

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Otilija D. Keta

***In vitro* studija nesitnoćelijskog
karcinoma pluća: efekat jonizujućeg
zračenja i inhibitora tirozin kinazne
aktivnosti receptora za epidermalni faktor
rasta**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Otilija D. Keta

***In vitro* study of non-small cell lung carcinoma: effects of ionizing radiation and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

KOMISIJA ZA PREGLED I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

Mentori:

dr Aleksandra Ristić-Fira, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Aleksandra Ristić-Fira, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ivan Petrović, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

DATUM ODBRANE:



ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Radiosenzitivnost humanog genoma“, pod rukovodstvom dr Aleksandre Ristić-Fira.

Svom mentoru, dr Aleksandri Ristić-Fira, naučnom savetniku, dugujem najveću zahvalnost na znanju i iskustvu koje mi je prenosila tokom mog naučno-istraživačkog rada. Posebno joj se zahvaljujem na ukazanoj stručnoj pomoći, savetima i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Korać, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za pregled i korisne sugestije, kao i na pomoći i pokazanom razumevanju u završnoj fazi izrade ove disertacije.

Najlepše se zahvaljujem dr Ivanu Petroviću, naučnom savetniku, za pregled i ocenu kao i stručne savete, primedbe i sugestije tokom izrade ovog rada, naročito iz oblasti radijacione fizike.

Takođe se zahvaljujem dr Leli Korićanac na prijateljskoj pomoći i savetima koje mi je dala tokom izvođenja eksperimentalnog dela ovog rada.

Svojim koleginicama, Jeleni Žakula, Tanji Bulat i dr Danijeli Todorović se posebno zahvaljujem za drugarstvo i podršku u našem zajedničkom radu.

Kolegi Igoru Goliću se takođe iskreno zahvaljujem na uloženom vremenu i trudu i pomoći u realizaciji eksperimentalnog dela ove disertacije.

Takođe se zahvaljujem svim koleginicama i kolegama iz laboratorije 090 koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Svojoj porodici se zahvaljujem na ljubavi, podršci i razumevanju koje mi pružaju svih ovih godina.

***In vitro* studija nesitnoćelijskog karcinoma pluća: efekat jonizujućeg zračenja i inhibitora tirozin kinazne aktivnosti receptora za epidermalni faktor rasta**

REZIME

Zračenje indukuje povišenu ekspresiju receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). Polazeći od značaja EGFR signalnog puta u procesu tumorigeneze, ovaj receptor je postao važan ciljani molekul u terapiji tumora. Utvrđeno je da je on pojačano eksprimiran i u nesitnoćelijskom karcinomu pluća i da ima važnu ulogu u patogenezi i prognozi terapijskog ishoda ove bolesti. Erlotinib, inhibitor tirozin kinazne funkcije EGFR je jedan od prvih agenasa koji su uvedeni u ciljanu terapiju nesitnoćelijskog karcinoma pluća. S obzirom na navedeno, istraživanja sinergističkog delovanja erlotiniba i zračenja u cilju poboljšanja antitumorskog efekta ovih agenasa su veoma aktuelna. Mehanizmi koji se nalaze u osnovi kombinovane terapije i njenog uticaja na nastanak različitih tipova ćelijske smrti su još uvek nedovoljno istraženi.

U ovoj disertaciji je *in vitro* ispitivan antitumorski efekat pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom na CRL-5876 ćelije nesitnoćelijskog karcinoma pluća čoveka. Efikasnost pojedinačnih i kombinovanih tretmana na ćelijsko klonogeno preživljavanje, vijabilnost, proliferaciju, kao i na kinetiku nastanka i nestanka dvolančanih prekida na DNK i distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, praćena je u funkciji vremena. U okviru ove studije analizirani su i efekti navedenih tretmana na promenu morfologije i ultrastrukture ćelija. U cilju utvrđivanja tipova ćelijske smrti do kojih ovi agensi dovode i njihovog međusobnog odnosa, uveden je inhibitor autofagije, hlorokin.

Na osnovu radiobioloških parametara utvrđeno je da CRL-5876 ćelije adenokarcinoma pluća čoveka pripadaju grupi radiorezistentnih tumorskih ćelija. Promene radiobioloških parametara nakon kombinovanog tretmana ukazuju da erlotinib značajno povećava radioosetljivost CRL-5876 ćelija. Ove promene su praćene i na nivou ćelijskog ciklusa. Zračenje izaziva G2/M blok, dok erlotinib dovodi do smanjenja S faze.

Kombinovani tretmani izazivaju najveće promene posle 48 h, kada je smanjenje S faze praćeno povećanjem broja ćelija u G1 fazi.

Predtretman erlotinibom dodatno povećava broj γ -H2AX fokusa indukovanih zračenjem. Uticaj erlotiniba se ogleda u povećanju broja rezidualnih fokusa posle 24 h, što ukazuje na kašnjenje u reparaciji DNK i u vezi je sa smanjenim klonogenim kapacitetom ćelija. Utvrđeno je da zračenje indukuje pojavu mitotske katastrofe CRL-5876 ćelija, a takođe dovodi i do autofagije koja ovde ima citoprotektivnu ulogu. Tretman zračenjem je u najvećem stepenu indukovao senescenciju ovih ćelija. Efekti erlotiniba se prvenstveno ostvaruju putem indukcije apoptoze. Predtretman erlotinibom kod ozračenih CRL-5876 ćelija dovodi do daljeg porasta broja ćelija u apoptozi. Pokazano je da hlorokin povećava citotoksičnost izazvanu erlotinibom i zračenjem kod CRL-5876 ćelija, ali da se efekti samog hlorokina gube posle sedam dana. Takođe je utvrđeno da u kombinovanim tretmanima dolazi do povećanja apoptoze i smanjenja senescencije CRL-5876 ćelija.

Rezultati dobijeni na modelu adenokarcinoma pluća čoveka ukazuju na značajan radiosenzitizirajući efekat erlotiniba. Takođe, ovi rezultati sugerišu da bi primena inhibitora autofagije u kombinaciji sa navedenim tretmanima mogla da ima dodatni antitumorski efekat u terapiji NSCLC.

Ključne reči: nesitnoćelijski karcinom pluća (NSCLC), γ -zračenje, erlotinib, receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), γ -H2AX, mitotska katastrofa, autofagija, apoptoza, senescencija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Radijaciona biologija

UDK broj: [613.648.4+615.277]:616-00.6 (043.3)

***In vitro* study of non-small cell lung carcinoma: effects of ionizing radiation and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor**

SUMMARY

It is known that radiation therapy increases EGFR expression in cancer cells, thus promoting radioresistance. Considering the importance of EGFR signaling pathway in tumorigenesis, this receptor has become an important target molecule for the treatment of tumors. It has been shown that EGFR is frequently overexpressed in non-small cell lung cancer (NSCLC) and plays an important role in the pathogenesis and the prediction of the therapeutic outcome of the disease. Erlotinib inhibits the tyrosine kinase activity of the EGFR and is used in molecular targeted therapy of NSCLC. Given the above findings, combining radiation with erlotinib in order to boost antitumor effects of these agents represents an actual field of research. However, the mechanisms underlying combined therapy and its impact on the induction of different modes of cell death have not been fully explained.

This thesis examines the antitumor effect of single and combined treatments with γ -rays and erlotinib on CRL-5876 human lung adenocarcinoma cells *in vitro*. The efficiency of single and combined treatments on clonogenic survival, cell viability, proliferation, kinetics of formation and disappearance of DNA double strand breaks and cell cycle distribution is monitored as a function of time. In this study the effects of these treatments on cell morphology and ultrastructure are analyzed. In order to determine the modes of cell death caused by these agents and to reveal their mutual relations, the autophagy inhibitor chloroquine is introduced in the analysis.

Based on the radiobiological parameters it is found that CRL-5876 human lung adenocarcinoma cells belong to the radioresistant group of cells. Changes in radiobiological parameters after combined treatments show that erlotinib significantly increases radiosensitivity of CRL-5876 cells. Moreover, changes in cell cycle distribution after treatments are observed. It is revealed that radiation causes G2/M arrest while erlotinib induces a decrease in S phase. The combined treatments lead to a major change after 48 h,

when the reduction in S phase is followed by an increase in the number of cells in G1 phase.

Pretreatment with erlotinib further enhances the number of radiation induced γ -H2AX foci. The impact of erlotinib on the kinetics of the disappearance of DNA DSB is reflected in the increase of residual foci after 24 h. This indicates a delay in DNA repair which is related to the reduced clonogenic capacity of cells. It is found that irradiation induces mitotic catastrophe in CRL-5876 cells, but also provokes autophagy that is shown to have a cytoprotective role. Radiation treatment induces senescence of the cells at highest degree. Pretreatment with erlotinib in irradiated CRL-5876 cells leads to a further increase in the number of cells in apoptosis. In this thesis, it is shown that chloroquine increases cytotoxicity induced by radiation and erlotinib in CRL-5876 cells, but the effects of chloroquine, as single agent, are lost after seven days. It is also found that the combined treatments increase apoptosis and decrease senescence in CRL-5876 cells.

The results obtained on human lung adenocarcinoma model indicate significant radiosensitizing effect of erlotinib. Also, these results suggest that the application of an autophagy inhibitor in combination with the above treatments may have an additional antitumor effect on NSCLC cells.

Key words: non small cell lung cancer (NSCLC), γ -irradiation, erlotinib, epidermal growth factor receptor (EGFR), γ -H2AX, mitotic catastrophe, autophagy, apoptosis, senescence

Scientific field: Biology

Special topic: Radiation biology

UDC number: [613.648.4+615.277]:616-00.6 (043.3)

SKRAĆENICE

WHO Svetska zdravstvena organizacija

NSCLC nesitnoćelijski karcinom pluća

SCLC sitnoćelijski karcinom pluća

EGFR receptor za epidermalni faktor rasta

ALK kinaza anaplastičnog limfoma

DNK dezoksiribonukleinska kiselina

SSB jednolančani prekidi na molekulu DNK

DSB dvolančani prekidi na molekulu DNK

ATM ataksija teleangiektazija mutirana

ATR proteinska kinaza povezana sa ataksija teleangiektazija i Rad3

P21 inhibitor ciklin zavisne kinaze 1

DNA-PKcs proteolitička subjeninica DNK zavisne proteinske kinaze

BRCA1 protein kancera dojke 1

53BP1 p53 vezani protein 1

NHEJ nehomologna rekombinacija

HR homologna rekombinacija

ATP adenzin trifosfat

iNOS inducibilna azot-oksida sintaza

TKI tirozin kinazni inhibitori

FDA agencija za hranu i lekove

NF-κB nukleusni faktor κB

ATG geni povezani sa autofagijom

SA-β-Gal β-galaktozidaza povezana sa senescencijom

FCS fetalni teleći serum

PBS fosfatno puferisani fiziološki rastvor

TCA trihlorsirćetna kiselina

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

EDTA etilen diamino tetra sirćetna kiselina
BSA albumin goveđeg seruma
SDS natrijum dodecil sulfat
SRB sulforodamin B
PI propidijum jodid
X-Gal 5-Bromo-4-hloro-3-indolil β -D-galaktopiranozid
MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid
BrdU 5-bromo-2-deoksiuridin
DMSO dimetilsulfoksid
DTT ditionitrol
PMSF fenilmetilsulfonil hlorid
TEMED N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
PS fosfatidil serin
AVO kiselo-vezikularne organele
RBE relativna biološka efektivnost
SER faktor povećanja osetljivosti
ER endoplazmin retikulum
DDR odgovor ćelije na oštećenja nastala na molekulu DNK

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 KANCER PLUĆA-OPŠTE KARAKTERISTIKE	1
<i>1.1.1 Epidemiologija i etiologija kancera pluća</i>	1
<i>1.1.2 Patohistološka podela kancera pluća</i>	2
<i>1.1.3 Adenokarcinom pluća</i>	3
1.2 TERAPIJA KANCERA PLUĆA	4
<i>1.2.1 Radioterapija kancera pluća</i>	5
<i>1.2.2 Ciljana molekularna terapija kancera pluća</i>	5
1.3 OŠTEĆENJA DNK IZAZVANA JONIZUJUĆIM ZRAČENJEM	6
<i>1.3.1 Jonizujuće zračenje</i>	7
<i>1.3.2 DSB i γ-H2AX</i>	9
<i>1.3.3 Reparacija oštećenja na molekulu DNK</i>	11
1.4 INHIBICIJA EGFR SIGNALNOG PUTA	12
<i>1.4.1 EGFR signalni put</i>	13
<i>1.4.2 Mutacije u genu za EGFR</i>	15
<i>1.4.3 Tirozin kinazni inhibitori</i>	15
1.5 MEHANIZMI ĆELIJSKE SMRTI	16
<i>1.5.1 Apoptoza</i>	17
<i>1.5.2 Autofagija</i>	18
<i>1.5.3 Mitotska katastrofa</i>	20
<i>1.5.4 Senescencija</i>	21
2. CILJ	22

3. MATERIJAL I METODE	24
3.1. MATERIJAL	24
3.1.1 Čelijska linija	24
3.1.2 Hemikalije	24
3.1.3 Puferi.....	25
3.1.4 Antitela	26
3.2. METODE	26
3.2.1 Gajenje ćelija u kulturi.....	26
3.2.2 Uslovi zračenja	26
3.2.3 Priprema rastvora erlotiniba i hlorokina	27
3.2.4 Klonogeni esej.....	27
3.2.5 MTT esej.....	28
3.2.6 SRB esej.....	28
3.2.7 BrdU esej.....	29
3.2.8 Analiza ćelijskog ciklusa	29
3.2.9 Imunocitohemija.....	30
3.2.10 Analiza morfoloških promena bojenjem po May-Grünwald Gimzi	30
3.2.11 Transmisiona elektronska mikroskopija	31
3.2.12 Morfometrijska analiza nukleusa.....	31
3.2.13 Western blot analiza.....	32
3.2.14 Kvantifikacija apoptoze.....	33
3.2.15 Detekcija i kvantifikacija kiselo-vezikularnih organela (AVO)	34
3.2.16 Detekcija i kvantifikacija senescencije.....	34
3.2.17 Statistička obrada rezultata	35
4. REZULTATI	36
4.1 Optimizacija eksperimentalnih uslova.....	38
4.1.1 In vitro rast CRL-5876 ćelija adenokarcinoma pluća	38
4.1.2 Testiranje koncentracija erlotiniba.....	39
4.2 Klonogeno preživljavanje CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja i erlotiniba	40

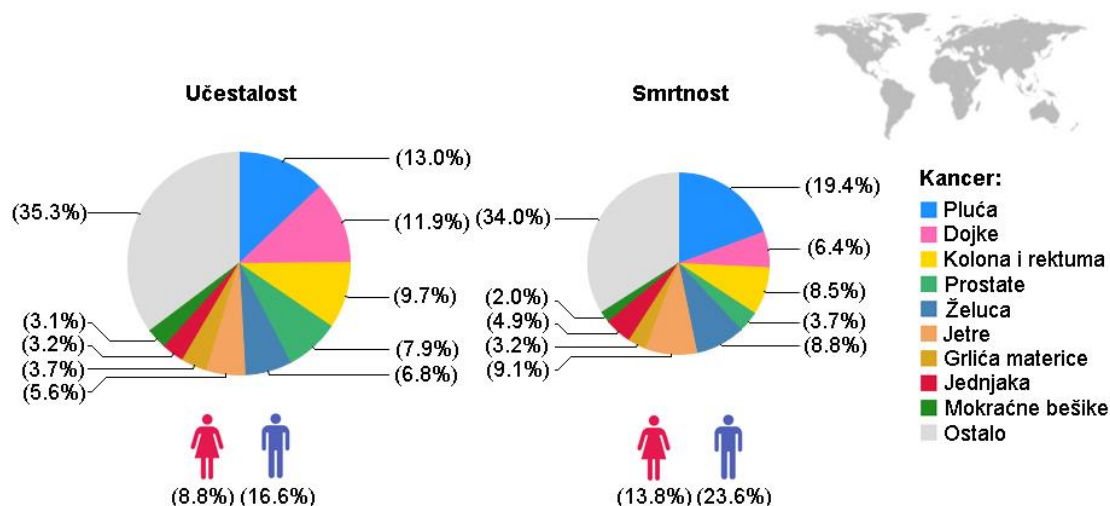
4.3 Vijabilnost CRL-5876 ćelija nakon tretmana γ -zračenjem i erlotinibom.....	44
4.4 Proliferacija CRL-5876 ćelija nakon tretmana γ -zračenjem i erlotinibom.....	45
4.5 Klonogeno preživljavanje, vijabilnost i proliferacija HTB140 i 59M ćelija nakon γ -zračenja.....	46
4.6 Efekti tretmana γ -zračenjem i erlotinibom na ćelijski ciklus CRL-5876 ćelija	48
4.7 Kvantifikacija γ -H2AX fokusa	49
4.8 Morfološke promene CRL-5876 ćelija izazvane γ -zračenjem i erlotinibom.....	53
4.9 Ultrastrukturna analiza CRL-5876 ćelija nakon tretmana γ -zračenjem i erlotinibom	54
4.10 Morfometrijska analiza nukleusa CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja i erlotiniba	59
4.11 Analiza ekspresije proteina u lizatima CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja i erlotiniba.....	63
4.12 Analiza tipova ćelijske smrti CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja, erlotiniba i hlorokina.....	68
4.12.1 Apoptoza.....	70
4.12.2 Indukcija AVO.....	72
4.12.3 Senescencija.....	75
5. DISKUSIJA	78
6. ZAKLJUČCI	95
7. LITERATURA	97

1. UVOD

1.1 KANCER PLUĆA - OPŠTE KARAKTERISTIKE

1.1.1 Epidemiologija i etiologija kancera pluća

Kancer pluća je već nekoliko decenija vodeći uzrok smrtnosti od malignih tumora širom sveta. Prema podacima Globocan 2012 projekta Međunarodne agencije za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) pri Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. *World Health Organization, WHO*), u svetu je 2012. godine registrovano 1.59 miliona smrtnih ishoda, što čini 19.4% od ukupnog broja kancerom uzrokovanih smrti (**Slika 1**). Više od polovine ovih slučajeva (58%) pripada zemljama u razvoju. Učestalost kancera pluća kod muškaraca je na prvom mestu, dok je kod žena četvrti najčešći maligni tumor, posle karcinoma dojke, kolorektalnog karcinoma i karcinoma grlića materice. Najveća stopa učestalosti kancera pluća kod muškaraca zabeležena je u srednjoj i istočnoj Evropi i istočnoj Aziji, dok je kod žena ona najveća u Severnoj Americi [Ferlay *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013].



Slika 1. Epidemiologija kancera pluća u svetu. Preuzeto i modifikovano iz projekta GLOBOCAN 2012 (www.globocan.iarc.fr)

Razlike u učestalosti kancera pluća između zemalja, kao i između muške i ženske populacije, su posledica razlika u broju pušača. Aktivno ili pasivno udisanje duvanskog dima je glavni faktor rizika za nastanak kancera pluća i odgovorno je za preko 80% ovih kancera [Peters *et al.*, 2012]. U druge faktore rizika spadaju izloženost radonu i sredinska ili profesionalna izloženost industrijskim karcinogenima, kao što su azbest, arsen, herbicidi, insekticidi, policiklični aromatični ugljovodonici [Spyratos *et al.*, 2013]. Takođe, pozitivna porodična anamneza kao i infektivni agensi povećavaju rizik od nastajanja kancera pluća [Dela Cruz *et al.*, 2011].

1.1.2 Patohistološka podela karcinoma pluća

Skoro svi kanceri pluća (~ 99%) su maligni epitelijalni karcinomi [Travis *et al.*, 2004]. Prema klasifikaciji WHO, a na osnovu histoloških parametara, dele se na dve osnovne grupe: nesitnoćelijski (eng. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) i sitnoćelijski (eng. *small cell lung cancer*, SCLC) karcinom pluća [Beasley *et al.*, 2005]. Nesitnoćelijski karcinom pluća čini 85%, dok sitnoćelijski karcinom pluća obuhvata 15% svih tumora pluća [Sechler *et al.*, 2013]. Brojni histološki podtipovi NSCLC se najčešće razvrstavaju u tri velike grupe: adenokarcinom, skvamozni karcinom i karcinom velikih ćelija [Brambilla *et al.*, 2001].

Izloženost duvanskom dimu značajno doprinosi histologiji i lokalizaciji tumora [Malara *et al.*, 1999]. Naime, skvamozni karcinom pluća je češće u vezi sa konzumiranjem cigareta i lokalizovan je više centralno u odnosu na adenokarcinom. Kod adenokarcinoma i karcinoma velikih ćelija češća je periferna lokalizacija na plućima [Khuder *et al.*, 2001].

Za određivanje stadijuma bolesti kod NSCLC koristi se TNM (eng. *tumor, node, metastasis*) klasifikacija [Green *et al.*, 2002]. Ovaj sistem daje informacije o lokalizaciji i proširenosti tumora i koristi se za prognozu bolesti i izbor terapije. Na osnovu TNM statusa, tumor se može naći u jednom od četiri stadijuma. IA je rani stadijum, dok stadijum IV predstavlja uznapredovalu fazu bolesti.

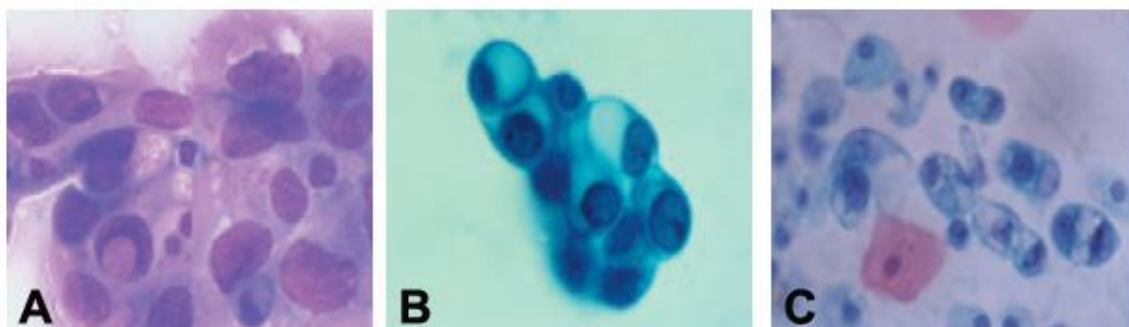
1.1.3 Adenokarcinom pluća

Adenokarcinom je u mnogim zemljama najčešći histološki podtip karcinoma pluća [Travis *et al.*, 2011]. Iako se mnogi slučajevi ove bolesti sreću kod pušača, adenokarcinom se češće javlja kod osoba, naročito žena, koje nikada nisu pušile [Yano *et al.*, 2011]. Glavni histološki podtipovi adenokarcinoma pluća su acinarni, papilarni, bronhioalveolarni, solidni sa stvaranjem mucina i mešoviti koji je mnogo češći, naročito kod većih tumora. Adenokarcinom metastazira najčešće limfnim i hematogenim putem, dok se aerogena diseminacija sreće uglavnom kod bronhioalveolarnog podtipa [Travis *et al.*, 2004]. Kod približno jedne petine pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarcinomom pluća najčešće su metastaze na mozgu, kostima, adrenalnim žlezdama i jetri [Quint *et al.*, 1996].

Dijagnoza adenokarcinoma citološkim metodama je zasnovana na detektovanju promena ćelijske morfologije i građe ćelijskih klastera [Geisinger *et al.*, 2003] (**Slika 2**). Ćelije adenokarcinoma pluća mogu biti pojedinačne ili organizovane u trodimenzionalne strukture (morule, acinuse, papile, pseudopapile). Nukleusi ćelija adenokarcinoma pluća su ovalni, sa granuliranim hromatinom i istaknutim nukleolusima. Citoplazma ćelija je prozirnija u poređenju sa citoplazmom ćelija skvamoznog karcinoma i može biti homogena ili ispunjena vakuolama. Pojedinačna, velika vakuola ispunjena mucinom može u nekim slučajevima da potisne nukleus ka ćelijskoj membrani - tzv. karcinom ćelija tipa prstena pečatnjaka (eng. *signet-ring cell carcinoma*). [Travis *et al.*, 2004].

Imunohistohemijske osobine adenokarcinoma pluća zavise od podtipa i stepena diferencijacije tumora. Najčešći epitelijalni markeri koji se koriste za klasifikaciju su: AE1/AE3, CAM 5.2, EMA, CEA, CK7, CK20 i TTF-1 [Colby *et al.*, 1995; Rubin *et al.*, 2001; Yatabe *et al.*, 2002]. Za adenokarcinom pluća karakterističan je CK7(+), CK20(-), TTF-1(+) imunohistohemijski profil [Giordano *et al.*, 2001]. Genske promene koje se nalaze u osnovi adenokarcinoma pluća uključuju mutacije koje dovode do aktivacije onkogena ili inaktivacije tumor-supresorskih gena. Takođe se aktiviraju i signalni putevi koji dovode do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija. Mutacije u KRAS genu se sreću u 30% adenokarcinoma pluća i češće su kod pušača, dok su mutacije u genima za receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) i

kinazu anaplasičnog limfoma (eng. *anaplastic lymphoma kinase*, ALK) češće kod osoba koje nikada nisu pušile [Riely *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012]. U negativne prognostičke faktore spadaju i mutacije TP53, LKB1, ERBB2 i BRAF gena [Greulich, 2010].



Slika 2: Adenokarcinom pluća. Na citopatološkom uzorku uočljiva su pravilna jedra i sitni nukleolusi - Diff-Quick bojenje (A). Klaster ćelija bronhoalveolarnog tumora mucinoznog tipa - Papanicolau bojenje (B). Pojedinačne ćelije bronhoalveolarnog karcinoma sa infiltriranim alveolarnim makrofagima - Papanicolau bojenje (C). Preuzeto iz [Travis *et al.*, 2004].

1.2 TERAPIJA KANCERA PLUĆA

Terapijski protokoli za kancer pluća zavise od histološkog tipa kancera (NSCLC, SCLC), stadijuma bolesti i opšteg zdravstvenog stanja pacijenta. Za rane stadijume NSCLC (I, II i IIIA), hirurško odstranjivanje tumora je jedan od najvažnijih terapijskih pristupa. Petogodišnje preživljavanje ovih pacijenata uz primenu hemioterapije iznosi 51% [Douillard *et al.*, 2006; Provencio *et al.*, 2011]. Međutim, kod samo 20 do 30% pacijenata tumor se dijagnostikuje kada je u resektabilnom stadijumu [Prokakis *et al.*, 2008]. Kod neresektabilnih oblika NSCLC primenjuje se radioterapija u kombinaciji sa hemioterapijom na bazi platine [Provencio *et al.*, 2011]. Uprkos napretku koji pruža kombinovana terapija, prognoza pacijenata sa NSCLC je i dalje loša uz brojna propratna neželjena dejstva lekova. Međutim, nova saznanja iz oblasti biologije kancera i mehanizama onkogeneze dovela su do razvoja novih terapijskih strategija kao što je ciljano molekularna terapija.

1.2.1 Radioterapija kancera pluća

Radioterapija (zračna terapija) je jedan od ključnih pristupa u lečenju malignih bolesti. U savremenoj radioterapiji, da bi se povećao efekat zračenja i smanjilo oštećenje okolnog zdravog tkiva, najčešće se koristi frakcionisanje doze zračenja [Pajonk *et al.*, 2010]. Uspeh radioterapije se određuje primenom tzv. 4R principa radijacione biologije. On podrazumeva: 1. **r**eparaciju DNK oštećenja, 2. **r**edistribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, 3. **r**epopulaciju i 4. **r**eoksigenaciju hipoksičnih regiona tumora. Postoje mišljenja da ovaj koncept treba proširiti petim članom – **r**adioosetljivošću, koja se razlikuje kod normalnih i tumorskih ćelija [Balcer-Kubiczek, 2012].

Standardni terapijski protokol kod pacijenata sa NSCLC u stadijumu III podrazumeva primenu ukupne doze zračenja od 60 Gy u frakcijama od po 2 Gy tokom perioda od 6 nedelja [Sause *et al.*, 1995; Rowell & Williams, 2001]. Istraživanja su pokazala da se bolji efekti radioterapije postižu kombinovanjem sa agensima koji povećavaju osetljivost na zračenje. Kod pacijenata sa NSCLC zračenje se najčešće kombinuje sa cisplatinom i etopozidom. Međutim, iako se kombinovana terapija pokazala efikasnijom u odnosu na samo zračenje, prognoza pacijenata sa NSCLC u stadijumu III je i dalje loša sa petogodišnjim preživljavanjem koje je manje od 20% [Lerouge *et al.*, 2014].

1.2.2 Ciljana molekularna terapija kancera pluća

Nova strategija u lečenju kancera je ciljana molekularna terapija koja se zasniva na fenomenu „onkogene zavisnosti” kancerskih ćelija. Prema ovom konceptu, za održavanje malignog fenotipa određenih kancera „odgovorni su” često samo jedan ili nekoliko gena, pa inaktivacija proteina koje ovi geni kodiraju može da dovede do smrti kancerske ćelije [Weinstein & Joe, 2008].

U ciljanoj molekularnoj terapiji kancera pluća danas se koriste agensi koji inhibiraju nekoliko signalnih puteva neophodnih za preživljavanje i proliferaciju kancerskih ćelija. Agensi koji inhibiraju EGFR su cetuksimab, gefitinib i erlotinib. Krizotinib inhibira ALK, dok bevacizumab blokira angiogenezu delujući na vaskularni endotelni faktor rasta (eng.

vascular endothelial growth factor, VEGF). Još jedan u nizu ovih agenasa, vorinostat, spada u grupu inhibitora histonskih deacetilaza (eng. *histone deacetylase inhibitor*, HDAC), a njegova efikasnost u terapiji NSCLC se ispituje u tekućim kliničkim istraživanjima [Sechler *et al.*, 2013].

Prednost ciljane molekularne terapije u odnosu na konvencionalnu hemioterapiju je u tome što se selektivnim delovanjem na kancerske ćelije smanjuju neželjeni efekti na zdravo tkivo. Međutim, iako pacijenti sa NSCLC u početku dobro odgovaraju na ciljanu molekularnu terapiju, oni nažalost, posle izvesnog vremena razvijaju rezistenciju. Zbog toga se primenom ovih lekova srednje vreme preživljavanja pacijenata produžava za samo nekoliko meseci [Sechler *et al.*, 2013; Chong & Jänne, 2013]. Poslednjih godina se intenzivno radi na utvrđivanju mutacija koje dovode do nastanka rezistencije na ciljanu molekularnu terapiju, kao i na iznalaženju načina za njeno prevazilaženje [Blair *et al.*, 2014].

1.3 OŠTEĆENJA DNK IZAZVANA JONIZUJUĆIM ZRAČENJEM

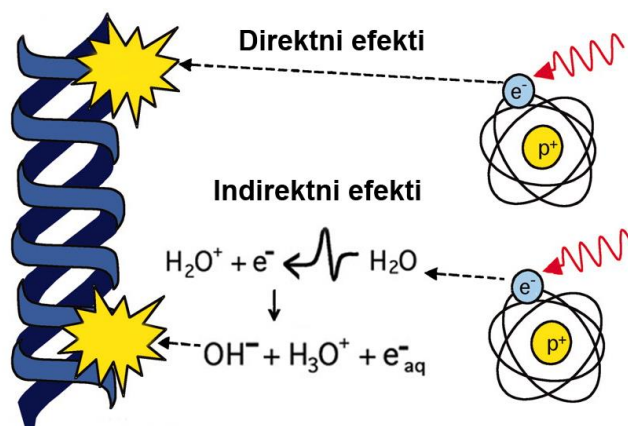
Jonizujuće zračenje indukuje brojna oštećenja DNK koja mogu biti: delecije baznih parova, jednolančani (eng. *single-strand breaks*, SSB), dvolančani (eng. *double-strand breaks*, DSB) prekidi i višestruka, kompleksna oštećenja [Barnard *et al.*, 2013]. Dok se većina SSB lako popravlja, ispravljanje kompleksnijih oštećenja kao što su DSB za ćeliju predstavlja veći izazov [DeWeese & Laiho, 2011]. Uprkos visoko efikasnim sistemima reparacije, tačnost u ponovnom povezivanju fragmenata DNK nije uvek potpuna zbog čega može da dođe do hromozomskih rearanžmana [Kasperek & Humphrey, 2011]. Ako se DSB zadrže do mitoze, fragmenti hromatida se mogu izgubiti tokom anafaze, što dovodi do pojave nebalansiranog genoma [DeWeese & Laiho, 2011]. Dvolančani prekidi i naročito višestruke, složene lezije na DNK za ćeliju su najčešće smrtonosni događaji [Sage & Harrison, 2011].

1.3.1 Jonizujuće zračenje

Jonizacija je proces u kome atom gubi ili dobija elektrone u svom omotaču odnosno elektronskim orbitama i time postaje pozitivan odnosno negativan jon. Prema tome, zračenje koje dovodi do jonizacije atoma zove se jonizujuće zračenje. Ono može da bude elektromagnetno, pod uslovom da ima dovoljno energije da oslobodi elektrone iz atoma, ili čestično, koje uključuje i jone. Elektromagnetno zračenje, koje se još zove i fotonsko, obuhvata: X i γ zrake, dok se pod čestičnim podrazumevaju: protoni, β (elektroni i pozitroni) zraci, α čestice i drugi joni. S obzirom da je elektromagnetno zračenje električno neutralno, ono jonizuje atome materije na posredan način preko fotoelektričnog ili Komptonovog efekta ili proizvodnjom parova elektron-pozitron. Pri fotoelektričnom efektu fotoni predaju svu svoju energiju elektronima na spoljnim elektronskim orbitama atoma pa se iz atoma emituju ti elektroni. Komptonov efekat karakteriše rasejanje fotona tako što on predaje deo svoje energije elektronima iz spoljnih atomskih orbita i nastavlja kretanje sa promenjenim pravcem i smanjenom energijom, dok su elektroni koji su primili energiju emitovani iz atoma. Proizvodnja para elektron-pozitron nastaje posle interakcije fotona sa poljem atomskog jezgra ili atomskog omotača, pri kojoj on gubi svoju celokupnu energiju i biva apsorbovan, a energija je potrošena na stvaranje para i njegovu emisiju. Elektroni proizvedeni na navedene načine jonizuju atome materije Kulonovim interakcijama sa elektronima atoma. Suprotno fotonima, naelektrisane čestice i joni jonizuju atome na neposredan način putem Kulonovih interakcija sa elektronima iz atomskih omotača. [Podgorsak *et al.*, 2005].

Indukcija DNK oštećenja i stvaranje slobodnih radikala su dva osnovna načina kojima zračenje dovodi do oštećenja ćelije. Direktni efekti jonizujućeg zračenja ogledaju se u trenutnom oštećenju ćelijskih makromolekula (DNK, fosfolipidi ćelijske membrane) i inicijaciji unutarćelijske signalizacije koja dovodi do aktivacije apoptotskih signalnih puteva [Mishra *et al.*, 2004; Morgan & Sowa, 2005]. S obzirom na to da je dominantni molekul u živim sistemima voda, radioliza vode je osnovna posledica indirektnog delovanja zračenja na biološke sisteme. Na ovaj način nastaju tri visokoreaktivna radikala: hidratisani, „akvatizovani” elektron (e_{aq}^-), hidroksil radikal (OH^\bullet) i vodonični (H^\bullet) radikal (**Slika 3**).

Njihovom rekombinacijom se formira toksični vodonik peroksid, H_2O_2 . Takođe, u prisustvu rastvorenog kiseonika nastaju i superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$) i hidroperoksi radikal (HO_2^{\cdot}) koji dovode do oštećenja DNK, proteina i ćelijskih membrana [Azzam *et al.*, 2012].



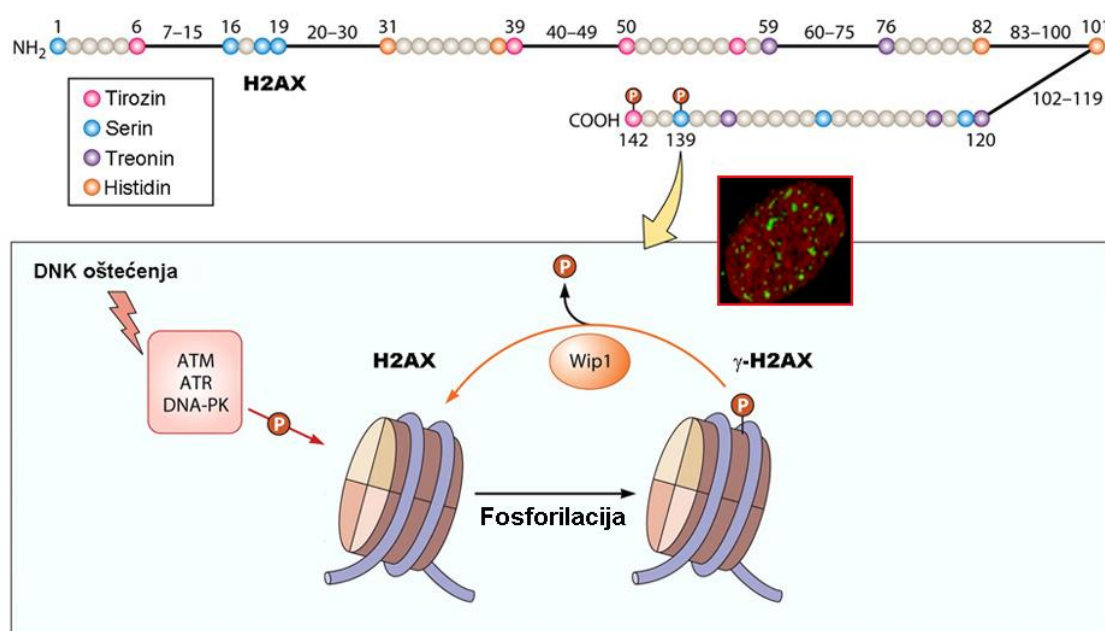
Slika 3. Direktni i indirektni efekti jonizujućeg zračenja. Preuzeto i modifikovano iz [Morgan & Sowa, 2005].

Energija zračenja je ta koja izaziva oštećenja tkivnih struktura. Količina energije (u džulima – J) koja se preda kilogramu (kg) materije naziva se absorbovanom dozom i izražava se u grejima (Gy). Jedna od važnih determinanti učinka jonizujućeg zračenja je brzina absorbovane doze. Ona predstavlja absorbovanu dozu u jedinici vremena i izražava se u grejima u sekundi (Gy/s) [McParland, 2010].

Radioterapija se primenjuje na dva načina: kao spoljašnja radioterapija, kada se izvor jonizujućeg zračenja nalazi na određenom rastojanju od pacijenta i kao unutrašnja terapija (brahiterapija) za koju se izvor zračenja postavlja u neposrednu blizinu tumora [Sadeghi *et al.*, 2010]. U radioterapiji se najčešće koristi fotonsko zračenje (X ili γ -zraci). Najčešći izvori γ -zračenja koji se primenjuje u kliničkoj praksi su teleterapijske mašine sa radioaktivnim izvorom ^{60}Co , dok se kao izvori X-zračenja i elektrona koriste ortovoltazne mašine, linearni akceleratori, betatroni i mikrotroni [Podgorsak *et al.*, 2005].

1.3.2 DSB i γ -H2AX

Jedan od značajnih mehanizama koji se razvio kod eukariota predstavlja fosforilacija izoforme histona H2A (H2AX) na mestima dvolančanih prekida DNK [DeWeese & Laiho, 2011]. Naime, stotine i hiljade H2AX molekula koji se nalaze u hromatinu u blizini DSB se u odgovoru na zračenje fosforiliše na omega-4-serinskom ostatku (Ser 139). Ovo dovodi do formiranja diskretnih fokusa (eng. *foci*) koji se mogu vizuelizovati uz pomoć imunocitohemije i fluorescentne mikroskopije [Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004]. Fosforilisani H2AX se u literaturi označava kao γ -H2AX [Rogakou *et al.*, 1998, 1999; Bonner *et al.*, 2008] (Slika 4). γ -H2AX fokusi služe kao mesta okupljanja brojnih molekula različitih proteina koji učestvuju u DNK reparaciji, hromatinskom remodeliranju i kontroli ćelijskog ciklusa [McKinnon & Caldecott, 2007; Bonner *et al.*, 2008].



Slika 4. Struktura i mehanizam fosforilacije i defosforilacije H2AX. Preuzeto i modifikovano iz [Banerjee & Chakravarti, 2011].

Za fosforilaciju H2AX na omega-4-serinu su odgovorne tri proteinske kinaze: ataksija teleangiektazija mutirana (eng. *ataxia telangiectasia mutated*, ATM), proteinska kinaza povezana sa ataksija teleangiektazija i Rad3 (eng. *ataxia telangiectasia and rad3-related*, ATR) i proteolitička subjedinica DNK zavisne proteinske kinaze (eng. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*, DNA-PKcs) [Lee & Chowdhury, 2011] (**Slika 4**). Koji će tip kinaze fosforilisati H2AX zavisi od porekla oštećenja DNK [Bonner *et al.*, 2008]. Mehanizmi defosforilacije γ -H2AX još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se zna da u njima učestvuje fosfataza 1 indukovana divljim tipom p53 (eng. *wild-type p53 induced phosphatase 1*, WIP 1) [Banerjee & Chakravarti, 2011] (**Slika 4**).

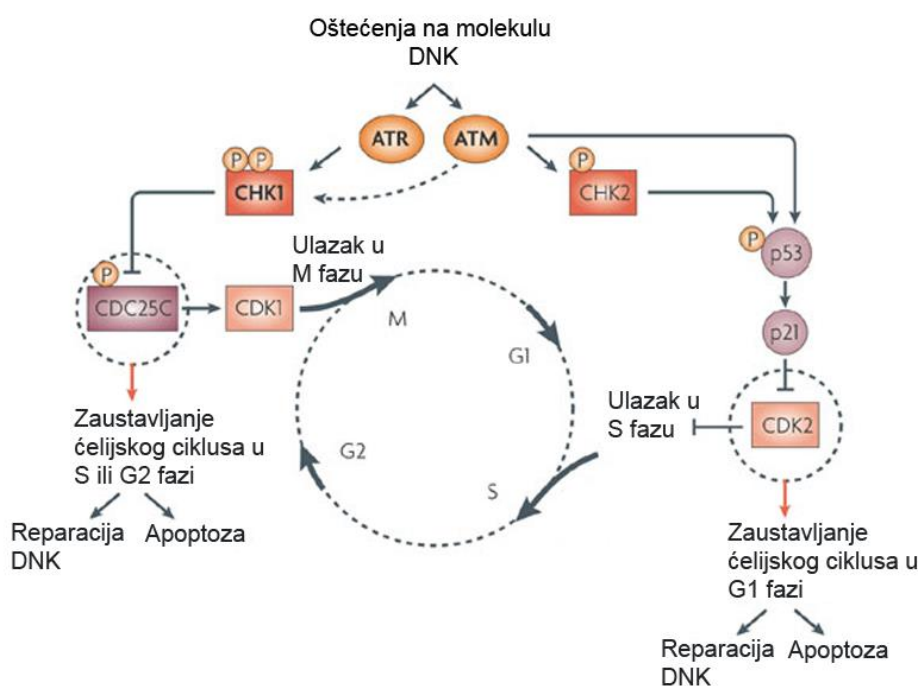
Većina nukleozomskih histona se sintetišu u S fazi ćelijskog ciklusa. Međutim, H2AX se takođe sintetiše i nezavisno od replikacije verovatno zbog toga što DNK oštećenja mogu da nastanu u bilo kojoj fazi ćelijskog ciklusa [De Weese & Laiho, 2011]. Nastanak γ -H2AX je početna tačka za aktivaciju niza događaja koji dovode do koncentracije različitih signalnih proteina uključujući protein kancera dojke 1 (eng. *breast cancer 1*, BRCA1) i p53 vezani protein 1 (eng. *p53-binding protein 1*, 53BP1) na mestu DSB. BRCA1 i 53BP1 imaju ključne uloge u održavanju integriteta genoma delovanjem na DNK reparaciju i kontrolne tačke ćelijskog ciklusa [Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002; FitzGerald *et al.*, 2009; Huen *et al.*, 2010]. Takođe, γ -H2AX učestvuje direktno ili posredno u remodeliranju hromatina, a takođe sprečava i disocijaciju prekinutih fragmenata DNK [van Attikum & Gasser, 2005; Bassing & Alt, 2004].

Metoda za detekciju γ -H2AX je imunocitohemijska tehnika koja omogućava vizuelizaciju pojedinačnih γ -H2AX fokusa u jedru ćelije [Moroni *et al.*, 2013]. Ova metoda se smatra jednom od najosetljivijih za detekciju DSB jer može da detektuje pojedinačne dvolančane prekide i pri jako niskim dozama zračenja (1mGy) [Rothkam & Löbrich, 2003]. S obzirom na veliku osetljivost, γ -H2AX je kao biomarker našao primenu i u kliničkoj praksi za praćenje efekata radioterapije, kao i za ispitivanje posledica radijacionih akcidenata [Löbrich *et al.*, 2005; Rothkamm *et al.*, 2007; Geisel *et al.*, 2008; Kuefner *et al.*, 2009; Redon *et al.*, 2009]. Konačno, γ -H2AX se koristi u radijacionoj biodozimetriji za merenje dnevnog kosmičkog zračenja u Međunarodnoj kosmičkoj stanici. Jedna od takvih studija je pokazala da su izmerene doze zračenja bile slične kada su merene γ -H2AX

esejom kao biološkim, i termoluminiscentnim, kao fizičim dozimetrom i iznosile su 0.7, odnosno 0.5 mSv/dan [Ohnishi *et al.*, 2009].

1.3.3 *Reparacija oštećenja na molekulu DNK*

U odgovoru na dvolančane prekide DNK koji su nastali pod uticajem jonizujućeg zračenja, kontrolni mehanizmi zaustavljaju ćelijski ciklus u određenoj fazi da bi omogućili dovoljno vremena za efikasnu popravku tih oštećenja. Ako su oštećenja suviše kompleksna i ne mogu da se efikasno poprave dolazi do senescencije ili apopoze ćelija [Lapenna & Giordano, 2009]. Tumor suprsor p53 je transkripcioni faktor koji ima ključnu ulogu u ovim procesima [Meek, 2004]. Kao što je već navedeno, ATM i ATR se aktiviraju kao odgovor na oštećenja na molekulu DNK. ATM fosforiliše p53 direktno ili putem aktivacije serin-treonin kinaze kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa 2 (eng. *checkpoint kinase*, CHK2) (Slika 5) [Lapenna & Giordano, 2009].



Slika 5. Zaustavljanje ćelijskog ciklusa kao posledica oštećenja na molekulu DNK. Preuzeto i modifikovano iz [Lapenna & Giordano, 2009].

P53 dovodi do transkripcije inhibitora ciklin zavisne kinaze 1 (eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, p21), odnosno inhibicije ciklin-zavisne kinaze 2 (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK2), što za posledicu ima zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G1 fazi [Derheimer & Kastan, 2010]. Kod oštećenih ćelija koje su već ušle u S fazu, ATM i ATR fosforilišu CHK1 (eng. *checkpoint kinase*, CHK1) koja inhibira dvojno-specifičnu fosfatazu (eng. *dual-specificity phosphatase* CDC25C) i ciklin-zavisnu kinazu 1 (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK1). Time se formira S/G2 blok i sprečava ulazak ovih ćelija u M fazu ćelijskog ciklusa (**Slika 5**) [Lapenna & Giordano, 2009].

Postoje dva mehanizma za popravku DSB koji se aktiviraju u ćeliji. Nehomologna rekombinacija (eng. *non-homologous end joining*, NHEJ) direktno povezuje prekinute krajeve DNK i aktivna je u svim fazama ćelijskog ciklusa. Homologna rekombinacija (eng. *homologous recombination*, HR) za popravku DNK koristi homologu sekvencu (sestrinsku hromatidu), zbog čega je aktivna u S i G2 fazi ćelijskog ciklusa [Chapman *et al.*, 2012].

Ćelije kancera imaju različite poremećaje u mehanizmima popravke oštećenja na molekulu DNK [Kennedy & Andrea, 2006]. Tako na primer, DNA-PK je jedan od članova NHEJ puta koji je povišeno eksprimiran kod radiorezistentnih tumora. Zbog toga se u prekliničkim studijama testira sposobnost različitih inhibitora molekula DNA-PK da povećaju osetljivost kancerskih ćelija na zračenje [Bouchaert *et al.*, 2012; Davidson *et al.*, 2013].

1.4 INHIBICIJA EGFR SIGNALNOG PUTA

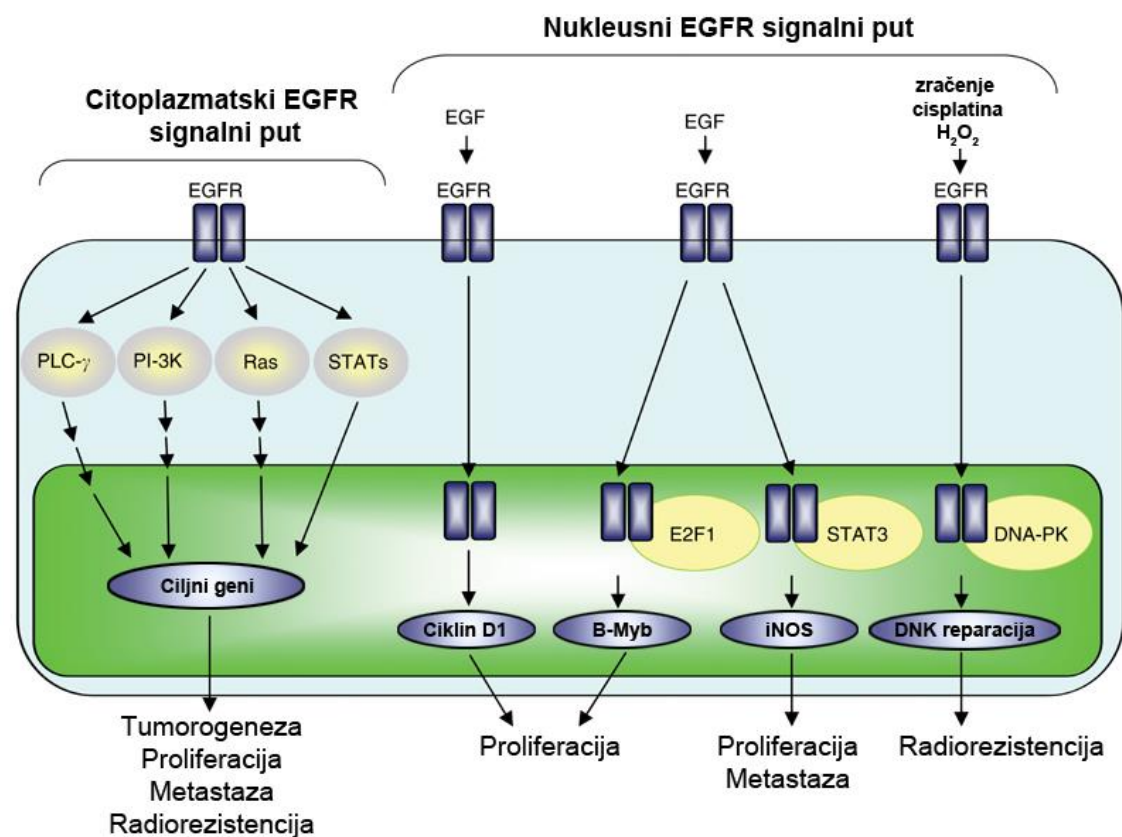
Razvitek ciljane terapije koja je povezana sa EGFR se zasniva na zapažanju da su tumorske ćelije kod kojih je EGFR mutiran ili prekomerno eksprimiran zavisne od EGFR signalizacije i da inhibicijom ovog signalnog puta dolazi do njihove smrti [Perez *et al.*, 2013]. Postoje dva osnovna pristupa u inhibiciji EGFR signalnog puta. Prvi način podrazumeva ciljano inhibiranje ligand-vezujućeg domena upotrebom monoklonskih antitela (mAb) čime se inhibira stvaranje dimera i aktivacija kinaza. U drugom pristupu ciljano inhibiranje kinaznog domena se postiže upotrebom tirozin kinaznih inhibitora (TKI). Oni kompeticijom sa adenzin trifosfatom (eng. *adenosine triphosphate*, ATP) za

vezujuće mesto na tirozin kinazi dovode do inhibiranja njene aktivnosti, a time i nizvodnih signalnih puteva [De Weese & Laiho, 2011].

1.4.1 EGFR signalni put

EGFR pripada familiji tirozin kinaza koja obuhvata EGFR (ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) i HER4 (ErbB4) [Yarden *et al.*, 2001]. To je transmembranski glikoprotein molekulske mase 170 kDa, sačinjen od 1186 aminokiselina. Smatra se da normalne ćelije imaju između 20000 i 200000 receptora za EGF po ćeliji [Small, 2008]. Pokazano je da je aktivacija EGFR-a okidač za različite razvojne, metaboličke i fiziološke procese, kao što su proliferacija, apoptoza, migracija, angiogeneza i diferencijacija ćelija [Dutta & Maity, 2007].

EGFR čine ekstracelularni domen za koji se vezuje ligand, kratki hidrofobni transmembranski region i citoplazmatski domen. Ligandi koji aktiviraju EGFR su faktori rasta, kao što je epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*, EGF) [Irmer *et al.*, 2007]. Nakon vezivanja liganda, usled konformacionih promena u ekstracelularnom domenu dolazi do dimerizacije i autofosforilacije, tj. aktivacije receptora. Aktivirani EGFR ostvaruje svoju biološku funkciju na dva načina. U citoplazmatskom signalnom putu, aktivirani EGFR deluje na ekspresiju gena regulisanjem aktivnosti nekoliko signalnih puteva koji uključuju PLC- γ -CaMK/PKC, Ras-Raf-MAPK, PI-3K-Akt-GSK i STAT [Lo & Hung, 2006] (**Slika 6**). Aktivacija ovih signalnih puteva dovodi u fiziološkim uslovima do proliferacije ćelija, ali i do tumorogeneze i metastaza, kao i hemio- i radiorezistencije tumorskih ćelija [Lo & Hung, 2006]. U odgovoru na stimulaciju EGF-om, EGFR može da se translocira u nukleus gde u interakciji sa transkripcionim faktorom STAT3 reguliše ekspresiju inducibilne azot-oksida sintaze (eng. *nitric oxide synthase*, iNOS), dok u interakciji sa E2F1 reguliše ekspresiju B-Myb [Lo *et al.*, 2005; Hanada *et al.*, 2006]. Nukleusni EGFR takođe dovodi do povišene ekspresije ciklina D1. B-Myb i ciklin D1 doprinose povećanju ćelijske proliferacije, dok iNOS učestvuje i u regulaciji metastaze tumorskih ćelija.



Slika 6. Citoplazmatski i nukleusni EGFR signalni put. Preuzeto i modifikovano iz [Lo & Hung, 2006].

Do translokacije EGFR-a u nukleus dolazi ne samo kao posledica vezivanja liganda, već i kao odgovor na jonizujuće zračenje, H₂O₂ i hemioterapeutike [Lo & Hung, 2006] (**Slika 6**). Nukleusni EGFR utiče i na proces DNK reparacije. Skorašnje studije su pokazale da je EGFR normalno prisutan u perinukleusnom regionu ćelija i da se nakon tretmana zračenjem internalizuje u nukleusni kompartiment. Vezivanjem za DNA-PKs i regulatornu subjedinicu Ku70 nukleusni EGFR utiče na proces reparacije DNK, a time i na smanjenje osetljivosti kancerskih ćelija na zračenje [Dittmann *et al.*, 2005] (**Slika 6**).

1.4.2 Mutacije u genu za EGFR

Kod pacijenata obolelih od NSCLC uočena je veza između postojanja određenih mutacija i odgovora na terapiju. Zbog toga su mutacije u genu za EGFR najbolje opisane baš na primeru NSCLC [Gazdar *et al.*, 2009]. Mutacije u kinaznom domenu EGFR-a se nazivaju “aktivirajućim mutacijama” zato što dovode do ligand-nezavisne aktivacije receptora. Najčešće su: delecije u egzonu 19, koje čine ~ 48% svih mutacija, tačkasta L858R mutacija, kao i delecije i insercije u egzonu 20, koje čine ~ 38%, odnosno 6% svih mutacija [Irmer *et al.*, 2007]. Pored mutacija u genu za EGFR, do ligand-nezavisne aktivacije receptora može da dođe i usled prekomerne ekspresije EGFR molekula. Tako je prekomerna ekspresija EGFR-a zastupljena kod 62% pacijenata sa NSCLC i direktno je povezana sa lošom prognozom bolesti [Hirsch *et al.*, 2003].

1.4.3 Tirozin kinazni inhibitori

EGFR TKI su kvinazolinaminski derivati male molekulske mase [Pao *et al.*, 2005]. Oni selektivno blokiraju EGFR signlni put vezujući se za mesto vezivanja ATP-a, koje se nalazi na tirozin kinaznom domenu EGFR [Ranson, 2004]. Trenutno se u terapiji uznapređovalog NSCLC koriste dva reverzibilna EGFR TKI: gefitinib i erlotinib [Santarpia *et al.*, 2011]. Upotreba gefitiniba (Iressa) je prvi put odobrena od strane Američke agencije za hranu i lekove (eng. *US Food and Drug Administration*, FDA) 2003. godine [Cohen *et al.*, 2003]. Erlotinib (Tarceva) je 2004. godine dobio dozvolu iste agencije kao drugi terapijski protokol za pacijente sa NSCLC u uznapređovaloj i metastatskoj fazi bolesti [Cohen *et al.*, 2005].

U nekoliko kliničkih studija faze II i III oba EGFR TKI su pokazala pozitivno dejstvo [Hann & Brahmer, 2007]. Ipak, za razliku od konvencionalne hemioterapije, ovi tirozin kinazni inhibitori su bili efikasniji kod određenog tipa pacijenata sa NSCLC. Bolji odgovor na terapiju je zapažen kod pacijenata sa područja istočne Azije, kod žena, kod nepušača, kao i kod pacijenata sa adenokarcinomom [Yatabe & Mitsudomi, 2007]. Naime, faza II kliničkih studija je pokazala mali efekat (12-27%) u ukupnoj populaciji NSCLC

pacijenata [Cappuzzo *et al.*, 2005; Hann & Brahmer, 2007]. Takođe, u fazi III određene studije su dale kontradiktorne rezultate. Po njima, većina pacijenata nije odgovorila na terapiju, dok je samo kod malog broja pacijenata zabeleženo značajno smanjenje tumora [Kim *et al.*, 2007]. Retrospektivnom analizom ovih studija je utvrđeno da je uspeh terapije kod pacijenata azijskog porekla, nepušača, žena i pacijenata sa adenokarcinomom posledica prisustva mutacija u genu za EGFR kod ovih pacijenata [Mansuet-Lupo *et al.*, 2014]. Smatra se da onkogene mutacije u genu za EGFR obezbeđuju veću osetljivost na terapiju zbog toga što TKI imaju veći afinitet za mutirani protein nego za wt protein [Sequist & Lynch, 2008].

Skoro svi pacijenti koji inicijalno dobro odgovore na terapiju TKI, vremenom razviju rezistenciju [Ercan *et al.*, 2010]. Studije su pokazale da je jedan od uzročnika sekundarne rezistencije T790M mutacija koja se sreće kod ~ 50% tumora rezistentnih na TKI terapiju [Simonetti *et al.*, 2010]. Mutacija T790M se takođe retko nalazi u netretiranim uzorcima tumora, što pretpostavlja postojanje rezistentnih subklonova koji preostaju nakon regresije tumora [Mansuet-Lupo *et al.*, 2014]. S obzirom na to da korelacija između klasičnih EGFR mutacija i osetljivosti na TKI nije potpuna i da pacijenti vremenom stiču rezistenciju na terapiju, javlja se potreba za identifikacijom i drugih markera koji bi objasnili kako osetljivost tako i rezistenciju na TKI [Ma *et al.*, 2011].

1.5 MEHANIZMI ĆELIJSKE SMRTI

Apoptoza je jedan od najbolje opisanih oblika ćelijske smrti i najčešće se koristi kao sinonim za nju. Međutim, poslednjih godina se koncept ćeljske smrti proširio, naročito u kontekstu tretmana malignih bolesti, pa se njime obuhvataju i drugi procesi koji dovode do inaktivacije proliferativnog kapaciteta ćelije. Najznačajniji od njih su: autofagija, nekroza, senescencija i mitotska katastrofa [Okada & Mak, 2004].

1.5.1 Apoptoza

Kerr i saradnici su 1972. godine opisali morfološke aspekte apoptoze [Kerr *et al.*, 1972]. U morfološkom smislu apoptotska ćelija je zaokrugljena i obično manjih dimenzija. Do ovoga dolazi usled kondenzacije hromatina (piknoza). Na površini plazmine membrane javljaju se strukture koje podsećaju na balone (eng. *blebbing*). Ova pojava je praćena fragmentacijom jedra u tzv. apoptotska tela u procesu pupljenja (eng. *budding*). Apoptotska tela sadrže nepromenjene organele, oivičena su plazminom membranom i *in vivo* bivaju fagocitovana od strane makrofaga [Elmore, 2007].

Apoptoza je oblik programirane ćelijske smrti, što znači da jednom aktivirana, pokreće niz energetski zavisnih morfoloških, molekularnih i biohemijskih događaja koji su regulisani veoma složenom mrežom pozitivnih i negativnih regulatora [Elmore, 2007]. Dosadašnja istraživanja pokazuju da ovaj proces ima dva osnovna puta: unutrašnji ili mitohondrijalni put i spoljašnji ili put receptora smrti [Andersen *et al.*, 2005]. Na ovaj način apoptoza može biti izazvana stimulacijom određenih receptora na ćelijskoj membrani ili putem unutarćelijskih mehanizama. Ove mehanizme mogu aktivirati oštećenja DNK nastala delovanjem različitih agenasa među kojima su zračenje i hemioterapeutici [Sprick & Walczak, 2004]. Oba apoptotska puta dovode do aktivacije kaspaze 3 koja započinje niz proteolitičkih događaja koji kulminira u koordinisanoj dezintegraciji ćelije. Aktivacija unutrašnjeg apoptotskog puta počinje oslobađanjem citohroma *c* iz mitohondrija u citoplazmu, gde formira kompleks sa Apaf-1 proteinom i omogućava njegovu oligomerizaciju. Na taj način se formira apoptozom koji aktivira kaspazu 9 i dalje dovodi do aktivacije kaspaze 3. Spoljašnji apoptotski put se pokreće vezivanjem liganda za receptore smrti na ćelijskoj membrani, što dovodi do aktivacije kaspaze 8, a zatim i kaspaze 3. Spoljašnji i unutrašnji apoptotski put su međusobno povezani. Aktivacija unutrašnjeg puta može pokrenuti kaspazu 8 i Bid protein koji uključuju mitohondrijalni put i izazivaju snažniji apoptotski odgovor [Sprick & Walczak, 2004]. Familija Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma* 2, Bcl-2) obuhvata proteine koji su ili pro-apoptotski (Bid, Bad, Bax, Bcl-XS), ili anti-apoptotski (Bcl-2, Bcl-XL). Od njihovog odnosa zavisi da li će process apoptoze biti aktiviran ili inhibiran [Andersen *et al.*, 2005].

Poremećaji u regulaciji ćelijske smrti mogu dovesti do različitih oboljenja među kojima je i kancer, bolest kod koje je zapažena preterana proliferacija ćelija i/ili smanjena ćelijska smrt [King *et al.*, 1998]. Postoji niz mehanizama koji kod ćelije kancera dovode do „otpornosti” na apoptozu. Jedan od njih je mutacija u tumor supresorskim genima, kao što je *p53*. Ovaj gen je mutiran u oko 50% malignih tumora. Kao odgovor na DNK oštećenja, *p53* zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi i reguliše ekspresiju *Bax* i *Bcl-2*. Ukoliko su ćelijska oštećenja suviše velika i ne mogu da se poprave dolazi do pokretanja procesa apoptoze [Pietenpol & Stewart, 2002].

Poremećaji u ekspresiji proteina koji učestvuju u apoptozi može doprineti rezistenciji kancerskih ćelija na tretman. NSCLC je rezistentniji na radio- i hemioterapiju od SCLC [Joseph *et al.*, 2001]. Klinička ispitivanja su pokazala je ekspresija *Bcl-2* je viša kod SCLC u poređenju sa NSCLC [McDoniels-Silvers *et al.*, 2002]. Osim razlika u nivou *Bcl-2* proteina, zabeležene su i razlike u nivou ekspresije prokaspaza. Iako još uvek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način ovakva promena ekspresije proteina utiče na rezistenciju na tretman kod NSCLC, kao jedan od mogućih mehanizama navodi se inhibicija translokacije kaspaze 3 iz citoplazme u nukleus [Joseph *et al.*, 2001]. Takođe, pokazano je da povišeni nivo nukleusnog faktora κ B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*, NF- κ B) deluje na povećanje transkripcije antiapoptotskih gena kod kancerskih ćelija i time učestvuje u mehanizmima rezistencije na tretman hemioterapeuticima [Hoesel & Schmid, 2013].

1.5.2 Autofagija

Autofagija je proces koji pomaže ćeliji da preživi stres. Tokom autofagije delovi citoplazme sa oštećenim organelama se odvajaju u posebne vezikule oivičene dvema membranama (autofagozomi). Autofagozomi se spajaju sa lizozomima i formiraju autolizosome u kojima se pomoću kiselih lizozomalnih hidrolaza razgrađuju ćelijske organele [Chen *et al.*, 2008]. Mnogi ekstracelularni i intracelularni signali, od kojih većina nastaje kao odgovor na stres, mogu izazvati autofagiju. Tako na primer, tokom gladovanja,

hipoksije ili u odsustvu faktora rasta, ćelija procesom autofagije obezbeđuje osnovne hranljive i gradivne elemente koji joj nisu omogućeni spolja ili *de novo* sintezom [Bialik & Kimchi, 2008]. I drugi nepovoljni uslovi, kao što su oksidativni stres, mitohondrijalna disfunkcija, jonizujuće zračenje i određeni hemioterapeutske agensi, mogu da dovedu do indukcije autofagije [Chen *et al.*, 2008; Tanida, 2011; O' Donovan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012].

Grupa od 30 ATG gena (eng. *autophagy-related genes*) reguliše proces autofagije [Bialik & Kimchi, 2008]. Elongacija membrane u formiranju autofagozoma regulisana je pomoću Atg12-Atg5-Atg-16 i Atg8/LC3 proteinskog sistema. U Atg8/LC3 sistemu, formira se LC3-I (eng. *microtubule-associated light chain 3*) koji konjukcijom sa fosfatidiletanolaminom prevodi u LC3-II i ugrađuje se u autofagozomalnu membranu. LC3-II predstavlja jedan od najčešće korišćenih autofagozomalnih markera [Ravikumar *et al.*, 2010]. LC3-II na citoplazmatskoj strani autofagozoma biva delipidizovan pomoću Atg4 i recikliran do LC3-I [Ravikumar *et al.*, 2009]. Mnogi kompleksni signalni putevi su uključeni u regulaciju funkcije ATG gena i formiranje autofagozoma. Jedan od najvažnijih regulatora je serin/treonin kinaza mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*), koji pokazuje kakva je dostupnost faktora rasta, nutrijenata i energije [Bialik *et al.*, 2011]. Takođe u ključne regulatore procesa autofagije spada i Beclin 1 [Lee *et al.*, 2013].

Kao tumor supresivni mehanizam, autofagija inhibira inflamaciju i sprečava genomsku nestabilnost uklanjanjem oštećenih mitohondrija koje proizvode slobodne radikale [Mathew *et al.*, 2007]. Takođe, pored uloge koju autofagija ima u preživljavanju ćelija u nepovoljnim uslovima, postoje studije koje ukazuju i na njenu ulogu u aktivaciji mehanizama ćelijske smrti. U odsustvu apoptoze, ili u ćelijama koje imaju oštećenja u apoptotskim putevima, pokazano je da se može odigrati i autofagijska ćelijska smrt. Ona je u literaturi poznata i kao tip II ćelijske smrti [Shimizu *et al.*, 2004]. Uloga autofagije u tumorogenezi i odgovoru kancerskih ćelija na terapiju je kompleksna, s obzirom na činjenicu da ima dvostruku ulogu, protektivnu i destruktivnu [Eskelinen, 2011]. Kancerske ćelije koriste autofagiju da održe rast i preživljavanje tumora u stresnim uslovima kao što je toksičnost izazvana terapijom [O' Donovan *et al.*, 2011].

1.5.3 Mitotska katastrofa

Nepravilnosti u distribuciji hromozoma tokom mitoze mogu doprineti malignoj transformaciji ćelije [Singh *et al.*, 2012]. Viši eukarioti su razvili mehanizme za eliminaciju onih ćelija kod kojih su mitotski procesi poremećeni. Jedan od tih mehanizama je mitotska katastrofa. Morfološke promene koje prate mitotsku katastrofu uključuju stvaranje mikronukleusa (koji obično potiču od hromozoma i/ili hromozomskih fragmenata koji nisu bili jednako raspoređeni nakon mitoze u ćerke ćelije) i postojanje multinukleusnih ćelija koje su rezultat nepravilne citokineze [Kroemer *et al.*, 2009]. Mitotsku katastrofu mogu izazvati različiti defekti u kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa, kao i različiti agensi koji se koriste u terapiji (zračenje, citostatici, agensi koji utiču na stabilnost mikrotubula) [Vakifahmetoglu *et al.*, 2008].

Signalni put koji leži u osnovi mitotske katastrofe je nedovoljno izučen. Sa funkcionalne tačke gledišta, može se definisati kao onko-supresivni mehanizam koji prethodi i razlikuje se od apoptoze, nekroze ili senescencije [Vitale *et al.*, 2011]. Za razliku od normalnih ćelija koje prolaze kroz sve faze ćelijskog ciklusa, ćelije koje imaju defekte u mitotskom aparatu (uključujući hromozome i ćelijsku mašineriju koja omogućava njihovu pravilnu segregaciju), zahvaljujući aktivaciji mitotske katastrofe ne mogu da prođu kroz M fazu ćelijskog ciklusa. Ćelije koje su zaustavljene u mitozu mogu „umreti mitotskom smrću“ bez izlaska iz mitoze, preći u G1 fazu, pa zatim aktivirati mehanizme ćelijske smrti, ili po izlasku iz mitoze postati senescentne. U odgovoru na oštećenja DNK ili mitotskog aparata, ćelije bivaju zaustavljene u mitozu i obično započinju program mitotske katastrofe ili „mitotske smrti“ [Joiner & van der Kogel, 2009]. Međutim, nekada ove mitotski nekompetentne ćelije mogu preći u sledeću interfazu ili proći jedan ciklus nepravilne mitoze. Najčešće se ova deoba ne može završiti zbog neuspele citokineze, pa se stvaraju tetraploidne ćelije koje ili umiru ili podležu procesu senescencije. Ponekad su ove ćelije sposobne da proliferišu i tada se stvaraju aneuploidne, potencijalno tumorogene ćelije. Zbog velikih hromozomskih rearanžmana one najčešće podležu ćelijskoj smrti [Vitale *et al.*, 2011].

1.5.4 Senescencija

Ćelijsko starenje ili senescencija može biti replikativna, kada nastaje kao posledica skraćivanja telomera tokom ćelijskih deoba i prerana senescencija koja nastaje kao posledica stresa, npr. nepopravljivih oštećenja DNK i hromatina, kao i usled ekspresije različitih onkogenih (npr. Ras onkogen) [Kuliman *et al.*, 2010; Baek *et al.*, 2013]. Bez obzira na signal koji je indukovao senescenciju, senescentne ćelije poseduju određene karakteristike kao što su zaustavljanje ćelijskog ciklusa, povišena ekspresija inhibitora ćelijskog ciklusa (p21Cip1/Waf1, p16INK4a, p15INK4b), hipofosforilacija Rb proteina, povišena aktivnost β -galaktozidaze povezane sa senescencijom (eng. *senescence associated beta-galactosidase*, SA- β -Gal) i karakterističan sekretorni fenotip [Vávrová & Rezáčová, 2011]. Takođe, za ove ćelije je karakteristična vakuolizacija citoplazme, spljoštena morfologija i pojava heterohromatinskih fokusa (eng. *senescence associated heterohromatin foci*, SAHF) bogatih trimetilovanim histonom H3 na lizinu 9 [Huggins *et al.*, 2013].

Ćelijska senescencija je u literaturi označena kao tumor supresivni mehanizam. U ranim stadijumima pre-onkogenih lezija, intracelularni mehanizmi (uključujući porast u p53 i p21) indukuju senescenciju u cilju eliminacije potencijalno opasne ćelije iz mase proliferišućih ćelija. Takođe, senescenciju mogu indukovati ekstracelularni signalni molekuli, kao što su transformišući faktor rasta beta (eng. *transforming growth factor beta*, TGF- β) [Kuliman *et al.*, 2010] i različiti citokini (npr. IL-1, IL-6, IL-8, GRO α) [Acosta *et al.*, 2008]. Same senescentne ćelije sintetišu različite pro-inflamatorne citokine (IL-1, IL-6), hemokine (IL-8, GRO, MCP-1), matriksne metaloproteinaze (MMP1, MMP3, MMP10), aktivatore i inhibitore plazminogena i fibronektin [Vávrová & Rezáčová, 2011]. Faktori koje luče senescentne ćelije takođe mogu da izazovu rast i invaziju tumora, kao i da utiču na angiogenezu [Fumagalli & d'Adda di Fagagna, 2009]. Kontroverzna uloga izmenjenog sekretornog fenotipa senescentnih ćelija još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Jedno od mogućih objašnjenja bilo bi da senescentne ćelije u ranim stadijuma tumora preko faktora koje sintetišu šalju signale ćelijama imunog sistema i tako dovode do njihovog uklanjanja i reparacije tkiva. Ukoliko odgovor izostane ovi faktori mogu dovesti do rasta i invazije tumora [Vávrová & Rezáčová, 2011].

2. CILJ RADA

Novi pravci u razvitku terapije kancera podrazumevaju kombinovanje različitih terapijskih agenasa koje ima za cilj efikasno prevazilaženje rezistencije na tretman. Takođe, literaturni podaci koji su vezani za eksperimentalne i kliničke studije ukazuju na značaj istraživanja različitih vidova ćelijske smrti i njihove uloge u procesu tumorogeneze i nastanka rezistencije na terapiju. S obzirom na mehanizam delovanja ciljanih molekularnih terapijskih agenasa, njihovo kombinovanje sa radiohemioterapijom se intenzivno istražuje. Dosadašnji *in vitro* podaci ukazuju na potencijalnu korist od kombinovanja erlotiniba sa zračenjem. Međutim, u literaturi se mogu naći samo sporadični podaci o iskustvima iz kliničke prakse koji testiraju ovu kombinaciju agenasa. Takođe, mehanizmi koji se nalaze u osnovi kombinovane terapije i njenog uticaja na nastanak različitih tipova ćelijske smrti su još uvek nedovoljno poznati.

U ovoj disertaciji ispitivan je antitumorski efekat pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom na ćelije nesitnoćelijskog karcinoma pluća čoveka *in vitro*. Primenjeni agensi se koriste u kliničkom tretmanu lokalno uznapredovalog ili metastatskog nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Kao model sistem korišćene su CRL-5876 ćelije adenokarcinoma pluća. Polazeći od činjenice da je erlotinib inhibitor EGFR, koji učestvuje u regulaciji proliferacije ćelija, kao i DNK reparaciji, u ovom radu je testirana hipoteza da erlotinib može da poveća radioosetljivost CRL-5876 ćelija.

Zbog svega navedenog, u okviru istraživanja koja su predmet ove disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Odrediti radiobiološke parametre koji definišu efikasnost γ -zračenja, odnosno kombinacije γ -zračenja i erlotiniba u eliminaciji CRL-5876 ćelija. Ovi parametri biće određeni praćenjem klonogenog preživljavanja ćelija nakon tretmana. Takođe, određiće se efekti tretmana na vijabilnost, proliferativni kapacitet ćelija, kinetiku indukcije i reparacije DSB, kao i na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

2. Utvrditi i analizirati tipove ćelijske smrti koji se aktiviraju nakon primene pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom. Prvo će biti vizuelizovane morfološke i ultrastrukturne promene koje nastaju delovanjem primenjenih agenasa, a zatim će se relevantnim metodama kvantifikovati promene karakteristične za proces mitotske katastrofe, apoptoze, senescencije i autofagije.
3. Pratiti ekspresiju proteina uključenih u relevantne signalne puteve koji su aktivirani u tretiranim ćelijama. Promene u ekspresiji proteina nakon tretmana biće praćene u različitim vremenskim intervalima.
4. Utvrditi antitumorski efekat različitih kombinacija γ -zračenja, erlotiniba i hlorokina na ćelije adenokarcinoma pluća čoveka *in vitro*. Efekti ovih tretmana biće praćeni merenjem ćelijske vijabilnosti.
5. Ispitati uticaj farmakološke inhibicije autofagije hlorokinom na indukciju apoptoze i senescencije CRL-5876 ćelija tretiranih γ -zračenjem i erlotinibom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Čelijska linija

Čelije adenokarcinoma pluća čoveka CRL-5876 (NCI-H1568) su korišćene kao eksperimentalni model u ovom radu. Čelijska linija je nabavljena od ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

Za radiobiološke eksperimente korišćene su još dve maligno transformisane čelijske linije čoveka, i to HTB140 (Hs 249T) čelije melanoma i 59M čelije ovarijanog kancera, koje su nabavljene iz iste kolekcije (ATCC, Manassas, VA, USA).

3.1.2 Hemikalije

Za gajenje ćelija korišćen je hranjivi medijum RPMI 1640 u koji je pre upotrebe dodavan 10% fetalni teleći serum (eng. *foetal calf serum*, FCS) i mešavina antibiotika penicilina (5000U) i streptomicina (5 mg/ml u 0.9% natrijum hloridu). Sve hemikalije za gajenje ćelijskih kultura su proizvod Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany.

Od istog proizvođača (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) su takođe nabavljeni: trihlorsirćetna kiselina (eng. *trichloroacetic acid*, TCA), tris baza, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Mowiol[®] 4-88, etilen diamino tetra sirćetna kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), etilen glikol tetrasirćetna kiselina (eng. *ethylene glycol tetraacetic acid*, EGTA), albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumine*, BSA), natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), natrijum-deoksiholat, natrijum ortovanadat (Na_3VO_4), akrilamid, bisakrilamid, glicin, β -merkaptotanol, brom fenol plavo, glicerol, Tween 20, sulforodamin B (SRB), propidijum jodid (PI), osmijum tetroksid, glutaraldehid, 5-Bromo-4-hloro-3-indolil β -D-galaktopiranozid (X-Gal), akridin oranž, kristal violet i hlorokin difosfat.

Komercijalni kompleti za praćenje ćelijske vijabilnosti (Cell proliferation Kit I, MTT), proliferacije (Cell Proliferation ELISA, BrdU-colorimetric Kit) i apoptoze (Annexin-V-FLUOS Kit), kao i erlotinib hidrohlorid (Tarceva, 150 mg) su nabavljeni od Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.

Dimetilsulfoksid (DMSO), ribonukleaza A, ditioneitol (DTT), spermidin, aprotinin, antipain, leuprptin, fenilmetilsulfonil hlorid (PMSF), amonijum persulfat i N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), Na-fluorid (NaF), β -diglicerofosfat i Na-pirofosfat su proizvodi SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany.

Sirćetna kiselina, sumporna kiselina, formaldehid, metanol i glicerol su nabavljeni od firme Zorka Pharma, a.d., Šabac, Srbija.

May-Grünwald eozin metilensko plavo je proizvod Merck KgaA, Darmstadt, Germany, dok je gimza proizvod Alkaloid a.d., Skopje, Macedonia.

Za hemiluminiscentnu detekciju proteina korišćen je ECL (eng. *enhanced chemiluminescence*) supstrat koji se sastoji od luminola i p-kumarične kiseline, a obe komponente su proizvod Sigma Chemical Company.

3.1.3 *Puferi*

- Fosfatno puferisani fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffer saline*, PBS), pH 7.4: 0.137 M NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 16.3 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl.
 - Pufer za liziranje: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% SDS, 0.5% Na-deoksiholat, 1mM EDTA, 1mM EGTA i 1mM (Na_3VO_4)
 - Pufer za nalivanje uzoraka: 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerola, 0.4% β -mercaptoetanol, 1% bromofenol plavo
 - SDS pufer za elektroforezu: 25 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, 192 mM glicin
 - Pufer za transfer: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol
 - TBS pufer: 1.5 M NaCl, 0.2 M Tris, pH 7.4
 - Pufer za „stripovanje“: 100 mM β -merkaptoetanol, 2% SDS i 62.5 mM Tris pH 6.7
- Puferi korišćeni u ovom radu su pripremani po procedurama navedenim u knjizi Molecular Cloning – A Laboratory Manual [Sambroock *et al.*, 1989].

3.1.4 Antitela

Zečja poliklonska antitela na p53, p21, Bax, Bcl-2, Ciklin D1, LC3, NF-kB p65, kao i sekundarno kozje anti-zečje IgG antitelo obeleženo peroksidazom iz rena (eng. *horse-radish peroxidase*, HRP) su proizvod Cell Signaling Technology Inc. Danvers, Massachusetts, United States. Zečje poliklonsko antitelo na β -aktin je proizvod Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, dok je mišje antitelo na γ -H2AX (Ser139) obeleženo sa Alexa Fluor[®]488, proizvod BioLegend Inc. San Diego, California, United States.

3.2 METODE

3.2.1 Gajenje ćelija u kulturi

Ćelije su gajene kao jednoslojne kulture u plastičnim bocama površine 25 cm² (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany), na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ (Haeraus, Manheim, Germany). Ćelije su rasađivane u proseku 2 puta nedeljno. Pri odlepljivanju adherentnih ćelija od površine plastike, konfluentni ćelijski monosloj je ispiran PBS-om, inkubiran u prisustvu rastvora 0.25% tripsin 0.53 mM EDTA u PBS na 37 °C 3-5 minuta, a zatim je tako dobijena ćelijska suspenzija razblaživana hranljivim medijumom u odnosu 1 : 3.

Za dugotrajno čuvanje, postupkom krioprezervacije, ćelije su razblaživane u medijumu sa 5% DMSO. Kriotube sa ćelijama (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany) su prvo zamrzavane na -70 °C preko noći, a zatim polako prebacivane u tankove sa tečnim azotom i tako čuvane na -196 °C.

3.2.2 Uslovi zračenja

Ćelije su ozračivane gama zracima iz izvora ⁶⁰Co u Laboratoriji za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u Beogradu.

Ozračivanje je izvodjeno u vazduhu, na sobnoj temperaturi. Plastične posude sa ćelijskim monoslojem su postavljane vertikalno, odnosno pod pravim uglom u odnosu na osu snopa gama zraka. Ćelijski monosloj je ozračivan dozama od 0.1, 2, 4, 6 i 8 Gy, pri brzini doze od ~ 1 Gy/min. Za analizu γ -H2AX proteina uzorci su ozračivani na ledu, u nosaču koji je posebno konstruisan za ovu namenu.

3.2.3 Priprema rastvora erlotiniba i hlorokina

Erlotinib hidrohlorid (Tarceva, 150 mg; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) je dobijen ljubaznošću Dr Giuseppe Privitera iz Instituta za radiologiju i radijacionu onkologiju „Poliklinika - Vittorio Emanuele“, Univerziteta u Kataniji, Italija. Koncentrovani 10 mM rastvor erlotiniba u DMSO, od koga su pravljena radna razblaženja koja su korišćena u eksperimentima, je čuvan na -20 °C. Rastvor 10 mM hlorokin difosfata je pravljen u sterilnoj vodi neposredno pre upotrebe. Koncentrovani rastvori su do finalnih (radnih) koncentracija razblaživani u RPMI 1640 podlozi za gajenje ćelija. Finalna koncentracija DMSO u eksperimentima nije prelazila 0.1%.

3.2.4 Klonogeni esej

Klonogeni esej je izveden prema odgovarajućoj proceduri koja se uobičajeno koristi u radiobiologiji [Withers & Elkind, 1970; Franken *et al.*, 2006; Petrović *et al.*, 2006, 2010]. Ćelije su nakon tretmana odlepljivane tripsinom od plastične podloge i zasejavane u odgovarajućem broju u ploče sa 6 bunara (Sarstedt AG. & Co, Nümbrecht, Germany). Vreme inkubiranja je određeno na osnovu kriterijuma od najmanje 6 perioda dupliranja populacije ćelija koja se analizira. Nakon inkubacionog perioda od 7 dana, ćelije su pažljivo isprane PBS-om, fiksirane metanolom u trajanju od 15 minuta na +4 °C, a zatim obojene 0.5% kristal-violet u 25% metanolu. Po uklanjanju boje, ploče su isprane vodom i osušene na sobnoj temperaturi. Kolonije koje sadrže 50 ili više ćelija su brojene pod invertnim svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany). Frakcija ćelija koje su preživjele tretmane je određivana poređenjem broja kolonija u tretiranim uzorcima sa

brojem kolonija u netretiranim kontrolama. Veličina, tj. površina kolonija je merena pomoću ImageJ računarskog programa (<http://rsb.info.nih.gov>) [Herzog *et al.*, 2007].

3.2.5 MTT esej

Vijabilnost ćelija je određivana MTT metodom (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid) u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara (Sarstedt AG. & Co, Nümbrecht, Germany). Metoda se zasniva na prevođenju tetrazolijumske soli koja je žute boje u purpurne kristale formazena. Ova reakcija se dešava enzimatskom aktivnošću mitohondrijalnih reduktaza u metabolički aktivnim ćelijama. Zbog toga je apsorbancia novonastalog formazena direktno srazmerna broju živih ćelija.

Posle inkubacije ćelija koje su bile izložene odgovarajućim tretmanima, u određenim vremenskim tačkama, ćelije su ispirane PBS-om, zatim im je dodavano 100 µl MTT i inkubirane su naredna 4 h na 37 °C. Nakon uklanjanja podloge koja sadrži MTT u svaki bunar je dodavano po 100 µl 10% SDS u 0.01 M HCl. Optička gustina je merena 24 h kasnije na ELISA fotometrijskom čitaču (Wallac, Victor2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finland), na talasnoj dužini od 550 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm.

3.2.6 SRB esej

Za određivanje vijabilnosti ćelija takođe je korišćen i kolorimetrijski sulforodamin B (SRB) esej prema proceduri Skehan-a i saradnika [Skehan *et al.*, 1990]. SRB se vezuje za bazne aminokiseline u proteinima i time omogućava merenje mase ukupnog proteinskog sadržaja koji je proporcionalan broju ćelija. Ćelije koje su gajene u mikrotitar pločama sa 96 bunara su fiksirane hladnom (+4 °C) 10% trihlorsirćetnom kiselinom i bojene 0.4% SRB koji je rastvoren u 1% sirćetnoj kiselini. Posle 15 min, višak boje je uklonjen ispiranjem 1% sirćetnom kiselinom. Vezana boja je zatim rastvorena u 10 mM Tris bazi, a apsorbancia je merena u ELISA čitaču (Walac, Victor2, Turku, Finland) na talasnoj dužini od 550 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm.

3.2.7 BrdU esej

Proliferacije ćelija je određena pomoću BrdU kolorimetrijskog imunoesaja koji se zasniva na ugrađivanju 5-bromo-2-dezoksiuridina (BrdU) u DNK tokom procesa replikacije. Test je rađen prema uputstvu proizvođača komercijalnog kita koji je korišćen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Dva sata pre isteka određenog vremena inkubacije, ćelijama je dodavan 10 μ M rastvor BrdU, zatim su fiksirane rastvorom za fiksiranje (Fixdenat solution) i inkubirane sa anti-BrdU-POD antitelom. Posle 90 minuta, antitelo je uklonjeno, ćelije su isprane puferom i inkubirane sa supstratom, tj. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinom (TMB). Inkubacija je trajala od 5 do 30 min, tj. do razvijanja boje. Reakcija između supstrata i enzima se zaustavlja dodavanjem 1M H₂SO₄, nakon čega se fotometrijski određuje optička gustina na 450 nm sa referentnom talasnom dužinom na 690 nm na ELISA čitaču (Walac, Victor2, Turku, Finland).

3.2.8 Analiza ćelijskog ciklusa

Za utvrđivanje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa korišćena je metoda protočne citofluorimetrije. Ćelije se tretiraju pomoću PI, koji se ugrađuje u molekul DNK i fluorescira u narandžasto crvenoj boji. Intenzitet emitovanog signala fluorescentne boje je proporcionalan količini DNK i daje informacije u kojoj fazi ćelijskog ciklusa se nalazi ćelija.

Za potrebe analize, približno 1×10^6 ćelija je fiksirano u hladnom 70% etanolu i inkubirano sa ribonukleazom A (500 μ g/ml), 15 min na 37°C. Nakon inkubacije, ćelije su tretirane pomoću PI (50 μ g/ml) i analizirane na CyFlow protočnom citofluorimetru (Partec, Münster, Germany). Dobijeni rezultati su obrađeni pomoću FloMax[®] računarskog programa.

3.2.9 Imunocitohemija

Ćelije su gajene na pokrovnim staklima koja su smeštena u ploče sa 6 bunara (Sarstedt AG. & Co, Nümbrecht, Germany). Posle tretmana, u eksperimentalnim uslovima koji će biti definisani dalje u tekstu, uklonjena je hranljiva podloga, ćelije su isprane PBS-om, a zatim fiksirane ledenim rastvorom metanol-aceton (u odnosu 1:1) 20 min na -20°C . Nakon fiksacije ćelije su rehidratisane u PBS-u. Nespecifično vezivanje je blokirano dodavanjem 5% BSA u PBS-u tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Za detekciju γ -H2AX fokusa primenjena je primarna (direktna) imunofluorescentna metoda [Odell & Cook, 2013]. Ćelije su inkubirane preko noći sa Alexa Fluor® 488 anti-H2AX fosforilisanim (Ser 139) antitelom razblaženim u odnosu 1:500. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, ćelije su oprane PBST-om (PBS-Tween 20). Ćelijski nukleusi su kontrastirani DAPI bojom u finalnoj koncentraciji od 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nakon obilnog ispiranja PBST-om, pokrovnostakla su montirana u medijumu Mowiol® 4-88 (antifade mounting medium). Fluorescentno bojeni preparati su zatim analizirani na laserskom konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems CMS GmbH; Wetzlar, Germany) pomoću LAS AF Lite računarskog programa (Leica Microsystems CMS GmbH). Broj γ -H2AX fokusa je određivan pomoću CellProfiler računarskog programa (www.cellprofiler.org). Ćelije sa više od 10 fokusa su smatrane fokus-pozitivnim ćelijama. U svakom eksperimentu analizirano je bar 50 fokus-pozitivnih ćelija.

3.2.10 Analiza morfoloških promena bojenjem po May-Grünwald Gimzi

Ćelije koje su za potrebe ove analize gajene na pokrovnim stakalcima, posle isteka određenog inkubacionog perioda, su prvo ispirane 2 min PBS-om, a zatim fiksirane metanolom u trajanju od 5 minuta. Nakon fiksiranja, ćelije su 5 min bojene rastvorom May-Grünwald eozin metilen plavo, a zatim i vodenim rastvorom Gimze u trajanju od 10 min. Posle kratkog ispiranja vodom, ćelije su ispirane acetonom i ksilolom, i to na sledeći način: 2 min aceton, 2 min aceton/ksilol (u odnosu 1:1) i 2 min ksilol. Preparati su montirani u

glicerolu i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom Zeiss-Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

3.2.11 Transmisiona elektronska mikroskopija

Ultrastrukturalna analiza uzoraka urađena je pomoću transmisiona elektronske mikroskopije. Čelije su fiksirane u 2.5% glutaraldehidu koji je rastvoren u 0.1M fosfatnom puferu (pH 7.2), a postfiksacija je urađena u 1% osmijum tetroksidu koji je rastvoren u istom puferu. Uzorci su dehidratirani kroz seriju razblaženja etanola rastuće koncentracije i kalupljeni u Aralditu (Fluka, Germany). Ukalupljeni blokovi su zatim sečeni dijamantskim nožem (Diatome, Switzerland) na UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems, Germany). Tanki preseki su montirani na bakarne mrežice, obojeni uranil acetat i olovo citratom u EM Stain aparatu (Leica Microsystems, Germany) i analizirani na Philips CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI, The Netherlands, USA).

3.2.12 Morfometrijska analiza nukleusa

Analizom morfologije nukleusa se dobijaju podaci o raspodeli nukleusa u nekoliko kategorija koje su formirane na osnovu veličine i indeksa nepravilnosti nukleusa (eng. *Nuclear Irregularity Index*, NII). Ovom metodom moguće je u analiziranoj populaciji ćelija identifikovati deo ćelija koje se nalaze u procesu senescence, apoptoze ili sadrže nukleusne nepravilnosti [Filippi-Chiela *et al.*, 2012].

Ćelije su obojene DAPI bojom, a zatim posmatrane pod Zeiss-Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Germany), fluorescentnim mikroskopom sa uveličanjem od 100x. Mikrografije su analizirane pomoću ImageJ računarskog programa. Autori metode su razvili programski dodatak (ImageJ plugin) koji daje informacije o površini objekta (nukleusa) i parametre za izračunavanje NII pomoću sledeće formule:

$$NII = Asp - Arbx + Rr + Rou$$

gde su Asp - odnos između osa elipsi koje opisuju objekat; Arbx - odnos između maksimalnog i minimalnog prečnika objekta; Rr - odnos između površine objekta i pravougaone površine kojom je on zahvaćen i Rou - zaokruženost objekta gde pravilni, kružni oblici imaju vrednost 1, a ostali oblici vrednost > 1 [Filippi-Chiela *et al.*, 2012].

3.2.13 Western blot analiza

Ćelijski ekstrakti dobijeni su tretiranjem ćelija puferom za liziranje. Neposredno pre upotrebe ovom puferu su dodati proteazni (PMSF, leupeptin, spermidin, antipain, aprotinin), i fosfatazni inhibitori (Na_3VO_4 , Na-fluorid (NaF), β -diglicerofosfat i Na-pirofosfat). Ćelije su 45 min lizirane na ledu, a zatim su centrifugirane 20 min na 13000 g na +4 °C, a zatim je supernatantu dodat pufer za nalivanje uzoraka. Dobijeni uzorci su denaturisani 5 min na 100 °C i do upotrebe čuvani na -20 °C.

Elektroforetsko razdvajanje proteina rađeno je metodom poliakrilamid gel elektroforeze u prisustvu deterdženta natrijum dodecil sulfata (eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Poliakrilamidni gel se sastojao iz dva dela: 7.5% gel za koncentrovanje uzoraka (1.5 M Tris-HCl pH 6.95, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H_2O) i 12% gel za razdvajanje uzoraka (1.5 M Tris-HCl pH 8.9, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H_2O). Elektroforeza je rađena u puferu za elektroforezu na Mini/PROTEAN[®] 3 Cell sistemu (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). U eksperimentima je korišćen proteinski marker poznatih molekulskih masa PageRegular[™] Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Uzorci su elektroforetski razdvajani na 110 mV.

Posle elektroforetskog razdvajanja proteina na gelu, uzorci su analizirani pomoću imuno-blot metode (Western blotting). Prvi korak u ovoj tehnici jeste transfer (prenos) proteina na membranu od poliviniliden difluorida (PVDF) (Immobilion-P Transfer Membrane, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Prenos proteina je izvođen u puferu za transfer i trajao je 2h na +4 °C. Za taj korak korišćen je sistem Trans Blott Cell (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). Membrane su zatim ispirane TBST puferom (0.1% Tween 20 u TBS puferu), blokirane 1h u rastvoru za blokiranje (5% obrano mleko u prahu

ili 5% BSA u PBST-u) i inkubirane preko noći na +4 °C u odgovarajućem primarnom antitelu koje je do određene koncentracije razblaženo u 2.5% mleku u TBST-u ili 2.5% BSA. Posle inkubacije i obilnog ispiranja u TBST-u, membrane su dodatno inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi u sekundarnom antitelu koje je konjugovano sa HRP.

Posle ispiranja PBST-om, na membrane je nanošen ECL supstrat za hemiluminiscenciju (luminol, vodonik peroksid, p-kumarična kiselina), inkubirane su 5 min, nakon čega su stavljane u kasete za razvijanje (Hypercassette, Amersham Lifescience, United States). Signal je detektovan pomoću autoradiografskog filma (AGFA, Medical X-ray film, Belgium). Filmovi su skenirani, a intenzitet signala je određivan denziometrijski pomoću TotalLab Quant računarskog programa (www.totallab.com). Za „čišćenje“ membrane primenjen je tzv. *stripping*, tj. membrane su inkubirane 30 min na 50 °C u posebnom puferu. Ovim postupkom sa membrana se odstranjuju supstrat, primarno i sekundarno antitelo, tako da ih je posle blokiranja moguće ponovo koristiti za novu imunoblot analizu sa drugim antitelima.

3.2.14 Kvantifikacija apoptoze

Karakteristika ćelija koje se nalaze u ranoj apoptozi je prelazak fosfatidil serina (eng. *phosphatidylserine*, PS) sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane. Za razliku od njih, vijabilne ćelije zadržavaju PS na unutrašnjoj strani ćelijske membrane. Aneksin specifično reaguje sa PS pa se zbog toga koristi za detekciju apoptoze. Međutim, i membrane nekrotičnih ćelija takođe dobro vezuju aneksin. Pošto je za nekrotične ćelije karakterističan gubitak integriteta membrane, da bi ih razlikovali od apoptotičnih ćelija koristi se specifično bojenje nukleinskih kiselina pomoću PI. Tako, dvojno bojenje aneksinom i PI omogućava detektovanje vijabilnih (duplo negativnih), rano apoptotskih (aneksin-pozitivnih) i kasno apoptotskih i nekrotičnih (aneksin/PI) ćelija [Engeland *et al.*, 2001].

Kvantifikacija apoptotskih i nekrotičnih ćelija rađena je pomoću Annexin V-FLUOS Staining kita (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su inkubirane 10 do 15 min rastvorom koji sadrži Aneksin V i PI. Uzorcima

je dodat inkubacioni pufer, a zatim su mereni na CyFlow protočnom citofluorimetru (Partec, Münster, Germany). Dobijeni rezultati su obrađeni pomoću FloMax[®] računarskog programa. Analizirano je minimum 10000 ćelija po uzorku.

3.2.15 Detekcija i kvantifikacija kiselo-vezikularnih organela (AVO)

Stvaranje kiselih vezikula (eng. *acido-vesicular organel*s, AVO) je jedna od pojava koje su karakteristične za proces autofagije. Za njihovu detekciju korišćena je boja akridin oranž. Akridin oranž je slaba baza koja se akumulira u kiselim vakuolama gde daje crveni fluorescentan signal. Intenzitet crvene fluorescencije je proporcionalan stepenu kiselosti.

Za ova ispitivanja, ćelije koje su gajene na pokrovnim staklima su obojene akridin oranžom u finalnoj koncentraciji od 1 µg/ml PBS, 15 min na 37 °C. Posle obilnog ispiranja PBS-om, ćelije su posmatrane pod laserskim konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems CMS GmbH; Wetzlar, Germany).

Kvantifikacija AVO je rađena citofluorimetrijskom metodom. Ćelije su inkubirane sa 1 µg/ml akridin oranž u PBS 15 min na 37 °C, tripsinizovane i analizirane na CyFlow protočnom citofluorimetru (Partec, Münster, Germany). Dobijeni rezultati su obrađeni pomoću FloMax[®] računarskog programa. Analizirano je minimum 10000 ćelija po uzorku.

3.2.16 Detekcija i kvantifikacija senescencije

Jedan od markera koji se koristi za detekciju senescentnih ćelija je povećanje pH zavisne aktivnosti β-galaktozidaze [Kurz *et al.*, 2000]. Ovaj citohemijski esej se zasniva na stvaranju plavo obojenog precipitata koji nastaje kao rezultat vezivanja hromogenog supstrata 5-bromo-4-hloro-3-indolil β-galaktopiranozida (X-Gal) i može da se detektuje na pH 6. Prednost SABG eseja u odnosu na ostale markere ćelijskog starenja je mogućnost *in situ* detektovanja senescentne ćelije u heterogenoj ćelijskoj populaciji.

Za detekciju senescencije, ćelije su isprane hladnim PBS-om, fiksirane 5 do 6 min u rastvoru 0.2% glutaraldehyda i 2% formaldehyda u PBS-u, a zatim inkubirane 24 h na 37 °C u rastvoru za bojenje koji sadrži 40 mM citričnu kiselinu/Na fosfatni pufer, 5 mM

$K_4[Fe(CN)_6]3H_2O$, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml X-gal i ima pH 6. Posle razvijanja boje, rastvor je uklonjen, ćelije su isprane PBS-om i posmatrane pod invertnim svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany).

3.2.17 Statistička obrada rezultata

Svi eksperimenti su urađeni najmanje u triplikatu i ponovljeni su bar dva puta. Dobijeni rezultati su izraženi kao srednje vrednosti sa standardnom greškom (eng. *standard error of the mean*, SEM). Statistička značajnost razlika između eksperimentalnih grupa određena je Studentovim *t*-testom pri čemu je granica značajnosti bila $p < 0.05$.

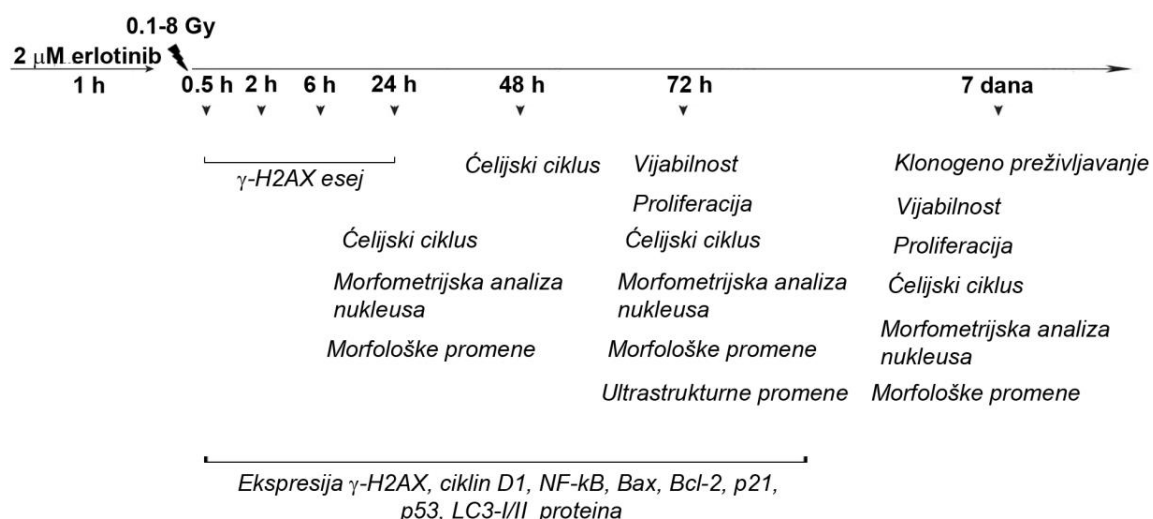
4. REZULTATI

U ovoj doktorskoj disertaciji je kao model sistem korišćena ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća CRL-5876 (H1568), koja se nalazi u okviru komercijalne kolekcije ATTC, a izolovana je iz metastaza lociranih u limfnim čvorovima pacijentkinje stare 48 godina [Phelps et al., 1996]. Na početku istraživanja se pristupilo optimizaciji eksperimentalnih uslova i opsežnoj analizi odabrane ćelijske linije. Praćen je rast CRL-5876 ćelija adenokarcinoma pluća čoveka u kulturi, njihov odgovor na dozni gradijent gama zračenja, kao i efekat rastućih koncentracija erlotiniba u funkciji vremena. Rezultati ovih eksperimenata prikazani su u poglavljima 4.1.1 i 4.1.2. Na osnovu ovih preliminarnih eksperimenata definisani su najoptimalniji eksperimentalni uslovi za ispitivanje efekata kombinovanih tretmana. Shematski prikaz eksperimentalne postavke doktorske disertacije je dat na **Slici 7**.

Rezultati eksperimenata koji se odnose na klonogeno preživljavanje CRL-5876 ćelija posle γ -zračenja, erlotiniba i kombinovanih tretmana (erlotinib + γ -zračenje) su prikazani u poglavlju 4.2, dok su efekti istih tretmana na ćelijsku vijabilnost, odnosno proliferaciju opisani u poglavlju 4.3 i 4.4. Da bi se odredilo mesto CRL-5876 ćelija na skali ćelijske radioosetljivosti, dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima preživljavanja, vijabilnosti i proliferacije druge dve ćelijske linije: HTB140 melanoma čoveka i 59M ćelija ovarijalnog karcinoma, nakon ozračivanja γ -zracima (poglavlje 4.5).

Efekti pojedinačnih i kombinovanih tretmana na ćelijski ciklus CRL-5876 ćelija su prikazani u poglavlju 4.6, dok su efekti ovih tretmana na kinetiku nastanka i nestanka dvolančanih prekida na DNK (DSB) opisani u poglavlju 4.7. Rezultati morfološke i ultrastrukturne analize CRL-5876 ćelija posle primene zračenja i erlotiniba su prikazani u poglavljima 4.8 i 4.9, dok su rezultati morfometrijske analize nukleusa nakon ovih tretmana dati u poglavlju 4.10. Ekspresija γ -H2AX, ciklina D1, NF- κ B, Bax, Bcl-2, p21, p53 i LC3-I/II proteina nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom prikazana je u poglavlju 4.11.

Na osnovu predhodnih rezultata (poglavlja 4.8, 4.9, 4.10), rađena je analiza ćelijske smrti koja nastaje kao odgovor na primenjene tretmane. U cilju praćenja efekata supresije autofagije na ostale tipove ćelijske smrti, uveden je novi agens, inhibitor procesa autofagije, hlorokin. Vijabilnost CRL-5876 ćelija nakon tretmana hlorokinom, erlotinibom i posle ozračivanja, kao i njihovim kombinacijama, opisana je u poglavlju 4.12, dok su efekti ovih tretmana na indukciju apoptoze, autofagije i senescencije opisani u podpoglavljima 4.12.1, 4.12.2 i 4.12.3.

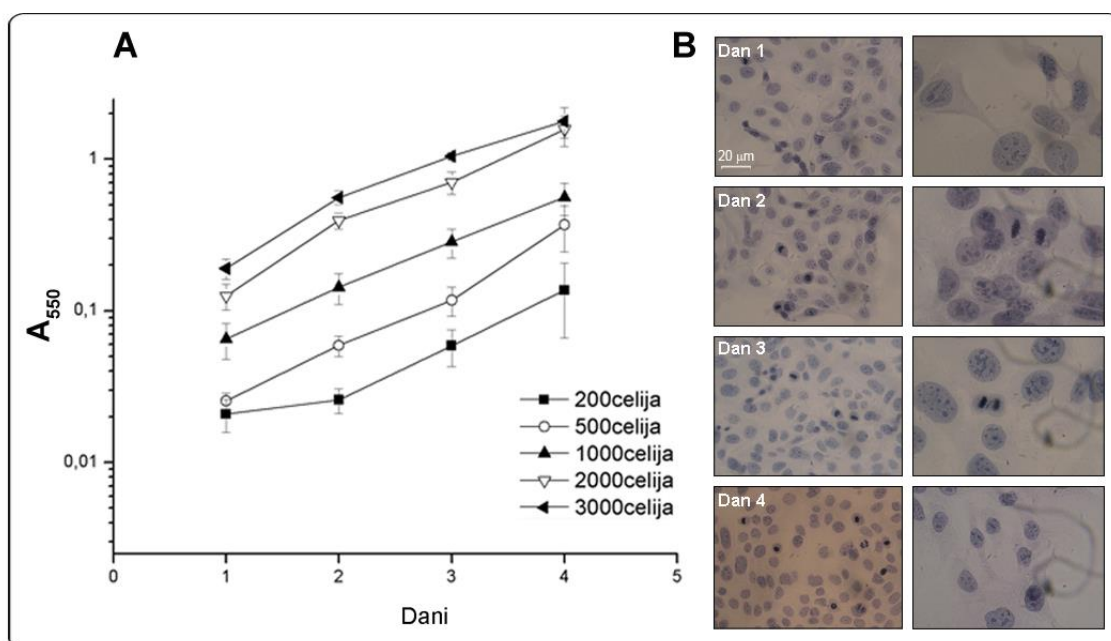


Slika 7. Shematski prikaz eksperimentalne postavke.

4.1 Optimizacija eksperimentalnih uslova

4.1.1 In vitro rast CRL-5876 ćelija adenokarcinoma pluća

Da bi definisali optimalan broj ćelija za kolorimetrijske metode, pomoću SRB eseja je praćen rast CRL-5876 ćelija do četvrtog dana u kulturi. U mikrotitar ploče sa 96 bunara zasejavan je različit broj ćelija, u rasponu od 200 do 3000 ćelija po bunaru (**Slika 8A**). Reprezentativne mikrografije ćelija obojenih hematoksilinom prikazane su na **Slici 8B**. S obzirom na to da je SRB metod pokazao linearni odnos između broja ćelija i absorbance, za vrednosti manje od 1, na osnovu dobijenih rezultata izabran je početni broj od 1000 ćelija po bunaru koji je dalje korišćen u svim kolorimetrijskim metodama.

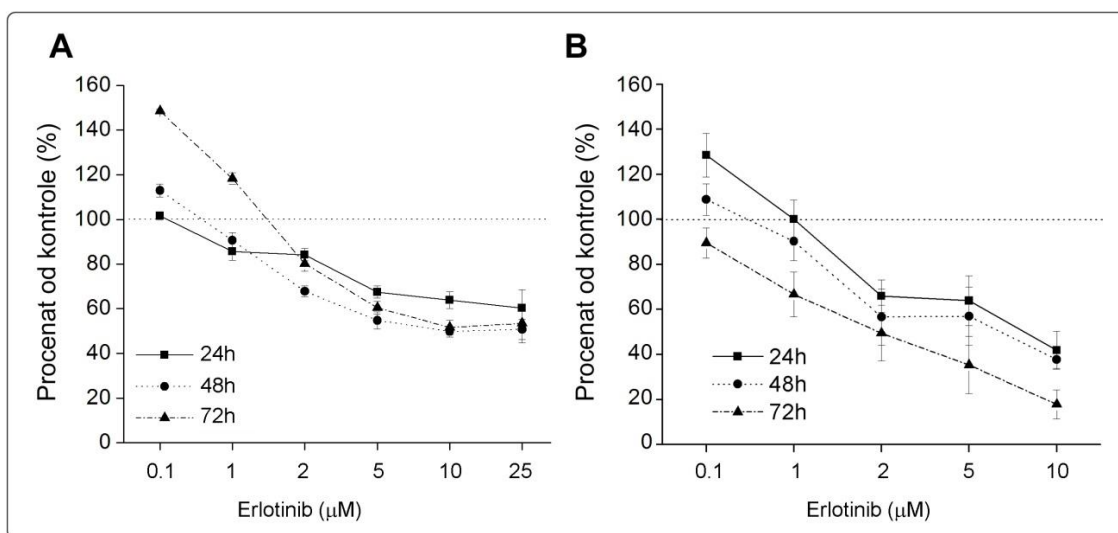


Slika 8. Kriva rasta CRL-5876 ćelija određena pomoću SRB eseja (**A**). Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška). Reprezentativne mikrografije CRL-5876 ćelija obojenih hematoksilinom (**B**). Uveličanje: 20 i 100x.

4.1.2 Testiranje koncentracija erlotiniba

U cilju pronalazjenja optimalne koncentracije erlotiniba za pojedinačne i kombinovane tretmane sa zračenjem, ćelijski odgovor na tretman je praćen pomoću MTT i SRB eseja (**Slika 9**). Ćelije koje su bile u eksponencijalnoj fazi rasta tretirane su erlotinibom, čija je finalna koncentracija bila od 0.1 do 25 μM . Promena vijabilnosti ćelija je praćena u tri vremenske tačke: 24, 48 i 72 h nakon tretmana.

Rezultati oba eseja su potvrdili dozno zavisno citotoksično dejstvo erlotiniba. MTT metoda (**Slika 9A**) je pokazala nešto više vrednosti u odnosu na rezultate SRB (**Slika 9B**). Na osnovu MTT, tretman 0.1 μM erlotinibom je doveo do stimulacije rasta posle 72 h (48% stimulacije rasta u odnosu na kontrolu).



Slika 9. Vijabilnost CRL-5876 ćelija određena MTT (**A**) i SRB (**B**) testom 24, 48 i 72 h nakon tretmana rastućim koncentracijama erlotiniba (od 0.1 do 25 μM). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

Stimulacija rasta detektovana SRB testom, za istu koncentraciju erlotiniba, bila je nešto niža (28% stimulacije), i detektovana je posle 24 h. Takođe, na osnovu MTT eseja je pokazano da su počevši od 2 μM erlotiniba, bolji citotoksični efekti postignuti posle 48 h u

odnosu na rezultate dobijene 24 h nakon tretmana. Međutim, za razliku od vrednosti dobijenih SRB testom, vrednosti koje su dobijene pomoću MTT pokazuju tendenciju porasta 72 h nakon tretmana, ukazujući na postojanje izvesnog oporavka ćelija koje su preživele tretman.

Određivanje vijabilnosti ćelija pomoću MTT eseja je pokazalo nešto više IC₅₀ vrednosti (koncentracija inhibitora pri kojoj se vijabilnost ćelija svodi na 50% od vrednosti kontrole), u odnosu na vrednosti koje su dobijene SRB testom. Uzevši u obzir podatke iz literature po kojima je SRB pokazao veću senzitivnost i bolju linearnost u odnosu na MTT [Keepers *et al.*, 1991], kao i na činjenicu da je koncentracija od 2 μM erlotiniba klinički relevantna [Zou *et al.*, 2013], ova koncentracija je odabrana za dalja istraživanja u kojima je erlotinib aplikovan samostalno ili u kombinaciji sa zračenjem. U eksperimentima u kojima je praćen efekat kombinovanih tretmana, CRL-5876 ćelije su izložene dejstvu 2 μM erlotiniba 1 h pre zračenja [Wang *et al.*, 2011], dok je dužina inkubacije nakon zračenja bila prilagođena trajanju konkretnog eksperimenta i naznačena je na odgovarajućem mestu u tekstu.

4.2 Klonogeno preživljavanje CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja i erlotiniba

Iako se klonogeni esej inicijalno koristio u istraživanju efekata zračenja na preživljavanje ćelija i smatra „zlatnim standardom” ćelijske radiobiologije, on se danas koristi i za ispitivanje dejstva drugih agenasa sa potencijalnom kliničkom primenom [Munshi *et al.*, 2005; Ristić-Fira *et al.*, 2009]. Ovim esejom se meri klonogena sposobnost ćelije, odnosno sposobnost ćelije da formira veliku koloniju ili klon, posle protoka od najmanje 6 perioda dupliranja ćelija posle zračenja. Kriterijum za koloniju je 50 i više ćelija koje se nalaze međusobno u neposrednoj blizini i odvojene su od okolnih grupa ćelija. Sposobnost pojedinačne ćelije da oformi koloniju koja se može detektovati golim okom je dokaz da je ta ćelija zadržala svoj reproduktivni potencijal nakon određenog toksičnog tretmana. Postoje dva eksperimentalna pristupa koji se primenjuju pri izvođenju klonogenog eseja – zasejavanje ćelija pre zračenja, koji je primereniji brzom određivanju osetljivosti ćelija na određene tretmane, i zasejavanje ćelija neposredno posle zračenja, koji

se koristi u klasičnim radiobiološkim studijama za određivanje sposobnosti reparacije potencijalno letalnih i subletalnih oštećenja ćelije [Franken *et al.*, 2006; Buch *et al.*, 2012].

Kombinovani tretmani (γ -zračenje i erlotinib) su rađeni tako što je 2 μ M erlotinib dodavan CRL-5876 ćelijama 1 h pre zračenja, a zatim su one odmah nakon zračenja rasadiwane u odgovarajućem broju. Medijum kulture je sadržao istu koncentraciju erlotiniba.

Određivanje broja kolonija rađeno je 7 dana nakon zračenja. Frakcija preživljavanja (SF) određena je na osnovu formule:

$$SF = \frac{\text{Broj kolonija}}{\text{Broj zasejanih ćelija} \times (\text{PE}/100)}$$

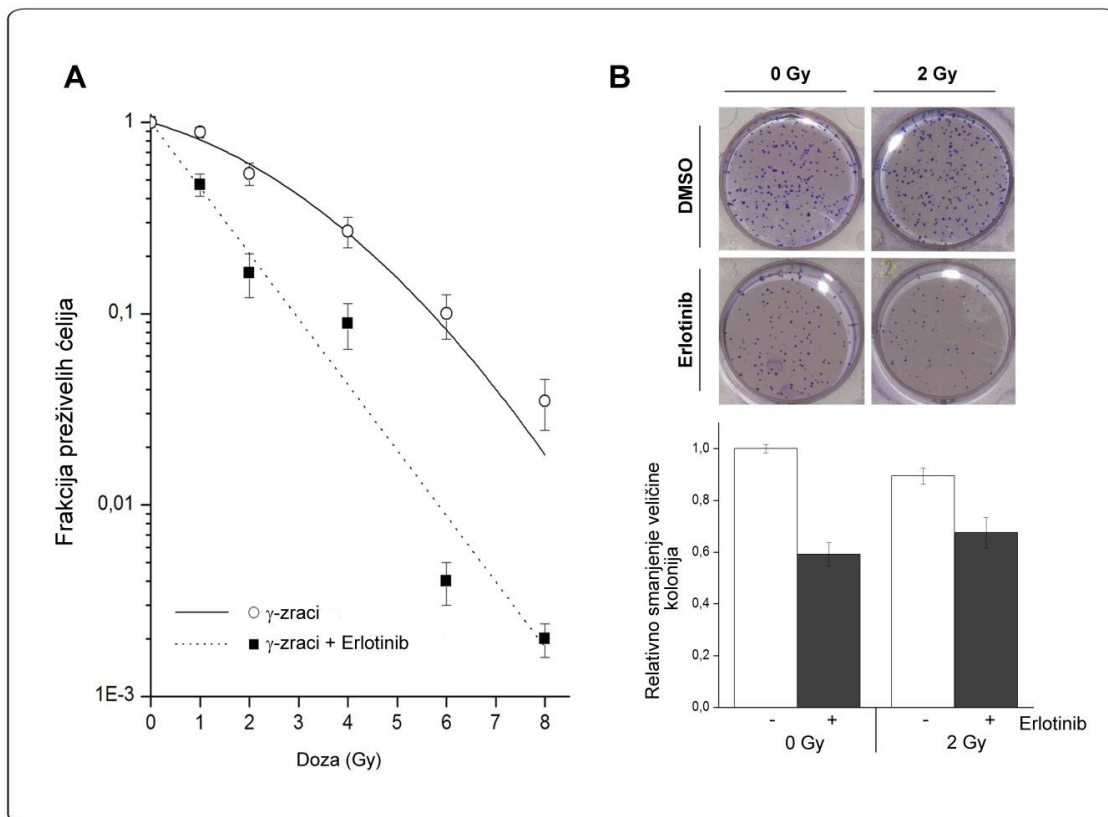
gde PE predstavlja efikasnost zasejavanja (eng. *Plating Efficiency*, PE) koja je definisana kao procenat ćelija u neozračenim, tj. kontrolnim uzorcima koje formiraju kolonije. Efikasnost zasejavanja CRL-5876 ćelija iznosila je 55%. Eksperimentalni podaci su fitovani pomoću linearno-kvadratne jednačine:

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

gde S predstavlja frakciju preživelih ćelija za dozu D, dok su α i β slobodni parametri fitovanja. Parametar α definiše početni nagib, odnosno „rame“ krive, dok parametar β definiše terminalni ili opadajući deo krive, poznat kao „rep“. Frakcija preživljavanja za dozu od 2 Gy (SF2) dobijena je iz najbolje fitovane krive preživljavanja.

Najbolje fitovane krive dobijene korišćenjem rezultata klonogenog eseja su predstavljene na **Slici 10**, dok su odgovarajući parametri fitovanja i radiobiološki podaci

dati u **Tabeli 1**. Dobijeni rezultati upućuju na radiorezistenciju analiziranih ćelija za niže doze, 1 i 2 Gy γ -zračenja. Vrednost SF2 za CRL-5876 ćelije dobijena sa najbolje fitovane krive iznosila je 0.61 ± 0.01 , dok je izmerena vrednost bila 0.54 ± 0.07 . Za doze veće od 4 Gy, odgovor CRL-5876 ćelija je bio izrazit, pokazujući značajan inhibitoryni efekat zračenja (**Slika 10A**). Kombinovani tretman erlotinibom i zračenjem doveo je do još jačeg odgovora ćelija u odnosu na samo zračenje. Kod ovih ćelija, vrednost SF2 očitana sa krive je iznosila 0.21 ± 0.01 . Takođe, utvrđen je porast α parametra sa 0.166 ± 0.059 kod ćelija tretiranih γ -zračenjem na 0.789 ± 0.110 kod kombinovano tretiranih ćelija. Za tretman γ -zračenjem vrednost β parametra iznosi 0.042 ± 0.019 . Kako β parametar ima veoma malu vrednost za krivu koja karakteriše dvostruki tretman, linearno-kvadratna jednačina je redukovana samo na njen linearni deo. Za potrebe poređenja uvedena je vrednost relativne biološke efektivnosti (eng. *relative biological effectiveness*, RBE), koja se definiše kao odnos apsorbovane doze referentnog zračenja (X ili γ zračenje) i apsorbovane doze analiziranog tipa zračenja, ili kombinovanog tretmana, koja izaziva isti biološki efekat [Combs *et al.*, 2012]. Za kombinovani tretman u ovom radu, RBE je određena u odnosu na efekat koji proizvodi doza od 2 Gy γ -zračenja (RBE (2 Gy, γ)) i iznosila je 3.12 ± 0.44 . Takođe, smanjenje broja kolonija pratilo je i smanjenje veličine kolonija (**Slika 10B**). Doza koja redukuje preživljavanje na 10% (D_{10}) se takođe smanjila sa 5.6 ± 0.06 Gy kod ćelija kod kojih je primenjeno samo zračenje na 2.9 ± 0.04 Gy kod ćelija na koje su primenjeni kombinovani tretmani (**Tabela 1**). U odnosu na vrednost D_{10} definisan je i faktor povećanja osetljivosti (eng. *sensitizer enhancement ratio*, SER) [Meike *et al.*, 2011]. Vrednost SER iznosi 1.9 ± 0.33 što ukazuje na to da je tretman erlotinibom doveo do porasta radioosetljivosti CRL-5876 ćelija.



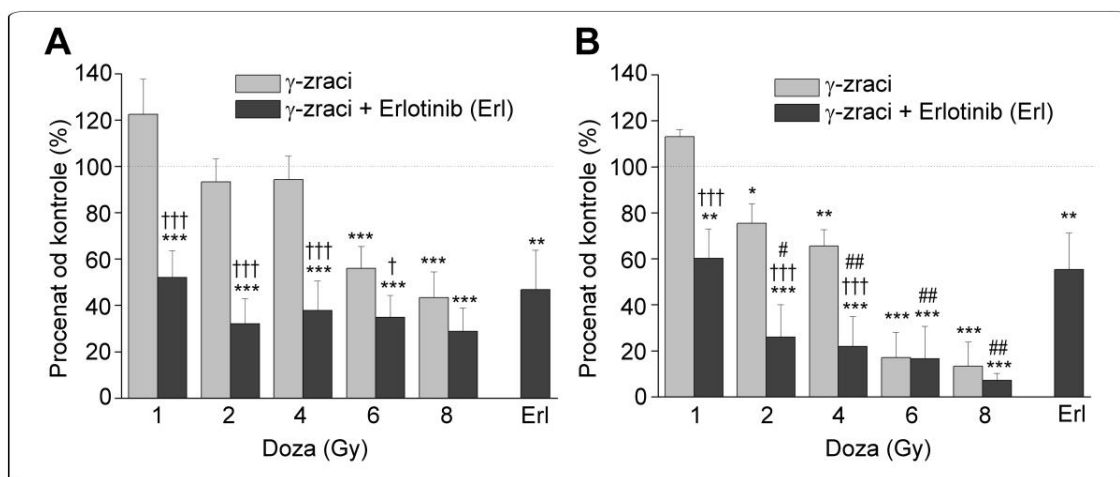
Slika 10. Klonogeno preživljavanje CRL-5876 ćelija 7 dana nakon γ -zračenja i kombinovanog tretmana γ -zračenjem i erlotinibom (A). Krive predstavljaju najbolje fitovanje numeričkih podataka iz eksperimenata pomoću linearno-kvadratnog modela. Primjenjene doze zračenja bile su 1, 2, 4, 6 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška). Relativno smanjenje veličine kolonija nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zracima i erlotinibom (B).

Tabela 1. Radiobiološki parametri za CRL-5876 ćelije

Tretman	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻¹)	SF2	RBE (2Gy, γ)	D ₁₀ (Gy)	SER (D ₁₀)
γ -zraci	0.166 \pm 0.059	0.042 \pm 0.019	0.61 \pm 0.01	1.00	5.6 \pm 0.6	1
γ -zraci+Erlotinib	0.789 \pm 0.110	-	0.21 \pm 0.01	3.12 \pm 0.44	2.9 \pm 0.4	1.9 \pm 0.33

4.3 Vijabilnost CRL-5876 ćelija nakon tretmana γ -zračenjem i erlotinibom

Efekti pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom na vijabilnost CRL-5876 ćelija ispitivani su SRB metodom posle 72 h i 7 dana (Slika 11). Nakon 72 h od ozračivanja gama zracima zapaženo je dozno-zavisno smanjenje vijabilnosti koje se kretalo u opsegu od 123 do 43 % u odnosu na kontrolne uzorke. Veće doze zračenja kao (6 i 8 Gy) su pokazale statistički značajno smanjenje vijabilnosti ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom ($p < 0.001$). Kombinovani tretmani su izazvali veći inhibitorski efekat u odnosu na efekat samog zračenja. Sa povećanjem doza zračenja, u kombinovanim tretmanima, efekat erlotiniba je nešto manje izražen. Sam erlotinib takođe smanjuje vijabilnost ćelija 72 h nakon primene ($p < 0.01$) (Slika 11A).



Slika 11. Vijabilnost CRL-5876 ćelija 72 h (A) i 7 dana (B) nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom određena SRB testom. Primenjene doze zračenja bile su 1, 2, 4, 6 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

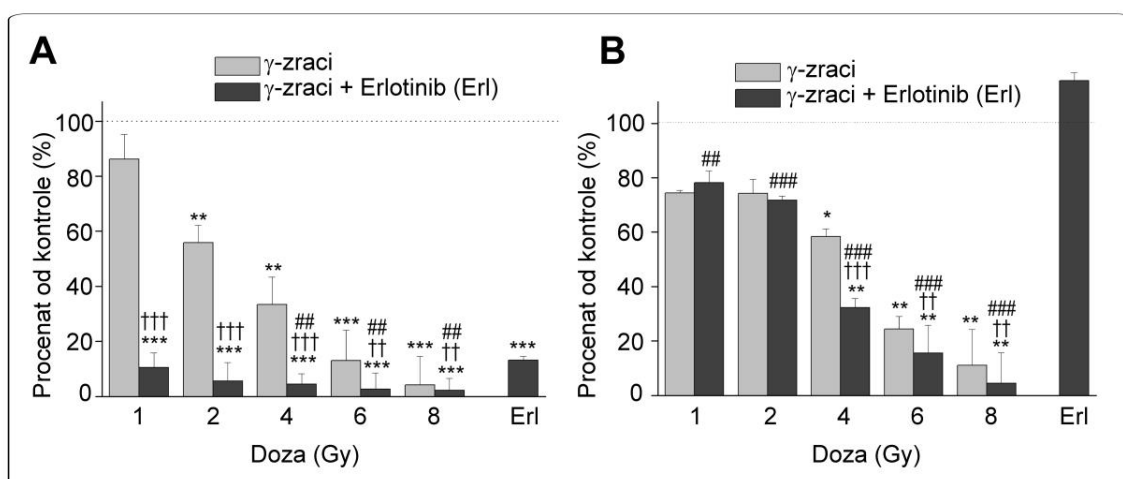
* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje; # - statistička značajnost u odnosu na erlotinib.

*, †, # - $0.01 < p < 0.05$; **, ††, ## - $0.001 < p < 0.01$; ***, †††, ### - $p < 0.001$

Nakon 7 dana od ozračivanja γ -zracima, doze od 6 i 8 Gy su dovele do izrazitog pada ćelijske vijabilnosti. Kombinovani tretmani su pokazali bolju doznu zavisnost u odnosu na vremensku tačku od 72 h. Takođe, vijabilnost ćelija je bila statistički značajno smanjena, kako za pojedinačne, tako i za kombinovane tretmane (**Slika 11B**).

4.4 Proliferacija CRL-5876 ćelija nakon tretmana γ -zračenjem i erlotinibom

Prema rezultatima analize ćelijske proliferacije pomoću kolorimetrijskog BrdU ELISA testa, 72 h nakon ozračivanja ćelija, uočen je dozno zavisni pad proliferacije, koji se kreće u opsegu od 86 do 4% u odnosu na kontrolu. Kombinovani tretmani su doveli do još jačeg i statistički značajnog smanjenja proliferacije, koja u celom opsegu doza nije prelazila 10% u odnosu na vrednost kontrole (**Slika 12A**).



Slika 12. Proliferacija CRL-5876 ćelija 72 h (**A**) i 7 dana (**B**) nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom, određena SRB testom. Primenjene doze zračenja bile su 1, 2, 4, 6 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje; # - statistička značajnost u odnosu na erlotinib.

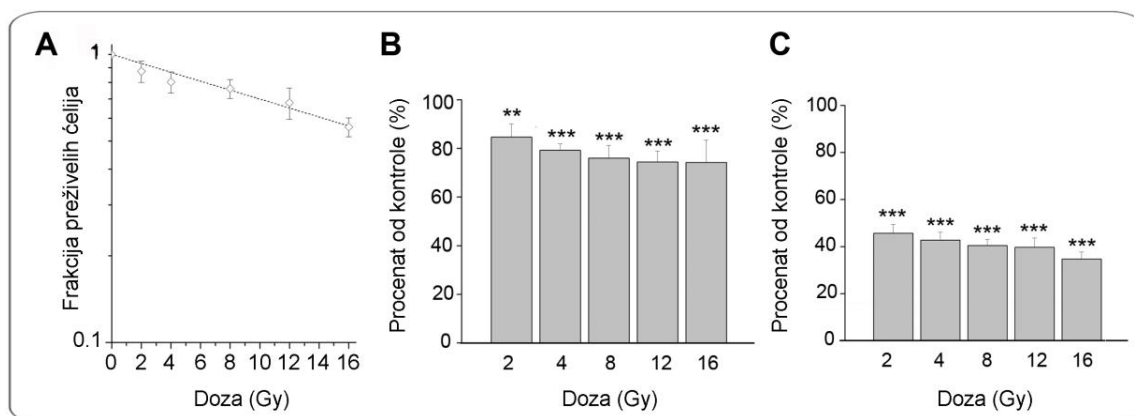
*, †, # - 0.01 < p < 0.05; **, ††, ## - 0.001 < p < 0.01; ***, †††, ### - p < 0.001

Međutim, 7 dana nakon tretmana, svi tretirani uzorci su pokazali tendenciju porasta proliferacije u odnosu na vremensku tačku od 72 h (**Slika 12B**).

4.5 Klonogeno preživljavanje, vijabilnost i proliferacija HTB140 i 59M ćelija nakon γ -zračenja

Radioosetljivost kancerskih ćelija značajno varira između različitih tipova tumora [El-Awady *et al.*, 2003]. S obzirom na ovu činjenicu, u cilju pozicioniranja CRL-5876 ćelija adenokarcinoma na skali radioosetljivosti, rađeno je poređenje ove ćelijske linije sa dve tipa kancerskih ćelija čoveka: HTB140 melanomom i 59M ovarijalnim karcinomom. Obe ćelijske linije su ozračivane γ -zracima pod istim uslovima kao i CRL-5876 ćelije.

Kriva preživljavanja HTB140 ćelija predstavlja najbolje fitovanje numeričkih podataka iz eksperimenata pomoću linearno-kvadratnog modela (**Slika 13A**). SF2 vrednost za ove ćelije iznosila je 0.93 ± 0.01 i ukazuje na izrazito visoku radiorezistenciju ovih ćelija.



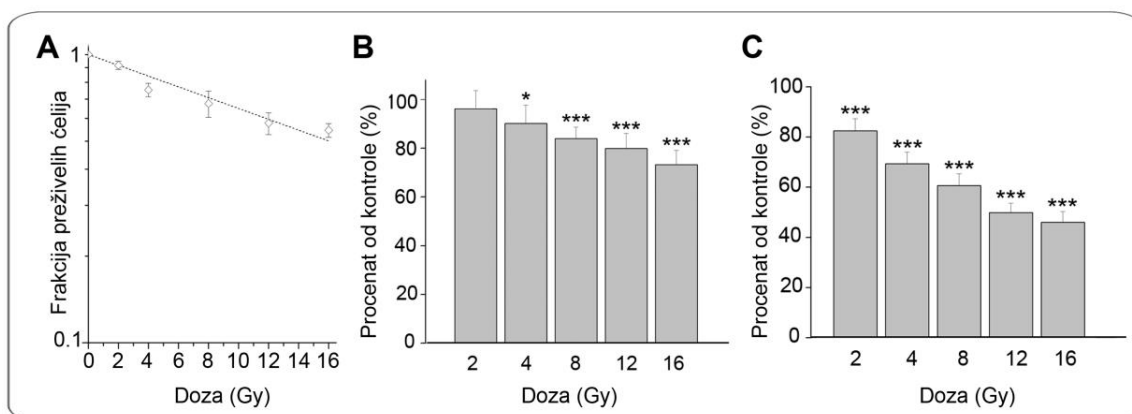
Slika 13. Klonogeno preživljavanje (**A**), vijabilnost (**B**) i proliferacija (**C**) HTB140 ćelija 7 dana nakon γ -zračenja dobijeni klonogenim esejom, SRB i BrdU metodom. Primenjene doze zračenja bile su u rasponu od 2 do 16 Gy. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat u odnosu na kontrolu.

* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu

* - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$

Vijabilnost HTB140 ćelija praćena SRB testom se kretala u opsegu od 85 do 74% nakon primene γ -zraćenja (**Slika 13B**). Smanjenje vijabilnosti kod tretiranih ćelija je bilo statistiĉki znaćajno u odnosu na netretirane uzorke ($p < 0.01$ za 2 Gy i $p < 0.001$ za više doze). Smanjenje proliferacije HTB140 ćelija je takođe znaćajno smanjeno kod ozraćenih ćelija u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) (**Slika 13C**).

Kriva preživljavanja 59M ćelija data je na **Slici 14A**. Prema dobijenim rezultatima, SF2 vrednost za ove ćelije posle ozraćivanja γ -zracima je 0.91 ± 0.01 . U istim eksperimentalnim uslovima, vijabilnost 59M ćelija je smanjena u odnosu na kontrolu i kreće se u opsegu od 94 do 71%. Smanjenje vijabilnosti je statistiĉki znaćajno, kako za dozu od 4 Gy ($p < 0.05$), tako i za veće doze ($p < 0.001$) (**Slika 14B**). Smanjenje proliferativnog kapaciteta 59M ćelija nakon ozraćivanja pokazuje jasnu doznu zavisnost i kreće se u opsegu od 80 do 45% u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) (**Slika 14C**).



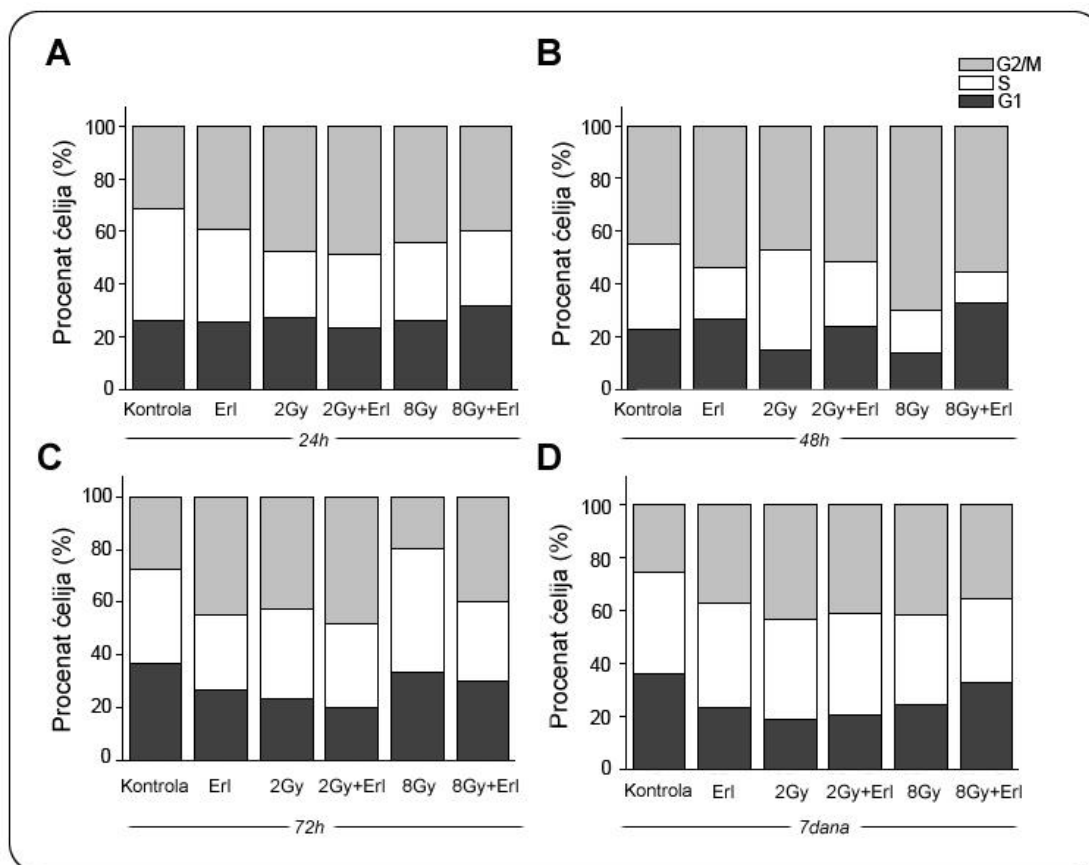
Slika 14. Klonogeno preživljavanje (A), vijabilnost (B) i proliferacija (C) 59M ćelija 7 dana nakon tretmana γ -zracima dobijeni klonogenim, SRB i BrdU esejom. Primenjene doze zraćenja bile su u rasponu od 2 do 16 Gy. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu.

* - statistiĉka znaćajnost u odnosu na kontrolu

* - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$

4.6 Efekti tretmana γ -zračenjem i erlotinibom na ćelijski ciklus CRL-5876 ćelija

S obzirom da uočeno smanjenje proliferativne sposobnosti ćelija nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana može biti posledica promena na nivou ćelijskog ciklusa, analizirana je distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa posle primene odgovarajućih tretmana. Uticaji erlotiniba i zračenja na ćelijski ciklus analizirani su metodom protočne citofluorimetrije. Efekti tretmana, pri čemu su za analizu odabrane doze od 2 i 8 Gy, u prisustvu ili bez 2 μ M erlotiniba, praćeni su u četiri vremenske tačke: 24 h, 48 h, 72 h i 7 dana. Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 15**.



Slika 15. Distribucija CRL-5876 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) i 7 dana (D) nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom (Erl). Primenjene doze zračenja bile su 1, 2, 4, 6 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu.

Uzorci koji su samo ozračeni γ -zracima pokazuju akumulaciju ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, dok je smanjenje S faze primećeno 24, 48 i 72 h nakon pojedinačnog tretmana erlotinibom (**Slika 15A, B, C**). U ovim vremenskim tačkama, kada je erlotinib kombinovan sa zračenjem, dolazi do daljeg smanjenja broja ćelija koje su u S fazi. Nakon 48 h od kombinovanih tretmana, smanjenje S faze je praćeno porastom broja ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa (**Slika 15B**). Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, 7 dana nakon primenjenih pojedinačnih i kombinovanih tretmana, pokazuje izraženiji G2/M blok, dok procenat ćelija u S fazi ostaje u rangu netretiranih, kontrolnih ćelija (**Slika 15D**).

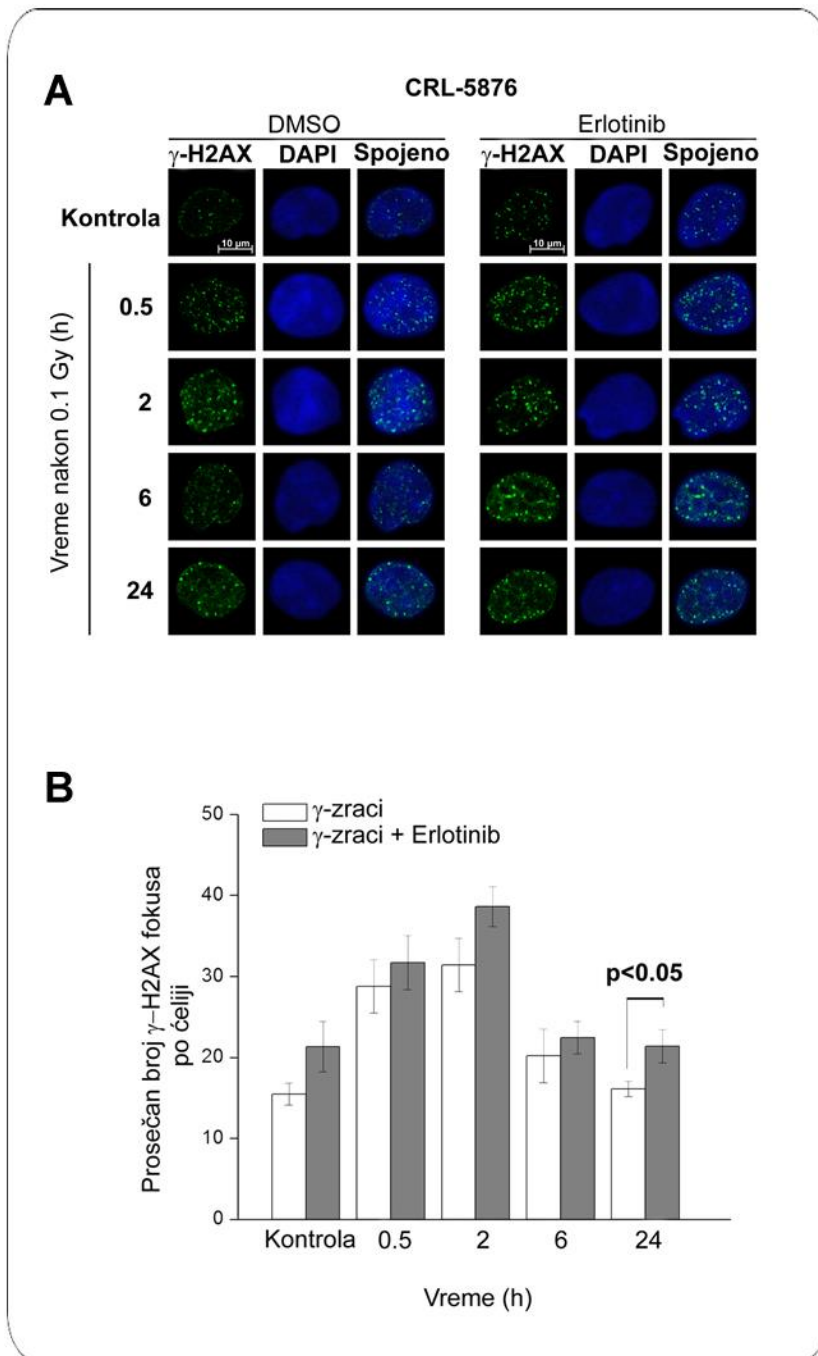
4.7 *Kvantifikacija γ -H2AX fokusa*

Pomoću γ -H2AX eseja praćen je nivo oštećenja ćelijske DNK, tj. nastanak DSB do kojih dolazi posle specifičnih pojedinačnih i kombinovanih tretmana. Reprezentativne mikrofografije γ -H2AX fokusa su prikazane na **Slici 16A**. Za praćenje kinetike nastanka i popravke dvolančanih oštećenja na DNK, primenjena je doza od 0.1 Gy i analiziran je vremenski interval koji je obuhvatio 0.5, 2, 6 i 24 h. Ovako mala doza zračenja je izabrana zato što je pokazano da veće doze dovode do nastanka većeg broja γ -H2AX fokusa, zbog čega može da dođe do njihovog preklapanja tj. nemogućnosti da se precizno utvrdi stvarni broj fokusa u pojedinačnim ćelijama [Sak & Stuschke 2010; Li *et al.*, 2013].

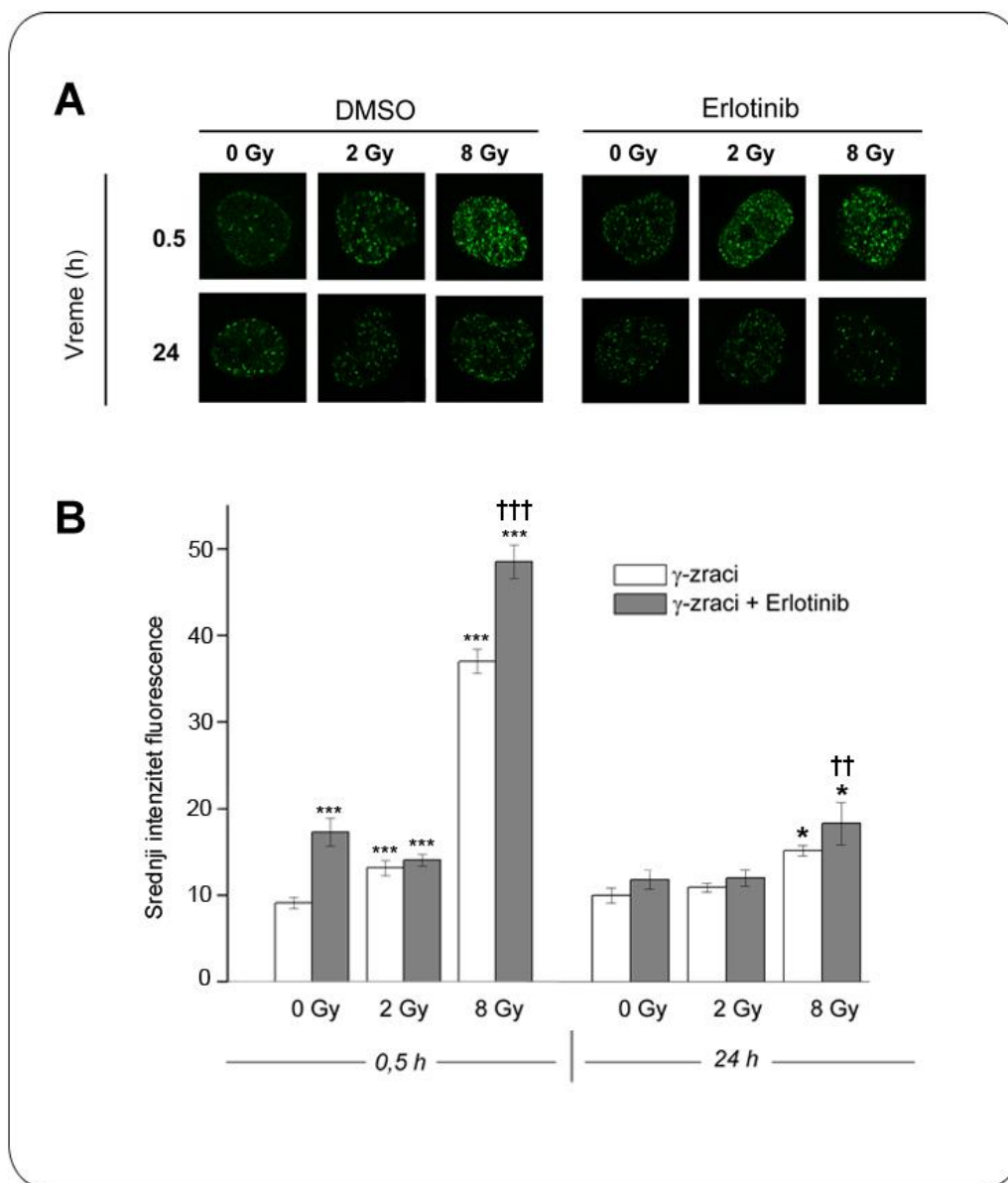
Analize mikrofografija pomoću CellProfiler računarskog programa pokazuje da broj γ -H2AX fokusa raste odmah nakon izlaganja ćelija γ -zracima, dostiže maksimum posle 2 h, i kao posledica DNK reparacije, počinje postepeno da opada. Nakon inkubacionog perioda od 24 h, broj γ -H2AX fokusa je opao na kontrolni nivo. Brzina nastanka i nestajanja γ -H2AX fokusa je slična i kod ćelija koje su pre ozračivanja tretirane erlotinibom. Međutim, statistički značajan porast u broju γ -H2AX fokusa kod ćelija izloženih kombinovanom tretmanu zapažen je samo posle 24 h ($p < 0.05$) (**Slika 16B**).

U slučaju kada su primenjene više doze zračenja (2 i 8 Gy), merena je ukupna fluorescencija obeleženog γ -H2AX po ćeliji [Anderson *et al.*, 2013]. Reprezentativne mikrofografije γ -H2AX fokusa su prikazane na **Slici 17A**. Merenja su izvršena pomoću LAS AF Lite računarskog programa 0.5 i 24 h nakon tretmana.

Trideset minuta nakon primene pojedinačnih i kombinovanih tretmana, svi tretirani uzorci pokazuju statistički značajno povećanje ukupne fluorescence γ -H2AX po ćeliji ($p < 0.001$) (**Slika 17B**). Takođe, pretretman erlotinibom u kombinaciji sa dozom od 8 Gy značajno povećava nivo ukupne fluorescence γ -H2AX ($p < 0.001$). Rezultati merenja koja su izvršena na ćelijama 24 h nakon tretmana pokazuju da ozračivanje sa 8 Gy takođe dovodi do statistički značajnog porasta vrednosti ukupne fluorescence γ -H2AX u odnosu na kontrolu. Pretretman erlotinibom kod ćelija ozračenih sa 8 Gy doveo je do povećanja vrednosti ukupne fluorescence ($p < 0.01$) nakon 24 h (**Slika 17B**).



Slika 16. Reprezentativne mikrofografije dobijene imunofluorescentnim bojenjem γ -H2AX fokusa (**A**) i kinetika nastanka/nestanka γ -H2AX fokusa (**B**) 0.5, 2, 6, i 24 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom. Primenjena doza zračenja je 0.1 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Rezultati su predstavljeni kao prosečan broj γ -H2AX fokusa po ćeliji \pm SEM (standardna greška). Veličina podeoka na mikrofografijama odgovara 10 μ M.



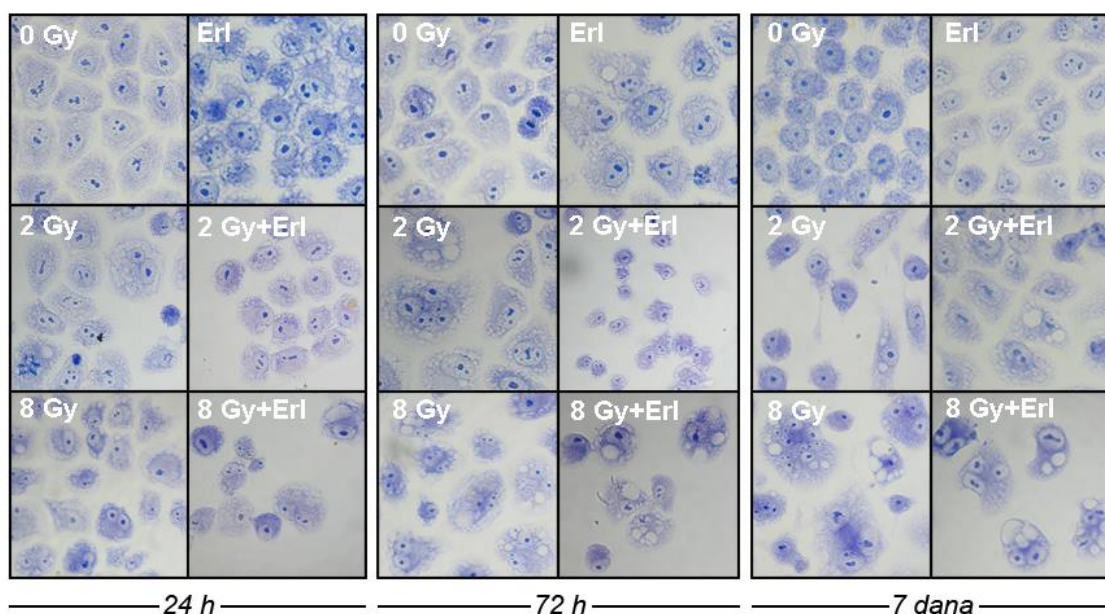
Slika 17. Reprezentativne mikrografije dobijene imunofluorescentnim bojenjem γ -H2AX fokusa (A) i grafički prikaz ukupne srednje fluorescence γ -H2AX po ćeliji (B) 0.5 h i 24 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom. Primenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba je 2 μ M. Rezultati su predstavljeni kao srednji intenzitet fluorescence γ -H2AX po ćeliji \pm SEM (standardna greška).

* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje

*, † - $0.01 < p < 0.05$; **, †† - $0.001 < p < 0.01$; ***, ††† - $p < 0.001$

4.8 Morfološke promene CRL-5876 ćelija izazvane γ -zračenjem i erlotinibom

Morfološke promene do kojih je došlo na CRL-5876 ćelijama nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom praćene su u odabranim vremenskim tačkama: 24 h, 72 h i 7 dana. Nakon tretiranja, ćelije su po isteku vremena inkubacije obojene May-Grünwald Gimzom i ispitivane pod svetlosnim mikroskopom (**Slika 18**).



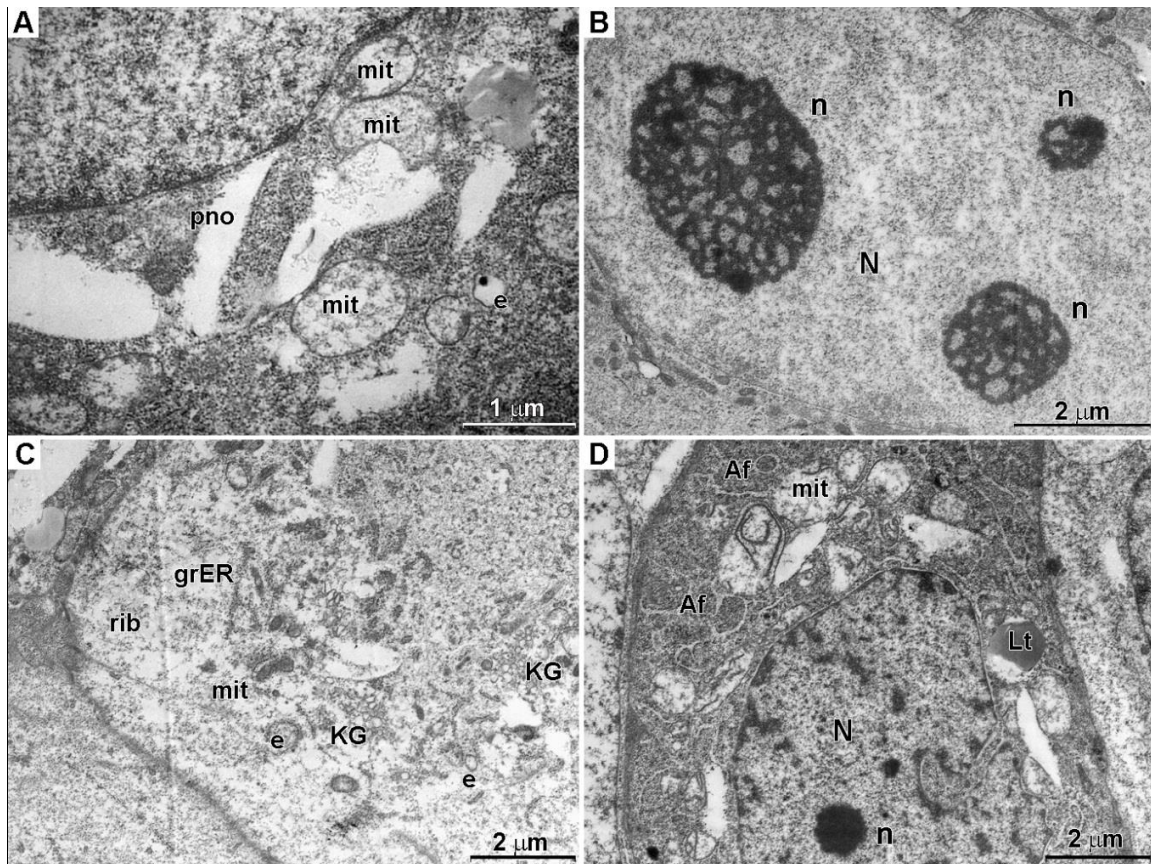
Slika 18. Analiza morfoloških promena CRL-5876 ćelija 24 h, 72 h i 7 dana nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zracima i erlotinibom (Erl). Primenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba je 2 μ M. May-Grünwald Gimza bojenje. Mikroskop: Zeiss-Axioplan 2. Uveličanje: 100x.

Netretirane CRL-5876 ćelije su ujednačene veličine, sa pojedinačnim, ovalnim, jasno definisanim nukleusima. Takođe, zapažaju se jasno definisani, pojedinačni ili višestruki nukleolusi i blaga vakuolizacija citoplazme. Ozračivanje ćelija dovelo je do pojave višejedarnih ćelija. Ovo je naročito izraženo kada su ćelije ozračene većim dozama, npr. 8 Gy. Primećen je i visok stepen vakuolizacije citoplazme u odnosu na kontrolu, i to u svim vremenskim tačkama, kako kod ćelija izloženih pojedinačnim tretmanima erlotinibom ili zračenjem, tako i kod ćelija koje su tretirane kombinacijom ovih agenasa.

4.9 Ultrastrukturna analiza CRL-5876 ćelija nakon tretmana γ -zračenjem i erlotinibom

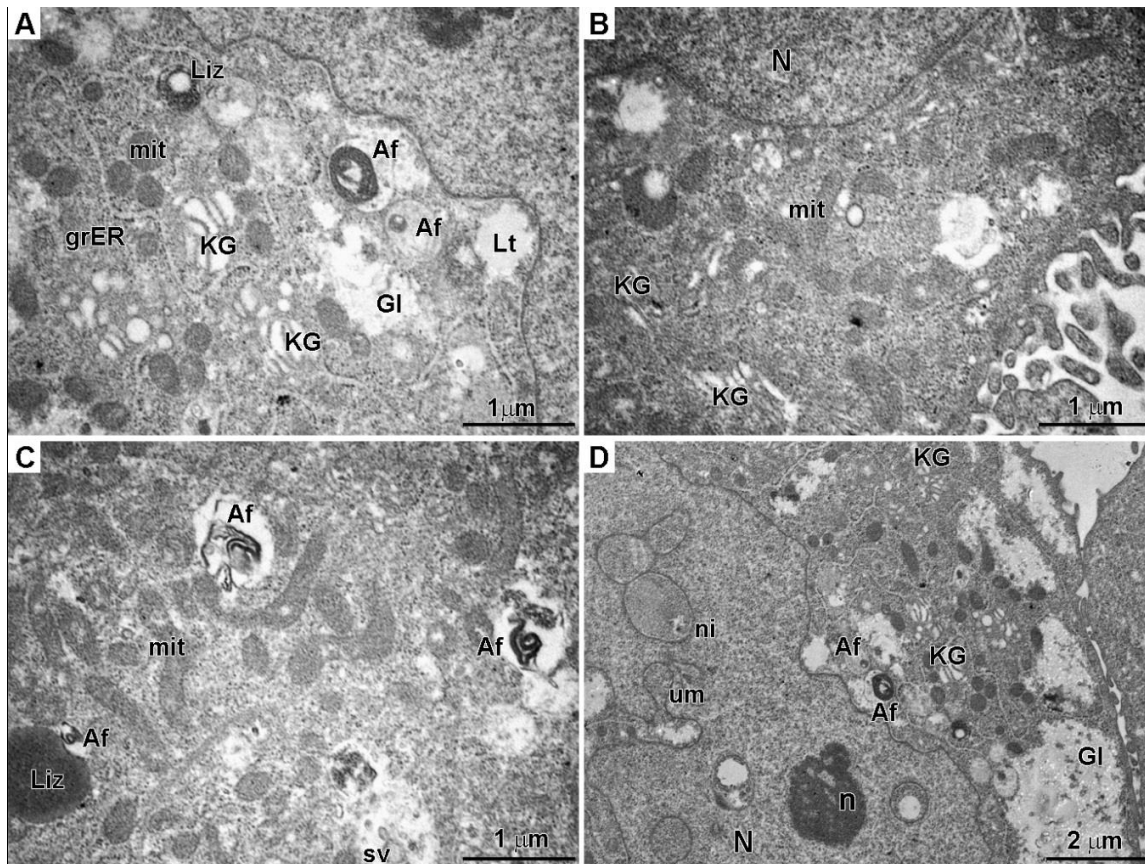
Da bi se objasnile opisane morfološke promene koje u CRL-5876 ćelijama nastaju delovanjem zračenja i erlotiniba (poglavlje 4.8), i da bi se dobio bolji uvid u oštećenja do kojih ovi agensi dovode na ultrastrukturnom nivou, primenjena je transmisiona elektronska mikroskopija. Iz opsega svih testiranih doza zračenja i koncentracija erlotiniba, za ova istraživanja, izabrane su doze od 2 i 8 Gy γ -zračenja, odnosno 5 i 25 μ M erlotinib. Promene na CRL-5876 ćelijama su analizirane 72 h nakon primene ovih agenasa.

Analizom mikrografija kontrolnih CRL-5876 ćelija mogu se uočiti tipična obeležja malignog fenotipa. Promene u obliku nukleusa i invaginacije nukleusnog ovoja su česte kod kancerskih ćelija, dok se polilobulacija nukleusa može naći kod nekih adenokarcinoma [Zink *et al.*, 2004; de Las Heras *et al.*, 2013]. Tako se i kod CRL-5876 ćelija mogu uočiti krupni, pleomorfni, izraženo euhromatski nukleusi sa istaknutim poljima heterohromatina, kao i proširenja i duboki uvrati nukleusnog ovoja (**Slika 19A, D**). Ćelije malignih tumora obično imaju višestruke nukleoluse koji su krupniji i nepravilnijeg oblika u odnosu na nukleoluse normalnih ćelija. Morfološke i funkcionalne promene nukleolusa kancerskih ćelija su posledica povećane potrebe za biogenezom ribozoma i najčešće su u vezi sa promenama u mehanizmima koji kontrolišu ćelijsku proliferaciju [Montanaro *et al.*, 2008]. Nukleolusi CRL-5876 ćelija su brojni, što ukazuje na izrazitu transkripcionu aktivnost ovih ćelija i na njima se jasno uočavaju fibrilarni (*pars fibrosa*) i granulisani (*pars granulosa*) regioni (**Slika 19B**). O izrazitoj transkripcionoj aktivnosti CRL-5876 ćelija svedoče i brojni slobodni ribozomi u citoplazmi, kao i razvijena mreža granulisanog endoplazminog retikuluma (grER) i kompleksa Goldži (KG) (**Slika 19C**). Takođe se mogu primetiti nabubrele, svetle mitohondrije i retki autofagozomi (Af) (**Slika 19A, D**).



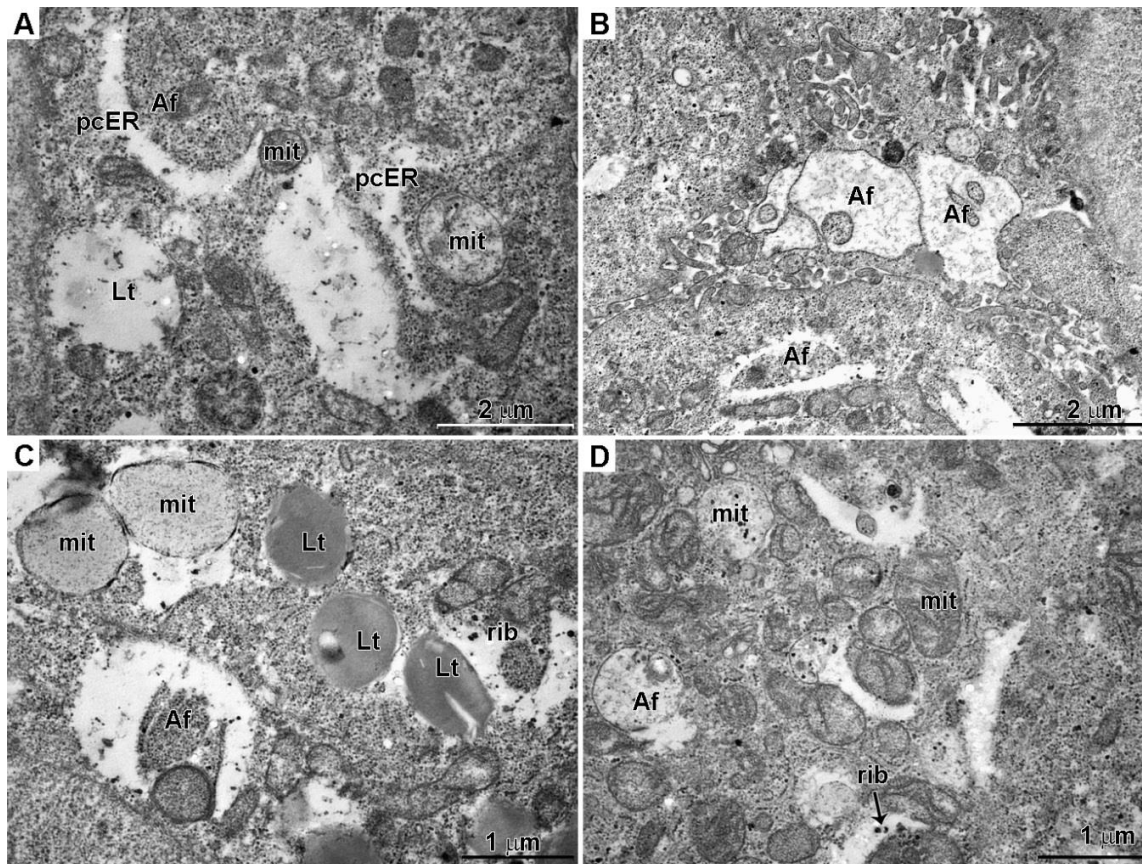
Slika 19. Ultrastruktura kontrolnih CRL-5876 ćelija. **N** - nukleus; **n** - nukleolus; **mit** - mitohondrije; **pno** - proširenja nukleusnog ovoja; **KG** - Kompleks Goldži; **e** - endocitotske vezikule; **rib** - ribozomi; **grER** - granulirani endoplazminski retikulum; **Lt** - lipidna tela; **Af** - autofagozomi. Uveličanje: 19500 x (A), 11500 x (B), 8800 x (C); 8800 x (D).

Ozračivanje CRL-5876 ćelija sa 2 Gy je dovelo do ultrastrukturnih promena u odnosu na kontrolne ćelije. Tako su u ozračenim ćelijama mitohondrije brojnije, tamne i sa više kristi (**Slika 20**). Takođe, može se uočiti veći broj autofagozoma u kojima se nalaze ostaci oštećenih mitohondrija (**Slika 20A, C, D**), a na **Slici 20C** se zapaža i spajanje autofagozoma sa lizozomom. Za razliku od kontrolnih ćelija, kod kojih KG pokazuje perinukleusnu lokalizaciju, kod ozračenih ćelija se zapaža i njegova submembranska lokalizacija (**Slika 20D**). Na **Slici 20D** se mogu uočiti i duboki uvrati (invaginacije) nukleusnog ovoja koji svedoče o brzom deobu ćelija i dovode do stvaranja nukleusnih pseudoinkluzija. Na mikrografijama ćelija koje su ozračene sa 2 Gy mogu se uočiti i polja glikogena, lipidna tela i brojne sitne vezikule.



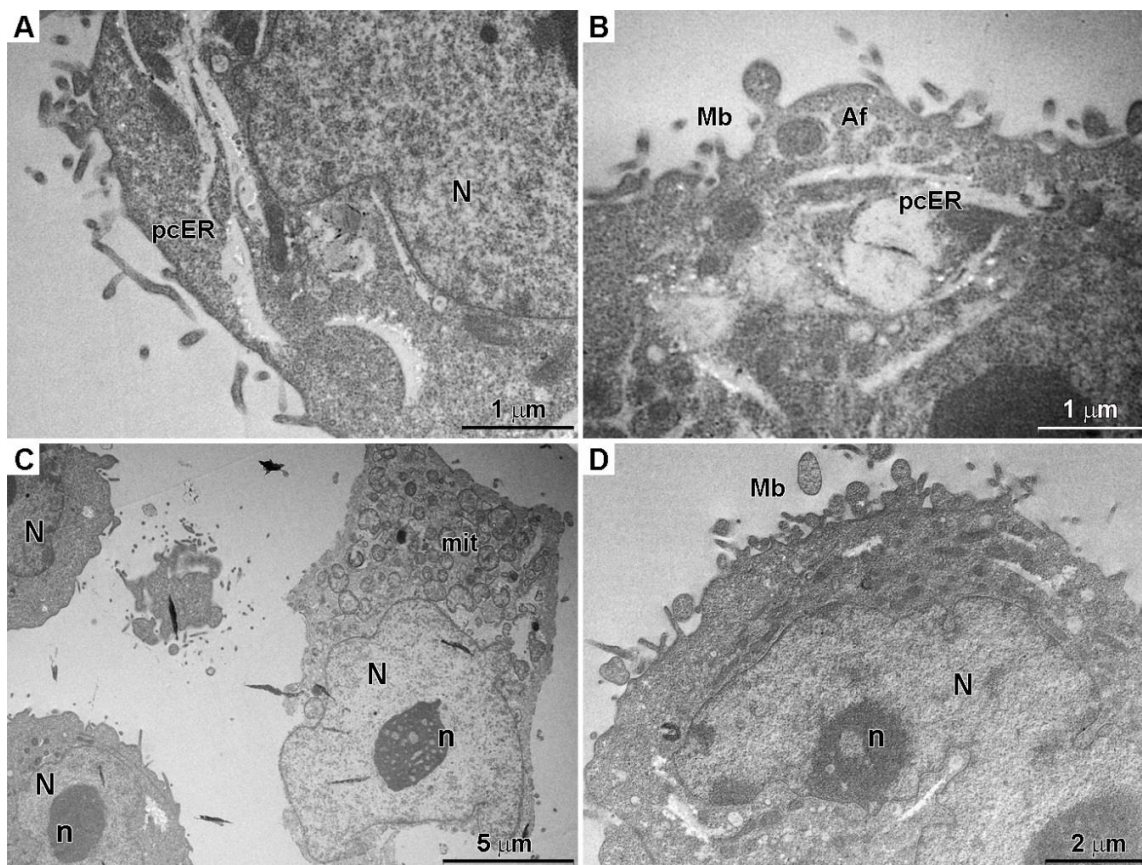
Slika 20. Ultrastrukturne promene CRL-5876 ćelija 72 h nakon tretmana γ -zračenjem. Primenjena doza zračenja je bila 2 Gy. **N** - nukleus; **n** - nukleolus; **mit** - mitohondrije; **KG** - Kompleks Goldži; **Liz** - lizozomi; **grER** - granulirani endoplazmin retikulum; **Lt** - lipidna tela; **Af** - autofagozomi; **GI** - glikogen; **ni** - nukleusne inkluzije; **um** - uvrati membrane nukleusa; **sv**-sitne vezikule. Uveličanje: 19500 x (A), 19500 x (B), 19500 x (C); 8800 x (D).

Ozračivanje ćelija sa 8 Gy je dovelo do novih promena na mitohondrijama, tako da su, za razliku od ćelija koje su ozračene nižom dozom, mitohondrije ovih ćelija svetle, jako nabubrele sa izraženom kristolizom (**Slika 21**). Pored toga, autofagozomi ovih ćelija su krupniji, zahvataju veće delove citoplazme sa oštećenim organelama, uključujući i poliribosome koji su grupisani u strukture nalik rozetama (**Slika 21D**). Na **Slici 21A** primećuje se i autofagozomalna membrana, koja najverovatnije vodi poreklo od jako proširenih cisterni ER, a koje su pokazatelj postojanja stresa ER. Osim navedenog, na **Slici 21** se mogu uočiti i brojnija i krupnija lipidna tela kako u odnosu na kontrolne tako i u odnosu na ćelije koje su ozračene dozom od 2 Gy.



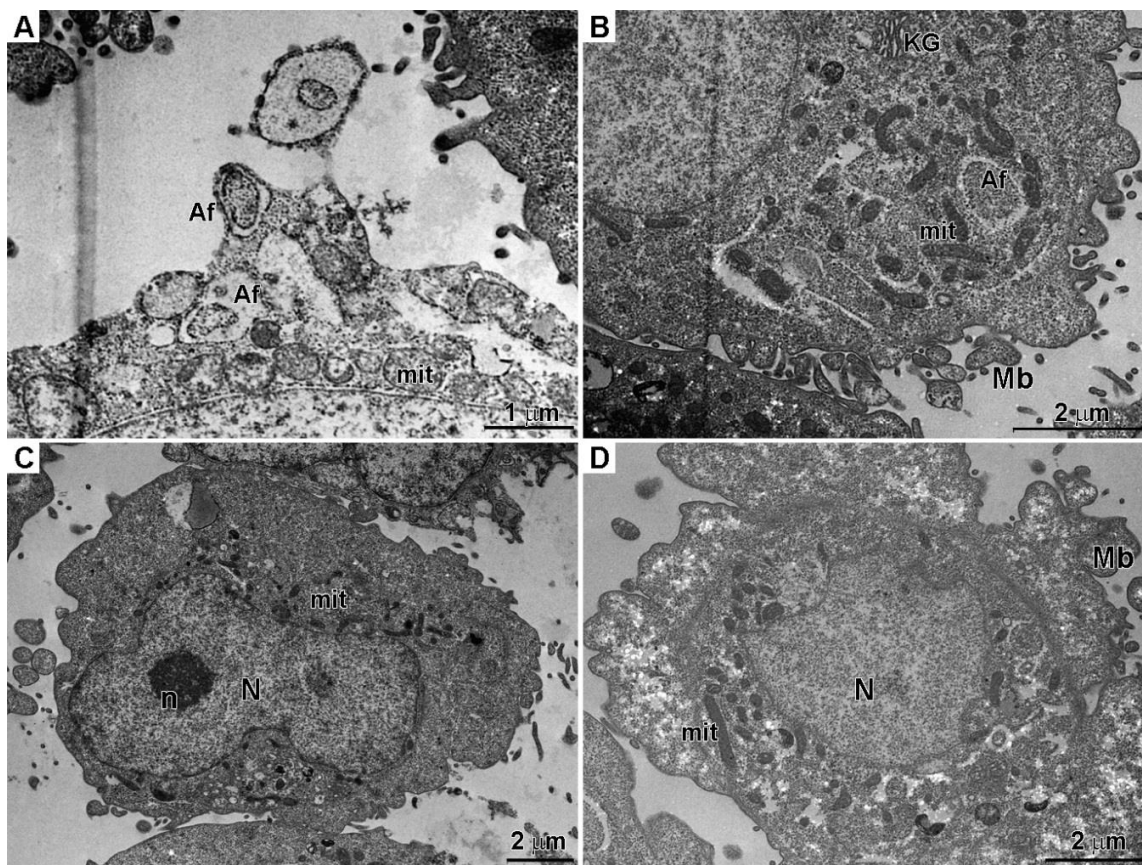
Slika 21. Ultrastrukturne promene CRL-5876 ćelija 72 h nakon tretmana γ -zračenjem. Primenjena doza zračenja je bila 8 Gy. **Lt** - lipidna tela; **pcER** – proširene cisterne endoplazminog retikuluma; **mit** - mitohondrije; **rib** - ribozomi; **Af** - autofagozomi; Uveličanje: 19500 x (A), 19500 x (B), 19500 x (C); 8800 x (D).

Kada je u pitanju tretman CRL-5876 ćelija erlotinibom, na **Slici 22A** i **22B** se primećuje da ćelije tretirane 5 μ M erlotinibom takođe pokazuju znake stresa ER. Autofagozomi su takođe uočljivi ali su sitniji i u manjem broju nego kod ozračenih ćelija (**Slika 22B**). Najupadljivija karakteristika ćelija koje su tretirane erlotinibom je „baloniranje” i „pupljenje” ćelijske membrane (Mb) (**Slika 22**). Obe pojave koje su karakteristične za proces apoptoze. Takođe, dolazi i do piknoze nukleusa (**Slika 22C**), dok se na **Slici 22D** može zapaziti i proces njegove fragmentacije. Očuvana nukleusna morfologija kao i veliki broj jako nabubrelih mitohondrija, koji se mogu videti na **Slici 22C**, upućuju i na prisustvo sekundarne nekroze kod ćelija pod ovim tretmanom.



Slika 22. Ultrastrukturne promene CRL-5876 ćelija 72 h nakon tretmana erlotinibom. Primenjen je 5 μ M erlotinib. **N** - nukleus; **n** - nukleolus; **pcER** – proširene cisterne endoplazminog retikuluma; **mit** - mitohondrije; **rib** - ribozomi; **Lt** - lipidna tela; **Af** - autofagozomi; **Mb** – baloniranje plazmine membrane („membrane blebbing“). Uveličanje: 15000 x (**A**), 19500 x (**B**), 4400 x (**C**); 8800 x (**D**).

Na **Slici 23** su prikazane ultrastrukturne promene ćelija do kojih je došlo primenom 25 μ M erlotiniba. Na ovim mikrografijama može se uočiti da ćelije menjaju oblik u odnosu na kontrolne, i da te promene ukazuju na apoptotski tip ćelijske smrti. Naime, uočava se baloniranje ćelijske membrane i stvaranje apoptotskih tela. Takođe, prisustvo autofagozoma i heterogene populacije mitohondrija u kojoj se mogu uočiti i filamentozne i okruglaste mitohondrije, kao i tamne i svetle, ukazuju na prisustvo različitih tipova ćelijske smrti CRL-5876 ćelija izloženih ovom tretmanu.



Slika 23. Ultrastrukturne promene CRL-5876 ćelija 72 h nakon tretmana erlotinibom. Primenjen je 25 μ M erlotinib. **N** - nukleus; **n** - nukleolus; **mit** - mitohondrije; **Af** - autofagozomi; **Mb** – baloniranje plazmine membrane („membrane blebbing“). Uveličanje: 15000 x (A), 8800 x (B), 5600 x (C); 8800 x (D).

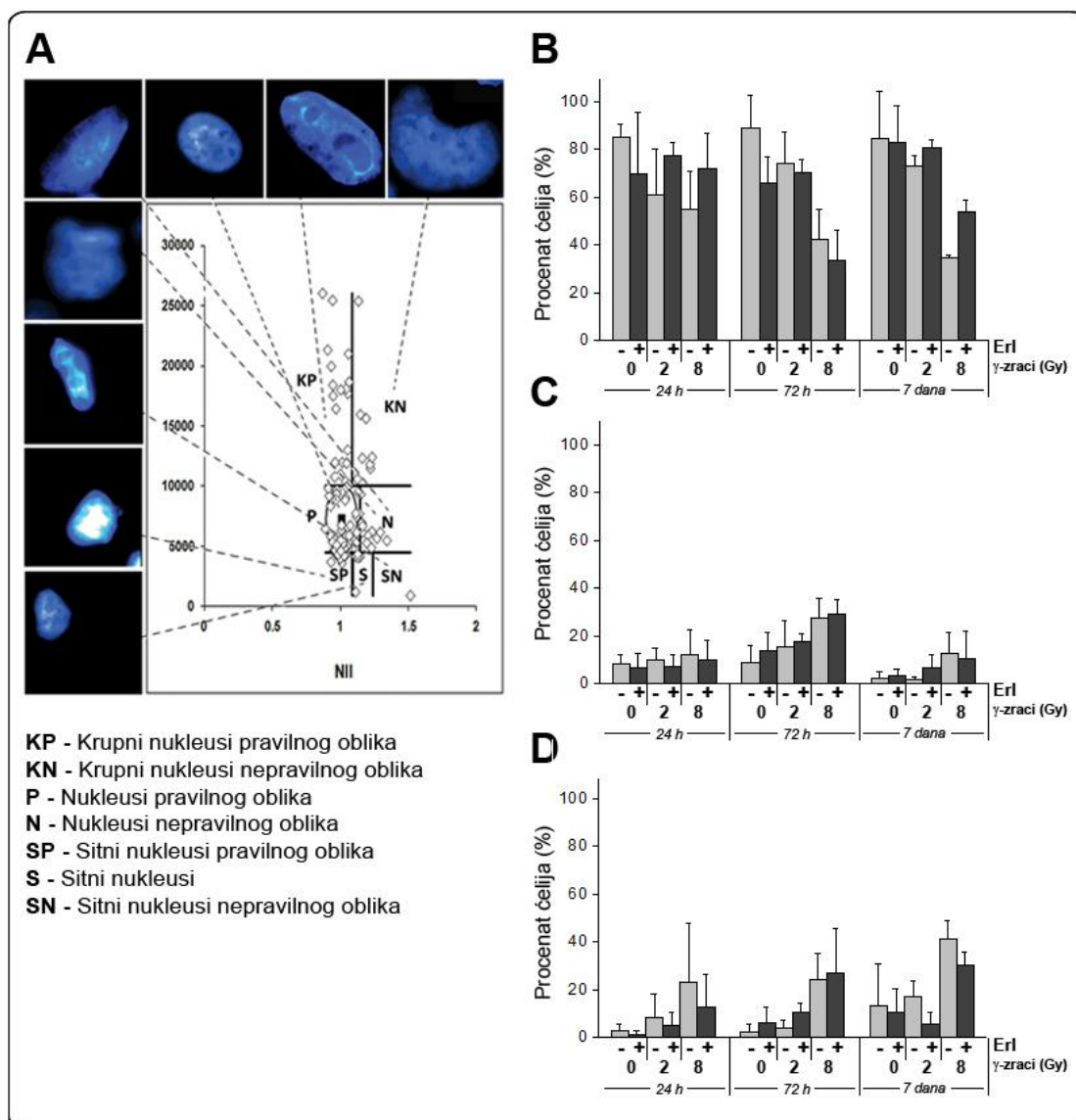
4.10 Morfometrijska analiza nukleusa CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja i erlotiniba

Morfometrijskom analizom nukleusa (eng. *nuclear morphometric analysis*, NMA) moguće je u analiziranoj populaciji ćelija identifikovati deo ćelija koje se nalaze u procesu senescencije, apoptoze ili sadrže nukleusne nepravilnosti [Filippi-Chiela *et al.*, 2012]. Analizom morfologije nukleusa se za analiziranu populaciju ćelija dobija pregled raspodele nukleusa u sedam ćelijskih kategorija, koje su formirane na osnovu veličine i indeksa nepravilnosti nukleusa (eng. *nuclear irregularity index* (NII)) (Slika 24A). Prema ovoj metodi, pod normalnom, odnosno pravilnom morfologijom smatra se dominantna

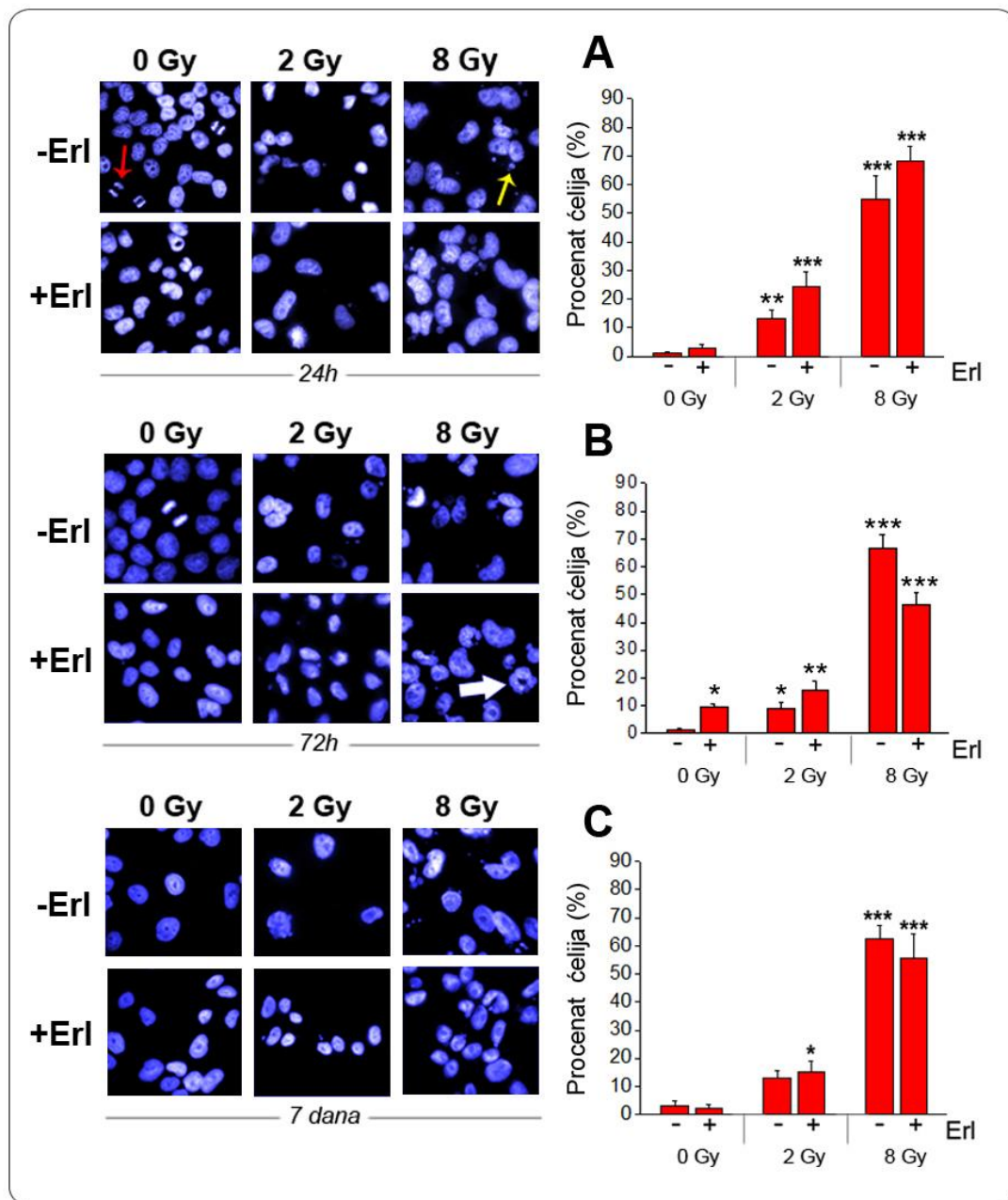
morfologija nukleusa u kontrolnim, tj. netretiranim uzorcima. Nukleusi nepravilnog oblika smatraju se pokazateljem mitotske katastrofe, dok povećanje nukleusa ukazuje na proces senescencije. Primer analize raspodele nukleusa, 72 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ - zračenjem i erlotinibom prikazan je na **Slici 24A**.

Prema dobijenim rezultatima, pojedinačni tretmani erlotinibom ili zračenjem, kao i njihova kombinovana primena, u sve tri vremenske tačke pokazuju opadanje broja nukleusa normalne, tj. pravilne morfologije (**Slika 24B**). Takođe, kod ozračenih ćelija, primećuje se dozno-zavistan pad broja pravilnih nukleusa, dok je kod ćelija kod kojih je primenjen kombinovani tretman sa erlotinibom, veće smanjenje normalnih nukleusa u odnosu na samo zračenje zapaženo 72 h nakon tretmana. Na **Slici 24C** su objedinjeni svi nukleusi nepravilne morfologije, koji su detektovani nakon primenjenih tretmana. Utvrđeno je da broj nepravilnih nukleusa raste sa primenjenom dozom zračenja. Takođe, kod ćelija pretretiranih erlotinibom, u vremenskoj tački od 72 h detektovan je veći broj nukleusa nepravilne morfologije u odnosu na samo zračenje. Zračenje je takođe dovelo do povećanja broja krupnih nukleusa. U ovoj vremenskoj tački kombinovani tretmani sa erlotinibom su proizveli više krupnih nukleusa nego samo zračenje (**Slika 24D**).

Pored morfometrijske analize nukleusa, određen je i procenat ćelija kod kojih je zapažena fragmentacija nukleusa, bilo u vidu prisustva multinukleusnih ćelija ili ćelija sa mikronukleusima (**Slika 25**). Sam erlotinib ne dovodi do značajnog broja fragmentisanih nukleusa. Statistički značajno dozno-zavisno povećanje broja ćelija sa fragmentisanim nukleusima u odnosu na kontrolu primećeno je i kod uzoraka tretiranih zračenjem, kao i zračenjem u kombinaciji sa erlotinibom, i to u svim analiziranim vremenskim tačkama ($p < 0.01$). Ipak, kombinovani tretmani nisu doveli do statistički značajnog povećanja broja fragmentisanih nukleusa u odnosu na samo zračenje (**Slika 25A, B, C**).



Slika 24. Morfometrijska analiza nukleusa CRL-5876 ćelija nakon tretmana. Raspodela nukleusa 72 h nakon tretmana (A) i grafički prikaz pravilnih (B), nepravilnih (C) i krupnih pravilnih nukleusa (D) 24 h, 72 h i 7 dana nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom. Primjenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Rezultati prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).



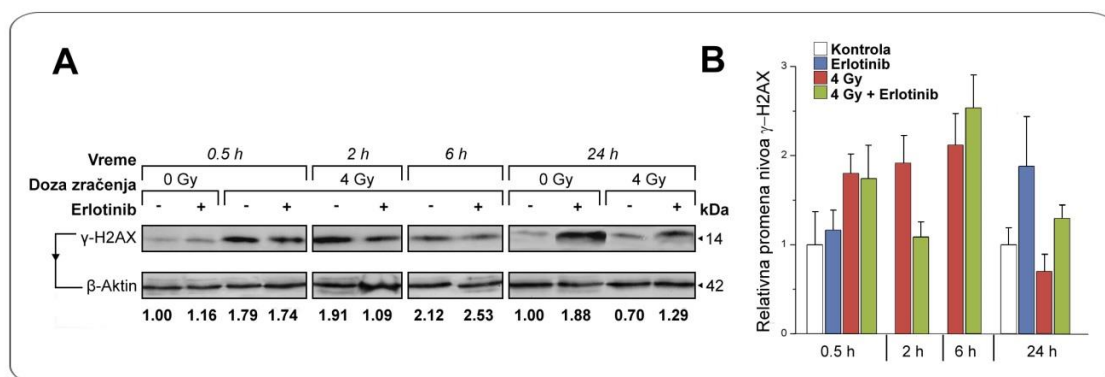
Slika 25. Kvantifikacija CRL-5876 ćelija sa fragmentisanim nukleusima 24 h (A), 72 h (B) i 7 dana (C) nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem (2 i 8 Gy) i erlotinibom (2 μ M). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška). Primeri nukleusa u mitozu označeni su crvenom, mikronukleusi žutom, a multinukleusne ćelije belom strelicom. Nukleusi su vizuelizovani DAPI bojom. Mikroskop: Zeiss-Axioplan 2. Uveličanje: 100x.

* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu, * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$

4.11 Analiza ekspresije proteina u lizatima CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja i erlotiniba

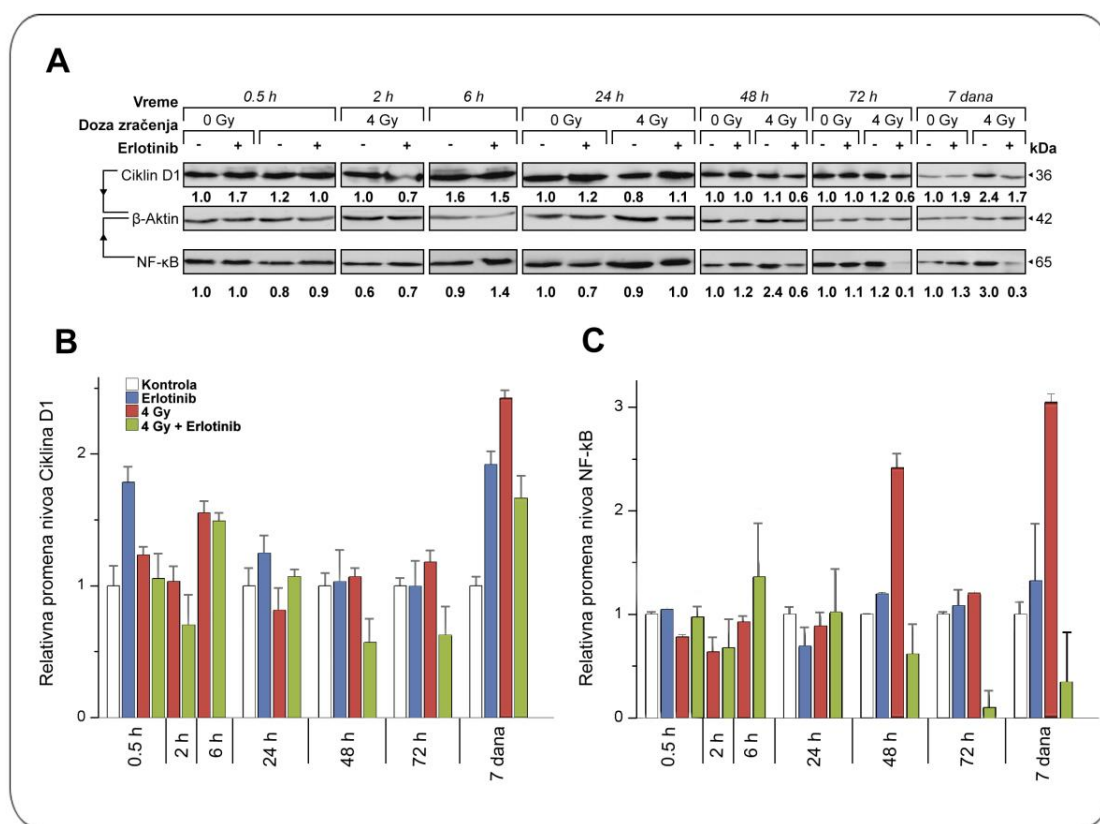
Da bi potvrdili i upotpunili dobijene rezultate, analiziran je nivo ekspresije γ -H2AX, ciklina D1, NF- κ B, Bax, Bcl-2, p21, p53 i LC3-I/II proteina u CRL-5876 ćelijama nakon primenjenih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom. S obzirom na činjenicu da je analizom bio obuhvaćen širok spektar vremenskih tačaka počevši od 0.5 h pa do 7 dana, za tretman zračenjem je, na osnovu prethodnih rezultata, izabrana doza od 4 Gy. Ovo je optimalna doza koja može da izazove promene na nivou ekspresije proteina koje su i u kratkim vremenskim intervalima merljive imunoblot metodom.

Analiza ekspresije γ -H2AX nakon izlaganja pojedinačnim i kombinovanim tretmanima γ -zračenjem i erlotinibom predstavljena je na **Slici 26A**. Pokazano je da oba agensa, kako samostalno tako i u kombinaciji dovode do povećanja nivoa γ -H2AX u odnosu na kontrolne uzorke, ako se izuzme tretman zračenjem u vremenskoj tački od 24 h (**Slika 26B**).



Slika 26. Imunoblot analiza lizata CRL-5876 ćelija korišćenjem anti- γ -H2AX antitela (**A**) i grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije γ -H2AX 0.5, 2, 6 i 24 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zracima i erlotinibom (**B**). Primenjena doza zračenja je 4 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Antitelo na β -aktin je korišćeno kao interna kontrola koncentracije proteina u uzorcima. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su normalizovani u odnosu na kontrolne uzorke i prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

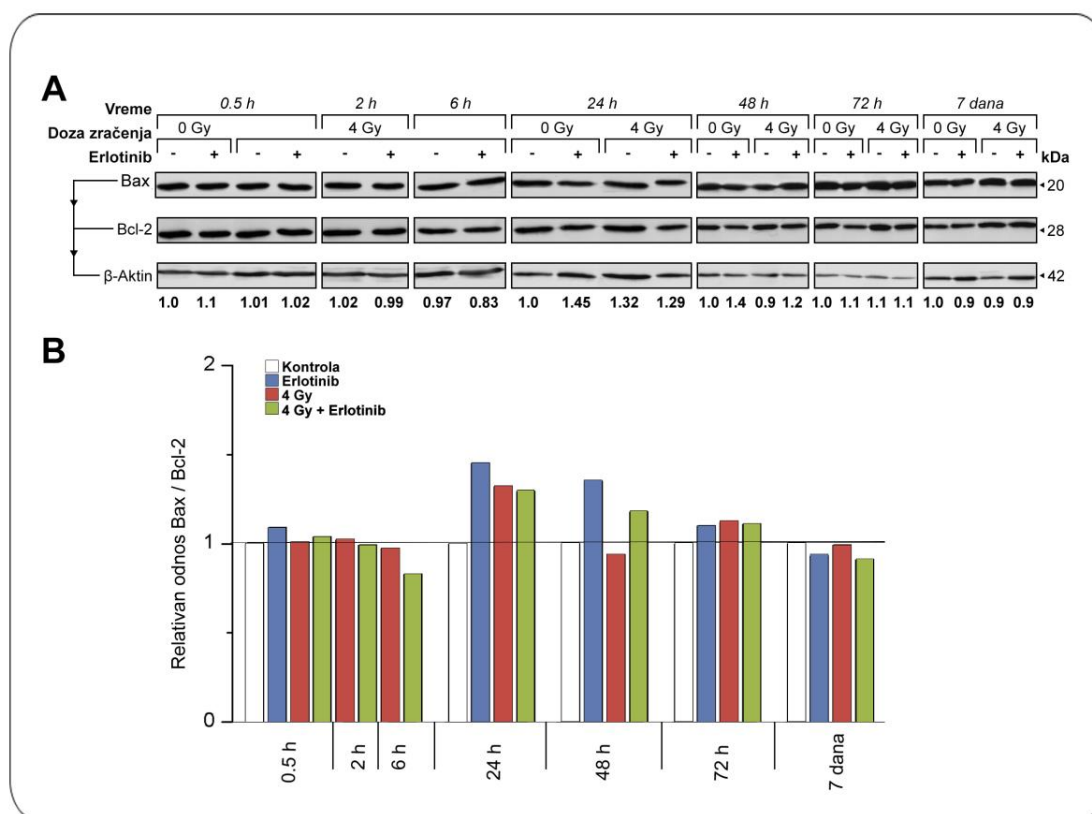
Promene nivoa ekspresije ciklina D1 i NF- κ B proteina prikazane su na **Slici 27A**. Nivo ciklina D1 u uzorcima koji su tretirani erlotinibom je 1.9 puta veći u odnosu na kontrolu i zapažen je 7 dana nakon tretmana (**Slika 27B**). Najveća promena nivoa ciklina D1 kod ozračenih i kombinovano tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolne primećena je takođe 7 dana nakon tretmana gde je on pokazao 2.4, odnosno 1.7 puta veće vrednosti (**Slika 27B**).



Slika 27. Imunoblot analiza lizata CRL-5876 ćelija korišćenjem anti-ciklin D1 i anti-NF- κ B antitela (**A**) i grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije ciklin D1 i NF- κ B 0.5, 2, 6, 24, 48, 72 h i 7 dana nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom (**B**) i (**C**). Primenjena doza zračenja je 4 Gy, a koncentracija erlotiniba je 2 μ M. Antitelo na β -aktin je korišćeno kao interna kontrola koncentracije proteina u uzorcima. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su normalizovani u odnosu na kontrolne uzorke i prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

Nivo ekspresije NF- κ B proteina je značajnije promenjen kod ozračenih uzoraka u vremenskim tačkama 48 h i 7 dana, i to 2.4 i 3 puta veće vrednosti u odnosu na kontrolu. Kod kombinovanih tretmana zabeležen je niži nivo NF- κ B proteina u odnosu na vrednosti u kontroli (**Slika 27C**).

Odnos ekspresije proapoptotskog Bax proteina i antiapoptotskog Bcl-2 proteina (Bax/Bcl-2) se u procesu apoptoze povećava [Salakou *et al.*, 2007]. Analiza odnosa ekspresije ovih proteina data je na **Slici 28A**.

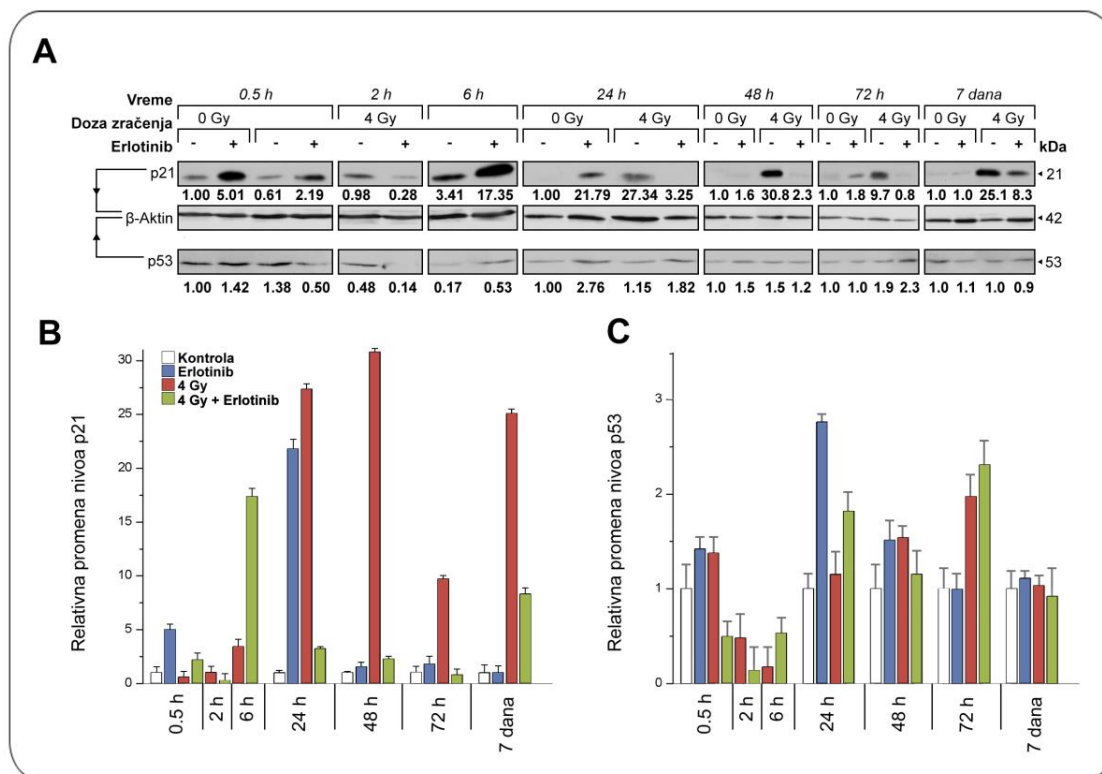


Slika 28. Imunoblot analiza lizata CRL-5876 ćelija korišćenjem anti-Bax i anti-Bcl-2 antitela (**A**) i grafički prikaz denzitometrijske analize odnosa ekspresije Bax i Bcl-2 0.5, 2, 6, 24, 48, 72 h i 7 dana nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom (**B**). Primenjena je doza zračenja od 4 Gy, a koncentracija erlotiniba bila je 2 μ M. Antitelo na β -aktin je korišćeno kao interna kontrola koncentracije proteina u uzorcima.

Primenjeni tretmani su značajnije povećali Bax/Bcl-2 u odnosu na kontrolu samo u vremenskim tačkama 24 i 48 h. Nakon 24 h, tretman erlotinibom povećao je Bax/Bcl-2 u odnosu na kontrolu 1.45, tretman zračenjem 1.32, a kombinovani tretman 1.29 puta. Nešto slabije povećanje Bax/Bcl-2 primećeno je 48 h nakon tretmana erlotinibom, tj. kombinovanim tretmanom erlotinibom i zračenjem i iznosilo je 1.4, odnosno 1.2 puta u odnosu na kontrolne uzorke (**Slika 28B**).

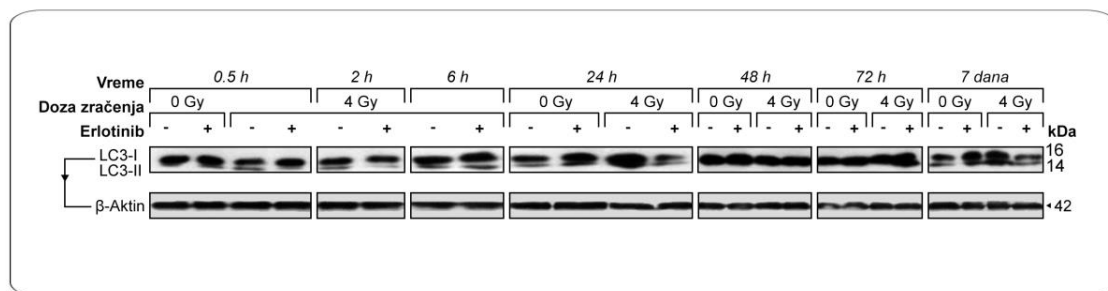
Analiza ekspresije p21 i p53 proteina prikazana je na **Slici 29A**. Rezultati pokazuju da su svi tretmani doveli do porasta nivoa ekspresije p21 proteina, osim kod ozračenih uzoraka u vremenskoj tački od 0.5 h i uzoraka na koje je primenjen kombinovani tretman u vremenskoj tački od 2 h (**Slika 29B**). Najupadljivije povećanje nivoa ekspresije p21 proteina izazvano je zračenjem. U vremenskoj tački 48 h ekspresija p21 je čak ~30 puta veća u odnosu na kontrolu. Sam erlotinib je doveo do povećanja ekspresije p21 24 h nakon aplikovanja, a dobijene vrednosti su ~ 22 puta veće u odnosu na kontrolu. Kombinovani tretmani, na dužim vremenskim tačkama pokazuju manji efekat na ekspresiju p21 proteina u odnosu na samo zračenje.

Promene na nivou ekspresije p53 proteina ilustrovane su na **Slici 29C**. Tretman erlotinibom je najviše povećao nivo p53 proteina 24 h nakon tretmana (2.76 puta u odnosu na kontrolu). U ozračenim i kombinovano tretiranim uzorcima najveći porast nivoa p53 zabeležen je 72 h nakon tretmana (1.97, odnosno 2.31 put u odnosu na kontrolu).



Slika 29. Imunoblot analiza lizata CRL-5876 ćelija korišćenjem anti-p21 i anti-p53 antitela (A) i grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije p21 i p53 0.5, 2, 6, 24, 48, 72 h i 7 dana nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem i erlotinibom (B) i (C). Primenjena je doza zračenja od 4 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Antitelo na β -aktin je korišćeno kao interna kontrola koncentracije proteina u uzorcima. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su normalizovani u odnosu na kontrolne uzorke i prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

Jedan od pokazatelja procesa autofagije je konverzija LC3-I u LC3-II. Rezultati imunoblot analize u kojoj su praćeni ovi parametri je prikazana na **Slici 30**. Rezultati pokazuju da se indukcija autofagije dešava pod uticajem kako pojedinačnih tako i kombinovanih tretmana već 0.5 h nakon njihove primene. Takođe, počev od vremenske tačke 24 h, LC3-II se detektuje i u kontrolnim uzorcima **Slika 30**.

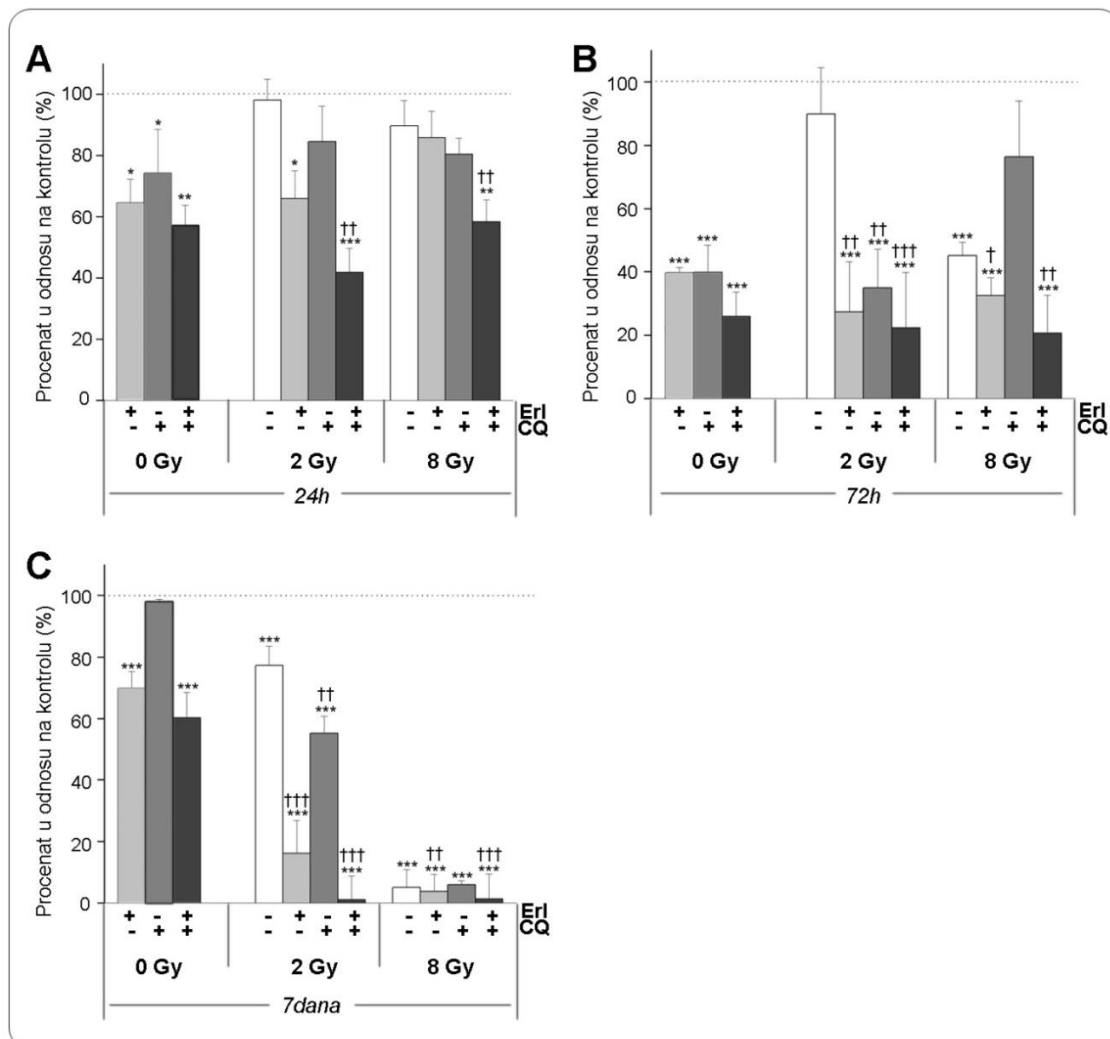


Slika 30. Reprezentativni imunoblot analize ćelijskih lizata CRL-5876 ćelija dobijen korišćenjem anti-LC3 antitela 0.5, 2, 6, 24, 48, 72 h i 7 dana nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zracima i erlotinibom. Primenjena je doza zračenja od 4 Gy, a koncentracija erlotiniba 2 μ M. Antitelo na β -aktin je korišćeno kao interna kontrola koncentracije proteina u uzorcima.

4.12 Analiza tipova ćelijske smrti CRL-5876 ćelija nakon γ -zračenja, erlotiniba i hlorokina

Na osnovu rezultata koji su pokazali da je erlotinib pojačao dozno zavisnu inaktivaciju CRL-5876 ćelija izazvanu zračenjem (poglavlja 4.2, 4.3 i 4.4), dalja istraživanja su usmerena na karakterizaciju tipova ćelijske smrti koji leže u osnovi odgovora CRL-5876 ćelija na ove tretmane. Takođe, na osnovu morfoloških i ultrastrukturnih promena koje su detektovane (poglavlja 4.8, 4.9, i 4.10), otvorio se novi pravac istraživanja čiji je cilj ispitivanje neapoptotskih tipova ćelijske smrti, u prvom redu autofagijske ćelijske smrti. Zbog toga je u naredne eksperimente uveden hlorokin kao agens koji inhibira proces autofagije. Cilj ispitivanja je analiza uloge autofagije kao i njene supresije na ostale tipove ćelijske smrti.

Pre nego što se pristupilo detekciji različitih tipova ćelijske smrti koji nastaju delovanjem γ -zračenja i/ili erlotiniba, analizirano je dejstvo hlorokina. Hlorokin je primenjen samostalno ili u kombinaciji sa agensima koji se koriste u ovom radu, i praćen je uticaj na vijabilnost CRL-5876 ćelija. Na osnovu literaturnih podataka, odabrana je koncentracija hlorokina od 5 μ M [Newman *et al.*, 2012]. Vremenske tačke u kojima je analiziran efekat agenasa bile su 24 h, 72 h i 7 dana posle tretmana (**Slika 31**).



Slika 31. Vijabilnost CRL-5876 ćelija 24 h (A), 72 h (B) i 7 dana (C) nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem, erlotinibom (Erl) i hlorokinom (CQ) određena SRB testom. Primenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, koncentracija erlotiniba 2 μ M, a koncentracija hlorokina 5 μ M. Dobijene vrednosti su izražene kao procenat u odnosu na kontrolu. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje

*, †, - $0.01 < p < 0.05$; **, ††, - $0.001 < p < 0.01$; ***, †††, - $p < 0.001$

Pojedinačni tretmani erlotinibom ili hlorokinom, kao i njihova kombinacija, značajnije smanjuju vijabilnost ćelija 24 h nakon primene, u odnosu na efekat samog zračenja (Slika 31A). Najveća inhibicija rasta u ovoj vremenskoj tački je ostvarena

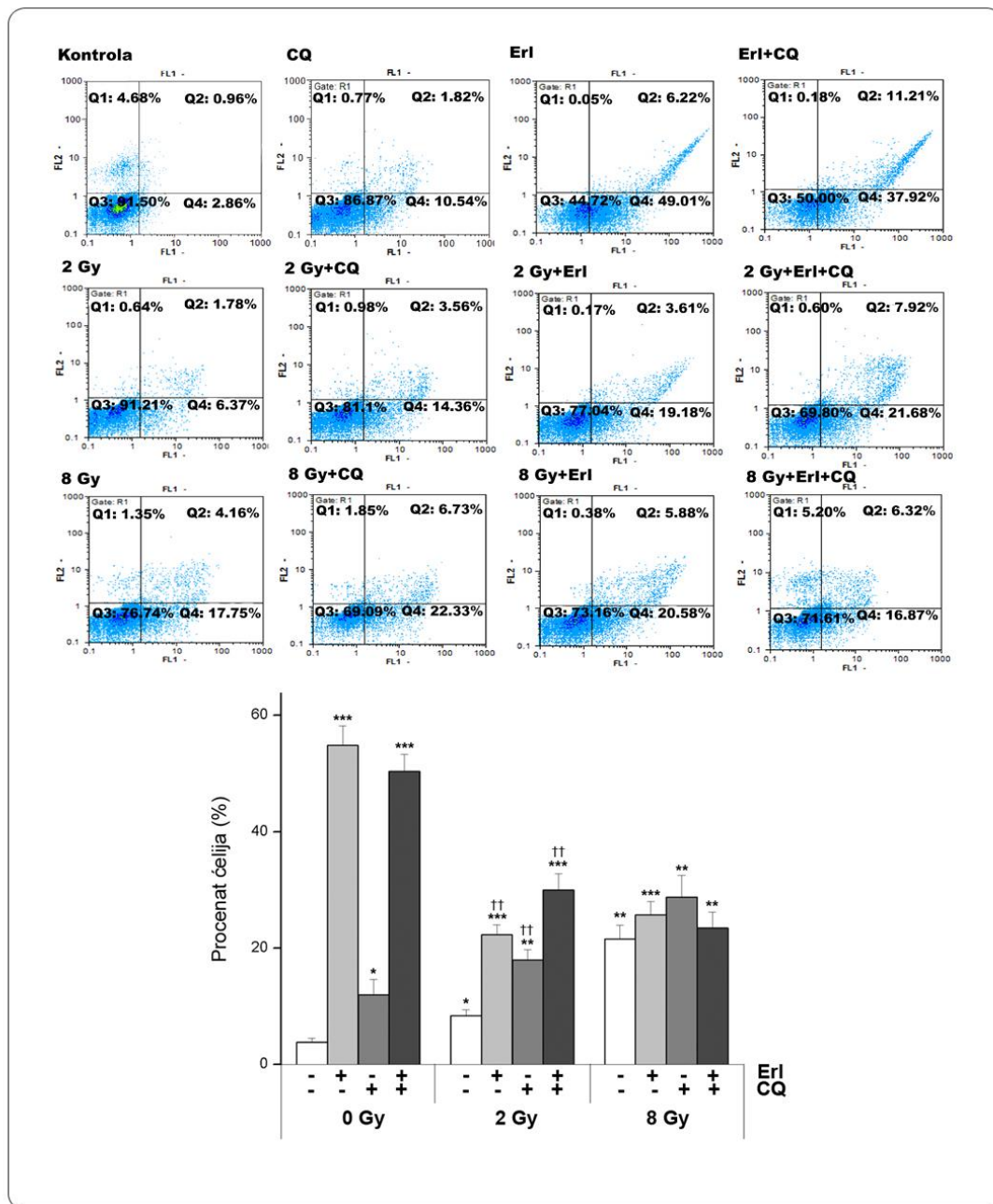
primenom sva tri agensa, tj. kombinacijom erlotiniba i hlorokina sa zračenjem, i to kako u odnosu na kontrolu tako i u odnosu na efekte samog zračenja ($p < 0.01$).

Maksimalni efekat erlotiniba i hlorokina, kao i njihove kombinacije uočen je 72 h nakon tretmana (**Slika 31B**). Svi primenjeni tretmani dovode do daljeg smanjenja ćelijske vijabilnosti u odnosu na rezultate dobijene posle 24 h. Međutim, sedam dana nakon tretmana, ćelije koje su tretirane agensima bez ozračivanja, pokazale su trend oporavka koji se ogleda u povećanju ćelijske vijabilnosti u odnosu na vrednosti dobijene posle 72 h (**Slika 31C**). Ipak, u ovoj vremenskoj tački je upadljiva razlika između ćelija koje su ozračivane sa 2 i 8 Gy, u prisustvu ili bez drugih ispitivanih agenasa. Vijabilnost ćelija je redukovana, tako da posle ozračivanja sa 8 Gy ne prelazi 6%. Izuzev ćelija koje su tretirane samo hlorokinom, ostali uzorci pokazuju smanjenje ćelijske vijabilnosti u odnosu na vrednosti za vremenske tačke 24 i 72 h.

Hlorokin je u ovom eksperimentu pokazao maksimalni efekat 72 h od primene, dok se njegov efekat skoro u potpunosti gubi nakon sedam dana. Međutim, u svim vremenskim tačkama zapaženo je njegovo radiosenzitizirajuće dejstvo, iako je ono manje u odnosu na efekat erlotiniba. Takođe, kada su erlotinib i hlorokin zajedno primenjeni sa ozračivanjem ćelija, njihova vijabilnost je smanjena u većoj meri nego kada su ovi agensi pojedinačno kombinovani sa zračenjem.

4.12.1 Apoptoza

Rezultati analize pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem, erlotinibom i hlorokinom na indukciju apoptoze CRL-5876 ćelija su prikazani na **Slici 32**. Metodom protočne citofluorimetrije u tretiranim uzorcima je detektovano prisustvo tri grupacije ćelija: ranoapoptotske, kasnoapoptotske i nekrotične. Vremenska tačka koja je odabrana kao optimalna za detekciju apoptoze CRL-5876 ćelija je 48 h nakon tretmana.



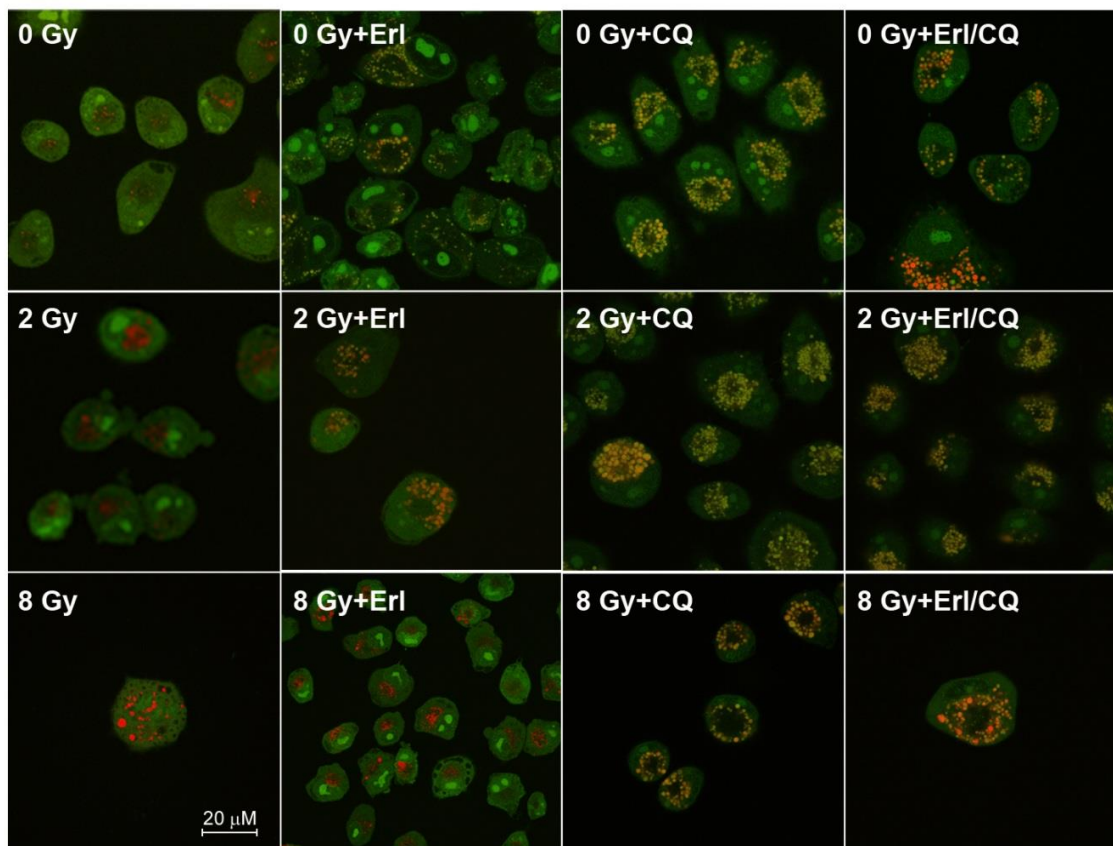
Slika 32. Kvantifikacija apoptoze CRL-5876 ćelija dobijena metodom protočne citofluorimetrije 48 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana: ozračivanje dozama od 2 ili 8 Gy γ -zračenjem, i tretmani 2 μ M erlotinibom (Erl) i 5 μ M hlorokinom (CQ). Dobijene vrednosti su izražene kao procenat apoptotičnih ćelija u uzorku. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška). * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje; *, †, - 0.01 < p < 0.05; **, ††, - 0.001 < p < 0.01; ***, †††, - p < 0.001

Dobijeni rezultati pokazuju da posle 48 h svi tretmani dovode do statistički značajnog povećanja broja apoptotskih ćelija. Erlotinib ima najveći efekat na indukciju apoptoze CRL-5876 ćelija (~55%), dok je najmanje apoptotskih ćelija nađeno kod uzoraka koji su ozračeni dozom od 2 Gy (~8%) (**Slika 32**). Tretman hlorokinom dovodi do nastanka apoptoze kod ~12% ćelija. Taj broj se značajno povećava kada su erlotinib i hlorokin aplikovani u kombinaciji (~50% apoptotskih ćelija). Dodatak erlotiniba i hlorokina ćelijama koje su ozračene dozom od 2 Gy dovodi do statistički značajnog povećanja apoptoze ($p < 0.01$), u odnosu na samo zračenje. Veća indukcija apoptoze postignuta je primenom samog erlotiniba (~23%) nego primenom samog hlorokina (~18%), dok je najveći efekat dobijen primenom sva tri agensa (~30%). Broj apoptotskih ćelija u uzorcima koji su ozračeni dozom od 8 Gy bio je veći nego kod uzoraka koji su ozračeni dozom od 2 Gy i iznosio je ~ 22%. Međutim, dodavanje erlotiniba i hlorokina ćelijama ozračenim sa 8 Gy nije proizvelo statistički značajne razlike u indukciji apoptoze (**Slika 32**).

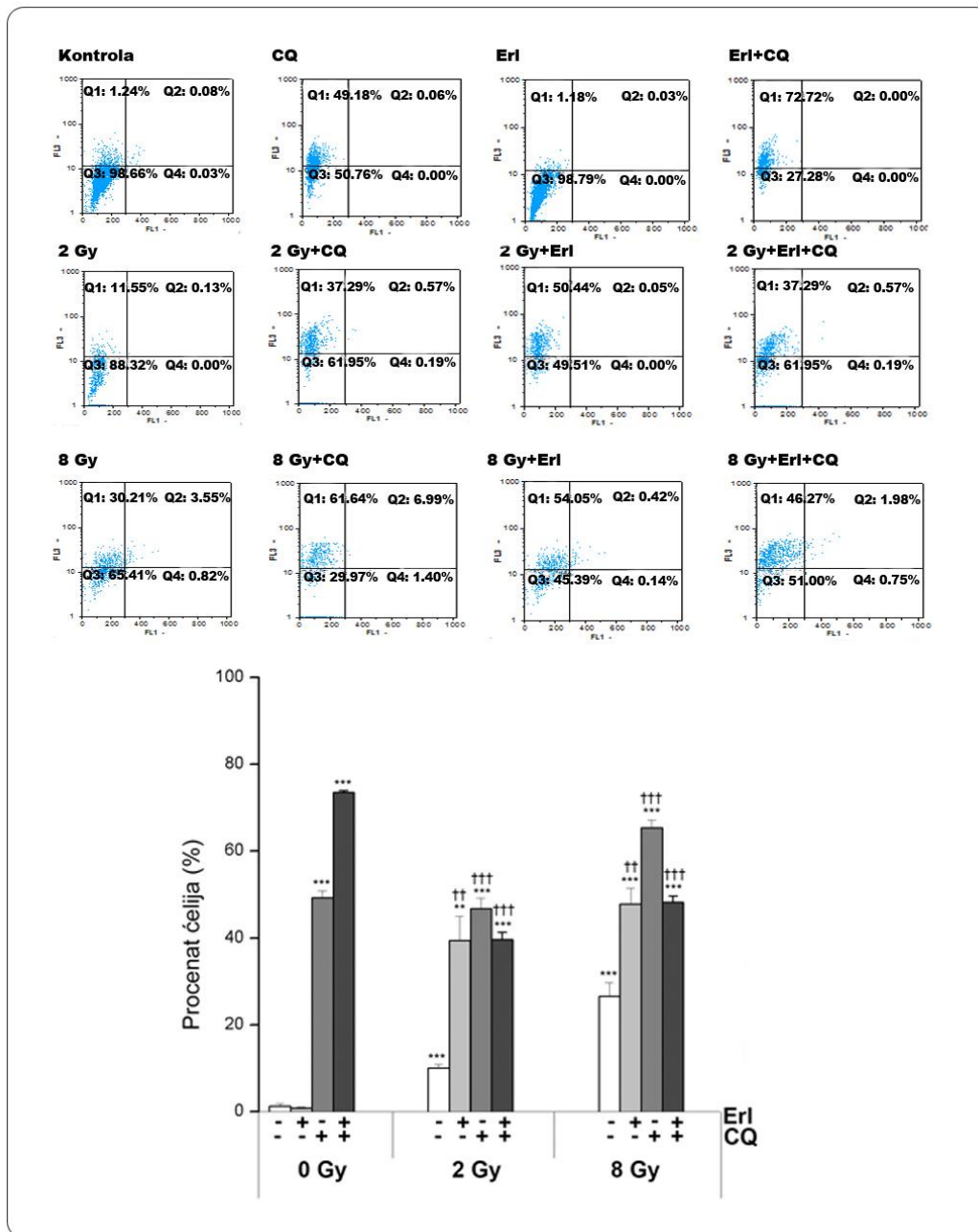
4.12.2 Indukcija AVO

Jedna od pojava karakterističnih za proces autofagije je stvaranje kiselih vezikula (eng. *acido vesicular organelles*, AVO). Za detekciju AVO korišćena je boja akridin oranž, koja emituje crvenu fluorescenciju u kiselim vezikulama, dok fluorescira zeleno kada se nađe u citoplazmi i nukleusu. Reprezentativne mikrografije CRL-5876 ćelija obojenih akridin oranžom 72 h nakon pojedinačnih tretmana zračenjem, erlotinibom i hlorokinom, kao i njihovim kombinacijama, prikazane su na **Slici 33**. Dobijeni rezultati pokazuju da svi primenjeni tretmani dovode do akumulacije AVO u citoplazmi ćelija. Najveći broj AVO zapažen je kod ćelija koje su tretirane samim hlorokinom ili kombinacijom agenasa koja uključuje hlorokin.

Reprezentativni zapis kvantifikacije AVO CRL-5876 ćelija dobijen metodom protočne citometrije, 72 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zracima, erlotinibom i hlorokinom prikazan je na **Slici 34**.



Slika 33. Mikrografije koje pokazuju prisustvo kiselo-vezikularnih organela (AVO) 72 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana γ -zračenjem, erlotinibom (Erl) i hlorokinom (CQ). Primenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, koncentracija erlotiniba 2 μ M, a koncentracija hlorokina 5 μ M. Akridin oranž bojenje. Mikroskop: Leica TCS SP5 II. Podeok na slici je isti za sve mikrografije i odgovara 20 μ M.



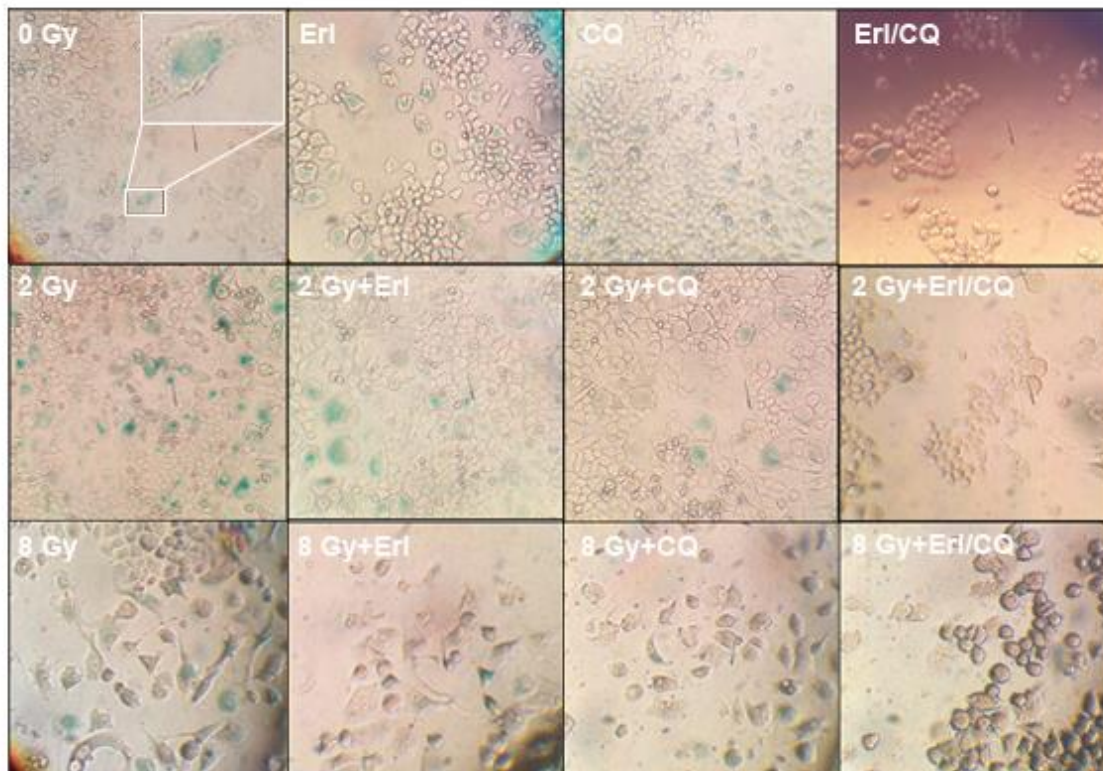
Slika 34. Kvantifikacija kiselo-vezikularnih organela (AVO) metodom protočne citofluorimetrije 72 h nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana 2 i 8 Gy γ -zračenjem, 2 μ M erlotinibom (Erl) i 5 μ M hlorokinom (CQ). FL1-zelena fluorescenca; FL3-crvena fluorescenca. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška). * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje; *, †, - 0.01 < p < 0.05; **, ††, - 0.001 < p < 0.01; ***, †††, - p < 0.001

Dobijeni rezultati pokazali su da erlotinib kada je primenjen samostalno ne dovodi do statistički značajnog povećanja broja ćelija koje sadrže AVO. Za razliku od erlotiniba, prisustvo hlorokina značajno povećava crvenu fluorescenciju ($p < 0.001$), kako u slučaju kada je primenjen pojedinačno, tako i u kombinaciji sa erlotinibom. Zračenje je takođe dovelo do statistički značajnog dozno-zavisnog nagomilavanja AVO u tretiranim ćelijama ($p < 0.001$). Erlotinib kombinovan sa zračenjem statistički značajno povećava prisustvo AVO u odnosu na efekte samog zračenja ($p < 0.01$), ali u manjoj meri u odnosu na kombinaciju hlorokina i zračenja ($p < 0.001$). Primena sva tri agensa dovela je do statistički značajnog povećanja AVO, kako u odnosu na kontrolne ćelije, tako i u odnosu na ćelije kod kojih je primenjen samo tretman zračenjem ($p < 0.001$).

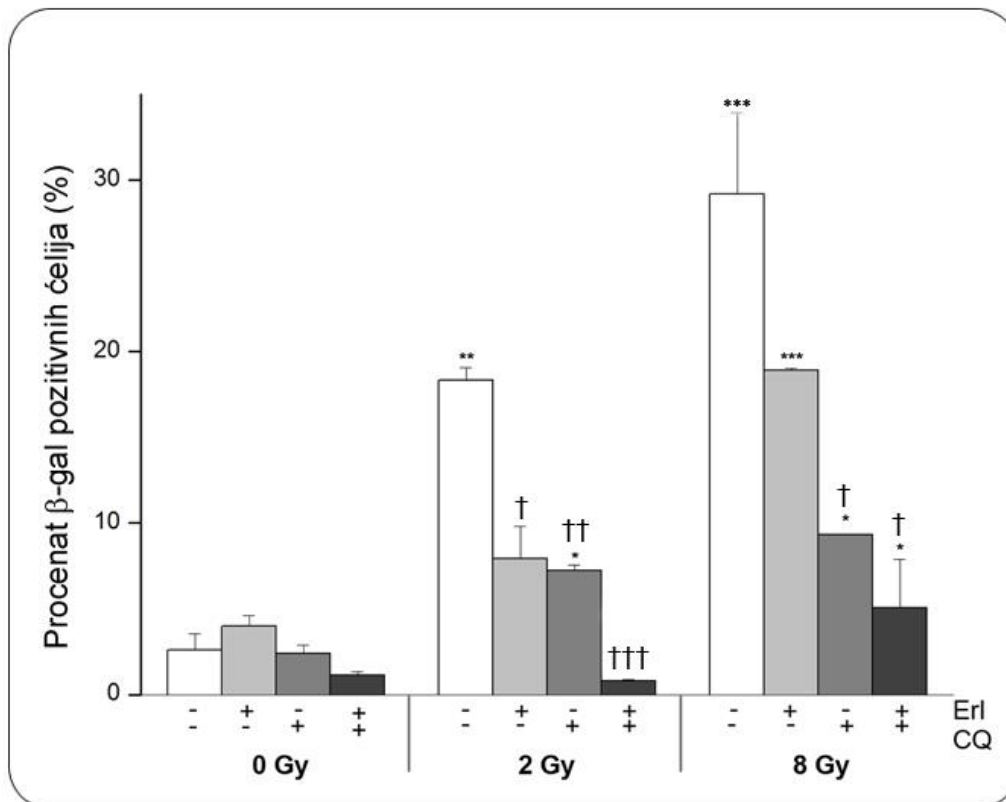
4.12.3 Senescencija

Ispitivanja pojave senescencije rađena su pomoću β -gal eseja, koji omogućava *in situ* detekciju senescentnih ćelija na pripremljenim uzorcima. Senescencija nije zapažena u kraćim vremenskim intervalima do 72 h, već je detektovana 7 dana nakon tretmana. Reprezentativne mikrofotografije koje ilustruju pojavu senescencije u vidu plavo obojenih ćelija su prikazane na **Slici 35**.

Najviše β -gal pozitivnih ćelija uočeno je nakon tretmana zračenjem. Zapažena je jasna zavisnost broja β -gal pozitivnih ćelija od primenjene doze zračenja, tako da je doza od 8 Gy indukovala približno 30% senescentnih ćelija u odnosu na ukupan broj zasejanih ćelija (**Slika 36**). Sam erlotinib neznatno povećava broj senescentnih ćelija u odnosu na kontrolu. U uzorcima koji su osim zračenjem bili tretirani i erlotinibom ili hlorokinom zapažen je viši broj senescentnih ćelija u odnosu na kontrolne ćelije, ali manji broj u odnosu na ćelije koje su tretirane samo zračenjem. Takođe, veći broj senescentnih ćelija pronađen je u uzorcima koji su tretirani kombinacijom zračenja i erlotiniba u odnosu na one koji su izlagani zračenju i hlorokinu. Najmanji broj senescentnih ćelija je pronađen kod trostruko tretiranih ćelija, i ostao je na nivou kontrolnih uzoraka.



Slika 35. Reprezentativne mikrografije senescentnih CRL-5876 ćelija koje su detektovane β -gal esejom 7 dana nakon tretmana γ -zračenjem, erlotinibom (Erl) i hlorokinom (CQ). Primenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, koncentracija erlotiniba 2 μ M, a koncentracija hlorokina 5 μ M. Mikroskop: Carl Zeiss Jena. Uveličanje 20x.



Slika 36. Kvantifikacija senescencije CRL-5876 ćelija 7 dana nakon tretmana γ -zračenjem, erlotinibom (Erl) i hlorokinom (CQ). Primenjene doze zračenja su 2 i 8 Gy, koncentracija erlotiniba 2 μ M, a koncentracija hlorokina 5 μ M. Rezultati dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM (standardna greška).

* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; † - statistička značajnost u odnosu na zračenje.

*, † - $0.01 < p < 0.05$; **, †† - $0.001 < p < 0.01$; ***, ††† - $p < 0.001$

5. DISKUSIJA

Karcinom pluća je po mnogim klasifikacijama najučestaliji tip kancera u svetu [Tang *et al.*, 2013]. Uprkos savremenim dostignućima u oblasti hirurgije, hemioterapije i radioterapije, kroz proteklih par dekada stopa smrtnosti pacijenata obolelih od ove bolesti ostaje uglavnom nepromenjena. Loša statistika je delimično posledica činjenice da je kancer pluća vrlo često asimptomatski kroz dugi period vremena, što dodatno pogoršava prognozu. Kada se otkrije u kasnom stadijumu, hirurško odstranjivanje više ne daje željene rezultate [Herbst *et al.*, 2008; Saintigny & Burger, 2012].

Trenutno, metastaze i rezistencija na lekove predstavljaju glavni terapijski problem. NSCLC je manje osetljiv na hemioterapiju od SCLC i čak i uz hirurško odstranjivanje tumora u ranoj fazi, kod približno 50% pacijenata javljaju se recidivi [Kelsey *et al.*, 2006]. S obzirom na ovu činjenicu, posebna pažnja usmerava se na nove terapijske režime koji uključuju molekularnu ciljanu terapiju, jer su sistemska hemioterapija i radioterapija kao jedina opcija za lokalno uznapredovale i/ili metastatske tumore najviše primenjivane poslednjih godina. Erlotinib je inhibitor tirozin kinazne aktivnosti EGFR-a koji je od strane FDA odobren za terapiju NSCLC. Svoju ulogu ostvaruje kompetitivnim vezivanjem za ATP-vezujuće mesto na tirozin kinaznom domenu receptora, čime dovodi do smanjenja nizvodne signalizacije koja reguliše proliferaciju [Cohen *et al.*, 2005]. Iako je pokazano je da je erlotinib efikasan za tretman NSCLC koji ima mutacije u genu za EGFR, posle 10 do 14 meseci od početka terapije, kod nekih pacijenata dolazi do rezistencije na erlotinib i pojave recidiva [Kosaka *et al.*, 2011; Oxnard *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013]. S obzirom na brojna otvorena pitanja vezana za molekularne mehanizme i signalne puteve koji leže u osnovi stečene rezistencije na tirozin-kinazne inhibitore, ovo polje istraživanja je i danas izuzetno atraktivno [Sierra *et al.*, 2010].

Kompenzatorni mehanizmi koji favorizuju preživljavanje kancerskih ćelija nakon tretmana predstavljaju glavna ograničenja molekularne ciljana terapije [Axelrod *et al.*, 2013]. S obzirom na to da su ćelijski signalni putevi međusobno isprepletani u kompleksnu mrežu, kombinovana terapija se pojavila kao značajna terapijska strategija i jedan od glavnih načina za efikasno prevazilaženje rezistencije na tretman. Međutim, molekularni

mehanizmi koji se nalaze u osnovi sinergističkog efekata antikancerskih agenasa u kombinovanim tretmanima su još uvek nedovoljno poznati, naročito uzimajući u obzir činjenicu da redosled davanja agenasa prilikom tretmana može značajno da utiče na njihovu efikasnost [Lee *et al.*, 2012].

U brojnim studijama koje se bave kombinovanim tretmanima testirani su agensi koji imaju različite mehanizme delovanja. Cilj svih istraživanja je da se poboljša efikasnost erlotiniba u terapiji NSCLC. Na ovaj način testirani su sledeći agensi: CDK-2/ciklin A inhibitor - NBI1, inhibitor histonskih deacetilaza - trihostatin A, inhibitor enzima folatnog metabolizma - perimetreksed, kao i ciljani molekularni inhibitor EGFR-a, monoklonsko antitelo - cetuksimab i MET tirozin kinazni inhibitor - tivantinib [Orzaez *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Minami *et al.*, 2012; Goldman *et al.*, 2012].

Pored simultane primene sa hemioterapeuticima, erlotinib se smatra dobrim kandidatom za kombinovanje sa radioterapijom [Mehta, 2012]. S obzirom na činjenicu to da je preko 50% pacijenata obolelih od kancera podvrgnuto terapiji zračenjem [Baskar *et al.*, 2012], uvođenje TKI u ovaj terapijski režim otvara mogućnost poboljšanja prognoze kod ovih pacijenata. Nekoliko ključnih nalaza obrazlaže potrebu za istraživanjem uloge EGFR signalizacije u radiosenzitizaciji tumorskih ćelija. Na primeru različitih tumorskih model sistema je pokazano da niske doze zračenja mogu da dovedu do aktivacije EGFR-a, a time i signalnih puteva koji dovode do ubrzane proliferacije ili repopulacije kancerskih ćelija. Preživljavanje kancerskih ćelija nakon zračenja pre svega zavisi od efikasne reparacije oštećenja koja su nastala na DNK. Takođe, EGFR učestvuje u modulaciji translokacije, transkripcije i fosforilacije ključnih proteina/gena DNK reparacionog sistema [deWeese & Laiho, 2011]. Iz ovih razloga je u brojnim prekliničkim studijama testirano antiproliferativno dejstvo EGFR inhibitora kombinovanih sa zračenjem [Baumann *et al.*, 2007; Meyn *et al.*, 2009; Bokobza *et al.*, 2014]. S obzirom da rezultati ovih istraživanja ukazuju na potencijalnu korist od kombinovanja anti-EGFR terapije sa zračenjem, ova strategija se ispituje u tekućim programima kliničkih istraživanja kod pacijenata kod kojih su dijagnostifikovani različiti epitelijalni tumori, uključujući i NSCLC [Tang *et al.*, 2013].

Poslednjih nekoliko decenija apoptoza se smatra centralnim mehanizmom programirane ćelijske smrti [Ricci & Zong, 2006]. Međutim, sve je više dokaza da

konvencionalni hemioterapeutske agensi ne izazivaju samo apoptozu kancerskih ćelija već i druge, neapoptotske oblike ćelijske smrti, kao što su nekroza, autofagija, mitotska katastrofa i senescencija [Jain *et al.*, 2013]. Autofagija je ključni proces koji nastoji da održi ili obnovi ćelijsku homeostazu nakon metaboličkog i terapijskog stresa. Skorašnjim studijama je potvrđena dvojna, citoprotektivna i citotoksična uloga autofagije, a pitanje koja će od njih biti aktivirana u odgovoru na terapiju zavisi od tipa tumora i primenjenog tretmana [Chen & Karantza, 2011]. Rezultati prekliničkih istraživanja na *in vitro* i *in vivo* modelima ukazuju na to da inhibicija autofagije povećava citotoksični efekat agenasa koji se koriste u terapiji kancera [Yang *et al.*, 2011]. Kao i u slučaju autofagije, postoje različita shvatanja uloge senescencije na osetljivost tumorskih ćelija na terapiju. Naime, ukoliko se senescencija shvati kao ireverzibilno stanje u kome ćelija u potpunosti gubi reproduktivni potencijal, onda bi se ona mogla smatrati poželjnim ishodom terapije, s obzirom na to da su ćelije reproduktivno „mrtve“. Međutim, alternativno se senescencija može shvatiti i kao reverzibilno stanje, tj. kao način kojim kancerska ćelija prevazilazi citotoksične efekte terapije, a koje pod određenim uslovima mogu regenerisati populaciju tumorskih ćelija, što bi takođe značilo dvojnju ulogu senescencije u terapiji [Gewirtz, 2014].

Istraživanje različitih vidova ćelijske smrti i njihove uloge u tumorogenezi i rezistenciji na terapiju ima veliki uticaj na razvitak i implementaciju novih terapijskih strategija. Mnogi novi, ciljano dizajnirani terapijski pristupi se razvijaju sa namerom da deluju na specifične molekule koji imaju ključnu ulogu u okviru jednog ili više tipova ćelijske smrti. Da bi novi terapijski protokoli postigli željene rezultate, potrebno je dublje razumevanje odnosa između različitih signalnih puteva koji su uključeni u mehanizme nastanka ćelijske smrti i načina na koji ovi terapijski protokoli deluju na njih. Zbog toga je u ovom radu ispitivan efekat erlotiniba na povećanje radioosetljivosti ćelija adenokarcinoma pluća čoveka sa posebnim osvrtom na tipove ćelijske smrti do kojih ovi agensi dovode, kako pojedinačno tako i u kombinaciji. Takođe, da bi se utvrdio međusobni odnos različitih tipova ćelijske smrti nastalih u odgovoru na primenjene tretmane, primenjen je i hlorokin, agens koji inhibitorno deluje na proces autofagije.

Početni eksperimenti u ovoj disertaciji su imali za cilj da definišu dinamiku rasta CRL-5876 ćelija adenokarcinoma pluća čoveka u *in vitro* uslovima. Oni su takođe poslužili

za izbor najpovoljnijih eksperimentalnih uslova za određene biološke eseje. Optimalna koncentracija erlotiniba određena je na osnovu testova ćelijske vijabilnosti. Vijabilnost CRL-5876 ćelija je praćena u funkciji rastuće koncentracije erlotiniba, kao i u funkciji vremena inkubacije u prisustvu erlotiniba. Koncentracije koje se koriste u *in vitro* istraživanjima ($\sim 2.5 \mu\text{M}$) odgovaraju koncentracijama koje se postižu u plazmi pacijenata primenom standardnih doza od 150 mg erlotiniba dnevno i ne ispoljavaju neželjeni toksićni efekat [Sharma *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007]. S obzirom na ovu ćinjenicu, kao i na to da je vrednost IC_{50} za erlotinib, dobijena sa krive pomoću SRB eseja posle 72 h iznosila $2 \mu\text{M}$, ova koncentracija je odabrana za dalja istraživanja u kojima je erlotinib dodavan ćelijama samostalno ili u kombinaciji sa γ -zraćenjem. U literaturi se mogu naći podaci da ćelije za koje su vrednosti IC_{50} manje od $0.1 \mu\text{M}$ spadaju u linije koje su hiperosetljive na erlotinib. U *in vitro* uslovima, koncentracija erlotiniba od $\sim 2.5 \mu\text{M}$ predstavlja granicu koja razdvaja osetljive ćelijske linije od ćelijskih linija koje su rezistentne na erlotinib [Sharma *et al.*, 2007]. Prema ovoj podeli, CRL-5876 ćelije humanog adenokarcinoma pluća spadaju u ćelije intermedijerne do smanjene osetljivosti na tretman erlotinibom. Takoće, u literaturi postoje podaci prema kojima ove ćelije eksprimiraju intaktni (wt) gen za EGFR [Fernandez-Cuesta *et al.*, 2014]. S obzirom na ovaj podatak, ovakav EGFR mutacioni status CRL-5876 ćelija je u saglasnosti sa smanjenom osetljivoću na erlotinib, koja je zapažena. Iako se mutacije u EGFR genu smatraju korisnim za predvićanje dejstva EGFR TKI, one se ne mogu koristiti kao jedini kriterijum prilikom izbora terapije, jer se prema brojnim studijama ovaj tretman pokazao korisnim ćak i kod pacijenata sa wt *EGFR* [Shepherd *et al.*, 2005; Cappuzzo *et al.*, 2010; Pallis *et al.*, 2011].

Skoraćnje studije ukazuju na potrebu za sistematićnim pristupom u kombinovanju razlićitih agenasa koji se koriste u terapijske svrhe. Tako su Lee i saradnici koristeći molekularne inhibitore u kombinaciji sa razlićitim genotoksićnim agensima pokazali da promene redosleda davanja i dućine izlaganja ovim tretmanima znaćajno utiću na efikasnost ovih agenasa u ubijanju kancerskih ćelija [Lee *et al.*, 2012]. Naime, kod ćelijskih linija trostruko negativnih kancera dojke (eng. *triple negative breast cancers*, TNBCs), kao što su BT-20 ćelije, kao i kod A549 i NCL-H358 ćelija karcinoma pluća, efekat erlotiniba na povećanje osetljivosti na oštećenja DNK koja su izazvana doksorubicinom zavisi od

toga da li je erlotinib primenjen pre (erl → dox), nakon (dox → erl), ili simultano sa doksorubicinom (dox/erl) [Lee *et al.*, 2012]. Takođe, Zhuang i saradnici su na sličan način testirali kombinaciju erlotiniba i zračenja, i konstatovali da od pomenuta tri redosleda u davanju kombinovanih tretmana, najbolji efekat u smislu smanjenja preživljavanja i povećanja apoptoze pokazuje tretman u kome je erlotinib primenjen pre zračenja [Zhuang *et al.*, 2013].

Uzimajući u obzir gore navedene literaturne podatke, u ovoj disertaciji smo se odlučili za eksperimentalni pristup u kome je erlotinib dodavan CRL-5876 ćelijama, koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi, 1 h pre zračenja [Wang *et al.*, 2011]. Efekti tretmana su praćeni u širokom opsegu vremenskih tačaka. Shematski prikaz eksperimentalne postavke dat je na **Slici 7**. Primenjene doze zračenja bile su u opsegu doza koje se koriste u zračnoj terapiji NSCLC [Wu *et al.*, 2011].

Kvalitet i kvantitet oštećenja izazvanih zračenjem i erlotinibom su određeni uporednim praćenjem klonogenog preživljavanja, vijabilnosti ćelija i njihove proliferativne aktivnosti. Kriterijum za razlikovanje radiorezistentnih od radioosetljivih ćelija je frakcija preživljavanja posle ozračivanja dozom od 2 Gy (SF2). Ćelije sa $SF2 \geq 0.35$ se smatraju radiorezistentnim, odnosno radioosetljivim ukoliko je njihov $SF2 < 0.35$. [McIlwrath *et al.*, 1994; Salim *et al.*, 2012]. U literaturi se mogu naći podaci prema kojima NSCLC ćelijske linije pokazuju različit stepen radioosetljivosti sa SF2 vrednostima koje se kreću u rasponu od 0.21 kod H460 ćelija do 0.74 kod A549 ćelija [Pan *et al.*, 2009]. SF2 vrednost za CRL-5876 ćelije dobijena sa najbolje fitovane krive iznosi 0.61 ± 0.01 , dok je izmerena vrednost 0.54 ± 0.07 , što ih svrstava u radiorezistentne ćelije [Salim *et al.*, 2012; Matthews *et al.*, 2011]. Obe dobijene vrednosti se dobro poklapaju, s obzirom da SF2 dobijena fitovanjem sa fitovane krive u granicama greške eksperimentalno dobijene vrednosti. Postoje podaci da radiorezistencija kancerskih ćelija može da bude i znatno veća, kao na primer kod ćelija karcinoma mokraćne bešike i melanoma, gde SF2 vrednosti mogu da budu 0.98 odnosno 0.96 [Sangar *et al.*, 2004; Ristić-Fira *et al.*, 2009]. Rezultati istraživanja su pokazali da je erlotinib povećao radioosetljivost CRL-5876 ćelija. Ovo povećanje se ogleda u vrednosti RBE koja za kombinovani tretman zračenjem i erlotinibom iznosi 3.12 ± 0.44 . Takođe, kombinovana primena erlotiniba i zračenja dovodi do smanjenja D_{10} sa 5.6 ± 0.6 Gy za samo

zračenje na 2.9 ± 0.4 Gy za kombinovani tretman. Korišćenjem dobijenih D_{10} vrednosti određen je i faktor povećanja radioosetljivosti (SER), koji iznosi 1.9 ± 0.33 . Rezultati ovih eksperimenata pokazuju da je povećanje radioosetljivosti CRL-5876 ćelija indukovano erlotinibom veće nego u slučaju drugih ćelijskih linija adenokarcinoma pluća, gde su se SER vrednosti, definisane na isti način, kretale u opsegu od 1.20 do 1.46 [Wang *et al.*, 2011].

Praćenje ćelijske vijabilnosti pomoću SRB testa citotoksičnosti omogućava poređenje sa klonogenim esejom u *in vitro* istraživanjima. Zato se ovaj test uspešno koristi za praćenje interakcije agenasa sa antikancerogenim dejstvom i zračenja. Ova istraživanja su naročito pogodna za ćelije koje ispoljavaju intermedijernu radioosetljivost [Pauwels *et al.*, 2003]. Zbog toga je vijabilnost CRL-5876 ćelija nakon primenjenih tretmana praćena i SRB testom. U obe testirane vremenske tačke (72 h i 7 dana), primećeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti ćelija preteretiranih erlotinibom u odnosu na ćelije koje su izlagane samo nižim dozama zračenja (1, 2 i 4 Gy). Više doze zračenja (6 i 8 Gy) su pokazale značajan stepen inaktivacije ćelija 7 dana nakon ozračivanja. S obzirom na to da je nađen visok stepen korelacije u odgovoru ćelija na primenjene tretmane, može se zaključiti da SRB potvrđuje rezultate dobijene klonogenim esejom.

U ovom radu je pomoću BrdU testa određena i proliferativna sposobnost CRL-5876 ćelija nakon tretmana erlotinibom i zračenjem. Utvrđeno je da je erlotinib značajno smanjio proliferaciju ćelija 72 h nakon tretmana i u slučaju kada je primenjen samostalno i kada je primenjen zajedno sa zračenjem. Međutim, nakon 7 dana, kod svih tretiranih uzoraka zapaža se obnavljanje proliferativne sposobnosti ćelija, naročito kod uzoraka tretiranih samim erlotinibom i nižim dozama zračenja (1 i 2 Gy). Uzevši u obzir rezultate klonogenog eseja, može se zaključiti da su ćelije koje su preživele tretman zadržale proliferativnu sposobnost i da je kod nižih doza zračenja nivo proliferacije i dalje relativno visok.

Da bi uporedili rezultate i proverili eksperimentalne uslove, nivo preživljavanja i radioosetljivosti CRL-5876 ćelija smo korelirali sa vrednostima dobijenim ispitivanjem još dve kancerske linije čoveka. Kao model sistemi korišćene su HTB140 ćelije melanoma i 59M ćelije ovarijalnog kancera. Pomoću testova klonogenog preživljavanja, vijabilnosti i proliferacije je utvrđeno da su ove ćelijske linije rezistentnije na zračenje od CRL-5876

ćelija. U istim eksperimentalnim uslovima, obe ćelijske linije imaju visoke SF2 vrednosti (0.93 ± 0.01 za HTB140 i 0.91 ± 0.01 za 59M ćelije). Kao i u slučaju CRL-5876 ćelija, rezultati ćelijske vijabilnosti i proliferacije, kod obe linije, su potvrdili vrednosti dobijene metodom klonogenog preživljavanja. Opseg doza zračenja je prilagođen stepenu radioosetljivost svake analizirane ćelijske linije. Tako na primer, doza zračenja od 8 Gy koja kod CRL-5876 ćelija dovodi do snažne inaktivacije ćelija (<10% preživelih), kod HTB140 i 59M ćelija redukuje broj ćelija na ~ 80% preživelih [Keta *et al.*, 2013].

Uočeno smanjenje proliferativne sposobnosti ćelija nakon tretmana može biti posledica promena na nivou ćelijskog ciklusa. Na osnovu predhodnih eksperimenata, iz opsega testiranih doza zračenja izdvojene su doze od 2 i 8 Gy. Citofluorimetrijskom metodom su praćeni efekti zračenja sa ili bez 2 μ M erlotiniba u četiri vremenske tačke: 24 h, 48 h, 72 h i 7 dana. Zračenje je izazvalo G2/M blok kod CRL-5876 ćelija, a nakon 24, 48 i 72 h došlo je i do smanjenja broja ćelija koje se nalaze u S fazi. Kada je tretmanu zračenjem dodat i erlotinib, smanjenje populacije ćelija u S fazi je bilo još izraženije. Promene do kojih dolazi posle 48 h su karakterisane porastom broja ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa. Prema podacima iz literature, citostatičko dejstvo erlotiniba je potvrđeno i kod drugih ćelija karcinoma pluća, kao što su H226 i A549 ćelije, gde primena erlotiniba takođe dovodi do akumulacije ćelija u G1/S fazi [Chinnaiyan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011]. U inhibiciji procesa ćelijske proliferacije tumor supresor p53 ima značajnu ulogu. Međutim, on je često nefunkcionalan kod tumorskih ćelija. Pokazano je da je za zaustavljanje ćelijskog ciklusa u odgovoru na zračenje neophodan funkcionalan p53 koji indukuje blokadu ćelijskog ciklusa u G1 fazi. Takođe je potvrđeno da p53 učestvuje i u nekim aspektima G2/M bloka [Bunz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2011]. Zaustavljanje ćelijskog ciklusa nakon primenjenih tretmana se kod CRL-5876 ćelija može objasniti činjenicom da one eksprimiraju wt p53 [Phelps *et al.*, 1996; Soussi *et al.*, 2006].

U ispitivanjima ćelijske radioosetljivosti fosforilacija H2AX je osetljiv marker za detekciju DSB. [Qu *et al.*, 2013]. Pokazano je da broj γ -H2AX fokusa nakon zračenja brzo raste dok u narednih par sati postepeno opada kao posledica mehanizama koji učestvuju u reparaciji DSB. Međutim, kod nekih ćelija se γ -H2AX fokusi mogu zadržati danima nakon zračenja u vidu rezidualnih (zaostalih) fokusa, tj. mesta na DNK na kojima je izostala

reparacija DSB ili je došlo do nepravilne popravke lezija [Suzuki *et al.*, 2006]. Nekoliko studija je pokazalo da ćelijske linije koje imaju oštećenja u mehanizmima za reparaciju zadržavaju više γ -H2AX fokusa po ćeliji. Kod njih je takođe, 24 h nakon ozračivanja, zapaženo prisustvo većeg broja ćelija koje sadrže γ -H2AX fokuse [Kato *et al.*, 2006]. Smatra se da su rezidualni γ -H2AX fokusi koji su detektovani 24 h nakon zračenja pokazatelj gubitka klonogenog kapaciteta ćelije [Banáth *et al.*, 2010]. Kao što je naznačeno u poglavlju Cilj ove disertacije, testirana je hipoteza da erlotinib zbog mehanizma delovanja, može da povećava radioosetljivost CRL-5876 ćelija. Efekti zračenja i erlotiniba, kao i njihove kombinacije, na kinetiku nastanka i nestanka γ -H2AX fokusa su praćeni imunofluorescentnom metodom na dva načina. Zbog specifičnosti tehnika za detekciju γ -H2AX fokusa, pri većim dozama zračenja, zbog velikog broja γ -H2AX fokusa može da dođe do njihovog preklapanja, a time i do konstatovanja nižeg broja fokusa, što potencijalno predstavlja netačan rezultat. Zbog toga je za ispitivanje kinetike nastanka i reparacije γ -H2AX fokusa doza zračenja prilagođena eseju i iznosila je 0.1 Gy. Efekti većih doza zračenja (2 i 8 Gy), koje su bile odabrane iz prethodnih eksperimenata, praćeni su metodom merenja ukupne fluorescence γ -H2AX, 0.5 h i 24 h nakon tretmana. Utvrđeno je da broj γ -H2AX fokusa raste odmah nakon izlaganja dozi od 0.1 Gy i dostiže maksimum posle 2 h, da bi nakon 24 h opao na kontrolni nivo. Statistički značajan porast u broju γ -H2AX fokusa kod ćelija koje su pretretirane erlotinibom je nađen samo 24 h nakon tretmana. Kada su primenjene veće doze zračenja od 2 i 8 Gy, svi tretirani uzorci su pokazali statistički značajno povećanje ukupne fluorescence γ -H2AX po ćeliji već 0.5 h nakon tretmana ali je 24 h nakon tretmana jedino ozračivanje ćelija sa 8 Gy dovelo do statistički značajnog porasta vrednosti ukupne fluorescence γ -H2AX u odnosu na kontrolu. Pretretman erlotinibom kod ćelija ozračenih sa 8 Gy doveo je do povećanja vrednosti ukupne fluorescence u odnosu na samo zračenje u obe vremenske tačke. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima imunoblot analize prema kojoj je zračenje izazvalo porast ekspresije γ -H2AX, dok je predtretman erlotinibom doveo do daljeg porasta nivoa γ -H2AX kako u odnosu na kontrolu tako i u odnosu na samo zračenje.

Ćelijska smrt se u kontekstu radiobiologije izjednačava sa bilo kojim procesom koji dovodi do trajnog gubitka klonogenog kapaciteta ćelije [Joiner & van der Kogel, 2009].

Linearno-kvadratni model (eng. *linear-quadratic model*, LQ) se zasniva na binarnom ishodu: klonogena smrt nasuprot preživljavanju ćelije, iz čega proizilazi da su informacije o tipu ćelijske smrti irelevantne za kliničku aplikaciju LQ modela [Bacler-Kubiczek, 2012]. Ovaj model ne uzima u obzir činjenicu da nekoliko tipova ćelijske smrti, kao što su apoptoza, autofagija, mitotska katastrofa, nekroza i senescencija, mogu doprineti gubitku klonogenog potencijala u zavisnosti od vrste ćelija, lokalne mikrosredine i primenjene doze zračenja [Murray & Mirzayans, 2013]. Takođe je pokazano da su eseji koji se zasnivaju samo na merenju apoptoze nedovoljno pouzdani za predviđanje ishoda radioterapije, kao i da neapoptotski tipovi ćelijske smrti ovde igraju važnu ulogu [Abend, 2003; Brown & Attardi, 2005]. Prvi korak u istraživanju bila je vizuelizacija strukturnih promena na model sistemu koji je korišćen u ovom radu do kojih dolazi pod delovanjem primenjenih agenasa. Rezultati morfoloških i ultrastrukturnih analiza, koji su opisani u poglavljima 4.7 i 4.8, ukazuju na mogućnost postojanja različitih vidova ćelijske smrti kod CRL-5876 ćelija do kojih dolazi usled pojedinačne ili kombinovane primene erlotiniba i γ -zračenja.

Ultrastrukturne razlike između ćelija ozračenih višom i nižom dozom zračenja, se ogledaju, pre svega, u razlikama u mitohondrijalnoj populaciji. Brojne tamne mitohondrije ćelija ozračenih sa 2 Gy su verovatno posledica povećane potrebe ćelije za sintezom ATP-a, jer duboki uvrati koji su primećeni na membranama ozračenih ćelija ukazuju na mogućnost da se one još uvek aktivno dele. Ovakav ultrastrukturni nalaz se dovodi u vezu sa testovima vijabilnosti i proliferacije, prema kojima je vijabilnost ćelija nakon primene 2 Gy i dalje relativno visoka, kao i sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa. Ozračivanje ćelija višom dozom dovodi do pojave bubrenja mitohondrija, kristolize i dilatacije ER koja ukazuje na pojavu stresa ER [Schönthal, 2012]. Na analiziranim mikrografijama su zapaženi krupni autofagozomi koji zahvataju veće delove citoplazme u kojoj se nalaze oštećene organele. Membrana autofagozoma najverovatnije nastaje od veoma proširenih cisterni ER [Raciti *et al.*, 2012]. Prema podacima iz literature, stres ER može imati proapoptotsku ulogu [Vilatoba *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008]. Međutim, postoje podaci koji ukazuje da stres ER može indukovati i autofagiju, tj. da nakon stresa ER nastanak autofagije ima važnu ulogu u ćelijskom preživljavanju [Ogata *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2013]. Stres ER nastaje nakupljanjem nepravilno savijenih i oštećenih

proteina koji prevazilaze kapacitet molekularnih šaperona ("pratilaca") dostupnih u ER za njihovo savijanje. U odgovoru na stress ER dolazi do aktivacije odgovora na prisustvo nepravilno savijenih proteina (eng. *unfolded protein response*, UPR) koji smanjuju stres ER i takođe mogu indukovati autofagiju [Benbrook & Long, 2012]. Takođe je pokazano da stres ER izazvan zračenjem može da dovede do indukcije autofagije [Kim *et al.*, 2010]. Analiza morfoloških promena koje nastaju na CRL-5876 ćelijama 72 h nakon zračenja takođe pokazuje izraženu citoplazmatsku vakuolizaciju u odnosu na kontrolne ćelije, koja može da bude posledica procesa autofagije. Analizirajući pojavu kiselih vezikula u citoplazmi ozračenih ćelija pokazan je dozno-zavisian porast broja ovih struktura. Ozračivanje CRL-5876 ćelija takođe dovodi do porasta ekspresije LC3-II. Zbog toga se može pretpostaviti da je dominantan oblik odgovora CRL-5876 ćelija na zračenje indukcija autofagije u vremenskoj tački od 72 h nakon tretmana. U ovom slučaju, autofagija najverovatnije ispoljava svoju citoprotektivnu funkciju [Palumbo & Comincini, 2013].

Ultrastrukturalna analiza CRL-5876 ćelija koje su tretirane samo erlotinibom takođe ukazuje na znake ER stresa. Međutim, primećuje se manji broj autofagozoma nego kod ćelija tretiranih zračenjem. Svakako najupadljivija karakteristika ćelija pod tretmanom erlotinibom jesu morfološke promene karakteristične za apoptotske ćelije: „baloniranje” i „pupljenje” ćelijske membrane i fragmentacija nukleusa. Takođe, brojne nabubrele mitohondrije i očuvana morfologija nukleusa upućuju na postojanje sekundarne nekroze. Studije su pokazale da u odgovoru na određeni stimulus koji dovodi do smrti ćelije, obično postoji kontinuitet između procesa apoptoze i nekroze [Silva, 2010]. Mnogi agensi dovode do oštećenja ćelije i apoptoze pri manjim dozama, a do aktiviranja procesa nekroze nakon primene većih doza. Čak u slučaju primene iste doze citotoksičnog agensa, karakteristike oba tipa ćelijske smrti se mogu naći u istoj ćeliji [Zong & Thompson, 2006]. Apoptotska ili sekundarna nekroza se takođe često sreće kod ćelija u kulturi, gde se proces fagocitoza od strane susednih ćelija najčešće ne dešava, pa mrtve ćelije zbog gubitka energije i integriteta ćelijske membrane u kasnim stadijumima apoptoze mogu da dobiju karakteristike nekrotičnih ćelija [Majno & Joris, 1995].

Rezultat koji navodi na zaključak da kod CRL-5876 ćelija tretiranih erlotinibom dolazi do nastanka apoptoze kao dominantnog oblika umiranja ćelija je kvantifikacija

apoptotskih ćelija 48 h nakon primenjenih tretmana. Za kvantifikaciju apoptoze je izabrana ova vremenska tačka na osnovu analiza imunoblotova koja je pokazala da je odnos Bax/bcl-2 proteina povišen 24 i 48 h nakon primene zračenja i erlotiniba. Podaci iz literature prema kojima se maksimalan broj apoptotskih ćelija u *in vitro* uslovima najčešće može konstatovati 48 h posle ozračivanja su takođe uzeti u obzir pri izboru vremenske tačke za kvantifikaciju apoptoza [Muschel *et al.*, 1998]. Tretman erlotinibom je doveo do pojave apoptoze u ~ 55% ćelija, dok je zračenje dozama od 2 i 8 Gy indukovalo apoptozu u ~ 12%, odnosno ~ 22% ćelija. Dodatak erlotiniba u kombinovanim tretmanima je povećao broj apoptotskih ćelija, mada je to povećanje bilo statistički značajno samo kada je primenjena doza od 2 Gy. Rezultati Western blot analize su takođe pokazali da je od primenjenih tretmana najveći uticaj na indukciju apoptoze, koji se ogleda u povećanju Bax/Bcl-2 odnosa, imao erlotinib. U kombinovanom tretmanu sa zračenjem, erlotinib je takođe povećao odnos Bax/Bcl-2 48 h nakon tretmana, dok je samo zračenje pokazalo najmanji efekat na porast Bax/Bcl-2. U ovoj vremenskoj tački, Western blot analizom je utvrđena i povišena ekspresija p53 proteina. Ovo se može objasniti s obzirom na činjenicu da p53 svoju funkciju u indukciji apoptoze ostvaruje transkripcionom aktivacijom proapoptotskog Bax proteina [Mirzayans *et al.*, 2012]. Erlotinib je najveći efekat na povećanje ekspresije p53 ostvario 24 h nakon tretmana, dok je u ozračenim i kombinovano tretiranim uzorcima porast nivoa p53 bio niži. U vremenskoj tački od 48 h zabeležen je visok nivo p21 proteina, kao i NF-κB transkripcionog faktora. Multifunkcionalni protein p21, pored inhibitornog dejstva na ćelijski ciklus, učestvuje u indukciji procesa senescencije, a ima i ulogu negativnog regulatora procesa apoptoze [Abbas & Dutta, 2009]. Iako su svi tretmani doveli do povećanja ekspresije p21, značajno povećanja nivoa p21 proteina bilo je izazvano zračenjem, a bilo je najveće (~30 puta u odnosu na kontrolu) u vremenskoj tački 48 h. U literaturi je poznato da NF-κB ima antiapoptotsku ulogu kod ćelija kancera i da hemio- i radioterapija, dovode i do aktivacije NF-κB [Magné *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011]. Zbog toga bi se manji efekat zračenja na indukciju apoptoze u odnosu na erlotinib mogao objasniti visokom ekspresijom p21 i NF-κB.

Takođe treba napomenuti da sam erlotinib u našem eksperimentalnom modelu, za razliku od zračenja, nije izazvao veći porast AVO (**Slika 34**), što je u skladu sa rezultatima

ultrastrukturne analize. Li i saradnici su testirali efekat klinički relevantne doze erlotiniba na indukciju procesa autofagije. Za to su koristili dve NSCLC ćelijske linije sa mutiranim EGFR statusom (delecije u egzonu 19), koje su osetljive na erlotinib kao i dve rezistentne NSCLC linije (wt EGFR i L858R/T790M). Rezultati su pokazali da kod ćelijskih linija koje su osetljive na erlotinib dolazi do indukcije i apoptoze i autofagije. Kod ćelijskih linija koje su rezistentne na erlotinib nije došlo do indukcije procesa autofagije [Li *et al.*, 2013]. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su saglasni sa nalazima ovih autora. Naime, i kod CRL-5876 ćelija, koje ekspimiraju wt EGFR, rezultati dobijeni pomoću više različitih metoda ukazuju na to da je apoptoza dominantan tip ćelijske smrti u odgovoru na erlotinib.

U literaturi je poznato da kod kancerskih ćelija koje su pretrpele velika oštećenja izazvana zračenjem može da dođe do mitotske katastrofe za koju je karakteristično stvaranje multinukleusnih ćelija i/ili mikronukleusa [Miranda *et al.* 1996; Blank *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2010]. Kod maligno transformisanih ćelija mitotska katastrofa se najčešće povezuje sa defektima u kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa [Roninson *et al.*, 2001; Castedo *et al.*, 2004]. Da bi smo utvrdili efekte zračenja na indukciju mitotske katastrofe kod CRL-5876 ćelija, kao i bi proverili da li erlotinib povećava mitotsku katastrofu nakon zračenja, u ovom radu je urađena morfometrijska analiza nukleusa u tri vremenske tačke: 24 h, 72 h i 7 dana nakon tretmana. Rezultati pokazuju da zračenje izaziva dozno-zavisan pad nukleusa normalne morfologije, kao i porast u broju nepravilnih nukleusa, koji se smatraju pokazateljima mitotske katastrofe. Analizom morfoloških promena CRL-5876 ćelija nakon tretmana, uočava se pojava džinovskih, multinukleusnih ćelija koja takođe predstavlja jednu od morfoloških karakteristika mitotske katastrofe [Waldman *et al.*, 1996]. Smatra se da džinovske ćelije najverovatnije nastaju fuzijom ćelija koje se nalaze u procesu mitoze i ćelija koje su u S ili G2 fazi ćelijskog ciklusa [Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Castedo *et al.*, 2004]. Park i saradnici su u svojoj studiji koristili gefitinib, EGFR TKI koji ima sličan mehanizam delovanja kao erlotinib. Oni su ustanovili da gefitinib povećava radioosetljivost NCL-H460 i VMRC-LCD ćelija indukcijom mitotske katastrofe i da taj proces podrazumeva inhibiciju ATM fosforilacije koja leži u osnovi kaskade događaja koji dovode do G2 bloka [Park *et al.*, 2010]. Autori su analizirajući druge tipove EGFR inhibitora (monoklonsko antitelo cetuksimab), zaključili da je inhibicija fosforilacije ATM

verovatno specifična za gefitinib, ili bar za EGFR TKI male molekulske mase. U ovoj studiji je, u svim testiranim vremenskim tačkama, ustanovljeno da zračenje dovodi do dozno-zavisnog porasta broja ćelija sa fragmentisanim nukleusima. Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u broju ovih ćelija u sličaju kada je tretmanu zračenjem dodat erlotinib. S obzirom na ovakav rezultat, nameće se pretpostavka da radiosenzitizacija CRL-5876 ćelija ne podrazumeva indukciju mitotske katastrofe. Treba napomenuti da su u navedenoj studiji primenjene više doze inhibitora od onih koje se nalaze u plazmi pacijenata i da niža koncentracija erlotiniba, koju smo koristili u našim eksperimentima, možda nije bila dovoljna da indukuje povećanje broja multinukleusnih ćelija kao pokazatelja mitotske katastrofe.

S obzirom na rezultate morfometrijske analize nukleusa koji su pokazali da zračenje izaziva dozno zavisian porast krupnih nukleusa, koji mogu biti pokazatelj senescencije ćelija, pristupilo se dodatnim ispitivanjima sa ciljem da se potvrde ovi nalazi. Senescentne ćelije karakteriše pljosnata, ravna morfologija (eng. *flattened*), sa razvučenom, granulisanom citoplazmom. Na biohemijskom nivou javljaju se metaboličke promene koje dovode do povećanja aktivnosti lizosomalne β -galaktozidaze. Histochemijsko bojenje sa X-gal dovodi do plave prebojenosti ovih ćelija, čime se omogućava njihovo prepoznavanje u heterogenoj ćelijskoj populaciji. Rezultati istraživanja na NSCLC ćelijskim linijama sa wt EGFR su pokazali da erlotinib dovodi do povećanja radioosetljivosti putem indukcije senescencije, i to kod 5 od 11 analiziranih ćelijskih linija [Wang *et al.*, 2011]. U ovoj studiji, povećanje radioosetljivosti i indukcija senescencije su povezane sa zaostalim DSB koji su indukovani zračenjem. Takođe, u ovoj studiji je utvrđeno da su ovi procesi nezavisni od p53 statusa ćelija. Zanimljivo je da sam erlotinib nije indukovao senescenciju niti je doveo do značajnijeg smanjenja proliferacije kod ovih ćelija. Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazuju da je 7 dana nakon ozračivanja došlo do indukcije senescencije kod CRL-5876 ćelija, koja se ogleda u povećanju broja plavih ćelija na analiziranim preparatima. Ustanovljeno je da plavo prebojene ćelije morfološki ispunjavaju kriterijume senescentnih ćelija. Iako je ozračivanje ćelija dovelo do dozno-zavisne indukcije procesa senescencije, sam erlotinib nije izazvao statistički značajno povećanje broja senescentnih ćelija. Takođe, iako je nakon kombinovanih tretmana broj senescentnih ćelija veći u odnosu

na kontrolu, taj broj je manji nego u slučaju samog zračenja. Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima Western blot analize, tj. nivoom ekspresije p21. U ovoj vremenskoj tački, ekspresija p21 je nakon zračenja bila ~ 25 puta veća u odnosu na kontrolu dok je nakon kombinovanog tretmana ~ 8 puta veća. Posle primene samog erlotiniba ekspresija p21 ostaje na nivou kontrole.

U analizi narednih rezultata počecemo od stava: “Najbolja početna pozicija za otkriće novog leka je početi od starog” [Chong & Sullivan, 2007]. Ovom rečenicom se opisuje pristup u otkriću novih lekova u tretmanu kancera u kome se poznatom leku nalazi nova klinička primena. Jedan od ovakvih lekova je i hlorokin, 5-aminokvinolinski agens koji se koristi u terapiji malarije [Cufi *et al.*, 2013]. Pokazano je da hlorokin inhibira proces autofagije tako što inhibira lizosomalne proteaze i sprečava događaje koji dovode do fuzije autofagozoma i lizozoma. Hlorokin je jedan od najšire korišćenih inhibitora autofagije *in vitro* i *in vivo* [Amaravadi *et al.*, 2011; Mancias & Kimmelman 2011]. Pored toga, hlorokin i njegovi derivati su jedini inhibitori procesa autofagije čija je primena u kliničkoj praksi odobrena od strane FDA. Trenutno se više od 30 kliničkih studija bavi pitanjem da li farmakološka inhibicija autofagije hlorokinom i hidroksihlorokinom može da dovede do povećanja efektivnosti postojećih terapija kancera [Gorski *et al.*, 2012; Maycotte *et al.*, 2012]. Kod pacijenata sa NSCLC su u toku kliničke studije koje testiraju bezbednost i efikasnost kombinovanja hidroksihlorokina sa različitim lekovima koji se već nalaze u kliničkoj upotrebi. Jedna od ovih studija je u fazi I i II testirala i potvrdila bezbednu upotrebu hidroksihlorokina uz erlotinib [Goldberg *et al.*, 2012].

U ovom radu je *in vitro* testirana efikasnost različitih kombinacija zračenja γ -zracima, hlorokina i erlotiniba u eliminaciji NSCLC CRL-5876 ćelija sa posebnim osvrtom na tipove ćelijske smrti koje ovi specifični tretmani indukuju. Na osnovu SRB testa citotoksičnosti utvrđeno je da hlorokin ima slabiji efekat na smanjenje vijabilnosti CRL-5876 ćelija nego erlotinib. Najveće smanjenje vijabilnosti ćelija je zabeleženo 72 h nakon primene kombinacije ovih agenasa, dok je 7 dana nakon tretmana zabeležen trend oporavka, tj. porasta vijabilnosti ćelija. U kombinovanim tretmanima sa zračenjem, primećen je isti trend. Najbolje rezultate u smanjenju ćelijske vijabilnosti pokazao je

trostruki tretman, tj. primena erlotiniba, hlorokina i zračenja. Za to je bila najpovoljnija vremenska tačka od 7 dana.

Biološki efekti hlorokina se zasnivaju na njegovim lizozomotropnim osobinama [Amaravadi & Thompson, 2007]. U neprotonovanoj formi, on može da difunduje kroz ćelijske membrane i da se nakon protonacije akumulira u kiselim organelama, kao što su lizozomi. Hlorokin inhibira autofagiju u kasnoj fazi, pa je karakteristika ćelija tretiranih ovim agensom akumulacija, a ne inhibicija AVO u citoplazmi [Tasdemir *et al.*, 2008]. Zbog toga i u našim eksperimentima hlorokin kod ozračenih ili ćelija pretretiranih erlotinibom dovodi do povećanja crveno obojenih vakuola (**Slika 33**). Literaturni podaci ukazuju na značajan potencijal hlorokina u radio- i hemiosenzitizaciji tumorskih ćelija [Solomon & Lee, 2009]. Fan i saradnici su pokazali da hlorokin inhibira rast i indukuje apoptozu i nekrozu kod A549 ćelija karcinoma pluća [Fan *et al.*, 2006]. Niže koncentracije hlorokina (0.25-32 μM) izazivaju vakuolizaciju i povećanje kiselog kompartmana u ćelijama i imaju antiproliferativno dejstvo na ove ćelije. Nasuprot tome, više koncentracije hlorokina (64-128 μM) indukuju apoptozu 24 h nakon tretmana uz nizak nivo vakuolizacije. Takođe je zanimljivo, da duže izlaganje hlorokinu (72 h), pri koncentracijama od 32 do 64 μM , dovodi do nekroze A549 ćelija. Autori skorašnjih studija, u kojima je pokazano da hlorokin takođe povećava citotoksičan efekat erlotiniba putem indukcije apoptoze, pretpostavljaju da bi indukcija autofagije mogla biti ključni faktor rezistencije na erlotinib kod NSCLC ćelija sa wt EGFR [Schwartz *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2013]. U eksperimentima koji su opisani u ovoj disertaciji, nivo apoptoze CRL-5876 ćelija 48 h nakon tretmana hlorokinom je niži nego posle tretmana erlotinibom, i iznosi $\sim 12\%$. Međutim, dodavanje hlorokina ostalim tretmanima (erlotinib, zračenje, erlotinib + zračenje) dovodi do povećanja broja apoptotskih ćelija, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na sve navedene tretmane bez hlorokina. Rezultati istraživanja primenjenih tretmana na indukciju procesa autofagije kod CRL-5876 ćelija su pokazali da prisustvo hlorokina značajno povećava crvenu fluorescenciju, kako u slučaju kada je primenjen pojedinačno, tako i u kombinaciji sa erlotinibom. Hlorokin u kombinaciji sa zračenjem, kao i primena sva tri agensa, dovodi do statistički značajnog povećanja AVO. Ovo povećanje se zapaža

kako u odnosu na kontrolne ćelije tako i u odnosu na ćelije kod kojih je primenjen samo tretman zračenjem.

Komparativna studija uticaja supresije procesa autofagije na indukciju senescencije pokazuje da sam hlorokin ne dovodi do povećanja β -gal pozitivnih ćelija u odnosu na kontrolu, a da u kombinaciji sa zračenjem, kao i kada je treći agens kod tretmana erlotinib + zračenje, dovodi do smanjenja senescencije u odnosu na samo zračenje (**Slika 36**). Ovi rezultati su u vezi sa podacima iz literature koji pokazuju da se procesi autofagije i senescencije mogu odigravati paralelno, kao i da indukcija autofagije pospešuje razvitak senescentnog fenotipa. Izlaganje MCF-7 ćelija tumora dojke koncentracijama doksorubicina i kamptotecina koje odgovaraju kliničkim vrednostima, dovodi kako do indukcije autofagije tako i do indukcije senescencije, koje su bile povezane sa povišenom ekspresijom p53 i p21 [Goehe *et al.*, 2012]. Farmakološka inhibicija procesa autofagije hlorokinom dovodi do odlaganja ispoljavanja senescentnog fenotipa kod ovih ćelija, iako ukupna senescencija izazvana doksorubicinom i kamptotecinom nije bila smanjena. Ovo je autore navelo na zaključak da autofagija povećava i olakšava proces senescencije, verovatno obezbeđivanjem dodatnog izvora energije koji omogućava ćelijama da uđu u produženo stanje mirovanja. Treba napomenuti da u su u vremenskoj tački od 7 dana takođe nađene povišene vrednosti NF-kB i ciklina D1 kod uzoraka tretiranih zračenjem. S obzirom na to da NF-kB stimuliše transkripciju ciklina D1 [Hinz *et al.*, 1999], slični profili koji su dobijeni kao odgovor na primenjene tretmane su očekivani. Povišena ekspresija ovih proteina takođe može biti u vezi sa indukcijom senescencije kod CRL-5876 ćelija. Određene studije su pokazale da akumulacija ciklina D1 u senescentnim ćelijama, može da bude posledica povišenog nivoa p21. Prema ovim studijama, p21 indukuje akumulaciju ciklina D1 u nukleusu putem inhibicije njegovog izlaska iz nukleusa [Alt *et al.*, 2002]. Međutim, druga studija je pokazala da Ras onkogen indukuje akumulaciju p21 tako što dovodi do povećanja nivoa ciklina D1 kod Ras-transformisanih mišjih fibroblasta [Coleman *et al.*, 2003]. Ovi autori smatraju da Ras dovodi do stabilizacije p21 indukujući stvaranje p21-ciklin D1 kompleksa, čime se sprečava degradacija p21 od strane 20S proteozoma. Zbog toga je moguće da na početku procesa senescencije povišen nivo p21

dovodi do akumulacije ciklina D1 u nukleusu koji stabilizira p21 i omogućava njegovu dalju akumulaciju.

Kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i reparacija oštećenja na DNK su regulisani signalnim putevima koji predstavljaju tzv. odgovor ćelije na oštećenja DNK (eng. *DNA damage response, DDR*). Ovi signalni putevi u velikoj meri utiču na biološke posledice zračenja, uključujući ćelijsku smrt. DDR ne određuje samo preživljavanje ćelija nakon zračenja, već i tip ćelijske smrti, kao i vreme u kome će ona nastupiti [Joiner & van der Kogel, 2009]. Naime, kod tumorskih ćelija najčešće prođe nekoliko mitozâ od momenta ozračivanja do nastupanja ćelijske smrti. Iako DDR signalni putevi uspevaju da poprave većinu oštećenja na DNK izazvanih zračenjem, kod velikih oštećenja DNK oni najčešće ne mogu da spreče da neke ćelije sa DNK prekidima uđu u mitozu. U ovom radu je utvrđeno da u slučaju CRL-5876 ćelija velike doze zračenja dovode do povećanja DSB, koji se mogu detektovati i 24 h nakon tretmana. Nekompletna ili nepravilna reparacija DNK dovodi do hromozomskih aberacija, a sudbina takvih ćelija zavisi od tipa ovih aberacija [Brown & Attardi, 2005]. Ćelije sa dicentričnim hromozomima i acentričnim fragmentima (koji mogu da formiraju mikronukleuse), najčešće umiru nakon zračenja. Prisustvo dve centromere u dicentričnim hromozomima sprečava njihovo razdvajanje u metafazi, zbog čega dolazi do mitotske katastrofe, koja za posledicu ima smrt ćelije. Tako mitotska katastrofa može da dovede do različitih oblika ćelijske smrti, kao što su apoptoza, autofagija, nekroza ili senescencija. Ovde je pokazano da CRL-5876 ćelije ispoljavaju znake mitotske katastrofe već 24 h nakon tretmana zračenjem. S obzirom na to da su rezultati pokazali da zračenje indukuje i apoptozu i senescenciju kod CRL-5876 ćelija, ovi oblici ćelijske smrti se najverovatnije dešavaju kao posledica mitotske katastrofe. Iako erlotinib dovodi do statistički značajnog povećanja γ -H2AX fokusa 24 h nakon tretmana zračenjem od 8 Gy, utvrđeno je da on svoje radiosenzitivirajuće dejstvo ostvaruje prvenstveno putem indukcije apoptoze, a ne mitotske katastrofe. Takođe, jedna od važnih posledica ozračivanja CRL-5876 ćelija jeste i indukcija citoprotektivne autofagije. Rezultati analiza dejstva kombinovanih tretmana u kome je hlorokin doveo do povećanja apoptoze putem inhibicije autofagije, upućuju da se primenom ovog agensa značajno može povećati radioosetljivost CRL-5876 ćelija.

6. ZAKLJUČCI

1. CRL-5876 ćelije NSCLC adenokarcinoma čoveka sa vrednošću SF2 = 0.61 spadaju u grupu radiorezistentnih tumorskih ćelija.
2. Erlotinib je povećao osetljivost CRL-5876 ćelija na γ -zračenje, a promena radioosetljivosti se ogleda kroz promenu vrednosti SF2, RBE(2 Gy, γ) i D₁₀. Faktor povećanja radioosetljivosti izračunat na osnovu D₁₀ (SER (D₁₀)) iznosi 1.9.
3. Zračenje i erlotinib smanjuju vijabilnost i proliferaciju CRL-5876 ćelija. Kombinovani tretman dovodi do veće inaktivacije ćelija u odnosu na pojedinačne. Ove vrednosti su u saglasnosti sa vrednostima koje su dobijene za radiobiološke parametre. Međutim, kada je primenjen samostalno i sa nižim dozama zračenja, efekat erlotiniba na proliferaciju ćelija se gubi nakon sedam dana.
4. Zračenje i erlotinib dovode do promena u ćelijskom ciklusu CRL-5876 ćelija. Zračenje izaziva G2/M blok, dok erlotinib dovodi do smanjenja broja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa. Kombinovani tretman (γ -zračenje + erlotinib) dovodi do najvećih promena u distribuciji ćelija 48 h nakon tretmana (povećanje G1 i smanjenje S faze). Rezultati analize ćelijskog ciklusa su komplementarni sa relevantnim podacima proliferativne aktivnosti CRL-5876 ćelija.
5. Zračenje dovodi do porasta γ -H2AX fokusa. Predtretman erlotinibom dovodi do povećanja broja γ -H2AX fokusa. Prisustvo rezidualnih γ -H2AX fokusa 24 h nakon tretmana ukazuje na kašnjenje u reparaciji DSB, što se dovodi u vezu sa redukovanim klonogenim preživljavanjem.

6. Zračenje i erlotinib dovode do promena u morfologiji i ultrastrukturi CRL-5876 ćelija. Zračenje dovodi do pojave džinovskih, multinukleusnih ćelija. Na ultrastrukturnom nivou vidi se da tretmani dovode do stresa ER. Rezultati ultrastrukturne analize su povezani sa testovima vijabilnosti i proliferacije, kao i sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa.
7. Zračenje dovodi do indukcije mitotske katastrofe, kao i citoprotektivne autofagije. Takođe, od svih primenjenih tretmana, zračenje ima najveći efekat na indukciju senescencije kod CRL-5876 ćelija.
8. Efekti erlotiniba se ostvaruju prvenstveno putem indukcije apoptoze. Kombinovani tretmani (γ -zračenje + erlotinib) su povećali apoptozu CRL-5876 ćelija u odnosu na samo zračenje. Promena nivoa ekspresije signalnih molekula za analizirane tipove ćelijske smrti je u skladu sa citofluorimetrijskim merenjima i zapaženim promenama ćelijske morfologije.
9. Hlorokin u kombinovanim tretmanima sa γ -zračenjem i erlotinibom smanjuje vijabilnost CRL-5876 ćelija. Međutim, kada je primenjen samostalno efekat hlorokina na vijabilnost ćelija se gubi nakon sedam dana. Hlorokin u svim kombinovanim tretmanima dovodi do povećanja apoptoze i smanjenja senescencije CRL-5876 ćelija.

7. LITERATURA

- Abbas T, Dutta A. **2009**. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6): 400-414.
- Abend M. **2003**. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol*, 79(12): 927-941.
- Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J. **2008**. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6): 1006-1018.
- Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. **2002**. p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem*, 277(10): 8517-8523.
- Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. **2011**. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 17(4): 654-666.
- Amaravadi RK, Thompson CB. **2007**. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 13(24): 7271-7279.
- Andersen MH, Becker JC, Straten Pt. **2005**. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 4(5): 399-409.
- Anderson D, Andrais B, Mirzayans R, Siegbahn EA, Fallone BG, Warkentin B. Comparison of two methods for measuring γ -H2AX nuclear fluorescence as a marker of DNA damage in cultured human cells: applications for microbeam radiation therapy. *J Instrum*, **2013** JINST 8 C06008.
- Axelrod M, Gordon VL, Conaway M, Tarcsafalvi A, Neitzke DJ, Gioeli D, Weber MJ. **2013**. Combinatorial drug screening identifies compensatory pathway interactions and adaptive resistance mechanisms. *Oncotarget*, 4(4): 622-635.

- Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. **2012**. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, 327(1-2): 48-60.
- Baek KH, Bhang D, Zaslavsky A, Wang LC, Vachani A, Kim CF, Albelda SM, Evan GI, Ryeom S. **2013**. Thrombospondin-1 mediates oncogenic Ras-induced senescence in premalignant lung tumors. *J Clin Invest*, 123(10): 4375-4389.
- Balcer-Kubiczek EK. **2012**. Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword. *Exp Oncol*, 34(3): 277-285.
- Ban ath JP, Klovov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. **2010**. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*, 10: 4.
- Banerjee T, Chakravarti D. **2011**. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 31(24): 4858-4873.
- Barnard S, Bouffler S, Rothkamm K. **2013**. The shape of the radiation dose response for DNA double-strand break induction and repair. *Genome Integr*, 4(1): 1.
- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. **2012**. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*, 9(3): 193-199.
- Bassing CH, Alt FW. **2004**. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle*, 3(2): 149-153.
- Baumann M, Krause M, Dikomey E, Dittmann K, D orr W, Kasten-Pisula U, Rodemann HP. **2007**. EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol*, 83(3): 238-248.
- Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. **2005**. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*, 40(2): 90-97.
- Benbrook DM, Long A. **2012**. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol*, 34(3): 286-297.
- Bialik S, Kimchi A. **2008**. Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development. *Adv Exp Med Biol*, 615: 177-200.

- Bialik S, Pietrokovski S, Kimchi A. **2011**. Myosin drives autophagy in a pathway linking Atg1 to Atg9. *Embo j*, 30(4): 629-630.
- Blair BG, Bardelli A, Park BH. **2014**. Somatic alterations as the basis for resistance to targeted therapies. *J Pathol*, 232(2): 244-254.
- Blank M, Mandel M, Keisari Y, Meruelo D, Lavie G. **2003**. Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin. *Cancer Res*, 63(23): 8241-8247.
- Bokobza SM, Jiang Y1, Weber AM1, Devery AM1, Ryan AJ2. **2014**. Short-course treatment with gefitinib enhances curative potential of radiation therapy in a mouse model of human non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 88(4): 947-954.
- Bonner WM., R. C., Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. **2008**. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8(12): 957-967.
- Bouchaert P, Guerif S, Debiais C, Irani J, Fromont G. **2012**. DNA-PKcs expression predicts response to radiotherapy in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 84(5): 1179-1185.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. **2001**. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J*, 18(6): 1059-1068.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. **2013**. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 132(5): 1133-1145.
- Brown JM, Attardi LD. **2005**. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*, 5(3): 231-237.
- Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. **2012**. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay-a comparative study. *Radiat Oncol*, 7: 1.

- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. **1998**. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393): 1497-1501.
- Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicens S, Szczésna A, Juhász E, Esteban E, Molinier O, Brugger W, Melezínek I, Klingelschmitt G, Klughammer B, Giaccone G; SATURN investigators. **2010**. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*, 11(6): 521-529.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. **2005**. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 97(9): 643-655.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W, Kroemer G. **2004**. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, 23(25): 4362-4370.
- Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. **2012**. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, 47(4): 497-510.
- Chen N, Karantza V. **2011**. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, 11(2): 157-168.
- Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y. **2011**. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16: 1172-1185.
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. **2008**. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*, 15(1): 171-182.
- Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, Armstrong E, Varambally S, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Harari PM. **2005**. Mechanisms of enhanced radiation response

- following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res*, 65(8): 3328-3335.
- Chong CR, Jänne PA. **2013**. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med*, 19(11): 1389-1400.
- Chong CR, Sullivan DJ Jr. **2007**. New uses for old drugs. *Nature*, 448(7154): 645-646.
- Cohen MH, Johnson JR, Chen YF, Sridhara R, Pazdur R. **2005**. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *Oncologist*, 10(7): 461-466.
- Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. **2003**. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist*, 8(4): 303-306.
- Colby TV, Koss M, Travis WD. **1995**. Tumors of the Lower Respiratory Tract. 3rd ed. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC.
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. **2003**. Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *Embo j*, 22(9): 2036-2046.
- Combs SE, Zipp L, Rieken S, Habermehl D, Brons S, Winter M, Haberer T, Debus J, Weber KJ. **2012**. In vitro evaluation of photon and carbon ion radiotherapy in combination with chemotherapy in glioblastoma cells. *Radiat Oncol*, 7: 9.
- Cufí S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cuyàs E, López-Bonet E, Martin-Castillo B, Joven J, Menendez JA. **2013**. The anti-malarial chloroquine overcomes primary resistance and restores sensitivity to trastuzumab in HER2 positive breast cancer. *Sci Rep*, 3: 2469.
- Davidson D, Amrein L, Panasci L, Aloyz R. **2013**. Small Molecules, Inhibitors of DNA-PK, Targeting DNA Repair, and Beyond. *Front Pharmacol*, 4: 5.
- de Las Heras JI, Batrakou DG, Schirmer EC. **2013**. Cancer biology and the nuclear envelope: a convoluted relationship. *Semin Cancer Biol*, 23(2): 125-137.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. **2011**. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*, 32(4): 605-644.

- Derheimer FA, Kastan MB. **2010**. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Lett*, 584(17): 3675-3681.
- DeWeese TL, Marikki L. **2011**. Molecular Determinants of Radiation Response, Springer.
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen DJ, Kehlback R, Rodemann HP. **2005**. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 280(35): 31182-31189.
- Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, González-Larriba JL, Grodzki T, Pereira JR, Le Groumellec A, Lorusso V, Clary C, Torres AJ, Dahabreh J, Souquet PJ, Astudillo J, Fournel P, Artal-Cortes A, Jassem J, Koubkova L, His P, Riggi M, Hurteloup P. **2006**. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 7(9): 719-727.
- Dutta PR, Maity A. **2007**. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett*, 254(2): 165-177.
- El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J. **2003**. Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *Br J Cancer*, 89(3): 593-601.
- Elmore S. **2007**. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495-516.
- Engeland M, van den Eijnde SM, Aken T, Vermeij-Keers C, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. **2001**. Detection of apoptosis in ovarian cells in vitro and in vivo using the annexin v-affinity assay. *Methods Mol Med*, 39: 669-677.
- Ercan D, Zejnullahu K, Yonesaka K, Xiao Y, Capelletti M, Rogers A, Lifshits E, Brown A, Lee C, Christensen JG, Kwiatkowski DJ, Engelman JA, Jänne PA. **2010**. Amplification of EGFR T790M causes resistance to an irreversible EGFR inhibitor. *Oncogene*, 29(16): 2346-2356.

- Eskelinen EL. **2011**. The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 11(4): 294-300.
- Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. **2006**. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 14(9): 3218-3222.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; **2013**. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 25/6/2014.
- Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A. **2002**. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*, 4(12): 993-997.
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. **2004**. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9): 959-967.
- Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, Sun R, Menon R, Leenders F, Ortiz-Cuaran S, Peifer M, Bos M, Daßler J, Malchers F, Schöttle J, Vogel W, Dahmen I, Koker M, Ullrich RT, Wright GM, Russell PA, Wainer Z, Solomon B, Brambilla E, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brambilla CG, Lantuejoul S, Altmüller J, Becker C, Nürnberg P, Heuckmann JM, Stoelben E, Petersen I, Clement JH, Sängler J, Muscarella LA, la Torre A, Fazio VM, Lahortiga I, Perera T, Ogata S, Parade M, Brehmer D, Vingron M, Heukamp LC, Buettner R, Zander T, Wolf J, Perner S, Ansén S, Haas SA, Yatabe Y, Thomas RK. **2014**. CD74-NRG1 Fusions in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov*, 4(4): 415-422.
- Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Lenz G. **2012**. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One*, 7(8): e42522.

- FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF. **2009**. 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4): 897-904.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. **2006**. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5): 2315-2319.
- Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. **2009**. SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nat Cell Biol*, 11(8): 921-923.
- Gazdar AF. **2009**. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28 Suppl 1: S24-31.
- Geisel D, Heverhagen JT, Kalinowski M, Wagner HJ. **2008**. DNA double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty. *Radiology*, 248(3): 852-859.
- Geisinger KR, Stanley MW, Raab SS, Silverman JF, Abati A. **2003**. Modern Cytopathology. Churchill Livingstone: New York.
- Gewirtz DA. **2014**. Autophagy and senescence in cancer therapy. *J Cell Physiol*, 229(1): 6-9.
- Giordano TJ, Shedden KA, Schwartz DR, Kuick R, Taylor JM, Lee N, Misek DE, Greenson JK, Kardia SL, Beer DG, Rennert G, Cho KR, Gruber SB, Fearon ER, Hanash S. **2001**. Organ-specific molecular classification of primary lung, colon, and ovarian adenocarcinomas using gene expression profiles. *Am J Pathol*, 159(4): 1231-1238.
- Goehe RW, Di X, Sharma K, Bristol ML, Henderson SC, Valerie K, Rodier F, Davalos AR, Gewirtz DA. **2012**. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther*, 343(3): 763-778.
- Goldberg SB, Supko JG, Neal JW, Muzikansky A, Digumarthy S, Fidias P, Temel JS, Heist RS, Shaw AT, McCarthy PO, Lynch TJ, Sharma S, Settleman JE, Sequist LV. **2012**.

- A phase I study of erlotinib and hydroxychloroquine in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 7(10): 1602-1608.
- Goldman JW, Laux I, Chai F, Savage RE, Ferrari D, Garmey EG, Just RG, Rosen LS. **2012**. Phase 1 dose-escalation trial evaluating the combination of the selective MET (mesenchymal-epithelial transition factor) inhibitor tivantinib (ARQ 197) plus erlotinib. *Cancer*, 118(23): 5903-5911.
- Gorski SM, Ries J, Lum JJ. **2012**. Targeting autophagy: the Achilles' heel of cancer. *Autophagy*, 8(8): 1279-1280.
- Greene F, Page D, Fleming I, Fritz A, Balch C, Haller D and Morrow M. **2002**. AJCC Cancer Staging Manual ((ed 6)) Springer-Verlag. New York: 237.
- Greulich, H. **2010**. The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. *Genes Cancer*, 1(12): 1200-1210.
- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC. **2006**. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog*, 45(1): 10-17.
- Hann CL, Brahmer JR. **2007**. "Who should receive epidermal growth factor receptor inhibitors for non-small cell lung cancer and when?". *Curr Treat Options Oncol*, 8(1): 28-37.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. **2008**. Lung cancer. *N Engl J Med*, 359(13): 1367-1380.
- Herzog E, Casey A, Lyng FM, Chambers G, Byrne HJ, Davoren M. **2007**. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay. *Toxicol Lett*, 174(1-3): 49-60.
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. **1999**. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 19(4): 2690-2698.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Barón AE, Zeng C, Franklin WA. **2003**. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell

- lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*, 21(20): 3798-3807.
- Hoesel B, Schmid JA. **2013**. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12: 86.
- Hu YL, Jahangiri A, Delay M, Aghi MK. **2012**. Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. *Cancer Res*, 72(17): 4294-4299.
- Huen MS, Sy SM, Chen J. **2010**. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2): 138-148.
- Huggins CJ, M. R., Lee S, Salotti J, Thomas S, Martin N, Quiñones OA, Alvord WG, Olanich ME, Keller JR, Johnson PF. **2013**. C/EBPgamma suppresses senescence and inflammatory gene expression by heterodimerizing with C/EBPbeta. *Mol Cell Biol*, 33(16): 3242-3258.
- Irmer D, Funk JO, Blaukat A. **2007**. EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene*, 26(39): 5693-5701.
- Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dingba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Łos M. **2013**. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med*, 17(1): 12-29.
- Joiner MC, van der Kogel A. **2009**. Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition, CRC Press.
- Joseph B, Ekedahl J, Lewensohn R, Marchetti P, Formstecher P, Zhivotovsky B. **2001**. Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 20(23): 2877-2888.
- Kasperek TR, Humphrey TC. **2011**. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 22(8): 886-897.

- Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS. **2006**. Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual. *Radiat Res*, 166(3): 443-453.
- Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. **1991**. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer*, 27(7): 897-900.
- Kelsey CR, Clough RW, Marks LB. **2006**. Local recurrence following initial resection of NSCLC: salvage is possible with radiation therapy. *Cancer J*, 12(4): 283-288.
- Kennedy RD, D'Andrea AD. **2006**. DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol*, 24(23): 3799-3808.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. **1972**. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4): 239-257.
- Keta O, Todorović D, Popović N, Korićanac L, Cuttone G, Petrović I, Ristić-Fira A. **2013**. Radiosensitivity of human ovarian carcinoma and melanoma cells to γ -rays and protons. *Arch Med Sci*, doi: 10.5114/aoms.2013.39902
- Khunder SA. **2001**. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*, 31(2-3): 139-148.
- Kim HR, Shim HS, Chung JH, Lee YJ, Hong YK, Rha SY, Kim SH, Ha SJ, Kim SK, Chung KY, Soo R, Kim JH, Cho BC. **2012**. Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement. *Cancer*, 118(3): 729-739.
- Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, Jung DK, Lu B. **2010**. Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by perk-eIF2alpha in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene*, 29(22): 3241-3251.

- Kim TY, Han SW, Bang YJ. **2007**. Chasing targets for EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer: Asian perspectives. *Expert Rev Mol Diagn*, 7(6): 821-836.
- King KL, Cidlowski JA. **1998**. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 601-617.
- Kosaka T, Yamaki E, Mogi A, Kuwano H. **2011**. Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 165214.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **2009**. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1): 3-11.
- Kuefner MA, Grudzenski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, Lobrich M, Uder M. **2009**. DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol*, 44(8): 440-446.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. **2010**. The essence of senescence. *Genes Dev*, 24(22): 2463-2479.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. **2000**. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20): 3613-3622.
- Lapenna S, Giordano A. **2009**. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8(7): 547-566.
- Lee DH, Chowdhury D. **2011**. What goes on must come off: phosphatases gate-crash the DNA damage response. *Trends Biochem Sci*, 36(11): 569-577.

- Lee JS, Ha TK, Park JH, Lee GM. **2013**. Anti-cell death engineering of CHO cells: co-overexpression of Bcl-2 for apoptosis inhibition, Beclin-1 for autophagy induction. *Biotechnol Bioeng*, 110(8): 2195-2207.
- Lee MJ, Ye AS, Gardino AK, Heijink AM, Sorger PK, MacBeath G, Yaffe MB. **2012**. Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell*, 149(4): 780-794.
- Lerouge D, Rivière A, Dansin E, Chouaid C, Dujon C, Schott R, Lavole A, Le Pennec V, Fabre E, Crequit J, Martin F, Dehette S, Fournel P, Precheur-Agulhon B, Lartigau E, Zalcman G. **2014**. A phase II study of cisplatin with intravenous and oral vinorelbine as induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy with oral vinorelbine and cisplatin for locally advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 14: 231.
- Li P, Du CR, Xu WC, Shi ZL, Zhang Q, Li ZB, Fu S. **2013**. Correlation of dynamic changes in gamma-H2AX expression in peripheral blood lymphocytes from head and neck cancer patients with radiation-induced oral mucositis. *Radiat Oncol*, 8: 155.
- Li T, Ling YH, Goldman ID, Perez-Soler R. **2007**. Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*, 13(11): 3413-3422.
- Li YY, Lam SK, Mak JC, Zheng CY, Ho JC. **2013**. Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 81(3): 354-361.
- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC. **2005**. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*, 7(6): 575-589.
- Lo HW, Hung MC. **2006**. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer*, 94(2): 184-188.

- Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M. **2005**. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25): 8984-8989.
- Ma C, Wei S, Song Y. **2011**. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis*, 3(1): 10-18.
- Magné N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Houtte PV, Gérard JP, Peyron JF. **2006**. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett*, 231(2): 158-168.
- Majno G, Joris I. **1995**. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1): 3-15.
- Malara NM, Sgambato A, Granone P, Flamini G, Margaritora S, Boninsegna A, Cesario A, Galetta D, Yang Q, Cittadini A. **1999**. Biological characterization of central and peripheral primary non small cell lung cancers (NSCLC). *Anticancer Res*, 19(3b): 2249-2252.
- Mancias JD, Kimmelman AC. **2011**. Targeting autophagy addiction in cancer. *Oncotarget*, 2(12): 1302-1306.
- Mansuet-Lupo A, Zouiti F, Alifano M, Tallet A, Charpentier MC, Ducruit V, Devez F, Lemaitre F, Laurent-Puig P, Damotte D, Blons H. **2014**. Intratumoral distribution of EGFR mutations and copy number in metastatic lung cancer, what impact on the initial molecular diagnosis? *J Transl Med*, 12(1): 131.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. **2007**. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(12): 961-967.
- Matsumoto H, Miyazaki S, Matsuyama S, Takeda M, Kawano M, Nakagawa H, Nishimura K, Matsuo S. **2013**. Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression. *Biol Open*, 2(10): 1084-1090.

- Matthews Q, Jirasek A, Lum JJ, Brolo AG. **2011**. Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy. *Phys Med Biol*, 56(21): 6839-6855.
- Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. **2012**. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy*, 8(2): 200-212.
- McDoniels-Silvers AL, Stoner GD, Lubet RA, You M. **2002**. Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues. *Neoplasia*, 4(2): 141-150.
- McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. **1994**. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res*, 54(14): 3718-3722.
- McKinnon PJ, Caldecott KW. **2007**. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8: 37-55.
- McParland BJ. **2010**. Biological effects of ionizing radiation. *Nuclear Medicine Radiation Dosimetry*, Springer: 401-453.
- Meek DW. **2004**. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9): 1049-1056.
- Mehta VK. **2012**. Radiotherapy and erlotinib combined: review of the preclinical and clinical evidence. *Front Oncol*, 2: 31.
- Meike S, Yamamori T, Yasui H, Eitaki M, Matsuda A, Morimatsu M, Fukushima M, Yamasaki Y, Inanami O. **2011**. A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression. *Mol Cancer*, 10: 92.
- Meyn RE, Munshi A, Haymach JV, Milas L, Ang KK. **2009**. Receptor signaling as a regulatory mechanism of DNA repair. *Radiother Oncol*, 92(3): 316-322.

- Minami S, Kijima T, Takahashi R, Kida H, Nakatani T, Hamaguchi M, Takeuchi Y, Nagatomo I, Yamamoto S, Tachibana I, Komuta K, Kawase I. **2012**. Combination chemotherapy with intermittent erlotinib and pemetrexed for pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase I dose-finding study. *BMC Cancer*, 12: 296.
- Miranda EI, Santana C, Rojas E, Hernández S, Ostrosky-Wegman P, García-Carrancá A. **1996**. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mutat Res*, 349(2): 173-182.
- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. **2012**. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 170325.
- Mishra KP. **2004**. Cell membrane oxidative damage induced by gamma-radiation and apoptotic sensitivity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 23(1): 61-66.
- Montanaro L, Tréré D, Derenzini M. **2008**. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol*, 173(2): 301-310.
- Morgan WF, Sowa MB. **2005**. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40): 14127-14128.
- Moroni M, Maeda D, Whitnall MH, Bonner WM, Redon CE. **2013**. Evaluation of the gamma-H2AX assay for radiation biodosimetry in a swine model. *Int J Mol Sci*, 14(7): 14119-14135.
- Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. **2005**. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med*, 110: 21-28.
- Murray D, Mirzayans R. **2013**. Role of Therapy-Induced Cellular Senescence in Tumor Cells and its Modification in Radiotherapy: The Good, The Bad and The Ugly. *J Nucl Med Radiat Ther*, (S6): 018.
- Muschel RJ, Soto DE, McKenna WG, Bernhard EJ. **1998**. Radiosensitization and apoptosis. *Oncogene*, 17(25): 3359-3363.

- Newman AC, Scholefield CL, Kemp AJ, Newman M, McIver EG, Kamal A, Wilkinson S. **2012**. TBK1 kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF-kappaB signalling. *PLoS One*, 7(11): e50672.
- Odell ID, Cook D. **2013**. Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol*, 133(1): e4.
- O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. **2011**. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy*, 7(5): 509-524.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K. **2006**. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26(24): 9220-9231.
- Oh SH, Lim SC. **2009**. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy/apoptosis induced by capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) and dihydrocapsaicin is regulated by the extent of c-Jun NH2-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase activation in WI38 lung epithelial fibroblast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(1): 112-122.
- Ohnishi T, Takahashi A, Nagamatsu A, Omori K, Suzuki H, Shimazu T, Ishioka N. **2009**. Detection of space radiation-induced double strand breaks as a track in cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, 390(3): 485-488.
- Okada H, Mak TW. **2004**. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4(8): 592-603.
- Orzáez M, Guevara T, Sancho M, Pérez-Payá E. **2012**. Intrinsic caspase-8 activation mediates sensitization of erlotinib-resistant tumor cells to erlotinib/cell-cycle inhibitors combination treatment. *Cell Death Dis*, 3: e415.
- Oxnard GR, Arcila ME, Chmielecki J, Ladanyi M, Miller VA, Pao W. **2011**. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 17(17): 5530-5537.

- Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. **2010**. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*, 28(4): 639-648.
- Pallis AG, Fennell DA, Szutowicz E, Leighl NB, Greillier L, Dziadziuszko R. **2011**. Biomarkers of clinical benefit for anti-epidermal growth factor receptor agents in patients with non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 105(1): 1-8.
- Palumbo S, Comincini S. **2013**. Autophagy and ionizing radiation in tumors: the "survive or not survive" dilemma. *J Cell Physiol*, 228(1): 1-8.
- Pan Y, Li WX, Li JM, Zhu JQ, Liang YQ, Guo AL. **2009**. [Correlation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit expression to radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines]. *Ai Zheng*, 28(7): 714-717.
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. **2005**. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2(3): e73.
- Park SY, Kim YM, Pyo H. **2010**. Gefitinib radiosensitizes non-small cell lung cancer cells through inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *Mol Cancer*, 9: 222.
- Pauwels B, Korst AE, de Pooter CM, Pattyn GG, Lambrechts HA, Baay MF, Lardon F, Vermorken JB. **2003**. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol*, 51(3): 221-226.
- Perez R, Crombet T, de Leon J, Moreno E. **2013**. A view on EGFR-targeted therapies from the oncogene-addiction perspective. *Front Pharmacol*, 4: 53.
- Peters S, Adjei AA, Gridelli C, Reck M, Kerr K, Felip E; ESMO Guidelines Working Group. **2012**. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 23 Suppl 7: vii56-64.

- Petrović I, Ristić-Fira A, Todorović D, Korićanac L, Valastro L, Cirrone P, Cuttone G. **2010**. Response of a radioresistant human melanoma cell line along the proton spread-out Bragg peak. *Int J Radiat Biol*, 86(9): 742-751.
- Petrović I, Ristić-Fira A, Todorović D, Valastro L, Cirrone P, Cuttone G. **2006**. Radiobiological analysis of human melanoma cells on the 62 MeV CATANA proton beam. *Int J Radiat Biol*, 82(4): 251-265.
- Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, Gazdar AF, Carbone DP, McClintock PR, Linnoila RI, Matthews MJ, Bunn PA Jr, Carney D, Minna JD, Mulshine JL. **1996**. NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. *J Cell Biochem Suppl*, 24: 32-91.
- Pietenpol JA, Stewart ZA. **2002**. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181-182: 475-481.
- Podgorsak E. **2005**. Technical Editor. *Radiation oncology physics: handbook for teachers and students*, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Prokakis Ch, Koletsis EN, Apostolakis E, Chatzimichalis A, Dougenis D. **2008**. Preoperative chemotherapy in early-stage (stage IB-IIIa) resectable non small cell lung cancer. Is it justified? *J buon*, 13(2): 161-168.
- Provencio M, Isla D, Sánchez A, Cantos B. **2011**. Inoperable stage III non-small cell lung cancer: Current treatment and role of vinorelbine. *J Thorac Dis*, 3(3): 197-204.
- Qu YY, Hu SL, Xu XY, Wang RZ, Yu HY, Xu JY, Chen L, Dong GL. **2013**. Nimotuzumab enhances the radiosensitivity of cancer cells in vitro by inhibiting radiation-induced DNA damage repair. *PLoS One*, 8(8): e70727.
- Quint LE, Tummala S, Brisson LJ, Francis IR, Krupnick AS, Kazerooni EA, Iannettoni MD, Whyte RI, Orringer MB. **1996**. Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 62(1): 246-250.
- Raciti M, Lotti LV, Valia S, Pulcinelli FM, Di Renzo L. **2012**. JNK2 is activated during ER stress and promotes cell survival. *Cell Death Dis*, 3: e429.

- Ranson M. **2004**. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer*, 90(12): 2250-2255.
- Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Narayanan U, Renna M, Jimenez-Sanchez M, Sarkar S, Underwood B, Winslow A, Rubinsztein DC. **2009**. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 11): 1707-1711.
- Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. **2010**. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*, 6(8): 1184-1186.
- Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA. **2009**. gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res*, 43(8): 1171-1178.
- Ricci MS, Zong WX. **2006**. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, 11(4): 342-357.
- Riely GJ, Johnson ML, Medina C, Rizvi NA, Miller VA, Kris MG, Pietanza MC, Azzoli CG, Krug LM, Pao W, Ginsberg MS. **2011**. A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *J Thorac Oncol*, 6(8): 1435-1437.
- Ristić-Fira AM, Korićanac LB, Zakula JJ, Valastro LM, Iannolo G, Privitera G, Cuttone G, Petrović IM. **2009**. Effects of fotemustine or dacarbazine on a melanoma cell line pretreated with therapeutic proton irradiation. *J Exp Clin Cancer Res*, 28: 50.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. **1999**. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, 146(5): 905-916.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. **1998**. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10): 5858-5868.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD. **2001**. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 4(5): 303-313.

- Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V. **2007**. Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology*, 242(1): 244-251.
- Rothkamm K, Löbrich M. **2003**. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9): 5057-5062.
- Rowell NP, Williams CJ. **2001**. Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. *Thorax*, 56(8): 628-638.
- Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R. **2001**. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev*, 10(1): 77-82.
- Sadeghi M, Enferadi M, Shirazi A. **2010**. External and internal radiation therapy: past and future directions. *J Cancer Res Ther*, 6(3): 239-248.
- Sage E, Harrison L. **2011**. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival. *Mutat Res*, 711(1-2): 123-133.
- Saintigny P, Burger JA. **2012**. Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discov Med*, 13(71): 287-297.
- Sak A, Stuschke M. **2010**. Use of gammaH2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*, 20(4): 223-231.
- Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Petsas T, Dougenis D. **2007**. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo*, 21(1): 123-132.
- Salim H, Akbar NS, Zong D, Vaculova AH, Lewensohn R, Moshfegh A, Viktorsson K, Zhivotovsky B. **2012**. miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell

- lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence. *Br J Cancer*, 107(8): 1361-1373.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **1989**. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sangar VK, Cowan R, Margison GP, Hendry JH, Clarke NW. **2004**. An evaluation of gemcitabine differential radiosensitising effect in related bladder cancer cell lines. *Br J Cancer*, 90(2): 542-548.
- Santarpia M, Altavilla G, Salazar MF, Magri I, Pettineo G, Benecchi S, Rosell R. **2011**. Tyrosine kinase inhibitors for non-small-cell lung cancer: finding patients who will be responsive. *Expert Rev Respir Med*, 5(3): 413-424.
- Sause WT, Scott C, Taylor S, Johnson D, Livingston R, Komaki R, Emami B, Curran WJ, Byhardt RW, Turrisi AT, et al. **1995**. Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 88-08 and Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 4588: preliminary results of a phase III trial in regionally advanced, unresectable non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 87(3): 198-205.
- Schönthal AH. **2012**. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica (Cairo)*, 2012: 857516.
- Schwartz EL, Ling YH, Zou Y, Piperdi B, Perez-Soler R. **2012**. Activation of autophagy by erlotinib protects NSCLC cells with wild-type EGFR from erlotinib cytotoxicity. *Cancer Research: April 15, 2012; Volume 72, Issue 8, Supplement 1*, Proceedings: AACR 103rd Annual Meeting 2012-- Mar 31-Apr 4, 2012; Chicago, IL
- Sechler M, Cizmicea AD, Avasarala S, Van Scoyk M, Brzezinski C, Kelley N, Bikkavilli RK, Winn RA. **2013**. Non-small-cell lung cancer: molecular targeted therapy and personalized medicine - drug resistance, mechanisms, and strategies. *Pharmacogenomics Pers Med*, 6: 25-36.
- Sequist LV, Lynch TJ. **2008**. EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: an evolving story. *Annu Rev Med*, 59: 429-442.

- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. **2007**. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(3): 169-181.
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabárbara P, Seymour L; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. **2005**. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 353(2): 123-132.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. **2004**. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6(12): 1221-1228.
- Sierra JR, Cepero V, Giordano S. **2010**. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. *Mol Cancer*, 9: 75.
- Silva MT. **2010**. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*, 584(22): 4491-4499.
- Simonetti S, Molina MA, Queralt C, de Aguirre I, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Sanchez JJ, Gonzalez-Larriba JL, Jimenez U, Isla D, Moran T, Viteri S, Camps C, Garcia-Campelo R, Massuti B, Benlloch S, Ramon y Cajal S, Taron M, Rosell R. **2010**. Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med*, 8: 135.
- Singh R, George J, Shukla Y. **2012**. Retraction: Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell Div*, 7: 15.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. **1990**. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13): 1107-1112.
- Small W. **2008**. Combining targeted biological agents with radiotherapy: Current status and future directions. Demos Medical Publishing.

- Solomon VR, Lee H. **2009**. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*, 625(1-3): 220-233.
- Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Béroud C. **2006**. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res*, 12(1): 62-69.
- Sprick MR, Walczak H. **2004**. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1644(2-3): 125-132.
- Spyratos D, Zarogoulidis P, Porpodis K, Tsakiridis K, Machairiotis N, Katsikogiannis N, Kougioumtzi I, Dryllis G, Kallianos A, Rapti A, Li C, Zarogoulidis K. **2013**. Occupational exposure and lung cancer. *J Thorac Dis*, 5(Suppl 4): S440-445.
- Suzuki M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. **2006**. Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res*, 165(3): 269-276.
- Tang J, Salama R, Gadgeel SM, Sarkar FH, Ahmad A. **2013**. Erlotinib resistance in lung cancer: current progress and future perspectives. *Front Pharmacol*, 4: 15.
- Tanida I. **2011**. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 14(11): 2201-2214.
- Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahedi N, Kroemer G. **2008**. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol*, 445: 29-76.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press: Lyon, **2004**.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang

- PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. **2011**. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6(2): 244-285.
- Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. **2008**. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, 15(7): 1153-1162.
- van Attikum H, Gasser SM. **2005**. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*, 4(8): 1011-1014.
- Vávrová J, Rezáčová M. **2011**. The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. *Folia Biol (Praha)*, 57(2): 41-46.
- Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Smyth CA, Jenkins S, Thompson JA, Eckhoff DE, Contreras JL. **2005**. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis. *Surgery*, 138(2): 342-351.
- Vitale I, G. L., Castedo M, Kroemer G. **2011**. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(6): 385-392.
- Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. **1996**. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*, 381(6584): 713-716.
- Wang M, Morsbach F, Sander D, Gheorghiu L, Nanda A, Benes C, Kriegs M, Krause M, Dikomey E, Baumann M, Dahm-Daphi J, Settleman J, Willers H. **2011**. EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 71(19): 6261-6269.
- Wang SH, Shih YL, Ko WC, Wei YH, Shih CM. **2008**. Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*, 65(22): 3640-3652.

- Weinstein IB, Joe A. **2008**. Oncogene addiction. *Cancer Res*, 68(9): 3077-3080; discussion 3080.
- Withers HR, Elkind MM. **1970**. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 17(3): 261-267.
- Wu D, Zhu H, Tang H, Li C, Xu F. **2011**. Clinical analysis of stereotactic body radiation therapy using extracranial gamma knife for patients with mainly bulky inoperable early stage non-small cell lung carcinoma. *Radiat Oncol*, 6: 84.
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. **2011**. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 10(9): 1533-1541.
- Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y. **2011**. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. *Int J Clin Oncol*, 16(4): 287-293.
- Yarden Y. **2001**. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4: S3-8.
- Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. **2002**. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*, 26(6): 767-773.
- Yatabe Y, Mitsudomi T. **2007**. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers. *Pathol Int*, 57(5): 233-244.
- Zhang QC, Jiang SJ, Zhang S, Ma XB. **2012**. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances anti-tumor effects of docetaxel or erlotinib in A549 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(7): 3471-3476.
- Zhuang HQ, Bo QF, Yuan ZY, Wang J, Zhao LJ, Wang P. **2013**. The different radiosensitivity when combining erlotinib with radiation at different administration schedules might be related to activity variations in c-MET-PI3K-AKT signal transduction. *Onco Targets Ther*, 6: 603-608.

Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. **2004**. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 4(9): 677-687.

Zong WX, Thompson CB. **2006**. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 20(1): 1-15.

Zou Y, Ling YH, Sironi J, Schwartz EL, Perez-Soler R, Piperdi B. **2013**. The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance of wild-type EGFR non-small-cell lung cancer cells to erlotinib. *J Thorac Oncol*, 8(6): 693-702.

BIOGRAFIJA

Otilija D. Keta je rođena 29.01.1983. godine u Pančevu. Gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je u Vršcu. Studijsku grupu Biologija, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine. Diplomirala je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9.15 na smeru Histologija i embriologija. Diplomski rad je odbranila na odseku za Razviće životinja pod nazivom „Postembrionalno razviće Callipodida (Myriapoda, Diplopoda)“ pod rukovodstvom prof. dr Slobodana Makarova. Doktorske studije u okviru studijskog programa Biologija ćelija i tkiva na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine.

Zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča” od 1.07.2008. godine, gde kao istraživač pripravnik, a od 2010. kao istraživač saradnik učestvuje na projektima: „Signalni putevi delovanja steroidnih hormona i uticaj endogenih i egzogenih faktora na modulaciju procesa u ćelijama sisara” (143044B), i „Radiosenzitivnost humanog genoma” (173046), finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Od 2008. godine je aktivno uključena u međunarodnu saradnju sa Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali del Sud (INFN-LNS), Katanija, Italija, na projektu “Radiobiological studies of human malignant cells after irradiation with light and heavy ions”.

Ima pet objavljenih radova u časopisima međunarodnog značaja, šest radova u časopisima domaćeg značaja, kao i devet kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Отилија Д. Кета

број индекса ВО 070003

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

In vitro студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2014.

Отилија Кета

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Отилија Д. Кета

Број индекса ВО 070003

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада: In vitro студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста

Ментори: др Александра Ристић-Фира, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду

др Александра Кораћ, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани/а Отилија Д. Кета

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2014.

Отилија Кета

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

In vitro студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2014

Олимпија Кетић