринела смањењу вијабилности HEL ћелија након примене H₂O₂.

Закључак: Анализа експресије оксидативних оштећења молекула и активности антиоксиданаса показала је постојање оксидативног стреса код ХМН. Код већине болесника промене су удружене са високим вредностима показатеља нитрозативног стреса и појачаном активношћу АКТ/mTOR сигналног пута. mTOR киназа испољила је различиту сензитивност на промене редокс стања код здравих и ХМН болесника и деловала је стимулативно на преживљавање и пролиферацију ћелија у условима оксидативног стреса.

Кључне речи: ХМН, ROS, RNS, mTOR

Научна област: медицина

Ужа научна област: хематологија

УДК број: 616.155-006:577(043.3)

The impact of reactive oxygen species on mTOR signaling activity in patients with myeloproliferative neoplasms

Summary

Introduction: A common characteristic of malignancies is an increase of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). In such circumstances macromolecules are damaged and the cell structure and function are disrupted. The oxidative DNA damage is considered to be the initial event in the development of carcinogenesis. ROS affects the function of hematopoietic stem cells, changes the cell cycle progression, accelerates aging and induces hematological malignancies. The *BCR/ABL* oncogene and *JAK2V617F* mutation induces the formation of ROS in hematopoietic stem cells that leads to genomic instability and DNA damage. In the myeloproliferative neoplasm (MPN) patients, *JAK2V617F* mutation and *BCR/ABL* oncogene are associated with the constitutive activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, which stimulates the growth and proliferation of cells. As ROS and RNS may affect the activity of mTOR, we have examined the parameters of antioxidant protection and oxidative damage of lipids and proteins in circulation as well as the AKT/mTOR signaling pathway activity in the MPN granulocytes and human erythroleukemia (HEL) cell line with *JAK2V617F* mutation.

Methods: The study includes 110 de novo MPN patients: 30 polycythemia vera (PV), 24 essential thrombocythemia (ET), 34 primary myelofibrosis (PMF) as well as 22 patients with the diagnosis of chronic myeloid leukemia (CML) and 10 healthy subjects. Markers of oxidative and nitrosative stress in plasma and erythrocyte lysates were determined by the colorimetric method. The intracellular production of ROS was determined by fluorogenic reagent H₂DCF-DA. The levels of nitrotyrosine, inducible NO synthase (iNOS) and the activation rate of AKT/mTOR/p70S6K kinases were determined in granulocytes of MPN patients using immunocytochemistry and immunoblotting methods. The influence of hydrogen peroxide (H₂O₂) and 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) oxidants on AKT/mTOR signal pathway, cell cycle and survival were tested by Western blot, FACS and MTT test in HEL cells.

Results: The activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were reduced in the erythrocytes of most MPN subtypes, while catalase activity was reduced only in patients with CML. Total antioxidant capacity in plasma and catalase activity in erythrocytes demonstrated the highest values in PMF. As indicators of oxidative damage of lipids and proteins, the malondialdehyde and protein carbonyl were elevated in plasma of MPN. The concentration of total nitrite and nitrate (NO_x) was increased in PMF compared to healthy subjects and other MPN entities. In addition, the ROS, nitrotyrosine and iNOS expression were increased in granulocytes of MPN. Expression of pS6K, effector of mTOR kinase, positively correlated with the increased AKT/mTOR activation in granulocytes of MPN. *In vitro*, H₂O₂ stimulated the activation of mTOR and increased the expression of nitrotyrosine and iNOS in MPN granulocytes. MPN granulocytes exhibited a greater resistance to cytotoxic H₂O₂ activity compared to healthy subjects. The treatment of HEL cells with H₂O₂ also caused the activation of AKT/mTOR signaling, while AAPH only increased the activity of mTOR kinase. The reduced viability of HEL cells by H₂O₂ was supported with mTOR inhibitor rapamycin. The mTOR inhibition significantly reduced the number of HEL cells in the S phase of cell cycle.

Conclusions: The expression of oxidation modified macromolecules and the activity of antioxidants demonstrated the presence of oxidative stress in MPN. Those changes were associated with the high levels of nitrosative stress markers and increased activity of AKT/mTOR signaling pathway. Although the mTOR kinase exhibited different sensitivity to the redox status in MPN, it stimulated cell proliferation and survival in oxidative stress conditions.

Key words: MPN, ROS, RNS, mTOR

Research area: medicine

Special topic: hematology

UDC number: 616.155-006:577(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Хроничне мијелопролиферативне неоплазме	1
1.1.1. ХМЛ, Ph ⁺ ХМН	3
1.1.2. Ph ⁻ ХМН.....	4
1.1.3. Сигнални путеви у ХМН	7
1.1.4. PI3K/AKT сигнални пут.....	8
1.1.5. mTOR сигнални пут	11
1.2. Оксидативни стрес	16
1.2.1. Реактивне врсте кисеоника	18
1.2.2. NO и реактивне врсте азота	19
1.2.3. Антиоксидативана заштита	21
1.2.4. Потенцијал p53 тумор супресора у редокс биологији	23
1.2.5. Оксидативна оштећења биомолекула.....	23
1.2.6. Оксидативни стрес у ХМН	26
2. ЦИЉЕВИ РАДА	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	30
3.1. Материјал	30
3.1.1. Избор болесника	30
3.1.2. Ћелијска линија	30
3.2. Методe	31
3.2.1. Обрада биолошког материјала болесника.....	31
3.2.2. FRAP тест	32
3.2.3. Одређивање концентрације хемоглобина	32
3.2.4. Одређивање активности каталазе у еритроцитима	33
3.2.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе у еритроцитима.....	33
3.2.6. Одређивање активности глутатион пероксидазе у еритроцитима	34
3.2.7. Одређивање активности глутатион редуктазе у еритроцитима.....	35
3.2.8. Одређивање концентрације малондиалдехида у плазми.....	36
3.2.9. Одређивање концентрације протеин карбонила у плазми	37
3.2.10. Одређивање концентрације нитрита и нитрата у плазми	38

3.2.11.	Тест редукције нитро тетразолиум плавог	39
3.2.12.	Детекција ROS у гранулоцитима	40
3.2.13.	Тест редукције тетразолијумске соли, МТТ	40
3.2.14.	Имуноцитохемијска метода.....	41
3.2.15.	Имунохистохемијска метода LSAB+/HRP	42
3.2.16.	Анализа експресије протеина	43
3.2.17.	Изолација ДНК и детекција JAK2V617F мутације	46
3.2.18.	Анализа ћелијског циклуса у <i>in vitro</i> условима применом проточне цитометрије	48
3.2.19.	Експериментални дизајн	49
3.2.20.	Статистичка анализа	50
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	51
4.1.	Резултати детекције JAK2V617F мутације код Ph-XMN болесника	51
4.2.	Активност система антиоксидативне заштите.....	51
4.2.1.	Активност каталазе у еритроцитима	51
4.2.2.	Активност супероксид дисмутазе у еритроцитима.....	52
4.2.3.	Активност глутатион пероксидазе у еритроцитима.....	53
4.2.4.	Активност глутатион редуктазе у еритроцитима.....	54
4.2.5.	Укупни антиоксидативни капацитет плазме, FRAP тест	55
4.2.6.	Антиоксидативна заштита	56
4.3.	Продукти оксидације липида и протеина.....	57
4.3.1.	Концентрација малондиалдехида у плазми	57
4.3.2.	Концентрација протеин карбонила у плазми.....	58
4.3.3.	Оксидативна оштећења липида и протеина у плазми.....	59
4.4.	Концентрација нитрита и нитрата у плазми	60
4.5.	NBT тест на гранулоцитима	62
4.6.	Одређивање ROS у гранулоцитима	63
4.7.	Експресија iNOS у гранулоцитима	64
4.8.	Експресија нитротирозина у гранулоцитима	66
4.9.	Експресија p53 у гранулоцитима	67
4.10.	Експресија АКТ и pAKT у гранулоцитима.....	68
4.11.	Експресија mTOR и pmTOR у гранулоцитима	72
4.12.	Експресија mTOR и pmTOR у костној сржи	75

4.13.	Експресија pS6K у гранулоцитима.....	77
4.14.	Активност mTOR у гранулоцитима након третмана водоник пероксидом и антиоксидансом.....	78
4.15.	Експресија iNOS у гранулоцитима након третмана водоник пероксидом и антиоксидансом.....	80
4.16.	Експресија нитротирозина у гранулоцитима након третмана водоник пероксидом и антиоксидансом.....	81
4.17.	МТТ тест са гранулоцитима после третмана.....	83
4.18.	МТТ тест са HEL ћелијама.....	84
4.19.	Утицај различитих третмана са H ₂ O ₂ на активност АКТ/mTOR сигналног пута код HEL ћелија.....	85
4.20.	Утицај континуираног третмана са ААРН на активност АКТ/mTOR сигналног пута код HEL ћелија.....	87
4.21.	Испитивање ћелијског циклуса HEL ћелија FACS методом.....	90
5.	ДИСКУСИЈА.....	92
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	115
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	117

1. УВОД

1.1. Хроничне мијелопролиферативне неоплазме

Хроничне мијелопролиферативне неоплазме представљају клоналне болести хематопоетских матичних ћелија (ХМЋ) које карактерише поремећај пролиферације једне или више мијелодних ћелијских линија (Saeidi K, 2016). Ћелије свих мијелоидних лоза могу припадати малигном клону: еритроидне ћелије, мегакариоцити, неутрофили и моноцити (Hermouet S и сар., 2015; Spivak JL, 2010; Vainchenker W и Kralovics R, 2017). Иницијални малигни догађај одвија се у плурипотентној ХМЋ, у лимфо-мијелоидним прогениторима, при чему фенотип ХМН осликава пролиферативну предност мијелоидне у односу на лимфоидну ћелијску лозу. Због тога ретко и углавном у тежим облицима болести и лимфоидне ћелије, углавном Б лимфоцити, НК (енгл. *Natural Killer*) ћелије и Т лимфоцити, могу припадати малигном клону (Hermouet S и сар., 2015; Delhommeau F, 2007; Vainchenker W и Kralovics R, 2017).

William Dameshek је 1951. године први употребио термин „мијелопролиферативни поремећаји“, на основу запажања да болести као што су полицитемија вера и мијелофиброза са мијелоидном метаплазијом (сада означена као примарна мијелофиброза) могу у основи представљати исти поремећај, проузрокован тада непознатим стимулусом у костној сржи, чија је последица повећана пролиферација прекурсора хематопоезе у костној сржи и повећана продукција зрелих ћелија крви (Dameshek W, 1951).

Термин „неоплазма“ је 2008. од стране Светске здравствене организације (СЗО) уведен у класификацији тумора хематопоетског и лимфоидног ткива да би се истакла клонска природа мијелопролиферативних болести (Rumi E и Cazzola M, 2017). Према критеријумима СЗО из 2016. у ХМН се убрајају: хронична мијелоидна леукемија (ХМЛ), полицитемија вера (ПВ), есенцијална тромбоцитемија (ЕТ), примарна мијелофиброза (ПМФ), хронична неутрофилна леукемија, хронична еозинофилна леукемија, и неklasификовани ХМН ентитети (Barbui T, 2018). Ћелијска трансформација код ХМЛ последица је настанка Филадельфија хромозома (енгл. *Philadelphia chromosome, Ph*), реципрочном хромозомском транслокацијом

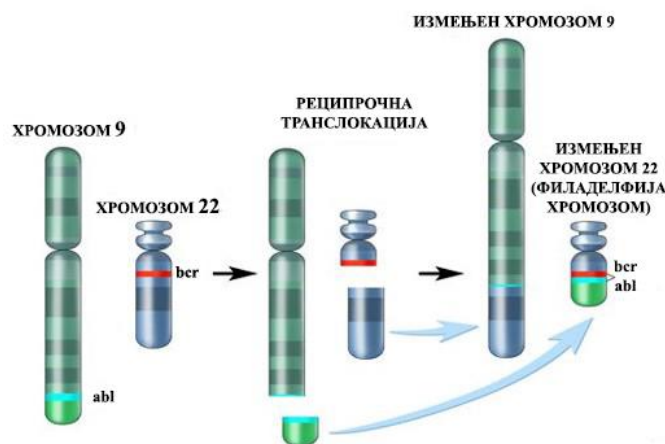
(9;22) када настаје *BCR-ABL* ген који кодира синтезу конститутивно активне цитоплазматске тирозин киназе. Фузија гена *BCR-ABL* је основни онкогени догађај у овој болести, и ово је једина ХМН која има јасно дефинисан, специфичан генски поремећај. Групи Филадельфија хромозом негативних (Ph⁻) ХМН припадају ПБ, ЕТ и ПМФ, чији се настанак доводи у везу са *JAK2/CALR/MPL* мутацијама. Остале ХМН су хетерогене и имају различите клиничке карактеристике и исход (Delhommeau F и сар., 2010; Barbui T, 2018).

Малигну природу ХМН карактерише моноклоналност, на супрот поликлонској природи нормалне хематопоезе/мијелопоезе (Spivak JL, 2010; Hermouet S и сар., 2015). Трансформисана плурипотентна ХМЋ има предност у преживљавању у односу на нормалне ХМЋ, тако да углавном прогенитори трансформисаних ћелија насељавају костну срж и затим као зреле ћелије доспевају у крв. Ниво клонске доминације варира код различитих подтипова ХМН. Тако су скоро све ћелије крви и костне сржи болесника са ХМЛ и ПМФ при постављању дијагнозе прогенитори малигног клона, док су код болесника са ЕТ и ПБ, уз доминацију малигног клона, присутне и ћелије пореклом од нормалних ХМЋ (Spivak JL, 2010). Од доминације малигног клона зависи и функција појединачних зрелих ћелија мијелоидне лозе која може бити мање или више поремећена што се одражава на патогенезу болести и компликације које се јављају (Hermouet S и сар., 2015).

ХМН спадају у ретке болести (инциденца је мања од 6/100.000 особа годишње) од које углавном оболевају старије особе. Иако болесници са ХМН генерално имају краћи животни век у односу на општу популацију, релативна стопа преживљавања је најмања код болесника са ПМФ (Rumi E и Cazzola M., 2017). Поред неконтролисане мијелопролиферације, као компликација ХМН јављају се тромбохеморагијски поремећаји, фиброза костне сржи, спленомегалија, хронична инфламација, поремећај функције имунског система, клонска еволуција са трансформацијом у акутну мијелоидну леукемију (АМЛ) и повећан ризик за развој секундарних канцера (Hasselbalch HC, 2013; Hasselbalch HC и сар., 2014; Hasselbalch HC и Вјортн МЕ 2015; Spivak JL, 2010). Основни циљ досадашњих терапеутских приступа је да се број ћелија у крви нормализује, спрече васкуларне компликације, да се нормализује морфологија костне сржи и смањи ризик за прогресију болести у ПМФ или АМЛ.

1.1.1. ХМЛ, Ph^+ ХМН

BCR-ABL химерни онкоген, који настаје реципрочном транслокацијом између хромозома 9 и 22, назван Филадельфија хромозом, доводи *c-ABL* ген под транскрипциону контролу *BCR* гена (слика 1).



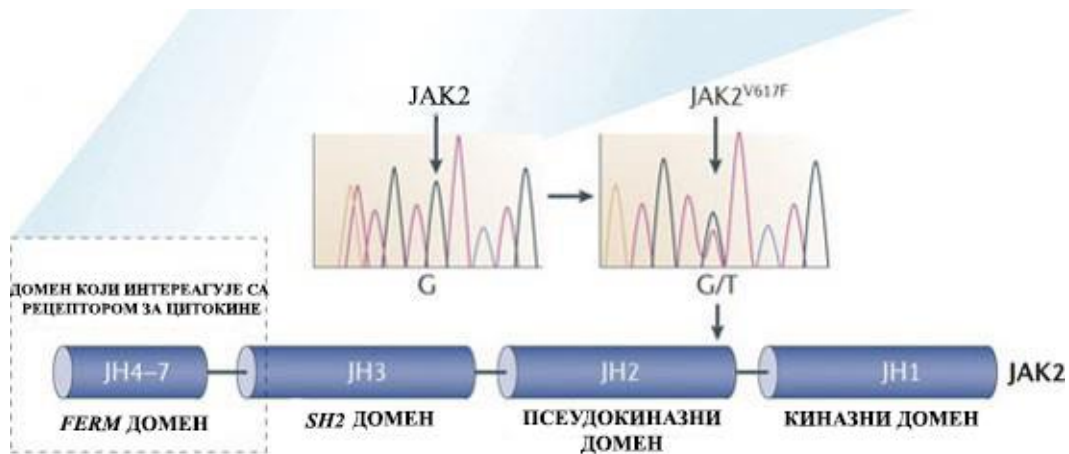
Слика 1. Шематски приказ настанка Филадельфија хромозома транслокацијом између хромозома 9 и 22. Преузето са www.cancer.gov и модификовано.

Транскрипцијом гена настаје конститутивно активна *BCR-ABL* тирозин киназа која има кључну улогу у патогенези ХМЛ. Киназа стимулише сигналне путеве независно од присуства фактора раста и мења одговор ћелије на оштећења ДНК што има за последицу геномску нестабилност и резистенцију на апоптозу и терапију (Кортуга М и сар., 2006). Прогресивна оштећења генетског материјала огледају се у клиничком току саме болести. Прва је хронична фаза са леукоцитозом и хиперпродукцијом неутрофила, у којој је Филадельфија хромозом једино генетско оштећење. Након неколико година хронична фаза се трансформише у фазу акцелерације са повећеним бројем бласта у костној сржи и периферној крви која у релативно кратком периоду (6-9 месеци) прелази у терминалну бластну кризу коју карактеришу многобројне генетске абнормалности (Van Etten RA и Shannon KM, 2004; Joregensen HG и Holyoake TI, 2007). Фузија гена *BCR-ABL* као основни онкогени догађај за последицу има активацију неколико сигналних путева: *STAT5*, *Ras*, *MAPK*, *PI3K*, *c-jun* и *c-myc* (Kindler T и сар., 2003; Huang M и сар., 2002). *STAT5* (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription factor 5*) је важан фактор леукемогенезе чија експресија и активација расту са прогресијом болести

(Warsch W и сар., 2012). Овај транскрипциони фактор позитивно регулише активност антиапоптоских гена (*BCL-2*, *BCL_{xl}*) повећавајући не само број мутација, него и толеранцију ћелија на њихово присуство. (Bourgeais J и сар., 2016). BCR-ABL киназа доводи до конститутивне активације PI3K/AKT сигналног пута тако што се везује за регулаторну подјединицу p85 PI3K (Skorski T и сар., 1997). JAK2 киназа, укључена у регулацију процеса нормалне хематопоезе, појачано је активирана у ћелијама периферне крви ХМЛ пацијената у бластној кризи.

1.1.2. *Ph⁻* ХМН

Ph⁻ ХМН карактерише еволуција болести, односно постојање тзв. биолошког или фенотипског континуума, од ЕТ као ране фазе, преко ПВ до ПМФ као узнапредовалог стадијума, са повећаним ризиком од леукемијске трансформације и развоја секундарних канцера (Hasselbalch HC и сар., 2014). ЕТ карактерише повећан број мегакариоцита у костној сржи, тромбоцитоза, повећана инциденца вазомоторних симптома и тромбохеморагијских компликација, и присуство *JAK2* (слика 2), *CALR* или *MPL* мутације (Rumi E и Cazzola M, 2016). ПВ карактерише еритроцитоза уз супримирану ендегену продукцију еритропоетина, панмијелога костне сржи (уз апсолутно повећање масе еритроцита повећан је и број леукоцита и тромбоцита, „*trilineage growth*“) и *JAK2V617F* мутација (Spivak JL, 2010; Bittencourt RI и сар., 2011; Rumi E и Cazzola M, 2016). Честа је појава спленомегалије, а ризик од артеријске и венске тромбозе је повећан. За ПМФ је карактеристична клонска мијелопролиферација са мегакариоцитном хиперплазијом, праћеном пролиферацијом фибробласта костне сржи која доводи до мијелофиброзе (ретикулинске и/или колагенске) и екстремедуларне хематопоезе, са израженом спленомегалијом и анемијом (Van Etten RA и Shannon KM, 2004; Bittencourt RI и сар., 2011) Присутна је *JAK2*, *CALR* или *MPL* мутација. У раној фази ПМФ (префибротичка ПМФ) постоји пролиферација гранулоцита и мегакариоцита без присуства ретикулинске фиброзе (Rumi E и Cazzola M, 2016). Код ПМФ су запажене и различите комбинације „цитоза“ и цитопенија (Rumi E и Cazzola M, 2016).



Слика 2. Шематски приказ структуре ЈАК2. Сви чланови ЈАК фамилије поседују 7 ЈН (ЈАК homology) домена који су организовани у 4 региона: ЈН1, који је каталитички (киназни) домен; ЈН2- каталитички неактиван (псеудо-киназни) домен; ЈН3 и ЈН4, који деле хомологију са SH2 доменом (Src-homology-2) и ЈН4-ЈН7, који чине FERM домен, одговоран за везивање ЈАК киназе за цитосолне домене цитокинских рецептора. Модификовано након преузимања из *Quintas-Cardama и сар., 2011; Nature Reviews Drug Discovery.*

Молекуларни маркери Ph^- ХМН

ПВ, ЕТ и ПМФ имају сличне биолошке карактеристике, што указује на њихово заједничко моноклонско порекло. Најзначајнија сличност је повећана осетљивост хематопоезних претходника на еритропоетин (ЕПО), што доводи до раста еритроидних прогенитора *in vitro* у одсуству цитокина. Овај процес се назива формирање ендогених еритроидних колонија и запажен је код 100% ПВ и око 30-50% болесника са ЕТ и ПМФ. Повећана сензитивност није ограничена само на ЕПО, већ укључује и друге цитокине, као што су интерлеукин 3, SCF (енгл. *Stem Cell Factor*), IGF-1 (енгл. *Insulin-like Growth Factor 1*), GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) и тромбопоетин (ТПО). Запажено је формирање и ендогених мегакариоцитних колонија у већини ХМН. То је указало да онкогени догађај који доводи до ХМН утиче на сигналне путеве хематопоезских цитокина, посебно ЕПО и ТПО (Delhommeau F и сар., 2010).

Молекуларна природа Ph^- ХМН није била позната све до 2005. године, када је неколико истраживачких група, употребом функционалних, генетичких и молекуларних приступа, истовремено идентификовало *JAK2V617F* мутацију као главни молекуларни догађај код већине Ph^- ХМН (James C и сар., 2005; Kralovics R

и сар., 2005; Levine RV и сар., 2005; Baxter EJ и сар., 2005). Соматска мутација *JAK2V617F* је присутна код више од 95% болесника са ПВ и 50-60% болесника са ЕТ и ПМФ (Skoda RC, 2015; Viny AD и Levine RL, 2014). JAK2 киназе (енгл. *Janus Activated kinase*) припадају JAK фамилији мембранских тирозин киназа (слика 2). Ови ензими се везују за интрацитоплазматске домене разних рецептора за цитокине преко FERM (енгл. 4.1 *protein, Ezrin Radixin Meosin*) домена, што доводи до даље нисходне ћелијске сигнализације преко сигналних путева PI3K/AKT, RAS и STAT (Delhommeau F и сар., 2010; Pandey R и Kapur R, 2015). JAK2 учествује у преношењу сигнала са различитих хематопоетских рецептора, укључујући рецепторе за ЕПО, ТПО, GM-CSF и G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) у хематопоетским ћелијама, као и сигнала са рецептора за интерлеукин 3 и рецептора са тирозин-киназном активношћу, какав је KIT (Delhommeau F и сар., 2010; Spivak JL, 2010). JAK2 се под нормалним условима активира након интеракције ових рецептора са одговарајућим лигандима. Међутим, соматска мутација у аутоинхибиторном региону *JAK2* гена у егзону 14 на 9. хромозому доводи до замене аминокиселине валин фенилаланином на позицији 617 (*JAK2V617F*) на протеинском нивоу (Vainchenker W и Kralovics R, 2017) што доводи до конститутивне активације сигналних путева у одсуству лиганда и повећане активности JAK2 киназе која регулише пролиферацију, диференцијацију и преживљавање ћелија (Spivak JL, 2010). Хомозиготност за *JAK2V617F* мутацију потиче од митотичке рекомбинације краћег крака хромозома 9, у око 30% болесника са ПВ или ПМФ. Хомозиготни прогенитори су изузетно ретки код ЕТ (Vannucchi AM и Guglielmelli P, 2008). Поред ове мутације у егзону 14 *JAK2* гена, код 2-3% болесника са PV је детектовано неколико различитих активирајућих мутација и у егзону 12 *JAK2* гена (Skoda RC, 2015).

Мутација у гену за калретикулин, *CALR*, детектована је код 20-35% ЕТ и ПМФ пацијената код којих нису присутне *JAK2* мутације. Ова мутација доводи до измене у протеинској секвенци калретикулина, што се одражава на његову локализацију и функцију у ендоплазматичном ретикулуму и учешће у метаболизму калцијума у ћелији. Иако механизам којим *CALR* мутација доводи до настанка ХМН још увек није познат, последица њеног настанка је повећана активност JAK2/STAT

сигналног пута у прогениторима и прекурсорима мегакариоцита и гранулоцита (Pandey R и Kapur R, 2015).

Соматска мутација у гену за ТПО рецептор, *MPL* (енгл. *Myeloproliferative Leukemia virus oncogene*), присутна је код 3-8% ЕТ и ПМФ пацијената. Замена аминокиселине триптофан на позицији 515 леуцином (*MPL-W515L*), лизинном или аргинином (*MPL-W515K/A*), доводи до губитка аутоинхибиторног ефекта рецептора који потиче од триптофана и конститутивне активације *MPL*. Ниво експресије *JAK2* и *MPL* протеина се повећава за време сазревања мегакариоцита и представља још један вид регулације мегакариопоезе (Delhommeau F и сар., 2010; Pasquier F и сар., 2014; Skoda RC, 2015).

JAK2/CALR/MPL мутације представљају секундарни догађај или „*driving*“ мутације, док је примарни генетски поремећај или „*founding*“ мутација код ХМН још увек непознат (Bjørn ME и Hasselbalch HC, 2015) Ове три мутације се међусобно искључују и конвергирају ка активацији *JAK/STAT* сигналног пута (Pandey R и Kapur R, 2015). Код око 10% ХМН пацијената који немају ни једну од *JAK2/CALR/MPL* мутација (енгл. „*triple negative*“) такође је показана повећана активност *JAK2/STAT* сигналног пута. Тако би се *Ph⁻* ХМН генерално могле посматрати као болести настале услед повећане активност *JAK2/STAT* сигналног пута (Skoda RC, 2015).

Поред *JAK2/CALR/MPL* мутација код ХМН се јављају и друге соматске мутације (*TET2*, *DNMT3a*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*) у епигенетским регулаторима, транскрипционим факторима или сигналним молекулима, које не делују директно на пролиферацију хематопоеетских ћелија и саме не могу изазвати ХМН фенотип. Неке од њих претходе а неке настају након „*driving*“ мутација, утичући на иницијацију или прогресију ХМН (Pasquier F и сар., 2014; Skoda RC, 2015; Pandey R и Kapur R, 2015).

1.1.3. Сигнални путеви у ХМН

JAK2V617F мутација код *Ph⁻* ХМН и *BCR-ABL* онкоген код *Ph⁺* ХМН доводе до конститутивне активације *JAK2/STAT5*, *ERK1/2*, *MAPK*, *PI-3K/AKT/mTOR* односно, *Ras*, *MAPK*, *c-jun* и *c-myc* нисходних сигналних путева. Ови сигнални

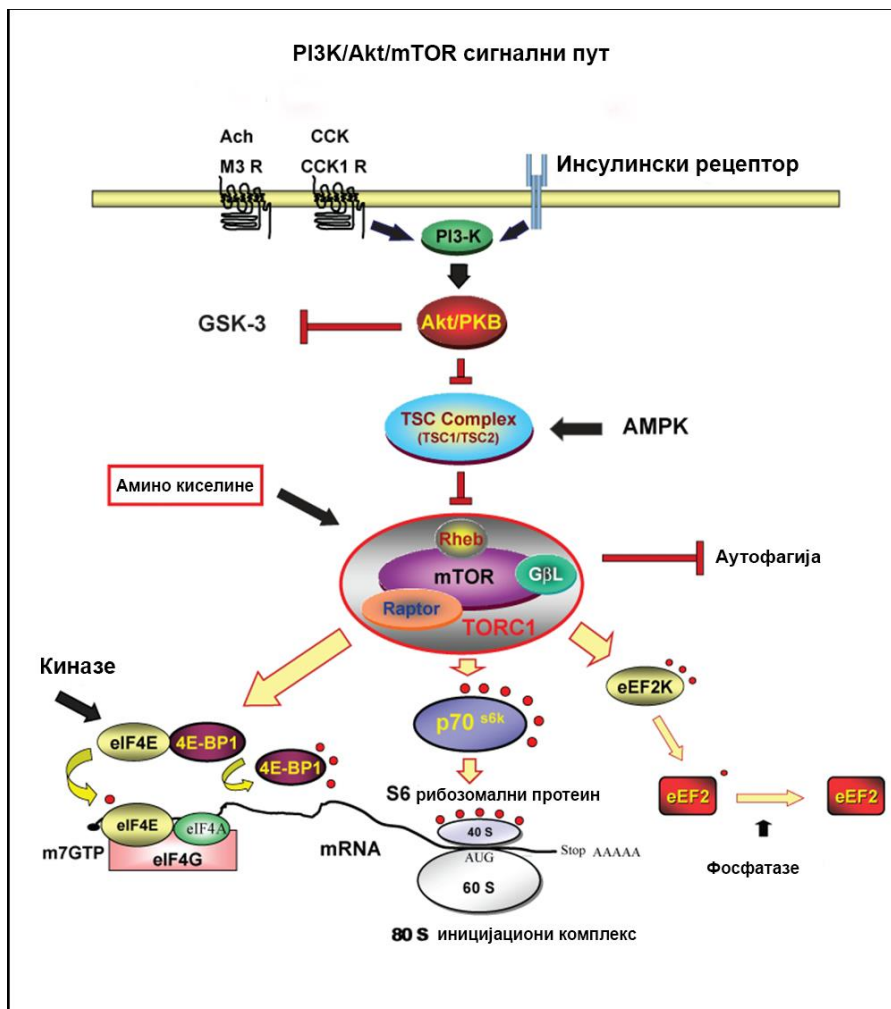
путеви важни за метаболизам, раст, пролиферацију, диференцијацију и преживљавање ћелија потенцијални су посредници у њиховој малигној трансформацији (Kindler T и сар., 2003, Huang M и сар., 2002Spivak JL 2010, Pandey R и Kapur R 2015).

1.1.4. PI3K/АКТ сигнални пут

Фосфатидилинозитол-3 киназе (енгл. *Phosphatidylinositol-3 kinases*, PI3K) су фамилија киназа које фосфорилишу 3' ОН групу инозитолног прстена у фосфолипидима. Постоје 3 класе PI3K, од којих је класа 1 најбоље изучена. Ову класу чине хетеродимери који се састоје из каталитичке, p110 и регулаторне, p85 подјединице. Она се даље дели на подкласу 1А коју активирају рецептори са тирозин киназном активношћу и подкласу 1Б коју активирају рецептори повезани са протеинима. До сада су откривене три изоформе каталитичке подјединице (алфа, бета и гама) и седам регулаторних подјединица. Адаптор подјединица PI3K интерагује са рецептором преко једног или два SH домена и долази до фосфорилације што условљава алостеричку активацију каталитичке подјединице. За неколико секунди настаје фосфатидил инозитол трифосфат, PI-3,4,5-P3 (Fresno Vara JA и сар., 2004).

Активација сигналног пута PI3K/АКТ значајна је за пролиферацију плазма ћелија, Т и Б лимфоцита. Конститутивна активација сигналног пута важна је за опстанак бласта код АМЛ и повезана је са лошијом прогнозом код ових болесника (Grandage VL и сар., 2005). Активација PI3K/АКТ пута позитивно утиче на пролиферацију и преживљавање ћелија са *bcr-abl* мутацијом (Janus A и сар., 2010). PI3K фосфорилише фосфоинозитиде на положају 3-ОН инозитолног прстена. Настали 3-фосфорилисани фосфолипиди везују PH (енгл. *plecstrin homology*) регион АКТ и PDK1 (енгл. *phosphoinositide dependent kinase 1*) што омогућава њихову транслокацију до плазма мембране, блиски контакт и фосфорилацију АКТ од стране ове киназе (слика 3). PTEN (енгл. *phosphatase and tensin homolog*) фосфатаза има супротни ефекат, а такође и значајну улогу у регулацији ембриогенезе и апоптозе. Она дефосфорилише PI3P на D3 позицији инозитолног прстена.

У одређеном броју канцера регистрована је амплификација и повећана експресија гена за p110 каталитичку субјединицу PI3K (Borlado LR и сар., 2000) као и амплификација гена за АКТ (Cheng JQ и сар., 1996). Овај сигнални пут има значајну улогу не само у развоју тумора већ и у њиховом одговору на антипролиферативну терапију. Блокада сигналног пута може бити значајни синергистички чинилац у деловању других хемотерапеутика. NFκB је транскрипциони фактор чија је појачана активност карактеристика многих малигнитета. У матичним ћелијама АМЛ блокада PI3K специфичним инхибитором (LY294002) смањује експресију овог транскрипционог фактора а повећава експресију p53 који уводи ћелије у стање мировања или у апоптозу (Grandage VL и сар., 2005).



Слика 3. Компоненте PI3K/AKT/mTOR сигналног пута. Модификовано након преузимања са www.pancreapedia.org, 2010.

АКТ је серин/треонин киназа која улази у састав многих сигналних путева. АКТ је први пут окарактерисана након изолације гена *akt1* и *akt2*, идентификованих као хумани хомолози *v-akt* онкогена, који доводи до развоја леукемије код мишева (Staal SP, 1987). Код сисара постоје три изоформе овог ензима (АКТ1-3) које су кодиране са три различита гена. Такође постоји разлика у релативној ткивној дистрибуцији ових изоформи: АКТ1 је најбројнија у већини ткива, АКТ2 доминира у ткивима осетљивим на инсулин, а АКТ3 има највећу експресију у мозгу и тестисима. Све изоформе на N-терминалном региону садрже РН домен који се састоји од око 100 аминокиселина и важан је за функцију киназе. У каталитичком домену налази се треонински остатак (Thr-308) чија је фосфорилација неопходна за активацију АКТ киназе. У хидрофобном С-терминалном домену смештен је други регулаторни остатак-серин (Ser-473) чија је фосфорилација важна за максималну активност киназе (Alessi DR и сар., 1996).

АКТ се преко свог РН домена везује за PI3P што омогућава његов транспорт до плазма мембране где се фосфорилише на два места и достиже своју пуну активност. Интракција између РН-домена у саставу АКТ и 3-фосфоиноситада доводи до конформационих промена и излагања два главна места фосфорилације. PDK1 која је конститутивно активна фосфорилише T308 и на тај начин стабилизује активациону петљу (Fresno Vara JA и сар., 2004). Повећана активност АКТ последица је директне активације или смањене инактивације киназе. Активација АКТ је онкогени феномен широко распрострањен у многим малигнитетима а може бити последица активирајуће мутације *PI3K* гена, *BCR-ABL* транслокације, амплификације самог гена за АКТ или делеције гена за PTEN фосфатазу (Guertin DA и Sabatini DM, 2005).

Akt кодирајући гени појачано се експримирају или су умножени код карцинома желуца, јајника, дојке, панкреаса и простате. Појачана експресија проонкогена *Akt* налази се код више од половине колоректалних карцинома. Код примарног карцинома дојке активација *Akt* повезана је са појачаном пролиферацијом тумора и лошијом прогнозом (Cicenas J и сар., 2005). Амплификација *Akt* гена показана је код карцинома дојке и оваријума и то нарочито код недиферентованих облика тумора што указује на везу између експресије онкогена и агресивности тумора (Bellacosa A и сар., 1995). Тумор супресорна

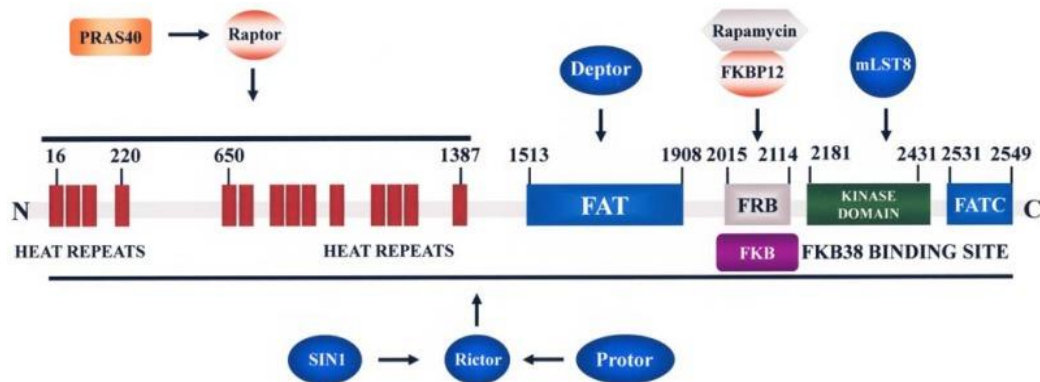
фосфатаза PTEN одговорна је за дефосфорилацију PI3P што се негативно одражава на активацију АКТ. Многи малигнитети код људи (карцином простате и едометријума, меланом и глиобластом) имају губитак функције ове фосфатазе услед делеције или инактивирајуће мутације гена што води хиперактивацији АКТ. Мутација *PTEN* гена једна је од најчешћих соматских мутација код канцера. Код глиобластома је заступљена чак 70%.

АКТ изазива онкогену трансформацију фибробласта пилића у култури активацијом mTOR сигналног пута. У трансформисаним ћелијама постоји конститутивна фосфорилација супстрата, S6K и 4E-BP1 (Aoki M и сар.,2001).

1.1.5. mTOR сигнални пут

mTOR (енгл. *Mammalian target of rapamycin*) је серин/треонин киназа, молекулске масе 280 kDa, која учествује у регулацији ћелијског раста и метаболизма. Налази се у саставу два различита мултипротеинска комплекса mTORC1 и mTORC2.

mTOR има 2549 аминокиселине и састоји се од различитих структурних домена. На аминокиселинском крају налази се неколико HEAT (енгл. *Huntingtin, elongation factor 3, the A subunit of protein phosphatase 2A, TOR1*) поновака који су важни за протеин-протеин интеракцију (слика 4). На карбокси-терминалном крају смештен је каталитички домен. У његовој близини налази се FRB (енгл. *FKBP-rapamycin binding*) домен за који се везује комплекс FKBP12 (енгл. *FK506- and rapamycin-binding protein*)-рапамицин. FKBP12 је интрацелуларни кофактор, пептидил-пролил *cis/trans* изомераза неопходна за инхибиторно деловање рапамицина (инхибитора mTOR киназе). На карбокси терминалној половини налазе се и два FAT (енгл. *FRAP-ataxia-teleangiectasia*) домена и то један поред FRB домена а други на самом карбокси-терминалном крају, FATC. Овај последњи домен есенцијалан је за киназну активност mTOR-а тако да промена на нивоу једне аминокиселине ремети функцију целог молекула (Peterson и сар., 2000).



Слика 4. Шематски приказ структуре mTOR (Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, McCubrey JA. *The Emerging Role of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Network in cancer Stem Cell Biology. Cancers* 2010; 2:1576-1596.)

Претпоставља се да FAT и FATC домени међусобно инетреагују и доводе до конформационих промена које омогућавају приступ каталитичком центру. Унутар FATC домена постоји дисулфидни мост између два цистеинска остатка (Dames SA и сар., 2005). Ово може бити објашњење редокс регулације активности mTOR-а јер редукција или оксидација ових веза може утицати на интеракцију FATC са другим доменима или протеинима унутар комплекса (Sarbasov DD и Sabatini DM, 2005). mTOR је у већини ћелија локализован у цитоплазми где се налази у блиском контакту са мембранама митохондрија, ендоплазматског ретикулума и Голџијевог апарата.

Важне компоненте mTORC1 поред mTOR су Raptor (енгл. *regulatory associated protein of mTOR, Rapamycin sensitive protein*), протеин од 149 kDa који стимулише функцију mTOR-а јер омогућава лакши приступ супстратима, PRAS40 (енгл. *proline-rich Akt substrate 40 kDa*) и mLST8 (енгл. *mammalian lethal with SEC13 protein 8, GbetaL*) субјединица која улази у састав оба комплекса. mTOR је кључни регулатор ћелијског раста и пролиферације. Активност mTORC1 неопходна је за преживљавање у раним стадијумима развоја, што је показано на ембрионима мишева којима недостаје mTOR, односно Raptor (Guertin DA и сар., 2006). Интеракција Raptor-а са mTOR-ом на многим контактним тачкама, као и места за смештај његових супстрата упућују на значај ове компоненте за активност комплекса. mLST8 се везује за каталитички регион mTOR-а и стабилизује његову интеракцију са Raptor-ом стимулишући киназну активност (Janus A и сар., 2005).

mLST8 се повећано експримира у неким карциномима где промовише раст тумора и повећава инвазивни потенцијал канцерских ћелија. Његов значај у одржавању стабилне структуре и појачаној активности комплекса (mTORC1/2) показан је једино код онкогено измењених ћелија. Стимулативно делује на активацију АКТ од стране mTORC2 и фосфорилацију 4E-BP1 од стране mTORC1 (Kakimoto и сар., 2015).

У састав mTORC2 поред mTOR-а улазе Rictor (енгл. *Rapamycin insensitive protein*), SIN1 (енгл. *SAPK-interacting protein*) и mLST8 неопходни за очување интегритета и активности комплекса. У недостатку ових субјединица изостаје фосфорилација АКТ и РКС (енгл. *protein kinase C*) неопходна за њихову пуну активност (Guertin DA и сар., 2006).

Активност mTORC1 регулисана је факторима раста и нутријентима, док је активност mTORC2 могуће регулисати једино факторима раста. mTORC2 директно фосфорилише и активира АКТ. Из овога се закључује да се међусобно деловање АКТ и mTOR-а одвија у оба смера.

Каква ће бити заступљеност ова два комплекса у ћелији зависи од доступности компоненти и њиховог међусобног афинитета. Најснажнија конкуренција постоји за mTOR тако да уградња молекула у један комплекс представља лимитирајући фактор за стварање другог комплекса. Такође, недостатак компоненти Rictor и SIN1 води повећаној активности mTORC1 (Jacinto E и сар., 2006).

Активност mTOR сигналног пута

У најважније регулаторе активности mTOR киназе спадају фактори раста, инсулин и нутритивни статус. Пролиферативни стимулуси спроводе се до mTOR-а преко PI3K/АКТ сигналног пута (Gingras AC и сар., 1998).

mTOR и Raptor формирају комплекс који је осетљив на нутритивно стање у ћелији тако да јачина њихове везе и активност mTOR-а зависе од доступности нутријената: стабилност комплекса је слабија што је количина нутријената већа. Већи степен mTOR-Raptor интеракције умањује киназну активност mTOR-а тако што доводи до конформационих промена каталитичког домена или спречава

интеракцију између супстрата и активног места киназе. Функција Raptor-а није само регулација ензимске активности већ и одржавање правилне структуре и стабилности mTOR молекула, одређивање субцелуларне локализације и допремање супстрата. Raptor има двојако деловање на активност mTOR-а па се сматра да њихова интеракција служи у координацији ћелијског раста и услова средине (Kim и сар., 2002).

У ћелијама сисара хетеродимер TSC1/TSC2 (енгл. *tuberous sclerosis complexes 1 and 2*) који се састоји од хамартина и туберина, интегрише многобројне екстрацелуларне и интрацелуларне сигнале и има водећу улогу у регулацији mTORC1. Његов недостатак води конститутивној активацији mTORC1. АКТ повећава активност mTORC1 инактивацијом хетеродимера TSC1/TSC2 директном фосфорилацијом TSC2 или фосфорилацијом и активацијом киназа које имају стимулаторни ефекат на TSC1/TSC2. Овај димер укључен је у регулацију mTOR активности у стању смањених енергетских резерви у ћелији. Хипоксија и АМПК (енгл. *AMP kinase*) посредним путем тј. активацијом TSC1/2 инхибирају mTORC1 (Reiling и Sabatini DM, 2006). Услед накупљања АМП (аденозин монофосфата) долази до активације АМП-зависне киназе која фосфорилише и активира TSC2 што за последицу има инхибицију mTORC1 (Inoki K и сар., 2003б). Познато је да АКТ има позитиван утицај на енергетски статус ћелије и доводи до повећања АТФ (аденозин трифосфата) и смањене активности АМП-киназе. Све скупа води повећаној активности mTORC1 (Hahn-Windgassen A и сар., 2005).

Још један молекул који инхибира mTORC1 независно од TSC1/TSC2 је PRAS40. АКТ фосфорилише PRAS40 на месту T246 омогућавајући везивање 14-3-3 протеина и последично одвајање од mTORC1 (Naar EV и сар., 2007)

mTORC1 има важну регулаторну улогу у процесу транслације информационе РНК (иРНК) и рибозомалној биогенези. Како оба процеса у великој мери зависе од енергетског потенцијала ћелија активност mTOR-а повезана је са одржањем енергетске хомеостазе у ћелији. Смањена количина АТФ у ћелији може директно утицати на пад активности mTORC1 (Dennis PB и сар., 2001).

Последњих година све већа пажња поклања се вези између метаболизма липида и транслације протеина. mTOR сигнални пут је у том смислу веома интересантан јер директно повезује регулацију оба процеса. Код Б-ћелијског

лимфома (енгл. *DLBL, diffuse large B-cell lymphoma*) инхибитори PI3K и FASN (енгл. *fatty acid synthase*) делују синергистички и успоравају раст тумора. Такође је примећена позитивна корелација између појачане експресије mTOR супстрата eIF4E (енгл. *suppressor of eukaryotic translation initiation factor 4E*) и FASN као и позитиван утицај синтазе масних киселина на стабилност транслационог фактора (Karadia B и сар., 2018).

Инхибиција mTOR-а зауставља ћелију у G1 фази ћелијског циклуса. Позитивно деловање mTOR-а на ћелијски раст односи се на иницијацију транслације иРНК, синтезу рибозома, експресију гена који регулишу метаболизам, аутофагију и реорганизацију цитоскелета (Gingras AC и сар., 2001).

Фосфорилацијом два кључна супстрата S6K1 (енгл. *ribosomal p70S6 kinase*) и 4E-BP1 (енгл. *eIF4E binding protein*), mTOR започиње процес транслације. Ослобађање eIF4E од фосфорилисаног 4E-BP омогућава формирање активног eIF4F комплекса који је неопходан за 5'капа-зависну транслацију иРНК. S6K може бити активирана и другим киназама као што су PDK1 или MAPK. Активирана S6K фосфорилише 40s рибозомалну подјединицу што за последицу има транслацију иРНК са 5-олигопиримидинским крајем. То се пре свега односи на иРНК која кодира рибозомалне протеине, елонгациони фактор и инсулину сличан фактор раста II.

Транслациони комплекс састоји се од eIF4E, eIF4G протеина и РНК хеликазе eIF4A и стимулише 5'капа-зависну транслацију протеина. eIF4E препознаје капа-крај на РНК. Везивање eIF4B подстиче хеликазе да уклоне секундарну структуру 5'-УТР иРНК, што је неопходно за регрутовање малих рибозомалних јединица. На овај начин eIF4 сигнални пут омогућава транслацију иРНК која кодира регулаторе ћелијског циклуса, као што је циклина D1 или орнитин декарбоксилаза, потребна за фосфорилацију протеина ретинобластома (pRB) или фактора раста (Guertin DA и Sabatini DM, 2007).

Улога S6K у туморогенези

Активност S6K у матичним ћелијама хематопоезе неопходна је за пролиферацију током нормалне хематопоезе али и за прогресију леукемогенезе

(Ghosh J и сар., 2016). S6K има антиапоптогско дејство јер фосфорилише тумор супресорни PDCD4 (енгл. *programmed cell death protein 4*) и чини га подложним за деградацију (Dorrello NV и сар., 2006). Многи протеини који учествују у регулацији ћелијске смрти подлежу посттранслационој модификацији која утиче на њихову конформацију, целуларну локализацију и активност. S6K деловањем на нивоу рибозома стимулише раст ћелија, а фосфорилацијом инактивира BAD промотер (енгл. *BCL2 associated death promoter*) који има проапоптогску функцију што се позитивно одражава на преживљавање ћелија (Harada H и сар., 2001).

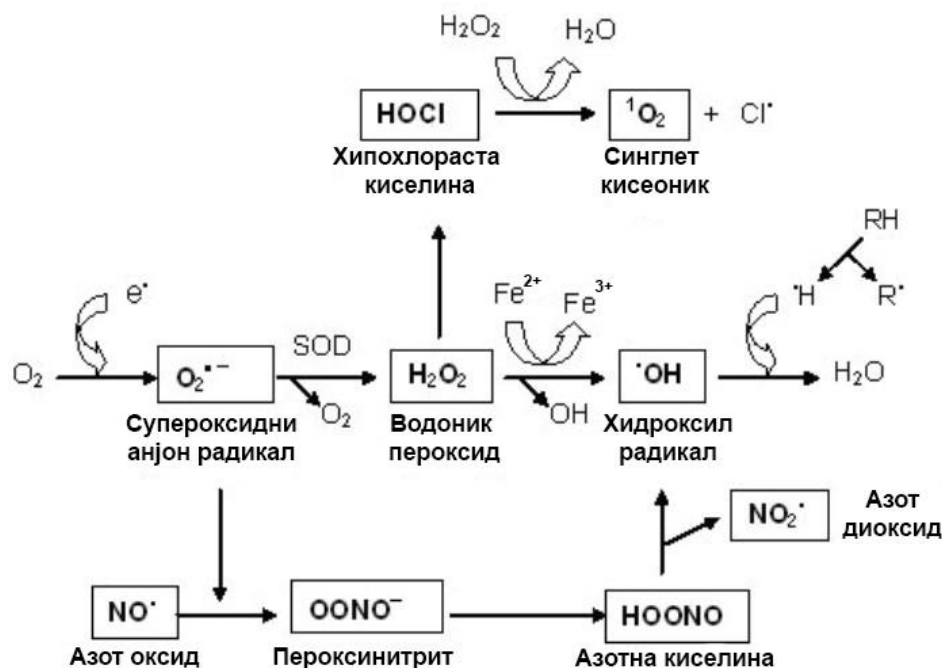
eIF4B је кључни протеин иницијалног комплекса транслације (енгл. *translational initiation complex, TIC*). FASN стимулативно делује на активност S6K која је одговорна за фосфорилишућу модификацију USP11 и преко ње на повећану стабилност eIF4B и онкогену транслацију (Karadia B и сар., 2018).

1.2. Оксидативни стрес

Оксидација је последица аеробног метаболизма еукариотских ћелија, услед чега су оне стално изложене реактивним врстама кисеоника, ROS (енгл. *Reactive oxygen species*). ROS настају непотпуном редукцијом кисеоника у физиолошким оксидоредукционим процесима, попут ланца транспорта електрона у митохондријама и током активности ензимских система као што су NADPH (енгл. *Nicotine adenine dinucleotide phosphate*) оксидазе (NOX), ксантин оксидоредуктазе, липоксигеназе и цикло-оксигеназе (Finkel T, 2003; Gloire G и сар., 2006; Sardina JL и сар., 2012). Истовремено, аеробне ћелије су развиле различите системе антиоксидативне заштите.

ROS се могу посматрати на два начина, у зависности од концентрације у којој су присутни. У нижим концентрацијама имају улогу сигналних молекула у бројним физиолошким процесима. Виши ниво ROS доводи до оксидативног стреса, који представља дисбаланс између прооксиданаса и система антиоксидативне заштите, што узрокује оштећења липида, протеина и дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) (Schieber M и Chandel NS, 2014). Поред дејства на макромолекуле, ниво ROS утиче и на сигналне путеве (активност протеин-киназа, фосфатаза, транскрипционих фактора), експресију гена, индукцију или инхибицију

пролиферације ћелија или ћелијске смрти. Биолошки одговор зависи од врсте ћелије и њеног антиоксидативног капацитета, али и од врсте ROS, редокс статуса саме ћелије и њеног окружења, времена излагања дејству ROS и њиховој концентрацији (Boonstra J и Post JA, 2004). У ROS се убрајају високо реактивни слободни радикали: супероксидни анјон ($O_2^{\cdot-}$), хидроксил радикал (OH^{\cdot}), пероксил радикал (ROO^{\cdot}), хидропероксил (HOO^{\cdot}), алкоксил радикал (RO), као и нерадикалске врсте, оксидујући агенси који лако могу да се конвертују у радикале, као што су водоник пероксид (H_2O_2), хипохлорна киселина ($HOCl$) и синглет кисеоник (1O_2). Активности ROS су испреплетане са активностима азот монооксида (NO) и других реактивних врста азота, RNS (енгл. *Reactive nitrogen species*), који су такође део физиолошких процеса у ћелији и испољавају двојак дејство у зависности од нивоа у коме су присутни (Espey MG и сар., 2002a,b; Gloire G и сар., 2006; Valko M и сар., 2007). У вишим концентрацијама NO реагује са кисеоником или супероксидним анјоном при чему настају нове реактивне врсте какав је пероксинитрит ($ONOO^-$) и друге RNS (слика 5), које могу да модификују шири опсег биомолекула у односу на сам NO (Ridnour LA и сар., 2004). У RNS се убрајају: азот оксид (NO), азот диоксид (NO_2), азот триоксид (N_2O_3), нитроксил (HNO), пероксинитрит и други (Cortese Krott MM и сар., 2017). Повишена концентрација RNS може да доведе до оксидативног или нитрозативног стреса и оштећења биомолекула, укључујући протеине, липиде и ДНК и да утиче на сигналне путеве и процесе у ћелијама (Fukumura D и сар., 2006; Yeo WS и сар., 2008). Да ли је стрес оксидативни или нитрозативни зависи од конкретне ROS/RNS интермедијарне форме као и од ћелијског окружења. Тако, пероксинитрит и азот диоксид радикал (NO_2^{\cdot}) доводе до оксидације супстрата, док се нитрозативни ефекти остварују дејством азот триоксида, N_2O_3 (Espey MG и сар., 2000; Ridnour LA и сар., 2004; Gloire G и сар., 2006; Wink DA и сар., 2011; Cortese Krott MM и сар., 2017).



Слика 5. Реактивне врсте и њихови метаболити (преузето и модификовано из Durackova Z. *Some current insights into oxidative stress. Physiol Res* 2010; 59:459-469.)

1.2.1. Реактивне врсте кисеоника

Супероксид анјон радикал, $O_2^{\bullet -}$, настаје редукцијом молекула кисеоника једним електроном, а главни извор његовог настанка је митохондријални транспорт електрона. Након настанка, овај радикал подлеже дисмутацији до H_2O_2 и O_2 , спонтано или дејством ензима супероксид дисмутазе (SOD). Још један извор овог радикала је NADPH оксидаза присутна у фагоцитима (NOX2). Изоензимске форме овог ензимског комплекса постоје и у другим ћелијама али продукују много мање супероксида који учествује у сигналним путевима. Супероксид анјон се сматра примарним ROS и може даље да реагује са другим молекулима када настају секундарни ROS или RNS, директно или у процесима које катализују ензими или метали. Овај радикал је укључен у патофизиологију разних болести, али не реагује директно са полипептидима, шећерима и нуклеинским киселинама, док је његов утицај на липиде контроверзан (Valko M и сар., 2006; Valko M и сар., 2007).

Хидроксил радикал, OH^\bullet , је неутрална форма хидроксилног јона. Овај радикал је најреактивнија хемијска врста у биолошким системима. Има кратак полуживот и

након формирања, *in vivo*, реагује у близини места свог настанка. Доводи до директних оштећења ДНК (оксидације и уклањања база, формирања ДНК-ДНК интраланчаних деривата, једноланчаних и дволанчаних прекида) и оксидације липида (Valko M и сар., 2006; Toyokuni S, 2016; Filomeni G и сар., 2015).

Водоник пероксид, H_2O_2 , настаје у пероксизомима, органелама које интензивно користе кисеоник у остваривању различитих метаболичких функција. Мада H_2O_2 није слободни радикал јер нема неспарене електроне, он лако прелази у реактивни хидроксил радикал (Boonstra J и Post JA, 2004). H_2O_2 је главна реактивна врста кисеоника у ћелијској сигнализацији због капацитета да инхибира тирозин-фосфатазе оксидацијом цистеинских аминокиселинских остатака у каталитичком домену ових ензима, што доводи до активације тирозин-киназа и нисходне сигнализације (Gloire G и сар., 2006). Од великог је значаја и чињеница да водоник пероксид може слободно да дифундује кроз ћелијске мембране и реагује са ћелијама у окружењу (Bjorn ME и Hasselbalch HC, 2015).

Стварање слободних радикала често подразумева учешће редокс-активних метала, као што је гвожђе/бакар (Fe^{2+}/Cu^+) редокс пар. У условима стреса, вишак супероксидног аниона *in vivo* доводи до ослобађања гвожђа из комплекса са другим молекулима. Ослобођено гвожђе тада може да реагује у тзв. Фентоновој реакцији са водоник пероксидом, када настаје високо реактивни хидроксил радикал (Valko M и сар., 2006, Griendling KK и сар., 2016, Toyokuni S, 2016).

1.2.2. NO и реактивне врсте азота

NO је слободни радикал који може да остварује своја дејства и као оксидант (донор електрона) и као редукутант (акцептор електрона). То је мали, релативно стабилан молекул, који дифундује кроз ћелијске мембране и реагујући са својим молекулским метама утиче на интра- и екстраћелијско окружење (Gross S и Wolin M, 1995). Као сигнални молекул, NO регулише бројне физиолошке и патофизиолошке процесе (Schmidt HH и Walter U, 1994). Многе активности NO су двојачке, и углавном зависе од нивоа у коме се ствара. У нижим, наномоларним концентрацијама, NO регулише процесе као што су контрола тонуса васкулатуре, функционисање неурона и регулација протеина који везују гвожђе. Већину

физиолошких ефеката NO остварује активацијом солубилне гуанилат циклазе у ћелијама, када настаје циклични гуанозинмонофосфат (сGMP) главни секундарни гласник NO (Burke AJ и сар., 2013). Пост-транслациона модификација протеина, углавном преко S-нитрозилације цистеин-тиол резидуа, је још један механизам NO сигнализације (Fukumura D и сар., 2006). У вишим, микромоларним концентрацијама, NO испољава индиректно дејство путем нитрозативних и оксидативних промена. Насупрот конвенционалним сигналним молекулима који своје деловање остварују везивањем за рецепторе, биолошка дејства NO заснивају се на широком опсегу хемијских реакција (Ridnour LA 2004; Gloire G и сар., 2006; Gross S и Wolin M, 1995; Loitto VM 2000; Burke AJ и сар., 2013). Повећана синтеза NO доприноси настанку разних патофизиолошких стања, укључујући хроничну инфламацију и канцер (Gross S и Wolin M, 1995). Показано је да, у зависности од типа, активности и локализације ензима који га синтетишу, концентрације у којој се ствара, времена излагања и осетљивости ћелија, NO може деловати позитивно или инхибиторно на прогресију тумора и стварање метастаза (Fukumura D, 2006). NO и NO метаболити, као што су нитрити, нитрати, S-нитрозотиоли, нитрозамини и пероксинитрит имају важну улогу у остваривању цитотоксичних и генотоксичних ефеката NO, као што су инхибиција митохондријалне респирације, оштећење и губитак функције протеина, оштећење ДНК које доводи до мутација, некроза и апоптоза (Fukumura D, 2006). Yoshioka и сарадници (2006.) су на ћелијској линији RAW264 показали да NO донори дозно зависно повећавају ниво и активност каталазе. NO у нижој концентрацији штити макрофаге од апоптозе изазване дејством H₂O₂ делујући на продукцију каталазе.

NO настаје синтезом од L-аргинина, NADPH и кисеоника деловањем три изоформе азот оксид синтазе (енгл. *Nitric Oxide Synthases*, NOS) у одговору на митогене и инфламаторне стимулусе (Fukumura D, 2006; Amin AR 2012). Неуронална (енгл. *neuronal NOS*, nNOS) и ендотелна (енгл. *endothelial NOS*, eNOS) NOS су конститутивно експримиране у ткивима и њихова активација зависи од повећања интрацелуларног калцијума. Конститутивне NOS синтетишу мање NO, у наномоларним концентрацијама, у краћем периоду. Индуцибилна азот-оксид синтаза (енгл. *inducible NOS*, iNOS) је изоформа NOS чија функција не зависи од нивоа интрацелуларног калцијума и има највећи капацитет за синтезу NO (Wink

DA и сар., 2011; Hill BG и сар., 2010). Активност iNOS може бити индукована разним стимулусима, као што су проинфламаторни цитокини, ендотоксини, оксидативни стрес (Zamora R и сар., 2000). iNOS је главна изоформа NOS која синтетише NO у високим, микромоларним концентрацијама, у дужем временском периоду, што је карактеристично за NO сигнализацију у инфламацији и код канцера (Lopez Rivera E и сар., 2014). Под одређеним условима, када је низак ниво ензимског супстрата, L-аргинина, NO-синтазе стварају супероксид анјон радикал, уместо NO, доприносећи оксидативном стресу (Luo S и сар., 2014).

1.2.3. Антиоксидативана заштита

Иако се ROS стварају за време нормалног аеробног метаболизма, биолошки ефекти које они остварују зависе од њихове концентрације. Повишен ниво ROS је цитотоксичан, док је нижи ниво неопходан за регулацију неколико кључних физиолошких процеса, укључујући диференцијацију ћелија, апоптозу, пролиферацију и регулацију редокс-сензитивних сигналних путева. Повећана концентрација ROS може да доведе до ћелијске смрти, мутација, хромозомских аберација и канцерогенезе. Ћелије су развиле разне системе антиоксидативне заштите како би спречиле штетне ефекте ROS и RNS или поправиле настала оштећења. Антиоксидативна заштита функционише на неколико нивоа и доводи до одлагања или инхибиције оксидације супстрата, уклањањем самих ROS или уклањањем јона метала који су катализатори у реакцијама ROS и RNS. Систем антиоксидативне заштите има ензимску и неензимску компоненту (Weydert C и CullenJJ, 2010).

Ензимске компоненте антиоксидативане заштите

Три главна антиоксидативна ензима у ћелијама сисара су супероксид дисмутаза (енгл. *superoxide dismutase*, SOD), каталаза (енгл. *catalase*, CAT) и глутатион пероксидаза (енгл. *glutathione peroxidase*, GPx). Постојање различитих форми ових ензима и њихова различита интрацелуларна и екстрацелуларна дистрибуција обезбеђују заштиту од потенцијалног оксидативног стреса (Weydert C и CullenJJ, 2010).

Супероксид дисмутаза је металоензим који катализује дисмутацију супероксидног анјона до водоник пероксида и молекуларног кисеоника. SOD је прва линија одбране од потенцијалне токсичности супероксидног анјона. Овај ензим такође учествује у ћелијској сигнализацији регулисањем нивоа ROS (супероксидног анјона и H_2O_2) и биорасположивости NO. Код сисара постоје три изоформе SOD: Cu,Zn-SOD (SOD 1), MnSOD (SOD 2) и EC-SOD (SOD 3) (енгл. *extracellular*, EC). Cu,Zn-SOD чини 90% укупне активности SOD у еукариотским ћелијама и налази се углавном у цитоплазми ћелије, док се мала фракција ензима може наћи у лизозомима, пероксизомима и једру. Састоји се од две субјединице, од којих свака у активном центру садржи јоне Cu и Zn. EC-SOD се налази у екстраћелијском простору, у ткивима многих органа, као што су плућа, срце и бубрези, у плазми, лимфи и цереброспиналној течности. MnSOD се налази у матриксу митохондрија, важна је у заштити од оксидативног стреса и има антитуморско дејство (Weydert C и Cullen JJ, 2010).

Каталаза је један од најактивнијих и најраспрострањенијих ензима у хуманој биохемији који ефикасно конвертује водоник пероксид у воду и кисеоник (Živić S и сар., 2008). Смештена је у пероксизомима свих ткива сисара (Urso ML и Clarkson PM, 2003). Каталаза смањује ниво експресије матриксних металопротеаза (базалних и оних која зависе од активности MnSOD) и таложење колагена (Weydert C и Cullen JJ, 2010). Пад капацитета различитих тумора за детоксификацију H_2O_2 у вези је са смањеним нивоом каталазе (Valko M и сар, 2006). С обзиром да је крајњи продукт активности SOD водоник пероксид, активности ензима SOD и каталазе су у спрези ради одржања редокс равнотеже.

Глутатион пероксидаза, заједно са CAT, учествује у уклањању водоник пероксида. CAT је ефикаснија од GPx у уклањању H_2O_2 када је он присутан у високим концентрацијама, док GPx уклања H_2O_2 када је његова концентрација ниска (Otašević V и сар., 2011). GPx редукује водоник пероксид до молекула воде, уз помоћ редукованог глутатиона (GSH) који притом прелази у оксидовани облик (GSSG). Овај ензим је селенопротеин и у свом активном центру уместо цистеина садржи селеноцистеин. GPx има пет изоензимских облика. За његову функцију је потребно неколико кофактора (редуковани глутатион, NADPH и глукозо-6-фосфат) и протеина. Тако, глутатион редуктаза (енгл. *glutathione reductase*, GR) и глукозо-

6-фосфат дехидрогеназа (енгл. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*, G-6-PD) не реагују директно са ROS већ омогућавају функцију GPx (Weydert C и Cullen JJ, 2010).

Неензимске компоненте антиоксидативане заштите

У неензимске компоненте антиоксидативане заштите убрајају се различити протеини и мали молекули, као што су: глутатион (GSH), витамин С, мокраћна киселина, албумин, трансферин, билирубин, витамин Е, витамин А, коензим Q. Ови молекули на различитим нивоима делују као снажни антиоксиданси и „чистачи“ слободних радикала (Valko M и сар., 2006).

1.2.4. Потенцијал p53 тумор супресора у редокс биологији

У хематолошким малигнитетима мутација p53 тумор супресорног гена удружена је са прогресијом болести, лошом прогнозом и резистенцијом на хемотерапију. Једно од тумор-супресорних деловања p53 је и регулисање анти-оксидативне заштите. Утицај на стварање ROS зависи од степена активности и субцелуларне локализације p53. Високе концентрације ROS и RNS могу повратно деловати на стабилност овог молекула мењајући његов редокс-статус (Maillet A и Pervaiz S, 2012), али и утичући на везивање за ДНК, с обзиром да се неколико цистеинских аминокиселинских остатака налази у централном домену p53 који је битан за ову интеракцију (Valko M и сар., 2007). Леукемијске ћелије *in vitro* као и оне пореклом од пацијената код којих постоји мутација p53 испољавају резистенцију на апоптозу. У HEL ћелијама утврђена је коегзистенција *JAK2V617F* и p53 мутације. Претпоставља се да *JAK2V617F* води леукемијској трансформацији ћелија у којима постоји губитак функције p53 (Zhao W и сар., 2012).

1.2.5. Оксидативна оштећења биомолекула

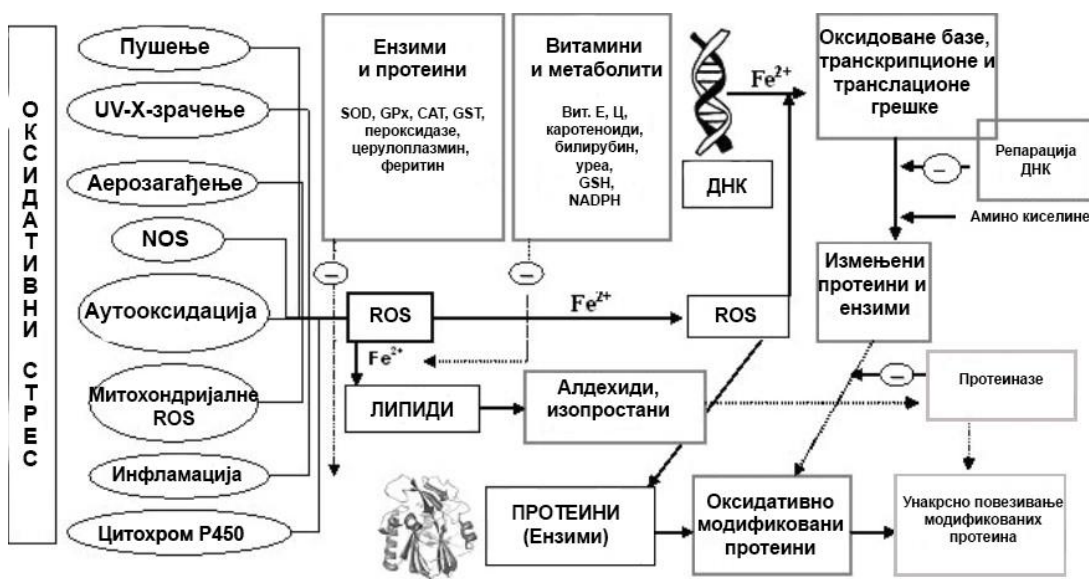
Оштећења ДНК. Сматра се да су хидроксил радикал и синглет кисеоник основни ROS који могу да оштете ДНК (Avery SV, 2011; Valko M и сар., 2007). Они реагују са свим компонентама ДНК молекула, оштећујући пуринске и пиримидинске базе као и дезоксирибозну спиралу. Сви прооксиданси од којих могу

да настану ове две реактивне врсте индиректно доприносе оштећењу ДНК (слика б). Гуанин је међу базама најподложнији оксидативном оштећењу, због свог ниског редокс потенцијала (Filomeni G и сар., 2015). Најизучаванија ДНК лезија која настаје услед оксидације гуанина је 7,8-дихидро-8-оксо деоксигуанозин (енгл. *7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine*, 8-ОН-dG). Овај и други оксо-деривати могу довести до тачкастих мутација ДНК. ROS такође проузрокују и дволанчане ДНК прекиде (енгл. *double strand breaks*, DSBs), који су у основи хромозомских аберација (Nieborowska-Skorska M и сар., 2012). Перманентна модификација генетичког материјала услед оксидативних оштећења представља први корак ка мутагенези, канцерогенези и старењу (Evans MD и сар., 2004; Valko M и сар., 2007). Постоји неколико репарационих механизма који поправљајући оштећења одржавају интегритет ДНК, али су они у ћелијама канцера најчешће нарушени (Bjørn ME и Hasselbalch HC, 2015; Saki M и Prakash A, 2017).

Оштећења протеина. Бочни ланци аминокиселинских остатака у протеинима, посебно цистеина и метионина, као и саме пептидне везе, подложни су оксидацији дејством ROS и RNS (слика 6). ROS могу деловати директно на протеине, или посредно модификацијом шећера и липида, када новонастали реактивни молекули доводе до оксидативних оштећења (Levine RL, 2002). Стварање карбонилних група је биомаркер оксидативних оштећења протеина, који у односу на друге маркере оксидативног стреса, као што је липидна пероксидација, има предност због своје стабилности (Dalle-Donne I и сар., 2003, Valko M и сар., 2007). Протеин карбонил (ПК) може настати на више начина: 1) директном оксидацијом бочних ланаца аминокиселина пролина, аргинина, лизина и треонина у протеинима; 2) оксидативним пресецањем протеина α -амидацијом или оксидацијом бочних ланаца глутамина; 3) дејством реактивних липидних алдехида; 4) дејством реактивних карбонилних деривата (кетоамина, кетоалдехида и деоксиозона) (Dalle-Donne I и сар., 2003). Карбонилација протеина која углавном доводи до губитка функције у неким случајевима може активирати сигналне путеве укључене у антиоксидативне процесе и регулацију ћелијске хомеостазе (Curtis JM и сар., 2012). Оксидативне модификације протеина јављају се током процеса

старења, али су важне и за етиологију и прогресију многих болести и поремећаја (Levine RL, 2002; Dalle-Donne I и сар., 2003).

Оштећења липида. Хидроксил радикал својим деловањем омогућава оксидацију полинезасићених масних киселина. Хемијска деградација оксидованих полинезасићених масних киселина доводи до формирања бројних реактивних липофилних молекула који лако дифундују кроз мембране (слика 6). Најпознатији молекули који тако настају су алдехиди: акролеин, 4-хидрокси-2-ноненал (енгл. *4-hydroxy-2-nonenal*, HNE), малондиалдехид (МДА), 4-оксо транс-2,3 ноненал (енгл. *4-oxo trans-2,3-nonenal*, 4-ONE). Уколико не дође до детоксификације ових молекула системима антиоксидативне заштите, настаје оштећења биомолекула. Показано је да 4-HNE и 4-ONE могу да модификују ДНК и РНК. Такође, 4-HNE, МДА и акролеин могу хемијски да алкилују цистеинске, хистидинске и лизинске аминокиселинске остатке у протеинима, у реакцији карбонилације протеина (Dalle-Donne I и сар., 2003; Curtis JM и сар., 2012).



Слика 6. Интеракција оксиданаса и антиоксиданаса у настанку оксидативног стреса. Модификовано након преузимања из *Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. Physiol Res 2010; 59:459-469.*

Утицај RNS на биомолекуле. NO и његови интермедијери такође могу да доведу до оштећења протеина, ДНК и липида (Fukumura D и сар., 2006, Filomeni G и сар., 2015). Сам NO инхибира липидну пероксидацију, али када је присутан у

већим концентрацијама реагује са кисеоником и настају интермедијери као што је $\text{NO}_2\cdot$ (азот диоксид радикал), који може да доведе до липидне пероксидације (Patel RP и сар., 1999). Важан биомаркер канцера праћених инфламацијом је 8-нитрогуанин који настаје деловањем пероксинитрита на ДНК (Burke AJ и сар., 2013). NO и пероксинитрит могу да доведу до посттранслационих модификација протеина, као што су нитрозилација и нитрација. S-нитрозилација је припајање азот монооксида тиолним бочним ланцима цистеина, важна посттранслациона модификација већине класа протеина. Преко ње NO остварује своје убиквитарно дејство на сигналну трансдукцију и учествује у физиолошкој редокс-регулацији (Hess DT и сар., 2005). Нитрација протеина на тирозину представља додавање нитро групе ($-\text{NO}_2$) тирозинским аминокиселинским остацима у протеинима, када настаје 3-нитротирозин (Radi R, 2004). То је посттранслациона модификација која утиче и на структуру и на функцију протеина. Представља трајну ковалентну промену протеина, која мења активацију ћелија, доводи до оксидативних оштећења и инфламације (Patel RP и сар., 1999; Mikkelsen RB и Wardman P, 2003; Lopez-Rivera E и сар., 2014; Ischiropoulos H, 2009).

1.2.6. Оксидативни стрес у ХМН

Ниво ROS у *JAK2V617F* позитивним ћелијама може бити повећан услед ослобађања проинфламаторних цитокина као што су $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$ и интерлеукини из гранулоцита, мегакариоцита и стромалних ћелија костне сржи или директним ослобађањем ROS из мегакариоцита и гранулоцита. Сигнали *JAK2V617F* и *BCR/ABL* киназа усмерени су ка *STAT5* транскрипционом фактору као важном ефектору канцерогеног деловања. Пораст интрацелуларних ROS услед појачане активације *STAT5* последица је смањене експресије *CAT* и глутаредоксина 1 у малигним ћелијама. Мутагено деловање ендогених ROS код ХМЛ болесника условљава развој резистенције на иматиниб (инхибитор *BCR/ABL* киназе), што често представља знак да болест прелази у следећу, узнапредовалу фазу (Bourgeais J и сар., 2017)

Стимулација *PI3K/AKT/mTOR* сигналног пута од стране онкогених киназа повећава количину ROS због смањене активности *CAT* у ћелијама које

експримирају *JAK2V617F* мутацију, односно појачане активности митохондријалног респираторног ланца у присуству *BCR/ABL* онкогена (Kim и сар., 2005). Повећан ниво ROS инхибицијом фосфатаза продужава активацију киназа и позитивним повратним утицајем појачава њихово стимулативно дејство. (Marty и сар., 2013).

За ХМН је карактеристична умерена хронична инфламација (Hasselbalch HC, 2013; Hasselbalch HC и Vjørn ME, 2015) коју карактерише стварање ROS, RNS и инфламаторних цитокина (Yeо WS и сар., 2008; Hermouet S и сар., 2015). Кључни ефектор у одржавању инфламаторног стања је малигни клон кога представљају ћелије мијелоидне лозе (Vjørn ME и Hasselbalch HC, 2015; Hermouet S и сар., 2015). Око 60% хематопоеетског капацитета нормалне костне сржи човека користи се за стварање гранулоцита (Cedergren J и сар., 2003). Код ХМН они су активирани (Cervantes F и сар., 2009; Hasselbalch HC, 2013; Hasselbalch HC и Vjørn ME, 2015), а њихов број је повећан. Гранулоцити и еритроцити су потенцијални извор реактивних врста кисеоника и азота, али и битан део антиоксидативне заштите.

Као ћелије урођеног имунитета, гранулоцити стварају разне антимицробне факторе, укључујући супероксид анјон и NO. Мада ROS и RNS у овим ћелијама превасходно имају антимицробну улогу омогућавајући ослобађање протеаза (Finkel T, 2003), они учествују и као сигнални молекули у преношењу физиолошких сигнала током пролиферације и диференцијације ћелија, експресије гена, апоптозе, инфламаторног и имунског одговора (Fialkow L и сар., 2007). NO регулише неколико функција гранулоцита, укључујући хемотаксу, адхезију, агрегацију, апоптозу и деструкцију бактеријских ћелија (Jyoti A и сар., 2014). У зависности од величине малигног клона, овај мијелоидни део имунског и инфламаторног одговора може бити парцијално или доминантно измењен (Hermouet S и сар., 2015). Активација неутрофила помоћу GM-CSF или TNF- α може имати важну улогу у модулацији њихових адхезивних и секреторних активности и утицати на преживљавање ових краткоживећих ћелија одлагањем конститутивне апоптозе (Chilvers ER и сар., 2000). Као главни извор ROS у гранулоцитима, мембрански ензимски комплекс NOX, након стимулације ствара велике количине ROS које се за време нерегулисане инфламације, под патолошким условима, ослобађају у екстраћелијско окружење и оштећују околна ткива (Fialkow и сар., 2007). NO у

гранулоцитима може настати активношћу све три изоформе NOS (Greenberg SS и сар., 1998; Fialkow и сар., 2007; Cedergren J и сар., 2003; Jyoti A и сар., 2014), али се по свом значају издваја iNOS која је конститутивно експримирана код ових ћелија (Cedergren J и сар., 2003; Jyoti A и сар., 2014). Патогени потенцијал малигно измењених гранулоцита је велики, с обзиром да они већ поседују неке карактеристике малигнућелија: конститутивна експресија iNOS (Cedergren J и сар., 2003; Jyoti A и сар., 2014; Lopez-Rivera E, 2014; Fukumura D и сар., 2006); нарушени механизми репарације ДНК (Sallmyr A и сар., 2004, Kagoya Y и сар., 2014; Henriksson G и сар., 2004; Vjørn ME и Hasselbalch HC, 2015); продукција два главна прекурсора свих ROS и RNS, супероксидног анјона и NO (Fialkow L и сар., 2007, Imbesi S и сар., 2013). Поред гранулоцита и мегакариоцити могу бити извор ROS (Marty C и сар., 2013).

Еритроцити су ћелије специјализоване за транспорт и размену гасова (O_2 , CO_2 и NO) у живим организмима. Они су опремљени изузетно ефикасним системом ензимске и неензимске антиоксидативне заштите и делују као покретни „чистачи“ слободних радикала обезбеђујући антиоксидативну заштиту другим ткивима и органима (Siems WG и сар., 2000; Pandey KB и Rizvi SI, 2011). Еритроцити преузимају ROS које ослобађају неутрофили, макрофаги и ендотелне ћелије и неутралишу их цитосолним антиоксидативним системом (Mohanty JG и сар., 2014). Протеом ових ћелија измењен је у ХМН (Socoro-Yuste N и сар., 2016). Код болесника са ПВ њихов број је прекомерно повећан. Еритроцити због своје специфичне функције могу бити извор ROS (Mohanty JG и сар., 2014), важни су у метаболизму NO (van der Vliet A и сар., 1997; Moshage N и сар., 1995; Tsikas D, 2007; Khadem-Ansari MH и сар., 2017; Griendling KK и сар., 2016), али и потенцијални извор гвожђа који у слободном облику као редокс активни метал учествује у стварању слободних радикала (Valko M и сар., 2006; Griendling KK и сар., 2016). У организму не постоји пут за активну екскрецију гвожђа. Запажено је да флеботомија значајно смањује ризик од појаве канцера (Toyokuni S, 2016).

2. ЦИЉЕВИ РАДА

Последица мутација карактеристичних за ХМН је активација сигналних путева који су важни за метаболизам, раст, пролиферацију, диференцијацију и преживљавање ћелија. Један од тих путева је mTOR који, интегришући неколико других сигналних путева, представља централни регулатор битних ћелијских функција. Полазећи од чињенице да код болесника са хроничним мијелопролиферативним неоплазмама постоји поремећај оксидативног статуса и антиоксидативне заштите, а да на активност mTOR могу утицати реактивне врсте и кисеоника и азота, постављени су следећи циљеви:

1. одредити активности ензима антиоксидативне заштите (SOD, CAT, GPx, GR), одредити концентрацију нитрита и нитрата и продуката оксидације липида и протеина у периферној крви пацијената и одговарајућих контрола;
2. одредити експресију iNOS, нитротирозина, p53, фосфорилисане и нефосфорилисане форме АКТ и mTOR киназа у гранулоцитима;
3. испитати *in vitro* утицај различитих концентрација ROS на пролиферацију, ћелијски циклус и активност АКТ/mTOR сигналног пута еритролеукемијских HEL92.1.7. ћелија као и на активност mTOR сигналног пута, експресију iNOS и нитротирозина у гранулоцитима болесника са ХМН.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал

3.1.1. Избор болесника

Студија пресека спроведена је у сарадњи са Клиником за хематологију, Клиничког центра Србије. Након добијања сагласности Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду 88 дијагностикованих, претходно нелечених пацијената ове установе са дијагнозом Ph⁻негативне ХМН (30 са ПВ, 24 са ЕТ и 34 са ПМФ), као и 22 пацијената са дијагнозом ХМЛ укључени су у испитивање. Просечна старост пацијената била је 61 година (однос полова: 59 мушкараца и 51 жена). Дијагноза ХМН постављена је на основу критеријума светске здравствене организације за туморе лимфног и хематопоезног ткива из 2008. године. Дијагностика ових болесника обухватила је анализу крвне слике са леукоцитарном формулом, биохемијског статуса, волумена еритроцита, анализу мијелограма, кариотипа, *in vitro* културу претходника хематопоезе и патохистолошку анализу биоптата костне сржи. Контролну групу представљало је 10 испитаника са нормалним налазом хематолошких параметара у крвној слици. Биолошки материјал прикупљен је уз писмену сагласност испитаника, а након њиховог информисања о сврси прикупљања материјала. Испитивања су спроведена у складу са препорукама Конвенције о биомедицинским истраживањима из Хелсинкија (*World Medical Association Declaration of Helsinki, 1996*).

3.1.2. Ћелијска линија

У *in vitro* испитивању коришћена је хумана HEL 92.1.7. ћелијска линија. То је еритролеукемијска ћелијска линија која спонтано диференцира у еритробласте (Martin и сар., 1982) и поседује *JAK2V617F* мутацију у хомозиготном стању. Гајена је у RPMI-1640 медијуму за култивацију (*Biowest, Nuaille, France*) са додатком 10% феталног говеђег серума (*FBS, Fetal Bovine Serum, Biowest, Nuaille, France*) и 1% *PENSTREP* 100 U/ml пеницилин/ 100mg/ml стрептомицина, *Biowest, Nuaille, France*) на температури од 37°C, у атмосфери са 5% CO₂ и 100% влажности.

3.2. Методе

3.2.1. Обрада биолошког материјала болесника

Венска крв болесника и здравих контрола (10-30 ml) је сакупљана у епруветама са K₂EDTA антикоагулантом и центрифугирана на 2000 rpm ради издвајања плазме. Аликвоти плазме чувани су на -20°C до даље анализе. Део еритроцита је издвојен, испран три пута са физиолошким раствором и затим разблажен истим раствором у односу 1:1. Еритроцити су чувани на -70 °C до анализе ензима.

Остатак крви разблажен је фосфатним пуфером (PBS-a, pH=7.2, без Ca²⁺ и Mg²⁺) са додатком 2mM EDTA у запремини 1:1,2. Након тога 35 ml разблажене крви наношено је на 15 ml лимфопрепа, градијент густине 1,077 g/l (*LSM, Lymphocyte Separation Medium, Capricorn Scientific, GmbH, Germany*) и центрифугирано 30 минута на 1400 rpm, 20°C. Горњи слој плазме са тромбоцитима је пажљиво аспириран као и слој моноклеарних ћелија у интерфази. Да би се добила фракција са гранулоцитима, еритроцити су лизирани помоћу раствора за лизу еритроцита (0,15M NH₄Cl, 0,1 mM EDTA, 12 mM NaHCO₃) или хипотоним деловањем хладне дестиловане воде на +4°C. Након центрифугирања 2 минута на 1000 rpm, 20°C, издвојени гранулоцити испрани су два пута у фосфатном пуферу, pH 7,4. Број и вијабилност ћелија одређивана је бојењем са 0.4% раствором Трипан плавог (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

За детекцију протеина у гранулоцитима, вршено је њихово обележавање на цитоспин препаратима. У ту сврху 2,4x10⁶ ћелија је растварано у 6 ml DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Biowest, Nuaille, France*). Обележене плочице су затим стављане испод блока са по два цилиндрична отвора и у сваки је сипано 0,5 ml ћелијске суспензије. Блокови су потом центрифугирани на 1000 обртаја, 5 минута (20°C). Плочице са залепљеним ћелијама сушене су 20 минута на собној температури, а потом су фиксиране ацетоном. Препарати су чувани на - 20 °C до даље анализе.

3.2.2. FRAP тест

Тотални антиоксидативни капацитет плазме одређиван је мерењем редукционе моћи плазме FRAP (енгл. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) методом, која се заснива на редукцији жутог фери-трипиридилтриазин комплекса (Fe(III)-TPTZ) у плаво обојени фери комплекс (Fe(II)-TPTZ), при ниским рН (3,6) вредностима (Benzie и Strain., 1996). FRAP реагенс се састоји из:

-300 mM ацетатног пуфера, рН 3,6 ;

-10 mM 2, 4, 6- три [2-пиридил]-s-триазина раствореног (ТПТЗ) у 40 mM HCl и

-20 mM воденог раствора гвожђе хлорида, FeCl₃ x 6H₂O.

Реакција почиње мешањем плазме и реагенса.

100 μ l узорка + 300 μ l H₂O + 3 ml FRAP реагенса

Слепа проба: 400 μ l H₂O + 3 ml FRAP реагенса

Апсорбанца је очитана на спектрофотометру (*Ultrospec 3300, Biochrom Ltd, Cambridge, UK*), на 593 nm након инкубације од 6 минута на 37 °C.

$$A = A_{\text{узорка}} - A_{\text{слепа проба}}$$

За конструкцију стандардне криве коришћени су раствори гвожђе сулфата, FeSO₄ познате концентрације који настају серијом разблажења. Вредност апсорбанце линеарно је пропорционална концентрацији антиоксиданаса у раствору.

100 μ l стандардног раствора + 300 μ l H₂O + 3 ml FRAP реагенса

Слепа проба: 400 μ l H₂O + 3 ml FRAP реагенса

$$A = A_{\text{стандарда}} - A_{\text{слепа проба}}$$

FRAP вредности израчунате су помоћу регресионих једначина и изражене су као μ mol Fe (II)/l плазме.

3.2.3. Одређивање концентрације хемоглобина

Концентрација хемоглобина у лизатима еритроцита одређивана је помоћу Драпкиновог реагенса у чији састав улазе калијум ферицијанид (K₃Fe(CN)₆), калијум цијанид (KCN) и калијум дихидроген фосфат (KH₂PO₄). Хемоглобин се оксидује у реакцији са калијум ферицијанидом у метхемоглобин који се затим

помоћу калијум цијанида преводи у стабилни цијанметхемоглобин. Апсорбанца овог једињења мери се спектрофотометријски, на таласној дужини од 540 nm (van Assendelft OW и сар., 1984).

$$\text{Hb(g/l)} = A_{540} \times 1,465 \times \text{разблажење узорка}$$

3.2.4. Одређивање активности каталазе у еритроцитима

Активност ензима САТ у лизатима еритроцита одређивана је по методи Аеби и сарадника (1984). Реакциону смешу чине 50 mM натријум фосфатни пуфер, рН 7, лизат еритроцита и 30% H₂O₂ који се додаје непосредно пред мерење. Спектрофотометријски током три минута (у интервалима од по 30 секунди) мерили смо пад апсорбанце H₂O₂ услед његове разградње каталазом из узорка. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 240 nm (*Ultrospec 3300, Biochrom Ltd, Cambridge, UK*). Активност је изражена као број интернационалних јединица по граму хемоглобина, IU/gHb.

$$((\Delta A/\text{мин.})/a) \times R \times 1/\text{CHb}_{(g/l)} \times 1000 = \text{U/gHb}$$

a – апсорбанца за H₂O₂ (43,6)

R – разблажење узорка

3.2.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе у еритроцитима

Лизати еритроцита се претходно подвргавају дејству апсолутног етанола и хлороформа у односу 62,5:37,5 како би се уклонио хемоглобин. Након центрифугирања 5 минута на 7000 грм, за даљу анализу је коришћен супернатант.

У реакцији је праћено смањење брзине аутооксидације епинефрина у присуству ензима. SOD уклања супероксидни анјон радикал неопходан за оксидацију. Процент инхибиције представља меру каталитичке активности ензима и сразмеран је промени апсорбанце на 480 nm, која је праћена спектрофотометријски (*Ultrospec 3300, Biochrom Ltd, Cambridge, UK*) (Misra HP и Fridovich I, 1972).

Потребни реагенси:

1. 0,05 M карбонатни пуфер (NaHCO₃/ CO₃), 1mM EDTA, рН 10,25

2. 0,01 M епинефрин у 0,02 M HCl

Референтну вредност представља пораст апсорбанце на 480 nm као последица аутооксидације у одсуству ензима.

Контрола: пуфер + епинефрин.

Узорак: пуфер + супернатант + епинефрин.

$$\text{SOD (U/gHb)} = 2(\Delta K - \Delta A) \times R / V \times C_{\text{Hb}} \times \Delta K$$

ΔK – промена апсорбанце контролне реакције у минути

ΔA – промена апсорбанце реакције са узорком у минути

V – запремина узорка

C_{Hb} – количина хемоглобина

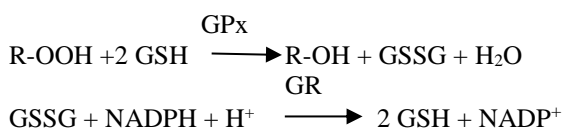
R – разблажење

Јединица SOD активности изражава се на грам хемоглобина и предстаља количину ензима која узрокује 50% инхибиције брзине аутооксидације епинефрина у линеарном делу пораста апсорбанце.

3.2.6. Одређивање активности глутатион пероксидазе у еритроцитима

Разградњом пероксида настају слободни радикали који реагују са ћелијским макромолекулима, нарочито липидима мењајући њихову структуру и функцију доводећи до оштећења. Глутатион пероксидаза је ензим који делује протективно тако што редукује високо реактивне пероксиде до слабо реактивних (стабилних) алкохола. У овој реакцији као редукујући реагенс служи ћелијски глутатион.

Никотинамид динуклеотид фосфат (NADPH) у присуству GR преводи оксидовану форму глутатиона (GSSG) у редуковану (GSH) која је поново активна и том приликом се сам оксидује. За одређивање активности глутатион пероксидазе користи се индиректна метода којом се прати пад апсорбанце NADPH на 340 nm услед његове оксидације (Tamura T и сар., 1996).



Реагенси потребни за ову реакцију су:

фосфатни пуфер, KH_2PO_4 (Ph 7)

1. редуковани глутатион, GSH (50 mM)
2. NADPH (3mM)
3. глутатион редуктаза, GR (0,33 U/ml)
4. терц-бутил-хидропероксид, ТВН

Узорак: Драпкинов реагенс + суспензија еритроцита

Сви реагенси су претходно загрејани до собне температуре. Реакција започиње додавањем терц-бутилхидропероксида у реакциону смешу. Пад апсорбанце очитаван је на спектрофотометру, на сваких 30 секунди, у трајању од три минута (*Ultrospec 3300, Biochrom Ltd, Cambridge, UK*). Као слепа проба користи се реакциона смеша без узорка.

Активност пероксидазе израчунава се помоћу формуле:

$$U/Hb = (A_{340}/\min_{(слепа\ проба)} - A_{340}/\min_{(узорак)}) \times DF/6,22 \times C_{Hb} \times V$$

A_{340}/\min – промена апсорбанце слепе пробе и узорка у минуту;

DF – фактор разблажења узорка

V – запремина узорка у 1 ml

3.2.7. Одређивање активности глутатион редуктазе у еритроцитима

Глутатион редуктаза је ензим који катализује редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) у редуковану форму (GSH). Адекватана количина редукованог глутатиона у ћелији неопходна је за оптималну активност других ензима – глутатион пероксидаза и глутатион трансфераза, као и за заштиту од оксидативног стреса. У реакцији редукције користи се NADPH као директни донор водоника:



Спектрофотометријском методом (*Ultrospec 3300, Biochrom Ltd, Cambridge, UK*) одређивања активности ензима прати се пад апсорбанце NADPH на 340 nm (Glatzle D и сар., 1974). Реагенси потребни за ову реакцију су:

1. 100 mM К-фосфатни пуфер, 1 mM EDTA, pH 7,5;
2. дилуциони пуфер (100 mM фосфат pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mg/ ml BSA)
3. 2 mM NADPH
4. 2 mM оксидовани глутатуин (GSSG)

Лизати еритроцита су разблажени у дилуционом пуферу непосредно пре анализе. Реакција почиње додавањем NADPH, на собној температури.

	Слепа проба	Узорак
2 mM GSSG	500 μ l	500 μ l
пуфер	450 μ l	400 μ l
узорак	/	50 μ l
2 mM NADPH	50 μ l	50 μ l

Израчунавање:

$$U/gHb = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{blank}) \times R / \epsilon \times C_{Hb} \times V \text{ (y ml)} \quad \epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3.2.8. Одређивање концентрације малондиалдехида у плазми

Малондиалдехид одређиван је коришћењем тиобарбитурне киселине, ТВА. У киселој средини и на високој температури МДА и ТВА граде коњуговану обојену супстанцу у којој је однос МДА:ТВА = 1:2. Концентрација МДА у корелацији је са интезитетом боје (Baskić D и сар., 2005).

Потребни реагенси су:

-28% трихлорсирћетна киселина, ТСА

-тиобарбитурна киселина, ТВА

-0,05М натријум хидроксид, 0,05М NaOH

За екстракцију липидних пероксида користи се 28% трихлорсирћетна киселина.

300 μ l плазме + 100 μ l 28% ТСА

Узорци су 30 минута инкубирани на леду, у фрижидеру, вортексовани 10 минута и инкубирани на -20°C, 5 минута. Након одлеђивања, узорци су центрифугирани 4 минута на 15 000 rpm, +4°C. Бистри, горњи слој пребачен је у нове епендорфице и у сваку је додат 1%ТВА у 0,05 М NaOH у односу:

супернатант : ТВА = 4 : 1.

Следила је инкубација на 100°C у воденом купатилу у трајању од 1 сата. Након тога епендорфице су охлађене на леду. Садржај је пребачен у микроплоче и апсорбанца је прочитана на ELISA читачу, на 540 nm (RT-6100, Rayto, Shenzhen, China).

Концентрација је одређена коришћењем стандарне криве.

I стандард:

41 μ l тетраметоксипропана, ТМА

20 ml дејонозоване воде

20 капи концентроване хлороводоничне киселине, HCl

Допунити водом до 25 ml.

II стандард: 0,5ml стандарда и до 50 ml дестиловане воде.

Финална концентрација стандарда је 100 nmol/ml MDA. Од ње се прави серија двоструких разблажења (нпр. nmol/ml 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 ...). Стандарди и слепа проба третирани су исто као плазма.

3.2.9. Одређивање концентрације протеин карбонила у плазми

Одређивање концентрације ПК у плазми заснива се на методи Levine и сарадника (1990). Пре почетка анализе потребно је плазму разблажити PBS-ом да би се добила оптимална концентрација протеина за рад и затим центрифугирати 10 минута на 14000 rpm да би се уклониле честице које могу ометати читавање.

Потребни реагенси:

-2,5 M HCl

-10 mM DNPH, динитрофенилхидразин,

-10% TCA, трихлорсирћетна киселина,

-20% TCA трихлорсирћетна киселина,

-20 mM KH_2PO_4 , pH 2,3, калијум фосфатни пуфер,

-GndHCl, гуанидин хидрохлорид.

Паралелно се припремају узорак и његова слепа проба:

Узорак: 200 μ l плазме + 800 μ l DNPH

Слепа проба: 200 μ l плазме + 800 μ l 2,5 M HCl.

Смеша је инкубирана у мраку, на собној температури, 1 сат, са вортексовањем на сваких 15 минута. Затим је додато 1ml 20% TCA у сваку епандорфицу, уз инкубацију на леду 10 минута. Након центрифугирања 10 минута на 10 000 g, (+4°C), одбачен је супернатант и поступак поновљен са талогом и 10% TCA.

Супернатант је одбачен а талог ресуспендован у 1ml смеше етанол-етилацетат (1:1), вортексован и центрифугиран 10 минута на 10 000 g, (+4°C). Испирање је поновљено још 2 пута. Након последњег испирања талог је ресуспендован у 500 µl GndHCl, вортексован и инкубиран 10-15 минута на 37°C. После двоструког центрифугирања супернатант је пребачен у микротитрационе плоче и очитана је апсорбанца на ELISA читачу, на 375 nm (*RT-6100, Rayto, Shenzhen, China*). Количина протеин карбонила у узорку изражава се у односу на количину укупних протеина. Концентрација протеина израчунава се на основу стандардне криве која се конструише помоћу *BSA (bovine serum albumine)* стандарда у серији двоструких разблажења, уз читавање апсорбанце на ELISA читачу на 280 nm.

Протеин карбонил (nmol/ml) = (A_{375} узорка - A_{375} слепе пробе) * 45,45 (nmol/ml)

Протеин карбонил (nmol/mg) = протеин карбонил (nmol/ml) /концентрација протеина (mg/ml)

3.2.10. Одређивање концентрације нитрита и нитрата у плазми

Грисова метода се користи за одређивање концентрације нитрита у узорку. Концентрација нитрата се одређује индиректно, превођењем нитрата у нитрите (Green LC и сар., 1982; Yucel AA и сар., 2012). Припрема узорка за анализу подразумева:

- Депротенизацију плазме помоћу NaOH и ZnSO₄.
- Редукцију нитрата у нитрите помоћу ванадијум хлорида (VaCl₃)

Депротенизација плазме

У 250µl плазме додавано је по 250 µl 0,3M NaOH, смеша је вортексована и инкубирана на собној температури 5 минута. Затим је у смешу додато 250 µl 10% ZnSO₄. Након вортексовања и центрифугирања на 14000 грm, 5 минута на +4°C, супернатант је издвојен у нове тубице и поново центрифугиран под истим условима.

Сви узорци и стандарди наносени су у дупликату на плоче са 96 бунарчића. Сваки узорак имао је своју контролу у коју није додаван Грисов реагенс (2% сулфониламид и 0,1% NEDD, N-(1-Naphthyl)ehylenediamine dihydrochloride):

Узорак/стандард: плазма + 2% сулфаниламид + 0,1% NEDD

Контрола: плазма + 1 М НСl

У другом делу експеримента узорцима је прво додат $VaCl_3$, а затим компоненте Грисовог реагенса. Све плоче инкубиране су 30 минута на 37 °С. Након тога очитана је апсорбанца на ELISA читачу, на 540 nm (*RT-6100, Rayto, Shenzhen, China*).

Апсорбанца узорка умањена је за апсорбанцу контроле. Концентрација је одређена коришћењем две стандардне криве за нитрите и нитрате. Криве су конструисане помоћу серије двоструких разблажења стандардних раствора нитрита и нитрата.

Потребни реагенси:

- 0,3 М NaOH - 0,6 g у 50ml dH₂O₂
- 10% ZnSO₄ - 5g у 50 ml dH₂O₂
- 1 М НСl - 46 ml dH₂O₂ + 4 ml 37% НСl
- 5% НСl - 13,5 ml 37% НСl + 8605 ml dH₂O₂
- 2% sulfanilamid - 2 g sulfanilamida у 100 ml 5% НСl
- 0,1% NEDD.- 0,1 g NEDD у 100ml H₂O₂
- $VaCl_3$ - 0,4 g $VaCl_3$ у 50 ml 1 М НСl

3.2.11. Тест редукције нитро тетразолиум плавог

Тест редукције нитро тетразолиум плавог, (енгл. *Nitro blue Tetrazolium, NBT*) је цитохемијски тест за мерење интензитета респираторног праска, односно за одређивање нивоа продукције супероксид анјон радикала. Реакција редукције жуто обојеног и у води нерастворног NBT настаје дејством супероксид анјон радикала који се ствара у реакцији респираторног праска каталитичким дејством NADPH оксидазе. При том настаје нерастворни тамно плави формаган, који може бити солубилизован и квантификован спектрофотометријски у цитохемијском есеју (Monboisse и сар., 1991). Редукција NBT може бити спонтана или стимулирана употребом форбол миристат ацетата (енгл. *Phorbol myristate acetate, PMA*).

По 100 μ l суспензије гранулоцита у медијуму, у концентрацији од 5×10^6 /ml сипано је у бунарчиће плоче са 96 места. Ради стимулације у одговарајуће бунарчиће додавано је по 10 μ l PMA (550 ng/ml). Тамо где нема стимулације додат

је медијум. На крају је сипано по 10 μl NBT реагенса (5 mg/ml) и инкубирано 30 минута на 37°C у влажној атмосфери. По завршеној инкубацији процес редукције је прекинут додавањем 100 μl 10% SDS (енгл. *sodium dodecyl sulfate*) закишељеног са 1M HCl (10 μl 1M HCl на ml 10% SDSa). Растварање добијене боје настављено је на 37°C преко ноћи. Апсорбанца је очитана на 540 nm, на ELISA читачу (RT-6100, Rayto, Shenzhen, China). Интензитет реакције изражава се као разлика интензитета апсорбанце стимулисане реакције и слепе пробе.

3.2.12. Детекција ROS у гранулоцитима

Производња ROS у ћелији одређена је помоћу нефлуоресцентног, мембрански пропусног једињења 2,7-дихлородихидрофлуоресцеин диацетата (H2DCFDA, Sigma Aldrich, USA), хемијски редуковане форме флуоресцеина, које се помоћу ћелијских естераза конвертује у поларни и мембрански непропусни дериват H2DCF. Новонастало једињење се у присуству унутарћелијских ROS оксидује до високо флуоресцентног 2,7-дихлорофлуоресцеина (DCF); (Kalyanaraman B и сар., 2012; Tsikas D, 2007).

Ћелијска суспензија нанета је у бунарчиће плоче са 96 места (10000-15000 ћелија по бунарчићу) и центрифугирана 10 минута на 14000 rpm. На талог је додата боја H2DCFDA финалне концентрације 2 μM . Ћелије су инкубирани 15 минута у мраку на 37°C. После инкубације додато је по 100 μl PBS и ћелије су спуштене центрифугирањем, на 1400 rpm, 10 минута. На талог је додато по 100 μl 1 M NaOH. Флуоресценца је очитана на читачу VICTOR (Wallac, Turku, Finland), при таласним дужинама 485nm за ексцитацију и 535nm за емисију.

3.2.13. Тест редукције тетразолијумске соли, МТТ

МТТ је колориметријски есеј за процену вијабилности ћелија. Заснива се на редукцији тетразолијумске соли МТТ (3-4,5-диметилтиазол-2,5-дифенилтетразолиум бромид) дехидрогеназама митохондрија, при чему настаје нерастворљив формазан љубичасте боје. МТТ редукују само активне митохондрије живих ћелија, па је тест погодан за мерење броја вијабилних ћелија, њихове активности и пролиферације (Mosmann T, 1983).

У тесту смо користили третиране и нетретиране ћелије. У бунарчиће плоче са 96 места сипано је по 100 μl ћелијске суспензије (10000-15000 ћелија по бунарчићу). Затим је додато 10 μl МТТ (5 mg/ml). Културе су инкубирани 3-4 сата на 37°C. Процес редукције је заустављен додавањем по 100 μl / бунарчићу 10% SDS-а закишељеног са 1N HCl. Растварање добијене плаве боје настављено је преко ноћи у инкубатору. Апсорбанца је читана на 540 nm на ELISA читачу (RT-6100, Rayto, Shenzhen, China).

3.2.14. Имуноцитохемијска метода

Први корак у бојењу цитоспинова гранулоцита била је блокада ендogene пероксидазе 10 минута на собној температури помоћу 3% воденог раствора H_2O_2 . Примењена је индиректна тростепена стрептавидин-биотин метода детекције (енгл. *UltraVision Detection System, Thermo scientific, USA*) у којој је стрептавидин обележен пероксидазом рена. Препарати испрани у дестилованиј води и 0,01 М фосфатном пуферу (pH 7,4) инкубирани су са примарним антителима у влажној комори, 12 сати на +4°C. Након тога извршена је инкубација са биотинизираним анти-зејим имуноглобулинима 30 минута на собној температури. У следећој етапи препарати су третирани стрептавидинским коњугатом на пероксидазу рена, 30 минута на собној температури. Између ових корака плочице су испирани у 0,01 М фосфатном пуферу (pH 7,4). На крају су препарати инкубирани у раствору супстрат-хромоген (3,3-диамино-бензидин тетрахлорид и H_2O_2 , *Dako, Liquid DAB+Substrate Chromogen System, USA*) у трајању од 5-10 минута на собној температури. За контрастирање је коришћен Мајеров хематоксилин. Као негативна контрола у току имуноцитохемијског бојења служили су узорци испитиваних ћелија који су бојени паралелно са узорцима на којима се доказује експресија биолошких маркера, али су у току процедуре бојења третирани неимуним серумом уместо примарног антителя.

За растварање примарних антисерума коришћен је комерцијални растварач (Cat. No. SO809, DAKO) Препарати су монтирани у водени медијум (*Aquatex- OC 261903, Merck, Germany*).

3.2.15. Имунохистохемијска метода LSAB+/HRP

Бојење је вршено на ткивним пресецима дебљине 5 μm . Пресеци су депарафинисани у ксилолу и рехидратисани кроз серију алкохола (100%-70%). Након тога је вршено демаскирање антигена, блокирање ендogene пероксидазе, инкубација примарним и секундарним антителом и бојење мешавином супстрат-хромоген. Ткивни узорци су на крају контрастрирани хематоксилином.

Демаскирање антигена

Формалдехид у току фиксације, као и парафин током калупљења, изазивају стеричке промене протеина у ткиву формирањем интермолекуларних веза што може маскирати антигене и умањити ефекат специфичног имунохистохемијског бојења. Поступком демаскирања антигена постиже се обнављање примарне стеричке конфигурације антигена уклањањем нежељених интермолекуларних веза, путем њиховог кидања и уклањањем Ca^{++} уз помоћ цитрата. У ту сврху ткивни пресеци су потопљени у цитратни пуфер (*Target Retrieval Solution, Code No. S 1700, DAKO*), рН6 и излагани микроталасним зрацима (560 W) у току 21 минута, након чега су испирани у текућој води.

Поступак бојења

Након извршене депарафинизације и поступка демаскирања антигена, блокирана је ендogenous пероксидаза са 3% воденим раствором H_2O_2 , 10 минута на собној температури. Ткивни пресеци испирани у дестилованиј води и 0,01 М фосфатном пуферу, рН 7,4 инкубирани су са примарним антителом у влажној комори, 12 сати на $+4^\circ\text{C}$. Након тога извршена је инкубација са биотинизираним анти-зечјим имуноглобулинима 30 минута на собној температури. У следећој етапи пресеци су третирани стрептавидинским коњугатом на пероксидазу рена, 30 минута на собној температури. Између ових корака препарати су испирани у 0,01 М фосфатном пуферу, рН 7,4. На крају пресеци су инкубирани у раствору супстрат-хромоген (*Dako, Liquid DAB+Substrate Chromogen System, USA*), у трајању од 5-10 минута на собној температури. Препарати су контрастрирани Мауер-овим хематоксилином. За растварање примарних антисерума коришћен је комерцијални растварач (Cat. No. SO809, DAKO) Препарати су монтирани у водени медијум (*Aquatex- OC 261903, Merck, Germany*).

Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења. Имунохистохемијска бојења извршена су уз контролу квалитета и специфичности бојења применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама *UK NEQAS* (енгл. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*).

Као позитивни контролни узорци коришћени су познати узорци мијелопролиферативних неоплазми код којих је експресија биолошких маркера већ раније доказана. Наиме, сви позитивни контролни узорци раније су вишеструко тестирани и доказано садрже испитиване антигене, а примењени су на исти начин као и испитивани узорци у овим истраживањима.

Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења служили су ткивни узорци испитиваних неоплазми који су бојени паралелно са узорцима на којима се доказује експресија биолошких маркера, али су у току процедуре бојења третирани неимуним серумом уместо примарног антитета.

Препарати су анализирани употребом микроскопа *Olympuse Provis AX70, Tokyo, Japan*.

3.2.16. Анализа експресије протеина

Изолација ћелијских протеина

Изолација укупних ћелијски протеини из гранулоцита и HEL ћелија извршена је применом хладног RIPA пуфера за лизирање ћелија који се састојао од: 50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1% Triton x-100, 1% натријум деоксихолат, 0,1% SDS, 2mM EDTA и 50mM NaF. Непосредно пре почетка лизирања ћелија, пуферу су додавани инхибитор фосфатаза 1mM Na-ортованадат и коктел инхибитора протеаза (*Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Ћелије су лизирани у односу 1 ml пуфера на 1×10^8 ћелија. Лизати су инкубирани најмање 30 минута на +4°C а затим центрифугирани 15 минута на 11000 rpm. Лизати су аликвотирани и чувани на -80°C до употребе. Концентрација протеина у сваком узорку одређивана је употребом комерцијалног *BCA* (енгл. *Bicinchoninic acid*) теста (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*).

Електрофоретско раздвајање протеина и детекција протеина Western blot анализом

Протеини у ћелијским лизатима анализирани су натријум-додецилсулфат-полиакриламидном гел електорофорезом (енгл. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*), према Лемлију (Laemmli, 1970). Ова електрофореза заснива се на денатурацији протеина који негативно наелектрисани путују кроз полиакриламидне гелове различите густине и тако долази до њиховог раздвајања на основу величине молекула. У ту сврху узорцима протеина из ћелијског лизата додаван је редуccionи пуфер за узорке следећег састава: 250mM Tris/HCl pH 6,8, 10% SDS, 30% глицерол, 5% β -меркаптоетанол и 0,02% бромфенол плаво. После кувања у кључалој води, у трајању од 5 минута, овако припремљени узорци протеина наносени су на 4% гел за концентровање узорака и раздвајани на 10% или 6% гелу дебљине 1 mm, при константној струји од 110 V (*PeqLab, VWR International Ltd, England, UK*). Коришћен је комерцијални раствор акриламида и бис-акриламида, Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1 (30% w/v), 2.6% C (*Serva, Heidelberg, Germany*). Како би се одредила молекулска маса раздвојених протеина, на сваки гел је нанета и смеша референтних протеина познатих молекулских маса (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 - 250 kDa; Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania*).

Полусувим електротрансфером на апарату *PeqLab (VWR International Ltd, England, UK)*, при константној струји (50 mA) током 90 минута, протеини су преношени са гела на поливинил дифлуорид мембрану (*Applichem, GmbH, Darmstadt, Germany*), у пуферу за трансфер (25 mM Tris-HCl, 192 mM глицин, 20% метанол, 0,1% SDS).

Неспецифично везивање протеина за мембране блокирано је инкубацијом са 3% немасним млеком у TBS (50mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl) током 1 сата на собној температури. Након тога мембране су инкубирани преко ноћи на +4°C са примарним антителом у 1% млеку раствореном у TBS са 0.5% Tween 20 (TTBS), на ротационој мешалици. Мембране су потом испиране у TTBS, а затим инкубирани са секундарним антителом коњугованим са HRP два сата на собној температури. Мембране су поново испиране у TTBS три пута по 10 минута.

Ради визуелизације обележених протеина на ауторадиографском филму (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) мембране су инкубирани са системом реагенса за појачану хемилуминисценцу (ECL, енгл. *Enhanced chemiluminescence reagent system, GE Healthcare, Amersham, UK*). Интензитет протеинских трака квантификован је дензитометријски, применом *Image Master Total Lab софтвера (GE Healthcare)*.

Антитела коришћена у испитивању експресије протеина

Табела 1. Примарна антитела (WB-Western blot; ИИИ- имунохистохемијско обележавање; ИИИ- имуноцитохемијско обележавање)

Антиген	Порекло	Метода	Произвођач
iNOS	зечје	ИИИ	Santa Cruz Biotechnology, USA
Nitrotirozin	мишје	ИИИ	R&D Systems, USA
Akt	зечје	ИИИ	Santa Cruz Biotechnology, USA
pAkt	зечје	ИИИ	Santa Cruz Biotechnology, USA
Akt	мишје	WB	R&D Systems, USA
pAkt	зечје	WB	R&D Systems, USA
mTOR	мишје	ИИИ, ИИИ	Santa Cruz Biotechnology, USA
pmTOR	зечје	ИИИ, ИИИ	Santa Cruz Biotechnology, USA
mTOR	мишје	WB	R&D Systems, USA
pmTOR	мишје	WB	R&D Systems, USA
S6K	мишје	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
pS6K	зечје	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
p53	зечје	ИИИ	Novocastra, UK
β -actin	мишје	WB	R&D Systems, USA
ERK	зечје	WB	Abcam, UK

Табела 2. Секундарна антитела (HRP- horse radish peroxidase, peroksidaza rena; WB-Western blot)

Антиген	Порекло	Метода	Произвођач
HRP коњуговано анти-мишје	козје	WB	Pierce, USA
HRP коњуговано анти-зечије	козје	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA

3.2.17. Изолација ДНК и детекција *JAK2V617F* мутације

Изолација ДНК из гранулоцита периферне крви

ДНК из гранулоцита изолована је фенол хлороформском методом у којој се издвојени гранулоцити центрифугирају у раствору фенол/хлороформ/изоамил алкохол (у односу 25:24:1). Том приликом се ДНК издваја у горњој, воденој фази. Следећи корак је преципитација из ове фазе додавањем 7,5 М раствора амино ацетата и хладног апсолутног етанола. Узорци ДНК су потом мешани са 70% раствором етил алкохола и талог ДНК је издвојен центрифугирањем. Реконституција ДНК за реакцију ланчаног умножавања (енгл. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) вршена је стерилном дестилованом водом на 37°C током ноћи.

Испитивање присуства *JAK2V617F* мутације

За PCR амплификацију (*T3000 Thermocycler, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen, Germany*) коришћени су прајмери приказани у табели 3.

Табела 3. Сетови прајмера коришћени за испитивање присуства *JAK2V617F* мутације

Прајмер	Секвенца (5' – 3')
JAK2-FWD	GTTTCTTAGTGCATCTTTATTATGGCAGA
JAK2-G-REV	FAM-TTACTCTCGTCTCCACAGAC
JAK2-T-REV	FAM-AAATTA CTCTCGTCTCCACAGAA

Температурни профил PCR реакције:

1. 5 мин/95°C – активација HotStarTaq полимеразе
2. 30 циклуса:
 - 30 сек/94°C – денатурација
 - 30 сек/62°C – анилинг

- 80 сек/72°C – елонгација
3. 10 мин/72°C – финална елонгација

Након PCR амплификације извршено је пречишћавање на колони (*QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, USA*) према упутству произвођача. Приликом одређивања присуства *JAK2V617F* мутације, PCR-ом умножени продукти су секвенцирани *BigDye Terminator V3.1* китом за секвенцирање на *ABI PRISM 3130 automated DNA Sequencer* апарату (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*), коришћењем *AB DNA Sequencing Analysis Software (v 5.2)*.

Секвенцирање PCR продуката

Секвенцирање ДНК је извршено капиларном електрофорезом на аутоматском секвенатору (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*) коришћењем *BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-a (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)*. У PCR реакцији се поред дидеоксинуклеотида користе и 2', 3'- дидеоксинуклеотиди. Сваки од 4 дидеоксинуклеотида обележен је различитом флуоресцентном бојом чиме је омогућена детекција фрагмената у секвенатору. ДНК полимераза копира један ланац ДНК матрице уграђујући нуклеотиде на 3' крај прајмера све док у растући ланац не угради неки од дидеоксинуклеотида. Дидеоксинуклеотиди немају ОН-групу на 3' позицији, због чега немају способност везивања следећег нуклеотида, па њиховом уградњом долази до терминације полимеризације. Реакције се раде само са једним прајмером тако да се добија серија фрагмената различитих дужина који се завршавају дидеоксинуклеотидом. Смеша за секвенцирање, финалне запремине 8 μ l, садржи следеће компоненте: 3-20 ng пречишћеног PCR продукта (за дужине 200-1000 bp), 3,2 pmol прајмера за секвенцирање и 3 μ l *Ready Reaction Mix-a (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA)*.

Температурни профил PCR реакције за секвенцирање:

1. 1 мин/96°C
2. 25 циклуса:
 - 10 сек/96°C
 - 5 сек/50°C

- 4 мин/60°C

3. 4°C/∞

Прајмери специфични за мутацију дужи су у односу на „wild“ тип прајмера. Приликом PCR анализе створене су *JAK2V617F* секвенце које су за три базна пара дуже у односу на немутиране *JAK2* секвенце. Уколико пацијент има *JAK2V617F* мутацију анализа ДНК секвенци (ABI3130x1) показала је два различита пика. Однос ова два пика (мутаног – 190 базних парова и немутаног – 187 базних парова) указује на различито алелно оптерећење. Алелно оптерећење мутираног гена је анализирано по формули: $\frac{\text{Висина пика}_{\text{JAK2V617F}}}{(\text{висина пика}_{\text{wild}} + \text{висина пика}_{\text{JAK2V617F}})} \times 100\%$. Према овој методи пацијенти су према степену оптерећења *JAK2* подељени у 3 групе: *JAK20* (без мутације), *JAK2* хетерозиготи (1-50%) и *JAK2* хомозиготи ($\geq 51\%$).

3.2.18. Анализа ћелијског циклуса у *in vitro* условима применом проточне цитометрије

За испитивање ћелијског циклуса и степена пролиферације HEL ћелија у култури коришћена је проточна цитометрија. У *in vitro* условима, након третмана са различитим концентрацијама оксиданаса, N-ацетил цистеина (*NAC*, *Sigma Aldrich*, *St. Louis*, *USA*) и рапамицина (*Merck Millipore*, *Burlington*, *MA*, *USA*), ћелије су обележаване пропидијум-јодидом, PI (*Beckman Coulter International SA*, *Nyon*, *Switzerland*) према препоруци произвођача, и анализиране помоћу проточне цитометрије. За ову анализу је коришћено $7,5 \times 10^5$ HEL ћелија по групи. Анализа је вршена на проточном цитометру *FASCalibur* (*BD Biosciences*, *San Jose*, *CA*, *USA*) и *CELLQuest software version 3.0*.

Рапамицин је липофилни, макролидни антибиотик који у комплексу са својим рецептором FKBP12 испољава инхибиторно дејство. У клиничкој пракси се користи као имуносупресант и за превенцију рестенозе крвних судова након ангиопластике.

3.2.19. Експериментални дизајн

Експерименти са гранулоцитима

У *in vitro* условима испитан је утицај ROS на активацију mTOR и експресију iNOS и нитротирозина у гранулоцитима пацијената и здравих контрола. Након изолације ћелије су ресуспендоване у медијуму RPMI-1640 (*Capricorn scientific, Germany*) коме је додат 10% говеђи серум (*Sigma Diagnostic, USA*), глутамин и антибиотици, пеницилин и стрептамицин (*Capricorn scientific, Germany*). Ћелије су засејане у плоче са 6 или 24 бунарчића у концентрацији $1 \times 10^6/\text{ml}$ медијума и инкубиране 2 сата на 37°C , 5% CO_2 , 100% влажности. Гранулоцити су третирани са 0,25 mM и 0,5 mM H_2O_2 у трајању од 30 минута. Одређене групе су 30 минута пре додавања H_2O_2 третиране са NAC у финалној концентрацији 3 mM. NAC уклања реактивне врсте кисеоника као што су водоник пероксид, хидроксил радикал и хипохлорна киселина (Агуота ОI и сар., 1989). По истеку предвиђеног времена гранулоцити су два пута испрани у фосфатном пуферу (pH 7,4) након чега је ћелијска суспензија коришћена за припрему цитоспинова и њихову даљу анализу.

У експериментима за проверу вијабилности гранулоцита МТТ тестом ћелије су третиране 24 сата већим распоном концентрација H_2O_2 (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2mM, 3mM).

Експерименти са HEL ћелијама

У експерименту који је имао за циљ испитивање активности mTOR сигналног пута, ћелијски циклус и пролиферацију под дејством оксиданаса, коришћене су HEL ћелије култивисане у 1640 RPMI медијуму (*Biowest, Nuaille, France*) са додатком 10% феталног говеђега серума (*FBS, Fetal Bovine Serum, Biowest, Nuaille, France*) и 1% *PENSTREP* (100U/ml пеницилин/ 100mg/ml стрептомицина, *Biowest, Nuaille, France*) на температури од 37 у атмосфери са 5% CO_2 и 100% влажности. Ћелије су изложене деловању различитих концентрација H_2O_2 , од 0,15mM до 1mM. За третман је коришћен 30% H_2O_2 растваран у стерилном PBS. Ефекат третмана праћен је у временском интервалу од 5 минута до 24 сата. Да би се избегао утицај елиминације H_2O_2 од стране ћелија формиране су групе са једнаким бројем HEL ћелија ($0,5-1 \times 10^6/\text{ml}$).

2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPN, *Sigma Aldrich, St. Louis, USA*) је азо-једињење које слободном дисоцијацијом на 37°C ствара слободне радикале. 1 mM AAPN у периоду од 24 h ствара 112 μ M пероксил радикала (Piga и сар., 2007). AAPN супстанца растварана је у стерилном PBS до жељене концентрације. Анализиран је ефекат дуготрајног третмана од 1h до 72h. Ради испитивања ефеката ендогених ROS, али и неутралисања утицаја H₂O₂ и AAPN коришћен је антиоксиданс NAC (*Sigma Aldrich, St. Louis, USA*) у концентрацијама од 1,5 mM до 3 mM. NAC је растваран у стерилном PBS и додаван као претретман или самостално.

По завршеном третману ћелије су припремљене за МТТ тест, анализу методом проточне цитометрије или су изоловани протеини за детекцију имуноблот методом.

3.2.20. Статистичка анализа

Резултати су приказани графички и табеларно. У обради података коришћене су методе параметријске и непараметријске анализе (Студентов т-тест, једнофакторска анализа варијансе, Mann Whitney тест). У анализи повезаности испитиваних параметара коришћене су методе једноструке (Spearman i Pearson) корелације. Сви тестови посматрани су на нивоу значајности нулте хипотезе $p < 0,05$.

Обрада података извршена је помоћу комерцијалног статистичког пакета за РС рачунаре *SPSS for windows 10 (Statistical Package for the Social Sciences for Windows, SPSS Inc. USA)*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Резултати детекције *JAK2V617F* мутације код *Ph*-ХМН болесника

Методом секвенцирања испитана је заступљеност *JAK2V617F* мутације на егзону 14 хромозома 9 код *Ph*-ХМН болесника. Од укупно 88 *Ph*-ХМН испитаника, *JAK2V617F* мутација је била присутна код свих ПВ, као и код 58% ЕТ и 56% ПМФ болесника.

Табела 4. Заступљеност *JAK2V617F* мутације међу *Ph*-ХМН испитаницима.

Дијагноза	<i>JAK2V617F</i> +	<i>JAK2V617F</i> -	Укупни број болесника
ПВ	30 (100%)	/	30
ЕТ	14 (58%)	10 (42%)	24
ПМФ	19 (56%)	15 (44%)	34

Даљом анализом утврђен је степен присутности *JAK2V617F* мутације при чему су испитаници код којих је проценат био већи од 50% означени као хомозиготи, а они са мањим процентом *JAK2V617F* мутације као хетерозиготи. У групи болесника са ПВ било је 14 хомозиготних (ПВхомо) и 16 хетерозиготних (ПВхтз) носиоца мутације. Међу ЕТ болесницима 14 су били хетерозиготи за *JAK2V617F* мутацију (ЕТхтз), а 10 их је било без мутације (ЕТ0). Од укупно 34 ПМФ болесника код њих 15 није детектован мутирани алел (ПМФ0), док је код преосталих 19 процентуална заступљеност мутације била мања од 50% (ПМФхтз).

4.2. Активност система антиоксидативне заштите

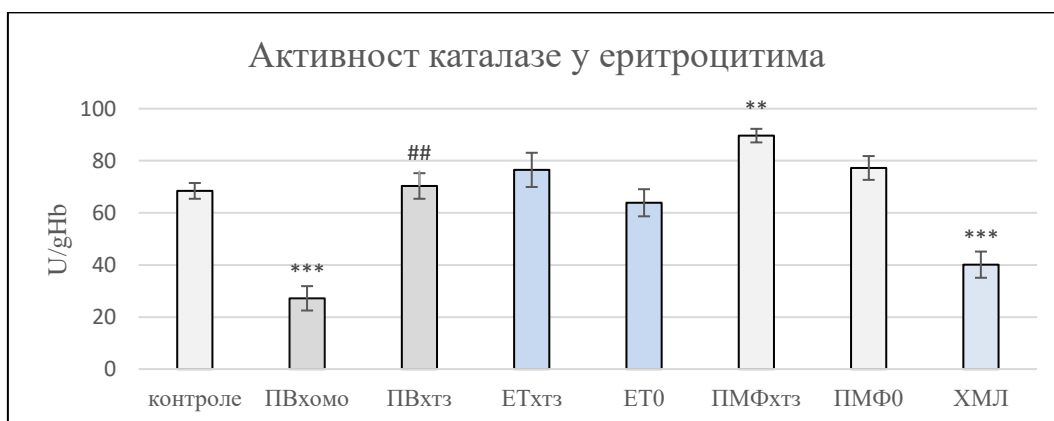
4.2.1. Активност каталазе у еритроцитима

Испитујући активност САТ у еритроцитима утврђено је да ПМФ болесници имају значајно веће вредности у поређењу са здравима ($p < 0,01$) али и са оболелима од ПВ и ХМЛ ($p < 0,001$). ПВ група има најмању активност међу оболелима од *Ph*-ХМН у односу на друга два ентитета (ЕТ, $p = 0,01$; ПМФ, $p < 0,001$). Једино код болесника са ХМЛ активност САТ је значајно смањена у поређењу са здравим

испитаницима, ($p < 0,001$). Посматрано у односу на присуство *JAK2* мутације најмању активност САТ имају ПВ болесници са хомозиготном мутацијом ($p < 0,001$), док је код ПМФ хетерозигота активност ензима највећа ($p < 0,01$). Код болесника са ПВ постоји значајна разлика у односу на степен *JAK2V617F* мутације ($p < 0,01$).



Графикон 1. Активност САТ у еритроцитима ХМН болесника и здравих контрола (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, у односу на контролу; ### $p < 0,001$ у односу на ПМФ)

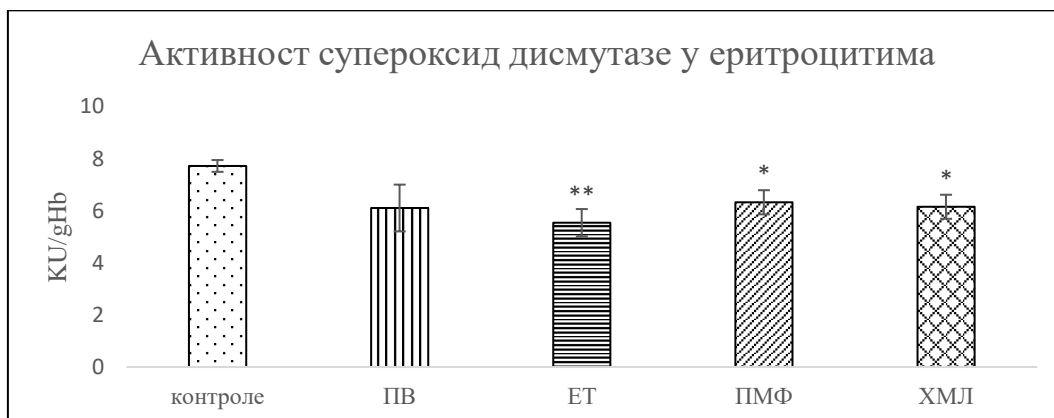


Графикон 2. Активност САТ у еритроцитима ХМН болесника и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, у поређењу са контролом; ## $p < 0,01$ у поређењу са ПВхомо)

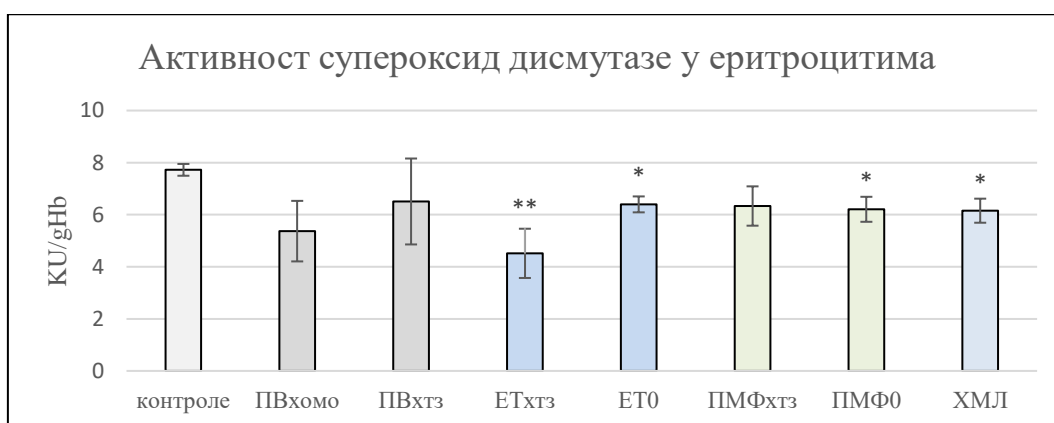
4.2.2. Активност супероксид дисмутазе у еритроцитима

Код свих болесника регистрован је пад активности SOD у лизату еритроцита. Најниже вредности забележене су код ЕТ ($p < 0,01$), затим ПМФ и ХМЛ ($p < 0,05$). У односу на присуство *JAK2V617F* мутације најниже вредности имају ЕТ

болесници са мутацијом ($p < 0,01$). Значајни пад активности забележен је и код ЕТ и ПМФ болесника без мутације.



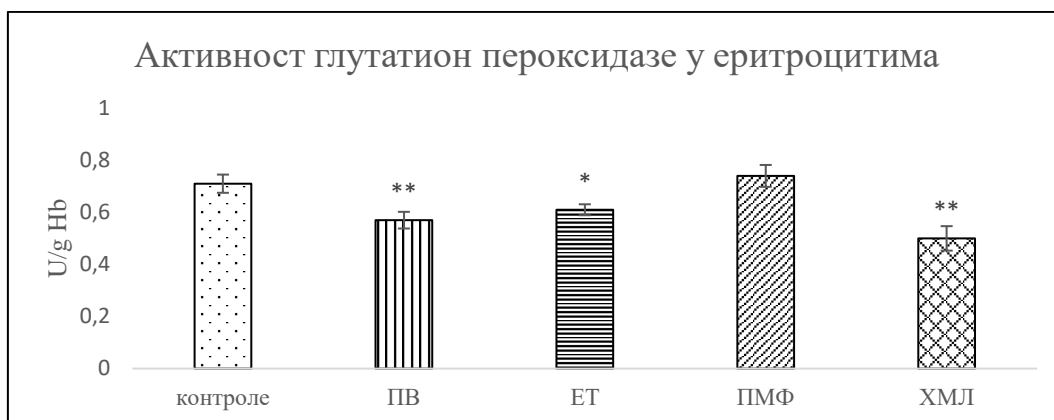
Графикон 3. Активност SOD у еритроцитима ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)



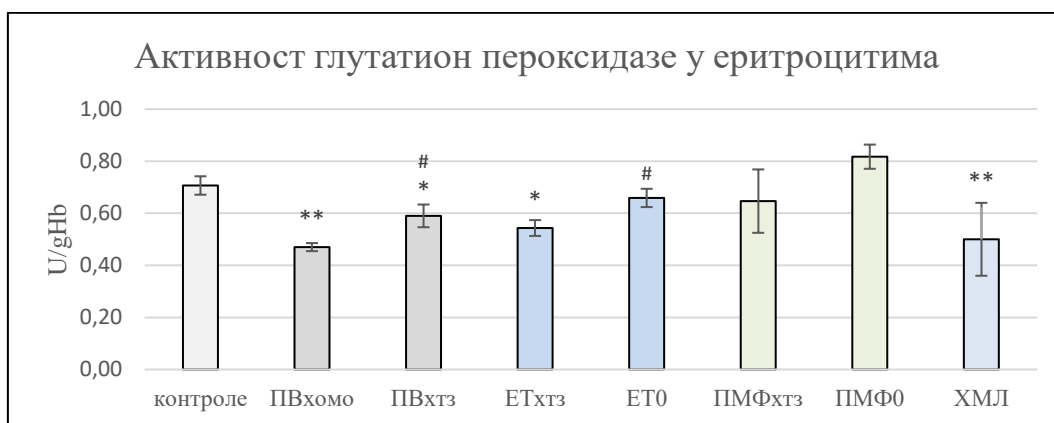
Графикон 4. Активност SOD у еритроцитима ХМН болесника и контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.2.3. Активност глутатион пероксидазе у еритроцитима

Оболели од ХМЛ имали су најслабију активност GPx у еритроцитима ($p < 0,01$). Пад ензимске активности забележен је код ПВ болесника ($p < 0,01$) и то значајно већи код испитаника који су имали већи степен *JAK2V617F* мутације ($p < 0,05$). Оболели од ЕТ такође су имали смањену активност GPx у еритроцитима у поређењу са контролама ($p < 0,05$), пре свега на рачун испитаника са *JAK2V617F* мутацијом ($p < 0,05$).



Графикон 5. Активност GPx у еритроцитима ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)



Графикон 6. Активност GPx у еритроцитима ХМН болесника и контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ у поређењу са контролом; # $p < 0,05$ у поређењу са ПВхомо тј. ЕТхтз)

4.2.4. Активност глутатион редуктазе у еритроцитима

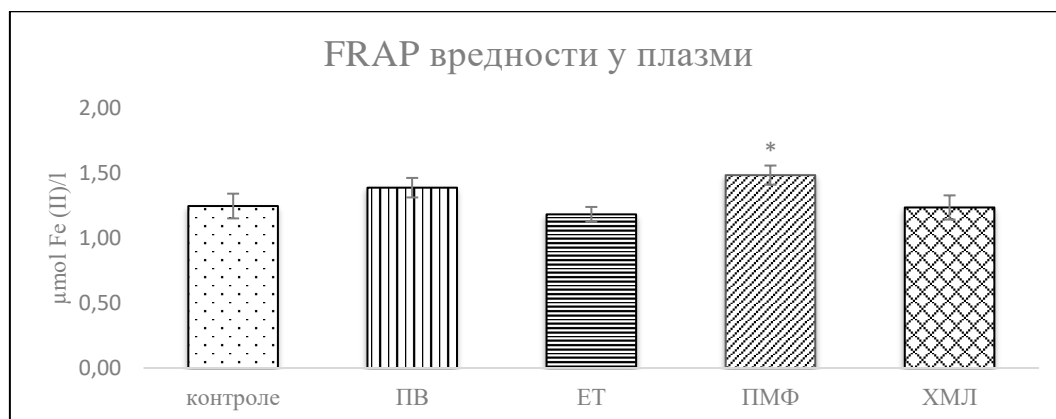
Испитујући активност GR у еритроцитима болесника од ХМН нисмо пронашли разлику у односу на активност ензима код здравих.



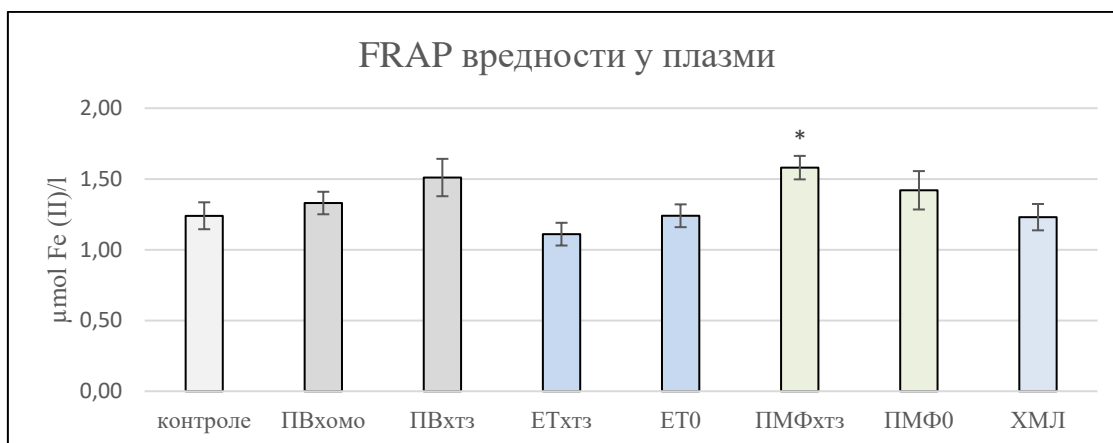
Графикон 7. Активност GR у еритроцитима ХМН болесника и контрола.

4.2.5. Укупни антиоксидативни капацитет плазме, FRAP тест

Укупни антиоксидативни капацитет плазме одређен је на основу редукционе моћи плазме, FRAP методом. Резултати су показали да се FRAP вредности код већине болесника са ХМН не разликују значајно од вредности здравих контрола осим код ПМФ ($p < 0,05$) где је измерено повећање. Поредећи активност са присуством *JAK2V617F* мутације у овој групи болесника значајни пораст FRAP вредности утврђен је само код *JAK2V617F* позитивних испитаника ($p < 0,05$).



Графикон 8. FRAP вредности у плазми ХМН болесника и здравих испитаника (* $p < 0,05$ у односу на контролу)



Графикон 9. FRAP вредности у плазми ХМН болесника и здравих испитаника у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$ у поређењу са контролом).

4.2.6. Антиоксидативна заштита

Код оболелих од ХМЛ забележено је значајно смањење активности SOD, GPx и CAT. Међу Ph-ХМН болесницима најслабију антиоксидативну заштиту имали су оболели од ЕТ. Активност SOD била је мања за 30% а активност GPx за 14% у поређењу са контролама. FRAP вредности биле су сличне као код здравих али зато ниже у односу на ПВ ($p < 0,05$) и ПМФ испитанике ($p < 0,01$). Код оболелих од ПВ једино је активност GPx снижена и то 20% у односу на вредности код здравих. У групи ПМФ болесника активност SOD била је 20% нижа у поређењу са контролама. Супротно томе активност CAT била је већа у односу на активност ензима код здравих контрола као и у односу на друга два ентитета (ПВ, $p = 0,001$ и ЕТ, $p < 0,05$).

Код испитаника са ПВ и ЕТ дијагнозом постојала је негативна корелације између активности CAT у еритроцитима и активације АКТ у гранулоцитима ($r = -0,424$, $p = 0,031$). Код ПМФ болесника није било везе између ове две активности. FRAP вредности у плазми код ових болесника такође су биле веће него код контрола и ЕТ испитаника ($p < 0,01$).

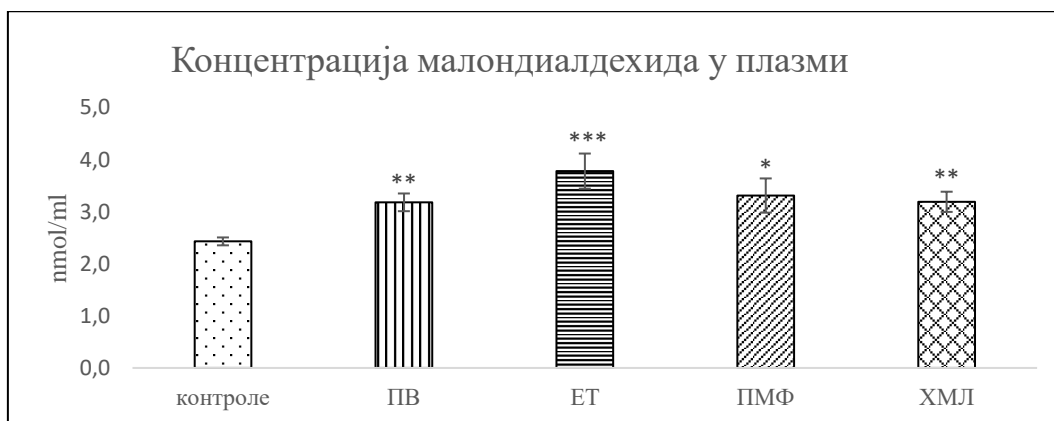
Поређењем активности ензима у односу на степен *JAK2V617F* мутације показано је да ПВ са хомозиготном мутацијом имају најмању активност GPx у односу на контролу, док је активност CAT најнижа у поређењу са контролама и свим осталим подгрупама ($p < 0,05$).

У групи ПВ болесника активност САТ и GРх значајно се разликује међу испитаницима са хомо- и хетерозиготном мутацијом *JAK2V617F* ($p < 0.05$). Код ЕТ испитаника активност GРх разликује се у зависности од присуства *JAK2V617F* мутације ($p < 0.05$).

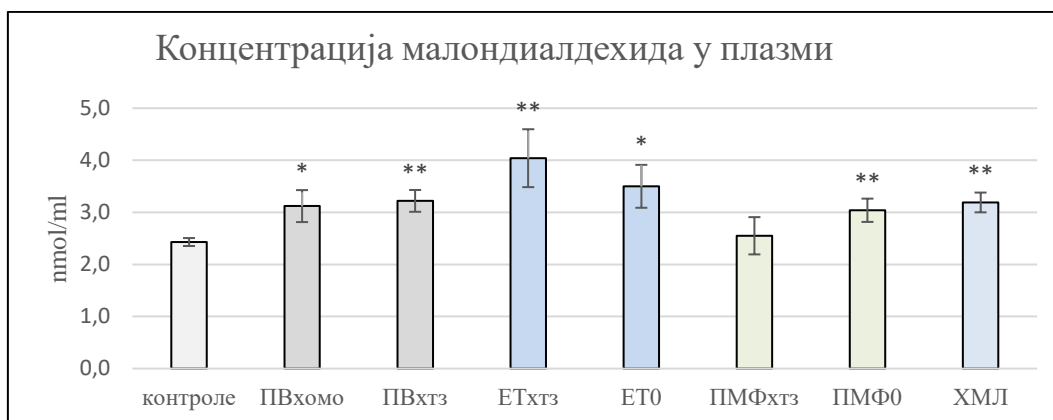
4.3. Продукти оксидације липида и протеина

4.3.1. Концентрација малондиалдехида у плазми

Методом која се заснива на реактивности липидних пероксида са тиобарбитурном киселином, утврђена је повећана концентрације МДА у свим групама болесника у односу на здраве контроле. Највећи раст забележен је код ЕТ ($p < 0,001$), затим ПВ ($p < 0,01$), ПМФ ($p < 0,05$) и на крају ХМЛ ($p < 0,01$). Концентрација продукта оксидације липида у плазми била је повећана код свих испитаника из ПВ и ЕТ групе без обзира на степен *JAK2V617F* мутације, док је у ПМФ групи раст забележен само код особа без мутације ($p < 0,01$).



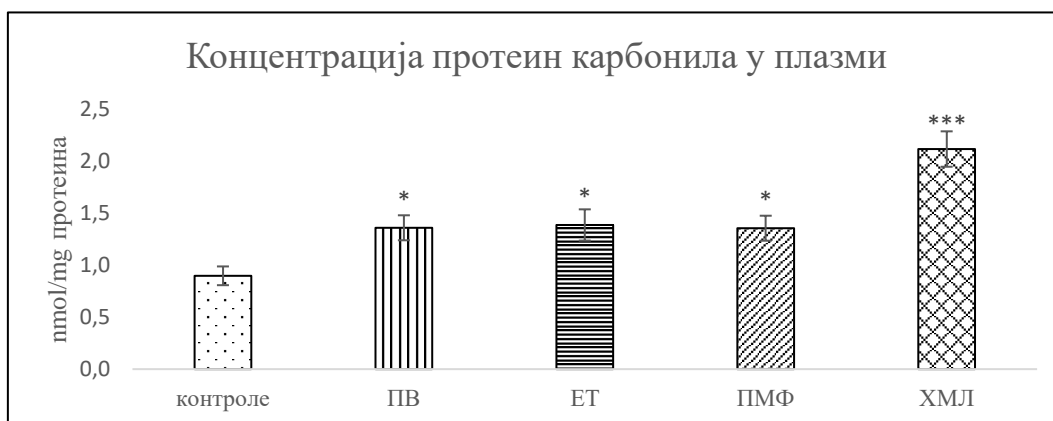
Графикон 10. Концентрација малондиалдехида у плазми ХМН болесника и здравих испитаника (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ у односу на контролу)



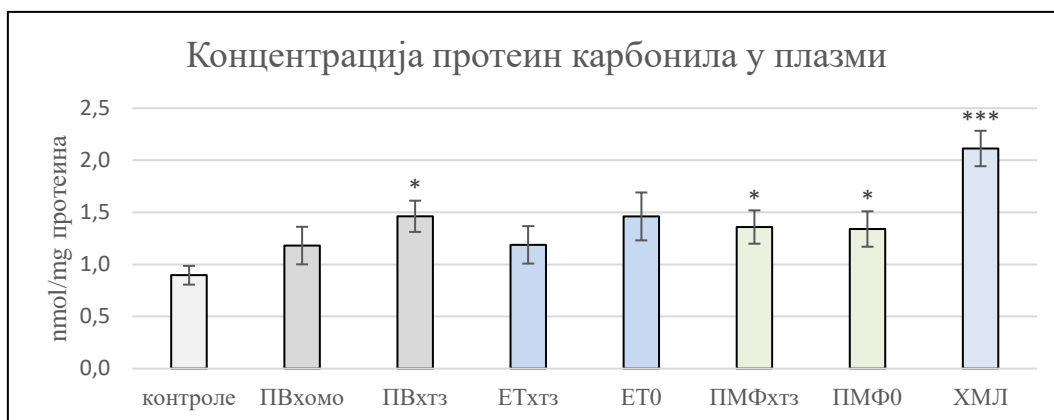
Графикон 11. Концентрација МДА у плазми ХМН болесника и здравих испитаника у односу на степен *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ у поређењу са контролом)

4.3.2. Концентрација протеин карбонила у плазми

Карбонилација представља облик оксидативног оштећења протеина. Концентрација ових иреверзибилно измењених деривата у плазми била је значајно већа код болесника у поређењу са контролама. Највећи пораст забележен је код оболелих од ХМЛ ($p<0,001$), а нешто мањи код болесника са *Ph*-ХМН ($p<0,05$). Код болесника са ПВ постоји разлика у концентрацији ПК у односу на степен *JAK2V617F* мутације при чему хетерозиготи имају значајно већи ниво ових продуката оксидације ($p<0,05$). У ПМФ групи раст је забележен код свих испитаника без обзира на присуство *JAK2V617F* мутације.



Графикон 12. Концентрација ПК у плазми ХМН болесника и здравих испитаника (* $p<0,05$; *** $p<0,001$ у односу на контролу).



Графикон 13. Концентрација ПК у плазми ХМН болесника и здравих испитаника у односу на степен *JAK2V617F* мутације : хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ поређење са контролом).

4.3.3. Оксидативна оштећења липида и протеина у плазми

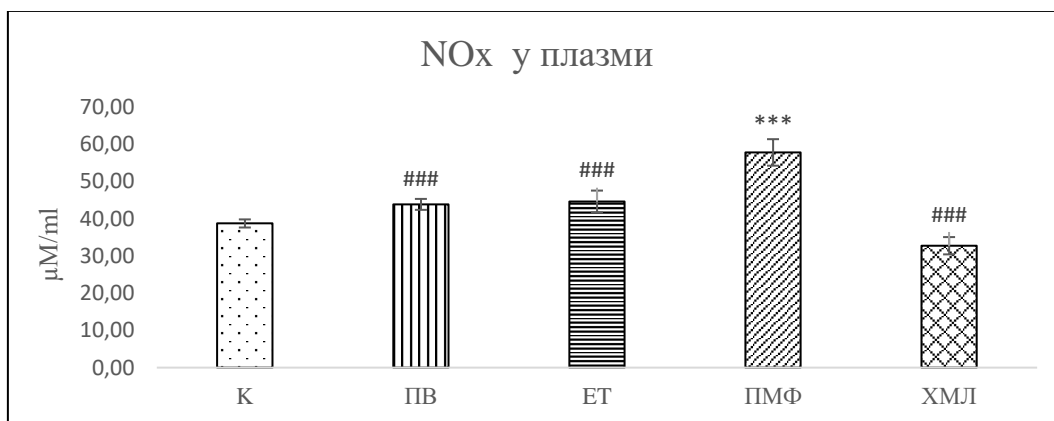
Студија је спроведена ради одређивања концентрације клиничких биомаркера оксидативног стреса, МДА и ПК, у плазми болесника са ХМН. Код свих болесника регистрован је пораст концентрације МДА приближно 40% и ПК приближно 50% у поређењу са контролама. Вредности ПК код оболелих од ХМЛ биле су 2,3 пута веће него код здравих контрола и 1,5 пута веће у поређењу са *Ph* ХМН ($p < 0,01$). Код свих испитаника је поређењем антиоксидативне заштите са продуктима оксидације утврђена негативна корелација између активности SOD у еритроцитима и концентрације МДА ($r = -0.406$, $p < 0.01$) и ПК ($r = -0.371$, $p < 0.05$) у плазми.

Табела 5. Корелација између активности SOD у еритроцитима и концентрације МДА и ПК у плазми испитаника.

	Коефицијент корелације (r)	p
МДА	-0,406	<0,01
ПК	-0,371	<0,05

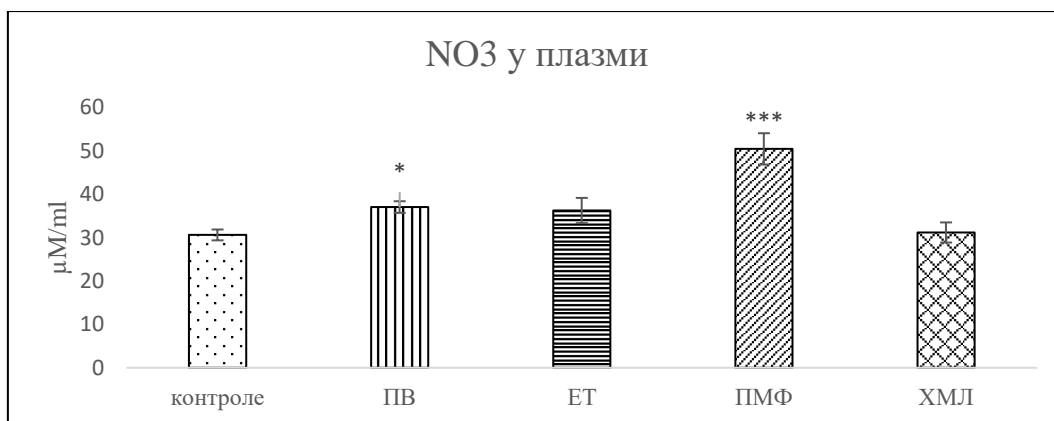
4.4. Концентрација нитрита и нитрата у плазми

У плазми испитаника Грисовом методом одређивана је концентрација NO_2^- и NO_3^- , стабилних продуката метаболизма NO . Концентрација укупних нитрита и нитрата (NO_x) била је повећана код ПМФ болесника у поређењу здравим испитаницима и другим ХМН ентитетима ($p < 0,001$).

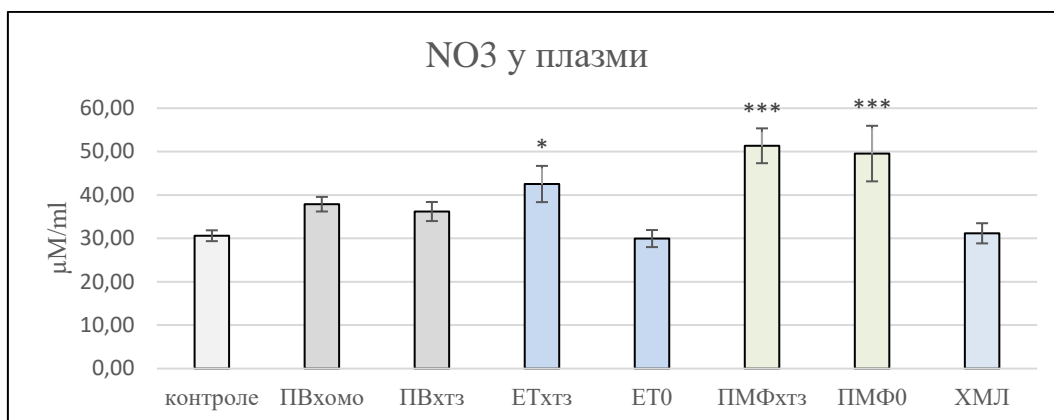


Графикон 14. Концентрација NO_x у плазми ХМН болесника и здравих испитаника (** $p < 0,001$, у односу на контролу; ### $p < 0,001$, у односу на ПМФ).

Болесници из ПВ ($p < 0,05$) и ПМФ ($p < 0,001$) групе испитаника имали су повећане вредности NO_3^- у плазми у односу на здраве. Концентрација NO_3^- у овим ентитетима није се разликовала у зависности од присуства *JAK2V617F* мутације.

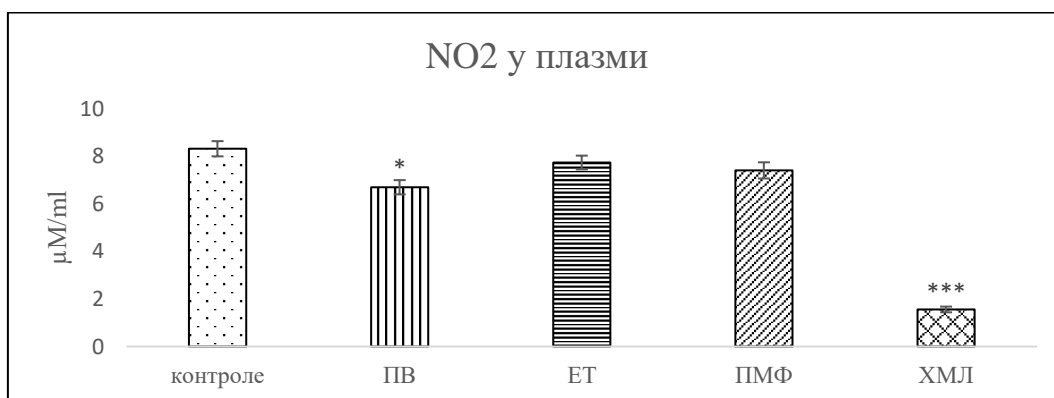


Графикон 15. Концентрација NO_3 у плазми ХМН болесника и здравих испитаника (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, у односу на контролу)

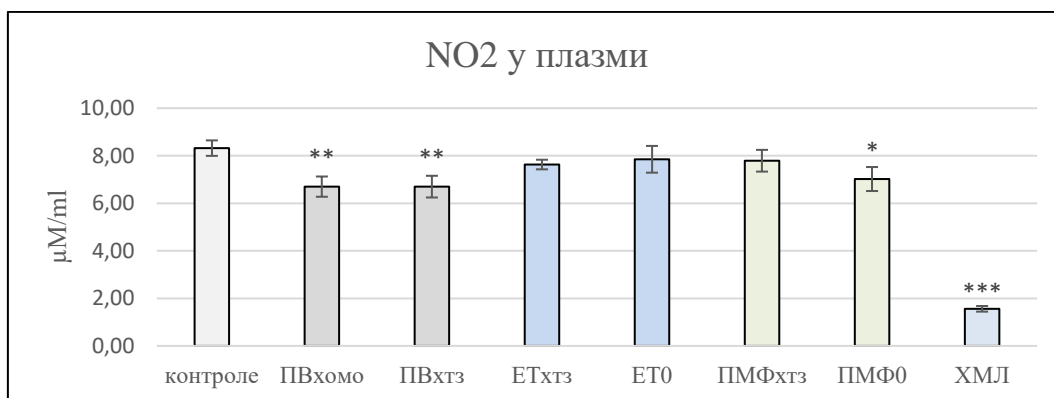


Графикон 16. Концентрација NO_3 у плазми ХМН болесника и здравих испитаника у односу на степен *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, у поређењу са контролом).

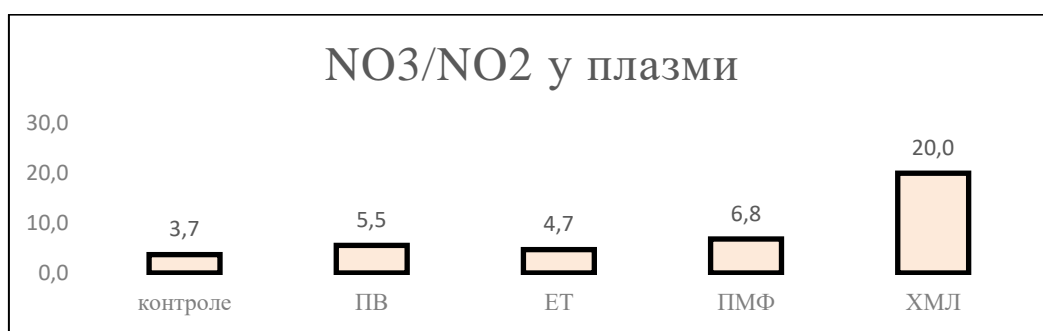
Поредећи концентрацију NO_2^- код испитаника утврдили смо пад вредности код оболелих од ПВ ($p < 0,05$) и ХМЛ ($p < 0,001$). Ниске вредности ових оксида код пацијената повезују се са високим вредностима NO_3^- тј. њиховом даљом оксидацијом у еритроцитима. Ово је нарочито изражено код ХМЛ где је концентрација NO_3^- 20 пута већа од концентрације NO_2^- . $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ однос код *Ph* ХМН болесника у просеку износи 5,7, док је код здравих само 3,7.



Графикон 17. Концентрација NO_2^- у плазми ХМН болесника и здравих испитаника (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ у односу на контролу)



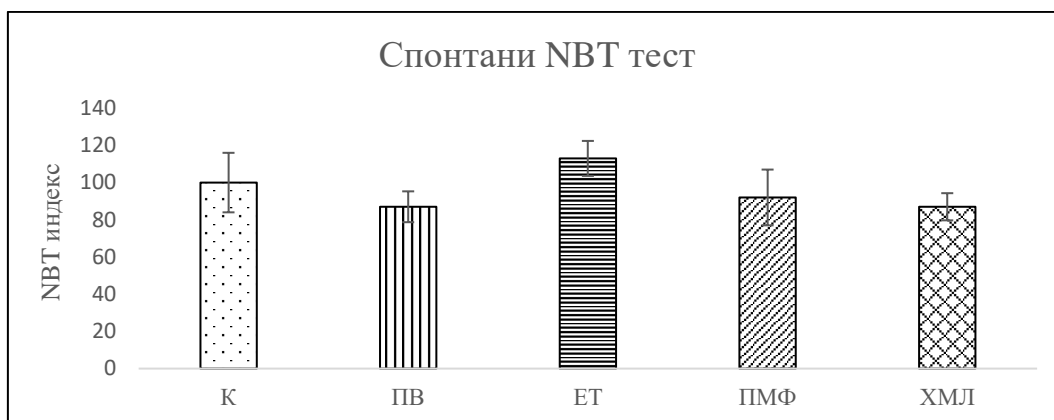
Графикон 18. Концентрација NO₂⁻ у плазми ХМН болесника и здравих испитаника у односу на степен *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, у поређењу са контролом).



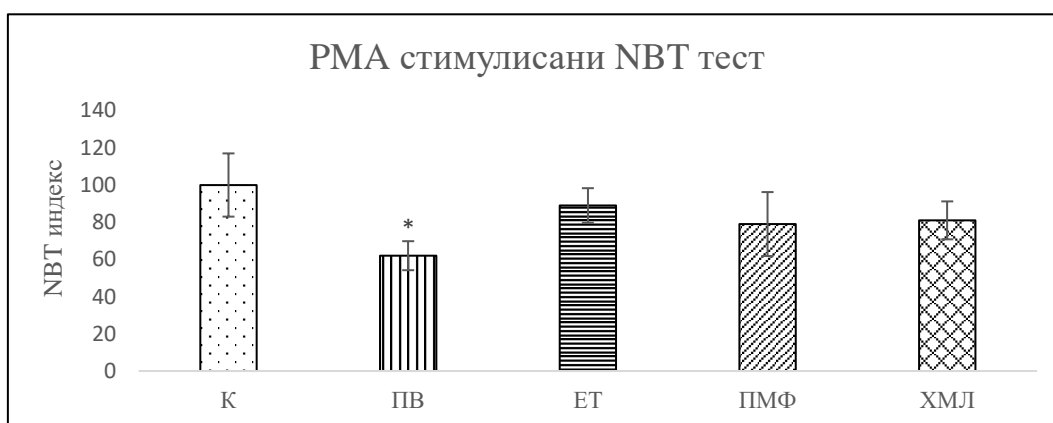
Графикон 19. Однос концентрација NO₃⁻ и NO₂⁻ у плазми ХМН болесника и здравих испитаника

4.5. NBT тест на гранулоцитима

NBT тест служи за процену једне од најважнијих функција гранулоцита-фагоцитозе и способности ензимског система NADPH да ствара супероксидни анион и сличне кисеоничне деривате. Испитивање изолованих, нестимулисаних гранулоцита показало је да нема разлике у вредности NBT индекса између контролне групе и група болесника. Међутим, након стимулације са РМА гранулоцити из ПВ групе имали су значајно мању реактивност (p < 0.05) у поређењу са здравим испитаницима.



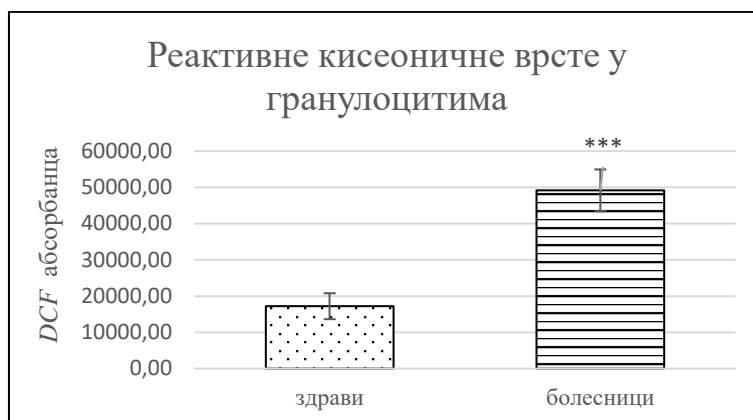
Графикон 20. Вредности NBT индекса у гранулоцитима ХМН пацијената и контрола.



Графикон 21. Вредности NBT индекса код ХМН пацијената и контрола након стимулације гранулоцита са PMA (* $p < 0,05$ у односу на контролу)

4.6. Одређивање ROS у гранулоцитима

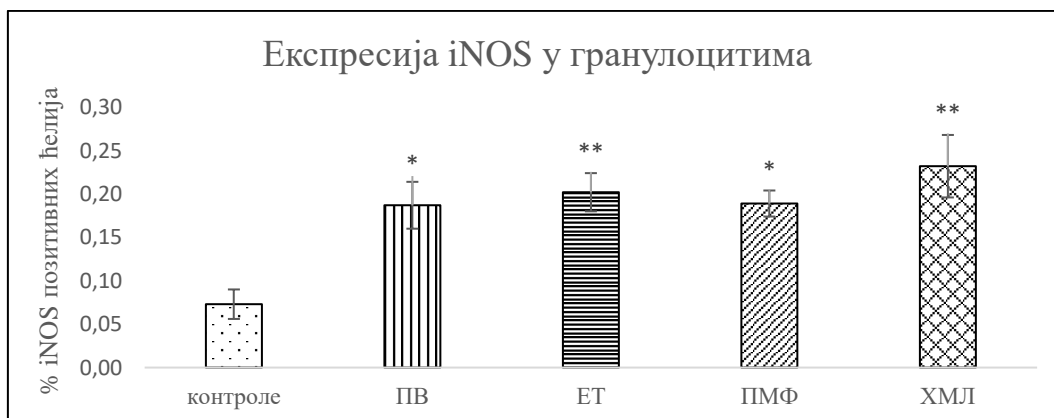
Користећи $H_2DCF-DA$ реагенс као индикатор испитан је степен интрацелуларне продукције ROS. За развој флуоресценце одговорна је оксидација помоћу ROS и неких RNS. Мерење флуоресценце је извршено на нативним гранулоцитима. Као позитивна контрола коришћене су ћелије третиране водоник пероксидом а као негативна контрола ћелије третиране NAC-ом. У групи болесника измерне су 2,86 пута веће вредности DCF флуоресценце о поређењу са групом здравих ($p < 0.001$). Ово говори у прилог повећане количине ROS у гранулоцитима испитаника са дијагнозом ХМН.



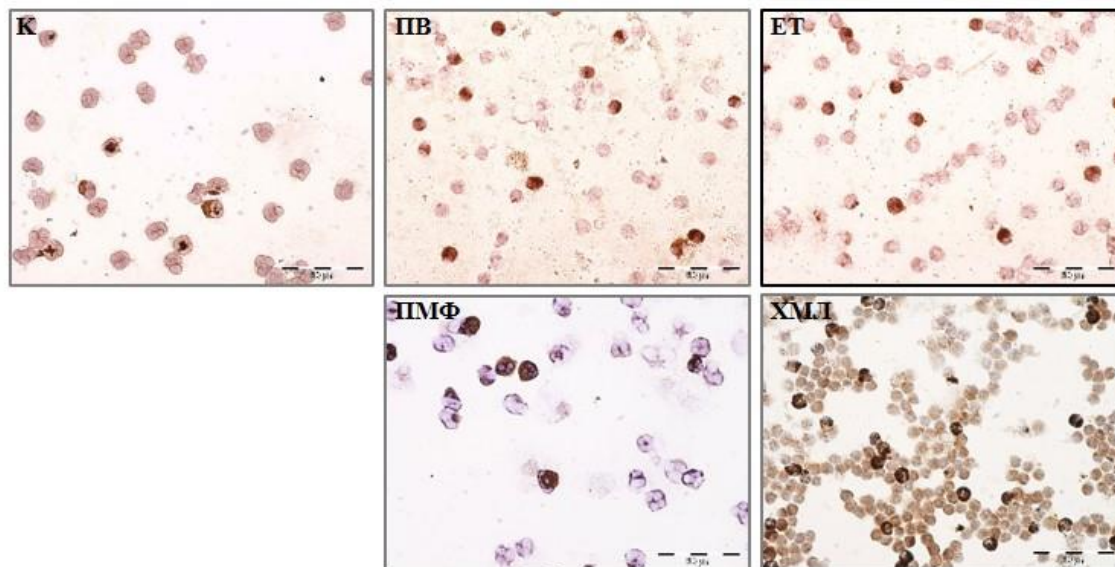
Графикон 22. Вредности DCF абсорбанце код ХМН болесника и контрола (***) $p < 0,001$)

4.7. Експресија iNOS у гранулоцитима

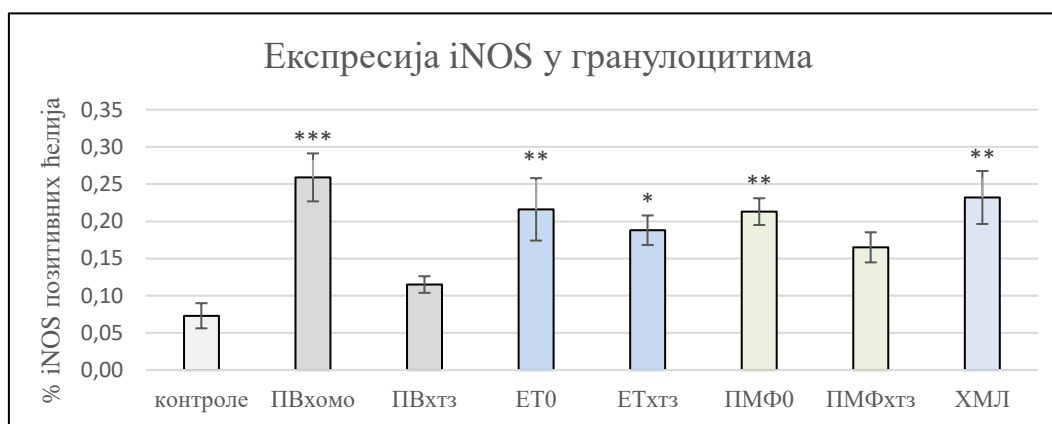
Имуноцитохемијском методом испитана је експресија iNOS у гранулоцитима болесника и одговарајућих контрола. Процент iNOS позитивних ћелија био је значајно већи код болесника од ПВ ($p < 0,05$), ЕТ ($p < 0,01$) ПМФ ($p < 0,05$) и ХМЛ ($p < 0,01$) у поређењу са здравим испитаницима. Пратећи истовремено експресију *JAK2V617F* гена и iNOS у гранулоцитима регистрован је пораст позитивних ћелија у свим групама осим ПВхтз и ПМФхтз.



Графикон 23. Експресија у iNOS гранулоцитима ХМН болесника и здравих испитаника (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ у односу на контролу)



Слика 7. Експресија iNOS на цитоспиновима гранулоцита ХМН болесника и одговарајућих контрола.



Графикон 24. Експресија у iNOS гранулоцитима ХМН болесника и здравих испитаника у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ у поређењу са контролом).

Код ПВ пацијената значајна разлика у експресији детектована је између хомозитних и хетерозиготних носиоца мутације ($p = 0.001$). Ова разлика је у складу са позитивном корелацијом која постоји између броја iNOS позитивних ћелија и степена *JAK2V617F* мутације ($r = 0.871$, $p = 0.000$).

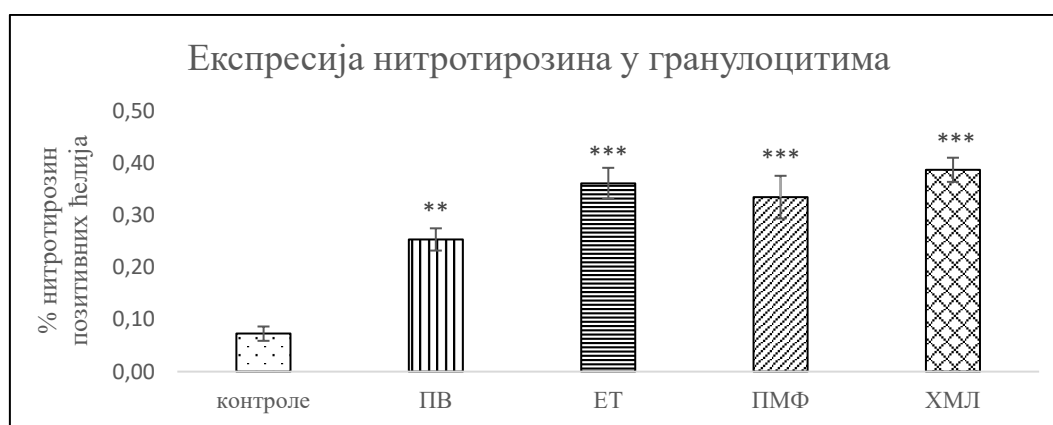
Експресија iNOS у гранулоцитима позитивно је корелирала и са концентрацијом NOx у плазми свих испитаника ($r=0,358$, $p < 0,05$).

Табела 6. Корелација између експресије iNOS у гранулоцитима и степена *JAK2V617F* мутације код ХМН болесника, односно експресије iNOS у гранулоцитима и концентрације NOx у плазми код свих испитаника.

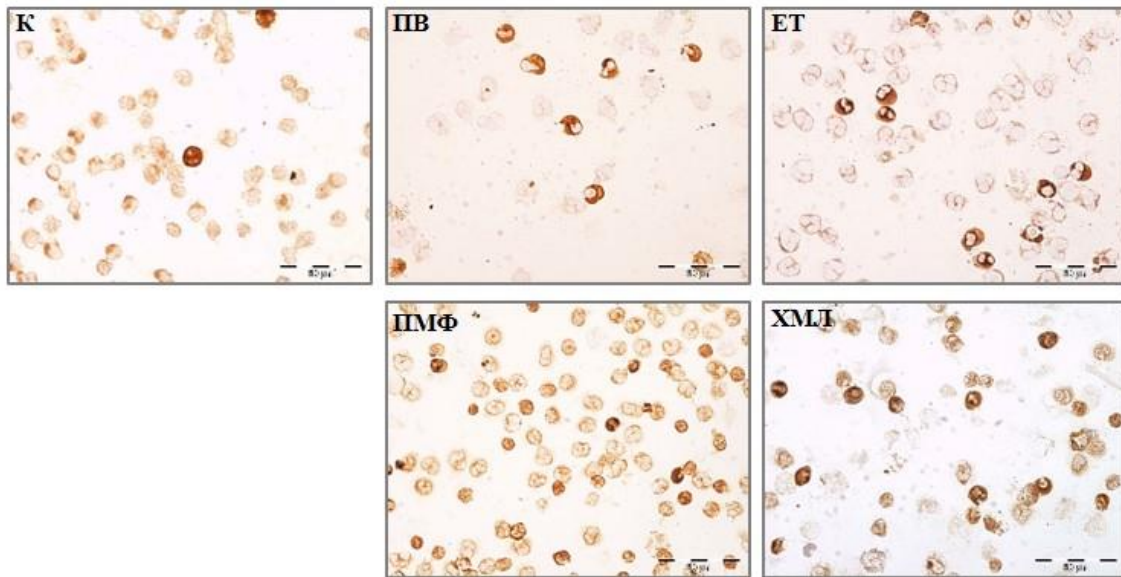
	Коефицијент корелације (r)	p
JAK2V617F мутација	0,871	=0,000
концентрација NOx у плазми	0,358	<0,05

4.8. Експресија нитротирозина у гранулоцитима

На цитоспиновима гранулоцита болесника и одговарајућих контрола испитана је експресија нитротирозинског антигена имуноцитохемијском методом. Анализом је утврђен повећани ниво експресије код оболелих од ПВ (p <0.01), ЕТ (p <0.001), ПМФ (p <0.001) и ХМЛ (p <0.001) у поређењу са контролама. Међу *Ph* ХМН болесницима ПВ група имала је значајно мањи број позитивних ћелија у односу на ЕТ и ПМФ (p <0.05).



Графикон 25. Експресија нитротирозина у гранулоцитима ХМН болесника и здравих испитаника (**p<0,01, ***p<0,001 у односу на контролу)



Слика 8. Експресија нитротирозина на цитоспиновима гранулоцита XMH болесника и одговарајућих контрола.

У гранулоцитима свих испитаника постоји позитивна корелација између експресије нитротирозина и iNOS ($r = 0.369$, $p < 0.05$), као и негативна корелација између активности SOD у еритроцитима и експресије нитротирозинског антигена у гранулоцитима ($r = -0,445$; $p < 0,05$).

Табела 7. Корелација између експресије нитротирозина и iNOS у гранулоцитима, односно активности SOD у еритроцитима испитаника.

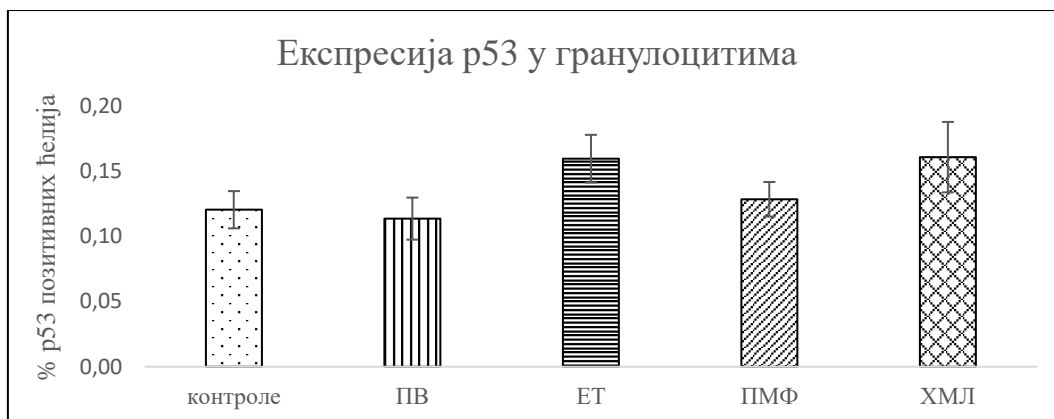
	Коефицијент корелације (r)	p
Експресија iNOS у гранулоцитима	0,369	<0,05
Активност SOD у еритроцитима	-0,445	<0,05

Болесници са дијагнозом ЕТ имали су најслабију активност SOD што је било у негативној корелацији ($r = -0.837$, $p < 0.05$) са високим процентом нитротирозин-позитивних ћелија код ових болесника.

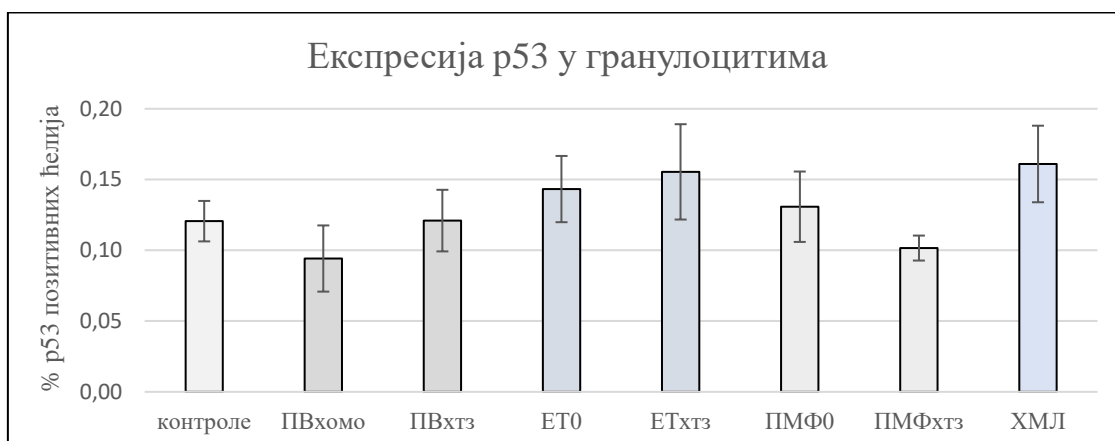
4.9. Експресија p53 у гранулоцитима

Методом имуноцитохемије испитивана је експресија проапоптотског протеина у гранулоцитима периферне крви. Процент позитивних ћелија код болесника био је сличан броју позитивних ћелија код здравих контрола. Иако је запажен тренд смањења експресије p53 код ПВ хомозигота и ПМФ хетерозигота,

експресија се није статистички значајно разликовала међу испитаницима у односу на дијагнозу или присуство *JAK2V617F* мутације.



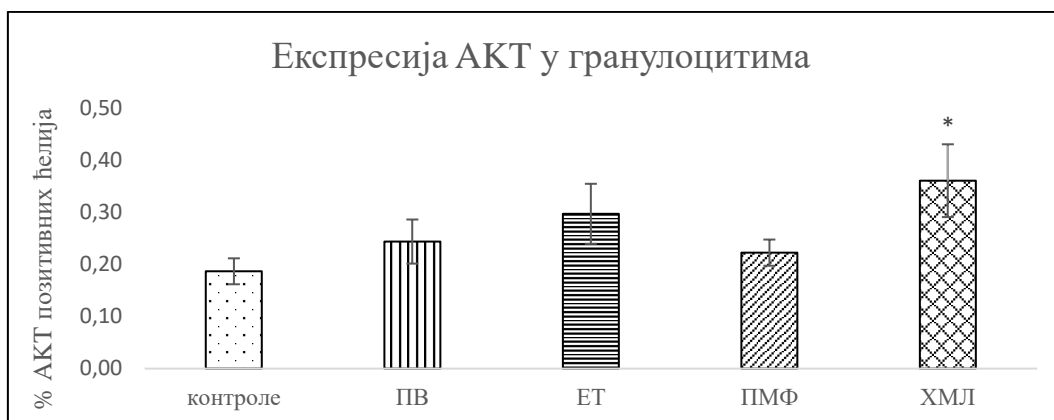
Графикон 26. Експресија p53 антигена у гранулоцитима ХМН болесника и контрола



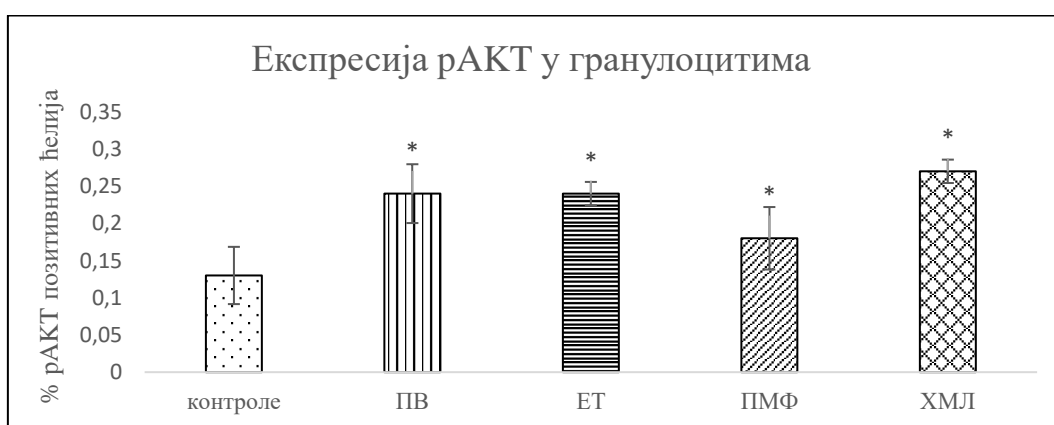
Графикон 27. Експресија p53 антигена у гранулоцитима ХМН болесника и контрола у односу на степен *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације.

4.10. Експресија АКТ и pАКТ у гранулоцитима

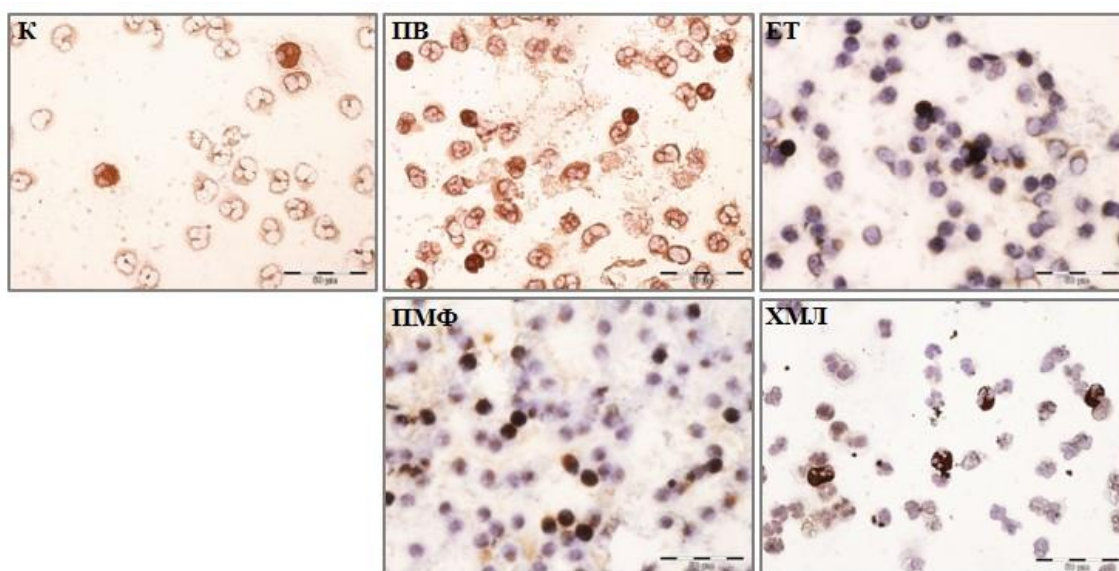
Експресија укупне и фосфорилисане форме АКТ испитивана је на цитоспиновима гранулоцита имуноцитохемијском методом. Повећан број АКТ-позитивних ћелија имали су ХМЛ болесници ($p < 0,05$). Процент фосфорилисане форме АКТ био је повећан код свих испитаника са дијагнозом ХМН у поређењу са контролом ($p < 0,05$). У односу на *JAK2V617F* мутацију већа експресија детектована је код ЕТ групе болесника без мутације ($p < 0,05$).



Графикон 28. Експресија АКТ киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$ у односу на контролу)

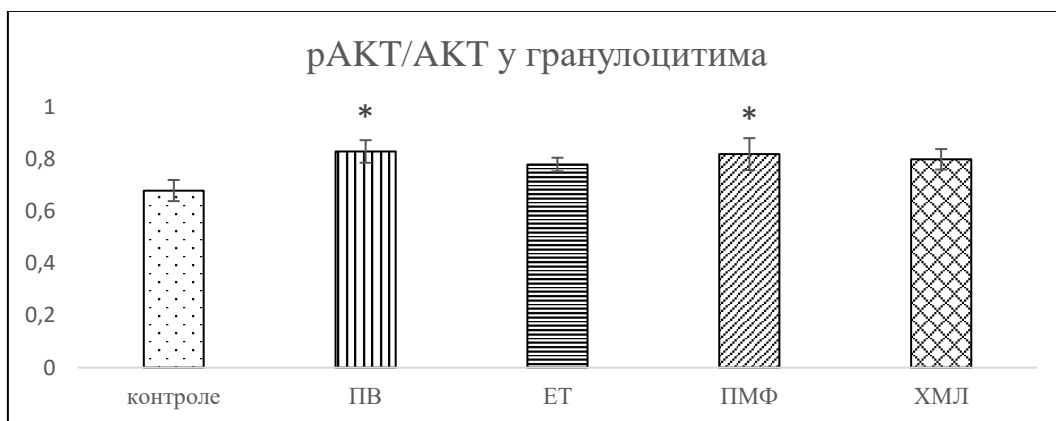


Графикон 29. Експресија рАКТ киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$ у односу на контролу)

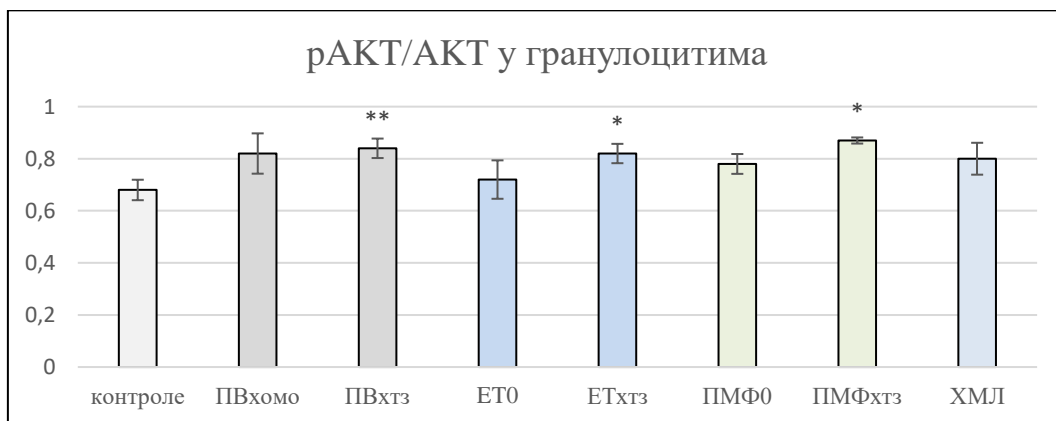


Слика 9. Експресија рАКТ на цитоспиновима ХМН болесника и здравих контрола.

Активација АКТ киназе најбоље се осликава односом фосфорилисане и укупне форме овог ензима, рАКТ/АКТ. Имуноцитохемијском методом повећани степен активације у односу на контролну групу утврђен је код болесника са ПВ и ПМФ ($p < 0,05$). Како је показано анализом присуства *JAK2V617F* мутације повећаној активацији допринели су хетерозиготни носиоци мутације: ПВхтз ($p < 0,01$) и ЕТхтз и ПМФхтз ($p < 0,05$).



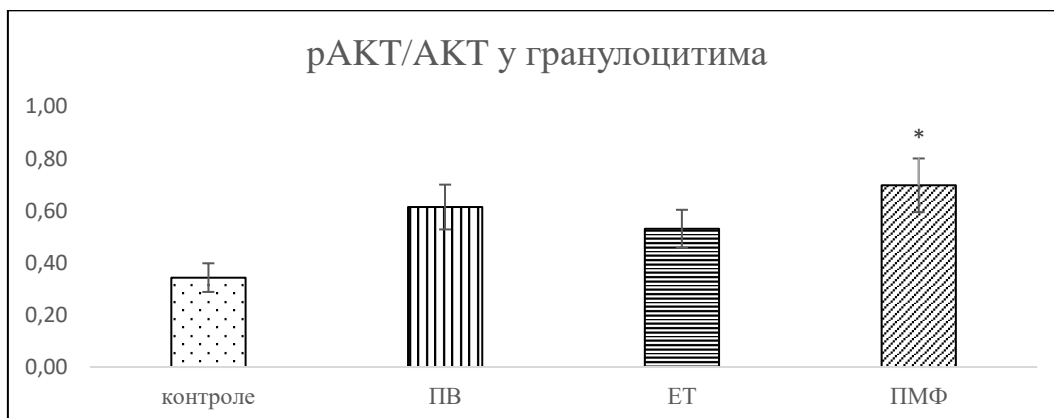
Графикон 30. Процент активне форме АКТ киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$ у односу на контролу)



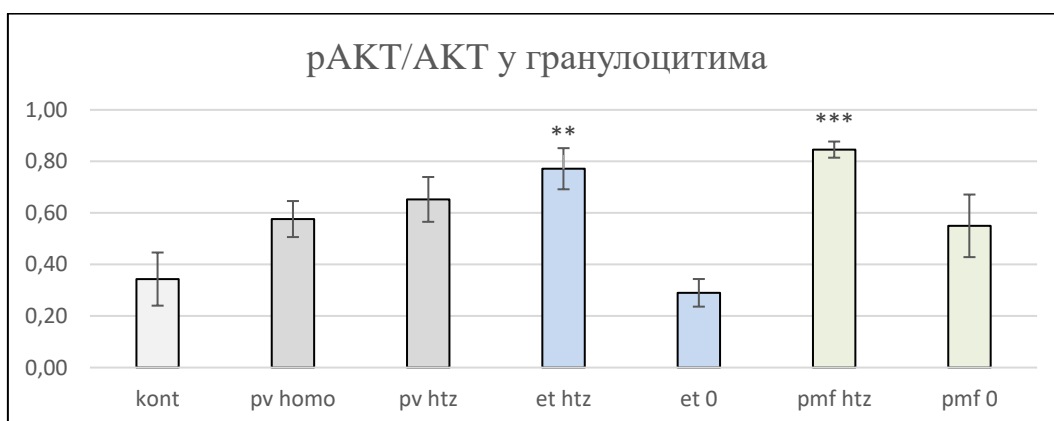
Графикон 31. Процент активне форме АКТ киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола у односу на степен *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, у поређењу са контролом)

Исти тренд међу *Rh* ХМН испитаницима имале су промене односа рАКТ/АКТ добијене Western blot методом при чему је значајна разлика у активацији киназе детектована код ПМФ ($p < 0,05$), односно ЕТхтз ($p < 0,01$) и ПМФхтз ($p < 0,001$) болесника. У групама болесника са дијагнозом ЕТ и ПМФ било

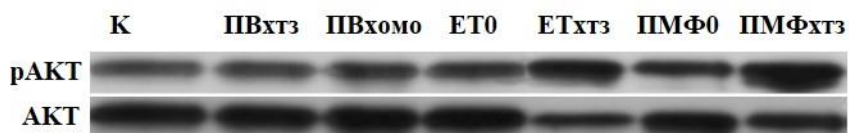
је значајне разлике у зависности од присуства *JAK2* мутације (ЕТхтз/ЕТ0, $p < 0,01$; ПМФхтз/ПМФ0, $p < 0,05$).



Графикон 32. Процент активне форме АКТ киназе у гранулоцитима Рh⁺ХМН болесника и контрола одређен Western blot методом (* $p < 0,05$ у односу на контролу)



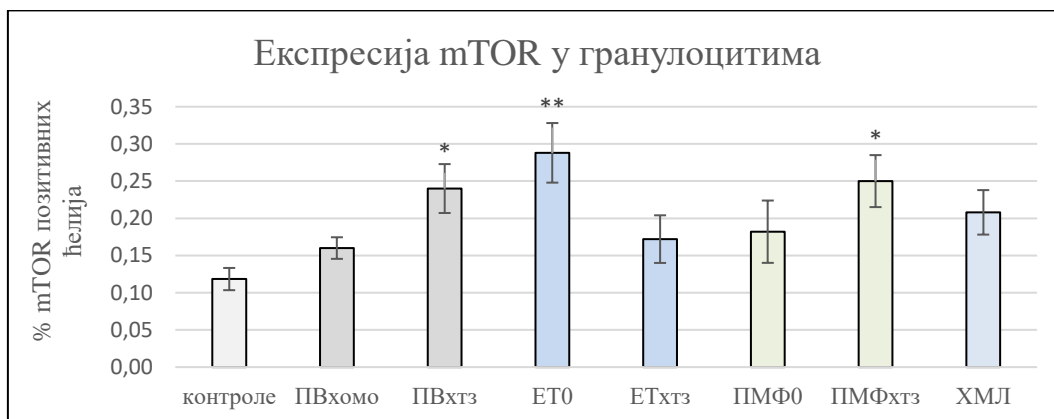
Графикон 33. Процент активне форме АКТ киназе у гранулоцитима Рh⁺ХМН болесника и контрола у односу на степен *JAK2V617F* мутације (хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације) одређен Western blot методом (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, у поређењу са контролом).



Слика 10. Експресија АКТ и рАКТ у гранулоцитима ХМН болесника и контрола

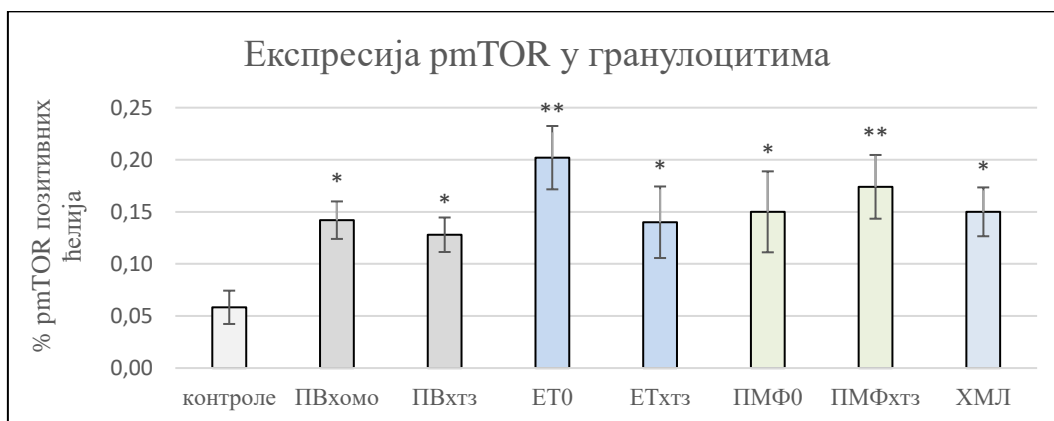
4.11. Експресија mTOR и pmTOR у гранулоцитима

Бојењем цитоспинава гранулоцита имуноцитохемијском методом показана је повећана експресија укупног mTOR код свих болесника са дијагнозом Ph ХМН (ЕТ, $p < 0,01$; ПВ и ПМФ $p < 0,05$). Унутар група број позитивних ћелија повећан је код ПВ и ПМФ хетерозигота ($p < 0,05$), односно код ЕТ болесника без *JAK2V617F* мутације ($p < 0,01$).



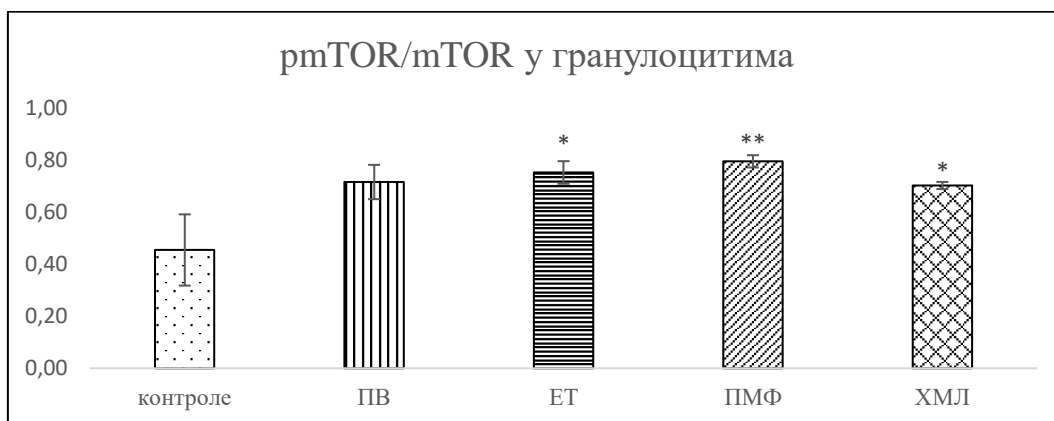
Графикон 34. Експресија укупне mTOR киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, у поређењу са контролом).

Фосфорилисана форма ензима повећано се експримира у свим групама ХМН (ЕТ, $p < 0,001$; ПМФ, $p < 0,01$; ПВ и ХМЛ $p < 0,05$). Присуство *JAK2V617F* мутације у гранулоцитима није имало утицаја на број pmTOR-позитивних ћелија.

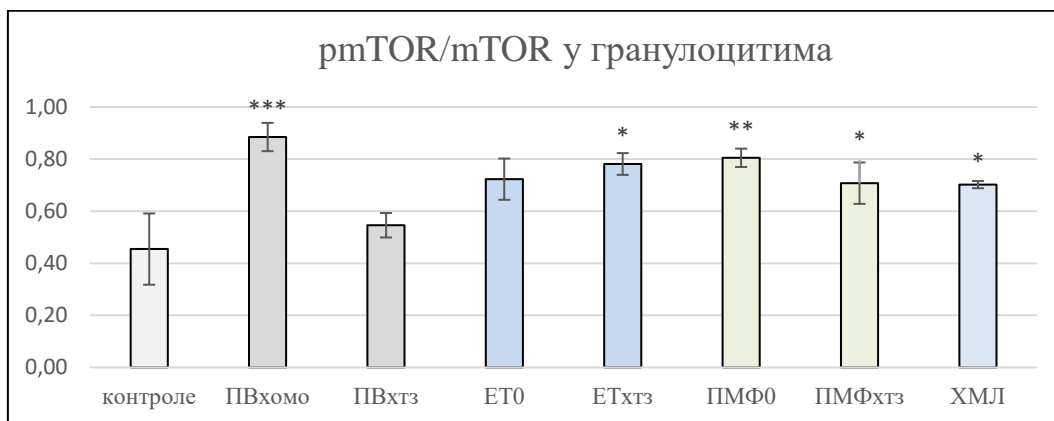


Графикон 35. Експресија pmTOR киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, у поређењу са контролом).

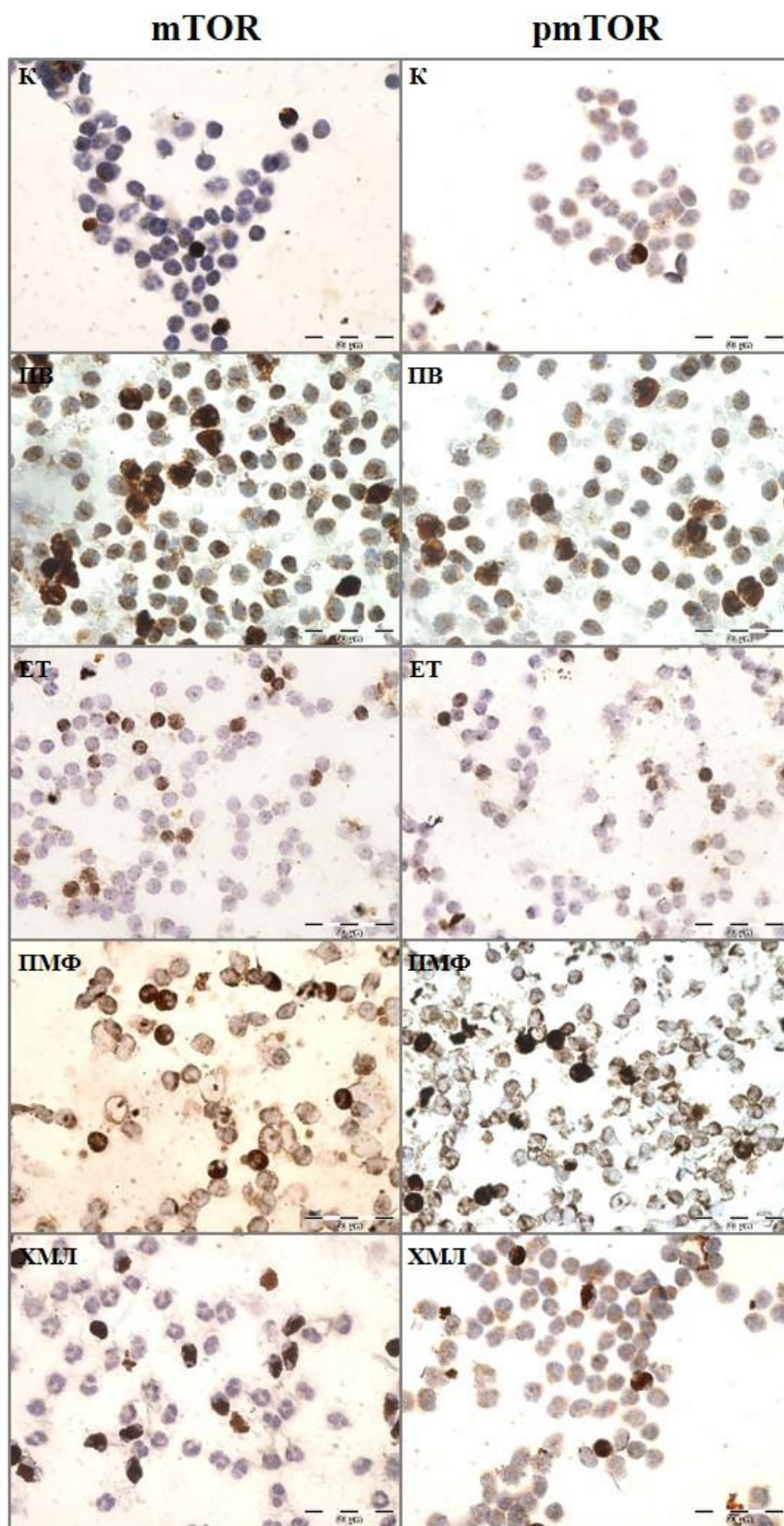
Степен активације киназе представљен као однос $p\text{mTOR}/\text{mTOR}$ показао је да од укупно присутног mTOR повећану активацију у поређењу са контролама имају сви болесници осим оних са дијагнозом ПВ. У овој групи значајна разлика у активности киназе постоји у зависности од степена *JAK2V617F* мутације, при чему већи степен мутације означава и појачану активацију ($p < 0,01$). Поред тога, активност mTOR повећана је код ХМЛ ($p < 0,05$), ЕТ хетерозигота ($p < 0,05$) и ПМФ са и без мутације ($p < 0,05$; $p < 0,01$).



Графикон 36. Степен активације mTOR киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ у односу на контролу)



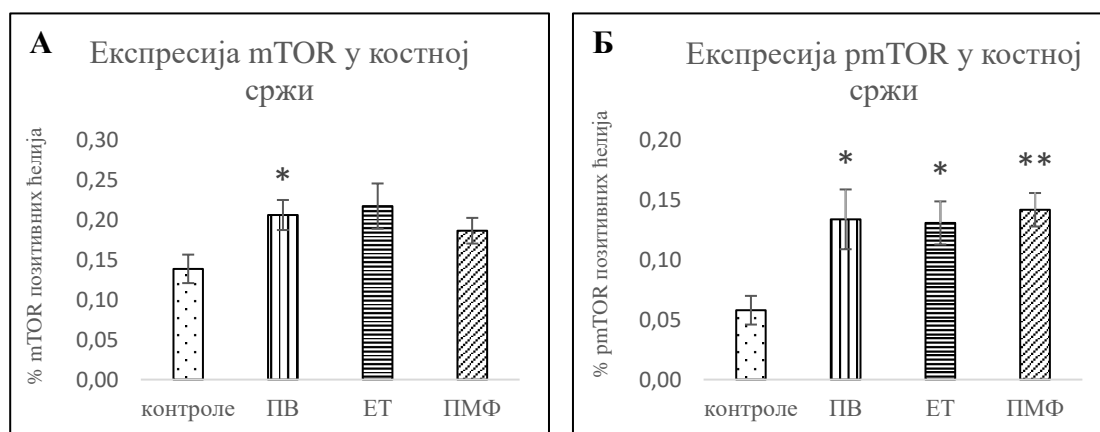
Графикон 37. Степен активације mTOR киназе у гранулоцитима ХМН болесника и контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, у поређењу са контролом).



Слика 11. Експресија mTOR и p-mTOR на цитоспиновима ХМН болесника и здравих испитаника

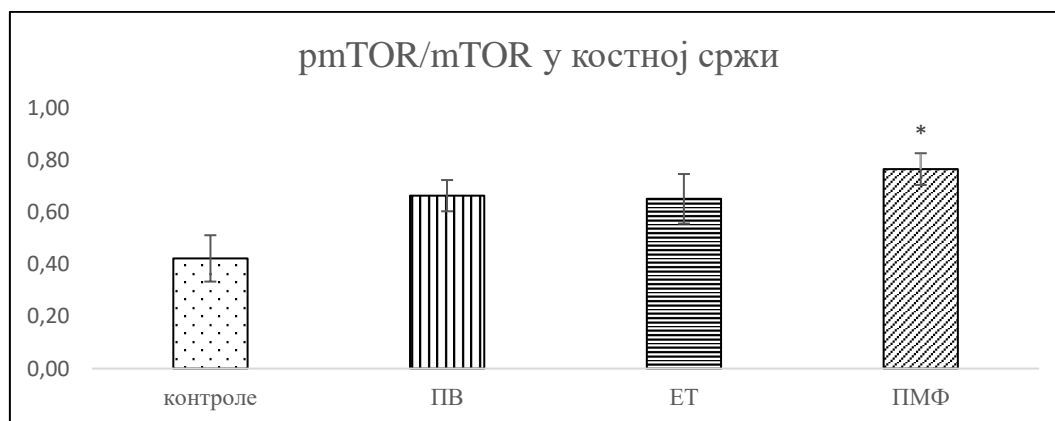
4.12. Експресија mTOR и pTmTOR у костној сржи

Имунохистохемијском методом на пресецима костне сржи повећани број mTOR позитивних ћелија, у односу на контроле, детектован је код оболелих од ПВ ($p < 0,05$). Супротно овоме, сви испитаници са дијагнозом Ph-ХМН имали су већу експресију фосфорилисане форме киназе у поређењу са здравима (ПВ, $p < 0,05$; ЕТ, $p < 0,05$; ПМФ, $p < 0,01$).

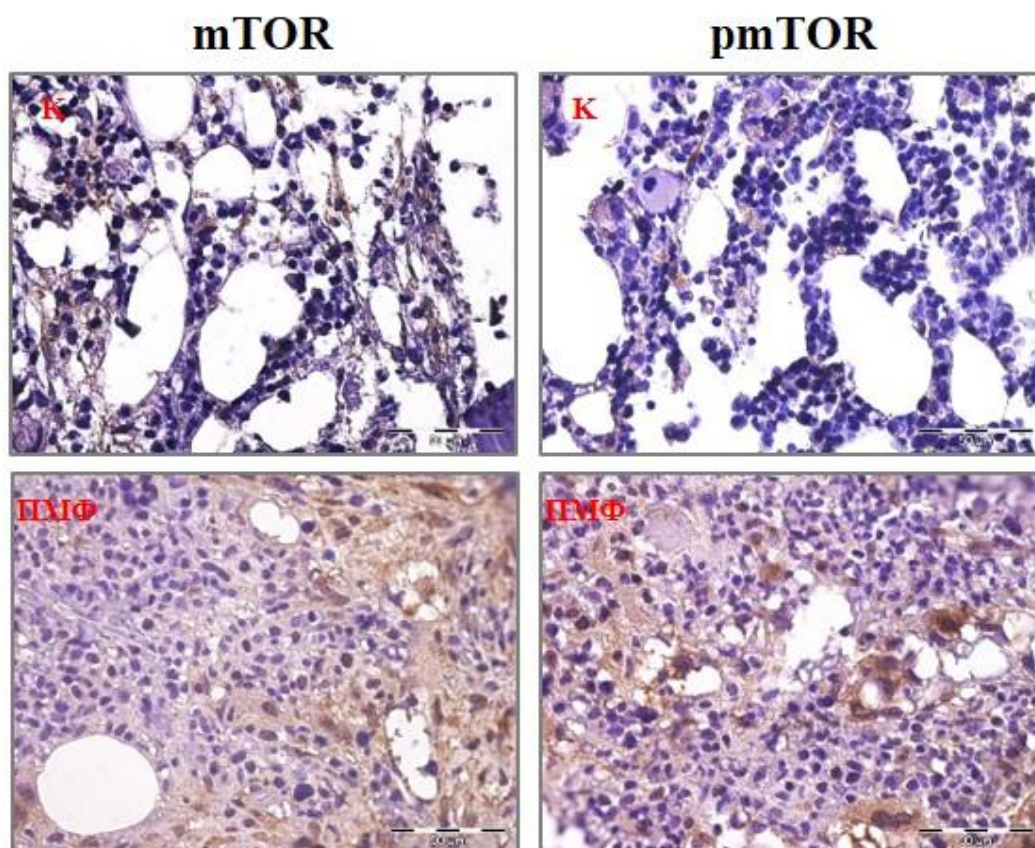


Графикон 38. Експресија mTOR (А) и pTmTOR (Б) у ћелијама костне сржи код Ph-ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ у односу на контролу)

Процент активне форме mTOR у односу на укупно експримирану (pTmTOR/mTOR) повећан је једино код ПМФ ($p < 0,05$).



Графикон 39. Степен активације mTOR киназе у у ћелијама костне сржи код Ph-ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$, у односу на контролу)



Слика 12. Експресија pmTOR и mTOR у ћелијама костне сржи контрола и ПМФ болесника.

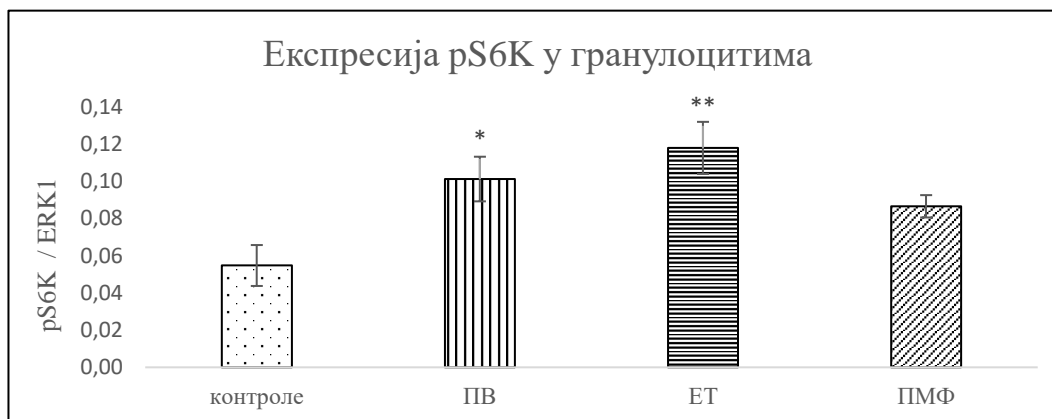
Даљом анализом утврђена је позитивна корелација између односа pmTOR/mTOR у костној сржи и експресије pmTOR ($r=0.590$, $p<0.01$) односно pmTOR/mTOR ($r=0.464$, $p<0.05$) у гранулоцитима.

Табела 8. Корелација између активности mTOR у костној сржи и гранулоцитима.

	Коефицијент корелације (r)	p
pmTOR у гранулоцитима	0,590	<0,01
pmTOR/mTOR у гранулоцитима	0,464	<0,05

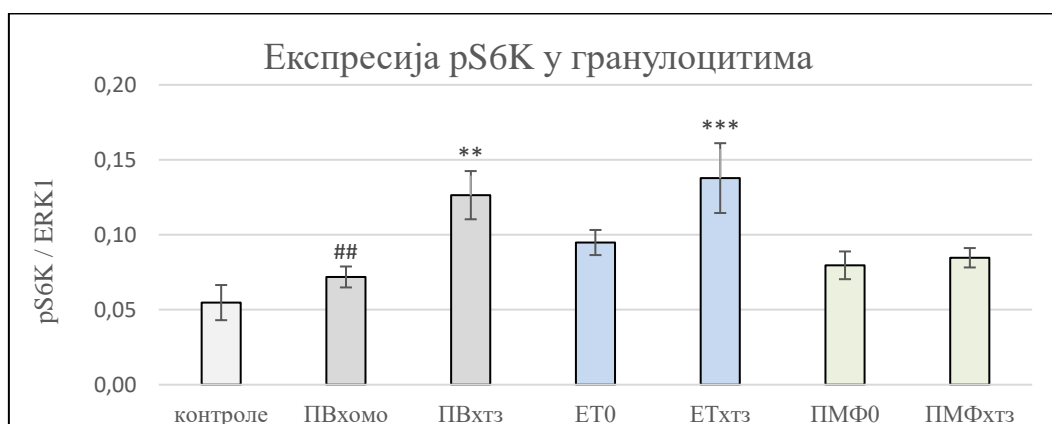
4.13. Експресија pS6K у гранулоцитима

Western blot методом испитана је експресија активне форме S6K у гранулоцитима пацијената и одговарајућих контрола. Највећу експресију имали су ЕТ ($p < 0,01$), а затим ПВ болесници ($p < 0,05$).

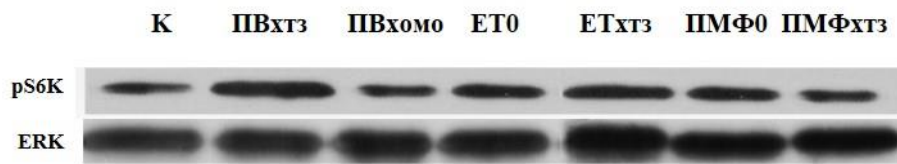


Графикон 40. Експресија pS6K гранулоцитима *Ph*-ХМН болесника и контрола (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ у односу на контролу)

У овим групама активност киназе била је најизраженија код хетерозиготних носилаца *JAK2V617F* мутације (ПВхтз, $p < 0,01$; ЕТхтз, $p < 0,001$), при чему се код оболелих од ПВ експресија pS6K значајно разликовала у односу на степен *JAK2V617F* мутације (ПВхтз / ПВхомо, $p < 0,01$). Код испитаника са ПМФ није било значајне разлике у поређењу са здравима.



Графикон 41. Експресија pS6K гранулоцитима *Ph*-ХМН болесника и контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у поређењу са контролом; ## $p < 0,01$ у поређењу са ПВхтз).



Слика 13. Експресија pS6K у гранулоцитима ХМН болесника и здравих контрола. у односу на присуство *JAK2V617F* мутације: хомо-хомозигот; хтз-хетерозигот; 0-без мутације.

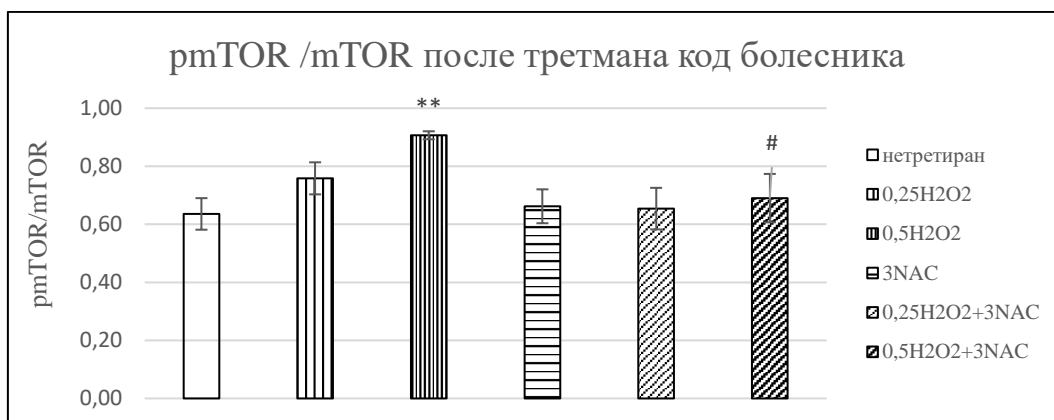
Експресија pS6K позитивно је корелирала са експресијом pmTOR ($r=0.325$, $p<0.05$) и активацијом АКТ (pАКТ/АКТ, $r=0.359$, $p<0.05$) у гранулоцитима.

Табела 9. Корелација између експресије pS6K и pmTOR, односно степена активације АКТ (pАКТ/АКТ) у гранулоцитима.

	Коефицијент корелације	p
pmTOR	0,325	<0,05
pАКТ/АКТ	0,359	<0,05

4.14. Активност mTOR у гранулоцитима након третмана водоник пероксидом и антиоксидансом

На цитоспиновима гранулоцита болесника и здравих контрола имуноцитохемијском методом испитана је експресија укупног и фосфорилисаног mTOR. Након тридесетоминутног третмана са две дозе H_2O_2 показано је да концентрација од 0,5mM повећава активност mTOR у поређењу са нетретираним групом ($p<0,01$). У гранулоцитима болесника претретман са NAC-ом поништава ово стимулационо деловање ($p<0,05$), док сам NAC нема утицаја на активност mTOR.



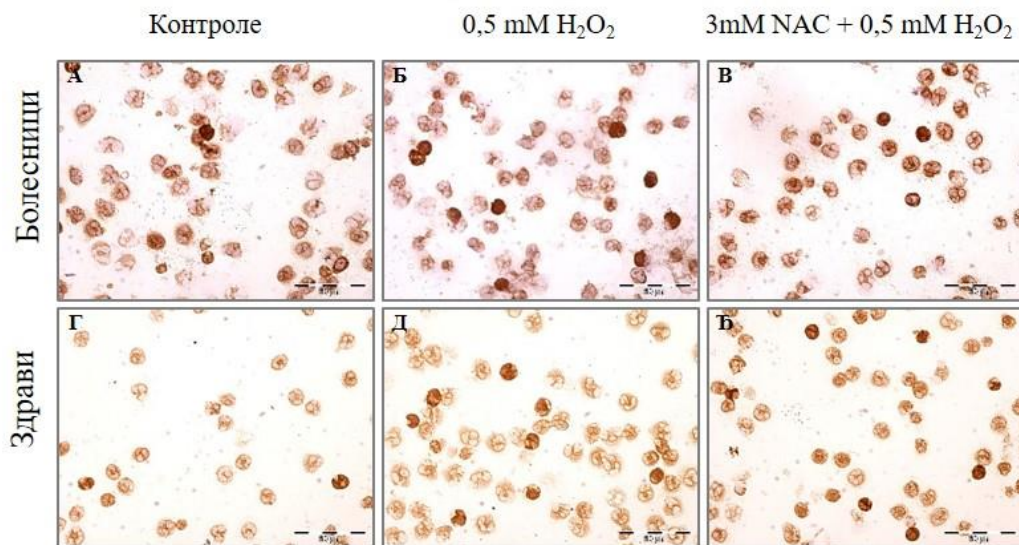
Графикон 42. Степен активације mTOR у гранулоцитима болесника након третмана са H₂O₂ (0,25 mM, 0,5 mM) и NAC (3 mM) (**p<0,01, у односу на контролу; #p<0,05 у односу на 0,5 mM H₂O₂).

Код здравих испитаника третман са 0,5 mM H₂O₂ има исти ефекат на активацију mTOR киназе али и након претретмана NAC-ом однос pmTOR/mTOR у гранулоцитима већи је у поређењу са нетретираном групом (p<0,01). Неутрализација ендогених оксиданаса (третман NAC-ом) такође делује стимулативно на mTOR (p<0,05).



Графикон 43. Степен активације mTOR у гранулоцитима здравих испитаника након третмана са H₂O₂ (0,25 mM, 0,5 mM) и NAC (3 mM) (*p<0,05, **p<0,01, у односу на контролу).

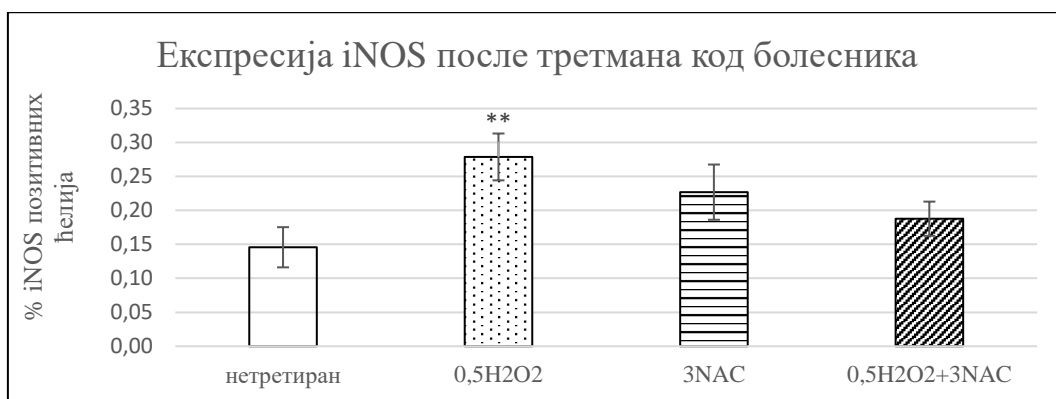
Резултати ових експеримената указују на стимулативно деловање H₂O₂ на mTOR киназу у гранулоцитима, али и на различиту сензитивност ензима приликом промене редокс стања код здравих и болесних.



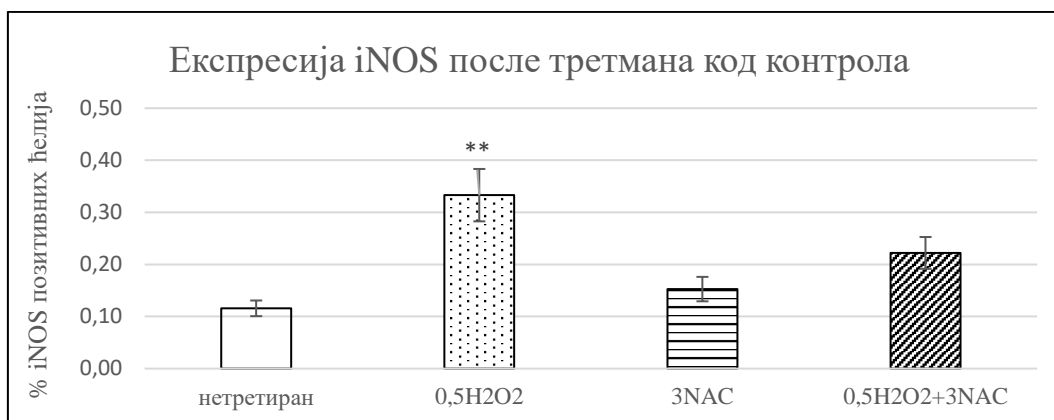
Слика 14. Експресија pTOR на цитоспиновима гранулоцита ХМН болесника и контрола после третмана са 0,5 mM H₂O₂ и 3 mM NAC.

4.15. Експресија iNOS у гранулоцитима након третмана водоник пероксидом и антиоксидансом

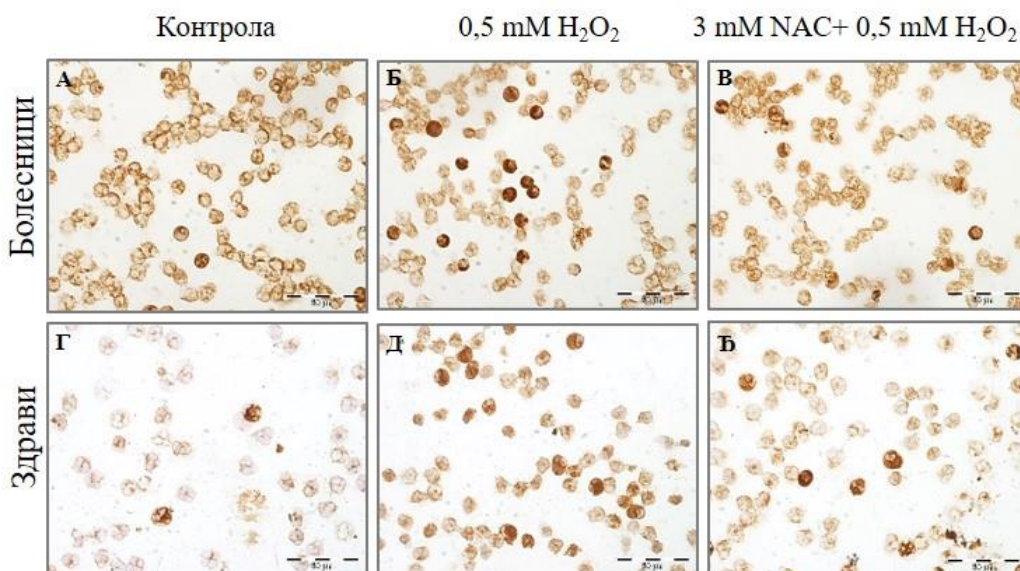
Након изолације и краткотрајног боравка у култури гранулоцити су третирани са 0,5 mM H₂O₂ и 3 mM NAC. Урађена су два експеримента са групом здравих испитаника и ХМН болесницима. У оба случаја H₂O₂ је довео до значајног повећања броја iNOS позитивних ћелија (p<0,01). Након претретмана са NAC-ом изостаје стимулативно деловање H₂O₂. Сам NAC је такође био без утицаја на експресију iNOS у гранулоцитима.



Графикон 44. Експресија iNOS у гранулоцитима ХМН болесника након третмана са H₂O₂ (0,5 mM) и NAC (3 mM) (**p<0,01, у односу на контролу).



Графикон 45. Експресија iNOS у гранулоцитима здравих испитаника након третмана са H₂O₂ (0,5 mM) и NAC (3 mM) (**p<0,01, у односу на контролу).



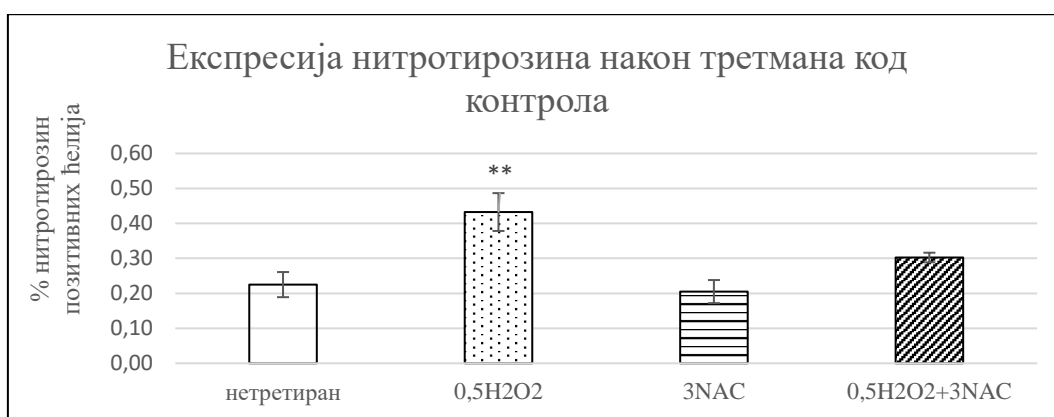
Слика 15. Експресија iNOS на цитоспиновима гранулоцита ХМН болесника и контрола после третмана са 0,5 mM H₂O₂ и 3 mM NAC.

4.16. Експресија нитротирозина у гранулоцитима након третмана водоник пероксидом и антиоксидансом

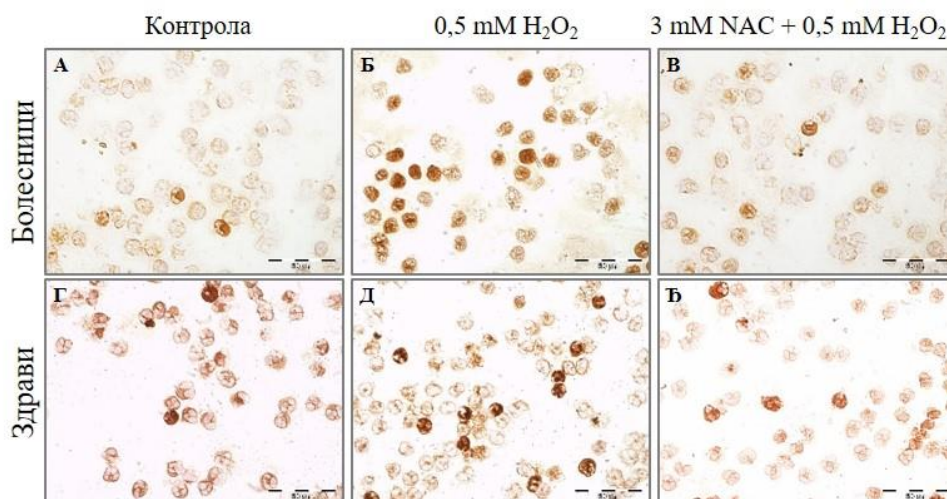
Након третмана водоник пероксидом и 3 mM NAC-ом цитоспинови гранулоцита употребљени су за имуноцитохемијску детекцији нитротирозина. Показано је да 0,5 mM H₂O₂ стимулативно делује на експресију нитротирозина код здравих (p<0,01) и код болесника (p<0,001). У групи оболелих NAC значајно смањује ово деловање H₂O₂ (p<0,01).



Графикон 46. Експресија нитротирозина у гранулоцитима ХМН болесника након третмана са H₂O₂ (0,5 mM) и NAC (3 mM) (***)p<0,001, у односу на контролу; ##p<0,01 у односу на 0,5 mM H₂O₂).



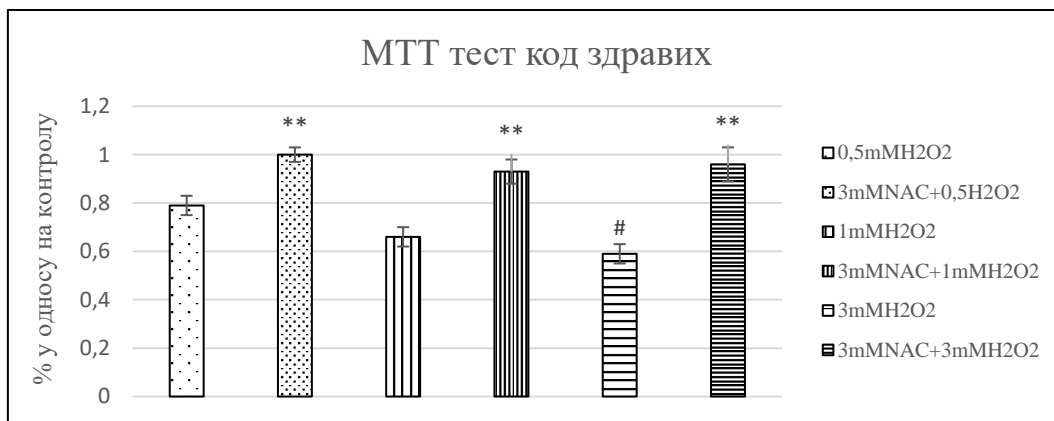
Графикон 47. Експресија нитротирозина у гранулоцитима здравих испитаника након третмана са H₂O₂ (0,5 mM) и NAC (3 mM) (**p<0,01, у односу на контролу).



Слика 16. Експресија нитротирозина на цитоспиновима гранулоцита ХМН болесника и контрола после третмана са 0,5 mM H₂O₂ и 3 mM NAC.

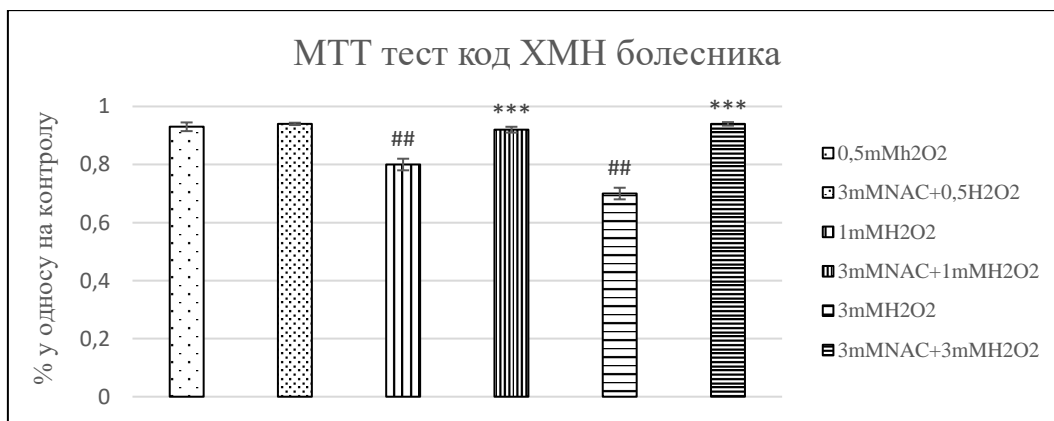
4.17. МТТ тест са гранулоцитима после третмана

У циљу провере цитотоксичног деловања H_2O_2 гранулоцити ХМН болесника и здравих испитаника третирали су различитим концентрацијама H_2O_2 (0,5 mM, 1 mM, 3mM) и 3 mM NAC.



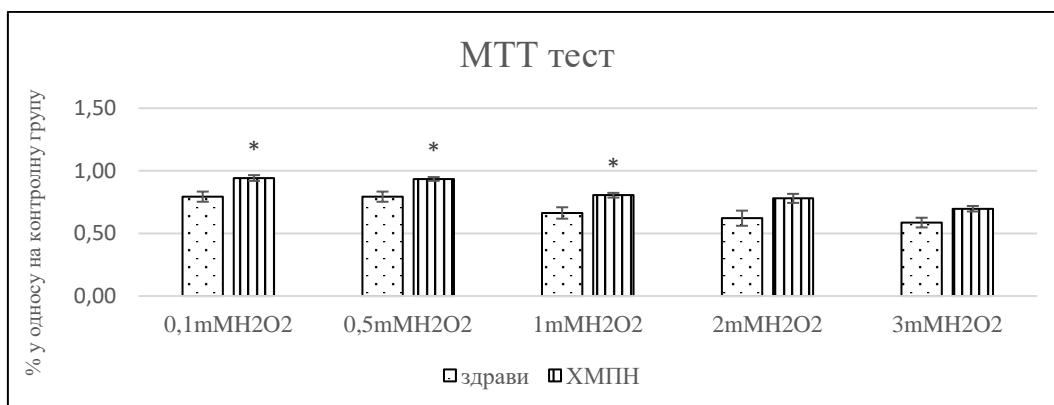
Графикон 48. Процент живих ћелија код контрола након третмана са H_2O_2 (0,5 mM, 1 mM, 3mM) и NAC (3 mM) (# $p < 0,05$ у односу на контролу; ** $p < 0,01$ у поређењу са групама без претретмана са 3 mM NAC)

Смањење броја живих ћелија са повећањем дозе H_2O_2 било је дозно зависно (здрави, ($p < 0,05$); болесници, ($p < 0,01$)) и имало је исти тренд у оба експеримента.). Претретман NAC деловао је цитопротективно и значајно је повећао број ћелија код здравих ($p < 0,01$) и болесника ($p < 0,001$).



Графикон 49. Процент живих гранулоцита код ХМН болесника након третмана са H_2O_2 (0,5 mM, 1 mM, 3mM) и NAC (3 mM) (## $p < 0,01$ у односу на контролу; *** $p < 0,001$ у поређењу са групама без претретмана са 3 mM NAC).

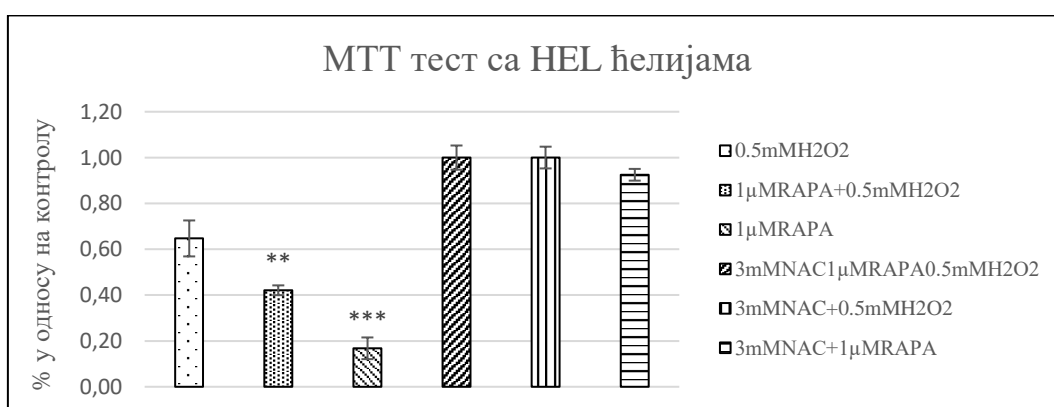
Гранулоцити болесника показали су већу отпорност на штетно деловање H_2O_2 што је при мањим дозама било високо значајно ($p < 0,05$).



Графикон 50. Однос живих гранулоцита између ХМН болесника и контрола након третмана са H_2O_2 (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM). (* $p < 0,5$, у односу на здраве испитанике)

4.18. МТТ тест са HEL ћелијама

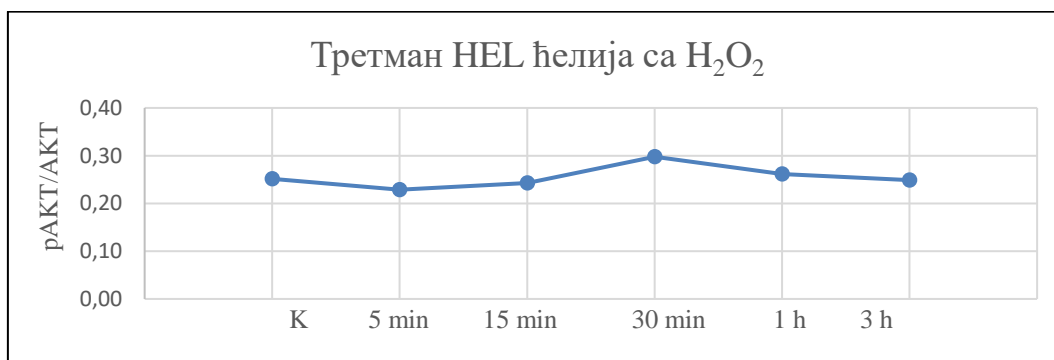
HEL ћелије третиране су једном дозом 0,5mM H_2O_2 и након 24 часа МТТ тестом испитиван је њихов вијабилитет. Као контрола служила је нетретирана група HEL ћелија. У групи третираној само H_2O_2 број ћелија смањено се за 40% у односу на контролу. Претретман рапамицином (1 μ M), инхибитором mTOR киназе, још више је потенцирао овај негативни тренд ($p < 0,01$). Доза рапамицина од 1 μ M довела је након 24 h до пада број ћелија за 80% ($p < 0,001$). NAC (3 mM) је имао цитопротективно дејство у овом експерименту, одржавајући број ћелија након третмана H_2O_2 приближно сличан контроли.



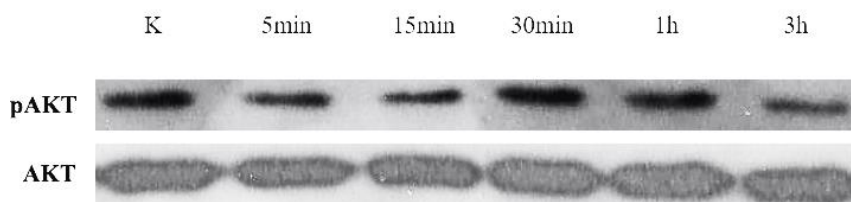
Графикон 51. Процент живих HEL ћелија након третмана (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у односу на контролу).

4.19. Утицај различитих третмана са H_2O_2 на активност АКТ/mTOR сигналног пута код HEL ћелија

У експерименту са HEL ћелијама испитана је динамика активације АКТ киназе након третмана са $0,5 \text{ mM } H_2O_2$ у временском интервалу од 0-3 h. Western blot методом одређена је протеинска експресија АКТ и pАКТ. Први одговор на примену H_2O_2 био је пад активности (5 мин.), максимална активност забележена је у 30. минути, да би се 1 сат после третмана вратила на почетне вредности.

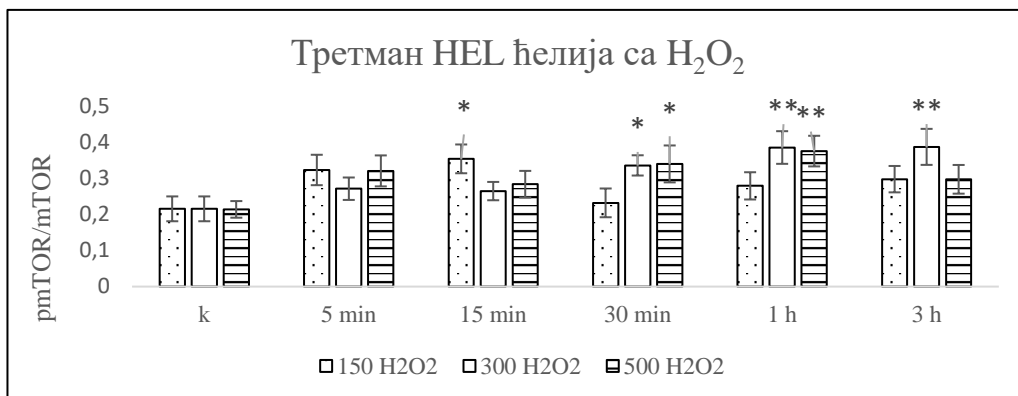


Графикон 52. Промена у степену активације АКТ (pАКТ/АКТ) након третмана са $0,5 \text{ mM } H_2O_2$ интервалу од 0-3 h

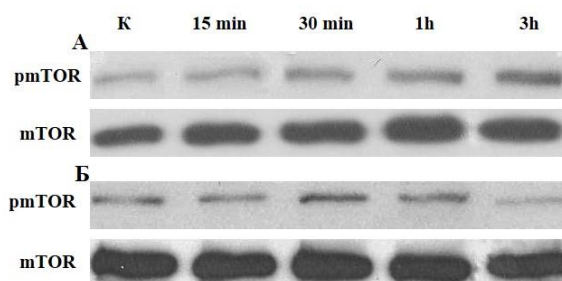


Слика 17. Експресија pАКТ и АКТ у HEL ћелијама након третмана са $0,5 \text{ mM } H_2O_2$ интервалу од 0-3 h.

Испитујући ефекат различитих концентрација H_2O_2 ($150 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$) на активност mTOR киназе показали смо везу између дозе H_2O_2 и динамике активације киназе. H_2O_2 у концентрацији од $150 \mu\text{M}$ свој максимални ефекат постигао је после 15 минута ($p < 0,05$). Стимулативно деловање најмање концентрације H_2O_2 било је краткотрајно, до 30. минута, када је детектована повећана активација mTOR под утицајем $300 \mu\text{M}$ и $500 \mu\text{M } H_2O_2$ ($p < 0,05$). Повећан однос pmTOR/mTOR постојао је 1 сат ($300 \mu\text{M}$ и $500 \mu\text{M } H_2O_2$, $p < 0,01$), односно 3 сата ($300 \mu\text{M}$, $p < 0,01$) од почетка третмана.

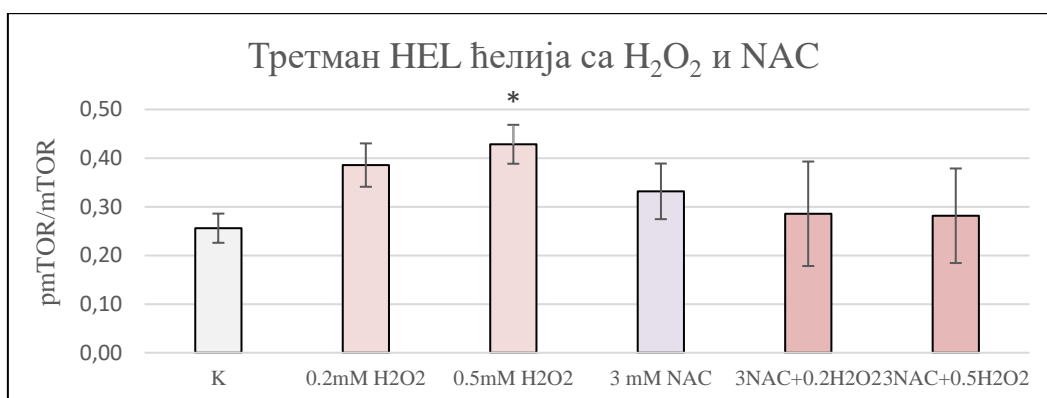


Графикон 53. Ефекат различитих доза H₂O₂ (150 μM, 300 μM, 500 μM) у временском интервалу од 0-3 h на активност mTOR у HEL ћелијама (*p<0,05; **p<0,01 у односу на контроле).

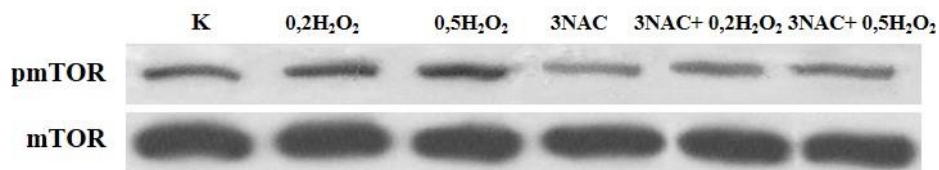


Слика 18. Експресија pmTOR и mTOR у HEL ћелијама након третмана са 300 μM H₂O₂ (А) и 500 μM H₂O₂ (Б) временском интервалу од 0-3 h

У експерименту HEL ћелије су третиране са H₂O₂ и NAC у трајању од 30 минута. Имуноблотом изолованих протеина одређена је експресија pmTOR и mTOR. Однос активне и укупне форме mTOR у односу на контролу повећан је након примене 0,5 mM H₂O₂ (*p<0,05). Претретман са NAC поништио је стимулаторни ефекат H₂O₂.

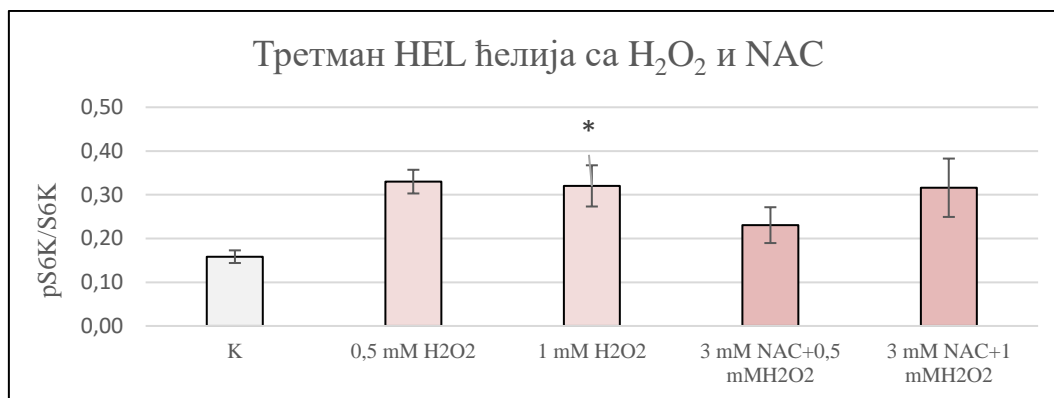


Графикон 54. Степен активације mTOR после третмана са H₂O₂ и NAC (*p<0,05 у односу на контролу)

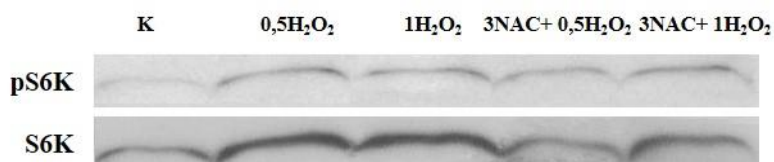


Слика 19. Експресија p-mTOR и mTOR у HEL ћелијама након третмана са 0,2 mM, 0,5mM H₂O₂ и 3 mM NAC.

Третман HEL ћелија у култури са 1 mM H₂O₂ имао је за последицу повећану активацију S6K (pS6K/S6K) 30 минута након примене H₂O₂ (p<0,05).



Графикон 55. Степен активације S6K (pS6K/S6K) после третмана са H₂O₂ и NAC (*p<0,05 у односу на контролу)

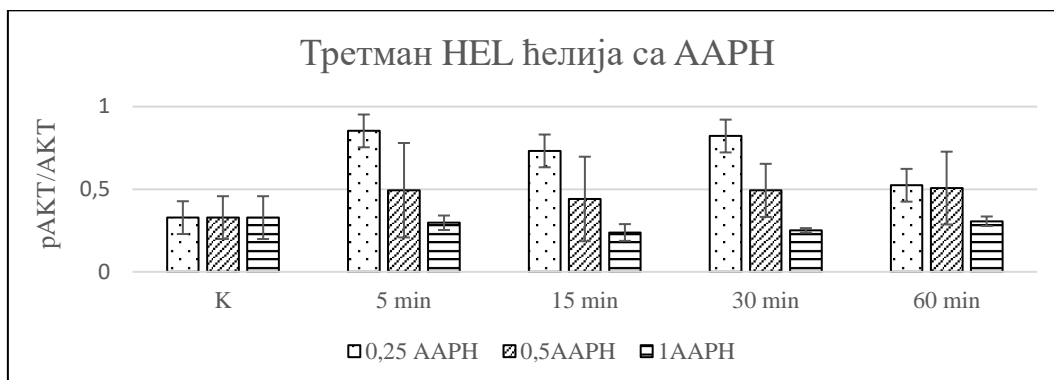


Слика 20. Експресија pS6K и S6K у HEL ћелијама после третмана са 0,5 mM H₂O₂, 1 H₂O₂ mM и 3 mM NAC.

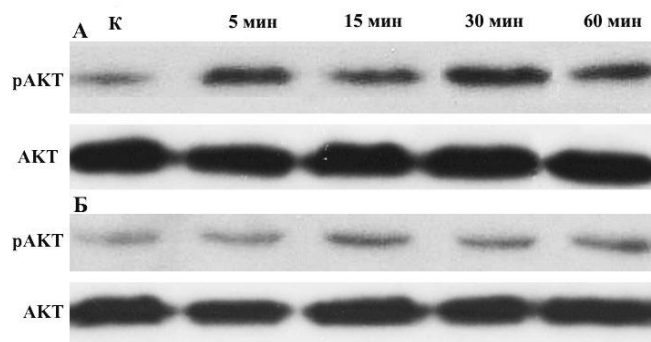
4.20. Утицај континуираног третмана са ААРН на активност АКТ/mTOR сигналног пута код HEL ћелија

У циљу испитивања континуираног деловања ROS на активност АКТ киназе HEL ћелије су третиране са 3 различите дозе ААРН (0,25mM, 0,5 mM, 1 mM) у трајању од 1 сата. Протеинска експресија показала је дозно-зависни пад активности при чему је ААРН у концентрацији 0,25 mM изазвао највећу активацију АКТ, док

је активност АКТ киназе након примене 1 mM ААРН била мања у односу на контролне вредности.

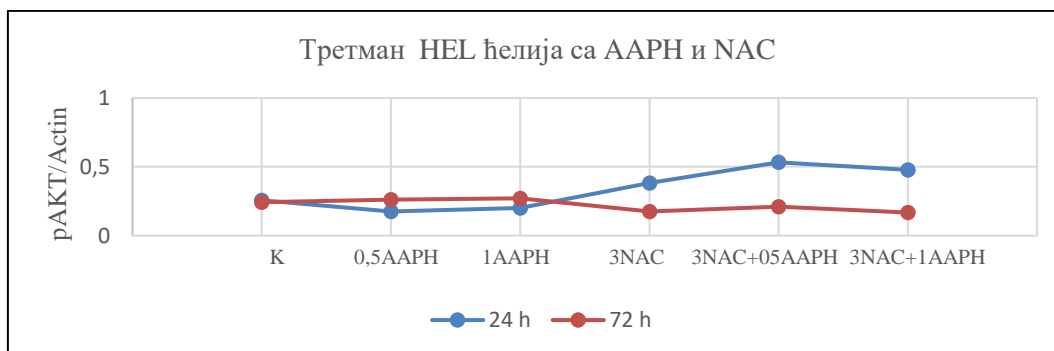


Графикон 56. Активација АКТ у HEL ћелијама након третмана различитим дозама ААРН (0,25mM, 0,5 mM, 1 mM).

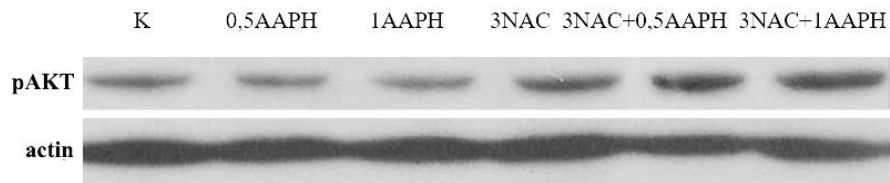


Слика 21. Експресија pAKT и АКТ у HEL ћелијама након третмана са 0,25mM ААРН (А) и 0,5 mM ААРН (Б) у трајању од 60 минута.

Утицај дуготрајног деловања ROS на АКТ киназу испитан је третманом HEL ћелија са ААРН и NAC у трајању од 24 и 72 h. Након 24 h, ААРН је довео до благог пада експресије pAKT док је антиоксиданс NAC имао супротни ефекат. После 72 h вредности pAKT у третираним групама биле су приближне вредностима код контрола.

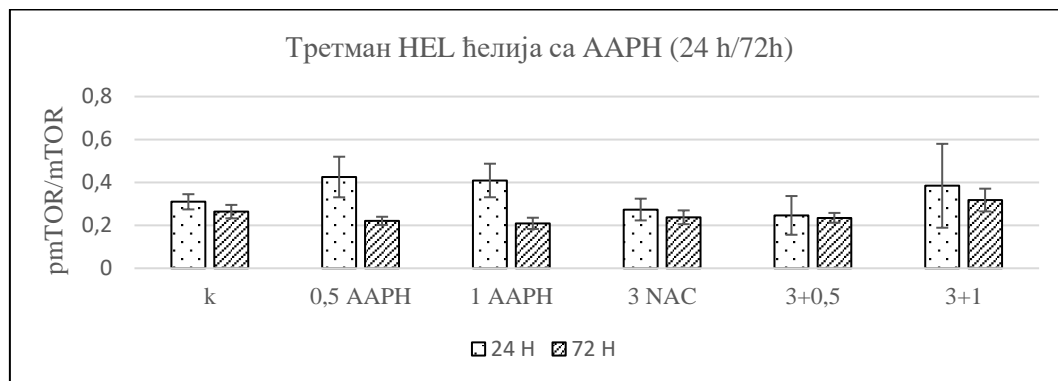


Графикон 57. Ефекат дуготрајног третмана са ААРН (0,5mM, 1 mM) и NAC (3mM) на експресију pAKT у HEL ћелијама.

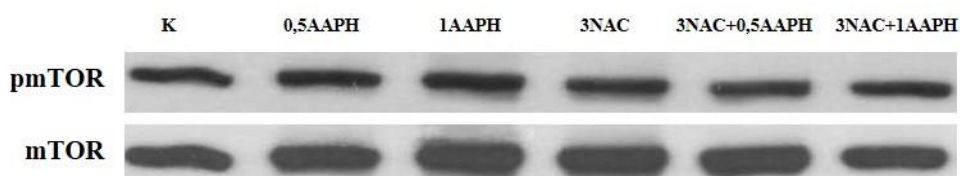


Слика 22. Експресија рАКТ и актина у HEL ћелијама 24 часа после третмана са 0,5mM ААРН, 1 mM ААРН и 3 mM NAC

У експерименту у коме смо испитивали утицај континуираног деловања ААРН на активност mTOR киназе имуноблот методом детектована је експресија mTOR и pmTOR у HEL ћелијама. Двадесетчетворочасовни третман довео је до благог повећања активности mTOR. После 72 h активност киназе била је нижа у односу на контролне вредности.

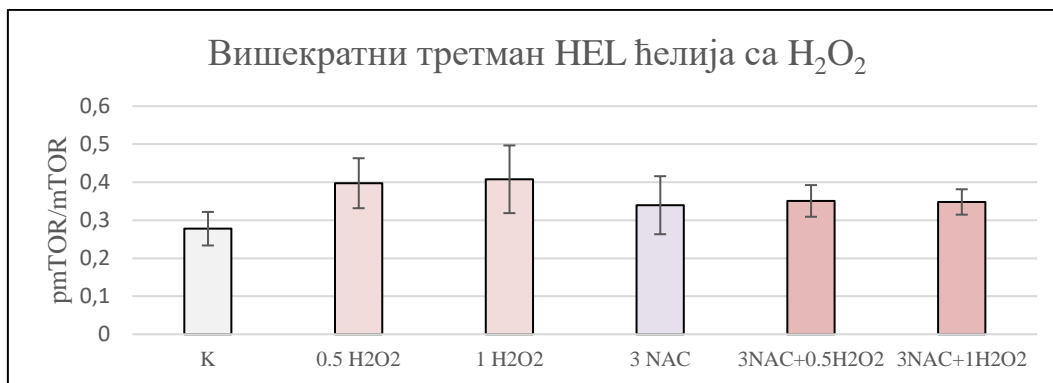


Графикон 58. Ефекат дуготрајног третмана са ААРН (0,5mM, 1 mM) и NAC (3mM) на активацију mTOR у HEL ћелијама.



Слика 23. Експресија pmTOR и mTOR у HEL ћелијама 24 часа после третмана са 0,5mM ААРН, 1 mM ААРН и 3 mM NAC.

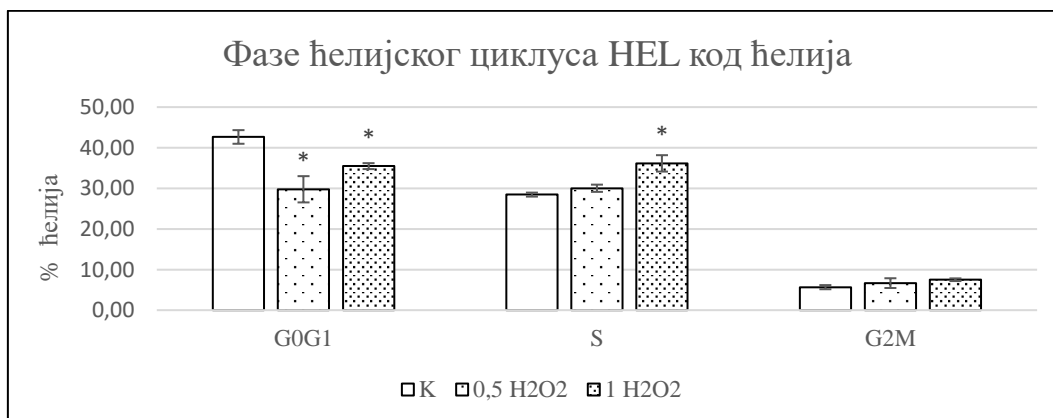
Вишекратни третман са H₂O₂ (0,5mM, 1 mM) и NAC (3 mM) није имао утицаја на активност mTOR киназе. Ћелије су третиране 3 пута у периоду од 24 сата, а затим је испитана протеинска експресија mTOR и pmTOR Western blot методом.



Графикон 59. Утицај вишекратне примене H₂O₂ (0,5mM, 1 mM) и NAC (3 mM) на активацију mTOR у HEL ћелијама

4.21. Испитивање ћелијског циклуса HEL ћелија FACS методом

Методом проточне цитометрије испитан је утицај 0,5 mM и 1mM H₂O₂ на ћелијски циклус HEL ћелија 48 h након примене. Том приликом регистрован је смањени број ћелија у мировању (G0G1 фаза, p<0,05) и повећан број ћелија у S фази (p<0,05) под утицајем H₂O₂.



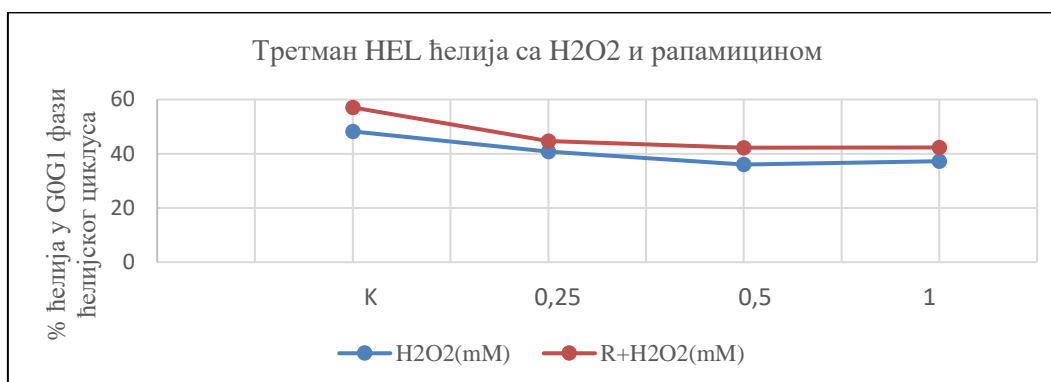
Графикон 60. Приказ фаза ћелијског циклуса код HEL ћелија након третмана са 0,5mM и 1 mM H₂O₂ (*p<0,05, у односу на контролу).

Поредећи ове вредности са активацијом mTOR (pmTOR/mTOR) у HEL ћелијама третираним са 1mM H₂O₂ утврђена је негативна корелација између броја ћелија у G0G1 фази (r=-0,591, p<0,05), односно позитивна корелација између броја ћелија у S (r=0,854, p<0,001) и G2M фази (r=0,646, p<0,05).

Табела 10. Корелација активности mTOR (pmTOR/mTOR) у HEL ћелијама са фазама ћелијског циклуса након третмана са 1 mM H₂O₂

Фазе ћелијског циклуса	Коефицијент корелације (r)	p
G0G1	-0,591	0,043
S	0,854	0,001
G2M	0,646	0,043

Претретман рапамицином (500 nM) смањио је ефекат H₂O₂ на проценат ћелија у G0G1 фази у култури.



Графикон 61. Промена броја HEL ћелија у G0G1 фази ћелијског циклуса након третмана са H₂O₂ или са рапамицином и H₂O₂.

Значај mTOR за пропацију ћелија кроз ћелијски циклус показан је деловањем рапамицина на нетретиране ћелије. Под утицајем инхибитора смањен је број ћелија у S и G2M фази (p<0,05).



Графикон 62. Приказ фаза ћелијског циклуса код HEL ћелија након третмана са 500 nM рапамицином (RAPA) (*p<0,05, у односу на групе без третмана).

5. ДИСКУСИЈА

Заједничка карактеристика многих тумора је повећана концентрација реактивних врста кисеоника. ROS оштећују ћелијске макромолекуле нарушавајући структуру и функцију саме ћелије, а оксидативно оштећење ДНК сматра се иницијалним догађајем у развоју канцерогенезе (Avery SV, 2011; Kryston TB и сар., 2011). NO у биологији тумора може имати двоструку улогу јер делује и стимулативно и превентивно на развој болести мењајући активност регулаторних молекула (Amin AR, 2012). С друге стране, ћелије тумора могу бити отпорније на оксидативни стрес у односу на нормалне ћелије, јер је у њима висок ниво продукције ROS често праћен повећаним капацитетом антиоксидативне заштите. На тај начин оне стичу пролиферативну предност у односу на здраве ћелије јер избегавају штетно деловање ROS, а у исто време, као извор реактивних врста, индукују апоптозу околних здравих ћелија (Bjorn ME и Hasselbalch HC, 2015; Ushio-Fukai M и Nakamura Y, 2008; Schieber M и Chandel NS 2014).

Хематопоеетске матичне и прогениторске ћелије експримирају неколико изоформи ензима NOX које производе мале количине реактивних врста кисеоника, што је у строго контролисаним условима, важно у редокс сигнализацији неопходној за успостављање баланса између процеса самообнове и диференцијације у адултним матичним ћелијама (Piccoli C и сар., 2007). Бројне студије посвећене су улози ROS и оксидативног стреса у регулацији хематопоезе (Eliades A и сар., 2012; Vlaski-Lafarge M и Ivanovic Z, 2015). Повећано, нерегулисано стварање ROS, утиче на функцију хематопоеетских матичних ћелија, што се одражава на ток ћелијског циклуса, убрзано старење ћелија или развој хематолошких малигнитета (Ghaffari S, 2008). Hasselbalch је 2013. године изнео хипотезу да стална инфламација може изазвати оштећења матичних ћелија у костној сржи јер доводи до оксидативних оштећења ДНК и ствара микросредину која погодује индукцији мутација. *BCR/ABL* онкоген и *JAK2V617F* мутација индукује стварање ROS у хематопоеетским матичним ћелијама услед чега настају оксидативни стрес, геномска нестабилноста и оштећења ДНК (Sattler M и сар., 2000; Marty и сар., 2013). Бројне студије су показале повећану продукцију ROS у ХМН и постојање оксидативног стреса (Vener C и сар., 2010; Musolino C и сар., 2012;

Marty C и сар., 2013; Yalcin S и сар., 2010; Hurtado-Nedelec M и сар., 2013, Durmus A и сар., 2014; Cenedi O и сар., 2009; Socoro-Yuste N и сар., 2017; Ćokić VP и сар., 2015). Утицај NO и RNS је мање испитан код ових хематолошких малигнитета и углавном се односи на одређивање примарних метаболита NO, нитрита и нитрата (Rejto L и сар., 2003, Cella G и сар., 2010).

Под утицајем *BCR/ABL* онкогена и *JAK2V617F* мутације код ХМН долази до конститутивне активације PI3K/AKT/mTOR нисходних сигналних путева (Skorski T и сар., 1997; Spivak JL, 2010; Pandey R и Kapur R, 2015), који су потенцијална мета дејства ROS и RNS (Zhao D и сар., 2017; Lopez-Rivera E и сар., 2014). У нижим концентрацијама ROS могу деловати као секундарни гласници који регулишу активност редокс-сензитивних ензима киназа и фосфатаза. Високе концентрације ROS у прогениторима хематопезе доводе до хиперфосфорилације AKT/mTOR пута као одговор на стимулацију цитокинима (Yalcin S и сар., 2010). Равнотежа између активности киназа и фосфатаза одређује интензитет сигнала AKT/mTOR пута (Clerkin JS и сар., 2008).

Полазећи од чињенице да код болесника са ХМН постоје услови за настанак оксидативног стреса и да на активност mTOR могу утицати реактивне врсте и кисеоника и азота, испитан је степен активације mTOR сигналног пута у гранулоцитима и костној сржи болесника са ХМН, као и у условима повећаног оксидативног стреса *in vitro*.

У овој студији показано је да је баланс између оксиданаса и антиоксиданаса нарушен код ХМН. У плазми свих болесника са ХМН, у односу на здраве контроле, повећана је концентрација продуката липидне пероксидације и ПК, који настаје оксидацијом протеина. Наши резултати су у складу са резултатима студија код болесника са ХМЛ, где је показан повећан ниво МДА и ПК у хроничној и у фази погоршања болести (Ahmad R и сар., 2008; Rajeshwari U и сар., 2013). Концентрација МДА расте са прогресијом болести, уз пад активности не-ензимске антиоксидативне заштите (Ahmad R и сар., 2010). С друге стране, наши резултати показују значајне разлике између појединих подтипова ХМН у погледу активности ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима, SOD, CAT, и GPx. Најслабији капацитет антиоксидативне заштите испољили су болесници са ХМЛ и ЕТ. Пад активности SOD и GPx измерен је код ЕТ болесника, док су оболели од ХМЛ уз то

имали и снижену активност САТ у својим еритроцитима. Код болесника са ПВ значајно смањење активности у односу на контролне узорке показано је за GRx. Болесници са ПМФ су се издвојили по својој реактивности и код њих је показана смањена активности једино за SOD, док је активност САТ била повишена, како у односу на здраве контроле тако и у односу на болеснике са ЕТ и ПВ. Вредности тоталног антиоксидативног капацитета плазме, који је одређиван мерењем редукционе моћи плазме FRAP методом, биле су највеће код болесника са ПМФ. Ове разлике између подтипова ХМН, где болесници са ЕТ имају најнижу антиоксидативну заштиту а ПМФ испољавају највећи антиоксидативни капацитет, у складу су са биолошким/фенотипским континуумом код ХМН, где ЕТ представља рану, ПВ умерену а ПМФ унапредовалу фазу болести. Код болесника са ПМФ повећани оксидативни стрес био је праћен и повећаним антиоксидативним капацитетом. Овај механизам до сада је запажен код других канцера (Bjørn ME и Hasselbalch HC, 2015), а наши резултати први пут указују да његово постојање код ХМН може довести до прогресије болести. Као извор ROS, малигне ћелије заштићене су од њиховог штетног дејства повећаном активношћу антиоксидативне заштите, али на околне здраве ћелије ROS могу деловати штетно и изазвати апоптозу (Ushio-Fukai M и Nakamura Y, 2008; Schieber M и Chandel NS 2014).

Испитивање антиоксидативног капацитета код болесника са ХМН које је спроведено у овој студији односи се на одређивање активности ензима антиоксидативне заштите у лизатима еритроцита. С друге стране, Џокић и сарадници (2015) су на основу анализе протеома и транскриптома гранулоцита болесника са ХМН показали повећану експресију САТ на протеинском нивоу код *JAK2V617F* негативних болесника са ЕТ и ПМФ, као и дерегулацију транскрипата неких гена битних за контролу оксидативног статуса. Резултат сличан нашим, али на генском нивоу, добијен у студији Hasselbalch HC и сарадника (2014), описује смањену експресију гена за САТ код ЕТ и ПВ, али не и код болесника са ПМФ. Socoro-Yuste и сарадници (2017) су на основу анализе протеома гранулоцита показали да су многи протеини укључени у антиоксидативну заштиту аберантно експримирани међу подтипovima ХМН или у односу на присуство *JAK2V617F* мутације. Уз то, ови аутори су показали да *JAK2* мутација има више утицаја на систем детоксификације ROS него подтип ХМН, и да постоји смањена експресија

CAT у присуству *JAK2V617F* мутације. Резултати Marty и сарадника (2013.), на *JAK2V617F* „knock-in“ мишјем моделу, приказују у матичним хематопоетским ћелијама смањену експресију CAT на генском и на протеинском нивоу, као и смањену експресију гена за CAT код ХМН CD34+ ћелија у поређењу са CD34+ ћелијама код здравих. Конститутивна активација PI3K/AKT сигналног пута под утицајем *JAK2V617F* мутације може да инхибира активност *Forkhead O* транскрипционих фактора који су важни за експресију антиоксидативних ензима, укључујући CAT. Слично овоме, дуготрајна активација STAT5 од стране BCR/ABL киназе одговорна је за смањену интрацелуларну експресију CAT и глутаредоксина 1. Поред антиоксидативног CAT у K562 ћелијама које експримирају *BCR/ABL* онкоген има и антипролиферативно дејство. Регулацију концентрације ROS, ензим зауставља ћелије у G0 фази, уводећи их у стање мировања (Bourgeais J и сар., 2017). Студија Seneli и сарадника из 2009. године је показала различиту активност SOD код три типа хематопоетских ћелија болесника са ХМН. Активност SOD у полиморфонуклеарним ћелијама била је значајно смањена, док је у еритроцитима била повећана код болесника у поређењу са здравим контролама. У тромбоцитима није било разлике између болесника и здравих контрола. Ово је указало да активности SOD ензима и продукција ROS могу бити измењене у складу са специфичном функцијом ћелија. Наши резултати се не могу у потпуности поредити са резултатима других аутора, јер испитују активност система антиоксидативне заштите на различитим нивоима и у различитим ћелијама, али они, као и резултати других, указују на поремећај регулације система са посебним освртом на разлику између појединачних подтипова ХМН.

Ниво интрацелуларних ROS у гранулоцитима болесника са ХМН одређиван је као важан биомаркер оксидативног стреса и активације гранулоцита. Употребом DCFH₂-DA детектују се реактивне врсте H₂O₂, HO•, ROO•, NO• и ONOO⁻ (Kalyanaraman B и сар., 2012; Tsikas D., 2007) које су карактеристичне за гранулоците. Повећан ниво ROS је детектован код болесника са ХМН, што је још једна потврда постојања оксидативног стреса код ХМН и активације гранулоцита код ових малигнитета. Главни извор ROS у гранулоцитима је мембрански ензимски комплекс NOX, која катализује NADPH-зависну редукцију кисеоника до супероксид анјон радикала. Под нормалним условима овај ензимски комплекс је

неактиван, а појединачне компоненте се налазе у цитоплазми и мембранским системима ћелије. Када су ћелије стимулисане, цитосолне компоненте (p47phox, p67phox, p40phox и Rac2) мигрирају до мембрана где се спајају са мембрански везаним компонентама (gp91phox/NOX2 и 22phox, које заједно формирају флавоцитохром b558), чиме настаје каталитички активна оксидаза. Фосфорилација p47phox на неколико серинских аминокиселинских остатака има кључну улогу у активацији NOX. Hurtado-Nedelec и сарадници су 2013. године испитивали ROS у неутрофилима болесника са ХМН који настају активношћу NOX и њихову улогу у настанку тромбоза и васкуларних компликација, које су главни узрок морталитета код ових болесника. Показали су да у неутрофилима болесника са ХМН, који експримирају *JAK2V617F* мутацију долази до конститутивне хиперпродукције ROS и повећане фосфорилације p47phox на Ser³⁴⁵. Веза између JAK2 и NOX је потврђена употребом селективних JAK2 инхибитора, који су довели до инхибиције фосфорилације p47phox на Ser³⁴⁵ и продукције ROS након њихове индукције GM-CSF-ом. Поред NADPH оксидазе, односно њене NOX2 изоформе као главног извора, ROS у неутрофилима могу настати у митохондријама или активношћу ксантин оксидазе. Кључну улогу у BCR/ABL зависом стварању ROS имају транскрипциона активност STAT5 и Rac2 GTP-аза која мења мембрански потенцијал митохондрија и проток електрона кроз респираторни ланаци (Warsch W и сар., 2012). Неутрофили су главни извор ROS у крви, што посебно долази до изражаја код ХМН. Мада је главни производ активности NOX супероксидни анјон, након његове дисмутације (спонтане или дејством SOD), настаје H₂O₂. Водоник пероксид може да дифундује кроз ћелије и ткива и активира друге ћелије као што су ендотелне ћелије и тромбоцити, или да доведе до оштећења околних ћелија, доприносећи патофизиологији ХМН. У неутрофилима ХМЛ болесника забележене су високе конценетарције H₂O₂ како пре и тако и након примене антитуморске терапије (Al-Gauуar MM и сар., 2007). Повећани ниво ROS код наших испитаника у складу је са резултатима других аутора и показије активацију и велики патогени потенцијал гранулоцита код *Ph*⁺ и *Ph*⁻ ХМН.

Тестом који се заснива на редукцији нитро тетразолиум плавог одређивали смо интрацелуларну продукцију супероксид анјон радикала у гранулоцитима. Испитивање изолованих, нестимулисаних гранулоцита показало је да нема разлике

у вредности NBT индекса између контролне групе и група болесника. Међутим, након стимулације са РМА гранулоцити из ПВ групе имали су значајно мању реактивност у поређењу са здравим испитаницима. У процесу фагоцитозе као одговор на инвазију микроорганизмима активира се читав низ ензима и система који катализује производњу високо токсичних једињења из кисеоника. „Респираторни прасак“ је брз, динамичан процес који се *in vivo* дешава једино у стимулираним ћелијама (Ceneli, 2009), зависи од врсте стимулуса и може бити измењен у различитим патолошким стањима. Током фагоцитозе код нормалних леукоцита расте NBT редукујућа активност леукоцита. У одмаклом стадијуму дијабетес мелитуса, акутне мијелоцитне леукемије, тумора бубрега и оварујума и након зрачења болесници имају смањени степен NBT редукације (Okuda и сар., 1974; Mantur и сар., 1998). Како је пероксинитрит (ONOO^-) један од значајнијих ефектора „респираторног праска“ слаба реактивност гранулоцита оболелих од ХМН могла би се објаснити повећаним стварањем NO^\cdot (што се огледа у повећаној концентрацији NO_x у плазми). Наиме, NO^\cdot директном инхибицијом NO_x смањује стварање $\text{O}_2^{\cdot-}$, што ограничава инфламаторну реакцију и штити околна ткива од прекомерних оштећења (Clancy и сар., 1992; Carr и сар., 2000). Испитујући функцију *bcr* онкогена важног за настанак ХМЛ, Voncken и сардници (1995) су показали да (*bcr-/bcr-*) неутрофили експерименталних мишева у одговору на стимулацију стварају знатно већу количину $\text{O}_2^{\cdot-}$ у поређењу са интактним или (*bcr-/bcr+*) и (*bcr+/bcr+*) неутрофилима. Претпоставља се да *bcr* онкоген има заштитину улогу јер смањује интензите инфламаторног одговора. Код ПВ болесника смањеној продукцији ROS после стимулације могла би допринети и повећана разградња $\text{O}_2^{\cdot-}$, јер у еритроцитима који су код њих најзаступљенији није регистрован значајнији пад активности SOD у поређењу са контролом. Хемоглобин многобројних еритроцита уклања део NO^\cdot . Поремећај редокс стања у гранулоцитима ремети њихову одбрамбену функцију. Смањену NBT редукујућу активност гранулоцита показали су и други аутори код болесника са ПВ (Samuelsson J и Palmblad J, 1996, Samuelsson J и Palmblad J, 1997), али и ПМФ (Perianin A и сар., 1984).

Студије које су фокусиране на ефекте NO и RNS код болесника са ХМН су ретке, иако у патологији ових болести има основа за њихово испитивање. Активност NO и RNS је често неодвојива од дејства ROS (Federico A и сар., 2007).

Они су део ефекторног система гранулоцита, као ћелија примарног имунолошког одговора, које су малигно измењене код ХМН. У овим испитивањима, допринос NO компоненте оксидативном и нитрозативном стресу у ХМН процењен је на основу концентрације метаболита NO у плазми, нитрата и нитрита, као и на основу експресије iNOS и нитротирозина у гранулоцитима. Одређивање нивоа самог NO је тешко због његовог кратког полуживота. Мада су нитрити примарни продукт метаболизма NO, они се не акумулирају *in vivo* већ брзо оксидују до нитрата дејством оксихемоглобина у еритроцитима (van der Vliet A и сар., 1997; Moshage N и сар., 1995; Tsikas D, 2007; Khadem-Ansari МН и сар., 2017; Griendling КК и сар., 2016). Еритроцити имају висок оксидативни капацитет за NO и нитрите. NO реагује са оксихемоглобином, када настају метхемоглобин и нитрати. Преузимање NO од стране еритроцита уз конверзију у нитрате је главни метаболички пут за ендогено формирање NO. Нитрати су биолошки потпуно неактивни, насупрот нитритима, и оксидација NO у еритроцитима до нитрата је најефикаснији пут метаболичке инактивације NO. У овој студији показана је повећана концентрација нитрата код болесника са ПВ и ПМФ. Болесници са ПМФ су имали значајно веће вредности NOx не само у односу на контролне узорке већ и у односу на болеснике са ПВ и ЕТ, што би могло да укаже да су и ROS и NO важни за прогресију болести. Када се метаболити посматрају појединачно, конверзија нитрита до нитрата била је већа код свих подтипова ХМН у односу на здраве контроле. У неколико студија је показано да је ниво нитрита и нитрата или смањен или повећан код канцера (Khadem-Ansari МН и сар., 2017, Günel N и сар., 2002; Gonenc и сар., 2006). Претходна испитивања нивоа продукције NO код болесника са ХМН показала су смањени ниво NO код ЕТ и повећан ниво NO код болесника са ПВ (Cella G и сар., 2010). Уз то, Rejto и сарадници (2003.) су показали *in vitro* да је NO одговор тромбоцита нарушен код пацијената са ХМН који имају тромбозу. У студији Sangwan-а и сарадника (2014) концентрација нитрита код ХМЛ болесника била је значајно повећана у поређењу са здравим контролама и примена иматиниба проузроковала је њен пад. Ово је у супротности са резултатима нашег истраживања у коме су ХМЛ болесници имали ниже вредности нитрита у односу на здраве испитанике. Претпоставља се да одговор лежи и чињеници да се највећи део њих оксидовао даље до нитрата с обзиром да је однос NO₃/NO₂ код ових болесника

вишеструко већи у поређењу са осталим групама. Наши резултати који показују повишени ниво NO метаболита посебно су важни у светлу података да нитрити и нитрати могу представљати резервоар NO у крви и ткивима. Ови метаболити могу, под одређеним условима *in vivo* као што су хипоксија или низак рН, бити извор NO и других биоактивних оксида азота (Bryan NS и сар., 2005; Lundberg JO и сар., 2008; Lundberg JO и Weitzberg E 2010; Gladwin TM, 2005; Griendling KK и сар., 2016).

Класични пут ензимске синтезе NO, L-аргинин–NOS, је главни извор NO у организму, а iNOS кључна изоформа овог ензима у NO сигнализацији која је у вези са инфламацијом и канцерогенезом (Fialkow L и сар., 2007; Lopez-Rivera E и сар., 2014). У овој студији испитивана је протеинска експресија iNOS у гранулоцитима болесника са ХМН. Код свих испитаника је показана повишена експресија iNOS, при чему је највећи број iNOS позитивних ћелија детектован код ХМЛ болесника. Ово указује на могућу повећану продукцију NO, у микромоларним концентрацијама, за разлику од других изоформи овог ензима које имају много мањи капацитет продукције NO. У нашој студији је такође показана позитивна корелација између концентрације NO_x у плазми и експресије iNOS у гранулоцитима болесника, што указује да је NO код ових малигнитета вероватно настао активношћу iNOS, као и на постојање услова за нитрозативни стрес код ХМН. iNOS се експримира у многим ћелијама након индукције имунолошким или инфламаторним стимулусима као и хипоксијом и оксидативним стресом. У неактивираним ћелијама информациона рибонуклеинска киселина (иРНК) за iNOS се *de novo* синтетише након стимулације (Rao KM, 2000; Fukumura и сар., 2006). Међутим, у многим канцерима iNOS је конститутивно експримирана (Lopez-Rivera E и сар., 2014, Fukumura и сар., 2006), као и у неким ткивима, као што је плућни епителијум (Hill BG и сар., 2010) и ћелијама са специфичном функцијом. Конститутивна експресија iNOS у гранулоцитима (Cedergren J и сар., 2003, Jyoti A и сар., 2014) указује да је NO важан ефекторни молекул у овим ћелијама. Активирани JAK-STAT сигнални пут повећава индукцију iNOS и синтезу NO (Rao KM, 2000; Aktan F, 2004; Lechner M и сар., 2005; Vannini F и сар., 2015). Показано је да једино ћелије које могу да стварају висок ниво NO, као при синтези катализованог iNOS, могу изазвати нитрозативни стрес (Espey MG и сар., 2000).

Многе ћелије канцера експримирају све три NOS, уз преминацију iNOS (Ma Q и сар. 2010). Због тога специфична инхибиција iNOS може представљати још једну стратегију у терапији тумора. Испитујући два различита терапијска приступа код оболелих од ХМЛ, Ghalaut и сардници (2012) су утврдили да је бољи ефекат имао третман који је довео до већег пада концентрације NO. Активност iNOS код канцера може се позитивно или негативно одразити на прогнозу болести. NO позитивно утиче на апоптотску активност p53, међутим, код неких канцера са мутираном формом p53, NO потенцира његова онкогена својстава. Специфични ниво NO настао активношћу iNOS може да активира HIF-1 α , АКТ и ERK сигналне путеве који даље доводе до повећане пролиферације, активације антиапоптотских путева и настанка метастаза (Wink DA и сар., 2011). Повећана експресија iNOS у нашој студији још један је показатељ активације гранулоцита и одраз трансформације ових ћелија, што је раније описано код других малигнитета (Lopez-Rivera E и сар., 2014), а први пут показано код ХМН.

Као меру активације ћелија, али и оксидативних оштећења и инфламације, испитали смо ниво експресије нитротирозина на протеинима гранулоцита болесника са ХМН. У гранулоцитима свих ХМН ентитета повећана је нитрација на тирозину. Показана је позитивна корелација између експресије iNOS и нитротирозина у гранулоцитима, што указује да је iNOS важна за настанак ове модификације. У складу са тим оболели од ХМЛ имали су највећи број позитивних ћелија у поређењу са осталим групама испитаника. Нитротирозин је један од стабилних крајњих продуката метаболизма NO и маркер кумулативне активности iNOS (Lopez-Rivera E и сар., 2014). Јуоти и сарадници (2014) су показали да Rac2 протеин, компонента NOX, интерагује са iNOS у хуманим и мишјим неутрофилима, што доводи до транслокације Rac2/iNOS до мембрана фагозома где остварују своју улогу у фагоцитози, стварањем ROS и RNS и нитрацијом протеина. Механизми настанка нитротирозина у гранулоцитима могу бити различити. Нитротирозин најчешће настаје након реакције пероксинитрита са протеинима који садрже тирозинске аминокиселинске остатке. Пероксинитрит, снажни оксиданс, настаје у реакцији између NO и супероксидног анјона, али под одређеним условима (када су присутни у високим и еквимоларним концентрацијама), због чега се често нитрација као последица дејства пероксинитрита *in vivo* доводи у питање (Baldus S

и сар., 2002, Espey MG и сар., 2002 В). Алтернативно, ова модификација може настати између тирозинских аминокиселинских остатака на протеинима и нитрита, у реакцији катализованој пероксидазама, каква је мијелопероксидаза (МПО) карактеристична за гранулоците (Griendling KK и сар., 2016). МПО, активирана водоник пероксидом, доводи до оксидације нитрита (NO_2^-) у азот диоксид радикал ($\cdot\text{NO}_2$), који даље води до нитрације (Pfeiffer S и сар., 2001; Hurst JK, 2002; Baldus S и сар., 2002; Ushio-Fukai M и Nakamura Y, 2008). МПО у неутрофилима и моноцитима ствара додатне метаболите, преведећи H_2O_2 у хипохлорну киселину (HOCl), која са присутним нитритима даје нитрил хлорид (NO_2Cl) што такође доприноси формирању нитротирозина (Aktan F, 2004). Нитрација протеина на тирозину утиче на један од најважнијих механизма ћелијске регулације, цикличну интерконверзију између фосфорилисане и нефосфорилисане форме тирозина у протеинима (Drew B и Leeuwenburgh C, 2002). Значај вероватно може бити двојак, у зависности од самог протеина који је модификован и контекста (активациони или инхибиторни) у ком фосфорилација датог тирозинског остатка утиче на функцију протеина.

ROS и RNS могу реверзибилно да модификују протеине преко сумпора у аминокиселинским остацима цистеина и метионина, што је основа за постојање сигнализације засноване на редокс реакцијама. Реактивне тиолне групе (SH) цистеина на многим протеинима могу брзо да реагују са H_2O_2 и NO у биолошким системима при чему настају S-хидроксиловани (S-OH) и S-нитрозиловани (S-NO) деривати. Након реакције са другим цистеинима (у редукованом глутатиону, GSH, или тиолним групама других протеина) оба ова деривата сумпора могу да се конвертују до дисулфида (S-S) и редукују даље до сулфхидрила на рачун редукованих еквивалената, преко NADPH и система тиоредоксин/тиоредоксин редуктаза и глутаредоксин/глутаредоксин редуктаза. Оксидативне модификације реактивних цистеина доводе до промена структуре и функције протеина, утичу на локализацију и физичке интеракције као и на подложност протеина другим посттранслационим модификацијама, као што је фосфорилација. Због тога се сматра да су цистеински аминокиселински остаци у протеинима примарни у преношењу редокс сигнала (Yoshida S и сар., 2011; Filomeni G и сар., 2015). Модификација тиолних група цистеина оксидансима налази се у основи

интеракција унутар mTORC1 комплекса (Sarbassov DD и Sabatini DM, 2005; Shenberger JS и сар., 2009; Yoshida S и сар., 2011).

Испитивање нивоа активације серин-треонин киназе АКТ у гранулоцитима, показало је повишену експресију фосфорилисана форме АКТ код свих ХМН, како код *Ph*-ХМН тако и код ХМЛ и повећан степен активације, изражен као однос фосфорилисане и укупне форме ензима, pAKT/AKT, код болесника са ПВ и ПМФ. Када се посматра допринос *JAK2V617F* мутације, активација АКТ била је највећа код хетерозиготних носиоца мутације, што указује да АКТ није под апсолутним утицајем *JAK2*. Идентификовани су бројни протеини који регулишу активност АКТ (Song G и сар., 2005). Како су показали Kim и сарадници (2005) аутофосфорилацијом на тирозину 177 (Tyr 177) BCR/ABL киназа стимулише активацију PI3K. Такође, mTORC2 директно фосфорилише и активира АКТ киназу (Jacinto E и сар., 2006). Појачана активност АКТ код наших испитаника одговара конститутивној активацији PI3K/AKT сигналног пута у *Ph*-ХМН и *Ph*⁺ХМН коју су описали други аутори (Bartalucci N и сар., 2013б; de Freitas RM и da Costa Maranduba CM, 2015).

У оквиру ове докторске дисертације испитана је експресија и степен активације mTOR у гранулоцитима болесника са ХМН. Одређивана је активна форма присутна у mTORC1 комплексу, детекцијом фосфорилације mTOR на Ser 2448 и испитан однос фосфорилисане и укупне форме ензима. Активирани mTOR у mTORC1 комплексу је фосфорилисан преодминантно на Ser 2448, а у mTORC2 комплексу на позицији Ser 2481 (Copp J и сар., 2009). Показана је повећана експресија укупног mTOR у гранулоцитима свих болесника са дијагнозом *Ph*-ХМН. Фосфорилисана форма ензима била је повећано експримирана код ХМЛ и *Ph*-ХМН, без утицаја *JAK2V617F* мутације. Сви ХМН болесници осим ПВ имали су већи степен активације киназе, pmTOR/mTOR, у поређењу са контролама. Ово је у складу са резултатима других истраживача који су показали конститутивну активацију mTOR и његових ефектора S6K и 4E-BP1 у присуству BCR/ABL киназе. (Lu C и сар., 2003). Код болесника са ПВ повећана активација је зависила од степена експресије *JAK2V617F* мутације и забележена је само код хомозигота. У неутрофилима, у одговору на стимулацију, покрећу се бројни конститутивни биохемијски путеви и ензими, без промењене експресије гена и нове синтезе

протеина. Транслациона контрола експресије специфичних протеина обезбеђује важну биолошку предност, укључујући способност брзе синтезе протеина коришћењем конститутивних иРНК, без потребе за транскрипцијом. Овакав вид регулације је важан за неутрофиле због кинетике инфламаторног одговора, синтезе реактивних медијатора у одговору на интра- и екстрацелуларне сигнале и кратког живота ових ћелија, мада је запажен и код тромбоцита и моноцита. Транслациону контролу специфичних протеина обезбеђује mTOR сигнални пут, регулацијом иницијације транслације одређеног субсета иРНК. Поред тога што утиче на митогенезу, раст ћелија и метаболичку контролу неколико типова ћелија, mTOR утиче и на акутне промене фенотипа терминално диференцираних ћелија какве су неутрофили. Механизам транслационе контроле регулисан mTOR киназом одговоран је за брзу синтезу и ослобађање кључног модулятора инфламације, солубилног интерлеукин 6 рецептора α (*interleukin-6 receptor α* , IL-6R α). Овај рецептор је централна компонента IL-6/IL-6R α сигналног система, одговорног за разне инфламаторне реакције, укључујући регрутовање ћелија, развој акутног инфламаторног одговора и прелаз из акутне у хроничну инфламацију. Транслација са конститутивних иРНК, након активације неутрофила, може се специфично инхибирати дејством рапамицина (Lindemann SW и сар., 2004). mTOR учествује у регулацији транслације протеина важних за функцију гранулоцита, као што је iNOS (Lee M и Choy JC, 2013) или HIF1 α (McInturff AM и сар., 2012). Ми нисмо запазили позитивну корелацију између експресије iNOS и активације mTOR у гранулоцитима болесника са ХМН. Овоме доприноси и чињеница да је регулација активности ових ензима комплексна и обострана (Lee M и Choy JC, 2013; Lopez-Rivera E и сар., 2014).

Имунохистохемијском методом испитана је експресија и степен активације mTOR у костној сржи болесника са ХМН. Аберантна активација mTOR запажена је код хематолошких малигнитета, укључујући ХМН (Bartalucci и сар., 2013), што указује да је регулација mTOR кључна за нормалну хематопоезу (Geest CR и сар., 2009). Ludin и сарадници (2014) су показали да mTOR повећава концентрацију ROS у матичним ћелијама хематопоезе што доводи до покретања ћелијског циклуса и мобилизације ћелија. mTOR је негативни регулатор аутофагије, процеса који штити ћелије од малигне трансформације спречавајући нагомилавање ћелијских

оштећења, уклањањем токсичних протеина и оштећених митохондрија, које су главни извор ROS (Pantovic A и сар., 2013). У костној сржи сви испитаници са дијагнозом *Ph*-ХМН имали су повећану експресију фосфорилисане форме mTOR киназе. Процент активне форме mTOR у односу на укупно експримирану (pmTOR/mTOR) био је повећан једино код болесника са ПМФ. Даљом анализом утврђена је позитивна корелација између односа pmTOR/mTOR у костној сржи и експресије pmTOR, односно pmTOR/mTOR у гранулоцитима. Ови резултати су у складу са подацима из литературе да је mTOR сигнални пут конститутивно активиран у ХМН ћелијама (Bogani C и сар., 2013). Испитивањем утицаја mTOR на регулацију мијелопоезе у *ex vivo* систему диференцијације гранулоцита, анализом различитих популација хематопоеетских прогенитора, показано је да рапамицин доводи до инхибиције експанзије одређених CD34⁺ прогенитора али не утиче на ране хематопоеетске прогениторе, вероватно диференцијалном регулацијом активности АКТ и mTOR (Geest CR и сар., 2009). У костној сржи болесника са ХМН који експримирају *JAK2V617F* мутацију повећан је ниво фосфорилације STAT5 и АКТ у хематопоеетским ћелијама (Grimwade и сар., 2009). На „*knock out*“ мишевима за лизозомалну киселу липазу (енгл. *lysosomal acid lipase*, LAL) показано је да недостатак функције овог ензима доводи до експанзије мијелоидних супресорских ћелија (енгл. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*, MDSCs) и настанка мијелопролиферативних неоплазми. LAL учествује у контроли развоја и хомеостазе ћелија мијелоидне линије и контроли инфламације. Показано је да је mTOR сигнални пут активиран у костној сржи у условима дефицијенције LAL. MDSCs ћелијама припадају разни типови ћелија, укључујући гранулоците (Yan C и сар., 2012).

Активност mTORC1 сигналног пута је испитивана одређивањем експресије нисходног ефектора mTOR-а, S6 киназе, у гранулоцитима болесника са ХМН. Највећу експресију активне форме S6K у гранулоцитима имали су ЕТ и ПВ болесници. У овим групама активност киназе била је најизраженија код хетерозиготних носилаца *JAK2V617F* мутације, што указује да поред JAK2 на активацију mTOR/S6K утичу и други путеви. Показано је да на активацију mTOR-а утиче и MEK/MAPK сигнални пут (Lehman JA и сар., 2003). Експресија pS6K позитивно је корелирала са експресијом pmTOR и активацијом АКТ у

гранулоцитима. У нашим истраживањима нисмо показали активацију S6 киназе у гранулоцитима болесника са ПМФ. Могуће је да код ПМФ mTOR остварује своја дејства преко других ефектора, а не преко S6K. Наши резултати указују да се са прогресијом болести мења и активност ефектора mTOR киназе.

Активност mTOR сигналног пута анализирана је у условима повишеног оксидативног стреса *in vitro*, након третмана гранулоцита H₂O₂. Резултати ових експеримената указују на стимулативно деловање H₂O₂ на mTOR киназу у гранулоцитима, али и на различиту сензитивност ензима на промене редокс стања код здравих и болесника са ХМН. У гранулоцитима болесника, претретман антиоксидансом NAC, који уклања реактивне врсте кисеоника као што су H₂O₂, OH[•] и HOCl (Aguota OI и сар., 1989), поништава стимулативно деловање водоник пероксида, док сам NAC нема утицаја на активност mTOR. Код здравих испитаника овај ефекат изостаје јер је и након претретмана NAC-ом однос pmTOR/mTOR у гранулоцитима већи у поређењу са нетретираном групом, а неутрализација ендогених оксиданаса такође делује стимулативно на mTOR.

Неколико студија је показало да је mTOR под регулацијом ћелијског редокс статуса (Sarbasov DD и Sabatini DM 2005; Dames S и сар., 2005; Shenberger JS и сар., 2009; Ока SI и сар., 2017). Постоје контрадикторни подаци који показују да mTOR може бити и активиран и инхибиран оксидативним стресом, што зависи од типа ћелије у којој је експримиран и врсте оксиданса (Sarbasov DD и Sabatini DM 2005; Shenberger JS и сар., 2009; Yoshida S и сар., 2011). Промене интрацелуларног енергетског нивоа и доступност нутријената утичу на функцију протеина који су регулисани редокс потенцијалом. Компоненте, као што су киназе, фосфатазе и мале GTP-азе, укључене су у временску и просторну регулацију активности mTORC1 (Yoshida S и сар., 2011).

Утицај ROS на активност сигналних путева треба посматрати у склопу промене редокс стања као важног фактора у регулацији унутарћелијских процеса (Kirlin WG и сар., 1999). Овај потенцијал зависи од локализације, метаболичког стања, диференцијације и типа ћелије. Промене које се јављају током ћелијског циклуса крећу се у распону од 0,260V до 0,160V и довољне су за активацију редокс сензитивних протеина. У ћелијама које пролиферишу потенцијал се мења у правцу оксидације 0,24V што је још израженије током диференцијације 0,2V док је на

почетку апоптозе измерено 0,17V-0,19V (Dames S и сар., 2005). Узевши у обзир све наведено претпоставља се да се TOR у ћелији налази у редукованој и оксидованој форми, а њихов однос одређен је факторима који иначе регулишу ћелијски редокс потенцијал међу којима су и ROS.

Активност mTOR између осталог регулисана је и јачином интеракције између киназе и Raptor-a. Већ је показано да нутритивни статус утиче на њихову везу тако што је недостатак нутријената стабилизује док у стању позитивног енергетског и нутритивног статуса у ћелији интеракција слаби, а активност mTOR-a расте (Kim, D.H и сар., 2002).

Sarbassov и Sabatini (2005) у свом истраживању су показали да mTOR-Raptor комплекс може бити регулисан редокс-сензитивним механизмом. У присуству оксиданса PAO (енгл. *phenylarsine oxide*) активира се сигнални пут и фосфорилише треонин 389 у супстрату S6K1. PAO ствара дисулфидне мостове оксидацијом тиолних група унутар протеина што за последицу има дисоцијацију комплекса и активацију mTOR киназе. Повећана активација киназе опстаје и у стању смањене количине нутријената што значи да је смештена нисходно у односу на нутријент-сензитивну регулацију или да можда представља механизам њеног деловања. Према овом моделу метаболизам митохондрија у присуству довољне количине нутријената може мењати редокс стање унутар ћелије и активирати mTOR-Raptor пут (Kim, D.H и сар., 2002).

У самом mTOR молекулу постоји редокс сензитивни регион означен као FACT. Оксидовани облик FACT се састоји из алфа хеликса и снажних дисулфидних веза између цистеинских остатака (Cys2460 и Cys2467) којима формира омчу. Оксидовани облик FACT може се везати за хидрофобну површину комплементарног облика окружену поларним резидуама. Редукција дисулфидних веза драматично повећава флексибилност унутар карбокси-терминалног региона а самими тим и доступност неколико хидрофобних бочних ланаца. Ово се одражава на интеракцију FACT са другим регионима mTOR-a као и са различитим унутарћелијским структурама (Dames S и сар., 2005). Показано је и да укупна количина TOR молекула у ћелији зависи од редокс-стања FACT домена. Како нема разлике на нивоу иРНК претпоставља се да дисулфидне везе унутар овог домена утичу на деградацију TOR-a.

Сигналном путу чија се активност огледа у ланчаној активацији киназа главну регулаторну противтежу чине фосфатазе (Groeger G и сар, 2009). Равнотежа између активности киназа и фосфатаза одређује присуство и јачину сигнала који се преносе путем PI3K/AKT/mTOR.

PTEN је фосфатидилинозитол 3 фосфатаза која дефосфорилише PtdIns(3,4,5)P3 на позицији 3 и настаје PtdIns(4,5)P2. Као последица њеног дејства инхибирани су пропација ћелијског циклуса и ћелијска покретљивост, смањују се ћелијски раст и величина и покреће апоптоза. (Davies MA и сар., 2002). Познато је да су мутација или губитак функције ове фосфатазе повезане са повећаном активношћу mTOR-а (Neshat MC., 2001). Активност липидне фосфатазе PTEN такође је регулисана редокс потенцијалом.

Један од начина инактивације фосфатазе је стварање реверзибилних дисулфидних веза у активном месту (Leslie N и сар., 2003). У *in vitro* условима услед оксидације H₂O₂ формирају се дисулфидне везе између цистеинског остатка на активном месту (C124) и суседног цистеина (C71) што за последицу има инактивацију ензима. Како се PTEN инаktivира ендогено створеним ROS у случају оксидативног стреса као и након стимулације факторима раста претпоставља се да оксидативна инактивација представља физиолошки механизам регулације PI3K/AKT/mTOR сигналног пута.

У истраживању којем се испитивало UV зрачење као важан онкогени чинилац из спољашње средине показано је да је оно и снажан стимулус у активацији p70 S6 киназе у епидермалним ћелијама мишева (Huang C и сар., 2002). Посредник у овом дејству је читав група ROS које се стварају унутар или у близини ћелијске мембране и покрећу каскаду киназа, активирају транскрипционе факторе и генску експресију. H₂O₂ је одговоран за фосфорилацију p70S6k на местима Thr389 и Thr421/ Ser424. Блокада рапамицином указује на посредничку улогу mTOR у овој каскади. Међутим како фосфорилација достиже максимум у различитим временским интервалима у односу на почетак индукције (на позицији Thr421/ Ser424 после 60 минута, на позицији Thr389 после 120 минута) претпоставља се учешће и других киназа у ROS посредованој активацији p70 S6 киназе.

Какав ће утицај имати ROS на сигналне молекуле зависи и од њихове дистрибуције у ћелији. Наиме, стварање H₂O₂ од стране NOX је локализовано

(Oakley и сар., 2009) јер се активирани NOX комплекси удружују у посебним ћелијским одељцима. И антиоксидативни систем има своју специфичну локализацију: GPx се налази у цитосолу, а CAT у пероксизомима. Фина субцелуларна локализација омогућава стварање H₂O₂ градијента на местима на којима су сигнални протеини сконцентрисани (Woo HA и сар., 2010).

У условима повишеног оксидативног стреса *in vitro*, након третмана водоник пероксидом, повећана је експресија iNOS и нитротирозина у гранулоцитима. Претходно описани резултати ове студије су показали повишену активност mTORC1 комплекса у условима ендогено повећаног оксидативног стреса код болесника са ХМН, који укључују и iNOS/NO компоненту. У истом окружењу, *in vitro*, повећана је активност mTORC1. PI3K/AKT/mTOR онкогени сигнални пут је потенцијална мета дејства iNOS и NO. Међутим, експериментални подаци који иду у прилог хипотези да iNOS и NO учествују у активацији mTOR и онкогеној сигнализацији су ретки. Lopez-Rivera и сарадници (2014) су код меланома показали везу између NO, односно експресије iNOS и реверзибилне нитрозилације TSC2 која спречава димеризацију са TSC1. У овом сигналном путу главни активатор mTOR киназе је мала Rheb GTP-аза. TSC2, као тумор супресор, у комплексу са TSC1 инактивира Rheb и тиме инхибира mTOR и молекуле нисходно у сигналном путу, p70 рибозомалну S6 киназу и 4EBP1. Повећана активација mTOR под дејством iNOS је онколошки значајна јер стимулише пролиферацију ћелија и раст тумора и негативно се одражава на апоптозу. Клинички значај оваквог дејства iNOS на mTOR показан је позитивном корелацијом експресије iNOS и нитрозилације са активацијом S6K и 4EBP1. TSC2 садржи бројне цистеинске аминокиселинске остатке у функционално значајним доменима, који могу бити нитрозиловани. Како је NO плејотропни молекул, своја дејства у регулацији mTOR може да остварује и другим механизмима, делујући на молекуле усходно од mTOR сигналног пута, ковалентним модификацијама протеина као што су нитрација и нитрозилација (Lopez-Rivera E и сар., 2014).

Тумор супресорни p53 протеин као хомотетрамерни транскрипциони фактор, али и механизмима независним од транскрипције, ствара услове за уклањање оштећене ДНК путем репарације или апоптозе. Његова инактивација или смањена експресија карактеристике су многих канцера и према Velu и сарадницима

(2007) могу бити последица оксидативног стреса када под утицајем ROS и RNS долази до *S*-глутатионилације ДНК-везујућег домена. Показано је такође да присуство *JAK2V617F* мутација утиче на функционалну инактивацију p53 иако су мутације самог p53 ретке у ХМН пре трансформације у акутну мијелоидну леукемију (Nakatake M и сар., 2012). Испитујући експресију p53 у гранулоцитима периферне крви наших испитаника није пронађена статистички значајна разлика у односу на дијагнозу или присуство *JAK2V617F* мутације мада је запажен тренд смањења експресије p53 код ПВ хомозигота и ПМФ хетерозигота. Ово је у складу са до сада објављеним, опречним, резултатима који се односе на везу између активације АКТ/mTOR сигналног пута и p53. На моделу хуманих фибробласта показано је да у основи старења, изазваног активацијом АКТ сигналног пута, лежи акумулација p53 услед mTOR-ом посредоване синтезе и стабилизације протеина (Aistle и сар, 2012). Супротно овоме, АКТ фосфорилацијом MDM2, Е3 убиквитин лигазе која је главни антагонист p53 у ћелији, доводи до деградације p53 (Ogawara Y., 2002.). Експресија p53 у ћелијама резултат је равнотеже супротних утицаја.

Резултати наших експеримената потврдили су широк спектар утицаја ROS на судбину третираних ћелија, од стимулације пролиферације до индукције ћелијске смрти. На гранулоцитима ХМН болесника и здравих испитаника МТТ тестом показано је цитотоксично деловање различитих концентрација H₂O₂. Овоме је свакако допринело и то што су изоловане ћелије биле лишене протективног деловања многобројних антиоксиданаса из плазме. Губитак ћелија био је дозно зависан код обе групе испитаника и неутрализован претретманом са NAC. Гранулоцити онколошких болесника имају повећану интрацелуларну концентрацију ROS, што је показано у нашој али и студији других истраживача (de Cavanagh EMV и сар., 2002). У нашем експерименту гранулоцити болесника испољили су већу отпорност на штетно деловање H₂O₂, вероватно као резултат боље адаптације на високе концентрације ROS (Devi GS и сар., 2000.). Према претходно описаним резултатима смањену активност САТ имали су само оболели од ХМЛ, док је код ПМФ болесника активност ензима у еритроцитима била значајно већа у поређењу са здравим испитаницима.

Како су гранулоцити веома сензитивне и реактивне ћелије чија се вијабилност у култури брзо смањује део експеримената урађен је са HEL ћелијама.

Ове ћелије представљају еритролеукемијску ћелијску линију чија је диференцијација заустављена на нивоу еритроидно-мегакариоцитног прогенитора. Испољавају конститутивну активацију JAK2 тирозин киназе која је последица хомозиготне *JAK2V617F* мутације (Este ML и сар., 2005)

Познато је да ефекат примене оксидативних агенса на процесе у ћелији у великој мери зависи од дозе и дужине њиховог деловања. H₂O₂ и NAC су у овој студији примењени у виду једнократног третмана осим у експерименту који је имао за циљ испитивање утицаја вишекратног излагања оксидансу на активност сигналног пута. Ефекти третмана праћени су у различитим временским интервалима: 5 минута до 3 сата, односно 24 h и 72 h.

Двадесет четворочасовни тест вијабилности (пролиферације) показао је да је број HEL ћелија третираних са H₂O₂ за 40% мањи у односу на контролу. После третмана рапамицином вијабилност ћелија се додатно смањила указујући на значај активног mTOR сигналног пута за преживљавања ћелија у култури.

У досадашњим истраживањима показана је веза између дозе и времена изложености са степеном оштећења макромолекула који доводе до малигне трансформације и апоптозе или ћелијске смрти (Gülden M и сар., 2010). Међутим, готово да нема истраживања која се односе на везу између дозе, односно времена деловања ROS и активности сигналних путева.

Испитујући експресију pAKT и AKT под утицајем H₂O₂ пораст активности регистрован је после 30 минута да би се у трећем сату вратио на почетне вредности. Сличну динамику активације регистровани смо и код mTOR киназе. Однос активне и укупно експримиране форме mTOR био је у 30. и 60. минути значајно већи у поређењу са нетретираним ћелијама. Третман HEL ћелија са мањом дозом H₂O₂ изазвао је краткотрајну активацију mTOR киназе (15 минута). Активација већим концентрацијама трајала је дуже, 1h (0,5 mM H₂O₂) односно 3h (0,3 H₂O₂ mM). У експерименту са различитим дозама H₂O₂ 30 минута после стимулације забележен је значајни пораст активности mTOR и S6 киназе у HEL ћелијама. Ефекат активације је изостао у групама које су пре H₂O₂ третиране са NAC. Ови резултати били су у складу са резултатима добијеним у експерименту са гранулоцитима наших испитаника. Сличан ефекат добијен је у истраживању са MO7е ћелијском линијом хуманих мегакариоцита. Третман са H₂O₂ значајно је смањивао активност

фосфатаза и повећао фосфорилацију тирозина ћелијских протеина. Примена NAC смањила је степен фосфорилације. Занимљиво је да је експресија *BCR/ABL* онкогена у овим ћелијама имала исти утицај на фосфорилацију протеина као и примена H_2O_2 (Sattler M и сар., 2000).

Иако регулише активност сигналних путева H_2O_2 није класичан сигнални молекул који функционише по принципу лиганд-рецептор. Полуживот H_2O_2 је врло кратак, у лимфоцитма, на пример, износи свега 1 ms. Директним деловањем на друге редокс системе као што су NADPH/NADP, глутатион/оксидовани глутатион, тиоредоксин/оксидовани тиоредоксин, протеин-SH/протеин-S-S-R регулише пролиферацију, апоптозу и сигналне путеве (Bienert GP и сар., 2006). Код примене H_2O_2 у експерименталним условима битан фактор који утиче на резултат је транспорт молекула кроз мембрану. Наиме, H_2O_2 брзо пролази кроз плазма мембрану али је транспорт ограничен. Показано је да константа пермеабилности тј. пропустљивост плазма мембране за H_2O_2 зависи од фазе ћелијског раста и да је пет пута већа у експоненцијалној фази раста (Sousa-Lopes и сар., 2004). Водоник пероксид се кроз плазма мембрану транспортује системом аквапорина (групе трансмембранских протеина који формирају поре за брзи транспорт молекула воде). За транспорт кроз мембране леукемијских ћелија најважнији су аквапорин 3 и 8. Од њиховог броја и активности који се могу мењати у различитим околностима зависи степен пермеабилности мембране за H_2O_2 (Vieceli Dalla Sega F и сар., 2014).

Као други оксиданс коришћен је ААРН са веома дугим полуживотом, чијим разлагањем константно и директно пропорционално концентрацији настају пероксил радикали ($ROO\cdot$). Анализом експресије АКТ и pАКТ протеина примећен је реципрочни однос између активности киназе и дозе оксиданса - са порастом концентрације ААРН опадала је активност АКТ у HEL ћелијама.

У експерименту у коме су ћелије 24 часа третиране са ААРН и/или NAC регистрована је повећана експресија pАКТ у свим групама третираним са антиоксидансом (NAC), да би после 72 h активност киназе била готово иста као код нетретираних ћелија. Исти третман имао је супротни ефекат на активацију mTOR киназе која је била повећана после двадесет четворочасовног деловања ААРН и смањена под утицајем NAC. Овај раскорак у активацији киназа могао би се објаснити негативном повратном спрегом која је описана у склопу

PI3K/AKT/mTOR сигналног пута, а чији механизам није до краја расветљен (Wang X и сар., 2017).

Двадесет четворочасовни вишекратни третман са H₂O₂ и NAC није значајно променио активацију mTOR у поређењу са контролном групом. Претпоставља се да је излагање ћелија дуготрајном дејству реактивних оксида довело до акумулација измењених макромолекула и интензивнијих поремаћаја у ћелијским процесима што за последицу има улазак ћелија у стање репарације насталих промена или стање адаптације на високе концентрације ROS (Davies KJA, 2000).

Интрацелуларно редокс стање, слично рН статусу или јонској концентрацији у цитосолу мења физиолошко окружење и функцију протеина (Bienart GP и сар., 2006). Сумација многобројних оксидо-редукционих промена и њихова међусобна интеракција одређује коначни резултат деловања ROS.

Појачана активација ћелијског циклуса код ХМТ повезана је са повећаном количином ROS (Tothova Z и сар., 2007). Недостатак активне АКТ киназе може се делимично надоместити повећањем интрацелуларне концентрације ROS (Juntala и сар., 2010). У нашој студији значајно је смањен број HEL ћелија у G0G1 фази, а повећан број ћелија у S фази након третмана са H₂O₂.

Peroni и срадници (2006) показали су у свом раду да блокада АКТ/mTOR сигналног пута делује проапоптотски и антипролиферативно на ћелије лимфома. mTOR се сматра централним координатором два кључна ћелијска процеса: ћелијског раста и деобе ћелија. Сигнале које добија путем нутритивних и митогених стимулуса преноси до својих ефектора. Активне форме S6K1 и 4E-BP1/ETIF-4E важне су за прогресију C2C12 миобласта кроз G1 фазу ћелијског циклуса (Fingar и сар., 2004). У ћелијама карцинома оваријума чија је битна карактеристика амплификација гена за 110α подјединицу PI3K и хиперактивација АКТ/mTOR сигналног пута показана је кључна улога ових ефектора у пропагацији кроз ћелијски циклус и експресији циклина D1, циклин зависне киназе CDK4, CDC25A и фосфорилацији ретинобластома. Третман рапамицином и инхибитором PI3K киназе (LY-294002), зауставља ћелије у G1 фази (Gao и сар., 2004). Исти ефекат имала је примена рапамицина на HEL ћелијама у нашој студији. Резултати испитивања *in vitro* показали су значајно смањење броја HEL ћелија у деоби након блокаде mTOR.

Ово је у складу са поставком Pietrasa и сарадника (2011) да PI3K/AKT/mTOR сигнални пут има кључну улогу у покретању ћелијског циклуса код ХМН тако што активира циклин D и циклин зависне киназе важне за пропацију кроз G1 фазу. Рапамицин смањује пролиферацију ХМН (Yilmaz и сар., 2006), а исти ефекат блокаде mTOR показан је на мишјем моделу (Chen и сар., 2009). Ово је у складу са нашом студијом где је показана позитивна корелација између броја ћелија у S и G2M фази ћелијског циклуса и активности mTOR у HEL ћелијама након третмана са H₂O₂. Супротно овоме активност mTOR киназе негативно је корелирала са бројем ћелија у G0G1 фази што све скупа указује на стимулативно дејство mTOR киназе на пролиферацију ћелија третираних H₂O₂, тј. у условима оксидативног стреса.

Азот моноксид и ROS имају важну улогу у свим фазама канцерогенезе као што су иницијација, прогресија и пропација. Малигне ћелије у стању перманентног оксидативног стреса развијају адаптивне одговоре пре свега у виду повећаног степена активности антиоксидативне заштите. У раним фазама развоја тумора, ROS својим цитотоксичним деловањем елиминише осетљиви клон ћелија и фаворизује пролиферацију малигнућ ћелија које су резистантне не само на деловање ендогених ROS већ и на терапеутике који путем њих делују (Manda G, и сар., 2009). Поред резистенције карактеристика малигнућ ћелија је и повећана продукција ROS као последица убрзаног метаболизма глукозе и интензивног транспорта електрона кроз респираторни ланац митохондрија (Kim и сар., 2005). Пораст ROS у хематопоеетским ћелијама под утицајем BCR/ABL, JAK2V617F, PI3K, AKT и mTOR киназе ствара зачарани круг у коме нова оштећења ДНК воде ка прогресији болести.

Резултати ове студије су показали постојање оксидативног стреса код ХМН, коме могу допринети и ROS и RNS и ово су први резултати који указују да би стање адаптације на оксидативни стрес код PhХМН могло да доведе до прогресије болести. Као важно запажање издваја се различита сензитивност mTOR киназе приликом промене редокс стања код здравих и болесника са ХМН, што указује на комплексност путева у које је mTOR киназа укључена и њихову измењеност код ових хематолошких малигнитета. За сада се наши резултати, у недостатку података о дејству редокс потенцијала на mTOR у ХМН или другим хематолошким

малигнитетима (објављене су две студије о регулацији mTOR-а код меланома, Lopez-Rivera E и сар., 2014 и Hambright HG и сар., 2015), могу посматрати само у ширем контексту редокс сигнализације унутар mTOR сигналног пута. Такође, приказани резултати су указали на стимулативно дејство mTOR киназе на пролиферацију ћелија у условима оксидативног стреса. Повећана продукција ROS јавља се у одговору на стимулацију факторима раста што је случај и са активацијом mTOR сигналног пута, стога не изненађује могућност њиховог синергистичког или укрштеног деловања.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Анализа експресије маркера оксидативних оштећења молекула и активности антиоксиданаса показала је постојање оксидативног стреса код ХМН.
2. Код појединачних подтипова ХМН постојале су значајне разлике у погледу активности ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима. У групи болесника са ХМЛ активност већине антиоксидативних ензима је била значајно смањена.
3. Уз повећану продукцију ROS и RNS код ПМФ болесника била је повећана и антиоксидативна заштита. Ово су први резултати који указују да би стање адаптације на оксидативни стрес код *Ph*-ХМН могло да доведе до прогресије болести.
4. Интактни гранулоцити болесника са ХМН имали су већу концентрацију интрацелуларних ROS у поређењу са контролама.
5. Повећана експресија нитротирозина и број iNOS-позитивних гранулоцита у ХМН, као одраз оксидативних оштећења и активације ћелија, били су најизраженији код болесника са ХМЛ.
6. У условима оксидативног стреса детектован је повећан степен активације АКТ и mTOR киназа у гранулоцитима већине болесника са ХМН у поређењу са контролама. Експресија pS6K, позитивно је корелирала са активацијом АКТ/mTOR у гранулоцитима.
7. Активност mTOR киназе у костној сржи повећана је код болесника са ПМФ и позитивно је корелирала са активношћу ове киназе у гранулоцитима периферне крви.
8. У *in vitro* условима показано је да H₂O₂ стимулативно делује на активацију mTOR, као и на експресију iNOS и нитротирозина у гранулоцитима болесника и здравих контрола. mTOR киназа испољила је различиту сензитивност приликом промене редокс стања код болесника са ХМН у односу на здраве испитанике.

9. Гранулоцити болесника испољили су већу отпорност на цитотоксично деловање H_2O_2 у односу на здраве испитанике, што указује на бољу адаптацију на високе концентрације ROS.
10. H_2O_2 је деловао стимулативно на активацију ћелијског циклуса. Активност mTOR киназе је важна за пролазак ћелија кроз G1 фазу и позитивно је корелирала са бројем ћелија у S фази након третмана са H_2O_2 . Резултати указују на стимулативно дејство mTOR киназе на пролиферацију ћелија у условима оксидативног стреса.
11. На активност mTOR сигналног пута код HEL ћелија утицали су врста и концентрација примењених оксиданаса као и време њиховог деловања.
12. Излагање HEL ћелија дуготрајном дејству H_2O_2 није значајно променило активацију mTOR, што указује да акумулација оксидативно измењених макромолекула доводи до стања репарације насталих промена или адаптације на високе концентрације ROS.

7. ЛІТЕРАТУРА

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105: 121-126.

Ahmad R, Tripathi AK, Tripathi P, Singh R, Singh S, Singh RK. Studies on lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant status as indices of oxidative stress in patients with chronic myeloid leukaemia. *Singapore Med J* 2010; 51(2):110-5.

Ahmad R, Tripathi AK, Tripathi P, Singh S, Singh R, Singh RK. Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *In Vivo* 2008;22(4):525-528.

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004, 75(6):639-53.

Alessi DR Andjelkovic M, Caudwell B, Cron O, Morrice N, Cohen P et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 15:6541–51.

Al-Gayyar MM, Eissa LA, Rabie AM, El-Gayar AM. Measurement of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukemia patients. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59:409-417.

Amin AR. The metabolomics of nitric oxide and reactive nitrogen species in immune editing tumor milieu: influence of nitric oxide-modulating therapies. *J Drug Metabol Toxicol* 2012; S8: 002.

Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 136-141.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989; 6(6):593-7.

Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK et al. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy *Oncogene* 2012; 31: 1949–1962

Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 2011, 434: 201-210.

Baldus S, Eiserich JP, Brennan ML, Jackson RM, Alexander CB, Freeman BA. Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1010-1019.

Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J* 2018, 8(2):15.

Bartalucci N, Tozzi L, Bogani C, Martinelli S, Rotunno G, Villeval JL et al. Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. *J Cell Mol Med* 2013; 17: 1385-1396.
B

Baskić D, Radosavljević G, Čokanović V, Jeftić I, Zelen I et al. Serum levels of NO, IL-18 and MDA in patients with breast carcinoma. *Medicus* 2005; 6: 62-65.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR, Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005, 365: 1054-61.

Bellacosa A, De Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare D et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas *Int J Cancer* 1995; 64: 280-285.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.

Bienart GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 994-1003.

Bittencourt RI, Vassallo J, Chauffaille Mde L, Xavier SG, Pagnano KB, Nascimento AC, et al. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012; 34(2): 140–149.

Bjørn ME, Hasselbalch HC. The Role of Reactive Oxygen Species in Myelofibrosis and Related Neoplasms. *Mediators Inflamm*, Volume 2015 (2015), Article ID 648090, 11 pages.

Bogani C, Bartalucci N, Martinelli S, Tozzi L, Guglielmelli P, Bosi A, Vannucchi AM; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro AGIMM Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of myeloproliferative neoplasms. *PLoS One* 2013, 8(1):e54826.

Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004, 337:1-13.

Borlado LR Redondo,C, Alvarez B, Jimenez C, Criado LM, Flores J et al. Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* 2000; 14: 895–903

Bourgeois J, Ishac N, Medrzycki M, Branchet-Boteineau M, Desbourdes L, Gouilles-Gruart V et al. Oncogenic STAT5 signaling promotes oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells by repressing antioxidant defences. *Oncotarget* 2017; 8: 41876-41889.

Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T et al. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol* 2005, 1(5):290-7.

Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*. 2013, 34(3):503-12.

Carr AC, McCall MR, Frei B Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1716-1723.

Cedergren J, Follin P, Forslund T, Lindmark M, Sundqvist T, Skogh T. Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils. *APMIS* 2003, 111(10):963-8.

Cella G, Marchetti M, Vianello F et al. Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Haemost* 2010;104: 151-156

Ceneli O, Haznedar R, Ongun CO, Altan N. Evaluation of superoxide dismutase enzyme activity of polymorphonuclear leucocytes, erythrocytes and thrombocytes in patients with chronic myeloproliferative disorders. *J Int Med Res* 2009; 37: 1365-1374.

Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2009, 94(11):1484-8.

Chen C, liu Y, Zheng P. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci Signal* 2009; 2: ra 75

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proct Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3636–3641

Chilvers ER, Cadwallader KA, Reed BJ, White JF, Condliffe AM. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: prospects for therapeutic intervention. *J Roy Coll Phys Lond*, 2000 34(1):68-74.

Cicenas J, Urban P, Vuaroqueaux V, Labuhn M, Kung W, Wight E et al. Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 394-401.

Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 1992; 90:1116-1121

Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266: 30-36.

Čokić VP, Mossuz P, Han J, Socoro N, Beleslin-Čokić B, Mitrović M et al. Microarray and Proteomic Analyses of Myeloproliferative Neoplasms with a Highlight on the mTOR Signaling Pathway. *PLoS One* 2015; 10: e0135463.

Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res* 2009, 69(5):1821-7.

Cortese-Krott MM, Koning A, Kuhnle GGC, Nagy P, Bianco CL, Pasch A, et al. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine. *Antioxid Redox Signal* 2017, 27(10):684-712.

Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA, Bernlohr DA. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab* 2012, 23(8):399-406.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003, 9(4):169-76.

Dames S, Mulet j, Rathgeb-Szabo K, Hall M, Grzesiek S. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability *J Biol Chemistry* 2005; 280 (21):20558-20564.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951, 6(4):372-5.

Davies KJA Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems *Life*, 2000;50: 279–289.

Davies MA, Kim SJ, Parikh NU, Dong Z, Bucana CD, Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1904-1914.

de Cavanagh EMV, Honegger AE, Hofer Bordenave ERH, Bullorsky EO, Chasseing NA, Fraga C Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients *Cancer* 2002; 94:3247-3251.

de Freitas RM, da Costa Maranduba CM. Myeloproliferative neoplasm and the JAK/STAT signaling pathway: an overview. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; 37(5): 348-353.

Delhommeau F, Jeziorowska D, Marzac C, Casadevall N. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2010, 91: 165-73.

Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Flower B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 2001;294: 1102–1105

Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN , Reddy PP Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias *Clin Chim Acta* 2000;293: 53–62

Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and bTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 2006; 314, 467–471.

Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 959:66-81.

Durmus A, Mentese A, Yilmaz M, Sumer A, Akalin I, Topal C et al. The Thrombotic Events in Polycythemia Vera Patients May Be Related to increased Oxidative Stress. *Med Princ Pract* 2014, 23:253–258.

Durmus A, Mentese A, Yilmaz M, Sumer A, Akalin I, Topal C et al. Increased oxidative stress in patients with essential thrombocythemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013, 17: 2860-2866.

Eliades A, Matsuura S, Ravid K. Oxidases and reactive oxygen species during hematopoiesis: a focus on megakaryocytes. *J Cell Physiol* 2012, 227(10):3355-62.

Espey MG, Miranda KM, Feelisch M, Fukuto J, Grisham MB, Vitek MP, Wink DA. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 899:209-21.

Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Xavier S, Citrin D, Vitek MP, Wink AA. A Chemical Perspective on the Interplay Between NO, Reactive Oxygen Species, and Reactive Nitrogen Oxide Species. *Ann NY Acad Sci* 2002, 962: 195–206. B

Espey MG, Thomas DD, Miranda KM, Wink DA. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99: 11127-11132. A

Este ML, Ozawa Y, Williams AH, List AF, Sokol L. Homozygous JAK2 V617P gain-of-function mutation is responsible for constitutive JAK2/STAT5 activation and proliferation of HEL.92.1.7. cell line *Blood* 2005; 106: 4377

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004, 567(1):1-61.

Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007; 121: 2381-2386.

Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 153-164.

Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 2015; 22(3): 377-88.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AT, Cheatham L, Christina Tsou C, Blenis J mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Molecular Cell Biology* 2004; 200–216.

Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15(2):247-54.

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M PI3K/Akt signalling pathway and cancer *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 193-204.

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006, 6: 521–534.

Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:281–291

Geest CR, Zwartkruis FJ, Vellenga E, Coffey PJ, Buitenhuis M. Mammalian target of rapamycin activity is required for expansion of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 2009, 94(7): 901-10.

Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10(11):1923-40.

Ghalaut VS, Sangwan L, Dahiva K, Ghalaut PS, Dhankhar R, Saharan R. Effects of imatinib therapy with and without turmeric powder on nitric oxide levels in chronic myeloid leukemia. *J Oncol Pharm Pract* 2012; 18: 186-190.

Ghosh J, Kobayashi M, Ramdas B, Chatterjee A, Ma P, Mali RS et al. S6K1 regulates hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia maintenance. *J Clin Invest*. 2016; 126(7):2621–2625.

Gingras AC, Kennedy SC, O Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998; 12: 502–513

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 2001; 15: 807-826.

Gladwin TM. Nitrite as an intrinsic signaling molecule. *Nat Chem Biol* 2005, 1, 245 – 246.

Glatzle D, Vuillennir YP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood-a convenient procedure for the assesment of riboflavine status in humans. *Experientia* 1974; 30: 565-638.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kB activation by reactive oxygen species:Fifteen years later. *Biochem pharmacol* 2006, 72: 1493–1505.

Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Simsek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol Int* 2006; 30:376-380.

Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and hemoresistance via NF-kB, MAP kinase and p53 pathway *Leukemia* 2005; 19: 586–594.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.

Greenberg SS, Ouyang J, Zhao X, Giles TD. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. *Nitric Oxide*. 1998;2(3):203-12.

Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL Dikalov S, Chilian W, Chen YW et al. American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-

Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res* 2016; 119: e39-e75.

Grimwade L, Happerfield L, Tristram C, Mcinotsh G, Rees M, Bench AJ et al. Phospho-STAT5 and phosphor-Akt expression in chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2009; 147: 495-506.

Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2655-71.

Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995, 57:737-69.

Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005; 1:353–361

Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007; 12:9-22.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kaalany NY, Mofat J et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCa, but not S6K1. *Dev Cell* 2006; 11: 859–871

Gülden M, Jess A, Kammann J , Maser E, Seibert H Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 49:1298–1305

Günel N, Coşkun U, Sancak B, Günel U, Hasdemir O, Bozkurt S. Clinical importance of serum interleukin-18 and nitric oxide activities in breast carcinoma patients. *Cancer* 2002, 95(3):663-7.

Haar EV, Lee S, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology* 2007; 9: 316–323.

Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 32081–32089.

Hambright HG, Meng P, Kumar AP, Ghosh R. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis disrupts oxidative stress-mediated survival of melanoma cells. *Oncotarget*. 2015; 6(9):7195-208.

Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD *PNAS* 2001; 9666-9670.

Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as Inflammatory Diseases: The Evidence, Consequences, and Perspectives. *Mediators of Inflammation*. Volume 2015 (2015), Article ID 102476, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102476>

Hasselbalch HC, Thomassen M, Riley CH, Kjær L, Larsen TS, Jensen MK et al. Whole blood transcriptional profiling reveals deregulation of oxidative and antioxidative defence genes in myelofibrosis and related neoplasms. Potential implications of downregulation of Nrf2 for genomic instability and disease progression. *PLoS One* 2014, 9(11): e112786.

Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res*. 2013, 37(2): 214-20.

Henriksson G, Sallmyr A, Du L, Larsson A, Manthorpe R, Bredberg A. Enhanced DNA-dependent protein kinase activity in Sjögren's syndrome B cells. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43(9):1109-15. Epub 2004 Jun 22.

Hermouet S, Bigot-Corbel E, Gardie B. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. *Mediators of Inflammation* Volume 2015, Article ID 145293, 16 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/14529>.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6(2):150-66.

Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR Jr, Darley-Usmar VM. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem* 2010, 285(26):19699-704.

Hirao A, Hoshii T. Mechanistic/mammalian target protein of rapamycin signaling in hematopoietic stem cells and leukemia. *Cancer Sci* 2013; 104(8): 977-982.

Huang C, Li J, Ke Q, Leonard S, Jiang BH, Zhong XS et al. Ultraviolet-induced phosphorylation of p70S6K at Thr389 and Thr421/Ser424 involves hydrogen peroxide and mammalian target of rapamycin but not Akt and atypical protein kinase C1 *Cancer Res* 2002; 62: 5689-5697.

Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol* 2014, 36: 79–90.

Huang M, Dorsey JF, Epling-Burnette PK, Nimmanapalli R, Landowski TH, Mora LB et al. Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. *Oncogene* 2002; 21: 8804-16.

Hurst JK. Whence nitrotyrosine? *J Clin Invest* 2002, 109(10):1287-9.

Hurtado-Nedelec M, Csillag-Grange MJ, Boussetta T, Belambri SA, Fay M, Cassinat B et al. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica* 2013; 98: 1517-1524.

Imbesi S, Musolino C, Allegra A, Saija A, Morabito F, Calapai G, Gangemi S. Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update. *Expert Rev Hematol* 2013, 6(3):317-25.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115: 577–590.

Ischiropoulos H. Protein tyrosine nitration-an update. *Arch Biochem Biophys* 2009, 484(2):117-21.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006; 127: 125–137.

James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-8.

Janus A, Robak T, Smolewski P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10: 479-498.

Joregensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans* 2007; 35:1347-54.

Junttila MM, Patil VD, Calamito M, Joshi RP, Birnbaum MJ, Koretzky GA. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species *Blood* 2010; 115: 4030-4038.

Jyoti A, Singh AK, Dubey M, Kumar S, Saluja R, Keshari RS et al. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing. *Antioxid Redox Signal* 2014, 20(3):417-31.

Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S et al. JAK2V617F+ myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. *Blood* 2014;124: 2996-3006.

Kakumoto K, Ikeda JI, Okada M, Morii E, Oneyama C. mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression. *PLoS ONE* 2015; 10(4): e0119015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119015>

Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* 2012, 52(1):1-6.

Kapadia B, Nanaji NM, Bhalla K, Bhandary B, Lapidus R, Beheshti A et al. Fatty Acid Synthase induced S6Kinase facilitates USP11-eIF4B complex formation for sustained oncogenic translation in DLBCL. *Nat Commun* 2018; 9:829.

Khadem-Ansari MH, Nozari S, Asoudeh M, Rasmi Y, Faridvand Y. Elevated Serum 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, Nitrite, and Nitrate in Patients with Stage I Multiple Myeloma. *Int J Cancer Manag* 2017, 10(10): e8493.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali JE, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H et al. mTOR interacts with Raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery *Cell* 2002;110: 163-175.

Kim JH, Chu SC, Gramlich JL, Pride YB, Babendreier E, Chauhan D et al. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 2005; 105: 1717-1723.

Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, Stevens T, Carius B, Gschaidmeier H et al. In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia* 2003, 17:999-1009.

Kirilin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ, Jones DP Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1208-1218.

Koptyra M, Falinski R, Nowicki M, Stokloska T, Majsterek I, Nieborowska-Skorska M et al. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance *Blood* 2006; 108:319-327.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005, 352: 1779-90.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Res* 2011; 711(1-2): 193-201.

Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* 2005,15(4):277-89.

Lee M, Choy JC. Positive feedback regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by Ras protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* 2013, 288(22):15677-86.

Lehman JA, Calvo V, Gomez-Cambronero J. Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, m-TOR-related THR389 kinase. *J Biol Chem* 2003, 278(30):28130-8.

Leslie N, Bennet D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN *The EMBO Journal* 2003; 22: 5501-5510.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-97.

Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(9):790-6.

Lindemann SW, Yost CC, Denis MM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004, 101(18):7076-7081.

Loitto VM, Nilsson H, Sundqvist T, Magnusson KE. Nitric oxide induces dose-dependent Ca^{2+} transients and causes temporal morphological hyperpolarization in human neutrophils. *J Cell Physiol* 2000,182(3):402-13.

Lopez-Rivera E, Jayaraman P, Parikh F, Davies MA, Ekmekcioglu S, Izdamehr S et al. Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2. *Cancer Res* 2014; 74: 1067-1078.

Ludin A, Gur-Cohen S, Golan K, Kaufmann KB, Itkin T, Medaglia C et al. Reactive Oxygen Species Regulate Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal, Migration and Development, As Well As Their Bone Marrow Microenvironment. *Antioxd Redox Signal* 2014, 21(11):1605-1619.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7(2):156-67.

Lundberg JO, Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396(1):39-45.

Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des* 2014, 20(22):3548-53.

Ly C, Arechiga AF, Melo JV, Walsh CM, Ong ST. Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* 2003; 63: 5716-22.

Ma Q, Wang Z, Zhang M, Hu H, Li J, Zhang D et al. Targeting the L-arginine-nitric oxide pathway for cancer treatment. *Curr Pharm Des* 2010, 16(4):392-410.

Maillet A, Pervaiz S. Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(11): 1285-94.

Manda G, Nechifor MT, Neagu TM Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies *Curr Chem Biol* 2009; 3:342-366.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011, 11(8):519-31.

Mantur M, Matowicka-Karna J, Darewicz B, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V, Prokopowicz J, Darewicz J. Nitroblue tetrazolium test in patients with renal tumor in the course of embolization. *Rocz Akad Med Bialymst.* 1998;43:292-7.

Marty C, Lacout C, Droin N, Le Couedic JP, Ribrag V, Solary E et al. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* 2013; 27: 2187-2195.

McInturff AM, Cody MJ, Elliott EA, Glenn JW, Rowley JW, Rondina MT, Yost CC. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood* 2012, 120(15):3118-25.

Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003, 22(37):5734-54.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-3175.

Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol* 2014, 28;5:84.

Moshage N, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma: A Critical Evaluation. *Clin Chem* 1995; 41:6.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

Musolino C, Allegra A, Saija A, Alonci A, Russo S, Spatari G et al. Changes in advanced oxidation protein products, advanced glycation end products, and s-nitrosylated proteins, in patients affected by polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Clin Biochem*. 2012; 45: 1439-1443.

Nakatake M, Monte-Mor B, Debili N, Casadevall N, Ribrag V, Solary E, Vainchenker W, Plo I. JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* 2012, 31(10): 1323-33.

Neshat MC, Mellishoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR PNAS 2001; 98: 10314–10319.

Nieborowska-Skorska M, Kopinski PK, Ray R, Hoser G, Ngaba D, Flis S et al. Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* 2012, 119(18):4253-63.

Oakley FD, Abbott D, Li Q, Engelhardt JF Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxid. Redox Signal* 2009; 11: 1313–1333.

Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 2002; 277: 21843–21850.

Oka SI, Hirata T, Suzuki W, Naito D, Chen Y, Chin A et al. Thioredoxin-1 maintains mechanistic target of rapamycin (mTOR) function during oxidative stress in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2017, 292(46):18988-19000.

Okuda K, Tadokoro I, Noguchi Y, Okuda K. Nitroblue tetrazolium (NBT)-dye test and the myeloperoxidase reaction of human leukocytes Japan. *J. Microbiol* 1974;18(5): 337-342.

Otašević V, Buzadžić B, Korać A, Stančić A, Janković A, Vučetić M et al. Effects of L-arginine and L-NAME supplementation on mRNA, protein expression and activity of catalase and glutathione peroxidase in brown adipose tissue of rats acclimated to different temperatures. *J Therm Biol* 2011; 36(5):269-276.

Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155(2):131-6.

Pandey R, Kapur R. Targeting phosphatidylinositol-3-kinase pathway for the treatment of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Mol Cancer* 2015; 14: 118.

Pantovic A, Krstic A, Janjetovic K, Kocic J, Harhaji-Trajkovic Lj, Bugarski D et al. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 2013; 52:524–531.

Pasquier F, Cabagnols X, Secardin L, Plo I, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; Suppl:S23-35.

Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3):385-400.

Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma *AJP* 2006;169, No. 6.

Perianin A, Labro-Bryskier MT, Marquetty C, Hakim J. Glutathione reductase and nitroblue tetrazolium reduction deficiencies in neutrophils of patients with primary idiopathic myelofibrosis. *Clin Exp Immunol* 1984; 57(1):244-8.

Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 2000; 275: 7416–7423.

Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, Mayer B. Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J Biol Chem* 2001, 276(36):34051-8.

Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, Scrima R, Lecce L, Boffoli D et al. Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 353(4):965-72.

Pietras ME, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 2011;195: 709–720.

Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 23;101(12):4003-8.

Rajeshwari U, Shobha I, Raghunatha R, Andallu B. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Acute and Chronic Myeloid Leukemia Patients. *OJBD* 2013; 3: 17-22.

Rao KM. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000; 3(1):27-58.

Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene*. 2006; 25(48):6373-83.

Rejto L, Huszka M, Káplár M, Udvardy M. Effects of in vitro platelet activation on platelet derived nitric oxide production in healthy humans and in chronic myeloproliferative diseases with elevated platelet counts. *Platelets* 2003; 14(5):283-286.

Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 2004, 385(1):1-10.

Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017, 129(6):680-692.

Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016, 98: 375–389.

Saki M, Prakash A. DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2017, 107:216-227.

Sallmyr A, Miller A, Gabdoulkhakova A, Safronova V, Henriksson G, Bredberg A. Expression of DNA-dependent protein kinase in human granulocytes. *Cell Res* 2004, 14(4):331-40.

Samuelsson J, Palmblad J. Defective neutrophil oxidative metabolism in polycythemia vera is associated with an impaired activation of phospholipase D. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 832:13-20.

Samuelsson J, Palmblad J. The defective stimulus-response coupling for oxidative reactions in neutrophils from patients with polycythemia vera. *Acta Haematol* 1996; 96(4):264-5.

Sangwan L, Kumar R, Peter R, Arun P. Evaluation of nitric oxide levels in chronic myeloid leukemia *IJIRR* 2014; 2: 1-5.

Sarbassov DD, Sabatini DM. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem* 2005; 280(47):39505-9.

Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Sánchez B, Llanillo M, Hernández-Hernández A. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012, 81(3):257-74.

Sattler M, Verma S, Shrinkhande G, Byrne CH, Pride YB, Winkler T et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 24273-8.

Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 2014, 24: R453–R462.

Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell*. 1994, 78(6):919-25.

Shenberger JS, Zhang L, Kimball SR, Jefferson LS. Hydrogen peroxide impairs insulin-stimulated assembly of mTORC1. *Free Radic Biol Med* 2009, 46(11):1500-9.

Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. Herzog Julius Rheumatology and Orthopedic Hospital, Bad Harzburg, Germany. *Clinical Nephrology* 2000, 53(1 Suppl):S9-17]

Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol* 2015, 43: 599-608.

Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997; 16: 6151-61.

Socoro-Yuste N, Čokić VP, Mondet J, Plo I, Mossuz P. Quantitative Proteome Heterogeneity in Myeloproliferative Neoplasm Subtypes and Association with JAK2 Mutation Status. *Mol Cancer Res* 2017;15: 852-861.

Socoro-Yuste N, Dagher MC, Gonzalez De Peredo A, Mondet J, Zaccaria A, Roux Dalvai F et al. Ph(-) myeloproliferative neoplasm red blood cells display deregulation of IQGAP1-Rho GTPase signaling depending on CALR/JAK2 status. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1863(11):2758-2765.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1):59-71.

Sousa Lopes A, Antunes F, Cyrne L, Marinho HS. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett* 2004; 578: 152-156.

Spivak JL. Narrative review: Thrombocytosis, polycythemia vera, and JAK2 mutations: The phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. *Ann Intern Med* 2010, 152(5): 300-306.

Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1987; 84:5034–7.

Tamura T, McMicken HW, Smith CV, Hansen TN. Mitochondrial targeting of GR requires a leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 659-663.

Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DH et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128:325-339.

Toyokuni S. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. *Arch Biochem Biophys* 2016, 595:46-9.

Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B* 2007, 851(1-2): 51-70.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003;189(1-2):41-54.

Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2008; 266(1):37-52.

Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017;129: 667-679.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39(1):44-84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, 160(1):1-40.

van Assendelft OW, Holtz AH, Lewis SM. Recommended method for the determination of the haemoglobin content of blood, I.C.S.H. Publications World Health Organization, 1.4.1. (1984).

van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997, 272(12):7617-25.

Van Etten RA, Shannon KM. Focus on myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes. *Cancer Cell* 2004; 6: 547-52.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 316–323.

Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 2015, 6:334-43.

Vannucchi AM, Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica* 2008, 93(7): 972-6.

Velu CS, Niture SK, Doneanu CE, Pattabiraman N, Srivenugopal KS Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress *Biochemistry*. 2007; 46(26): 7765–7780.

Vener C, Novembrino C, Catena FB, Fracciolla NS, Gianelli U, Savi F et al. Oxidative stress is increased in primary and post-polycythemia vera myelofibrosis. *Exp Hematol* 2010; 38: 1058-1065.

Vieceli Dalla Sega F, Zambonin L, Fiorentini D, Rizzo B, Caliceti C, Landi L et al Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843:806-814.

Viny AD, Levine RL. Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cancer J* 2014; 20(1): 61-65.

Vlaski-Lafarge M, Ivanovic Z. Reliability of ROS and RNS detection in hematopoietic stem cells-potential issues with probes and target cell population. *J Cell Sci* 2015, 128(21):3849-60.

Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 1995; 80:719-728.

Wang X, Yue P, Tao H, Sun SY Inhibition of p70S6K does not mimic the enhancement of Akt phosphorylation by rapamycin *Heliyon* 3 (2017) e00378

Warsch W, Grundchober E, Berger A, Gille L, Cerny-Reiterer S, Tigan AS et al. STAT5 trigger BCR/ABL1 mutation by mediating ROS production in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 2012; 3: 1669-87.

Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010, 5(1):51-66.

Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 2011; 89(6):873-91.

Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling *Cell* 2010;140: 517–528.

Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, Zang X, Tong W, Sellers R et al. ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. *EMBO J* 2010; 29: 4118-4131.

Yan C, Ding X, Dasgupta N, Wu L, Du H. Gene profile of myeloid-derived suppressive cells from the bone marrow of lysosomal acid lipase knock-out mice. *PLoS One* 2012,7(2):e30701.

Yeo WS, Lee SJ, Lee JR, Kim KP. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Rep.* 2008; 41(3):194-203.

Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H et al Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukemia-initiating cells. *Nature* 2006; 441:475-482.

Yoshida S, Hong S, Suzuki T, Nada S, Mannan AM, Wang J et al. Redox regulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity by modulating the TSC1/TSC2-Rheb GTPase pathway. *J Biol Chem* 2011; 286(37):32651-60.

Yoshioka Y, Kitao T, Kishino T, Yamamuro A, Maeda S. Nitric oxide protects macrophages from hydrogen peroxide-induced apoptosis by inducing the formation of catalase. *J Immunol* 2006; 176(8):4675-81.

Yucel AA, Gulen S, Dincer S, Yucel AE, Yetkin GI. Comparison of two different applications of the Griess method for nitric oxide measurement. *J Exp Integr Med* 2012, 2(2):167-171.

Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 2000, 6(5):347-73.

Zhao D, Yang J, Yang L. Insights for Oxidative Stress and mTOR Signaling in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury under Diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. Volume 2017 (2017), Article ID 6437467, doi.org/10.1155/2017/6437467

Zhao W, Du Y, Ho WT, Fu X, Zao ZJ. JAK2V617F and p53 mutations coexist in erythroleukemia and megacarioblastic leucemic cell lines. *Exp Hematol Oncol* 2012; 1(1):15.

Živić S, Vlaški J, Kocić G, Pešić M, Ćirić V, Đurić Z. Značaj oksidativnog stresa u nastanku dijabetesa tipa 1-određivanje aktivnosti katalaze u limfocitima obolelih. *Med Pregl* 2008; LXI (9-10): 458-463.

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

8-OH-dG - енгл. *7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine*, дихидро-8-оксодеоксигуанозин

ААРН - 2,2-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride

CALR - енгл. *calreticulin*, калретикулин

CAT - енгл. *catalase*, каталаза

cGMP - циклични гуанозинмонофосфат

DSBs - енгл. *double strand breaks*, дволанчани прекиди ДНК

4E-BP1 - енгл. *eIF4E binding protein*

eIF4B - енгл. *suppressor of eukaryotic translation initiation factor 4E*

FASN - енгл. *fatty acid synthase*, синтаза масних киселина

FAT - енгл. *FRAP-ataxia-teleangiectasia*

FERM - енгл. *4.1 protein, Ezrin Radixin Meosin*

FKBP12 - енгл. *FK506- and rapamycin-binding protein*

FRB - енгл. *FKBP-rapamycin binding*

G-6-PD - енгл. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*, глюкозо-6-фосфодехидрогеназа

G-CSF - енгл. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*, фактор стимулације гранулоцитних колонија

GM-CSF - *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*, фактор стимулације гранулоцитно-макрофагних колонија

GPx - енгл. *glutathione peroxidase*, глутатион пероксидаза

GR - енгл. *glutathione reductase*, глутатион редуктаза

GSH - глутатион

HEAT - енгл. *Huntingtin, elongation factor 3, the A subunit of protein phosphatase 2A, TOR1*

HEL - енгл. *Human erythroleukemia cells*

IGF-1 - енгл. *Insulin-like Growth Factor 1*, инсулину сличан фактор раста

JAK2 - енгл. *Janus activated kinase*, јанус киназа

MDSCs - енгл. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*, мијелоидне супресорске ћелије

mLST8 - енгл. *mammalian lethal with SEC13 protein 8, GbetaL*

MPL - енгл. *Myeloproliferative Leukemia virus oncogene*

mTOR - енгл. *Mammalian target of rapamycin*

NAC - N-ацетил цистеин

NADPH - енгл. *Nicotine adenine dinucleotide phosphate*, никотин аденин динуклеотид фосфат

NFκB - енгл. *Nuclear factor kappa B*, нуклеусни фактор капа B

NOS - енгл. *Nitric Oxide Synthases*, синтаза азот монооксида

NOX - NADPH оксидаза

PKC - енгл. *phosphoinositide dependent kinase 1*, фосфоинозитид зависна киназа

Ph⁻XMH/ Ph⁺ XMH - Филадельфија хромозом негативне/ Филадельфија хромозом позитивне хроничне мијелопролиферативне неоплазме

PI-3,4,5-P3 - фосфатидил инозитол трифосфат

PI3K - енгл. *phosphatidylinositol-3 kinase*, фосфатидилинозитол-3-киназа

PKC - енгл. *protein kinase C*, протеин киназа C

PRAS40 - енгл. *proline-rich Akt substrate 40 kDa*

PTEN - енгл. *phosphatase and tensin homolog*

Raptor - енгл. *regulatory associated protein of mTOR, Rapamycin sensitive protein*

Rictor - енгл. *Rapamycin insensitive protein*

RNS - енгл. *reactive nitrogen species*, реактивне врсте азота

ROS - енгл. *reactive oxygen species*, реактивне врсте кисеоника

S6K1 - енгл. *ribosomal p70S6 kinase*, рибозомална S6 киназа

SCF - енгл. *Stem Cell Factor*, фактор матичних ћелија

SIN1 - енгл. *SAPK-interacting protein*

SOD - енгл. *superoxide dismutase*, супероксид дисмутаза

STAT5 - енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription factor 5*

TSC1/TSC2 - енгл. *tuberous sclerosis complexes 1 and 2*, туберосклерозни комплекс 1/2

AML - акутна мијелоидна леукемија

AMP - аденозин монофосфата

ATP - аденозин трифосфата

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

ЕПО - еритропоетрин

ЕТ - есенцијална тромбоцитемија

иРНК - информациона рибонуклеинска киселина

МДА - малондиалдехид

ПВ - полицитемија вера

ПК - протеин карбонил

ПМФ - примарна мијелофиброза

ТПО - тромбоцитин

ХМЛ - хронична мијелоидна леукемија

ХМН - хроничне мијелопролиферативне неоплазме

ХМЋ - хематопоетске матичне ћелије

Биографски подаци

Др Драгослава Ђикић рођена је 4. 8. 1975. године у Сурдулици, где је завршила основну школу и гимназију општег смера као носилац Вукове дипломе. На Медицинском факултету Универзитета у Београду дипломирала је 30. 9. 2004. године са просечном оценом 9,23. Исте године на овом факултету уписала је последипломске студије - смер ендокринологија. Усмени магистарски испит положила је 28. 10. 2008. године са оценом 10, а магистарску тезу под насловом "Акутан ефекат етанола и блокаде синтезе азот-мооксида на структурне и функционалне карактеристике надбубрежне жлезде", чији је ментор Проф др Светозар Дамјановић и коментор Н. Сав. др Мирела Будеч, одбранила је 25. 5. 2010. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду. На истом факултету пријавила је докторат из хематологије.

Запослена је у Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, као истраживач-сарадник Групе за молекуларну онкологију којом руководи Н.Сав. др Владан Чокић. Тренутно је ангажована на пројекту: „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“ (МПН; 175053, период 2011-2017; руководилац др Владан Чокић, научни саветник) финансираним од стране Министарства за просвету и науку Републике Србије. Веће научних области медицинских наука, Универзитета у Београду, 29.3.2016. године дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације под називом: „ Утицај реактивних врста кисеоника на активност mTOR сигналног пута код пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама“ која је део горе поменутог истраживачког пројекта. Ментор докторске дисертације је Проф др Андрија Богдановић, а коментор В.Н.Сав. др Драгана Марковић.

Истраживачки опус мр Драгославе Ђикић, укључујући магистарску тезу, обухвата 47 научних публикација: 17 радова у међународним часописима, један рад штампан у националном часопису, 18 саопштења са међународних скупова и 11 саопштења са скупова од националног значаја штампана у изводу.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Драгослава Ђикић

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Утицај реактивних врста кисеоника на активност mTOR сигналног пута код пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojину drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28. 6. 2018.

Драгослава Ђикић

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Драгослава Ђикић

Broj upisa _____

Studijski program _

Naslov rada „Утицај реактивних врста кисеоника на активност mTOR сигналног пута код пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама“

Mentor Проф др Андрија Богдановић,,

Potpisani Драгослава Ђикић

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.6.2018.

Драгослава Ђикић

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Утицај реактивних врста кисеоника на активност mTOR сигналног пута код пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28. 6. 2018.

Isidora Jurek