

Биолошки факултет
Број захтева: 15/458-1
Датум: 15.07.2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **Отилије Д. Кета, дипломираног биолога.**

КАНДИДАТ: **Отилија Д. Кета**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

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

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 25.10.2012. године, својим актом под бр. 02 Број: 06-20745/10-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата која је гласила:

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

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Отилије Д. Кета**, образована је на VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 09.05.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/293-09.05.2014. год. у саставу:

Име и презиме члана Комисије	Звање	Научна област
1) Др Александра Ристић-Фира	Научни саветник, Универзитет у Београду- Институт за нуклеарне науке „Винча“	Радијациона биологија, молекуларна биологија малигне ћелије
2) Др Александра Кораћ	Редовни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет	Биологија ћелија и ткива
3) Др Иван Петровић	Научни саветник, Универзитет у Београду- Институт за нуклеарне науке „Винча“	Радијациона биологија

Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: Отилије Д. Кета, на IX редовној седници одржаној 15. јула 2014. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог:

1. Извештај Комисије са предлогом.
2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја
3. Потврде о раду



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/458-15.07.2014.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IX редовној седници одржаној 15.07.2014. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Отилије Д. Кета, под називом:

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

Универзитет је дана 25.10.2012. године. својим актом под бр. 02 Број: 06-20745/10-12 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. 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 **M22**

2. Keta O., Bulat T., Korićanac L., Žakula J., Cuttone G., Privitera G., Petrović I., Ristić-Fira A. (2014) Radiosensitization of Non-Small Cell Lung Carcinoma by EGFR Inhibition. Nuclear technology & radiation protection, 2014, 29(3). **M22**

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.05.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Ристић Фира и проф. Александре Кораћ о урађеној докторској дисертацији **Отилије Д. Кета**, истраживача сарадника Лабораторије за молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, под насловом **„In vitro студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста“** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Александра Ристић Фира, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, др Александра Кораћ, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Иван Петровић, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Отилије Д. Кета**, под насловом **„In vitro студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста“** садржи 123 стране. Подељена је на уобичајена поглавља: **увод** (21 страна); **циљ** (2 стране); **материјал и методе** (12 страна); **резултати** (42 стране); **дискусија** (17 страна); **закључци** (2 стране); **литература** (27 страна). Илустрована је са 6 слика у уводу, 30 графичких прилога (фигура и слика) и једном табелом у поглављу резултати и садржи 247 цитиране библиографске јединице.

Анализа докторске дисертације:

Увод докторске дисертације, кандидаткиње Отилије Кета, садржи пет поглавља. У њему је дат јасан преглед актуелних сазнања из области које су непосредно везане за предмет дисертације.

У првом поглављу Увода дат је преглед епидемиологије и етиологије канцера плућа и указано је на чињеницу да се ради о типу канцера са највећом смртношћу Поред разлике у учесталости која постоји између полова, значајне су и разлике између популације пушача и непушача. Указано је на постојање и других фактора ризика, као што је изложеност радону, индустријским канцерогенима у које се убрајају азбест, арсен, хербициди, инсектициди и полициклични ароматични угљоводоници. Истакнута је веза између породичне анамнезе и повећаног ризика од настанка канцера плућа. Истраживања у овој области су показала да ~ 99% свих канцера плућа припада групи епителијалних

карцинома. Према класификацији Светске здравствене организације, а на основу хистолошких параметара, деле се на две основне групе: неситноћелијски (non small cell lung carcinoma - NSCLC), који чини 85% случајева и ситноћелијски (small cell lung carcinoma - SCLC), коме припада 15% оболелих. Истакнуто је да се бројни хистолошки подтипови NSCLC најчешће деле у три велике групе: аденикарцином, сквамозни карцином и карцином великих ћелија.

Даље је описано дијагностиковање аденокарцинома помоћу цитолошких метода којима се детектују промене ћелијске морфологије везане за ово патолошко стање. Указано је да ћелије могу бити појединачне или организоване у тродимензионалне структуре. Њихови нуклеуси су правилни, са гранулираним хроматином и истакнутим нуклеолусима, док је цитоплазма прозирна и може бити хомогена или испуњена вакуолама. Посебна пажња је посвећена епителијалним маркерима (AE1/AE3, CAM 5.2, EMA, CEA, CK7, CK20 и TTF-1), који се користе за класификацију аденокарцинома плућа. Назначено је да генске промене до којих долази укључују мутације које активирају онкогене или инактивирају тумор-супресорске гене. Активирани су и сигнални путеви који доводе до неконтролисане пролиферације ћелија. Негативни прогностички фактор представљају мутације TP53, LKB1, ERBB2 и BRAF гена. Због свега наведеног, упркос напретку у области хирургије, радио- и хемиотерапије, прогноза пацијената са канцером плућа је лоша.

У поглављу које се односи на терапију аденокарцинома плућа јасно је истакнуто да избор терапијског протокола зависи од хистолошког типа канцера (NSCLC или SCLC), стадијума болести и општег стања пацијента. Стандардни терапијски протокол код пацијената са NSCLC у стадијуму III подразумева примену укупне дозе зрачења од 60 Gy у фракцијама од 2 Gy, које пацијент прима током 6 недеља. Бољи ефекти радиотерапије се постижу комбиновањем са агенсима који повећавају осетљивост на зрачење (цисплатина и етопозид).

Поред тога, указано је на постојање циљане молекуларне терапије која се заснива на феномену „онкогене зависности“ канцерских ћелија. Према овом концепту, за одржавање малигног фенотипа одређених канцера „одговорни су“ специфични гени, па стога инактивација протеина које ови гени кодирају може да доведе до смрти канцерске ћелије. Истакнуто је да се у циљаној молекуларној терапији канцера плућа данас користе агенси који инхибирају сигналне путеве неопходне за преживљавање и пролиферацију канцерских ћелија. Ерлотиниб је један од агенаса који инхибирају рецептор за епидермални фактор раста (EGFR), па се стога користи у циљаној терапији NSCLC. Предности ове терапије се огледају у селективном деловању агенаса на канцерске ћелије и смањењу нежељених ефеката на здраво ткиво. Нажалост, после извесног времена долази до развијања резистентности, чија природа још увек није позната. Последњих година се интензивно ради на утврђивању мутација које доводе до настанка резистенције, као и на изналажењу начина за њено превазилажење.

У посебном поглављу описани су ефекти јонизујућег зрачења на ћелије. У том контексту изнете су основне карактеристике процеса јонизације. Јонизујуће зрачење може да буде електромагнетно (X и γ зраци), под условом да има довољно енергије да ослободи електроне из атома, или честично (протони, β зраци, α честице и други јони). Истакнуто је да јонизујуће зрачење индукује бројна оштећења ДНК: делеције базних парова, једноланчане (SSB), дволанчане (DSB) прекиде и вишеструка, комплексна оштећења. Директни ефекти јонизујућег зрачења огледају се у тренутном оштећењу ћелијских макромолекула (ДНК, фосфолипиди ћелијске мембране) и активирању унутарћелијских сигнала који се даље преносе на покретање апоптотских сигналних путева. С обзиром на то да је доминантни молекул у живим системима вода, посебно је указано на последице радиолитисе воде код индиректног деловања зрачења на биолошке системе. Дат је и преглед

основних радиобиолошких детерминанти: енергије зрачења, дозе и брзине дозе.

Полазећи од чињенице да јонизујуће зрачење изазива широк спектар ДНК лезија, од којих су са радиобиолошке тачке гледишта најзначајнији дволанчани прекиди, у посебном поглављу указано је на значај фосфорилације хистона H2AX за праћење кинетике настанка и репарације дволанчаних прекида на ДНК. Фосфорилисани H2AX (γ -H2AX) је означен као биомаркер за одређивање радиоосетљивости ћелија, а такође и као биодозиметар код излагања зрачењу, било да се ради о терапијском, космичком или акциденталном.

Истакнуто је да су за фосфорилацију H2AX одговорне три протеинкиназе: ATM, ATR и DNA-PKcs. Која ће бити активирана зависи од типа оштећења ДНК. Детаљно је описан след догађаја који прате настанак γ -H2AX. На месту DSB долази до акумулације различитих сигналних протеина (BRCA1 и 53BP1), који учествују у одржању интегритета генома. Њихова улога у активирању механизма ДНК репарације, као и контролних тачака (G1 и S/G2 блок) у ћелијском циклусу, је детаљно описана. Посебно је истакнуто да ћелије канцера имају различите поремећаје у механизмима који поправљају оштећења на молекулу ДНК. Познато је да је DNA-ПК, која је један од чланова NHEJ (non-homologous end joining) репарационог пута, повишено експримирана код радиорезистентних тумора. Због тога се у преклиничким студијама тестира способност различитих инхибитора DNA-ПК да повећају осетљивост ћелија канцера на зрачење.

Даље у тексту, посвећена је пажња развоју циљане терапије која је повезана са EGFR. Она се заснива на запажању да туморске ћелије, код којих је EGFR мутиран или прекомерно експримиран, зависе од активације EGFR сигналног пута, тако што његова инхибиција доводи до ћелијске смрти. Описана је фамилија тирозин киназа са посебним освртом на EGFR и дат је илустративан и садржајан приказ овог сигналног пута. Дефинисана су два начина инхибиције посредством EGFR: инхибирање лиганд-везујућег домена употребом моноклонских антитела, и циљано инхибирање киназног домена помоћу инхибитора тирозин киназе (EGFR TKI).

Код пацијената оболелих од NSCLC уочена је веза између постојања одређених мутација и одговора на терапију. Међу најзначајније спадају „активирајуће“ мутације (делеције и тачкасте мутације) у киназном домену EGFR-а које доводе до лиганд-независне активације рецептора. До лиганд-независне активације рецептора може да дође и услед прекомерне експресије EGFR-а која је заступљена код 62% пацијената са NSCLC и директно је повезана са лошом прогнозом болести.

Посебно је истакнута улога EGFR TKI који селективно блокирају EGFR сигнални пут везујући се за место везивања АТФ-а на тирозин киназном домену EGFR. Одлуком Америчке агенције за храну и лекове (US Food and Drug Administration-FDA), ерлотиниб (Tarceva) је 2004. године увршћен у један од терапијских протокола за пацијенте са NSCLC у узнапредовалој и метастатској фази болести. Бројне клиничке студије, које су наведене у раду, указују на значај онкогених мутација у гену за EGFR. Сматра се да ове мутације обезбеђују већу осетљивост на терапију, због тога што TKI имају већи афинитет за мутирани протеин него за његову *wt* форму. С тим у вези, јавља се потреба за идентификацијом других маркера који би још боље објаснили механизме ћелијске осетљивости и резистенције на TKI.

У посебном одељку, на крају поглавља Увод, детаљно су описани различити типови ћелијске смрти. Посебна пажња је посвећена процесу апоптозе, наводећи прво основне морфолошке промене ћелије које су карактеристичне за овај процес. Затим је дат опсежан опис два основна апоптотска пута: унутрашњег или митохондријалног и спољашњег или пута активације рецептора смрти. Указано је и на постојање везе између ова два пута, до које долази посредством каспазе 8 и Bid протеина. Посебно је истакнуто да поремећаји у регулацији ћелијске смрти могу да доведу до различитих патолошких

стања, међу којима је и канцер, болест коју карактерише неконтролисана ћелијска пролиферација и/или смањена ћелијска смрт. У том контексту истакнут је и значај тумор супресорског гена *p53*, који као одговор на оштећења ДНК, зауставља ћелијски циклус у G1 фази и регулише експресију *Bax* и *Bcl-2*. У случају када су оштећења сувише велика и не могу да се поправе, долази до покретања процеса апоптозе.

Концепт ћелијске смрти је последњих година проширен, и то нарочито у вези са третманом малигнух болести. Овим термином су обухваћени сви процеси који доводе до инактивације ћелијске пролиферације, а најзначајнији међу њима су: аутофагија, некроза, сенесценција и митотска катастрофа. Уводни део кандидаткиња завршава одличним приказом свих релевантних аспеката феномена ћелијске смрти и на тај начин повезује различите научне области и заокружује слику о биомедицинским аспектима (коришћење ерлотиниба у циљу повећања радиоосетљивости ћелија NSCLC аденокарцинома човека и праћење релевантних цитоморфолошких промена), којима се бави у дисертацији.

Полазећи од ових теоријских основа, кандидаткиња је поставила **Циљ** својих истраживања. Почетна хипотеза се заснива на чињеници да зрачење индукује повишену експресију рецептора за епидермални фактор раста (EGFR). Имајући у виду значај EGFR сигналног пута у процесу туморогенезе, овај рецептор је постао важан циљани молекул у терапији тумора. Утврђено је да је он појачано експримиран и у неситноћелијском карциному плућа и да има важну улогу у патогенези и прогнози терапијског исхода ове болести. Ерлотиниб, инхибитор тирозин киназне функције EGFR је један од првих агенаса који су уведени у циљану терапију неситноћелијског карцинома плућа. С обзиром на све наведено, истраживања синергистичког деловања ерлотиниба и зрачења у циљу побољшања антитуморског ефекта оба агенса су веома актуелна.

У оквиру ове дисертације испитиван је антитуморски ефекат појединачних и комбинованих третмана γ -зрачењем и ерлотинибом на CRL-5876 ћелије неситноћелијског карцинома плућа човека.

Због свега наведеног, постављени су следећи циљеви ове докторске дисертације:

- Да се одреде радиобиолошки параметри који дефинишу ефикасност γ -зрачења, односно његовог комбиновања са ерлотинибом, у елиминацији CRL-5876 ћелија.
- Да се прати ефикасност описаних третмана преко промене ћелијске вијабилности, пролиферативног капацитета ћелија, кинетике настанка и нестанка дволанчаних прекида на ДНК, као и промене дистрибуције ћелија по фазама ћелијског циклуса, у функцији одређеног третмана и времена.
- Да се утврде и анализирају типови ћелијске смрти који се активирају под описаним третманима. У оквиру ове студије треба описати настале морфолошке и ултраструктурне промене ћелија и на основи тих резултата дефинисати и квантификовати различите типове ћелијске смрти (митотску катастрофу, апоптозу, сенесценцију, аутофагију).
- Да се у функцији времена прати промена експресије протеина који су укључени у карактеристичне сигналне путеве који су активирани под дефинисаним третманима и покуша да расветли њихова веза са детектованим морфолошким и ултраструктурним променама.

У поглављу **Материјал и методе**, Отилија Кета детаљно и јасно описује експерименталне услове и методе које је применила.

Кандидаткиња је у дисертацији користила ћелије аденокарцинома плућа човека CRL-5876 (NCI-H1568) као *in vitro* експериментални модел. У радиобиолошке експерименте укључене су још две малигно трансформисане ћелијске линије човека, НТВ140 (Hs 249Т) ћелије меланома и 59М ћелије оваријалног канцера. Све ћелијске

линије су набављене из колекције ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Ћелије су гајене као једнослојне културе, у хранљивој подлози RPMI 1640 која је садржала 10% фетални телећи серум и антибиотике пеницилин (5000U) и стрептомицин (5 mg/ml), на температури од 37 °C, у влажној атмосфери са 5% CO₂ (Haeraus, Mannheim, Germany). Током експеримената ћелије су пасажиране два пута недељно.

Монослој ћелијских култура које се налазе у експоненцијалној фази раста је озрачиван γ -зрацима из извора ⁶⁰Co у Лабораторији за заштиту од зрачења и заштиту животне средине, Института за нуклеарне науке Винча у Београду. Озрачивање је изведено у ваздуху, на собној температури. Пластичне посуде са ћелијским монослојем су постављане вертикално, тј. под правим углом у односу на осу снопа γ -зрака. Ћелије су једнократно озрачиване дозама од 0.1, 1, 2, 4, 6 и 8 Gy, при брзини дозе од ~ 1 Gy/min. За анализу γ -H2AX протеина узорци су озрачивани на леду, у носачу који је посебно конструисан за ову намену.

Поред γ -зрачења, у експериментима је коришћен и ерлотиниб хидрохлорид (Tarceva, 150 mg; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), који је добијен љубазношћу проф. Giuseppe Privitera из Института за радиологију и радијациону онкологију „Поликлиника - Vittorio Emanuele“, Универзитета у Катанији, Италија. Концентровани 10 mM раствор ерлотиниба је прављен у DMSO и чуван на -20 °C, док су радна разблажења прављена непосредно пре употребе у хранљивој подлози RPMI 1640. На тај начин, финална концентрација DMSO у експериментима није прелазила 0.1 %.

Комбиновани третмани (γ -зрачење и ерлотиниб) су рађени тако што је 2 μ M ерлотиниб додаван CRL-5876 ћелијама 1 h пре зрачења. Озрачене ћелије су одмах након зрачења расађиване у одговарајућем броју, а подлога за гајење је садржала исту концентрацију ерлотиниба.

Клоногени есеј, који представља „златни стандард“ ћелијске радијационе биологије се данас користи и за испитивање дејства других агенаса са потенцијалном клиничком применом. Овом методом се одређује способност ћелије да формира колонију која садржи минимум 50 ћелија после протока најмање 6 периода дупликације ћелија после зрачења. Након инкубационог периода од 7 дана, CRL-5876 ћелије су обојене 0.5% кристал-виолет у 25% метанолу, испране и осушене на собној температури. Колоније које садрже 50 или више ћелија су бројане под инвертним светлосним микроскопом (Carl Zeiss, Jena, Germany). Фракција ћелија које су преживеле третмане је одређена поређењем броја колонија у третираним узорцима са бројем колонија у нетретираним контролама. Величина колонија је мерена помоћу ImageJ рачунарског програма.

Вијабилност CRL-5876 ћелија је праћена 72 h или 7 дана после појединачних или комбинованих третмана помоћу колориметријских метода (MTT и SRB тест), док је пролиферативни капацитет ћелија у истим временским тачкама одређен коришћењем комерцијалног кита за BrdU методу (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Утицај ерлотиниба и зрачења на ћелијски циклус CRL-5876 ћелија је анализиран методом проточне цитофлуориметрије (Partec, Münster, Germany). За анализу су одабране дозе од 2 и 8 Gy, у присуству или без 2 μ M ерлотиниба. Ефекти третмана су праћени у четири временске тачке: 24 h, 48 h, 72 h и 7 дана. Добијени резултати су обрађени помоћу FloMax[®] рачунарског програма. Присуство апоптотских ћелија у контролним и третираним узорцима ја одређено 48 h након третмана помоћу Annexin V-FLUOS комерцијалног кита (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

За праћење морфолошких и ултраструктурних промена CRL-5876 ћелија под описаним третманима, као и за детекцију γ -H2AX фокуса коришћене су технике светлосне и електронске микроскопије, као и имуноцитохемијске и морфометријске методе. Кинетика промена протеинске експресије током третмана праћена је методом имуноблота.

Процес аутофагије је праћен детекцијом киселих везикула (AVO) помоћу боје

акридин оранж, која у AVO емитује црвену флуоресценцију, док флуоресцира зелено када се нађе у цитоплазми или нуклеусу. Испитивања процеса сенесценције су рађена помоћу β -gal есеја, који омогућава *in situ* детекцију сенесцентних ћелија.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња добијене експерименталне податке класификује у логично организоване целине, јасно графички и илустративно приказује, уз примену одговарајуће статистичке обраде.

У поглављу **Дискусија**, Отилија Кета тумачи добијене резултате и пореди их са досадашњим научним сазнањима. Кандидаткиња полази од податка да је карцином плућа, по многим класификацијама, најчесталији тип канцера и да је упркос достигнућима савремене медицине смртност пацијената незадовољавајуће велика. Појава метастаза и брз настанак резистенције на терапију представљају проблем при креирању протокола за лечење. У том контексту је од посебног значаја испитивање и примена агенаса из домена молекуларне циљане терапије. Ерлотиниб је инхибитор тирозин киназне активности EGFR-а који се користи у терапији NSCLC. Своју улогу остварује компетитивним везивањем за АТФ-везујуће место на тирозин киназном домену рецептора и доводи до инхибиције нисходних путева који утичу на ћелијску пролиферацију. Иако је третман ерлотинибом ефикасан за пацијенте са NSCLC који имају мутације у гену за EGFR, у релативно кратком року од почетка терапије (10 до 14 месеци), долази до стварања резистенције на терапију. С обзиром на бројна отворена питања у вези молекуларних механизма и сигналних путева који леже у основи стечене резистенције на тирозин киназне инхибиторе, ово поље истраживања је изузетно актуелно.

Колегиница Кета анализира бројне студије које се баве комбинованим третманима у којима се ерлотиниб примењује уз агенсе који испољавају различите механизме деловања. Поред заједничке примене са хемиотерапеутицима, истакнуто је да је ерлотиниб потенцијални кандидат за комбиновање са радиотерапијом. Неколико кључних налаза образлаже потребу за испитивање улоге EGFR сигналног пута у циљу повећања радиоосетљивости туморских ћелија. На примеру различитих малигно трансформисаних ћелија је показано да ниске дозе зрачења могу да доведу до активације EGFR, а тиме и сигналних путева који доводе до убрзане пролиферације или репопулације ћелија канцера. Преживљавање канцерских ћелија после зрачења зависи пре свега од ефикасности поправке оштећења која су настала на DNK. EGFR учествује у модулацији процеса транслокације, транскрипције и фосфорилације кључних компоненти система DNK репарације. Резултати бројних преклиничких студија у којима је тестирано антипролиферативно дејство инхибитора EGFR у комбинацији са зрачењем, повезивани су са резултатима истраживања која су обухваћена овом докторском дисертацијом. На овај начин је потврђено да анти- EGFR третман повећава осетљивост тумора на зрачење.

Експериментална поставка ове докторске дисертације, која је пажљиво одабрана, детаљно је дискутована у овом одељку. Образложена је концентрација ерлотиниба у једнократним и комбинованим третманима, а такође и опсег доза γ -зрачења којима су изложене CRL-5876 ћелије, редослед и дужина третмана, као и временске тачке за одређене биолошке есеје. Инактивација CRL-5876 ћелија после озрачивања γ -зрацима упоређена је са клоногеним преживљавањем после комбинованог третмана (ерлотиниб + γ -зрачење). Промена нивоа радиоосетљивости, која се огледа кроз промену радиобиолошких параметара, SF2, RBE (2 Gy, γ), D₁₀ и SER (D₁₀), је детаљно дискутована у односу на резултате других истраживачких група. Резултати клоногеног преживљавања су упоређени са резултатима вијабилности и пролиферативне способности CRL-5876 ћелија, добијеним помоћу колориметријских метода. Истакнуто је да ерлотиниб повећава радиоосетљивост CRL-5876 ћелија и да се то повећање, између осталог, огледа и у вредности RBE која за комбиноване третмане износи 3.12 ± 0.44 . Коришћењем D₁₀ вредности одређен је и фактор повећања радиоосетљивости (SER), који износи 1.9 ± 0.33 .

Добијени резултати су упоређени са литературним подацима. Ниво преживљавања и радиоосетљивости CRL-5876 ћелија упоређен је у паралелним експериментима са две ћелијске линије канцера човека, HTB140 ћелијама меланома и 59М ћелијама оваријалног карцинома. Анализа резултата тестова клоногеног преживљавања, вијабилности и пролиферације је показала да су ове ћелијске линије резистентније на зрачење од CRL-5876 ћелија.

Резултати цитофлуориметријске анализе ћелијског циклуса су показали да зрачење и ерлотиниб доводе до промена у ћелијском циклусу CRL-5876 ћелија. Док зрачење изазива G2/M блок, ерлотиниб доводи до смањења броја ћелија у S фази ћелијског циклуса. Комбиновани третман доводи до највећих промена после 48 h, и оне се огледају у повећању G1 и смањењу S фазе. Резултати анализе ћелијског циклуса су комплементарни са релевантним подацима пролиферативне активности CRL-5876 ћелија. Резултати су дискутовани у односу на податке из литературе који показују да је цитостатско дејство ерлотиниба потврђено и код других ћелија карцинома плућа, као што су H226 и A549 ћелије, где примена ерлотиниба такође доводи до акумулације ћелија у G1/S фази. Промене које су детектоване на нивоу ћелијског циклуса су детаљно анализирани и у односу на улогу p53 тумор супресора.

Сегмент истраживања који се односи на испитивање фосфорилације H2AX хистона као маркера за детекцију DSB је посебно анализиран, и то како са експерименталне стране тако и у односу на добијене резултате. Показано је да број γ -H2AX фокуса после зрачења брзо расте до максимума и у наредних неколико сати постепено опада као последица активације механизма који учествују у поправци DSB. Појава резидуалних (заосталих) фокуса, који представљају места на DNK на којима је изостала репарација DSB или је дошло до неправилне поправке лезија, је посебно детаљно дискутована у овом поглављу. Резидуални γ -H2AX фокуси који су детектовани 24 h након зрачења су повезани са губитком клоногеног капацитета ћелија. Истакнута је веза добијених резултата са подацима из литературе.

Ћелијска смрт се у контексту радијационе биологије повезује са процесом који доводи до трајног губитка клоногеног капацитета ћелије. Овај приступ не узима у обзир чињеницу да неки типови ћелијске смрти, као што су апоптоза, аутофагија, митотска катастрофа, некроза и сенесценција могу да допринесу губитку клоногеног потенцијала у зависности од врсте ћелија, окружења у коме се оне налазе и примењене дозе зрачења. Због свега наведеног приступило се опсежној морфолошкој и ултраструктурној анализи CRL-5876 ћелија. Запажено је присуство различитих видова ћелијске смрти до којих долази услед појединачних или комбинованих третмана ерлотинибом и/или зрачењем. На ултраструктурном нивоу су описане значајне промене на нивоу ћелијске мембране, нуклеуса, митохондрија и ендоплазминог ретикулума (ER). Запажене су ћелије са карактеристикама стреса ER. На анализираним микрографијама су примећени крупни аутофагозоми чија мембрана највероватније настаје од веома проширених цистерни ER. Резултати анализе електронских микрографија су повезани са тестовима вијабилности и пролиферације, као и са резултатима анализе ћелијског циклуса. Они су такође детаљно дискутовани у односу на бројне литературне податке. Анализирајући појаву киселих везикула у цитоплазми озрачених ћелија показан је пораст броја или присуства ? ових структура у функцији дозе. Озрачивање CRL-5876 ћелија такође доводи до пораста експресије LC3-II. Због тога, кандидаткиња претпоставља да је аутофагија доминантан облик одговора CRL-5876 ћелија, 72 h након третмана и наводи разлоге за испољавање њене цитопротективне функције. Од свих примењених третмана и њихових комбинација, зрачење код CRL-5876 ћелија у највећем степену индукује сенесценцију, док се ефекти ерлотиниба првенствено остварују путем индукције апоптозе. У комбинацији са зрачењем долази до даљег повећања популације ћелија која је у фази апоптозе. Промена нивоа

експресије сигналних молекула за анализиране типове ћелијске смрти је у складу са цитофлуориметријским мерењима и запаженим променама ћелијске морфологије. Ови резултати су детаљно дискутовани у односу на податке из литературе.

Да би се утврдио међусобни однос између различитих типова ћелијске смрти који настају као одговор на примењене третмане, уведен је хлорокин, агенс који инхибира процес аутофагије. Кандидаткиња излаже и дискутује резултате увођења хлорокина као трећег агенса у комбиноване третмане, који доводи до даљег смањења вијабилности CRL-5876 ћелија. Запажено је да у комбинованим третманима он доводи до повећања апоптозе и смањења сенесценције CRL-5876 ћелија.

У поглављу **Закључци**, које логично следе добро поткрепљену дискусију, детаљно су сумирани добијени резултати из докторске дисертације. Комисија у свом извештају истиче најзначајније.

- На основу добијених радиобиолошких параметара, CRL-5876 ћелије NSCLC аденокарцинома човека се могу сврстати у групу радиорезистентних туморских ћелија.
- Ерлотиниб повећава осетљивост CRL-5876 ћелија на γ -зрачење и промена радиоосетљивости се огледа кроз промену вредности SF2, RBE (2 Gy, γ), D₁₀ и SER (D₁₀).
- Зрачење и ерлотиниб смањују вијабилност и пролиферацију CRL-5876 ћелија, а њихова комбинована примена доводи до веће инактивације ћелија. Ови резултати су у сагласности са вредностима које су добијене за радиобиолошке параметре. Када је ерлотиниб примењен самостално, или у комбинацији са нижим дозама зрачења, ефекат на ћелијску пролиферацију се губи после 7 дана.
- Зрачење и ерлотиниб доводе до промена у ћелијском циклусу CRL-5876 ћелија. Док зрачење изазива G2/M блок, ерлотиниб доводи до смањења броја ћелија у S фази ћелијског циклуса. Комбиновани третман доводи до највећих промена после 48 h, и оне се огледају у повећању G1 и смањењу S фазе. Резултати анализе ћелијског циклуса су комплементарни са релевантним подацима пролиферативне активности CRL-5876 ћелија.
- Зрачење индукује пораст γ -H2AX фокуса, а предтретман ерлотинибом додатно повећава њихов број. Присуство резидуалних γ -H2AX фокуса 24 h након третмана указује на кашњење процеса поправке дволанчаних прекида на ДНК, што се директно доводи у везу са редукованим клоногеним преживљавањем.
- Код CRL-5876 ћелија, зрачење и ерлотиниб доводе до бројних промена на морфолошком и ултраструктурном нивоу. Јављају се циновске ћелије са више нуклеуса, а запајају се и промене које су карактеристичне за стрес ендоплазминог ретикулума (ER). Резултати анализе електронских микрографија су повезани са тестовима вијабилности и пролиферације, као и са резултатима анализе ћелијског циклуса.
- Зрачење доводи до индукције митотске катастрофе, као и цитопротективне аутофагије. Од свих примењених третмана и њихових комбинација, зрачење код CRL-5876 ћелија у највећем степену индукује сенесценцију.
- Ефекти ерлотиниба се првенствено остварују путем индукције апоптозе. У комбинацији са зрачењем долази до даљег повећања популације ћелија која је у фази апоптозе. Промена нивоа експресије сигналних молекула за анализиране типове ћелијске смрти је у складу са цитофлуориметријским мерењима и запаженим променама ћелијске морфологије.
- Увођење хлорокина као трећег агенса у комбиноване третмане доводи до даљег смањења вијабилности CRL-5876 ћелија. Међутим, када је примењен самостално,

ефекат хлорокина се губи после 7 дана. Запажено је да у комбинованим третманима доводи до повећања апоптозе и смањења сенесценције CRL-5876 хелија.

Поглавље **Литература** садржи 247 библиографске јединице, које су адекватно и на одговарајућим местима цитиране у тексту дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

Рад у истакнутом међународном часопису - M22

1. 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 **M22**
2. Keta O., Bulat T., Korićanac L., Žakula J., Cuttone G., Privitera G., Petrović I., Ristić-Fira A. (2014) Radiosensitization of Non-Small Cell Lung Carcinoma by EGFR Inhibition. *Nuclear technology & radiation protection*, 2014, 29(3). **M22**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја – M52

1. Keta O., Bulat T., Korićanac L., Todorović D., Cirrone G.A.P., Privitera G., G Cuttone, Petrović I, Ristic-Fira A. Erlotinib enhances radiosensitivity of CRL5876 human lung adenocarcinoma cells. *LNS Activity report 2011/2012*, 336-339 **M52**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Keta O., Korićanac L., Žakula J., Popović N., Cuttone G., Petrović I., Ristić-Fira A. Radio-sensitivity of human melanoma ovarian and lung carcinoma cells to gamma radiation, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, 21-24 September 2010, Proceedings, 322-324. **M33**
2. Keta O., Bulat T., Korićanac L., Todorović D., Privitera G., Petrović I., Ristić-Fira A. Sensitivity of lung carcinoma cells to γ - rays and erlotinib. *Physical chemistry 2012*, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28 September 2012. Volume I, 382-384. **M33**
3. Keta O., Bulat T., Korićanac L., Cuttone G., Privitera G., Petrović I., Ristić-Fira A. Enhancement of radiation efficiency by erlotinib in non-small cell lung carcinoma. 40th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Dublin, Ireland, September 1-5, 2013, Oral presentation, Session 12 – Radiation Phys. Chem. Modifiers. (*Young Investigator Award*) **M34**

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б4. Радови у часописима међународног значаја

Рад у истакнутом међународном часопису - M22

1. Ristić-Fira A., Korićanac L., Žakula J., Keta O., Iannolo G., Cuttone G., Petrović I. Proton inactivation of melanoma cells encanced by fotemustine. *Radiation Protection Dosimetry*, 2011, 143(2-4), 503-507
2. Koricanac L., Žakula J., Keta O., Cirrone P., Cuttone G., Ristic-Fira A., Petrovic I. Carbon Ions Induce DNA Double Strand Breaks and Apoptosis in HTB140 Melanoma Cells. *Nuclear Technology & Radiation Protection*, 2013, 28 (2): 109-236

Рад у међународном часопису - M23

1. Ristić-Fira A., Todorović D., Žakula J., Keta O., Cirrone P., Cuttone G., Petrović I. Response of Human HTB140 Melanoma Cells to Conventional Radiation and Hadrons, *Physiological Research*, 2011, S129-135.

Б5. Радови у часописима домаћег значаја – M52

1. Ristić-Fira A., Žakula J., Korićanac L., Keta O., Petrović I., Valastro L., Iannolo G., Privitera G, Cuttone G. Induction of apoptosis by fotemustine, dacarbazine and protons in a human melanoma cell line. *LNS Activity report 2008*, 2009, 230-233.
2. Korićanac L., Žakula J., Keta O., Privitera G, Cirrone G.A.P., Cuttone G., Petrović I., Ristić-Fira A., Alteration of p53 and Bax/Bcl-2 ratio by fotemustine and proton irradiation. *LNS Activity report 2009*, 2010, 234-237.
3. Žakula J., Korićanac L., Keta O., Romano F., Cirrone G.A.P., Cuttone G., Ristić-Fira A., Petrović I., Apoptosis of HTB140 melanoma cells induced by carbon ions of different LET. *LNS Activity report 2009*, 2010, 238-241.
4. Korićanac L., Keta O., Žakula J., Bulat T., Petrović I., Cirrone G.A.P., Privitera G., Cuttone G., Ristić-Fira A. Response of human lung adenocarcinoma cells to proton irradiation, *LNS Activity report 2010*, 2011, 245-248.
5. Bulat T., Keta O., Todorovic D., Koricanac L., Cirrone G.A.P., Cuttone G., Petrovic I., Ristic-Fira A. DNA repair and cell cycle regulation after irradiation of melanoma cells with γ -rays. *LNS Activity report 2011*, 2012, 310-313.

Б6. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја – M33 и M34

1. Ristić-Fira A., Korićanac L., Žakula J., Keta O., Iannolo G., Privitera G., Cuttone G., Petrović I. Boosting inactivation capacity of melanoma cell line by combined treatments with anticancer drugs and protons. *Micros 2009 - 15th International Symposium on Microdosimetry*, Verona, Italy, October 25-30, 2009, Abstracts book B6.

2. Žakula J., Korićanac L., Keta O., Cirrone G.A.P, Cuttone G., Ristić-Fira A., Petrović I. Carbon ion beam as inducer of melanoma cell apoptosis. 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, September 21-24, 2010, Proceedings, 376-378.
3. Ristić-Fira A., Korićanac L. Todorović D., Žakula J., Keta O., Cuttone G., Petrović I., Cellular response to therapeutic hadrons. International symposium One hundred years of Ivan Djaja's Belgrade school of physiology, Belgrade, September 10-14, 2010, Book of Abstracts 82.
4. Bulat T., Keta O., Korićanac L., Todorović D., Petrović I., Ristić-Fira A. Kinetics of DSB induction and changes in cell cycle regulation in melanoma cells after ionizing radiation. Physical chemistry 2012, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28 September 2012. Volume I, 379-381.
5. Ristić-Fira A., Petrović I., Todorović D., Korićanac L., Keta O., Bulat T., Cirrone G.A.P., Romano F., Cuttone G. Response of human lung adenocarcinoma cells to proton radiation and erlotinib. ICTR-PHE 2012: International Conference on Translational Research in Radio-Oncology and Physics for Health in Europe, Geneva, Switzerland, February 27 – March 2, 2012. Radiotherapy and Oncology, 2012, 102(1), 106.
6. Ristić-Fira A., Bulat T., Keta O., Romano F., Cirrone P., Cuttone G., Petrović I. Spatio-Temporal Radiation Biology with Conventionally or Laser-Accelerated Particles for ELIMED. 2nd ELIMED Workshop and Panel. (2013) AIP Conf. Proc. 1564, 101-104.

Б7. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја - М64

1. Bulat T., Todorović D., Keta O., Cirrone P., Privitera G., Cuttone G., Petrović I., Ristić-Fira A. Efekat erlotiniba i zračenja karbonskim jonima na proliferaciju nesitnoćelijskog adenokarcinoma pluća *in vitro*. XXXVI Oktobarski zdravstveni dani, Kragujevac, 28-30.10.2011, Knjiga apstrakata, 44.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација Отилије Д. Кета, под називом „*In vitro* студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста“, представља значајан научни допринос унапређењу терапијских протокола за третман неситноћелијског аденокарцинома плућа. Кандидаткиња полази од податка да је карцином плућа међу најчесталијим типовима канцера и да је упркос доситигнућима савремене медицине смртност пацијената незадовољавајуће велика. Појава метастаза и брз настанак резистенције на терапију представљају проблем при креирању протокола за лечење. У том контексту је од посебног значаја испитивање и примена агенаса из домена молекуларне циљане терапије, као и разумевање молекуларних механизма које они покрећу. Одабрани модел систем (CRL-5876 ћелије NSCLC аденокарцинома човека) и експериментална поставка ове докторске дисертације су у сагласности са радном хипотезом. Мултидисциплинарни

приступом у решавању постављених циљева омогућава добијање релевантних података и одговора на бројна постављена питања.

У свом раду, Отилија Кета свеобухватно анализира NSCLC ћелије аденокарцинома, обрађујући посебну пажњу на начине и механизме инактивацију ових ћелија под деловањем зрачења. Испитује ефекат ерлотиниба, инхибитора тирозин киназне активности EGFR, на повећање радиоосетљивости NSCLC ћелија и прати релевантне цитоморфолошке и ултраструктурне промене на третираним ћелијама. Бавећи се феноменом ћелијске смрти кандидаткиња повезује различите научне области и заокружује слику о потенцијалним биомедицинским аспектима дисертације. Такође истражује сложене молекуларне механизме који се налазе у основи испитиваних процеса.

Као најзначајније резултате ове докторске дисертације Комисија истиче свеобухватну радиобиолошку карактеризацију CRL-5876 ћелија NSCLC аденокарцинома човека, која је сврстава у групу радиорезистентних туморских ћелија. Третман ерлотинибом повећава осетљивост CRL-5876 ћелија на γ -зрачење и тиме показује своје радиосензитизујуће дејство. Промена радиоосетљивости се огледа кроз промену низа радиобиолошких параметара: SF2, RBE (2 Gy, γ), D₁₀ и SER (D₁₀). Комбиновани третмани (зрачење + ерлотиниб) смањују вијабилност и пролиферацију ових ћелија и утичу на промене у ћелијском циклусу. Док зрачење изазива G2/M блок, ерлотиниб доводи до смањења броја ћелија у S фази ћелијског циклуса. Комбиновани третман доводи до највећих промена после 48 h, и оне се огледају у повећању G1 и смањењу S фазе. Резултати анализе ћелијског циклуса су комплементарни са релевантним подацима пролиферативне активности CRL-5876 ћелија.

Један од значајних резултата ове дисертације је присуство резидуалних γ -H2AX фокуса 24 h након третмана које указује на кашњење процеса поправке дволанчаних прекида на ДНК, што се директно доводи у везу са редукованим клоногеним преживљавањем ћелија. Запажено је да зрачење и ерлотиниб доводе до бројних морфолошких и ултраструктурних промена CRL-5876 ћелија. Јављају се циновске ћелије са више нуклеуса, а запажају се и промене које су карактеристичне за стрес ендоплазматичног ретикулума (ER). Резултати анализе електронских микрографија су повезани са тестовима вијабилности и пролиферације, као и са резултатима анализе ћелијског циклуса. Показано је да зрачење доводи и до индукције митотске катастрофе, као и до појаве цитопротективне аутофагије. Од свих примењених третмана и њихових комбинација, зрачење код CRL-5876 ћелија у највећем степену индукује сенесценцију. Ефекти ерлотиниба се првенствено остварују путем индукције апоптозе. Промена нивоа експресије сигналних молекула за анализирани типове ћелијске смрти је у складу са цитофлуориметријским мерењима и запаженим променама ћелијске морфологије. Увођење хлорокина као трећег агенса у комбиноване третмане доводи до даљег смањења вијабилности CRL-5876 ћелија. Запажено је да у комбинованим третманима доводи до повећања апоптозе и смањења сенесценције CRL-5876 ћелија.

На основу свега наведеног произилази значај ове докторске дисертације, како за област ћелијске радиобиологије, тако и за развој нових терапијских стратегија за третман неситноћелијског карцинома плућа.

Познавајући Отилију Кета од почетка њеног истраживачког рада, Комисија жели да истакне њену посвећеност и прецизност у овој професији. То потврђују објављени научни радови из докторске дисертације, укупна библиографија

кандидаткиње, као и међународна награда *Young Investigator Award* коју јој је, за резултате ове докторске дисертације, 2013. године доделило European Radiation Research Society.

На основу изложених чињеница о докторској дисертацији Отилије Кета, које указују на квалитет и научни допринос постигнутих резултата, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и омогући Отилији Д. Кета да јавно одбрани своју докторску дисертацију под насловом „*In vitro* студија неситноћелијског карцинома плућа: ефекат јонизујућег зрачења и инхибитора тирозин киназне активности рецептора за епидермални фактор раста“.

Комисија:

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

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

**др Иван Петровић, научни саветник
Институт за нуклеарне науке „Винча“,
Универзитет у Београду**

У Београду, 30.06.2014. године