

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Miodrag D. Dragoj

EFEKTI INHIBICIJE CXCR4 RECEPTORA I
FOKALNE ADHEZIONE KINAZE U
SUPRESIJI INVAZIJE I PREVAZILAŽENJU
REZISTENCIJE KOD NESITNOĆELIJSKOG
KARCINOMA PLUĆA

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Miodrag D. Dragoj

**EFFECTS OF CXCR4 RECEPTOR AND
FOCAL ADHESION KINASE INHIBITION IN
SUPPRESSING INVASION AND
OVERCOMING DRUG RESISTANCE IN
NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORI:

dr Goran Brajušković, vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

dr Tijana Stanković, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Jelena Dinić, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu, u okviru projekta III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, kojim rukovodi dr Nikola Tanić.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Tijani Stanković koja je kvalitetno osmislila ovu disertaciju i pružila pomoć u svim fazama realizacije, naročito prilikom rešavanja problema i diskutovanja dobijenih rezultata. Neizmerno joj se zahvaljujem na ukazanom poverenju i podršci tokom izrade ove disertacije u čijem ostvarenju mi je uvek pomagala svojim znanjem i iskustvom.

Prof. dr Goranu Brajuškoviću se zahvaljujem na podršci tokom osnovnih i doktorskih studija, pokroviteljskom odnosu i pomoći u oblikovanju disertacije.

Dr Nikoli Taniću se zahvaljujem na pruženoj prilici za rad u nauci i podršci tokom izrade ove disertacije.

Dr Milici Pešić se zahvaljujem što mi je omogućila da steknem novo naučno iskustvo u Laboratoriji grupe za Farmakologiju Univerziteta u Tesaliju.

Dr Jeleni Dinić se zahvaljujem na svim praktičnim svetima i pomoći u izradi i oblikovanju disertacije.

Dr Konstanos Dimasu, dr Xrisidi Tsimblouli i Evangelii Sereti se zahvaljujem na pomoći u uspostavljanju in vivo modela i tumačenju dobijenih rezultata.

Puno hvala dragim kolegicama iz laboratorije 25 što su uvek spremni da pruže profesionalnu i prijateljsku pomoć i podršku, kao i na divnom druženju na Institutu i van njega.

Posebnu i neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestri, Neveni i Petru, bez čije ljubavi, razumevanja, bodrenja i pomoći nijedan moj uspeh ne bi bio moguć.

SAŽETAK

Rak pluća je najčešće dijagnostikovani tip malignih tumora i vodeći uzrok smrti od malignih oboljenja. Na osnovu kliničke prognoze i odgovora na terapiju čak 85% raka pluća se svrstava u tip nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NSCLC). Iako manje agresivan od sitnoćelijskog karcinoma pluća (SCLC), NSCLC lošije odgovara na terapiju. Dva najčešća uzroka neuspeha lečenja NSCLC-a klasičnom hemioterapijom su pojave metastaza i rezistencije na citostatike. Ovi procesi su regulisani brojnim signalnim molekulima, među kojima su i CXC hemokinski receptor 4 (CXCR4) i fokalna adhezijska kinaza (FAK), čije ciljano inhibiranje predstavlja obećavajući pristup u lečenju NSCLC-a. Cilj ove studije je bio da se ispita uloga CXCR4 i FAK-a u invazivnosti i rezistenciji NSCLC-a, kao i potencijal inhibicije ovih molekula u supresiji invazije i reverziji rezistencije kod ovog tipa karcinoma pluća. Konkretno, za ispitivanje uloge CXCR4 i FAK-a u invazivnosti NSCLC-a uspostavljen je *in vitro* sistem ćelija sa različitim funkcionalnim statusom p53 i PTEN tumor supresora, kao i *in vivo* ortotopni metastatski model NSCLC-a sa p53/PTEN deficijentnim tumorima. U ispitivanom *in vitro* sistemu istovremena inaktivacija p53 i PTEN tumor supresora dovela je do aktivacije CXCR4 i FAK molekula i nishodnih signalnih molekula AKT-a i ERK-a, što je bilo praćeno povećanjem invazivnog i migratornog potencijala ćelija. Primenom specifičnih inhibitora CXCR4 i FAK-a, WZ811 i PF-573228, pokazan je potencijal primene inhibicije ovih molekula u supresiji invazije i migracije p53-/PTEN- NSCLC ćelija, kao i metastatskog širenja agresivnih p53/PTEN deficijentnih tumora u *in vivo* modelu. U daljem toku studije za ispitivanje uloge CXCR4 i FAK-a u razvoju rezistencije NSCLC-a na hemioterapiju korišćene su rezistentne ćelijske linije, NCI-H460/R i COR-L23, koje se odlikuju povećanom ekspresijom ABCB1, odnosno ABCC1 transportera. Pokazano je da kombinovani tretmani inhibitorima CXCR4 i FAK-a sa doksorubicinom (DOX) uspešno senzitivizuju rezistentne ćelije na pomenuti citostatik. Ispitujući mehanizam reverzije rezistencije utvrđeno je da kombinovani tretmani smanjuju fosforilaciju FAK-a i AKT-a i dovode do aktivacije *senescence*-a. Istovremeno sa senzitivizacijom ćelija na DOX, kombinovanim tretmanima je uspešno suprimirana i invazija rezistentnih ćelija.

Imajući u vidu da su rezistencija na terapiju i metataziranje dva najvažnija problema u lečenju NSCLC-a, rezultati studije pokazuju da ciljano inhibiranje CXCR4 i FAK-a, kao i njihova kombinacija sa standardnim hemioterapeuticima, može predstavljati dobar terapijski pristup u lečenju ovog oboljenja.

KLJUČNE REČI: CXCR4, FAK, p53, PTEN, invazivnost, doksorubicin, rezistencija, ABCB1, ABCC1, nesitnoćelijski karcinom pluća

NAUČNA OBLAST: Molekularna onkologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Kancerogeneza

ABSTRACT

Lung cancer is the most commonly diagnosed type of malignant tumor and the leading cause of cancer death. Based on clinical prognosis and therapy response, up to 85% of lung cancer is classified as non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Although NSCLC is less aggressive than small cell lung carcinoma (SCLC), its response to therapy is worse than SCLC. Two major causes of therapy failure of NSCLC with classic chemotherapeutics are the development of metastasis and chemotherapy resistance. Among other signaling molecules, CXCR4 receptor and focal adhesion kinase (FAK) are known to regulate these processes and their targeted inhibition represents a promising approach in the treatment of NSCLC. The aim of this study was to examine the role of CXCR4 and FAK in the invasiveness and resistance of NSCLC, as well as the potential of their inhibition in the suppression of invasion and the reversal of resistance in this type of lung carcinoma. In order to examine the role of CXCR4 and FAK in the invasiveness of NSCLC, *in vitro* system of cancer cell lines with different functional status of the p53 and PTEN tumor suppressors was established, as well as *in vivo* orthotopic metastatic model of NSCLC with p53/PTEN deficient tumors. The simultaneous inactivation of p53 and PTEN tumor suppressors in *in vitro* system lead to significant increase in invasive and migratory potential associated with activation of CXCR4 and FAK molecules and their downstream signaling molecules, AKT and ERK. The potential for suppressing invasion and migration of p53-/PTEN- NSCLC cells, as well as the metastatic spread of aggressive p53/PTEN deficient tumors in *in vivo* model, has been shown by the application of specific inhibitors of CXCR4 and FAK, PF-573228 and WZ811. Furthermore, resistant cell lines NCI-H460/R and COR-L23 were used to investigate the role of CXCR4 and FAK in the development of NSCLC resistance to chemotherapy. NCI-H460/R and COR-L23 cells are characterized by an increased expression of ABCB1 and ABCC1 transporters, respectively. Our results additionally indicate that inhibition of CXCR4 and FAK in combination with DOX successfully sensitized NSCLC cells to the aforementioned cytostatic. By examining the mechanism of sensitization of NSCLC cells to DOX, it has been discovered that combined treatments reduced phosphorylation of FAK and AKT and lead to activation of senescence. Simultaneously with sensitization of cells to DOX, combined treatment successfully suppressed the invasion of resistant cells.

Considering that resistance to therapy and metastasis are the two most important problems in NSCLC treatment, the results of the study show that targeted inhibition of CXCR4 and FAK, as well as their combination with standard chemotherapeutics, could be a promising therapeutic approach in the treatment of this disease.

KEY WORDS: CXCR4, FAK, p53, PTEN, invasion, doxorubicin, resistance, ABCB1, BACC1, non-small cell lung carcinoma

SCIENTIFIC FIELD: Molecular oncology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Cancerogenesis

LISTA SKRAĆENICA

ABC – engl. ATP binding cassette	dATP – engl. deoxyadenosine triphosphate
ABCB1 – engl. ATP binding cassette subfamily B member 1	dCTP – engl. deoxycytosine triphosphate
ABCC1 – engl. ATP binding cassette subfamily C member 1	dGTP – engl. deoxyguanosine triphosphate
ACTB – engl. actin beta	dNTP – engl. deoxyribonucleoside triphosphate
ADP – engl. adenosine diphosphate	dTTP – engl. deoxythymidine triphosphate
AKT – familija serin/treonin specifičnih protein kinaza	DEPC – engl. diethyl pyrocarbonate
ALK – engl. anaplastic lymphoma kinase	DMSO – engl. dimethyl sulfoxide
APS – engl. ammonium persulfate	DNK – deoksiribonukleinska kiselina
ATCC – engl. American Type Culture Collection	DOX – doksorubicin
ATP – engl. adenosine triphosphate	ECACC – engl. European Collection of Authenticated Cell Cultures
AV – aneksin-V-FITC	EDTA – etilendiamin tetraacetat
BAX – engl. Bcl-2-associated X protein	EGFR – engl. epidermal growth factor receptor
Bcl-2 – engl. B cell lymphoma-2	EGTA – engl. ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BSA – engl. bovine serum albumin	ELISA – engl. enzyme-linked immunosorbent assay
cAMP – eng. cyclic adenosine monophosphate	ERK – engl. extracellular signal-regulated protein kinases
CNS – centralni nervni sistem	ETM – engl. epithelial–mesenchymal transition
Cpt – cisplatin	FA – engl. focal adhesion
CXCL12 – engl. C-X-C motif chemokine 12	FAK – engl. focal adhesion kinase
CXCR4 – engl. C-X-C chemokine receptor type 4	
DAG – engl. diacylglycerol	

FAK-CD – engl. carboxyl-terminal domain of FAK

FB – engl. fast blue

FBS – engl. fetal bovine serum

FDA – engl. Food and Drug Administration

FDG – engl. fluorescein-di- β -D-galacto-pyranoside

FREM – engl. four-point-one, ezrin, radixin, moesin

GAPDH – engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GDP – engl. guanosine diphosphate

GTP – engl. guanosine triphosphate

HIV – engl. human immunodeficiency virus

HRP – engl. horseradish peroxidase

IC50 – engl. inhibitory concentration (50% inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolu)

IgG – imunoglobulin G

IP3 – engl. inositol (1,4,5)-trisphosphate (inositol (1,4,5)-trifosfat)

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

JAK – engl. janus tyrosine kinase

kDNK – komplementarna DNK

MAPK – engl. mitogen-activated protein kinase

MDM2 – engl. mouse double minute 2 homolog

MDR – engl. multidrug resistance

MDR1 - engl. multidrug resistance protein 1

MMP – engl. matrix metalloproteinase

MRP1 – engl. multidrug resistance-associated protein 1

MTT – engl. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NF-kB – nuklearni faktor kB

NSCLC – engl. non-small cell lung carcinoma

NSG – NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ

p130Cas – engl. p130 Crk-associated substrate

PAGE – engl. polyacrylamide gel electrophoresis

PBS – engl. phosphate buffered saline

PCR – engl. polymerase chain reaction

PFA – engl. paraformaldehide

PI – engl. propidium Iodide

PI3K – engl. phosphoinositide 3-kinase

PIP2 – engl. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3 – engl. phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PLC – engl. phospholipase C

PKC – engl. protein kinase C

Prk2 – engl. proline-rich kinase-2

PS – engl. phosphatidylserine

PFT- α – engl. Pifithrin- α

PTEN – engl. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

WHO – engl. World Health Organization

PTX – engl. paclitaxel

PVDF – engl. polyvinylidene fluoride

Pyk2 – engl. protein-rich tyrosine kinase 2

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS1 – engl. receptor tyrosine kinase

RT – engl. reverse transcription

SCID – engl. severe combined immunodeficiency

SCLC – engl. small cell lung carcinoma

SDF-1 – engl. stromal cell-derived factor 1

SDS – engl. sodium dodecyl sulfate

STAT – engl. signal transducer and activator of transcription

TB – engl. trypan blue

TBE – engl. tris-borate-EDTA

TBS-T – engl. tris buffered saline with Tween 20

TCGA – engl. the cancer genome atlas

TEMED – engl. tetramethylethylenediamine

TGF β – engl. transforming growth factor

TNF α – engl. tumor necrosis factor α

TNM – engl. tumor-nod-metastasis

VEGF – engl. vascular endothelial growth factor

WFI – engl. wather for injection

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. TUMOR – OPŠTE KARAKTERISTIKE.....	1
1.2. INVAZIVNOST I METASTAZIRANJE TUMORA.....	3
1.2.1. CXCR4 – OPŠTE KARAKTERISTIKE I ULOGA U METASTAZIRANJU.....	8
1.2.2. FAK – OPŠTE KARAKTERISTIKE I ULOGA U METASTAZIRANJU.....	11
1.2.3. P53 i PTEN TUMOR SUPRESORI – OPŠTE KARAKTERISTIKE I ULOGA U REGULACIJI EKSPRESIJE I AKTIVNOSTI CXCR4 I FAK-a	14
1.3. REZISTENCIJA NA HEMIOTERAPIJU	17
1.3.1. ULOGA CXCR4 I FAK U RAZVOJU REZISTENCIJE	21
1.4. KARCINOM PLUĆA.....	23
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA.....	23
1.4.2. TERAPIJA NSCLC-a.....	25
1.4.3. ULOGA CXCR4 I FAK-a U PROGRESIJI I METASTAZIRANJU NSCLC-a.....	27
1.4.4. ULOGA ABCB1 I ABCC1 U REZISTENCIJI NSCLC-a NA HEMIOTERAPIJU.....	29
1.4.5. ULOGA CXCR4 I FAK-a U REZISTENCIJI NSCLC-a NA HEMIOTERAPIJU.....	31
1.4.6. CILJANA TERAPIJA NESITNOĆELIJSKOG KARCINOMA PLUĆA.....	31
2. CILJEVI.....	35
3. MATERIJAL I METODE.....	37
3.1. LEKOVI I FARMAKOLOŠKI INHIBITORI	37
3.2. UZORCI TKIVA	37
3.3. ĆELIJSKE LINIJE.....	38
3.4. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA.....	39
3.5. TEST CITOTOKSIČNOSTI LEKOVA I INHIBITORA.....	40
3.5.1. POJEDINAČNI I KOMBINOVANI TRETMANI ĆELIJA.....	40
3.5.2. MTT TEST VIJABILNOSTI.....	41
3.5.3. ANALIZA CITOTOKSIČNOG EFEKTA KOMBINACIJE TERAPEUTIKA	42
3.6. ANALIZE ĆELIJA PROTOČNOM CITOFLUORIMETRIJOM.....	43
3.6.1. ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI.....	43
3.6.2. ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA.....	44
3.6.3. AKUMULACIJA DOKSORUBICINA.....	44
3.6.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GALAKTOZIDAZE	45

3.6.5.	ODREĐIVANJE KOLIČINE CXCR4 PROTEINA.....	46
3.7.	IZOLACIJA PROTEINA IZ ČELIJA I WESTERN BLOT ANALIZA	46
3.7.1.	IZOLACIJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	46
3.7.2.	ELEKTROFOREZA PROTEINA.....	47
3.7.3.	ELEKTROTRANSFER PROTEINA	48
3.7.4.	IMUNOLOŠKA DETEKCIJA IMOBILIZOVANIH PROTEINA	48
3.7.5.	SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOBLOTOVA.....	49
3.8.	ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE.....	49
3.8.1.	IZOLACIJA RNK.....	49
3.8.2.	PROVERA KVALITETA RNK.....	50
3.8.3.	TRETMAN DNA- <i>zom</i> I REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCije (RT).....	51
3.8.4.	ANALIZA EKSPRESIJE GENA METODOM KVANTITATIVNOG PCR-a (qPCR) U REALNOM VREMENU.....	51
3.9.	ISPITIVANJE INVAZIVNOG I MIGRATORNOG POTENCIJALA ČELIJA.....	52
3.9.1.	TEST ZARASTANJE POVREDE.....	52
3.10.	TEST DEGRADACIJE ŽELATINA.....	52
3.10.1.	TEST INVAZIVNOSTI ČELIJA.....	54
3.11.	EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	55
3.12.	EKSPERIMENTALNI DIZAJN ANIMALNIH MODELA	56
3.12.1.	SUBKUTANA INOKULACIJA ČELIJA.....	56
3.12.2.	INTRAPLEURALNA INOKULACIJA ČELIJA	56
3.12.3.	TRETMANI ŽIVOTINJA SA INTRAPLEURALNO INOKULISANIM ČELIJAMA....	57
3.13.	STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA	57
4.	REZULTATI.....	59
4.1.	FUNKCIONALNI STATUS P53 I PTEN TUMOR SUPRESORA I NJIHOVA INHIBICIJA U NSCLC ČELIJAMA.....	59
4.2.	RAZLIKE U INVAZIVNOM I MIGRATORNOM POTENCIJALU NSCLC ČELIJA ...	63
4.3.	NIVO EKSPRESIJE CXCR4, FAK-a, AKT-a I ERK-a U ČELIJAMA SA INAKTIVNIM P53 I PTEN TUMOR SUPRESORIMA.....	67
4.4.	ANTI-INVAZIVNI EFEKTI PF-573228 I WZ811 INHIBITORA NA NSCLC ČELIJSKIM LINIJAMA SA NEAKTIVNIM P53 I PTEN TUMOR SUPRESORIMA	72
4.5.	CITOTOKSIČNI EFEKTI PF-573228 I WZ811 INHIBITORA NA NCI-H460 ^{p53-/PTEN-} I COR-L23 ČELIJAMA	78
4.6.	PROMENE U NIVOU pFAK, pAKT I pERK PROTEINA KOD NCI-H460 ^{p53-/PTEN-} I COR-L23 ČELIJA NAKON TRETMANA SA PF-573228 I WZ811	78

4.7. RAZLIKE U TUMORIGENOM POTENCIJALU NCI-H460 I COR-L23 ĆELIJA U <i>IN VIVO</i> SISTEMU	82
4.8. RAZLIKE U INVAZIVNOM I METASTATSKOM POTENCIJALU NCI-H460 I COR-L23 ĆELIJA U <i>IN VIVO</i> SISTEMU	84
4.9. ULOGA PF-573228 I WZ811 INHIBITORA U SMANJIVANJU METASTATSKOG POTENCIJALA COR-L23 ĆELIJA U <i>IN VIVO</i> SISTEMU	86
4.10. ANALIZE POVEZANOSTI EKSPRESIJE GENA <i>FAK I CXCR4</i> SA <i>ABCBI I ABCCI</i> U UZORCIMA PACIJENATA OBOLELIH OD NSCLC-a	87
4.11. ANALIZA EKSPRESIJE GENA <i>ABCBI I ABCCI</i> KOD NSCLC ĆELIJSKIH LINIJA88	
4.12. SENZITIVNOST NSCLC ĆELIJSKIH LINIJA NA KLASIČNE HEMIOTERAPEUTIKE	90
4.13. EKSPRESIJA <i>CXCR4</i> RECEPTORA KOD NSCLC ĆELIJA	90
4.14. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA SENZITIVNOST NCI-H460/R I COR-L23 ĆELIJA NA DOX	94
4.15. AKUMULACIJA DOX-a KOD REZISTENTNIH ĆELIJA NAKON KOMBINOVANIH TRETMANA	97
4.16. DISTRIBUCIJA ĆELIJSKOG CIKLUSA KOD REZISTENTNIH ĆELIJA NAKON KOMBINOVANIH TRETMANA	99
4.17. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA INDUKCIJU ĆELIJSKE SMRTI KOD REZISTENTNIH ĆELIJA	101
4.18. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA INDUKCIJU <i>SENESCENCE</i> -a KOD REZISTENTNIH ĆELIJSKIH LINIJA	103
4.19. PROMENE U NIVOU pFAK, pAKT I pERK PROTEINA KOD REZISTENTNIH ĆELIJA NAKON KOMBINOVANIH TRETMANA	105
4.20. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA INVAZIVNE I MIGRATORNE SPOSOBNOST REZISTENTNIH ĆELIJA	108
4.21. CITOTOKSIČNI EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA PF-573228 I WZ811 SA DOX-om NA REZISTENTNIM ĆELIJAMA NAKON 24 SATA	111
5. DISKUSIJA	112
6. ZAKLJUČCI	126
7. LITERATURA	129

1. UVOD

1.1. TUMOR – OPŠTE KARAKTERISTIKE

Tumor predstavlja oboljenje ćelije koje nastaje nakupljanjem genetičkih i epigenetičkih promena u genomu, usled čega ona postaje nestabilna i proliferativno superiorna. Za razliku od benignih tumora koji ostaju lokalizovani na mestu nastanka, maligni tumori se odlikuju visokim mitotskim indeksom i sposobnošću invazije i migracije. Procenjuje se da je 5% malignih tumora kod ljudi izazvano virusima, 5% zračenjem, a preostalih 90% hemijskim agensima. Među hemijski indukovanim tumorima 30% je uzrokovano duvanskim dimom, a ostatak agensima koji su povezani sa ishranom, profesijom i životnim okruženjem (Malarkey i ostali, 2013). Razvoj tumora kod ljudi podrazumeva složeni niz događaja koji može trajati i više decenija. Tokom ovog višestepenog procesa, u genomu ćelija se nagomilavaju mutacije i to u alelima proto-onkogenima i tumor-supresor gena odgovornih za regulaciju vitalnih ćelijskih procesa, kao što su ćelijski ciklus, apoptoza i očuvanje stabilnosti genoma (Hahn i Weinberg, 2002). U tim uslovima, dolazi do dramatičnog narušavanja homeostaze i ćelije prolaze kroz proces transformacije (Slika 1.) tokom koga stižu niz novih karakteristika (Hanahan i Weinberg, 2011) kao što su:

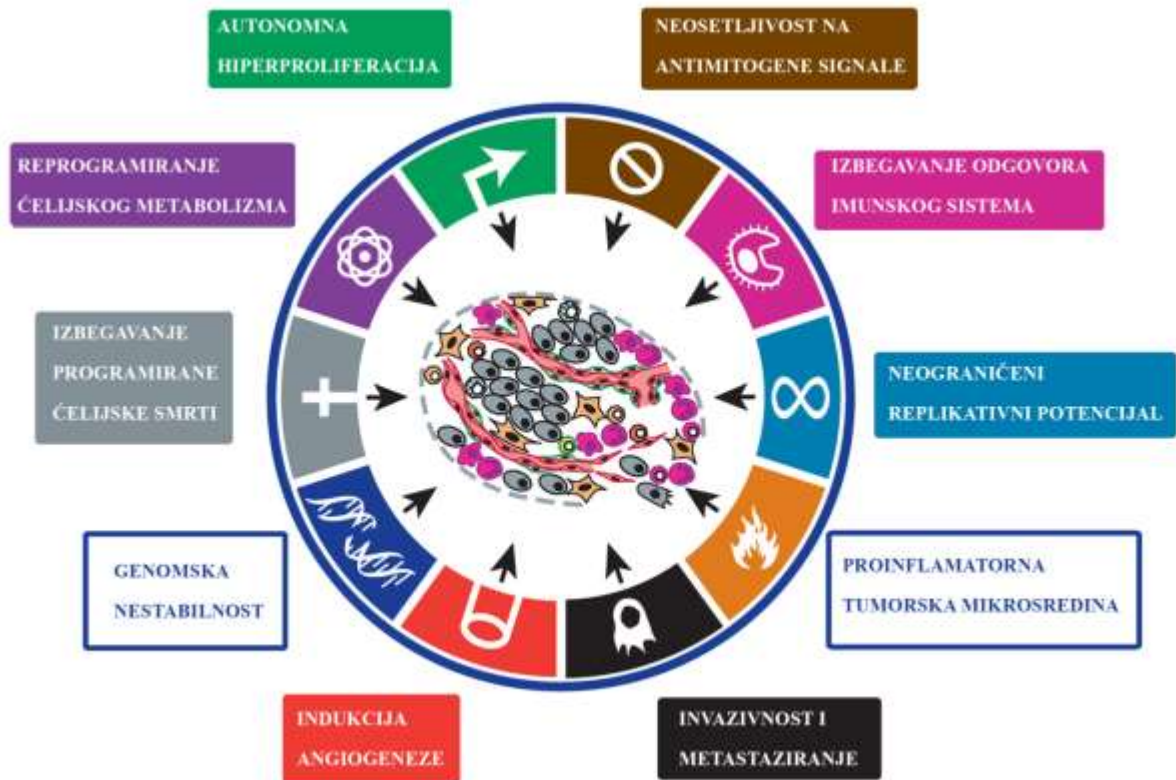
1. **Autonomna hiperproliferacija** – javlja se u odgovoru na stimulaciju rasta i deobe tumorske ćelije, kao posledica povećane autokrine produkcije faktora rasta, prekomerne ekspresije ili mutacione aktivacije receptora rasta ili usled konstitutivne aktivacije signalnih puteva nizvodno od ovih receptora;
2. **Neosetljivost na antimitogene signale** – usled promena u regulatornim i efektornim molekulima ćelijskog ciklusa, tumorske ćelije ne odgovaraju na antimitogene signale koji regulišu ćelijski rast, proliferaciju i diferencijaciju;
3. **Izbegavanje programirane ćelijske smrti apoptozom** - usled deregulacije aktivnosti proteina koji učestvuju u kontroli ovog procesa i promena mehanizama koji prepoznaju promene u ćeliji koje vode u apoptozu.
4. **Neograničeni replikativni potencijal** - zahvaljujući promenama u ekspresiji i aktivnosti telomeraza kod tumorskih ćelija ne dolazi do skraćivanja DNK na krajevima hromozoma nakon deobe, usled čega takve ćelije imaju sposobnost

da izbegnu prelazak u stanje ćelijskog mirovanja (engl. senescence) i stiču neograničeni replikativni potencijal;

5. **Indukcija angiogeneze** – usled povećane produkcije stimulatora angiogeneze od strane tumorskih ćelija, dolazi do stvaranja novih krvnih sudova (vaskulogenza) kao i do stvaranja novih krvnih sudova iz već postojećih (angiogeneza);
6. **Invazivnost i metastaziranje** – usled epitelijalno-mezenhimalne tranzicije, degradacije ekstraćelijskog matriksa i narušavanja međućelijskih interakcija, tumorske ćelije stiču sposobnost invazije u okolna tkiva i formiranja metastaza u udaljenim organima;
7. **Izbegavanje imunskog odgovora** – sposobnost tumorskih ćelija da izbegnu prepoznavanje i uklanjanje od strane ćelija imunskog sistema;
8. **Reprogramiranje ćelijskog metabolizma** – sposobnost reprogramiranja ćelijskog metabolizma ka alternativnim metaboličkim putevima, kao što je anaerobna glikoliza, što omogućava efikasnije korišćenje energije i opstanak u anaerobnim uslovima.

Procesi koji leže u osnovi sticanja navedenih karakteristika (Slika 1.) su:

1. **Genomska nestabilnost** – nagomilavanje genetičkih promena kao posledica mutacija u genima odgovornim za očuvanje stabilnosti genoma, što vodi povećanoj stopi mutacija i njihovoj akumulaciji u genomu (Hanahan i ostali, 2000).
2. **Proinflamatorna mikrosredina** – tumorska mikrosredina je bogata inflamatornim ćelijama, koje predstavljaju nezaobilazni faktor u neoplastičnom procesu i koje imaju važnu ulogu u podsticanju proliferacije i migracije (Coussens i Werb, 2002).



Slika 1. Ilustrovani prikaz osnovnih karakteristika malignih tumora. Pored osam osnovnih karakteristika, na slici su prikazani i procesi koji leže u osnovi sticanja navedenih karakteristika, genomska nestabilnost i proinflamatorna tumorska mikrosredina. (Preuzeto i modifikovano prema Hanahan i Weinberg, 2011).

Genomska nestabilnost i inflamatorna mikrosredina, zajedno sa velikim brojem ćelijskih deoba potrebnih za formiranje makroskopskih tumora, dovode do genetičkog diverziteta u populaciji ćelija tumora. Upravo heterogenost ćelija je razlog za izuzetnu varijabilnost u fenotipskim karakteristikama tumora, što dovodi do pojave populacije ćelija sa izraženim metastatskim potencijalom, kao i sposobnošću da prežive terapiju (Marusyk i ostali, 2012).

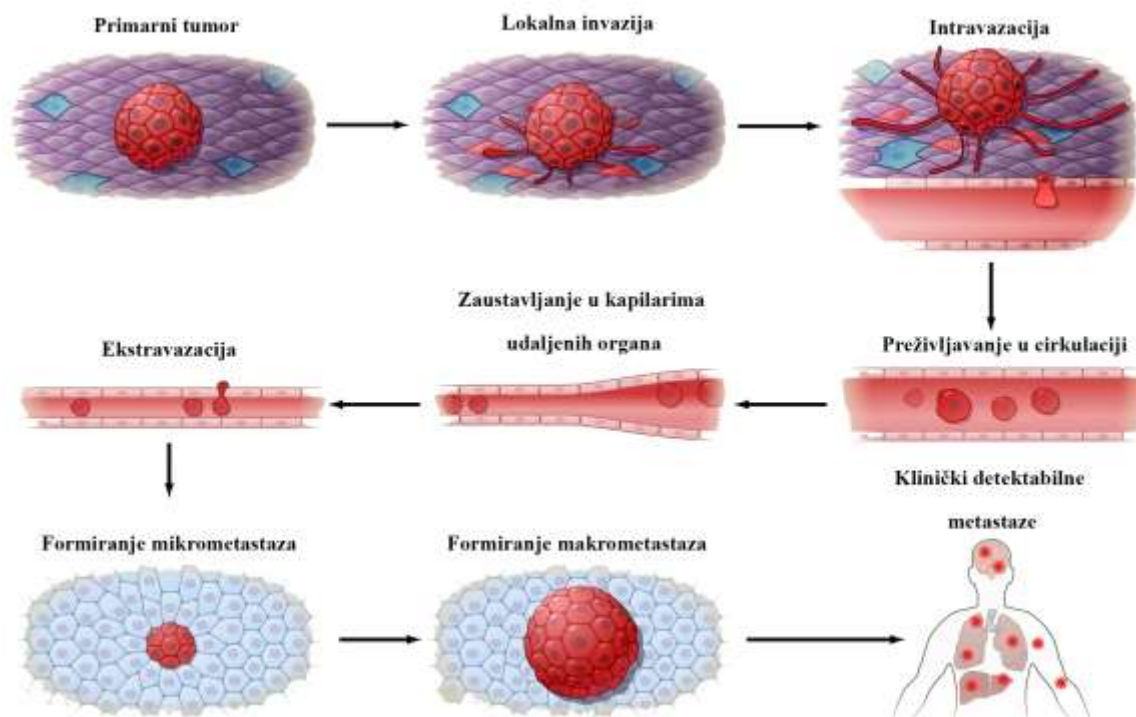
1.2. INVAZIVNOST I METASTAZIRANJE TUMORA

Jedan od najvećih problema u lečenju raka predstavlja invazivnost ćelija tumora i njihova sposobnost da formiraju metastaze. Na mestu nastanka tumora formira se primarna tumorska masa, koja je odgovorna za samo 10% smrti uzrokovanih malignim oboljenjima. Za preostalih 90% smrtnih slučajeva od

maligniteta odgovoran je proces metastaziranja (Weinberg, 2007b). Metastaze predstavljaju krajnji rezultat višestepenog procesa, invazivno-metastatske kaskade, koji uključuje širenje ćelija raka na anatomske udaljene organe, njihovo prilagođavanje u novoj mikrosredini i formiranje sekundarnog tumora. Do konačnog formiranja sekundarnog tumora dolazi nakon prolaska ćelija kroz niz složenih procesa, koji obuhvataju (Slika 2.):

1. lokalnu invaziju ćelija tumora kroz okolni ekstraćelijski matriks i kroz slojeve stromalnih ćelija,
2. intravazaciju u limfne i krve sudove,
3. preživljavanje u cirkulaciji,
4. zaustavljanje unutar kapilara udaljenih organa,
5. ekstravazaciju u parenhim drugih organa,
6. inicijalno preživljavanje u novoj mikrosredini i formiranje mikrometastaza i
7. ponovno uključivanje proliferativnog programa i formiranje makrometastaza (Fidler, 2003).

Prvi korak u diseminaciji ćelija tumora i formiranju metastaza u udaljenim organima, je odvajanje metastatskih ćelija od primarnog tumora. U normalnim fiziološkim uslovima, ćelije se drže unutar svojih definisanih granica zahvaljujući čvrstim adhezivnim vezama sa susednim ćelijama i ekstraćelijskim matriksom. Ukoliko izgube kontakt sa drugim ćelijama ili ekstraćelijskim matriksom, ćelije epitela ili endotelijuma ulaze u apoptozu. Ovaj način aktiviranja apoptoze se još naziva i anoikis, i predstavlja mehanizam kojim se višećelijski organizmi štite od kretanja ćelija izvan njihovih uobičajenih anatomske pozicije. Da bi uspešno napustile primarnu tumorsku masu, metastatske ćelije razvijaju brojne mehanizme za izbegavanje anoikisa. Takođe, zahvaljujući sposobnosti da raskidaju i formiraju adhezivne veze, metastatske ćelije stiču povećanu pokretljivost, a samim tim i sposobnost da migriraju i invadiraju u okolno tkivo. Pokretljivost započinje polarizacijom ćelije koja je praćena polimerizacijom aktina i formiranjem adhezivnih veza u pravcu kretanja ćelije (Alizadeh i ostali, 2014; Guan, 2016).



Slika 2. Invazivno-metastatska kaskada. Klinički detektabilne metastaze predstavljaju krajnji rezultat serije kompleksnih događaja, koji se zajedno nazivaju invazivno-metastatska kaskada. Tokom metastatskog progressa, tumorske ćelije napuštaju primarni tumor (lokalna invazija, intravazacija), dospevaju do udaljenih organa (preživljavanje u cirkulaciji, zaustavljanje u kapilarima udaljenih organa, ekstravazacija) i prilagođavaju se stranoj mikrosredini (formiranje mikrometastaze, metastatska kolonizacija). (Preuzeto i modifikovano prema Valastyan i Weinberg, 2011)

Adhezija ćelija se ostvaruje najčešće putem integrina, koji povezuju molekule u ekstraćelijskom matriksu sa citoskeletom ćelija. Nakon vezivanja sa ekstraćelijskim matriksom, integrini se grupišu na plazma membrani što vodi ka efikasnoj regrutaciji i aktivaciji različitih molekula unutar ćelije, kao što su adapterski proteini (npr. P130Cas i Crk), neregulatorne tirozin kinaze (npr. Src familija kinaza i fokalna adheziona kinaza (FAK)), male GTPaze (npr. Rho, Rac i Cdc42) i citoskeletni proteini (npr. talin, vinkulin i paksilin). Regrutovanjem pomenutih molekula sa unutrašnje strane plazma membrane formira se specijalizovani intracelularni kompleks nazvan fokalna adhezija ili fokalni kontakt, (engl. focal adhesion, FA) (Nagano i ostali, 2012). Fokalna adhezija predstavlja dinamični kompleks, koji pored posredovanja u prenosu signala, ima važnu ulogu i u migraciji ćelija. Integrini učestvuju i u produkciji matriksnih metaloproteinaza (MMP) neophodnih za

proteolitičku razgradnju ekstraćelijskog matriksa i bazalne membrane prilikom invazije metastatskih ćelija. Zahvaljujući povećanoj pokretljivosti, kao i sekreciji i aktivaciji MMP-a, ćelije tumora napuštaju primarnu masu i invadiraju u stromu povezanu sa tumorom, a zatim invadiraju i u parenhim susednog neizmenjenog tkiva (Mon i ostali, 2006).

Nakon invazije u stromalni odeljak, ćelije tumora imaju direktan pristup krvnim i limfnim sudovima, što im omogućava poboljšano snabdevanje hranljivim materijama i kiseonikom (Weinberg, 2007a). U cilju obezbeđivanja dovoljne količine ovih resursa za ubrzani rast, tumori dodatno indukuju lokalnu angiogenezu i formiraju nove krvne sudove. Pored toga, novoformirani krvni sudovi uglavnom imaju slabe međućelijske veze što ćelijama tumora obezbeđuje lakši ulazak u krvotok. Takođe, faktori koji lokalno utiču na funkciju endotelijalnih barijera, kao što su transformišući faktor rasta- β (engl. transforming growth factor- β , TGF β) ili vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) sintetisani od strane tumorskih ćelija, utiču na povećanje broja ćelija tumora koje ulaze u krvotok (Reymond i ostali, 2013).

Nakon uspešne intravazacije, maligne ćelije mogu putovati krvotokom ili limfotokom na udaljena mesta u telu. Međutim, napuštanje primarnog tumora i promena okruženja može negativno uticati na ćelije tumora i dovesti do njihove smrti. Ćelije tumora su zavisne od mitogenih faktora i faktora preživljavanja u mikrosredini tumora, koje im mogu nedostajati nakon napuštanja primarne mase i ulaska u cirkulaciju. Pored toga, krvotok predstavlja neodgovarajuće okruženje za tumorske ćelije, u kome su one izložene delovanju hidrodinamčkog pritiska, kao i ćelijama imunskog sistema (Weinberg, 2007b).

Ukoliko prežive sve navedene uslove i prepreke okruženja, maligne ćelije započinju ekstravazaciju. U ovom kompleksnom procesu ćelije napuštaju krvotok ili limfotok na udaljenim mestima u organizmu koja su podložna za razvoj metastaza. Pre više od 100 godina, Stephen Paget je prvi postavio *seed and soil* hipotezu o metastaziranju, objašnjavajući ovaj proces botaničkim terminima, kao interakciju "semena" (engl. seed), tj. ćelija tumora, i "odgovarajućeg zemljišta" (engl. soil), tj. mikrosredine organa. Ovom hipotezom se ističe da metastaze u određenim organima nisu posledica slučajnosti već rezultat specifičnih interakcija malignih ćelija i

mikrosredine organa i da do formiranja metastaza dolazi samo u slučaju kad su ćelije tumora i mikrosredina organa kompatibilni (Paget, 1889). James Ewing je, 40 godina kasnije osporio *seed and soil* teoriju i predložio hipotezu prema kojoj se metastatska diseminacija odvija isključivo pod dejstvom mehaničkih faktora koji su rezultat anatomske strukture vaskularnog sistema (Peinado i ostali, 2017).

Međutim, brojnim eksperimentima je kasnije pokazano da mesto ekstravazacije najčešće zavisi od oba faktora, mehaničkih faktora kao i specifičnih faktora u metastatskoj niši. Tačnije, pokazano je da se ekstravazacija malignih ćelija najčešće odvija u malim kapilarima koji su sličnog dijametra kao i ćelije koje metastaziraju (Stoletov i ostali, 2010). To dovodi do njihovog usporavanja i zaustavljanja, a potom i do formiranja stabilnih adhezivnih veza sa endotelijalnim ćelijama krvnih sudova. Pored toga, endotelijalne ćelije u vaskulaturi različitih organa prikazuju specifične receptore na površini i za formiranje adhezivnih veza zahtevaju ekspresiju srodnih liganada i receptora na malignim ćelijama. Široki spektar liganada i receptora doprinosi procesu ekstravazacije, uključujući selektine, integrine, kadherine, hemokine, CD44 i superfamiliju imunoglobulinskih receptora (Reymond i ostali, 2013). Od svih hemokina, CXCL12 (poznat i kao SDF-1, engl. stromal cell-derived factor-1) je najčešće uključen u ekstravazaciju ćelija tumora i formiranje metastaza. Smatra se da CXCL12, izlučen od strane stromalnih ćelija u udaljenim organima, privlači ćelije tumora koje eksprimiraju CXCR4 receptor i stimuliše njihovu migraciju, adheziju i ekstravazaciju (Domanska i ostali, 2013).

Pored toga što su CXCL12/CXCR4 uključeni u ekstravazaciju, oni imaju i važnu ulogu u preživljavanju metastatskih ćelija u novom okruženju i podsticanju formiranja metastatskih lezija (Massagué i Obenauf, 2016; Singla i ostali, 2015; Wald i ostali, 2013). Nakon ekstravazacije, ćelije tumora, kada dospeju u parenhim tkiva, mogu započeti formiranje sekundarne tumorske mase u novim okruženjima, procesom koji se naziva kolonizacija. U ovom procesu metastatske ćelije se susreću sa novim tkivnim okruženjem u kome nedostaju faktori rasta i preživljavanja koji su omogućili njihovim progenitorima uspešno formiranje primarnog tumora (Weinberg, 2007b). Da bi se razvila sekundarna metastatska lezija, ćelije tumora moraju biti u mogućnosti da komuniciraju sa različitim stromalnim ćelijama nove sredine. Mnogi

od ovih događaja oslanjaju se na interakciju između hemokina i specifičnih receptora, najčešće CXCL12 liganda i njegovog CXCR4 receptora (Domanska i ostali, 2013).

Iako metastaze predstavljaju glavni uzrok smrti od raka, sam proces metastaziranja je veoma neefikasan. Veliki broj cirkulišućih malignih ćelija može se detektovati u krvotoku pacijenata obolelih od raka (Nagrath i ostali, 2007). Međutim, kao što je rečeno, ćelije raka moraju da savladaju mnogobrojne prepreke prolazeći kroz opisane korake neophodne za kolonizaciju udaljenih organa i formiranje sekundarnog tumora. Shodno tome, procenjuje se da manje od <0,01% malignih ćelija koje dospeju u sistemska cirkulaciju konačno razviju makroskopske metastaze (Chambers i ostali, 2002).

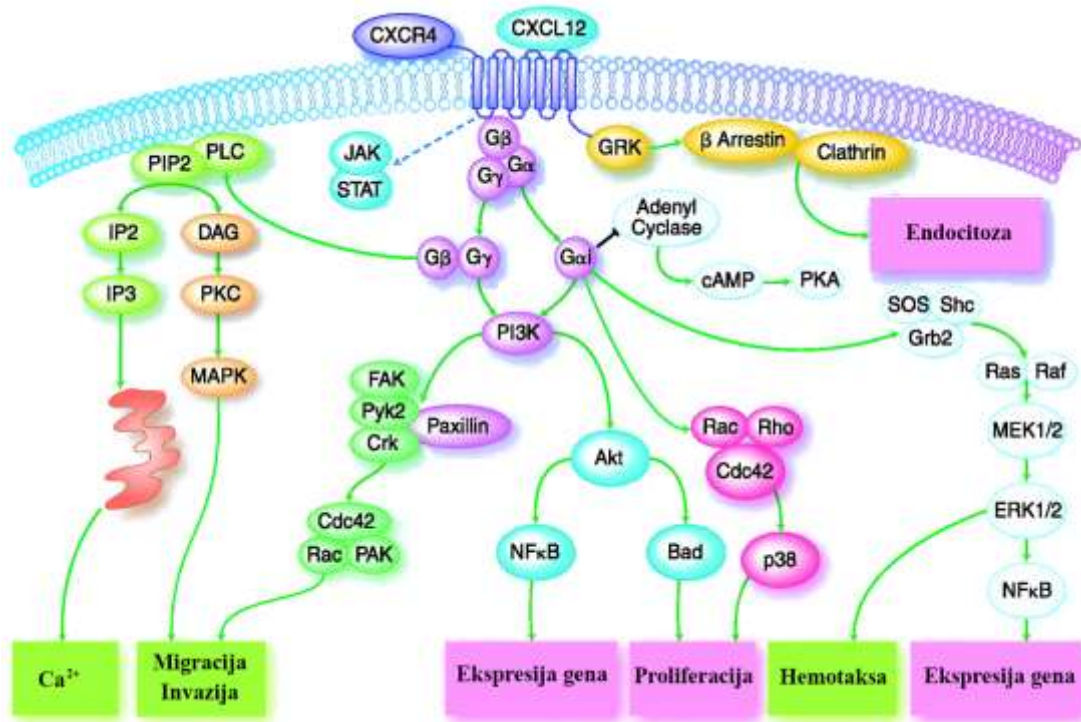
Brojni molekuli su uključeni u invazivno-metastatsku kaskadu, među kojima se izdvajaju CXCR4 receptor i FAK koji omogućavaju uspešnu kolonizaciju udaljenih organa i formiranje makroskopskih metastaza.

1.2.1. CXCR4 – OPŠTE KARAKTERISTIKE I ULOGA U METASTAZIRANJU

Hemokini su familija od 48 malih sekretornih hemotaktičkih citokina veličine oko 70-80 aminokiselina. Oni su uključeni u brojne važne biološke procese kao što su migracija ćelija, imunski nadzor, inflamacija, apoptoza i angiogeneza. Svojim učesćem u pomenutim procesima hemokini regulišu embriogenezu, hematopoezu, aktivnost urođenog i stečenog imunskog sistema, kao i promociju rasta tumora (Raman i ostali, 2011). Hemokini su podeljeni na 4 podtipa u zavisnosti od pozicije dva cisteinska ostatka na N-terminalnom kraju proteina: CXC, CC, C i CX3C. Kod ljudi je opisano preko 48 hemokina i 19 hemokinskih receptora. Neki receptori vezuju samo jedan ligand, dok drugi mogu biti aktivirani različitim hemokinima. Hemokinski receptori su G protein spregnuti receptori sa sedam transmembranskih domena i imenovani su na osnovu liganda koji vezuju. Tako su receptori koji vezuju CXC hemokine nazvani CXC receptori (CXCR), oni koji vezuju CC hemokine - CC receptori, CX3C hemokine - CX3C receptori, a oni koji vezuju C hemokine XC receptori (Zlotnik i Yoshie, 2000).

Među hemokinskim receptorima, CXCR4 je najčešće eksprimiran kod tumora (Zlotnik i ostali, 2011). Ovaj receptor je takođe poznat i pod nazivom *fusin*, i jedan je od najispitivanijih hemokinskih receptora zbog ranije otkrivene uloge kao ključnog receptora za ulazak HIV virusa u ćelije (Feng i ostali, 1996). Iako su početne studije bile usmerene na proučavanje učešća CXCR4 u HIV infekciji T-ćelija, njegova uloga u tumorigenezi postala je intenzivna tema ispitivanja nakon njegovog povezivanja sa hroničnom leukemijom, kao i sa regulacijom organ specifičnih metastaza u modelima raka dojke (Möhle i ostali, 1999; Müller i ostali, 2001).

Do danas, povećana ekspresija CXCR4 je povezana sa patogenezi 23 različite vrste raka kod ljudi, uključujući rak pluća, bubrega, mozga, prostate, jajnika i kože. Povećana ekspresija ovog receptora doprinosi rastu tumora, angiogenezi, rezistenciji na terapeutike, a posebno je značajna njegova uloga u metastaziranju. Kao primer njegove uloge u kancerogenezi ističe se studija na transgenom mišijem modelu tumora dojke u kojoj je pokazano da inhibicija CXCR4 receptora dovodi do smanjenja rasta tumora za čak 56% (Hassan i ostali, 2011). Prekliničke studije na različitim malignim tumorima su pokazale da je metastaziranje ćelija raka posredovano aktivacijom CXCR4 receptora i da je njihova migracija usmerena prema organima koji visoko eksprimiraju CXCL12. Kao definitivna potvrda uloge CXCR4 u metastaziranju, eksperimenti na metastatskim mišijim modelima su pokazali da inhibicija CXCR4 dovodi do smanjenog formiranja metastaza kod tumora dojke, raka debelog creva, prostate, hepatocelularnog karcinoma, osteosarkoma i melanoma (Domanska i ostali, 2013).



Slika 3. Šematski prikaz CXCL12/CXCR4 posredovanih intracelularnih signalnih puteva. CXCR4 je najčešće eksprimirani hemokinski receptor kod tumora. Povećana ekspresija i aktivacija CXCR4 receptora, kao i aktivacija njegovih nishodnih signalnih molekula (PI3K/AKT, MAPK/ERK i FAK) doprinosi rastu tumora, rezistenciji na terapeutike i metastaziranju. (Preuzeto i modifikovano prema Teicher i Fricker, 2010).

Za razliku od drugih hemokinskih receptora, CXCR4 vezuje samo CXCL12 kao ligand. Vezujući CXCL12, ovaj receptor inicira aktivaciju različitih nishodnih puteva koji rezultiraju u velikom broju odgovora (Slika 3.), kao što je povećanje nivoa intracelularnog kalcijuma, transkripcije gena, hemotakse, proliferacije i preživljavanja malignih ćelija (Domanska i ostali, 2013). Nakon vezivanja liganda za CXCR4 receptor, heterotrimerni G-kuplovani protein se aktivira zamenom GDP za GTP i dovodi do aktivacije dva glavna proteina u prenosu signala unutar ćelije, fosfolipaze C (PLC) i fosfatidilinozitol-3-OH kinaze (PI3K). PLC aktivira fosfatidil inozitol specifične kinaze koje hidrolizuju PIP2 generišući na taj način dva sekundarna glasnika, IP3 i DAG, što vodi ka aktivaciji brojnih protein kinaza, uključujući PKC i MAPK (Bendall i ostali, 2005; Mellado i ostali, 2001; Teicher i Fricker, 2010). S druge strane, aktivirana PI3K kinaza fosforiliše brojne komponente fokalne adhezije, kao što su prolin bogata kinaza 2 (engl. proline-rich kinase-2, Prk2), FAK i

citoskeletni protein paksilin. Ovim signalnim putem, CXCR4 reguliše procese reorganizacije aktinskog citoskeleta i promene neophodne za migraciju tumorskih ćelija (Wang i ostali, 2000). Takođe, PI3K kinaza inicira aktivaciju AKT-a, za koji je poznato da reguliše preživljavanje ćelija inaktivacijom Bcl2 proteina, stabilizacijom β -katenina i njegovim premeštanjem u jedro, kao i aktivacijom transkripcije gena koji promovišu proliferaciju i migraciju. Regulisanje ovih procesa putem aktivacije CXCR4 receptora takođe se odvija i preko p38 i MAPK/ERK signalnih puteva (Slika 3.) (Teicher i Fricker, 2010; Wang i ostali, 2016).

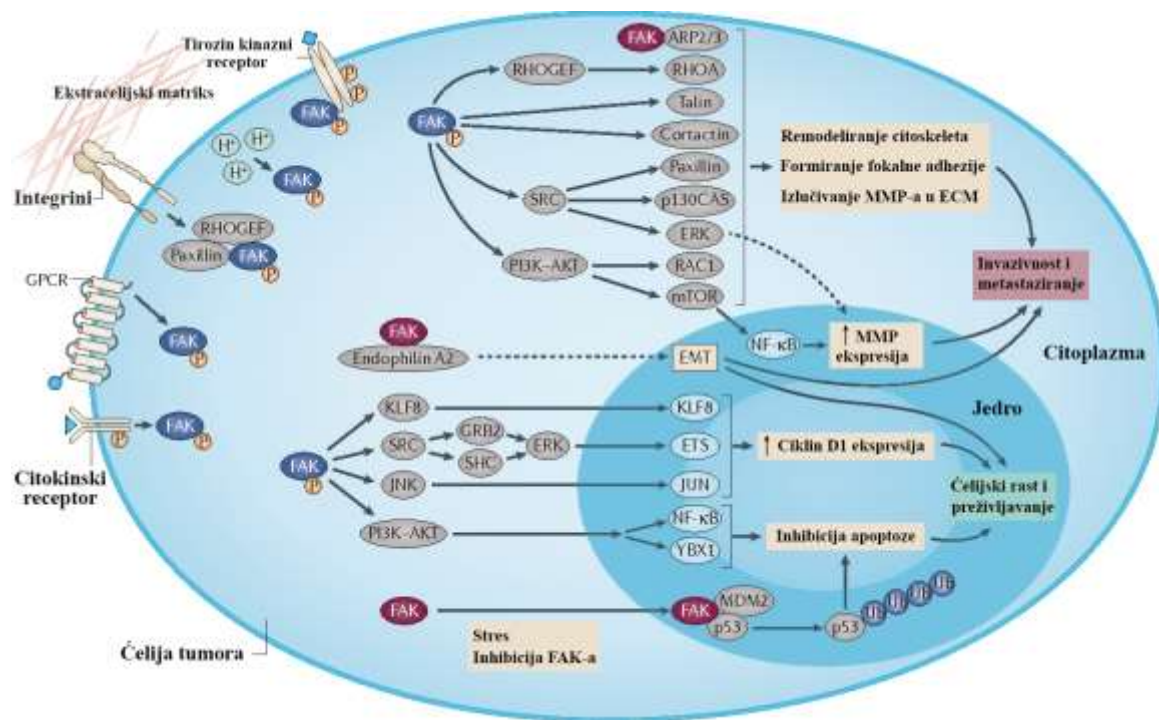
1.2.2. FAK – OPŠTE KARAKTERISTRIKE I ULOGA U METASTAZIRANJU

FAK je ne-receptorna protein tirozin kinaza koja se aktivira interakcijama sa integrinima, receptorima faktora rasta, G-kuplovanim receptorima i receptorima citokina, i ima ključnu ulogu u regulaciji adhezije, pokretljivosti, preživljavanja i proliferacije. Ova tirozin kinaza je osnovni intracelularni medijator promena koje se dešavaju u okoloćelijskoj sredini, kao što su remodelovanje ekstraćelijskog matriksa ili promene u dostupnosti hranljivih materija i faktora rasta (Yoon et al. 2015).

FAK je otkriven od strane dve različite grupe istraživača čiji je cilj bio proučavanje molekularnih mehanizama tumorigeneze. Prva grupa istraživača ispitivala je da li aktivacija integrinskih signalnih puteva može da obezbedi rast neizmenjenih ćelija nezavisno od kontakta sa podlogom (Ferrell i ostali, 1989; Golden i ostali, 1990). Druga grupa istraživača je identifikovala i klonirala ključne supstrate v-Src-a u cilju razumevanja mehanizama transformacije ćelija ovim onkoproteinom (Kanner i ostali, 1990; Schaller i ostali, 1992). Ubrzo je utvrđeno da ista tirozin kinaza, teška 120kD, ima veoma važnu ulogu u obe pomenute studije i nazvana je fokalna adhezijska kinaza, zahvaljujući predominantnoj lokalizaciji u fokalnim adhezijama. Od 1990. godine, kada je ova kinaza prvi put opisana, brojne studije su je povezale sa nizom drugih bioloških i patoloških procesa, kao i sa važnom ulogom u razvoju, progresiji i metastaziranju tumora (Zhao i Guan, 2009).

Gen koji kodira FAK protein mapiran je na humanom hromozomskom regionu 8q24.3, koji je povezan sa čestim aberacijama kod humanih maligniteta (Sulzmaier i ostali, 2014). Sekvenca gena *FAK* (*PTK2*) sastoji se od 34 egzona. Postoji nekoliko mehanizama aktivacije FAK-a kao što su: amplifikacija gena, povećana ekspresija i alternativno iskrajanje iRNK, kao i fosforilacija, defosforilacija i sumoilacija proteina (Golubovskaya, 2014).

Protein FAK se sastoji iz tri domena: kinazni domen, N-terminalni FERM (engl. four-point-one, ezrin, radixin, moesin) domen i C-terminalni domen. FAK kinazni domen se nalazi u sredini proteina i sadrži više mesta na kojima aminokiselina tirozin (Y) može biti fosforilisana, kao što su Y576, Y577 i mesto autofosforilacije Y397. N-terminalni FERM domen FAK proteina je odgovoran za njegovu kinazno nezavisnu funkciju (Calalb i ostali, 1995). U okviru ovog domena nalaze se nukleus-lokalizujuća sekvenca (engl. nuclear localization sequence, NLS) i mesto vezivanja za N-terminalni domen p53 tumor supresora. Takođe, nedavno objavljene studije pokazuju da FERM domen ima značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti FAK-a, koju ostvaruje tako što vezivanjem za kinazni domen onemogućava pristup Y397 aminokiselini i time sprečava autofosforilaciju (Frame i ostali, 2010). S druge strane, interakcija FERM domena sa aktivatorima, kao što su integrini, receptori faktora rasta ili hemokinski receptori, dovodi do konformacione promene koja oslobađa kinazni domen i dovodi do aktivacije i autofosforilacije FAK proteina (Cooper i ostali, 2003; Frame i ostali, 2010). C-terminalni domen FAK proteina, slično FERM domenu, učestvuje u brojnim protein-protein interakcijama i sastoji se od dva prolinom bogata regiona i FAT (engl. focal adhesion targeting) regiona. Zajedno sa FERM domenom, FAT domen ima ulogu u dimerizaciji koja je neophodna za aktivaciju FAK proteina i njegovu jedarnu lokalizaciju (Brami-Cherrier i ostali, 2014).



Slika 4. Šematski prikaz FAK poredovanih signalnih puteva i ćelijski procesi koje reguliše. FAK podstiče ćelijski rast i metastaziranje kinazno zavisnom (plava boja) i kinazno nezavisnom (crvena boja) aktivnošću. (Preuzeto i modifikovano prema Sulzmaier i saradnici, 2014).

Prve studije na FAK proteinu pretpostavile su da ima važnu ulogu u transformaciji ćelija v-Src onkogenom, pokazujući da njegova aktivacija u izostanku adhezivnih signala doprinosi tumorigenezi kroz promovisanje proliferacije i preživljavanja ćelija (Guan i Shalloway, 1992). Danas se zna da povećana ekspresija i aktivacija FAK-a ima veoma važnu ulogu i u metastaziranju tumora (Sulzmaier i ostali, 2014). FAK se izdvaja kao jedan od najvažnijih medijatora integrinskih signala i regulatora ćelijske adhezije (Slika 4.). Kao odgovor na adheziju ćelije, FAK se regrutuje u region fokalnih adhezija, autofosforiliše se i dalje aktivira nekoliko signalnih puteva povezanih sa migracijom i invazijom tumorskih ćelija. Najbolje je ispitana uloga FAK/Src kompleksa koji se formira nakon autofosforilacije Y397 FAK i vodi ka dodatnoj Y925 fosforilaciji i aktivaciji RAS/ERK signalnog puta (Schlaepfer i ostali, 1994). Dodatno, FAK preko autofosforilisanog Y397 mesta vezuje p85 subjedinicu PI3K, što vodi ka aktivaciji PI3K/AKT signalnog puta (Reiske i ostali, 1999). Pored aktivacije pomenutih signalnih puteva kod tumorskih ćelija, FAK učestvuje i u produkciji matrisknih metaloproteinaza (MMP) neophodnih za

proteolitičku razgradnju ekstraćelijskog matriksa i bazalne membrane prilikom invazije metastatskih ćelija (Mon i ostali, 2006).

1.2.3. P53 i PTEN TUMOR SUPRESORI – OPŠTE KARAKTERISTIKE I ULOGA U REGULACIJI EKSPRESIJE I AKTIVNOSTI CXCR4 I FAK-a

Brojni faktori regulišu ekspresiju i aktivaciju CXCR4 i FAK-a, utičući na taj način na migratorne i invazivne sposobnosti ćelija tumora. Među najznačajnijim regulatorima ovih molekula izdvajaju se p53 i PTEN tumor supresori (Ben-Baruch, 2009; Phillips i ostali, 2003).

Inaktivacija **p53** tumor supresora je jedna od najčešćih promena koje se javljaju kod malignih tumora. Gen *TP53*, prvi put opisan 1979. godine, bio je prvi tumor supresorni gen koji je identifikovan. Prvobitno se verovalo da je onkogen, ali podaci dobijeni 10 godina nakon njegovog otkrića definitivno su potvrdili njegovu tumor supresorsku funkciju (Levine i ostali, 2004). Gen *TP53* se nalazi na kratkom kraku hromozoma 17 (17p13) i kodira protein koji se sastoji od 393 aminokiseline. To je jedarni fosfoprotein od 53 kDa koji se sastoji od dva N-terminalna transaktivaciona domena praćena evolutivno očuvanim prolin bogatim domenom, centralnim DNK-vezujućim domenom, oligomerizacionim domenom neophodnim za stvaranje funkcionalnih tetramera i C-terminalnim domenom koji poseduje signale za premeštanje u jedro (Joerger i Fersht, 2016).

Tumor supresor p53 se označava kao čuvar genoma i jedan je od najčešće proučavanih molekula u kancerogenezi zbog kompleksnosti i značajnosti njegovih funkcija u ćeliji. Ovaj tumor supresor je uključen u regulaciju brojnih osnovnih ćelijskih procesa, uključujući popravku DNK oštećenja, ćelijski ciklus, apoptozu, autofagiju, ćelijsko mirovanje i metabolizam ćelija (Kasthuber i Lowe, 2017). On funkcioniše kao regulatorni protein koji pozitivno ili negativno reguliše ekspresiju preko 150 gena. U normalnim fiziološkim uslovima p53 se održava na niskom nivou zahvaljujući brojnim regulatorima, pre svega MDM-2 (engl. Murine Double Minute 2) proteinu koji funkcioniše kao p53-specifična ubikvitin E3 ligaza. Ova MDM-2-zavisna degradacija p53 proteina se zaustavlja kao odgovor na različite stimulse, kao

što su pojava oštećenja DNK ili replikacioni stres prouzrokovan aktivacijom onkogeni. U tim uslovima p53 protein reverzibilno zaustavlja ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa, i omogućava popravku DNK pre dalje deobe ćelija. Ukoliko oštećenja DNK ne mogu biti popravljena, p53 pokreće programiranu ćelijsku smrt, apoptozu (Miyashita i ostali, 1994).

Gubitak p53 ne samo da ima važnu ulogu u inicijaciji i progresiji tumora, već takođe omogućava ćelijama tumora da steknu pun metastatski potencijal. p53 direktno utiče na regulaciju transkripcije gena koji su uključeni u regulaciju pokretljivosti ćelija, adhezije i invazije, vezujući se za promotore tih gena (Wei i ostali, 2006). Kao potvrdu uloge p53 u metastaziranju, brojne studije su pokazale da gubitak heterozigotnosti ili mutacije u njegovom genu dovode do povećanja sposobnosti ćelija tumora da migriraju u *in vitro* sistemima, invadiraju kroz matrigel i metastaziraju u *in vivo* sistemima (Muller i ostali, 2011).

Svoju funkciju u suprimiranju metastatskih procesa, p53 ostvaruje jednim delom negativnom regulacijom gena *CXCR4* i *FAK*. Konkretno, Mehta i kolege su pokazali da p53 negativno reguliše ekspresiju gena *CXCR4*, tj. da gubitak funkcionalnog p53 tumor supresora dovodi do povećanja ekspresije *CXCR4* receptora i do povećanja invazivnih sposobnosti ćelija raka dojke (Mehta i ostali, 2007). Pored toga, poznato je da p53 negativno reguliše i ekspresiju *FAK*-a, kako na nivou iRNK tako i na nivou proteina (Golubovskaya i ostali, 2008). Takođe, pokazano je i da postoji značajna korelacija između povećane ekspresije *FAK*-a i mutacija u genu *TP53* kod pacijenata sa karcinomom dojke (Golubovskaya i Cance, 2010). Imunoprecipitacijom i konfokalnom mikroskopijom je dodatno ustanovljeno da postoji direktna interakcija između proteina *FAK*-a i p53, u kojoj se N-terminalni domen p53 proteina direktno vezuje za N-terminalni FERM domen *FAK*-a. Takođe, *FAK* može da suprimira p53 posredovanu transkripcionu aktivaciju p21, BAX i Mdm2 proteina (Golubovskaya i Cance, 2011; Powell i ostali, 2014).

PTEN je drugi najčešće izmenjeni tumor supresor kod humanih malignih tumora. Gen *PTEN*-a se nalazi na hromozomu 10 i kodira protein koji se sastoji od 403 aminokiseline (Steck i ostali, 1997). Studije koje su proučavale kristalnu strukturu *PTEN*-a su pokazale da se ovaj protein sastoji iz 3 domena: N-terminalnog domena koji sadrži kratak HCKAGKGR motiv koji je odgovoran za fosfataznu

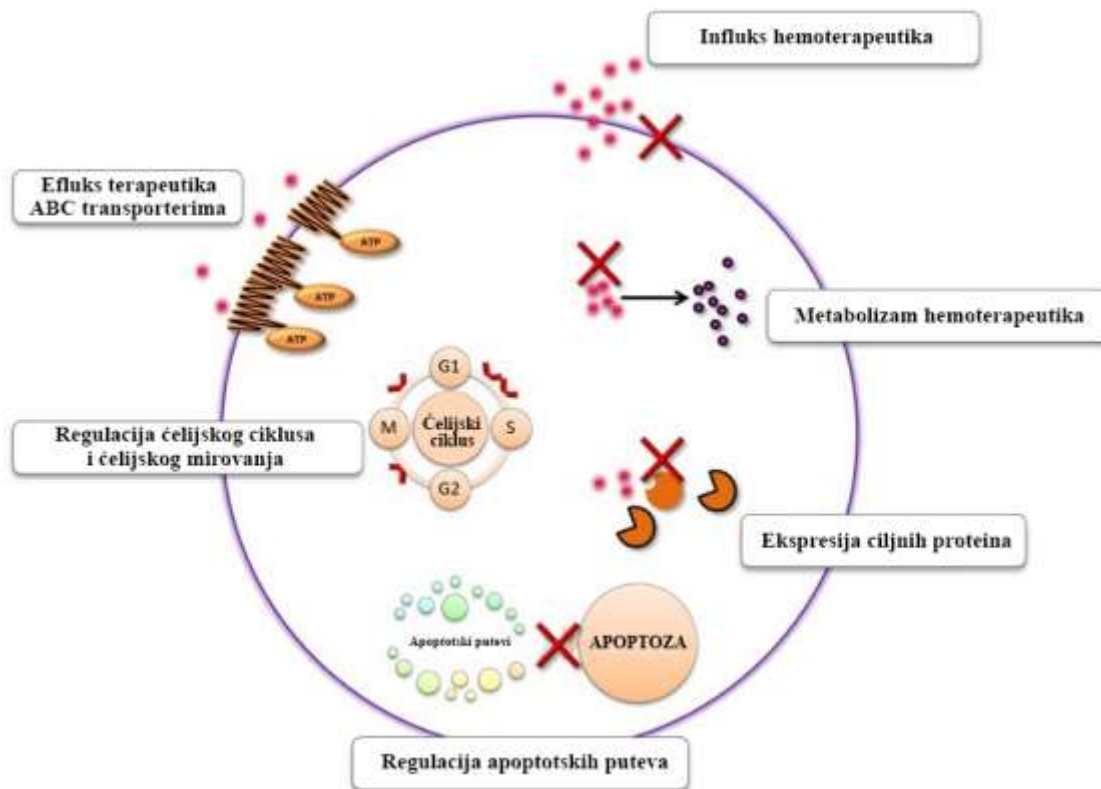
aktivnost, C2 domena odgovornog za vezivanje membranskih fosfolipida i efikasno pozicioniranje PTEN-a na membrani i C-terminalnog domena koji sadrži dva specifična domena odgovorna za protein-protein interakcije i dve sekvence koje sadrže prolin, glutaminsku kiselinu, serin i treonin, povezane sa stabilnošću PTEN proteina (Lee i ostali, 1999).

PTEN u ćeliji funkcioniše, pre svega, kao lipidna fosfataza. Ovaj tumor supresor hidrolizuje fosfatnu grupu membranskog lipida fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfata (PIP3) što dovodi do formiranja PIP2 (fosfatidilinozitol 3,4-bifosfat), zbog čega se PTEN tumor supresor smatra ključnim negativnim regulatorom PI3K/AKT signalnog puta (Maehama i Dixon, 1998). Aktivacija PI3K/AKT signalnog puta započinje vezivanjem liganda za tirozin kinazne receptore i receptore sa G-vezanim proteinima što vodi ka aktivaciji PI3K. Aktivirana PI3K dalje fosforiliše PIP2 lipid, konvertujući ga u PIP3. U ovom koraku, PTEN tumor supresor deluje kao negativni regulator PI3K/AKT signalnog puta, defosforilišući PIP3 koji je neophodan za aktivaciju AKT kinaze (Pérez-Ramírez i ostali, 2015). Upravo preko inhibicije ovog signalnog puta, PTEN tumor supresor ostvaruje važnu ulogu u supresiji invazivnih i metastatskih sposobnosti tumorskih ćelija. Pokazano je da gubitak PTEN-a i povećana aktivnost PI3K/AKT signalnog puta dovodi do povećane ekspresije i aktivacije CXCR4 receptora tumorskih ćelija što vodi ka povećanoj proliferaciji i metastaziranju tumora (Begley i ostali, 2015; Conley-LaComb i ostali, 2013).

Pored sposobnosti da defosforiliše membranske lipide, PTEN tumor supresor ima i protein fosfataznu aktivnost, kao i sposobnost direktne protein-protein interakcije zahvaljujući kojima reguliše važne ćelijske funkcije nezavisno od AKT signalnog puta. Prva identifikovana proteinska meta PTEN tumor supresora je FAK. Pokazano je da defosforilacijom FAK-a, PTEN tumor supresor reguliše interakcije ćelija sa okoloćelijskim matriksom i inhibira ćelijsku migraciju i invaziju (Tamura i ostali, 1998). Takođe, preko PI3K/NF- κ B signalnog puta, PTEN tumor supresor inhibira vezivanje NF- κ B proteina za *FAK* promotor i smanjuje njegovu ekspresiju čime utiče na rast i invaziju tumorskih ćelija (Zhang i ostali, 2014).

1.3. REZISTENCIJA NA HEMIOTERAPIJU

Pored formiranja metastaza, sposobnost ćelija tumora da prežive terapiju predstavlja glavni uzrok neuspeha lečenja raka. Hemioterapija je jedan od osnovnih pristupa u terapiji ovog oboljenja. U hemioterapiji tumora koriste se lekovi koji se nazivaju citostatici, čiji je glavni cilj zaustavljanje nekontrolisanih deoba i ubijanje tumorskih ćelija. Postoji veliki broj različitih hemioterapeutika koji se na osnovu mehanizma delovanja dele na: a) sredstva za alkilaciju, koja oštećuju DNK; b) antimetabolite, koji zamenjuju normalne gradivne blokove RNK i DNK; c) inhibitore topoizomeraze, koji inhibiraju topoizomerazu I ili II; i d) mitotske inhibitore, koji blokiraju mitozu i deobu ćelija (Huang i ostali, 2017). Međutim, efikasnost hemioterapije je ograničena razvojem rezistencije na citotoksične agense. Rezistencija može biti prisutna pre primene terapije kao urođena rezistencija, ili se može razviti u toku primene terapije kao stečena rezistencija (Holohan i ostali, 2013). Veoma složeni molekularni mehanizmi uzrokuju pojavu rezistencije i vrlo često ona podrazumeva otpornost na spektar terapeutika različitih struktura i mehanizama delovanja, što se definiše kao višestruka rezistencija na lekove (engl. multidrug resistance, MDR) (Baguley, 2010). Rezistentan fenotip može nastati usled povećanog izbacivanja terapeutika iz ćelije i smanjenja njegove intracelularne akumulacije, promena u metabolizmu leka, promena ekspresije ciljnih proteina, narušene normalne regulacije apoptoze, *senescence*-a i ćelijskog ciklusa (Slika 5.) (Chai i ostali, 2010; Holohan i ostali, 2013).



Slika 5. Mehanizmi rezistencije na hemioterapeutske lekove. Ćelije raka mogu razviti otpornost na lekove različitim mehanizmima koji nastaju usled promena u: influksu terapeutika, efluksu lekova ABC transporterima, kontroli ćelijskog ciklusa, senescence-a, apoptoze, ekspresiji ciljnih proteina i metabolizmu lekova. (Preuzeto i modifikovano prema Chai i saradnici, 2010).

Najveći pomak na polju proučavanja MDR-a došao je 1976. godine, kada je pokazano da je povećana ekspresija P-glikoproteina odgovorna za pojavu rezistencije na strukturno različita jedinjenja (Juliano i Ling, 1976). Danas je poznato da P-glikoprotein pripada ABC (engl. ATP-binding cassette) superfamiliji proteina koji funkcionišu kao energetske zavisne efluksne pumpe i čije povećanje ekspresije predstavlja jedan od glavnih mehanizama koji dovode do promena intracelularne koncentracije terapeutika i pojave MDR-a (Sun i ostali, 2012).

Kod ljudi je opisano 49 članova ove proteinske superfamilije, koji su podeljeni u sedam podfamilija (od A do G). P-glikoprotein pripada B familiji (ABCB) i poznat je još kao engl. multi-drug resistance protein 1 (MDR1) ili engl. ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), a njegov gen označen kao *ABCB1* je lociran na hromozomu 7q21. U normalnim fiziološkim uslovima kod čoveka, ovaj protein je ekspimiran na plazma membrani ćelija različitih organa, uključujući jetru, bubrege,

debelo crevo, nadbubrežnu žlezdu, ali i na ćelijama placente i endotelijalnim ćelijama krvno-moždane i krvno-placentalne barijere (Ambudkar i ostali, 1999; Holohan i ostali, 2013). Funkcija ovog proteina je u transportu i/ili izbacivanju njegovih supstrata i zaštiti ćelija od ksenobiotika, kao što su citotoksični agensi. ABCB1 protein prepoznaje i izbacuje iz ćelije mnoštvo strukturno i funkcionalno različitih supstrata (ciklični, linearni, bazni, nenaelektrisani, negativno naelektrisani, hidrofobni, aromatični, nearomatični supstrati). Zbog širokog spektra njegovih supstrata, P-glikoprotein deluje i na većinu citostatika (antraciklina, vinka alkaloida, epipodofilotoksina i taksena) kao i drugih lekova, uključujući HIV proteazne inhibitore i statine. Upravo zbog pomenute uloge, povećanje ekspresije ABCB1 transportera je jedan od glavnih uzroka razvoja rezistencije na lekove i pojave MDR fenotipa kod brojnih tipova maligniteta (Hodges i ostali, 2011).

Pored ABCB podfamilije transportera, ABCC podfamilija takođe ima veoma važnu ulogu u razvoju MDR-a. Gen *ABCC1* (engl. ATP-binding cassette subfamily C member 1), poznat i kao *MRP1* (engl. MDR-associated protein 1), je prvi identifikovani gen iz ABCC podfamilije transportera. Kloniran je iz rezistentne ćelijske linije tumora pluća H69AR (Yin i Zhang, 2011). Nakon njegovog otkrića, brojna istraživanja su pokazala važnu ulogu ABCC1 proteina u efluksu mnogih lekova i metabolita iz ćelije u različitim fiziološkim, patološkim i farmakološkim procesima. Gen *ABCC1* se nalazi na hromozomu 16p13.1, sadrži 31 egzon i kodira protein veličine između 180-190 kDa. Protein ABCC1 je prisutan u skoro svim tkivima čoveka, a visoko je ekspimiran u plućima, slezini, testisima, bubrezima, placenti, tireoidnoj žlezdi, bešici, nadbubrežnoj žlezdi i krvno-moždanoj barijeri. Ovaj protein transportuje brojne lekove koji se koriste u terapiji tumora, uključujući antracikline, epipodofilotoksine, vinka alkaloida, kamptotecine, metotreksat i mitoksantron, zbog čega povećana ekspresija ABCC1 dovodi do rezistencije na pomenute terapeutike i razvoja MDR-a (Munoz i ostali, 2007).

Većina citostatika izaziva oštećenja DNK ćelija tumora, bilo direktno (npr. cisplatin (CPT) ili doksorubicin (DOX)) ili indirektno (npr. inhibitori topoizomerase), dovodeći do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i indukcije apoptoze (Khamisipour i ostali, 2016). Apoptoza je glavni tip programirane ćelijske smrti i kod višćelijskih organizama je tesno povezana sa mehanizmima odgovornim za održanje homeostaze

tkiva (Igney i Krammer, 2002). Aktivacija ovog tipa ćelijske smrti može biti inicirana posredstvom dva alternativna puta: spoljašnjeg puta posredovanog receptorima smrti koji se nalaze na membrani ćelija, i unutrašnjeg ili mitohondrijalnog puta, posredovanog familijom Bcl-2 proteina. U oba puta se aktiviraju cisteinske aspartil-specifične proteaze (kaspaze). Aktivacija kaspaza dovodi do karakterističnih biohemijskih i morfoloških promena, kao što su pupljenje ćelijske membrane, gubitak veze sa okolnim ćelijama, kondenzacija hromatina i fragmentacija DNK molekula (Ichim i Tait, 2016). S obzirom da hemioterapeutici deluju prvenstveno preko indukcije apoptoze, defekti samih apoptotskih puteva i njihove regulacije mogu dovesti do razvoja rezistencije na terapiju. Ćelije tumora stiču sposobnost izbegavanja aktivacije apoptoze kroz brojne mehanizme. Kao najistaknutiji se izdvajaju promene u aktivaciji onkogeni (aktivirajuće mutacije gena PI3K proteina i aktivacija RAS/RAF signalnog puta) ili gubitak funkcije tumor supresora (inaktivirajuće mutacije gena p53 proteina i gubitak ekspresije PTEN-a). Alteracije u pomenutim putevima i molekulima utiču na ravnotežu aktivnosti pro- i anti-apoptotskih proteina Bcl-2 familije i na aktivaciju signala za preživljvanje što zajedno za posledicu ima neosetljivost tumorskih ćelija na indukciju apoptoze, a samim tim i razvoj otpornosti prema terapiji (Baguley, 2010).

Klasična hemioterapija, pored toga što se uglavnom zasniva na citotoksičnom delovanju lekova, može imati i citostatički efekat kojim se trajno onemogućava proliferacija ćelija i indukuje *senescence*, bez pojave ćelijske smrti. Koncept *senescence*-a prvi put su predstavili Haiflick i Moorehead 1961. godine kada su pokazali da neizmenjene humane diploidne ćelije imaju ograničeni kapacitet proliferacije nakon čega gube sposobnost daljeg deljenja (Haiflick i Moorhead, 1961). Danas znamo da ovaj fenomen predstavlja jednu vrstu ćelijskog mirovanja i naziva se replikativni *senescence*. Ovaj tip *senescence*-a nastaje skraćanjem i/ili oštećenjem telomera hromozoma uzrokovano ponovljenim replikacijama DNK tokom deoba ćelija. Danas je poznato da *senescence* može biti aktiviran i oksidativnim stresom i oštećenjem DNK, i tada se označava kao prerano indukovani *senescence*. Nezavisno od stimulusa kojim je pokrenut *senescence*, ćelije u mirovanju imaju nekoliko zajedničkih karakteristika koje se koriste za njihovu identifikaciju i karakterizaciju u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Kao glavna karakteristika opisuje se ireverzibilno zaustavljanje ćelijskog ciklusa koji se ne može ponovo pokrenuti

stimulacijom faktorima rasta (Francica i ostali, 2016). Nemogućnost ćelija u *senescence*-u da napreduju kroz ćelijski ciklus praćena je i sticanjem specifičnih promena u ćelijskoj morfologiji, kao što su povećanje volumena, dobijanje spljoštenog oblika sa jasno izraženim jedrom, povećanje granulisanosti citoplazme i povećanje aktivnosti enzima β -galaktozidaze (Lee i ostali, 2006). Pored važne uloge u fiziološkim procesima, pokazano je da ćelijski *senescence* ima ključnu ulogu u tumorigenezi, progresiji raka i u odgovoru tumorskih ćelija na hemioterapiju. Prisustvo ćelija u *senescence*-u u premalignim regijama, kao i njihovo odsustvo u malignim tumorima ukazuje na to da *senescence* može delovati kao prepreka razvoju tumora suprimirajući proliferaciju. Brojni hemioterapeutici i jonizujuće zračenje dovode do indukcije *senescence*-a ograničavajući dalju progresiju tumora. Postoji sve veći broj studija koje pokazuju da sticanje mehanizama kojima se izbegava aktivacija *senescence*-a doprinosi rezistenciji tumora na hemioterapiju, kao i da iniciranje programa *senescence*-a u solidnim tumorima može biti potencijalni terapijski pristup za prevazilaženje rezistencije (Gordon i Nelson, 2012).

1.3.1. ULOGA CXCR4 I FAK U RAZVOJU REZISTENCIJE

Pored dobro definisane uloge u metastaziranju tumora, nedavno je pokazano da CXCR4 i FAK imaju važnu ulogu i u razvoju rezistencije tumora na različite terapijske.

Kao što je već pomenuto, povećana ekspresija CXCR4 receptora povezana je sa lošim ishodom pacijenata obolelih od tumora. Takođe, vezivanje liganda za ovaj receptor dovodi do aktivacije ključnih signalnih puteva odgovornih za regulaciju proliferacije, rasta i progresije tumora. Međutim, nedavno je pokazano i da maligne ćelije povećano eksprimiraju CXCR4 receptor kao odgovor na terapiju hemioterapeuticima i da prateća aktivacija njegovih nishodnih signalnih puteva predstavlja važan mehanizam u razvoju rezistencije na terapiju (Domanska i ostali, 2013). Konkretno, pokazano je da tretman pacijenata obolelih od karcinoma rektuma bevacizumab-om dovodi do povećane ekspresije CXCR4 receptora u ćelijama tumora što je dalje povezano sa lošom prognozom (Saigusa i ostali, 2010). Takođe, pokazano je da tumorske ćelije akutne limfoblastne leukemije povećavaju ekspresiju pomenutog receptora u odgovoru na hemioterapiju i da su takve ćelije zaštićene od apoptoze

indukovane hemioterapijom kada se kultivišu sa stromom kosne srži. U takvom sistemu, tretman inhibitorom CXCR4 receptora smanjuje stromalnu zaštitu ćelija tumora i senzitivizuje ih na hemioterapiju (Sison i ostali, 2014). S druge strane, Xie i kolege su pokazali da je ekspresija CXCR4 receptora povećana u uzorcima tumorskog tkiva pacijenata obolelih od NSCLC-a koji su rezistentni na cisplatin, kao i u rezistentnoj ćelijskoj liniji, A548/DDP. Dodatno, inhibicijom CXCR4 receptora i senzitivizacijom rezistentnih ćelija, potvrdili su ulogu ovog receptora u rezistenciji na cisplatin kod NSCLC-a (Xie i ostali, 2017).

Pored veoma važne uloge u metastaziranju i regulaciji rasta i progresije tumora, pokazano je da FAK takođe učestvuje u razvoju rezistencije na terapiju, kao i da inhibicija FAK-a može doprineti senzitivizaciji brojnih tumora na hemioterapiju. Studija Hochwald i saradnika je pokazala da kombinacija FAK inhibitora Y15 i gemcitabina značajno inhibira rast tumora pankreasa u *in vivo* modelu u poređenju sa efektima pojedinačnih tretmana (Hochwald i ostali, 2009). Drugi FAK inhibitor, C4, pokazao se visoko efikasnim u kombinaciji sa doksorubicinom u inhibiciji rasta tumora i supresiji angiogeneze u mišijem ksenograft modelu tumora dojke (Golubovskaya, 2014). S obzirom da je u prekliničkim ispitivanjima pokazan značajan potencijal različitih inhibitora FAK-a da senzitivizuju ćelije tumora na hemioterapiju, pristupilo se ispitivanju njihovih efekata u kliničkim studijama. Primera radi, 2013. godine započeta je klinička studija delovanja FAK inhibitora VS6063 u kombinaciji sa paklitakselom (PTX) kod pacijenata sa uznapredovalim tumorom jajnika (klinička studija #NCT01778803, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01778803>).

Kao što je rečeno, brojne studije su pokazale anti-tumorski potencijal inhibitora CXCR4 receptora i FAK-a, kako pojedinačno tako i u kombinaciji sa klasičnim hemioterapeutcima. Međutim, glavni izazov za njihovu kliničku primenu leži u pitanju koji tipovi tumora će biti najosetljiviji na inhibitore pomenutih molekula, kao i koji molekularni profil pacijenata će dovesti do efikasnog odgovora na ovu terapiju.

1.4. KARCINOM PLUĆA

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA

Pojava malignih tumora je poslednjih decenija povećana zbog rasta i starenja svetske populacije, kao i zbog prihvatanja načina života za koji je poznato da povećava rizik od pojave raka, a koji uključuje pušenje, lošu ishranu, fizičku neaktivnost i promene reproduktivnih obrazaca povezanih sa urbanizacijom i ekonomskim razvojem. Prema poslednjim svetskim podacima, za 2012. godinu procenjena je pojava 14,1 miliona novih slučajeva malignih tumora i 8,2 miliona smrtnih slučajeva od raka širom sveta (Slika 6.). Karcinomi predstavljaju najbrojniji tip maligniteta i nastaju od epitelijalnih ćelija. Prema tipu epitelijalnih ćelija od kojih nastaju, karcinomi se mogu dalje svrstati u podgrupe:

1. adenokarcinomi (većina tumora dojke, pluća, debelog creva i prostate su adenokarcinomi nastali od epitelijalnih ćelija sa sekretornom funkcijom),
2. karcinomi skvamoznih ćelija (karcinomi pluća, creva, kože, grlića materice nastali od protektivnih epitelijalnih ćelija),
3. karcinomi bazalnih ćelija (karcinomi kože nastali od bazalnih ćelija epidermisa kože) i
4. karcinomi tranzicionih ćelija (karcinomi bubrega, uretre, bešike nastali od ćelija epitelijalnog tkiva koje se označava kao tranzicioni epitelijum ili urotelium).

Upravo je karcinom pluća najčešće dijagnostikovani tip malignih tumora sa 1,8 miliona novih slučajeva (13% svih maligniteta) i vodeći uzrok smrti od raka sa 1,6 miliona smrtnih slučajeva (19,4% ukupnih smrtnih slučajeva) (Torre i ostali, 2015).



Slika 6. 10 najčešće dijagnostikovanih tumora i 10 tumora najčešćih uzroka smrti od malignih oboljenja. (Preuzeto i modifikovano prema <http://2016.igem.org/Team:NJU-China/test.>)

Pluća, sa 2000 km disajnih puteva i više od 50 m² tankih alveolarnih membrana, su složen organ sastavljen od mnogo vrsta ćelija sa različitim funkcijama koje podržavaju razmenu gasova, kao i zaštitu od izloženosti toksičnim gasovima i infektivnim agensima. Hronično izlaganje sredinskim faktorima, koji doprinose pojavi raka pluća, dovode do morfoloških promena bronhijalnog epitela koji napreduju od hiperplazije ćelija preko metaplazije, teške displazije, karcinoma *in situ* i na kraju dovode do pojave karcinoma. Ovaj redosled događaja prvenstveno je povezan sa skvamoznim podtipom raka pluća. Nasuprot tome, progresija adenokarcinoma povezana je sa manje specifičnom premalignom lezijom, nazvanom atipična adenomatozna hiperplazija (Gridelli i ostali, 2015).

Još 1924. godine prvi put je predložen sistem klasifikacije karcinoma pluća, koji i danas predstavlja osnovu klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije. Rak pluća je klasifikovan na osnovu histoloških osobina i podeljen u četiri osnovne kategorije:

1. karcinom skvamoznih ćelija,
2. adenokarcinom,
3. karcinom krupnih ćelija i
4. sitnoćelijski karcinom.

Precizno određivanje kategorije tumora pluća je od presudnog značaja, od čega zavisi izbor tretmana i prognoza toka i ishoda bolesti. Na osnovu kriterijuma za određivanje terapije i prognoze, karcinomi skvamoznih ćelija, adenokarcinomi i

karcinomi krupnih ćelija svrstani su u jedinstvenu grupu i nazvani su nesitnoćelijski karcinomi (engl. non-small cell lung cancer, NSCLC). Ova grupa predstavlja 85% svih karcinoma pluća. Ostatak je svrstan u poseban entitet nazvan sitnoćelijski karcinom pluća (engl. small cell lung cancer, SCLC) (Gridelli i ostali, 2015).

Pored određivanja histološkog tipa, postoje i drugi parametri, kao što su gradus i stadijum bolesti, na osnovu kojih se dobijaju dodatne informacije koje pomažu pri postavljanju dijagnoze i određivanju terapije karcinoma pluća. Određivanje gradusa tumora vrši se na osnovu morfoloških i histoloških karakteristika tumorskih ćelija i predstavlja stepen diferenciranosti tumora. Na osnovu histopatoloških analiza karcinomi pluća se klasifikuju na: G1 – dobro diferentovane, G2 – srednje diferentovane, G3 – slabo diferentovane i G4 – aplastične karcinome. Stadijum bolesti se određuje na osnovu TNM (engl. tumor-nod-metastasis) klasifikacije, prema kojoj T ukazuje na veličinu i proširenost tumora, N predstavlja broj obližnjih limfnih čvorova zahvaćenih tumorima, a M se odnosi na prisustvo udaljenih metastaza. Na osnovu TNM parametara tumori se dalje grupišu u sedam različitih stadijuma (IA – IV) koji ukazuju na stepen progresije bolesti.

1.4.2. TERAPIJA NSCLC-a

Modaliteti lečenja NSCLC-a određuju se pre svega na osnovu stadijuma bolesti. Međutim i drugi faktori, kao što je celokupno zdravstveno stanje pacijenta, funkcija pluća, kao i molekularni profil tumora, takođe su važni pri odabiru terapije. Hirurška intervencija je prvi terapijski izbor za pacijente u ranijim stadijumima (I - IIIa) bolesti. Osim toga, za pacijente kod kojih se nakon hirurške intervencije histopatološkim analizama utvrdi da imaju rizik od pojave recidiva, preporučuje se odgovarajuća hemioterapija. Sa druge strane, kod pacijenata sa uznapredovalim NSCLC-om, kod kojih hirurška intervencija nije indikovana, hemioterapija i/ili radioterapija predstavljaju jedini mogući terapijski pristup. U hemioterapiji NSCLC-a najčešće se koriste derivati platine, cisplatin i karboplatin, u kombinaciji sa različitim citostaticima kao što su: PTX, vinorelbin, docetaksel, gemcitabin, etopozid, vinblastin i pemetreksed (Chang, 2011).

Cisplatin je jedan od antitumorskih lekova koji sadrže platinu i svrstava se među najpotentnije poznate hemioterapeutike sa veoma dobrim kliničkim rezultatima u lečenju brojnih solidnih tumora. Citotoksično delovanje ovog platinskog kompleksa ostvaruje se njegovom interakcijom sa DNK što uzrokuje unakrsno povezivanje G-G u okviru jednog lanca DNK molekula. Na taj način cisplatin formira DNK adukte koji dovode do zaustavljanja ćelija u G1, S ili G2/M fazi ćelijskog ciklusa i konačno do aktiviranja programirane ćelijske smrti, apoptoze (Siddik, 2003).

Paklitaksel je hemioterapeutik iz grupe taksana, koji se vezuje za mikrotubule deobnog vretena i sprečava njihovu depolimerizaciju. Mikrotubule su dinamične strukture izgrađene od heterodimera, α i β subjedinica, koje su uključeni u mnoge važne ćelijske procese, naročito u formiranje deobnog vretena. Paklitaksel, za razliku od drugih mikrotubule-interagujućih agenasa koji depolimerišu mikrotubule, svoj citotoksični efekat ostvaruje vezivanjem za već polimerizovane mikrotubule. Na taj način paklitaksel stabilizuje mikrotubule i sprečava njihovu depolimerizaciju, dovodeći do zaustavljanja progresije ćelijskog ciklusa u G2/M fazi i aktiviranja apoptoze (Barbuti i Chen, 2015).

Pored pomenutih hemioterapeutika, **doksorubicin** je jedan od najefkasnijih agenasa koji se koriste u lečenju velikog broja maligniteta kod ljudi. DOX pripada grupi antraciklinskih terapeutika i ostvaruje svoje citotoksično dejstvo na nekoliko načina. Pre svega, DOX inhibira enzim topoizomerazu II. Ovaj enzim je odgovoran za stvaranje dvolančanih prekida molekula DNK i njihovo ponovno spajanje, čime se menja spiralizacija DNK i obezbeđuje neometano odvijanje replikacije i transkripcije. Pored toga, prisustvo DOX-a u ćeliji dovodi do stvaranja slobodnih radikala i oštećenja na ćelijskoj membrani, molekulu DNK i proteinima (Thorn i ostali, 2011). Kod raka pluća, DOX se koristi u terapiji SCLC-a, dok je relativno neefikasan u lečenju NSCLC-a. Kao jedan od glavnih uzroka neosetljivosti NSCLC-a, izdvaja se urođena rezistencija ovog tipa tumora na DOX koja je najčešće praćena smanjenjem intracelularne koncentracije terapeutika (Vatsyayan i ostali, 2009). Dodatni problem u primeni DOX-a predstavlja i njegova kardiotoksičnost, što onemogućava prevazilaženje rezistencije kod tretmana NSCLC-a povećanjem doze pomenutog terapeutika (Hershman i Shao, 2009). Međutim, brojne studije na NSCLC-u i dalje koriste DOX upravo u svrhu istraživanja mehanizama rezistencije na

hemioterapeutike kod ovog tipa karcinoma (Chittasupho i ostali, 2014; Vatsyayan i ostali, 2009; Wang i ostali, 2017; Wongvaranon i ostali, 2013).

Prognoza karcinoma pluća je, pored izvesnog napretka postignutog hemioterapijom, i dalje veoma loša sa ukupnim petogodišnjim preživljavanjem manjim od 18% (Torre i ostali, 2016a). Molekularna heterogenost ovog tipa karcinoma smatra se jednim od glavnih razloga zašto pacijenti oboleli od NSCLC-a sa istim stadijumom bolesti i sličnom histologijom tumora imaju dramatično različite odgovore na terapiju i kliničku prognozu (Chen i ostali, 2014). Dva najčešća uzroka neuspeha antitumorske terapije, koji proističu iz heterogenosti ćelija NSCLC-a, su pojave metastaza i otpornosti na hemioterapiju (Siegel i ostali, 2016).

1.4.3. ULOGA CXCR4 I FAK-a U PROGRESIJI I METASTAZIRANJU

NSCLC-a

Kod većine pacijenata sa karcinomom pluća bolest se dijagnostikuje u kasnim fazama, kada ne postoji mogućnost lečenja operacijom ili radioterapijom, kao posledica lokalne invazije ili formiranja udaljenih metastaza. Metastatski tumori ne samo da predstavljaju problem za lečenje operacijom i radioterapijom zbog anatomskih pozicija, već su veoma često i rezistentni na hemioterapiju (Qian i ostali, 2017). Mehanizmi koji regulišu metastaziranje NSCLC-a su veoma kompleksni i regulisani su brojnim molekulima, uključujući i CXCR4 i FAK.

Sve više podataka sugerise da aktivacija CXCR4 receptora ima veoma važnu ulogu u promovisanju agresivnog, invazivnog, fenotipa kod NSCLC-a. Brojne kliničke studije su pokazale povezanost između povećane ekspresije CXCR4 receptora u primarnom tumoru sa lošom kliničkom prognozom pacijenata obolelih od NSCLC-a (Chatterjee i ostali, 2014; Domanska i ostali, 2013; Otsuka i ostali, 2008; Wald i ostali, 2013). Prilikom ispitivanja korelacija ekspresije CXCR4 receptora sa kliničkim parametrima pacijenta, Su i kolege su otkrili da su tumori sa visokom ekspresijom CXCR4 skloniji lokalnoj invaziji ćelija tumora i formiranju udaljenih metastaza nego tumori sa niskom ekspresijom CXCR4 receptora (Su i ostali, 2005).

Pored kliničkih studija, kao potvrda veoma važne uloge CXCR4 receptora u progresiji karcinoma pluća, brojne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da je povećana ekspresija CXCR4 receptora povezana sa invazivnim i migratornim sposobnostima NSCLC ćelija. *In vivo* studije, koje su koristile ksenografte humanih NSCLC ćelija u SCID miševima, pokazale su da ćelije karcinoma pluća najčešće metastaziraju na mestima u organizmu gde je prisustvo liganda CXCR4 receptora (SDF-1) značajno povećano u odnosu na njegov nivo u primarnom tumoru. U ovim studijama, primena inhibitora CXCR4 receptora rezultirala je značajnim smanjenjem metastaza NSCLC-a na nekoliko organa, kao što su nadbubrežne žlezde, jetra, pluća, mozak i kosna srž (Otsuka i ostali, 2008; Phillips i ostali, 2005).

Pored CXCR4 receptora, FAK je takođe povećano eksprimiran u NSCLC-u. Amplifikacija njegovog gena povezana je sa lošijom kliničkom prognozom pacijenata obolelih od NSCLC-a. Pored amplifikacije gena, uočeno je da povećana ekspresija FAK-a na nivou iRNK i proteina koreliše sa kasnijim stadijumima NSCLC-a (Carelli i ostali, 2006; Golubovskaya, 2010). Kao još jedan dokaz važne uloge FAK-a u progresiji ovog tipa karcinoma pluća, studija koju su sprovedi Nishimura i kolege pokazala je da je povećana fosforilacija FAK-a usko povezana sa preživljavanjem pacijenata nakon operativnog uklanjanja tumora (Nishimura i ostali, 1996). Uloga FAK-a u progresiji NSCLC-a potvrđena je i u *in vitro* studiji koja je pokazala da signalizacija posredovana FAK-om učestvuje u regulaciji invazije, migracije i proliferacije ćelija NSCLC-a (Mukhopadhyay i ostali, 2005).

Značajno učešće CXCR4 i FAK-a u patogenezi NSCLC-a može biti bar jednim delom posledica njihove regulacije p53 i PTEN tumor supresora za koje je pokazano da imaju ključnu ulogu u promociji i progresiji ovog tipa tumora.

Mutacije u genu *TP53* su među najčešće prisutnim genetičkim alteracijama kod humanih maligniteta. Konkretno, kod pacijenata obolelih od NSCLC-a, *TP53* je mutiran u preko 50% slučajeva zbog čega je i najčešće ispitivani prognostički marker kod ovog tipa tumora. Takođe, kod ovog tipa karcinoma se detektuje česti gubitak heterozigotnosti gena *TP53*, i u uzorcima pacijenata obolelih od NSCLC-a i u humanim ćelijskim linijama karcinoma pluća. Sveukupno, učestalost promena na genu *TP53* ukazuje na značajnu ulogu ovog tumor supresora u patogenezi NSCLC-a. Shodno tome, promene gena *TP53* su povezane i sa lošijom prognozom, povećanom

otpornošću na klasičnu hemioterapiju i metastaziranjem NSCLC-a (Mogi i Kuwano, 2011).

Za razliku od glioblastoma, melanoma, karcinoma prostate i jajnika kod kojih su somatske mutacije *PTEN*-a česte, kod pacijenata obolelih od NSCLC-a ove promene se detektuju u manje od 10% slučajeva. Međutim, inaktivacija *PTEN*-a se dešava kroz druge mehanizme, kao što su gubitak heterozigotnosti ili epigenetička inaktivacija usled hipermetilacije njegovog promotora. Upravo zahvaljujući ovim mehanizmima, potpuni gubitak ili smanjena ekspresija proteina *PTEN*-a prisutna je kod skoro 70% pacijenata obolelih od NSCLC-a (Pérez-Ramírez i ostali, 2015). Nezavisno od mehanizma, pokazano je da je gubitak *PTEN* tumor supresora povezan sa lošijim kliničkim ishodom bolesti, razvojem rezistencije na brojne hemioterapeutike i metastaziranjem NSCLC-a (Kokubo i ostali, 2005; Tang i ostali, 2006; Yanagawa i ostali, 2012).

Pored toga, u poslednje vreme se sve više ističe veza istovremene inaktivacije oba tumor supresora sa promocijom agresivnog fenotipa tumora koji se odlikuje brojnim metatazama i lošim kliničkim ishodom (Hu i ostali, 2003; Liu i ostali, 2014; Oki i ostali, 2005). Istovremena inaktivacija oba tumor supresora prijavljena je i kod NSCLC-a, u čak 50% ispitanih slučajeva. Takođe, istovremeno prisustvo promena *TP53* i *PTEN*-a koreliše sa invazijom u limfne čvorove kod ispitivanih pacijenata, što ukazuje na uticaj istovremeno inaktiviranih *p53* i *PTEN*-a u promovisanju metastatskog fenotipa kod NSCLC-a (Andjelkovic i ostali, 2011). Jedan od mogućih načina ovakvog uzajamnog delovanja je preko regulacije ekspresije i aktivnosti njihovih zajedničkih ciljanih molekula, kao što su *CXCR4* i *FAK*.

1.4.4. ULOGA ABCB1 I ABCC1 U REZISTENCIJI NSCLC-a NA HEMIOTERAPIJU

NSCLC se, osim izražene invazivnosti, veoma često odlikuje i urođenom rezistencijom na primenjenu terapiju (Sharma, 2012). U studiji u kojoj je ispitano preko 3000 različitih primarnih ćelijskih kultura izvedenih iz uzoraka NSCLC pacijenata koji nisu predhodno primali terapiju, pokazano je da je 63% uzoraka rezistentno na cisplatin, 75% na DOX i 40% na PTX (d'Amato i ostali, 2006). Pored

urođene rezistencije, gotovo svi pacijenti oboleli od NSCLC-a vremenom razvijaju stečenu rezistenciju prema terapiji kojoj su bili izloženi, iako su u početku odlično reagovali na primenjeni tretman (Chang, 2011).

Brojni mehanizmi su uključeni u razvoj rezistencije kod NSCLC-a. Kao što je već opisano, povećana ekspresija ABC transportera predstavlja jedan od osnovnih mehanizama kojima se menja efluks i smanjuje intracelularna koncentracija terapeutika, kao što su cisplatin, metotreksat, taksani, antraciklini i vinka alkaloidi. Brojne studije su ispitivale ulogu ABC transportera, kao što su ABCB1 i ABCC1, kod NSCLC-a (Shanker i ostali, 2010). Molekularne analize su pokazale da je ekspresija gena *ABCB1* značajno povećana kod rezistentnih ćelijskih linija u poređenju sa senzitivnim. Konkretno, ispitujući ekspresiju pomenutog gena kod humane rezistentne ćelijske linije NSCLC-a (NCI-H460/PTX250), utvrđeno je povećanje ekspresije *ABCB1* preko 1000 puta u odnosu na odgovarajuću senzitivnu (NCI-H460) ćelijsku liniju (Yabuki i ostali, 2007). Uloga ABCB1 transportera u hemorezistenciji potvrđena je i u *in vivo* uslovima. Pokazano je da je povećana ekspresija ovog receptora, kako na nivou mRNA-a tako i na nivou proteina, povezana sa urođenom rezistencijom ćelija tumora pluća u *in vivo* uslovima (Abe i ostali, 1996). Takođe, Chiu i kolege su pokazale značajnu korelaciju između ekspresije ABCB1 transportera i odgovora pacijenata obolelih od NSCLC-a na terapiju paklitakselom (Chiu i ostali, 2003).

Pored ABCB1 transportera, ABCC1 takođe ima važnu ulogu u razvoju rezistencije kod NSCLC-a. Ekspresija ovog transportera je značajno povećana u uzorcima primarnih tumora pacijenata obolelih od NSCLC-a, u poređenju sa neizmenjenim tkivom (Nooter i ostali, 1996; Ota i ostali, 1995). Njegova povećana ekspresija je označena kao veoma značajan indikator lošeg odgovora na terapiju i lošeg ukupnog preživljavanja kod NSCLC-a (Munoz i ostali, 2007). Pored toga, nekoliko studija je pokazalo da su različite ćelijske linije NSCLC-a, sa visokim nivoom ekspresije ABCC1 proteina, otporne na hemioterapeutike kao što su DOX, vinkristin i etopozid (Nooter i ostali, 1996; Ota i ostali, 1995; Young i ostali, 1999).

1.4.5. ULOGA CXCR4 I FAK-a U REZISTENCIJI NSCLC-a NA HEMIOTERAPIJU

Iako je povećanje ekspresije ABC transportera glavni mehanizam povezan sa otpornošću na hemioterapiju, promene u regulaciji apoptoze, *senescence*-a i ćelijskog ciklusa takođe mogu uticati na razvoj rezistencije kod NSCLC-a. Nedavno je pokazano da upravo preko regulacije ovih procesa CXCR4 i FAK ostvaruju svoju ulogu i u razvoju rezistencije na hemioterapeutike kod NSCLC-a (Azab i ostali, 2009; van Nimwegen i ostali, 2006; Sison i ostali, 2014).

Povećana ekspresija i aktivacija CXCR4 receptora kod NSCLC-a ima važnu ulogu u razvoju rezistencije na hemioterapiju. Upoređujući cisplatin-rezistentnu (A549/DDP) i senzitivnu ćelijsku liniju NSCLC-a (A549), pokazan je visok nivo ekspresije CXCR4 kod rezistentnih ćelija. S druge strane, smanjenje ekspresije CXCR4 receptora primenom antisens CXCR4 nukleotidnog fragmenta, dovelo je do indukcije apoptoze, smanjenja proliferativnog potencijala i senzitivizacije rezistentnih NSCLC ćelija na CPT (Xie i ostali, 2017). Osim važne uloge FAK-a u progresiji NSCLC-a, nedavno je pokazano da ova kinaza ima važnu ulogu i u razvoju rezistencije kod NSCLC-a, kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima. Konkretno, Howe i saradnici su pokazali značajnu ulogu FAK-a u razvoju rezistencije na tirozin kinazne inhibitore EGFR-a, kao i da kombinacija FAK inhibitora sa erlotinibom poboljšava ishod terapije (Howe i ostali, 2016a). Takođe, aktivacija FAK-a doprinosi razvoju rezistencije na dasatinib kod NSCLC-a, a njegovom inhibicijom moguće je senzitivizovati ćelije na ovaj terapeutik (Lu i ostali, 2013).

1.4.6. CILJANA TERAPIJA NESITNOĆELIJSKOG KARCINOMA PLUĆA

Uprkos tome što je karcinom pluća prepoznat kao histološki heterogeno oboljenje još u 1950-tim (Levine i Weisberger, 1955), svi pacijenti sa NSCLC-om primali su istu hemioterapiju bez obzira na histološki podtip bolesti sve do 2004. godine (Thomas i ostali, 2015). Međutim, brojne kliničke studije su pokazale da tačno određivanje histološkog podtipa ima veliku važnost u određivanju terapije, kao i da određene terapeutske strategije mogu doprineti boljem odgovoru samo kod pacijenata

sa specifičnim histološkim podtipom NSCLC-a. Konkretno, u kliničkoj studiji H3E-MC-JMDB koja je sprovedena nakon razvoja pemetrekseda, pokazano je da terapija ciplatin-pemetreksed-om statistički značajno produžava preživljavanje u odnosu na terapiju cisplatin-gemcitabin-om samo kod NSCLC pacijenata sa adenokarcinomom (Scagliotti i ostali, 2008).

Pored toga, uvedeno je i nekoliko novih tretmana u kliničkom lečenju određenih podgrupa pacijenata sa NSCLC-om, kod kojih većina ima mutacije u jednom od ključnih onkogeno koji utiču na nastanak i progresuju tumora. Konkretno, mutacione analize gena *EGFR*-a u primarnim tumorima pacijenata obolelih od NSCLC-a, koji su odgovorili ili nisu odgovorili na terapiju gefitinibom, identifikovale su podgrupu pacijenata sa specifičnim mutacijama u ovom genu koje su povezane sa kliničkim odgovorom na terapiju EGFR tirozin kinaznim inhibitorima (Pallis i ostali, 2009). Ubrzo nakon uvođenja EGFR inhibitora u kliničku praksu lečenja pacijenata obolelih od NSCLC-a sa specifičnim mutacijama, za još jedan tirozin kinazni inhibitor (krizotinib) je pokazano da je efikasniji od standardne hemioterapije u lečenju određenog podtipa NSCLC-a, ALK (engl. anaplastic lymphoma kinase) pozitivnog NSCLC-a (Shackelford i ostali, 2014). Nakon što su testiranja na specifične mutacije u genima *ALK* i *EGFR*-a postala standardna procedura u dijagnostici NSCLC-a, identifikovane su nove potencijalne mutacije za ciljanu terapiju kod pacijenata obolelih od NSCLC-a, kao što su mutacije u genima *ROS1*, *BRAF*, *RET* i *MET* (Toschi i ostali, 2017).

Pored pomenutih terapijskih strategija, jedan od novih i obećavajućih pristupa u lečenju karcinoma pluća, koji ima za cilj smanjenje invazije i reverziju rezistencije na klasične hemioterapeutike, jeste ciljana inhibicija CXCR4 receptora i FAK-a.

Trenutno postoji više od 15 različitih jedinjenja koji se koriste za inhibiciju CXCR4 molekula. Mogu se razlikovati 4 glavne klase CXCR4 inhibitora: I) mali modifikovani peptidi antagonisti CXCR4 receptora, kao što su BKT140 i POL6326; II) mali molekuli antagonisti CXCR4 receptora, kao što su AMD3100, WZ811, AMD070, MSX-122, GSK812397 i KRH-3955; III) antitela za CXCR4 receptor, kao što su MDX-1338, BMS 93656 i ALX-0651 i IV) modifikovani agonisti i antagonisti za SDF-1 ligand. Najpoznatiji CXCR4 inhibitor je AMD3100, poznatiji kao

plerixafor ili Mozobil®. On je jedini CXCR4 inhibitor odobren od strane FDA-a za kliničku upotrebu, i to kod ne-Hodžkinovog limfoma i multiplog mijeloma (Domanska i ostali, 2013; Peled i ostali, 2012). I pored toga što je odobren za kliničku primenu, efikasnost AMD3100 je ograničena usled smanjene bioiskoristivosti, koja je rezultat njegovog visokog pozitivnog naelektrisanja na fiziološkim pH vrednostima. Na osnovu predloženog mehanizma delovanja AMD3100, Zhan i kolege su sintetisali seriju različitih jedinjenja koji su kandidati da zamene AMD3100, kao jedinjenja koja imaju veću specifičnost za CXCR4 i bolju bioiskoristivost (Zhan i ostali, 2007).

Sinteza serije malih molekularnih antagonista CXCR4, sa dva aromatična ostatka amina povezanih sa para-ksililen grupom, dovela je do otkrića N1,N4-di-2-piridinil-1,4-benzendimetanamina, označenog kao **WZ811**. Ovaj mali molekularni antagonist CXCR4, predstavlja veoma snažan inhibitor aktivnosti ovog receptora. WZ811 ima sposobnost blokiranja CXCR4 već u koncentracijama ispod nanomolarnog opsega (Zhan i ostali, 2007). Takođe efikasniji je od AMD3100 u inhibiranju CXCR4/CXCL12-posredovane modulacije cikličnih adenzin monofosfata (cAMP), kao i u inhibiranju invazije i migracije u *Matrigel* esejima. Iako se WZ811 pokazao kao veoma uspešan u *in vitro* testovima, nikada nije dospeo do kliničkih istraživanja zbog njegove smanjene bioiskoristivosti dokazane u prekliničkim istraživanjima (Choi i ostali, 2012).

Prvi pokušaji da se inhibira signalizacija posredovana FAK-om u ćelijama raka izvedeni su pomoću antisens FAK oligonukleotida, adenovirusa sa FAK-CD (engl. carboxyl-terminal domain of FAK) i FAK siRNK-a. Sve nabrojane strategije su dovele do efikasnog inhibiranja aktivnosti FAK-a, što je praćeno smanjenim preživljavanjem ćelija tumora, aktivacijom apoptoze i smanjenjem tumorigenosti (Golubovskaya i ostali, 2009; Xu i ostali, 2000, 1996). Međutim, ovi pristupi imaju ograničenja za upotrebu u kliničkim istraživanjima, zbog čega je razvijen pristup inhibicije FAK-a malim molekularnim inhibitorima. Inhibitori FAK-a mogu biti podeljeni u dve grupe: I) inhibitori koji ciljaju enzimske ili kinaza-zavisne funkcije FAK-a, kao što su inhibitori koji ciljaju ATP-vezujuću domen i alosterički inhibitori koji menjaju konformaciju FAK-a i blokiraju kinaznu aktivnost i II) inhibitori koji sprečavaju pravilno zauzimanje konformacije FAK proteina (Golubovskaya, 2014). Jedan od najranije dizajniranih FAK inhibitora je TAE226, koji blokira ATP-vezujuće

mesto i inhibira fosforilaciju FAK-a (Y397 i Y861). Ovaj molekul je pokazao obećavajuće rezultate u prekliničkim testovima *in vitro* i *in vivo*. Pored TAE226 inhibitora, veoma često u prekliničkim ispitivanjima je korišćen i PF-526,271, koji blokira ATP-vezujuće mesto FAK-a i Pyk2 (engl. Protein-rich tyrosine kinase 2). PF-526,271 je u *in vivo* ispitivanjima uspešno inhibirao rast karcinoma pluća i prostate, dok je kod tumora dojke bio efikasan i u supresiji formiranja metastaza (Dunn i ostali, 2010).

Za razliku od prethodno pomenutih inhibitora, **PF-573228** inhibitor se odlikuje velikom selektivnošću prema FAK-u, bez obzira što ima veoma sličan mehanizam delovanja kao PF-526,271 i TAE226 inhibitori. PF-573228, takođe interaguje sa ATP-vezujućim domenom FAK-a, efikasno blokira Y379 fosforilaciju, a time i njegovu katalitičku aktivnost. Tretman malignih ćelija PF-573228 inhibitorom dovodi do smanjenja adhezije i inhibicije migracije ćelija. Zanimljivo je da tretman samo PF-573228 inhibitorom, nije imao veliki uticaj na proliferaciju i apoptozu kod tumorskih ćelija, što ga svrstava u odličan izbor prilikom ispitivanja uloge FAK-a u adhezivnim i migratornim sposobnostima malignih ćelija (Slack-Davis i ostali, 2007).

Inhibicija oba molekula, CXCR4 i FAK-a, ima veliki potencijal za klinička istraživanja na NSCLC-u, međutim kao mogući problem njihove efikasnosti ističe se heterogenost ćelija karcinoma pluća. U cilju rešavanja problema heterogenosti NSCLC-a, veliki značaj se pridaje određivanju molekularnog profila ćelija karcinoma pluća i identifikaciji specifičnih molekularnih podtipova koji će najbolje odgovarati na pomenute terapijske strategije.

2. CILJEVI

Shodno predstavljenim literaturnim podacima, prvi cilj ove studije je bio da se ispita značaj CXCR4 i FAK-a u invazivnosti NSCLC ćelija sa istovremeno inaktiviranim p53 i PTEN tumor supresorima. Radi realizacije ovog cilja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uspostaviti *in vitro* sistem humanih ćelijskih linija NSCLC-a sa različitim funkcionalnim statusom p53 i PTEN tumor supresora
2. Uporediti invazivne i migratorne sposobnosti humanih ćelijskih linija NSCLC-a sa različitim funkcionalnim statusom p53 i/ili PTEN tumor supresora
3. Ispitati nivo ekspresije CXCR4, FAK-a, AKT-a i ERK-a u humanim ćelijskim linijama NSCLC-a sa različitim funkcionalnim statusom p53 i/ili PTEN tumor supresora
4. Ispitati uticaj tretmana inhibitorima CXCR4 i FAK-a na migraciju i invaziju u *in vitro* sistemu NSCLC-a sa inaktivnim p53 i/ili PTEN tumor supresorima
5. Ispitati promene u fosforilaciji FAK-a, AKT-a i ERK-a nakon tretmana inhibitorima CXCR4 i FAK-a u *in vitro* sistemu NSCLC-a sa inaktivnim p53 i/ili PTEN tumor supresorima
6. Uporediti sposobnost ćelija NSCLC-a sa inaktivnim p53 i/ili PTEN tumor supresorima da formiraju tumore, kao i dinamiku rasta nastalih tumora u mišijem modelu subkutanih ksenografta tumora pluća
7. Ispitati efekte inhibicije CXCR4 i FAK-a u sprečavanju metastatskog širenja p53/PTEN deficijentnih tumora u mišjem ortotopnom metastatskom modelu tumora pluća

Drugi cilj ove doktorske studije je bio da se ispita uloga CXCR4 i FAK-a u rezistenciji na klasične hemioterapeutike kod NSCLC ćelija. Za realizaciju ovog cilja definisani su sledeći zadaci:

1. Odrediti relativni nivo ekspresije gena *CXCR4*, *FAK*, *ABCBI* i *ABCCI* kod tumorskih uzoraka pacijenata obolelih od NSCLC-a
2. Analizirati povezanost promena u ekspresiji gena *CXCR4* i *FAK* sa promenama ekspresije pomenutih ABC transportera kod tumorskih uzoraka pacijenata obolelih od NSCLC-a
3. Ispitati mogućnost i mehanizme reverzije rezistencije kod ćelijskih linija NSCLC-a primenom CXCR4 i/ili FAK inhibitora u kombinaciji sa klasičnim citostaticima

Treći cilj ove doktorske studije je bio da se ispita uticaj kombinovanog tretmana inhibitora CXCR4 ili FAK-a sa klasičnim hemioterapeuticima na invazivne sposobnosti rezistentnih NSCLC ćelijskih linija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. LEKOVI I FARMAKOLOŠKI INHIBITORI

U ovoj studiji korišćeno je nekoliko komercijalno dostupnih lekova, kao i farmakoloških inhibitora različitih signalnih molekula: CPt (Pfizer Pty Ltd, Australija), DOX (Arzneimittel GmbH, Austrija), PTX (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), PTEN inhibitor bpV(HOpic) (Santa Cruz Biotechnology, SAD), CXCR4 antagonist WZ811, FAK inhibitor PF-573228 i p53 inhibitor Pifitrin- α (PFT- α) (Selleckchem, SAD).

CPt i DOX su rastvoreni u sterilnoj vodi i 1 mM alikvoti su čuvani na sobnoj temperaturi (CPt) ili na +4 °C (DOX). PTX je rastvoren u 95% etanolu i alikvoti dobijenog 1 mM rastvora su čuvani na -80 °C. Inhibitori, PF-573228, WZ811, PFT- α i bpV(HOpic), su rastvoreni u dimetilsulfoksidu (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i njihovi 10 mM alikvoti su čuvani na -20°C. Neposredno pre tretmana, svi lekovi i inhibitori su rastvarani u sterilnoj vodi.

3.2. UZORCI TKIVA

U ovoj studiji analizirani su uzorci tumorskog i odgovarajućeg neizmenjenog tkiva 30 pacijenata obolelih od NSCLC-a koji su operisani na Klinici za grudnu hirurgiju, Kliničkog centra Srbije, u periodu od maja do oktobra 2004. godine. Uzorci su prikupljeni u pomenutom periodu nakon dobijanja saglasnosti pacijenata i odobrenja Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije za potrebe prethodne studije (broj rešenja 926/1), a u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije donete 1964. godine. Korišćenje uzoraka za potrebe ove studije odobreno je od strane istog Etičkog komiteta (broj rešenja 93/6). Dijagnoza NSCLC-a, histološki tip, gradus, prisustvo nekoroze kao i invazija u okolne limfne čvorove utvrđeni su histološkim pregledom postoperativnog tumorskog tkiva od strane patologa (J.S.) Službe za patologiju, Kliničkog centra Srbije. Tumori su klasifikovani na osnovu kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO) i prema TNM sistemu (Beasley i ostali, 2005; Travis i ostali, 2015).

Od 30 pacijenata, starosti od 43-72 godine, 24 su bili muškarci, a 6 žene. Pet NSCLC uzoraka bilo je dobro diferencirano (gradus 1), 21 je bio umereno

diferenciran (gradus 2) i 4 ih je bilo loše diferencirano (gradus 3). Patološki status I utvrđen je kod 5, II kod 11 i III kod 14 slučajeva. Po histološkom tipu 9 karcinoma su bili adenokarcinomi, a 21 karcinomi skvamoznih ćelija. Među 30 ispitivanih slučajeva 25 ih je imalo invaziju tumorskih ćelija u lokalne limfne čvorove, a 8 ih je bilo pozitivno na prisustvo nekroze. Nijedan pacijent nije primao ni hemio- ni radioterapiju pre operacije. Svi prikupljeni uzorci su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani do izolacije RNK.

3.3. ĆELIJSKE LINIJE

Kao materijal u *in vitro* eksperimentima u ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su tri ćelijske linije humanog karcinoma pluća: NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23.

NCI-H460 ćelijska linija je nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD), gde se vodi pod oznakom HTB177. Ćelije su epitelijalne morfologije, adherentne i rastu u monosloju. Karakteriše ih lako detektabilna ekspresija iRNK gena *TP53* i *PTEN* i to u nivou sličnom kao kod neizmenjenih ćelija pluća (Soria i ostali, 2002; Takahashi i ostali, 1989).

NCI-H460/R je ćelijska linija humanog karcinoma pluća uspostavljena u našoj laboratoriji iz NCI-H460 ćelijske linije (Pescic i ostali, 2006). NCI-H460 ćelije su kontinuirano tretirane rastućim koncentracijama (20-100 nM) doksorubicina u periodu od tri meseca. Selekcijom je, na ovaj način, dobijena rezistentna ćelijska linija označena kao NCI-H460/R koja stabilno raste u prisustvu 100 nM doksorubicina. Osim rezistencije na doksorubicin ova ćelijska linija pokazuje značajan stepen rezistencije i na druge klasične citostatike kao što su paklitaksel, etoposid i vinblastin. Shodno tome, NCI-H460/R ćelijska linija se odlikuje višestrukom rezistencijom na lekove, MDR fenotipom (Pescic i ostali, 2006).

COR-L23 je ćelijska linija humanog karcinoma pluća uspostavljena iz pleuralne efuzije pacijenta starog 62 godine muškog pola obolelog od krupnoćelijskog karcinoma pluća. Ćelijska linija je nabavljena od European Collection of Cell Cultures (ECACC, Velika Britanija). Kod COR-L23 ćelijske linije mutiran je gen *TP53* tumor supresora (http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines) (Oliver i ostali, 2011).

Sve tri ćelijske linije su gajene u flaskovima površine 25 cm² (Nunc, Danska) u osnovnom medijumu RPMI-1640 (Biological Industries, Izrael) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. fetal bovine serum, FBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), 2 mM L-glutamina (Biological Industries, Izrael) i smeše antibiotika 10 000 U/ml penicilina, 10 mg/ml streptomocina, i antimikotika 25 µg/ml amfotericina B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Kulture ovih ćelija su održavane u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na temperaturi od 37°C i u vlažnoj atmosferi sa 5% sadržaja CO₂. Kulture ovih ćelija su presejavane korišćenjem 0,25% tripsin/EDTA rastvora (Biological Industries, Izrael) dva puta sedmično po dostizanju 80-90% konfluentnosti. Broj ćelija je određivan pomoću hemocitometra na invertnom mikroskopu (Olympus, Nemačka). Ćelije su potom zasejavane u svežem medijumu u sledećim gustinama: 10 000 NCI-H460 ćelija/cm², 20 000 NCI-H460/R ćelija/cm² i 10 000 COR-L23 ćelija/cm².

Da bi se postigla pojedinačna ili istovremena inaktivacija p53 i PTEN tumor supresora, NCI-H60 ćelije su tretirane samostalno i u kombinaciji sa 10 µM PFT-α i 2,5 µM bpV(HOpic). Ćelije su tretirane 24 sata nakon zasejavanja u trajanju od 24 h. Ovako tretirane ćelije su u daljem tekstu označene kao NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-} i NCI-H460^{p53- / PTEN-} ćelije.

3.4. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA

Određivanje brojnosti i vijabilnosti ćelija postiže se njihovim bojenjem tripan-plavim (engl. trypan blue, TB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Princip na osnovu kog se žive ćelije razlikuju od mrtvih se zasniva na činjenici da TB ne prodire u unutrašnjost živih ćelija koje imaju intaktnu ćelijsku membranu. Zahvaljujući ovoj činjenici pod mikroskopom možemo razlikovati neobojenje žive ćelije i mrtve ćelije obojene TB-om koji prodire kroz njihovu oštećenu ćelijsku membranu. Ćelije su brojane mikroskopski na hemocitometru korišćenjem 0,4% TB rastvora u 1x PBS, 1x PBS i ćelija u medijumu u odnosu 5:3:2. Nakon 5 minuta, perioda koji omogućava prodiranje TB u mrtve ćelije, po 10 µl obojene ćelijske suspenzije je ubrizgano u obe komorice hemocitometra. Ćelije su brojane u po 5 pet polja, u obe komorice. Ukupan broj živih ćelija je određivan po sledećoj formuli:

ukupan broj ćelija/ml = prosečan broj ćelija po kvadrantu komorice x razblaženje ćelija x 10^4 , gde je 10^4 faktor komorice.

3.5. TEST CITOTOKSIČNOSTI LEKOVA I INHIBITORA

3.5.1. POJEDINAČNI I KOMBINOVANI TRETMANI ĆELIJA

U cilju proučavanja efekta CXCR4 i FAK inhibitora na supresiju invazije NSCLC ćelija sa farmakološki inaktiviranim p53 i/ili PTEN tumor supresorima najpre je ispitivan uticaj inhibitora ovih tumor supresora na vijabilnost NCI-H460 ćelija nakon 24 sata. U pojedinačnim tretmanima za inhibiciju p53 i PTEN tumor supresora korišćene su koncentracije 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M PFT- α i 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M bpV(HOpic). U kombinovanim tretmanima korišćene su sledeće koncentracije: 5 μ M, 10 μ M i 25 μ M PFT- α i 1 μ M i 2,5 μ M bpV(HOpic). Dalje je ispitivana citotoksičnost tretmana PF-573228 i WZ811 inhibitorima u opsegu koncentracija 0,5-10 μ M na COR-L23 i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelijama. Tretman PF-573228 i WZ811 inhibitorima kod NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija je primenjivan 2 sata nakon tretmana p53 i PTEN inhibitorima.

Za potrebe ispitivanja senzitivnosti NSCLC ćelija na klasične citostatike i farmakološke inhibitore korišćene su NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23 ćelije. Nakon sejanja po 1 000 ćelija po bunariću u 100 μ l svežeg medijuma i 24 časovne adaptacije, ćelije su tretirane terapeutcima u trajanju od 72 sata. Opseg koncentracija korišćenih u tretmanima je varirao za različite terapeutike: PF-573228 1–50 μ M, WZ811 1–50 μ M, PTX 0,001–1 μ M, DOX 0,001–10 μ M i Cpt 0,5–25 μ M.

Ispitivan je i uticaj kombinovanih tretmana DOX-a sa inhibitorima (PF-573228 i WZ811) na inhibiciju rasta NCI-H460/R i COR-L23 ćelijskih linija u trajanju od 72 sata. U slučaju kombinovanog tretmana na NCI-H460/R ćelijskoj liniji, tri različite koncentracije PF-573228 (2,5, 5 i 7,5 μ M), odnosno WZ811 (5, 10 and 25 μ M), kombinovane su sa 0,5–7,5 μ M opsegom DOX-a. Slično, COR-L23 ćelijska linija je tretirana sa tri različite koncentracije PF-573228 (2,5, 5 and 7,5 μ M), odnosno WZ811 (2,5, 5 and 10 μ M), u kombinaciji sa 10–500 nM opsegom DOX-a. Pored kombinovanog dejstva svakog inhibitora sa DOX-om na rast NCI-H460/R i COR-L23 ćelija, ispitivan je i istovremeni citotoksični efekat oba inhibitora zajedno sa DOX-om na ovim ćelijskim linijama. Tačnije, 2,5 μ M PF-573228 i 10 μ M WZ811

su zajedno kombinovani sa 0,5-7,5 μM opsegom DOX-a na NCI-H460/R ćelijskoj liniji, dok su 5 μM PF-573228 i 10 μM WZ811 kombinovani sa 10 – 500 nM DOX-om na COR-L23 ćelijskoj liniji.

Da bi se isključila mogućnost uticaja tretmana na vijabilnost rezistentnih ćelija u testovima migracije i invazije, MTT testom su ispitani efekti kombinovanih tretmana nakon 24 sata (trajanje testova migracije i invazije) na inhibiciju rasta NCI-H460/R i COR-L23 ćelija. Kod NCI-H460/R ćelijske linije testirano je citotoksično dejstvo 2,5 μM PF-573228 i 10 μM WZ811 u kombinacijama sa 0,5–7,5 μM DOX, dok je kod COR-L23 ćelijske linije analiziran citotoksični efekat 5 μM PF-573228 i 10 μM WZ811 sa DOX-om u rasponu koncentracija 10-500 nM.

3.5.2. MTT TEST VIJABILNOSTI

Efekti lekova i inhibitora na rast ćelijskih linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća ispitivani su primenom MTT testa. MTT test je najčešće korišćena *in vitro* analiza za određivanje stepena preživljavanja ćelija nakon tretmana, i koju je prvi opisao Tim Mosmann 1983. godine (Mosmann, 1983). Ovaj kolorimetrijski test se zasniva na sposobnosti vijabilnih ćelija da na membrani funkcionalnih mitohondrija redukuju žutu tetrazolijumovu so (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid, MTT) u formazan (Berridge i ostali, 2005). Formazan kristali, tamno ljubičaste boje, se rastvaraju dodavanjem odgovarajućeg rastvarača i apsorbancu se meri na 500-600 nm koristeći ELISA čitač. Izmerena apsorbancu koreliše sa brojem vijabilnih ćelija.

Test je rađen prema sledećoj proceduri:

1. Nakon isteka perioda predviđenog za tretman ćelija u mikrotitar pločama sa 96 bunarića, po 100 μl MTT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) rastvora (2 mg/ml) sipano je u svaki bunarić.
2. Naredna 3h, omogućeno je stvaranje formazana u vijabilnim ćelijama u inkubatoru na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂.
3. Zatim je medijum odliven i kristali formazana su rastvoreni u DMSO, 10 minuta na sobnoj temperaturi.

4. Apsorbanca (A) je određena pomoću ELISA čitača (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austrija), na talasnoj dužini 540 nm, sa korekcijom na 670 nm.
5. Na osnovu dobijene apsorbance je određen procenat inhibicije ćelijskog rasta (IC) prema sledećoj formuli:

$$IC (\%) = 1 - (A_{\text{tretirani uzorak}} / A_{\text{netretirana kontrola}}) \times 100$$

Koncentracija supstance koja dovodi do 50% inhibicije rasta ćelijske kulture se definiše kao IC₅₀ vrednost. IC₅₀ vrednost se izračunava pomoću linearne regresije. Testovi citotoksičnosti su rađeni u triplicatu i ponovljeni najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost triplikata ± standardna greška i efekti tretmana su upoređeni u odnosu na netretirane kontrolne uzorke.

3.5.3. ANALIZA CITOTOKSIČNOG EFEKTA KOMBINACIJE TERAPEUTIKA

Na osnovu podataka dobijenih MTT testom vijabilnosti analizirana je priroda međusobnog dejstva (sinergizam, antagonizam ili aditivni efekat) DOX-a i CXCR4 i FAK inhibitora. Računarski program CalcuSyn (Biosoft, Velika Britanija) je korišćen za izračunavanje kombinacionog indeksa (engl. combination index, CI) koji se zasniva na jednačini srednjeg efekta više terapeutika (Chou i Talalay, 1984). Ovaj metod uzima u obzir efekat svake supstance pojedinačno, efekat dve supstance u kombinaciji, kao i njihovog doza–efekat linearnog grafikona. Za izračunavanje kombinacionog indeksa potrebne su vrednosti inhibicije ćelijskog rasta za po najmanje tri doze svake supstance pojedinačno. Konačna procena prirode međudejstva terapeutika rađena je prema sledećoj raspodeli vrednosti kombinacionog indeksa: CI < 0,9 - sinergizam, CI > 1,1 - antagonizam i CI = 0,9 – 1,1 - aditivni efekat. CI vrednosti prikazane u ovoj disertaciji su reprezentativni rezultati najmanje tri izvedene analize.

Na osnovu dobijenih rezultata, koncentracije terapeutika sa najizraženijim sinergističkim efektom na inhibiciju ćelijskog rasta su korišćene u ostalim eksperimentima. Koncentracije korišćene za pojedinačne i kombinovane tretmane su sledeće: a) PF-573228 2,5 μM, WZ811 10 μM i DOX 1 μM za NCI-H460/R ćelijsku liniju i b) PF-573228 5 μM, WZ811 10 μM i DOX 50 nM za COR-L23 ćelijsku liniju.

3.6. ANALIZE ĆELIJA PROTOČNOM CITOFLUORIMETRIJOM

Metoda protočne citofluorimetrije ima široku primenu u biološkim istraživanjima. U ovoj studiji korišćena je za ispitivanje efekta tretmana na: a) indukciju ćelijske smrti, b) distribuciju ćelijskog ciklusa, c) akumulaciju doksorubicina u ćelijama, i d) β -galaktozidaznu aktivnost ćelija, e) kao i za određivanje količine CXCR4 proteina u ćelijama.

3.6.1. ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI

Procenat apoptotskih, nekrotičnih i živih ćelija ispitivan je primenom bojenja aneksin V-FITC (AV) / propidijum jodid (PI) paketom (Abcam, Velika Britanija). Ova metoda se zasniva na svojstvu ćelija da već u ranoj fazi apoptoze premeštaju fosfatidil serin sa unutrašnje strane ćelijske membrane na njenu spoljašnju stranu, što je signal za prepoznavanje apoptotične ćelije od strane makrofaga. Za detektovanje takvih ćelija koristi se fluorescentno obeleženi aneksin V-FITC koji ima visok afinitet vezivanja za membranski fosfatidil serin. Sa druge strane, PI ulazi samo u ćelije sa narušenim integritetom plazma membrane. Shodno tome, kombinovanjem ova dva agensa mogu se razlikovati žive ćelije (AV-PI-), ćelije u ranoj apoptozi (AV+PI-), ćelije u kasnoj apoptozi (AV+PI+) i nekrotične ćelije (AV-PI+).

Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su sejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića (Nunc, Thermo Fisher Scientific, SAD) i inkubirane preko noći. Gustina sejanja ćelija bila je 100 000 ćelija po bunariću u 1 ml medijuma. Nakon 72 sata tretmana, prikupljene su plivajuće i adherentne ćelije tripsinizovane po standardnoj proceduri. Sakupljene ćelije su centrifugirane 3 minuta na 2000 rpm. Talog ćelija je resuspendovan u 100 μ l 1X pufera za obeležavanje (10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl i 5 mM CaCl₂) u koji je dodato 2 μ l AV i 2 μ l PI i inkubiran je najmanje 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 200 μ l 1X pufera za vezivanje. Intenzitet fluorescence AV je izmeren u zelenom (FL1-H), a PI u crvenom (FL2-H) kanalu na CyFlow (Sysmex Partec, Nemačka) protočnom citofluorimetru. Za svaki uzorak beleženo je 10 000 događaja. Eksperimenti su urađeni u triplikatu, a prikazan je reprezentativni primer. Rezultati su analizirani Summit softverskim paketom (Dako, Colorado Inc., SAD).

3.6.2. ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA

Distribucija ćelijskog ciklusa ispitivana je primenom PI bojenja. Ova boja nakon ulaska u ćelije interkalira u DNK zavojnicu i fluorescira u narandžasto-crvenoj boji. Sama metoda se zasniva na činjenici da se ćelije, tokom faza ćelijskog ciklusa, razlikuju po sadržaju DNK. U G0/G1 fazi sadržaj DNK u ćeliji je 2N, u S fazi 2N-4N, a u G2/M fazi 4N. Nakon obeležavanja ćelija PI-om, intenzitet fluorescence je proporcionalan sadržaju DNK po ćeliji i ukazuje na fazu ćelijskog ciklusa u kojoj se one nalaze.

Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su sejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića i inkubirane preko noći. Gustina sejanja ćelija je bila 100 000 ćelija po bunariću u 1 ml medijuma. Nakon 72 sata tretmana, prikupljene su plivajuće i adherentne ćelije tripsinizovane po standardnoj proceduri. Plivajuće i odlepljene ćelije centrifugirane su zajedno 3 minuta na 2 000 rpm i fiksirane 70% etanolom u trajanju od 24 sata na -20°C. Nakon ponovnog centrifugiranja i uklanjanja etanola, ćelije su inkubirane u 500 µl PBS-a sa 50 µg/ml RNase A na 37°C. RNase A se dodaje kako bi se onemogućilo interkaliranje propidijum jodida u duple zavojnice RNK. Nakon 30 minuta dodato je 20 µg/ml PI i inkubirano još 5 minuta pre analize na FACSCalibur protočnom citofluorimetru (Becton Dickinson, SAD). Za svaki uzorak registrovano je 10 000 događaja. Eksperimenti su rađeni u triplikatu, a prikazan je reprezentativni primer. Rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro, pomoću Mod programa (Verity Software House, Inc., SAD) koji vrši automatsko određivanje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

3.6.3. AKUMULACIJA DOKSORUBICINA

Akumulacija DOX-a je analizirana metodom protočne citofluorimetrije koristeći sposobnost DOX-a da nakon ekscitacije fluorescira u crveno-narandžastom spektru. Prema tome, intenzitet fluorescence DOX-a u vijabilnim ćelijama je srazmeran njegovoj akumulaciji. Za potrebe ovog eksperimenta, ćelije su sejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića i inkubirane preko noći. Gustina sejanja ćelija je bila 100 000 ćelija po bunariću u 1 ml medijuma. Nakon 72 sata tretmana, prikupljene su samo adherentne ćelije tripsinizovane po standardnoj proceduri i resuspendovane u tubama sa 1 ml medijuma.

Prikupljene ćelije su zatim tretirane 10 μ M DOX-om i inkubirane 30 minuta na temperaturi od 37°C. Na kraju ovog perioda predviđenog za akumulaciju, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 1800 rpm i isprane hladnim 1X PBS-om nekoliko puta. Ćelije spremne za analizu su resuspendovane u 1X PBS-u sa 10% FBS-om i čuvane na 4°C u mraku do trenutka analize na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, SAD). Narandžasta fluorescenca DOX-a je merena na FL2-H kanalu pri talasnoj dužini 530 nm i rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro. Za svaki uzorak beleženo je 10 000 događaja. Eksperimenti su rađeni u triplikatu, a prikazan je reprezentativni primer.

3.6.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI β -GALAKTOZIDAZE

Ćelije izložene stresu mogu nepovratno izgubiti sposobnost da proliferišu. Ovo stanje ćelija se naziva ćelijsko mirovanje i odlikuje se povećanom aktivnošću enzima β -galaktozidaze. U ovoj studiji β -galaktozidazna aktivnost ćelija u mirovanju određivana je protočnom citofluorimetrijom korišćenjem fluorescein-di- β -D-galactopyranosidaze (FDG) (Thermo Fisher Scientific, SAD) kao fluorescentnog supstrata za enzim β -galaktozidazu.

Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su sejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića i inkubirane preko noći. Gustina sejanja ćelija je bila 100 000 ćelija po bunariću u 1 ml medijuma. Nakon 72 sata tretmana, prikupljene su adherentne ćelije tripsinizovane po standardnoj proceduri. Ćelije su centrifugirane 3 minuta na 2000 rpm. Talog ćelija je resuspendovan u 25 μ l odgovarajućeg rastvora FDG-a. Rastvor 200 mM FDG-a je pripremljen rastvaranjem 5 mg FDG u 38 μ l rastvora H₂O:DMSO (1:1). Dalje, taj rastvor je 100 puta razblažen u sterilnoj vodi, zagrejan na 37°C i tako pripremljen korišćen za resuspendovanje ćelija. Smeša ćelija i FDG rastvora je inkubirana na 37°C u trajanju od 1 minuta, nakon čega je dodat 1 ml hladnog PBS-a sa 0,2 μ g PI-a kako bi se mrtve ćelije isključile iz analize. Ćelije su dalje čuvane na ledu do trenutka analize na CyFlow (Sysmex Partec, Nemačka) protočnom citofluorimetru. Rezultati su analizirani Summit softverskim paketom. Za svaki uzorak registrovano je 10 000 događaja. Eksperimenti su rađeni u triplikatu, a prikazan je reprezentativni primer.

3.6.5. ODREĐIVANJE KOLIČINE CXCR4 PROTEINA

Nivo CXCR4 proteina je detektovan protočnom citofluorimetrijskom analizom. Za potrebe ovog eksperimenta, ćelije su sejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića i inkubirane preko noći. Gustina sejanja ćelija je bila 100 000 ćelija po bunariću u 1 ml medijuma. Nakon tretmana, adherentne ćelije su sakupljene nakon tripsinizacije po standardnoj proceduri, isprane PBS-om i fiksirane u 4% paraformaldehidu (PFA) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su zatim permeabilizovane u ledeno hladnom 100% metanolu tokom 30 minuta na 4°C. Nakon ispiranja u PBS-u, ćelije su blokirane 1 sat sa 0,5% albumina goveđeg seruma (engl. Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma Aldrich, Nemačka) u PBS-u. Ćelije su zatim resuspendovane u primarnom antitelu (mišiji anti-CXCR4, Invitrogen, 35-8800) razblaženom u 0,5% BSA (1:100) i inkubirane preko noći na 4°C. Nakon ispiranja PBS-om, ćelije sa vezanim nekonjugovanim primarnim antitelom resuspendovane su u sekundarnom antitelu (Aleksa Fluor 488 kozije anti-mišije IgG (H + L), Invitrogen, A-11001), razblaženom u 0,5% BSA (1:1 000) i inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi. Ćelije su zatim isprane i resuspendovane u 1 ml PBS-a. Intenzitet fluorescence je izmeren na FL1-H kanalu na CyFlow (Sysmex Partec, Nemačka) protočnom citofluorimetru. Rezultati su analizirani Summit softverskim paketom. Za svaki uzorak beleženo je 10 000 događaja. Eksperimenti su rađeni u triplikatu, a prikazan je reprezentativni primer.

3.7. IZOLACIJA PROTEINA IZ ĆELIJA I WESTERN BLOT ANALIZA

3.7.1. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Ukupni proteini su izolovani iz ćelija korišćenjem RIPA pufera (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) kome je neposredno pred upotrebu dodat kompletan koktel proteaznih inhibitora (Roche, Nemačka), kao i fosfatazni inhibitori (25 mM NaF, 5 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄) (Roche, Nemačka). Za potrebe izolacije proteina, 1 x 10⁶ ćelija je zasejano u mikrotitar ploče sa 6 bunarića. Totalni proteini su izolovani iz kontrolnih ćelija i ćelija nakon 24-satnih tretmana. Tokom procedure izolacije proteina najpre je odliven medijum i ćelije su isprane hladnim rastvorom PBS-a. U svaki bunarić je sipano 200 µl prethodno pripremljenog i ohlađenog RIPA pufera za

liziranje i ćelije su potom prebačene u tubice od 0,5 ml na ledu. Homogenati su sonifikovani i centrifugirani na 14 000 x g, 30 minuta na 4°C, a supernatant sa solubilnim proteinima uzet je za dalje analize. Uzorci su čuvani na -80°C do daljih analiza.

Koncentracija ukupnih proteina određivana je pomoću komercijalno nabavljenog kompleta Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, SAD), po uputstvu proizvođača. U 65 µl dejonizovane vode dodato je 10 µl uzorka i 125 µl boje i nakon 30 minuta očitana je apsorbancija na 562 nm na ELISA čitaču (Bio-Rad Laboratories, SAD). Koncentracija uzoraka određena je iz standardne krive konstruisane primenom poznatih koncentracija BSA.

3.7.2. ELEKTROFOREZA PROTEINA

Elektroforetsko razdvajanje proteina na osnovu molekulske težine vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE) u mini aparaturi za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Gel za razdvajanje proteina je sadržao 12% smešu akrilamid/bisakrilamida (Sigma-Aldrich, Nemačka) u odnosu 29:1, kao i 0,375 M Tris pH 8,8 i 0,1% SDS. Gel za koncentrisanje je sadržao: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1), 0,125 M Tris pH 6,8 i 0,1% SDS. Za polimerizaciju je korišćeno 60 µl 10% amonijum persulfata (APS) i 5 µl TEMED-a na 10 ml smeše, za oba gela.

Količina proteina koja je nanošena na gel je optimizovana eksperimentalno za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive u zavisnosti od intenziteta signala i količine nanetih proteina. Na osnovu toga, za analizu ekspresije proteina nanošeno je 40 µg proteina po bunariću. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2X Laemmli pufer (31,25 mM Tris pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptoetanol; 0,025% bromfenol plavo) koji je dodat uzorku u odnosu 1:1. Pre nalivanja, uzorci su dodatno denaturisani 5 minuta na 95°C. Kao standard za molekulsku težinu korišćen je obojeni *Rainbow* marker širokog opsega (GE Healthcare, SAD). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3; 0,1% SDS) pod konstantnim naponom od 150 V na sobnoj temperaturi.

3.7.3. ELEKTROTRANSFER PROTEINA

Transfer proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu (Hybond-P, GE Healthcare, Velika Britanija) je vršen pomoću sistema za transfer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (20% metanol, 192 mM glicin, 25 mM Tris pH 8,3), gde je ostavljen narednih 30 minuta. PVDF membrana je aktivirana u metanolu 10 sekundi, a zatim isprana u destilovanoj vodi 5 minuta. Nakon toga je prebačena u posudu sa puferom za transfer gde je ekvilibrisana narednih 20 minuta. Pomoćne komponente (filter papir, Watman papir, sušeri) su takođe pripremljene potapanjem u pufer za transfer 20 minuta. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i postavljanja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen preko noći, pod konstantnim naponom od 30 V. Po završenom transferu, membrane su sušene na sobnoj temperaturi 120 minuta, po preporuci proizvođača. Vizuelizacija proteinskih traka je vršena nakon aktivacije suvih membrana (kratko potapanje u metanol), potapanjem u Ponceau S boju (1% Ponceau S boja, 5% glacijalna sirćetna kiselina, destilovana voda). Gelovi su bojeni Coomassie Brilliant Blue bojom (0,25% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% glacijalna sirćetna kiselina, 45% metanol, destilovana voda), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi.

3.7.4. IMUNOLOŠKA DETEKCIJA IMOBILIZOVANIH PROTEINA

U cilju smanjivanja verovatnoće nespecifičnog vezivanja antitela, membrane su blokirane rastvorom obranog mleka (5%) u Tris-boratnom puferu sa dodatkom Tween-20 deterdženta (TBS-T: 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM natrijum hlorid, 0,05% Tween 20) u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi. Blokirane membrane su ispirane u TBS-T puferu 15 minuta, koji je zatim odliven i zamenjen rastvorom za blokiranje u koji su dodata primarna antitela. Korišćena su sledeća primarna zečija antitela: anti-AKT (1:1 000; Santa Cruz, sc-8312), anti-pAKT (1:750; Santa Cruz, sc-7985), anti-ERK (1:1 000; Santa Cruz, sc-94), anti-pERK (1:1 000; Santa Cruz, sc-16,982), anti-FAK (1:1 000; Invitrogen, 701,094) i anti-pFAK (pY397) (1:1 000; Invitrogen, 44-625G). Nakon inkubiranja sa primarnim antitelom preko noći na 4°C, membrane su ispirane tri puta po 10 minuta u TBS-T puferu, a

potom dalje inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi sa Horse Radish Peroxidase (HRP)-konjugovanim anti-zečijim sekundarnim antitelom (1:5 000; Santa Cruz, sc-2370 i 1:5 000; Abcam, 97051). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBS-T puferu, a zatim izložene dejstvu luminola (Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent, Solution A and Solution B, Santa Cruz Biotechnology, SAD). Membrana je inkubirana u substratu 1 minut, ocedena i izložena autoradiografskom filmu (Kodak Biomax) u trajanju od 1 do 5 minuta. Filmovi su razvijani odmah po završetku ekspozicije membrana i skenirani radi dalje analize. Svaka membrana je ponovo inkubirana sa primarnim mišijim antitelom za β -aktin (1:5 000; Santa Cruz, sc- 8432) ili GAPDH (1:5 000; Biologend, 649202), a potom i sa anti-mišijim sekundarnim antitelom (1:5 000; Dako, 2021-02 ili 1:10 000; Cell Signaling, 7076S).

3.7.5. SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOBLOTOVA

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem računarskog programa za analizu signala (TotalLab (Phoretix) v1.1). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na odgovarajući β -aktin ili GAPDH, kao kontrolu za nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za izračunavanje odnosa između ukupnih i fosforilisanih formi ispitivanih proteina, statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.8. ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE

3.8.1. IZOLACIJA RNK

Promene genske ekspresije su ispitivane u uzorcima tkiva pacijenata, kao i u ćelijskim linijama. Ukupna RNK je izolovana iz tumorskog i neizmenjenog plućnog tkiva svakog pacijenta, kao i iz odgovarajućih kontrolnih ćelija i ćelija nakon tretmana DOX-om. U proceduri izolacije RNK korišćen je Trizol reagens (Invitrogen, SAD) prema proceduri proizvođača. Procedura izolacije RNK iz uzoraka tkiva i ćelijskih linija se razlikuje samo u prvom koraku pripreme i homogenizacije uzoraka. Svi koraci nakon toga su identični.

Prilikom izolacije RNK iz tkiva pacijenata, prvi korak je bio liziranje i homogenizacija tkiva. Približno 0,1 g tkiva je lizirano sa 1 ml Trizol-a i homogenizovano u ručnom homogenizeru. U izolaciji RNK iz ćelijskih linija, ćelije su sejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića. Gustina sejanja ćelija je bila 200 000 ćelija po bunariću u 1 ml medijuma. Nakon 24 sata, NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23 ćelije su tretirane odgovarajućim koncentracijama DOX-a, i to redom 20 nM, 1 μ M i 50 nM. 24 sata nakon tretmana, oko 1×10^6 ćelija je lizirano dodavanjem 1 ml Trizol-a i homogenizovano provlačenjem kroz pipetu nekoliko puta.

Homogenizovani uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali. Nakon toga svakom uzorku je dodato 0,2 ml hloroforma. Nakon mešanja, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi još 2-3 minuta i centrifugirani 15 minuta na 12 000 x g pri 4°C u centrifugi sa hlađenjem (Centrifuge 5427R Eppendorf, Nemačka). Smeša je na taj način razdvajena na tri faze, donju crvenu fenol-hloroformsku, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK. Vodenu fazu čini 60% zapremine Trizol-a korišćenog za liziranje. Vodena faza je prenetu u nove tubice i dodato je 0,5 ml izopropanola. Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirani 10 minuta na 4°C i 12 000 x g. Na taj način RNK se taloži formirajući beličasti talog na dnu tubica. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je ispran sa 1 ml 75% etanola (rastvorenim u 0,1% DEPC vodi). Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 7 500 x g pri 4°C. Nakon centrifugiranja uzoraka, etanol je odliven i tubice su ostavljene da se talog osuši na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u 0,1% DEPC vodi i koncentracija RNK je merena spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

3.8.2. PROVERA KVALITETA RNK

Kvalitet RNK je ispitivan elektroforezom uzoraka na 1,3% agaroznom gelu (1,3 g agaroze u 100 ml 1X TBE pufera) sa 0,4 μ g/ml etidijum bromida. Uzorak RNK je pre nanošenja na gel mešan sa 0,4% rastvorom bromfenol plavog u 50% glicerolu u zapreminskom odnosu 1:1. Nakon elektroforeze u 1X TBE puferu pri 100 V, RNK je vizualizovana na Gel-Doc sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Kvalitet izolovane RNK je utvrđivan upoređivanjem odnosa inteziteta 28S i 18S RNK traka.

3.8.3. TRETMAN DNA-zom I REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCIJE (RT)

Totalna RNK (2 µg) u smeši sa DNA-zom I (1X finalno), 10X puferom (1X finalno) i DEPC vodom (do 9 µl finalnog volumena) je inkubirana 30 minuta na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1 µl EDTA, inkubiranjem smeše na 65°C 10 minuta i njenim hlađenjem na ledu. Reakcionoj smeši je dalje dodavano 10 µl smeše za reverznu transkripciju (High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, SAD) prema preporuci proizvođača. RT miks se sastojao iz sledećih komponenti u finalnim koncentracijama: 1X Random prajmera, 1X pufera, 1mM dATP, 1 mM dTTP, 1mM dGTP, 1 mM dCTP, 20U RNaznog inhibitora i 50 U MultiScribe™ reverzne transkriptaze. RT reakcija je trajala 2 sata na 37°C. Uzorci su zatim inkubirani 5 minuta na 85°C i potom ohlađeni na ledu. Dobijena cDNK koncentracije 100 ng/µl je čuvana na - 20°C.

3.8.4. ANALIZA EKSPRESIJE GENA METODOM KVANTITATIVNOG PCR-a (qPCR) U REALNOM VREMENU

qPCR u realnom vremenu je korišćen za određivanje razlike u nivou ekspresije iRNK gena *CXCR4*, *FAK*, *PTEN*, *ABCB1* i *ABCC1* u tumorskim uzorcima u odnosu na odgovarajuće uzorke neizmenjenog tkiva pacijenata, kao i među ćelijskim linijama.

Nakon reakcije reverzne transkripcije, reakcija qPCR je izvođena na aparatu ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD) korišćenjem Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-a (Thermo Fisher Scientific, SAD), po uputstvu proizvođača, koristeći 100 ng cDNK i prajmere za gore pomenute gene u ukupnom volumenu od 20 µl (Bösch i ostali; Chadderton i ostali, 1997; Dai i ostali, 2013; Ko i ostali, 2010; Shen i ostali, 2006). Pored toga, za svaki uzorak korišćeni su i prajmeri za gen *ACTB*, koji je služio kao endogena kontrola (NicAmhlaoihb i ostali, 1999). Nakon završenog procesa amplifikacije, rezultati su analizirani korišćenjem računarskog programa 7000 System Software (Applied Biosystems, SAD). Svaki uzorak je testiran u triplikatu i relativna ekspresija gena je analizirana korišćenjem $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metode (Livak i Schmittgen, 2001).

3.9. ISPITIVANJE INVAZIVNOG I MIGRATORNOG POTENCIJALA ĆELIJA

3.9.1. TEST ZARASTANJE POVREDE

Metoda zarastanja povrede (engl. wound healing) je test za proučavanje sposobnosti ćelija da migriraju u različitim uslovima. U ovom testu, “rana” je napravljena jednostavnim grebanjem monosloja ćelija, a kretanje ćelija ka centru povrede i njeno “zarastanje” je praćeno tokom vremena i kvantifikovano. Faktori, koji menjaju migraciju ćelija mogu dovesti do povećanja ili smanjenja stope “zarastanja” rane.

Procedura se sastojala iz više faza:

1. Sve ćelijske linije su umnožene, prebrojane i zasejane u adherentnim mikrotitar pločama sa 24 bunarića. Po bunariću je sejano 200 000 ćelija što je dovoljno da ćelije oforme konfluentan monosloj nakon 24 h. Ćelije su gajene u 1 ml RPMI medijuma po bunariću.
2. Nakon 24 sata u svakom bunariću zagreban je monosloj ćelija nastavkom (20-200 μ l) pod pravim uglom, pri čemu se vodilo računa da svi bunarići budu jednako zagrebani u obliku krsta. U svakom bunariću je nakon toga promenjen medijum da bi se odstranile odlepljene ćelije.
3. Ćelije su tretirane sa ranije pomenutim terapeutcima. Koncentracije terapeutika korišćene u ovom testu nemaju uticaj na vijabilnost ćelija što je prethodno pokazano MTT testom. Odmah nakon tretiranja ćelija kao i 24 sata nakon tretmana svaki bunarić je slikan na svetlosnom mikroskopu na 2X uveličanju tako da “rana” u obliku krsta bude centralno pozicionirana na slici.
4. Rezultati su analizirani u programu ImageJ. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu i prikazane su reprezentativne slike.

3.10. TEST DEGRADACIJE ŽELATINA

Merenjem stepena degradacije želatina utvrđuje se sposobnost ćelija da razgrađuju vanćelijski matriks. Kao model koristili smo želatin od svinjske kože koji je konjugovan sa fluorescentnom zelenom bojom (engl. Gelatin From Pig Skin,

Oregon green 488 conjugate, Life Technologies, SAD). Princip metode je da se ćelije zaseju na tankom sloju fluorescentno obeleženog matriksa i da se nakon 24 sata zabeleže i izmere oblasti gde nema fluorescence, tačnije oblasti gde su ćelije degradovale matriks.

Procedura se sastojala iz nekoliko faza:

1. Želatin, predhodno zagrejan 10 minuta na 37°C i rastvoren u PBS puferu u odnosu 1:5 (1 mg/μl finalno), je sipan u svako ležište ploče sa 6 bunarića, a potom je dodato 50 μl 0,25% gluteraldehida, čija je uloga umrežavanje želatina i stvaranje njegove nerastvorljive varijante.
2. Sterilna pokrovna stakla su postavljena u svaki bunarić preko nanetog želatina. Težina samih pokrovnih stakala obezbeđuje ravnomerno raspoređivanje želatina nakon polimerizacije po pokrovnom staklu.
3. Polimerizacija želatina je trajala 15 minuta na 4°C.
4. Zatim su pločice prebačene u novu ploču sa 6 bunarića tako da želatin bude sa gornje strane pokrovnog stakla, nakon čega je želatin ispran 3 puta PBS-om.
5. 40 000 ćelija u 1 ml odgovarajućeg medijuma sejano je na pokrovna stakla. Ćelije su držane 3 sata u inkubatoru na 37°C, nakon čega su tretirane terapeutcima.
6. Nakon 24 sata inkubacije, medijum je odliven i ćelije su fiksirane sa 4% PFA. Zatim je dodat 0,1% rastvor Triton™ X-100 u PBS puferu. Posle 10 minuta na pločice je sipan ActinRed™ 555 (Life Technologies, SAD) prema protokolu proizvođača. Nakon bojenja sa Hoechst 33342 bojom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), pokrovna pločica je nameštena na mikroskopsku pločicu pomoću Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) rastvora u glicerolu. ActinRed™ 555 je korišćen za vizuelizaciju aktinskih filamenata, a Hoechst 33342 za vizuelizaciju ćelijskih jedara. Pločice su slikane na 20X uveličanju na Zeiss Axiowert fluorescentnom

mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) pomoću AxioVision 4.8. programa.

7. Rezultati su analizirani u ImageJ programu. Mereni su obimi ćelija i odgovarajućih degradiranih oblasti želatina. Stepen degradacije želatina svake pojedinačne ćelije predstavljen je kao odnos obima degradirane oblasti u odnosu na obim ćelije. Analizirano je najmanje 100 ćelija. U rezultatima su pored histograma predstavljene reprezentativne slike.

3.10.1. TEST INVAZIVNOSTI ĆELIJA

Tumorske ćelije sa metastatskim potencijalom imaju sposobnost invazije, tj. svojstvo da se kreću ka izvoru hemijskog ili fizičkog stimulusa i da enzimatski razgrađuju prepreke u vidu proteina vanćelijskog matriksa i bazalne membrane. Sposobnost invazije ćelija utvrđena je ispitivanjem stepena prolaska ćelija kroz poroznu membranu obloženu matrigelom. U tu svrhu je korišćen komercijalno dostupan Matrigel, smeša vanćelijskih proteina koje sekretuju *Engelbret-Holm-Swarm* (EHS) ćelije mišjeg sarkoma, kojim su oblagane membrane na dnu komorica (BD Labware, SAD). Membrane su prečnika 6,4 mm i dijametra pora 8 µm.

Postupak testiranja invazivnosti ćelija sastojao se iz nekoliko koraka:

1. Komore sa poroznom membranom su stavljane u ploče za gajenje ćelija sa 24 bunarića. Gornja površina membrana je oblagana tankim slojem Matrigel-a razblaženim 1:15 u RPMI medijumu bez FBS-a (500 ng/ml finalno po membrani) kome je dozvoljeno da polimeriše 1 sat na 37°C.
2. U bunariće je prvo sipano 0,5 ml medijuma, a zatim su postavljene komorice sa pripremljenim matrigelom. Za pozitivne kontrole i tretmane korišćen je medijum sa 10% FBS seruma, dok je za negativnu kontrolu eksperimenta sipan medijum bez FBS seruma u bunariće.
3. U tako pripremljene komorice zasejano je po 200 000 ćelija u 0,2 ml RPMI medijumu bez FBS-a. Ćelije su tretirane terapeutcima u koncentracijama koje nisu uticale na vijabilnost ćelija, što je prethodno pokazano MTT testom.

4. Nakon 24 sata, medijum je izvađen iz komorica i ćelije sa gornje strane membrane koje nisu migrirale su odstranjene špatulicom.
5. Ćelije koje su migrirale su fiksirane 4% rastvorom PFA u trajanju od 10 minuta, a potom bojene 30 minuta Hoechst 33342 fluorescentnom bojom koja služi za vizuelizaciju ćelijskih jedara.
6. Membrane su isečene sa komorica i fiksirane na mikroskopsku pločicu sa rastvorom Mowiol®-a 4-88 u glicerolu.
7. Na svakoj membrani slikano je 10 različitih polja na 10X uvećanju na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu korišćenjem AxioVision 4.8 programa.
8. Slike dobijene na fluorescentnom mikroskopu su analizirane ImageJ programom i određivan je broj ćelija koje su invadirale. Eksperiment se smatra uspešnim ukoliko u negativnoj kontroli ima manje od 15% ćelija koje su invadirale kroz matrigel i membranu u odnosu na 100% ćelija koje su invadirale u pozitivnoj kontroli. Eksperiment je ponovljen tri puta za svaku ćelijsku liniju.

3.11. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U *in vivo* eksperimentima korišćeni su NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) miševi stari 8 nedelja i SCID (engl. Severe Combined Immunodeficiency) miševi stari 8-10 nedelja. Svi eksperimenti u kojima su korišćene životinje sprovedeni su laboratoriji dr Konstantinosa Dimasa (University of Thessaly, Larisa, Grčka). Eksperimenti su rađeni u skladu sa propisima Evropske unije (EU Directive 2010/63/EU) o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe i odobreni su od strane lokalne nadležne institucije u Grčkoj (local Directorate-General for Regional Rural Economy and Veterinary; broj licence 5542/228006; 30/11/2016), kao i od strane Etičkog komiteta IBISS-a (rešenje broj 01-876). Životinje su u toku eksperimenta gajene u sterilnim prostorijama sa kontrolisanim uslovima (ciklusi od 12 sati svetla i 12 sati mraka, sa slobodnim pristupom hrani i autoklaviranoj vodi).

3.12. EKSPERIMENTALNI DIZAJN ANIMALNIH MODELA

3.12.1. SUBKUTANA INOKULACIJA ĆELIJA

Za određivanje tumorigenog potencija humanih NSCLC ćelijskih linija razvijeni su mišji modeli sa subkutanim ksenograftima tumora pluća. Za potrebe ovog eksperimenta NCI-H460 i COR-L23 ćelije su inokulirane NSG miševima pod kožu aksilarne regije zadnjih nogu. Na dan inokulacije, NCI-H460 i COR-L23 ćelije su prebrojane i inokulirane su dve različite gustine ćelija (10 000 i 100 000 ćelija u 100 μ l medijuma) za obe ćelijske linije. Formiranje opipljivih potkožnih tumora praćeno je svakodnevno. Svaka eksperimentalna grupa se sastojala od 3 miša sa inokuliranim tumorskim ćelijama u obe aksilarne regije zadnjih nogu. Eksperiment je prekinut kada je zapremina tumora dostigla zapreminu od 1 500 mm^3 , odnosno oko 11% težine miša.

Da bi se ispitale dinamike rasta NCI-H460 i COR-L23 tumora u *in vivo* modelu, uspostavljeni su subkutani ksenografti tumora pluća u SCID miševima. Na dan inokulacije, NCI-H460 i COR-L23 ćelije su prebrojane i 10^6 ćelija svake ćelijske linije inokulirano je SCID miševima pod kožu aksilarne regije zadnjih nogu. Tri puta nedeljno je praćen rast tumora kod NCI-H460 i COR-L23 ksenografta i merena je veličina tumora. Zapremina tumora je izračunavana prema formuli $V (\text{mm}^3) = a \times b^2/2$, gde je $V (\text{mm}^3)$ zapremina tumora u mm^3 , a = dužina i b = širina tumora. Svaka eksperimentalna grupa se sastojala od 3 miša sa inokuliranim tumorskim ćelijama u obe aksilarne regije zadnjih nogu. Eksperiment je prekinut kada je zapremina tumora dostigla zapreminu od 1500 mm^3 , tj. oko 11% od težine miša.

3.12.2. INTRAPLEURALNA INOKULACIJA ĆELIJA

Intrapleuralna inokulacija ćelija je korišćena za uspostavljanje *in vivo* ortotopnog metastatskog modela tumora pluća, prema proceduri koju su opisali Kraus-Berthier i kolege (Kraus-Berthier i ostali, 2000). SCID miševi su anestetizirani intraperitonealnom injekcijom Ketamina u dozi 10 mg/kg i Xylazina 2 mg/kg. Na dan inokulacije, NCI-H460 i COR-L23 ćelije su prebrojane i rastvorene u 100 μ l RPMI medijuma. Vijabilnost ćelija je proverena tripan-plavom bojom i eksperiment je nastavljan isključivo ako je vijabilnost bila veća od 95%. Obe ćelijske linije su implantirane pomoću igle promera 26 u dve inokulacione gustine (1×10^6 i 5×10^5) u

zapremeni od 100 μ l RPMI medijuma kroz zid grudnog koša u levu pleuralnu šupljinu SCID miševa (i.pl. – engl. intra pleural). Svaka eksperimentalna grupa se sastojala od 5 miševa. Pre vraćanja u kavez, miševi su stavljeni pod toplotnu lampu da bi se održavala telesna temperatura i omogućio brži oporavak. Po jedan miš iz svake grupe je žrtvovan 14 dana nakon inokulacije tumorskih ćelija radi procene metastatskog širenja formiranih NCI-H460 i COR-L23 tumora. Preostale životinje su praćene svakodnevno i mereno je vreme preživljavanja životinja sa inokuliranim NCI-H460 i COR-L23 ćelijama.

3.12.3. TRETMANI ŽIVOTINJA SA INTRAPLEURALNO INOKULISANIM ĆELIJAMA

Za potrebe ovog eksperimenta životinje sa intraperitonealno inokulisanim COR-L23 ćelijama podeljene su u tri grupe: kontrolna grupa, grupa tretirana sa PF-573228 i grupa tretirana sa WZ811. Grupe tretirane inhibitorima činile su po 4 životinje, dok se kontrolna grupa sastojala od 7 životinja. Životinje su tretirane intraperitonealno u koncentraciji od 30 mg/kg. Oba inhibitora, PF-573228 i WZ811, su rastvarani u sterilnoj vodi (WFI – engl. water for injection) sa 10% DMSO i 5% Tween 80. Životinje u kontrolnoj grupi su tretirane rastvorom 10% DMSO i 5% Tween 80 u WFI. Tretman je trajao pet uzastopnih dana, sa početkom u 7. danu nakon inokulacije. Životinje su praćene svakodnevno i antitumorska i antimetastatska aktivnost inhibitora je procenjivana poređenjem vremena preživljavanja tretiranih životinja u odnosu na kontrolne životinje sa COR-L23 razvijenim tumorima.

3.13. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

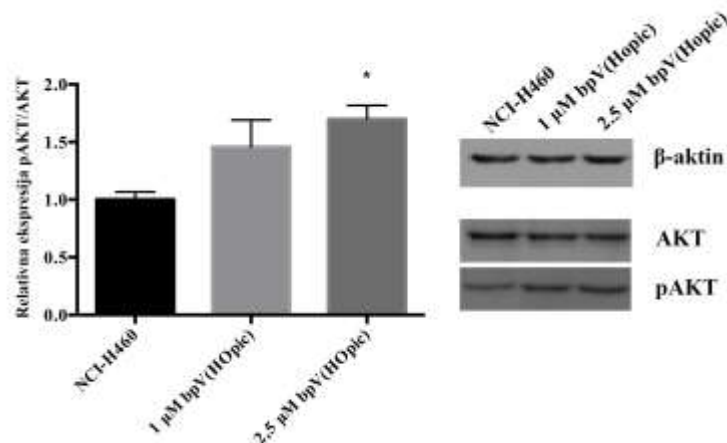
Statističke analize su rađene pomoću nekoliko programa: STATISTICA 10.0. software (StatSoft, Inc., Tulsa, USA.), GrafPad Prism6 (GraphPad Software, SAD) i R software verzija 3.3.0 (Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing). Podaci dobijeni RT-qPCR analizom, testom zarastanja povrede, testom invazivnosti ćelija, *Western blot* analizama, merenjem β -galaktozidazne aktivnosti i u *in vivo* eksperimentima analizirani su pomoću Student t-testa. Rezultati dobijeni u testu degradacije želatina nisu imali normalnu distribuciju, tako da je korišćen *Wilcoxon signe-rank* test. Rezultati dobijeni u analizama ćelijske smrti su analizirani dvofaktorskom ANOVA analizom. Rezultati preživljavanja su analizirani

korišćenjem *Kaplan & Meier product limit* metode, dok je *Log-rank* test korišćen za procenu značaja razlike u ukupnom preživljavanju. Moguća povezanost između nivoa ekspresije gena *ABCBI* i *ABCCI* i nivoa ekspresije gena *CXCR4* i *FAK* u uzorcima pacijenata, testirana je *Fisher exact* testom. Uočene razlike u svim testovima su smatrane statistički značajnim ukoliko je $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

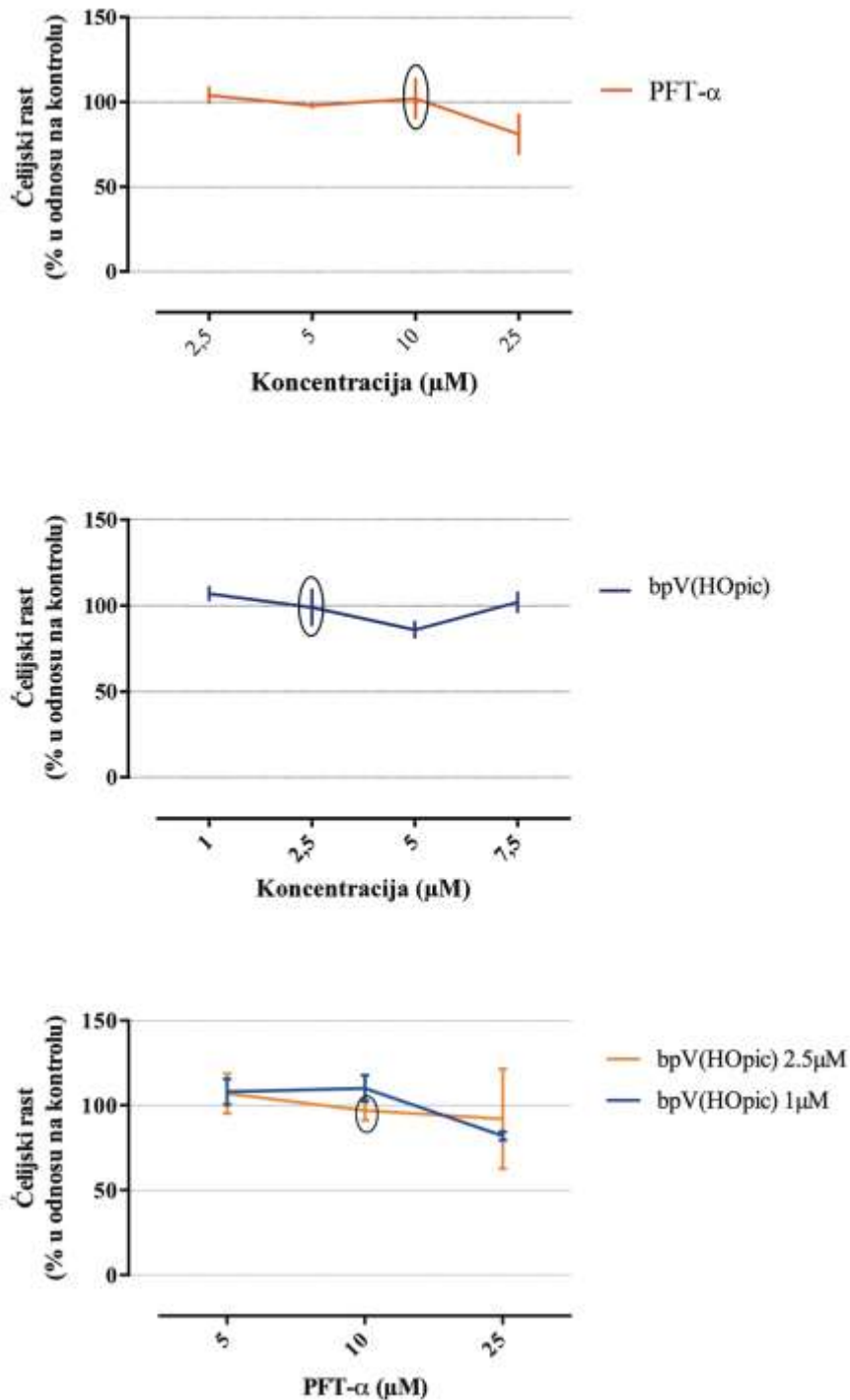
4.1. FUNKCIONALNI STATUS P53 I PTEN TUMOR SUPRESORA I NJIHOVA INHIBICIJA U NSCLC ĆELIJAMA

Sa ciljem uspostavljanja *in vitro* sistema humanih ćelijskih linija NSCLC-a sa različitim funkcionalnim statusom PTEN i p53 tumor supresora, u prvom delu studije su korišćene dve ćelijske linije raka pluća, NCI-H460 i COR-L23. NCI-H460 ćelije poseduju neizmenjena oba tumor supresora (wt, engl. wild type) (http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines), zbog čega su kod ove ćelijske linije primenjivani tretmani farmakološkim inhibitorima kako bi se postigla inaktivacija p53 i/ili PTEN tumor supresora. U tu svrhu su korišćeni poznati inhibitori p53 i PTEN tumor supresora, PFT- α i bpV(HOpic). U prethodnim publikacijama pokazano je da 10 μ M PFT- α uspešno inhibira funkciju p53 tumor supresora u NCI-H460 ćelijama (Zuco i Zunino, 2008). Shodno tome pomenutu koncentraciju koristili smo u svim daljim eksperimentima. Da bi se odredila koncentracija koja uspešno inhibira aktivnost PTEN tumor supresora, analiziran je nivo ekspresije pAKT proteina kod NCI-H460 ćelijske linije tretirane sa 1 μ M i 2,5 μ M bpV(HOpic). *Western blot* analiza je pokazala da 2,5 μ M bpV(HOpic) uspešno inhibira aktivnost PTEN tumor supresora i statistički značajno povećava ekspresiju pAKT proteina 1,7 puta ($p=0,02$) u odnosu na netretirane NCI-H460 ćelije (Slika 7.).



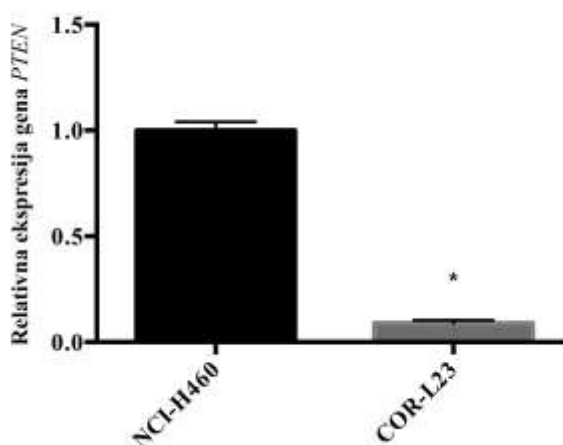
Slika 7. Western blot analiza AKT proteina i njegove fosforilisane forme kod NCI-H460 ćelija tretiranih inhibitorom PTEN tumor supresora (bpV(HOpic)). Histogram prikazuje nivo ekspresije fosforilisane forme AKT (pAKT) proteina u odnosu na nivo ekspresije ukupnog AKT proteina, normalizovane u odnosu na β -aktin kao internu kontrolu. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i prikazane su kao relativne vrednosti u odnosu na netretirane NCI-H460 ćelije. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina u odnosu na netretirane NCI-H460 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

MTT testom ispitan je efekat tretmana p53 i PTEN inhibitora na inhibiciju ćelijskog rasta NCI-H460 u cilju isključivanja mogućnosti da su dobijene razlike u narednim testovima migracije i invazije posledica značajnog uticaja tretmana na vijabilnost ćelija. Rezultati su pokazali da tretmani korišćeni za inhibiciju p53 i/ili PTEN tumor supresora ne utiču značajno na inhibiciju ćelijskog rasta kod NCI-H460 ćelija i ne smanjuju značajno njihovu vijabilnost (Slika 8.).



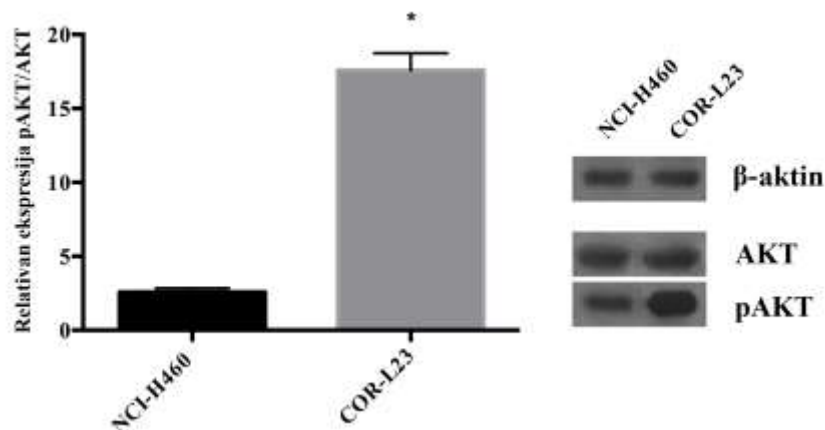
Slika 8. Efekti pojedinačnog i kombinovanog tretmana bpV(Hopic) i PFT- α na vijabilnost NCI-H460 ćelija nakon 24 sata. Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana MTT testom nakon pojedinačnog i kombinovanog tretmana bpV(HOpic) i PFT- α inhibitora u trajanju od 24 sata. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Prikazane su srednje vrednosti i standardne greške. Koncentracije korišćene u testovima zarastanja povrede, degradacije želatina i invazivnosti obeležene su crnim krugom.

Osim NCI-H460 ćelija sa farmakološki inhibiranom funkcijom p53 i/ili PTEN tumor supresora, u eksperimentima je kao model istovremene inaktivacije oba tumor supresora korišćena i COR-L23 ćelijska linija. Kod ovih ćelija je mutiran gen *TP53* tumor supresora (http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines). Takođe, ispitana je i ekspresija i funkcija PTEN tumor supresora. Tačnije, rezultati dobijeni RT-qPCR-om su pokazali da je ekspresija gena *PTEN* tumor supresora 11,5 puta ($p=0,0002$) manja kod COR-L23 ćelija u poređenju sa NCI-H460 ćelijama (Slika 9.).



Slika 9. RT-qPCR analiza ekspresije *PTEN* tumor supresora kod NCI-H460 i COR-L23 ćelijske linije. Relativna ekspresija ispitivanog gena je preračunata u odnosu na ekspresiju gena *ACTB* kao interne kontrole. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenata i predstavljane su kao relativne vrednosti u odnosu na NCI-H460 ćelije. Statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK između NCI-H460 i COR-L23 ćelijske linije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

Takva razlika u ekspresiji gena *PTEN* tumor supresora trebalo bi da se ogleda i u povećanoj ekspresiji pAKT proteina. U skladu sa tim, *Western blot* analiza je pokazala značajnu razliku u ekspresiji pAKT proteina među pomenutim ćelijskim linijama. Tačnije, ekspresija pAKT-a je 6,8 puta ($p=0,0003$) veća kod COR-L23 ćelijske linije u odnosu na NCI-H460 ćelije (Slika 10.).



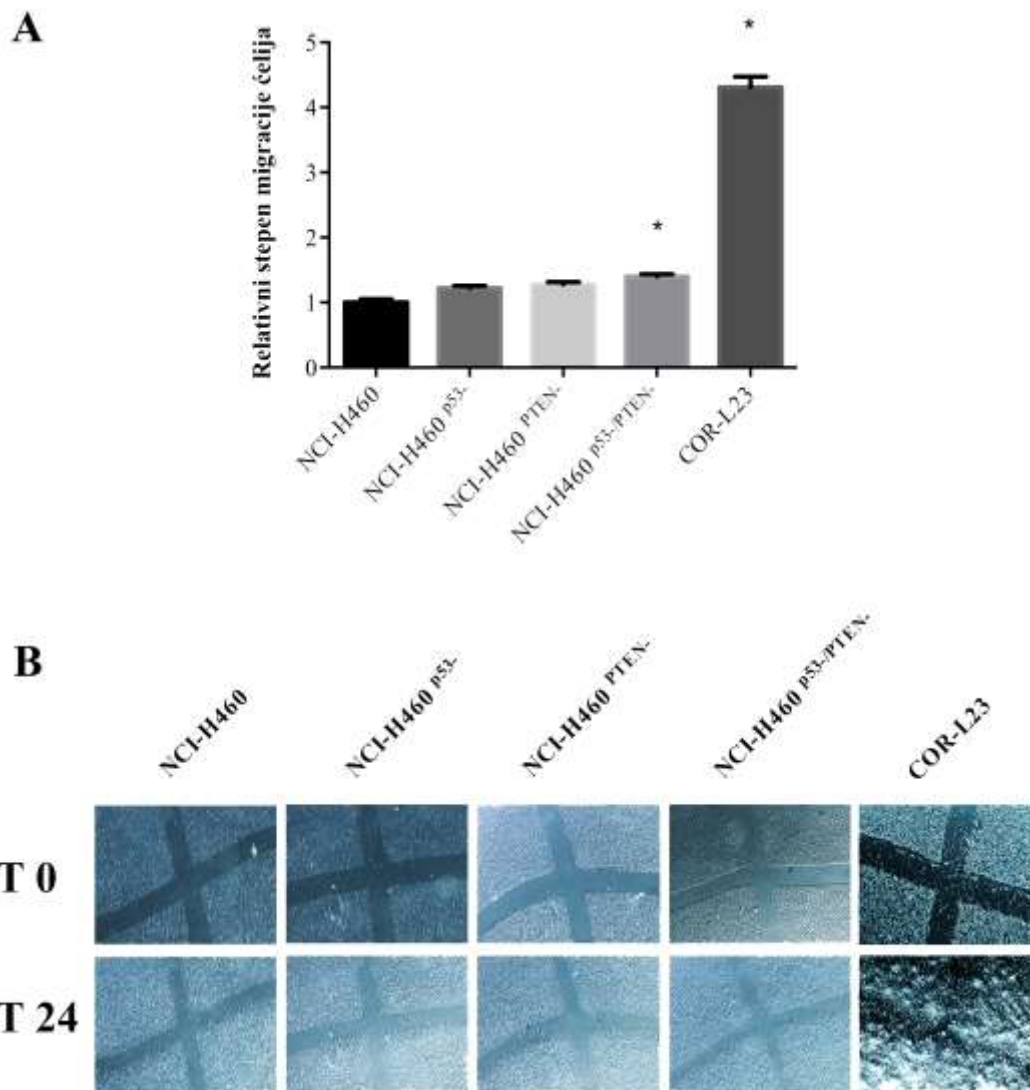
Slika 10. Western blot analiza AKT proteina i njegove fosforilisane forme kod NCI-H460 i COR-L23 ćelijske linije. Histogram prikazuje nivo ekspresije fosforilisane forme AKT proteina (pAKT) u odnosu na nivo ekspresije ukupnog AKT proteina, normalizovan u odnosu na β -aktin kao internu kontrolu. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenata. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina između NCI-H460 i COR-L23 ćelijske linije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

4.2. RAZLIKE U INVAZIVNOM I MIGRATORNOM POTENCIJALU NSCLC ĆELIJA

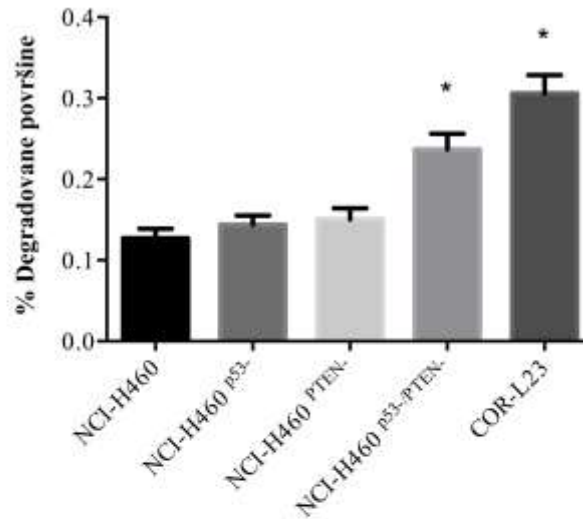
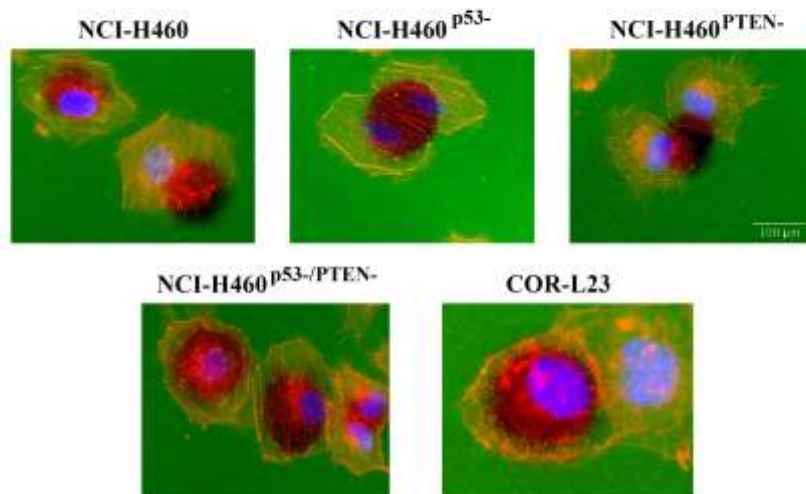
Testovima zarastanja povrede, degradacije želatina i invazivnosti ispitivan je uticaj funkcionalne inhibicije p53 i/ili PTEN tumor supresora na migraciju i invaziju NCI-H460 i COR-L23 ćelija.

U testu zarastanja povrede NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije su imale statistički značajno veću migraciju u poređenju sa NCI-H460 ćelijama (1,4 puta; $p=0,0052$; Slika 11.). Takođe, testovima degradacije želatina i invazivnosti su pokazane značajno povećane sposobnosti NCI-H460 ćelija da degraduju želatin (1,9 puta; $p=0,001$; Slika 12.) i invadiraju kroz matrigel (1,7 puta; $p=0,0043$; Slika 13.) nakon istovremene funkcionalne inhibicije p53 i PTEN tumor supresora.

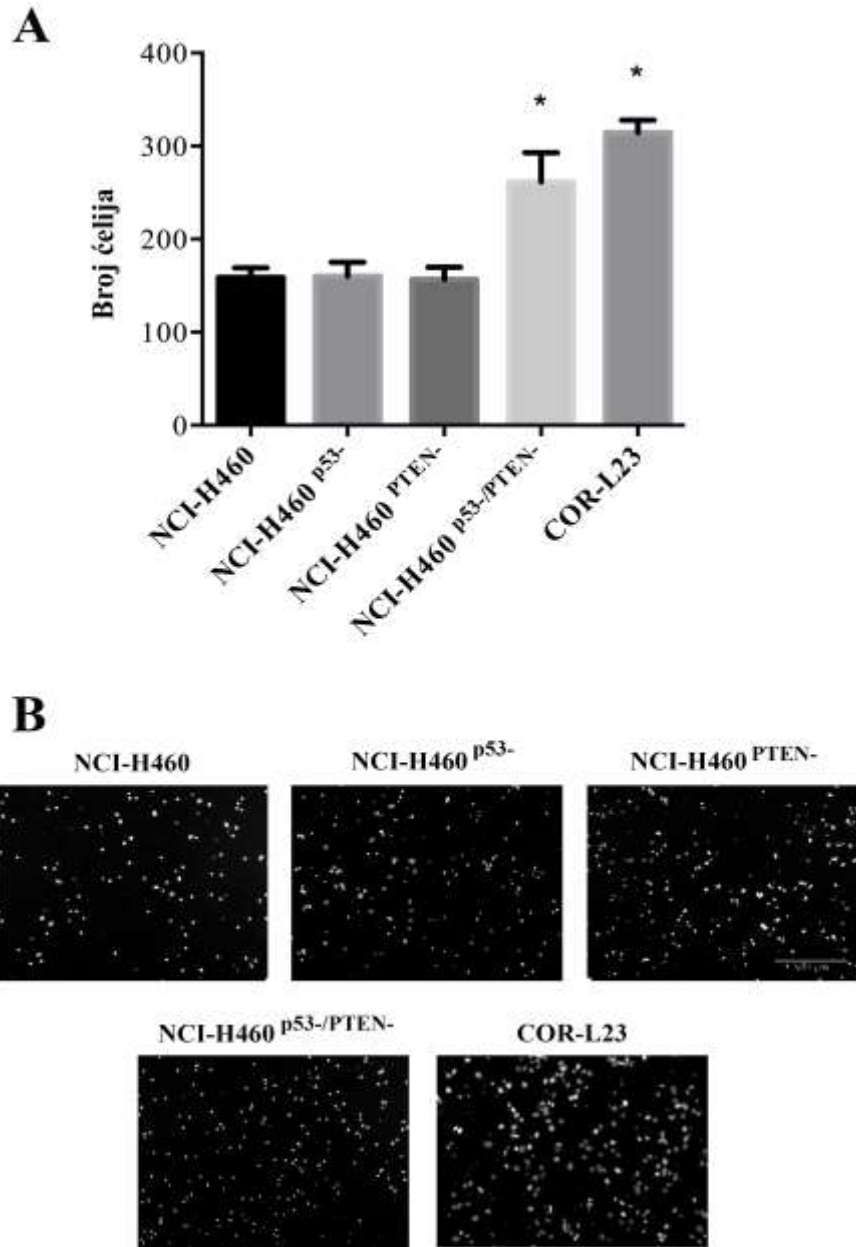
COR-L23 ćelije su pokazale isti obrazac ponašanja, u gore pomenutim testovima, kao i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije. Konkretno, COR-L23 ćelije migriraju 4 puta brže (Slika 11.; $p=0,0005$), degraduju 2,4 puta veću površinu želatina (Slika 12.; $p=0,0001$) i invadiraju kroz matrigel 2 puta više (Slika 13.; $p=0,0022$) u odnosu na NCI-H460 ćelije.



Slika 11. Relativni stepen migracije NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija. (A) Histogram prikazuje relativni stepen migracije ispitivanih ćelija u poređenju sa NCI-H460 ćelijama 24 sata nakon povrede. (B) Prikazane su reprezentativne slike, gde su povrede u obliku krsta predstavljene u trenutku nastanka (T 0) i nakon 24 sata (T 24). Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su relativne vrednosti u odnosu na migraciju NCI-H460 ćelija. Statistički značajne razlike u migraciji među ćelijama su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

A**B**

Slika 12. Stepen degradacije želatina NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija. Histogram pokazuje sposobnost ispitivanih ćelija da degraduju želatin (A). Intenzitet degradacije želatina je izražen kao odnos obima degradirane oblasti želatina u odnosu na obim ćelije. Prikazane su reprezentativne slike NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija zasejanih na želatinu (B). Crvena fluorescencija potiče od fluorescentnog obeležavanja ćelija sa ActinRedTM 555. Jedra su kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju. Želatin fluorescira zelenom bojom. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i analizirano je najmanje 100 ćelija. Statistički značajne razlike degradacije želatina u odnosu na NCI-H460 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$). Skala = 100 μ m.

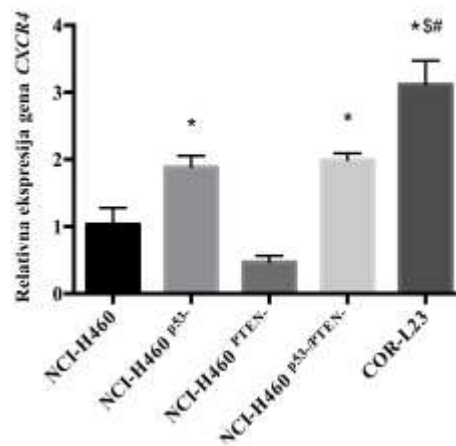
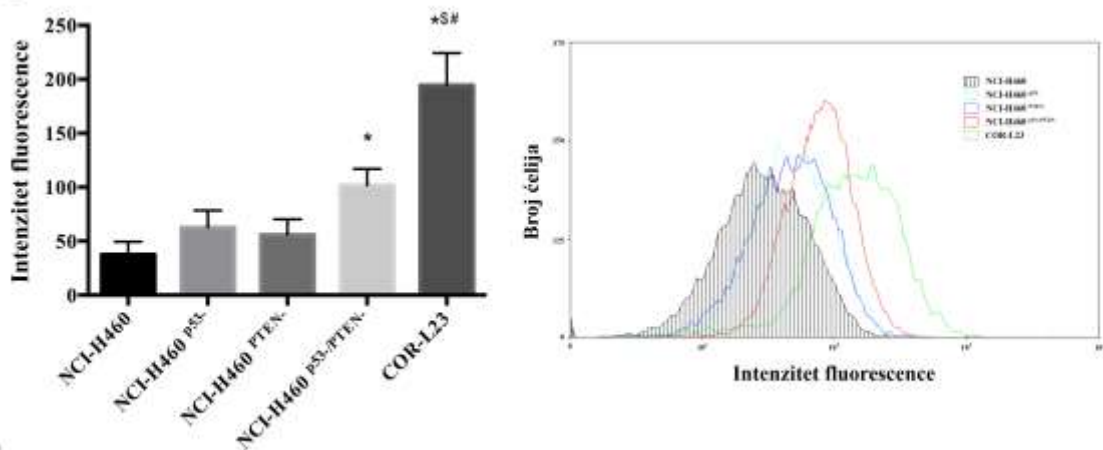


Slika 13. Stepen invazije NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija kroz matrigel. Histogram pokazuje broj ćelija koje imaju sposobnost da invadiraju i migriraju kroz poroznu membranu obloženu matrigelom (A). Prikazane su reprezentativne slike NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija (B). Na slikama se vide jedra ćelija koje su invadirale kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. Statistički značajne razlike u odnosu na NCI-H460 ćelija su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$). Skala = 500 μ m.

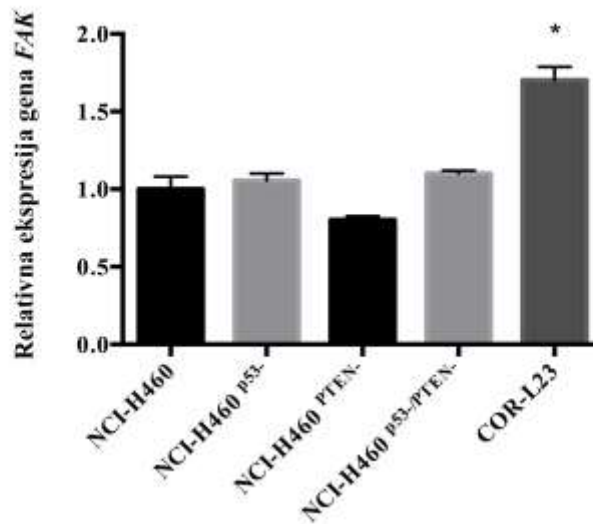
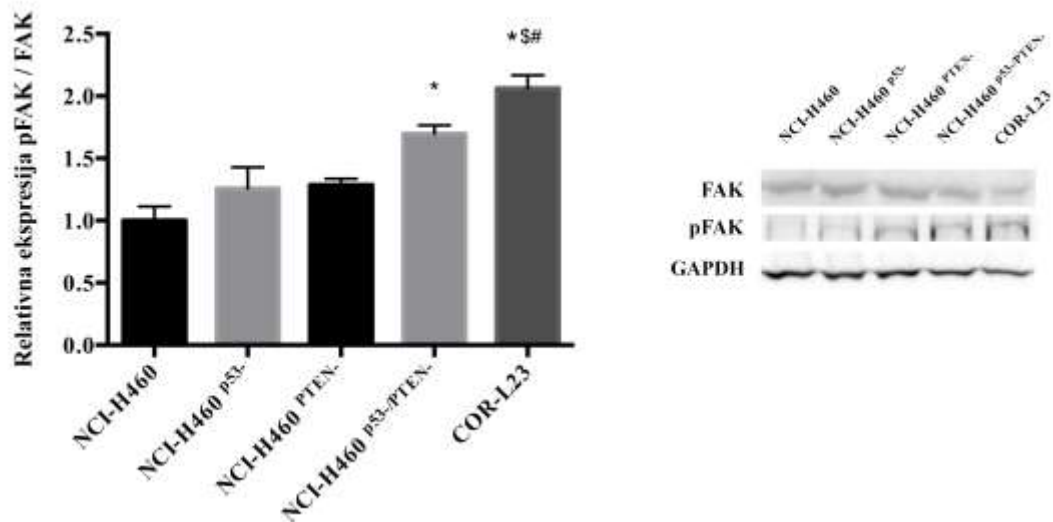
4.3. NIVO EKSPRESIJE CXCR4, FAK-a, AKT-a I ERK-a U ĆELIJAMA SA INAKTIVNIM P53 I PTEN TUMOR SUPRESORIMA

Dalje je ispitivan uticaj funkcionalne inhibicije p53 i PTEN tumor supresora na ekspresiju CXCR4 i FAK-a, kao i nishodnih molekula njihovih signalnih puteva, pAKT-a i pERK-a. Nakon tretiranja NCI-H460 ćelija sa 10 μ M PFT- α i 2,5 μ M bpV(HOpic), pojedinačno i u kombinaciji, analizirana je ekspresija pomenutih molekula RT-qPCR-om, protočnom citofluorimetrijom i *Western blot* metodom. Ovi eksperimenti su pokazali da NCI-H460^{p53-} i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije imaju značajno povećanu ekspresiju gena *CXCR4* receptora u poređenju sa NCI-H460 ćelijama (Slika 14A), i to redom 1,8 puta ($p=0,047$) i 2 puta ($p=0,022$). Na proteinskom nivou, samo istovremena funkcionalna inhibicija oba tumor supresora kod NCI-H460 ćelije dovela je do statistički značajnog povećanja ($p=0,0046$) ekspresije proteina CXCR4 1,7 puta u odnosu na kontrolne NCI-H460 ćelije (Slika 14B).

Ekspresija gena *FAK* je nepromenjena kod svih NCI-H460 ćelija tretiranih p53 i PTEN inhibitorima (Slika 15A). Iako je ekspresija gena *FAK* na nivou iRNK nepromenjena, istovremena funkcionalna inhibicija p53 i PTEN tumor supresora kod NCI-H460 ćelija dovodi do aktivacije FAK proteina i povećava količinu njegove fosforilisane forme 1,7 puta ($p=0,007$) u odnosu na kontrolne NCI-H460 ćelije (Slika 15B).

A**B**

Slika 14. RT-qPCR (A) i citofluorimetrijska analiza ekspresije CXCR4 receptora kod NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-PTEN-} i COR-L23 ćelija (B). Relativna ekspresija gena *CXCR4* je preračunata u odnosu na ekspresiju gena *ACTB* kao interne kontrole. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i prikazane su kao relativne vrednosti u odnosu na NCI-H460 ćelije. Nivo CXCR4 proteina je analiziran metodom protočne citofluorimetrije. Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta i vrednosti su prikazane na histogramu. Reprezentativne eksperimente je prikazan na slici. Statistički značajne razlike ekspresije u odnosu na NCI-H460 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$), u odnosu na NCI-H460^{p53-} ćelije kao \$ ($p \leq 0,05$) i u odnosu na NCI-H460^{PTEN-} ćelije kao # ($p \leq 0,05$).

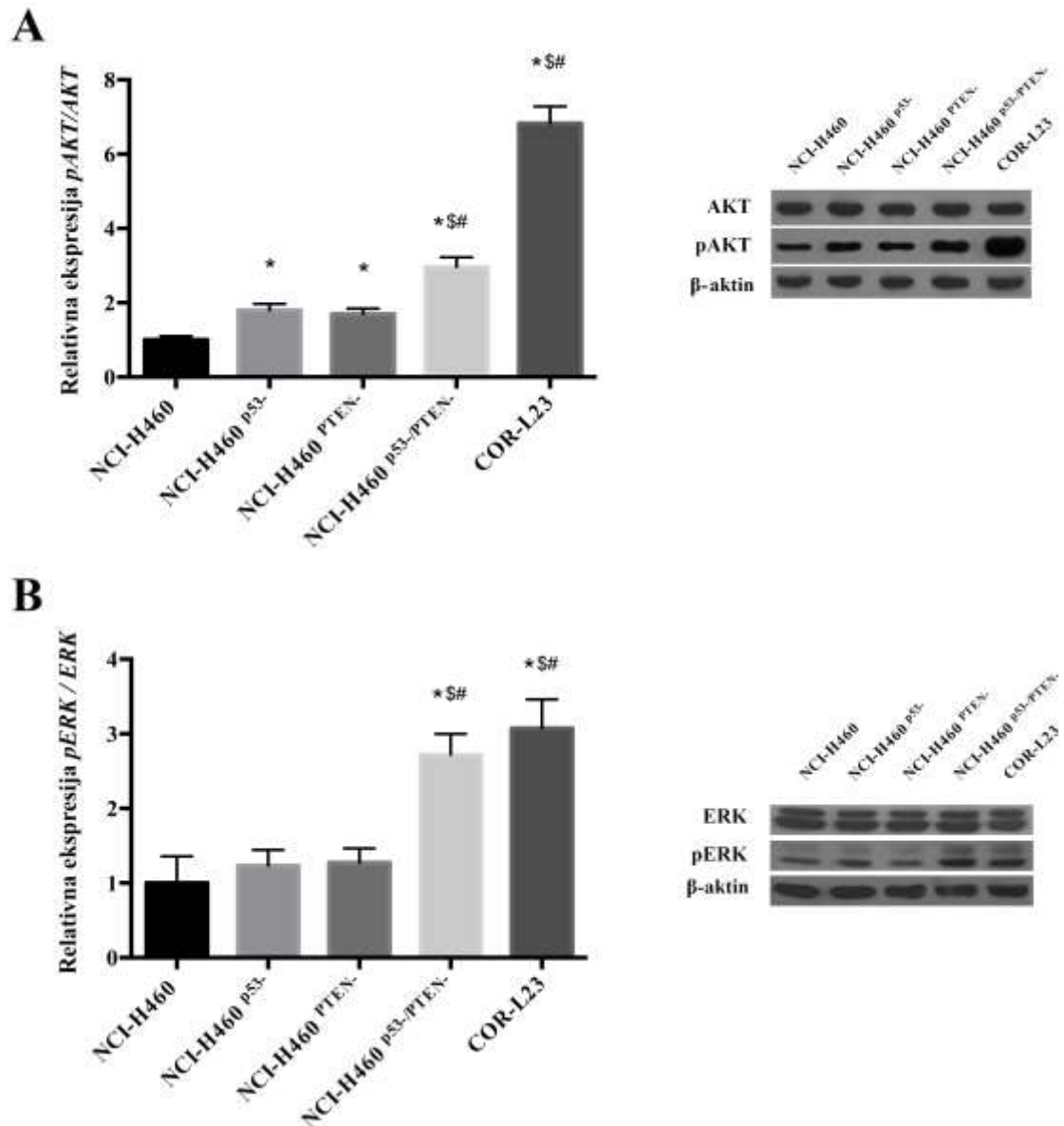
A**B**

Slika 15. RT-qPCR (A) analiza ekspresije gena *FAK* i *Western blot* (B) analiza ekspresije *FAK*-a i njegove fosforilisane forme (Y379) kod NCI-H460, NCI-H460^{p53}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-PTEN-} i COR-L23 ćelija. Relativna ekspresija gena *FAK* je preračunata u odnosu na ekspresiju gena *ACTB* kao interne kontrole. Aktivnost *FAK* prikazana je kao odnos nivoa ekspresije pFAK i ukupnog *FAK* proteina, normalizovane u odnosu na *GAPDH* kao internu kontrolu. Sve vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenata i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na NCI-H460 ćelije. Statistički značajne razlike u nivou iRNK i proteina u odnosu na NCI-H460 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$); u odnosu na NCI-H460^{p53-} ćelije kao \$ ($p \leq 0,05$) i u odnosu na NCI-H460^{PTEN-} ćelije kao # ($p \leq 0,05$).

Funkcionalna inhibicija p53 i PTEN tumor supresora, pojedinačno i u kombinaciji, takođe dovodi do značajnih promena u nivou ekspresije pAKT proteina. NCI-H460^{p53-} i NCI-H460^{PTEN-} ćelije pokazuju značajno povećanu količinu pAKT-a, i to redom 1,8 puta ($p=0,003$) i 1,7 puta ($p=0,004$), u poređenju sa NCI-H460 ćelijama (Slika 16A). NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije pokazuju još izraženiju promenu nivoa pAKT-a. Njihova količina pAKT proteina je 3 puta veća u odnosu na NCI-H460 ćelije ($p=0,001$) i 1,7 puta veća u odnosu na NCI-H460^{p53-} ($p=0,02$) i NCI-H460^{PTEN-} ($p=0,009$) ćelije (Slika 16A).

Za razliku od pAKT-a, nivo pERK-a je promenjen samo kod NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija, i statistički značajno ($p=0,042$) je povećan 2,7 puta u odnosu na NCI-H460 ćelije (Slika 16B).

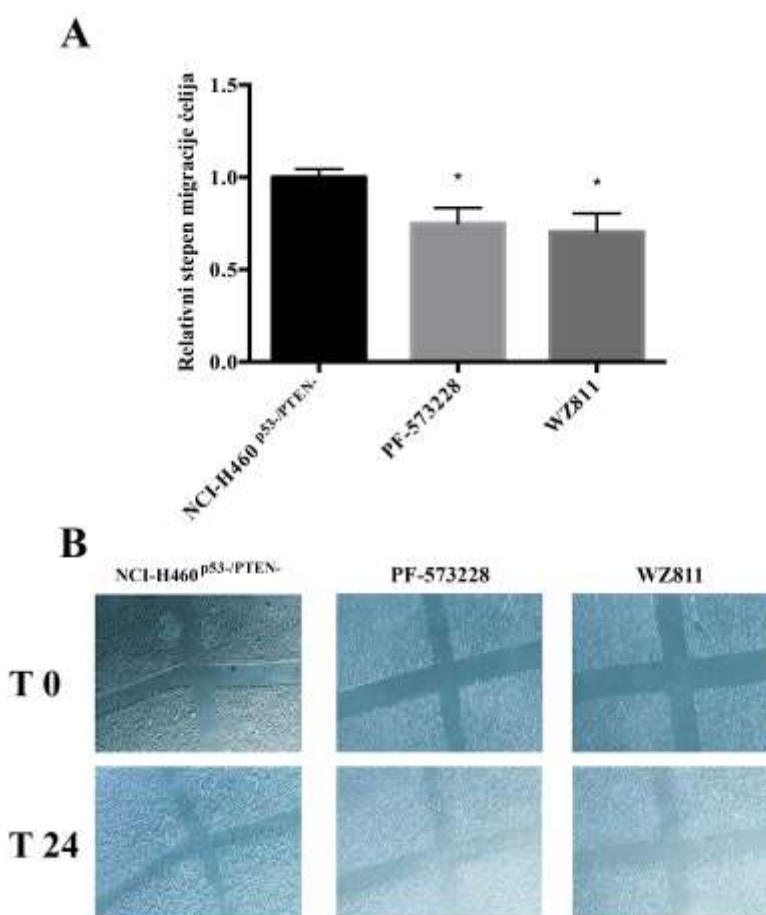
COR-L23 ćelije su pokazale sličan profil ekspresije gena i proteina kao i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije. Konkretno, COR-L23 ćelije imaju povećanu ekspresiju svih ispitivanih gena i proteina u odnosu na kontrolne NCI-H460 ćelije: iRNK *CXCR4* 3,1 puta (Slika 14A; $p=0,008$), protein *CXCR4* 5,2 puta (Slika 14B., $p=0,001$), iRNK *FAK* 1,7 puta (Slika 15A.; $p=0,008$), pFAK 2,1 puta (Slika 15B; $p=0,015$), pAKT 6,8 puta (Slika 16A; $p=0,002$) i pERK 3 puta (Slika 16B; $p=0,037$).



Slika 16. *Western blot* analiza AKT (A) i ERK (B) proteina i njihovih fosforilisanih formi kod NCI-H460, NCI-H460^{p53-}, NCI-H460^{PTEN-}, NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija. Histogrami prikazuju količine pAKT i pERK u odnosu na nivo ekspresije ukupnih formi odgovarajućih proteina, normalizovane u odnosu na β -aktin kao interne kontrole. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na NCI-H460 ćelije. Statistički značajne razlike u nivou proteina u odnosu na NCI-H460 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$), u odnosu na NCI-H460^{p53-} ćelije kao \$ ($p \leq 0,05$) i u odnosu na NCI-H460^{PTEN-} ćelije kao # ($p \leq 0,05$).

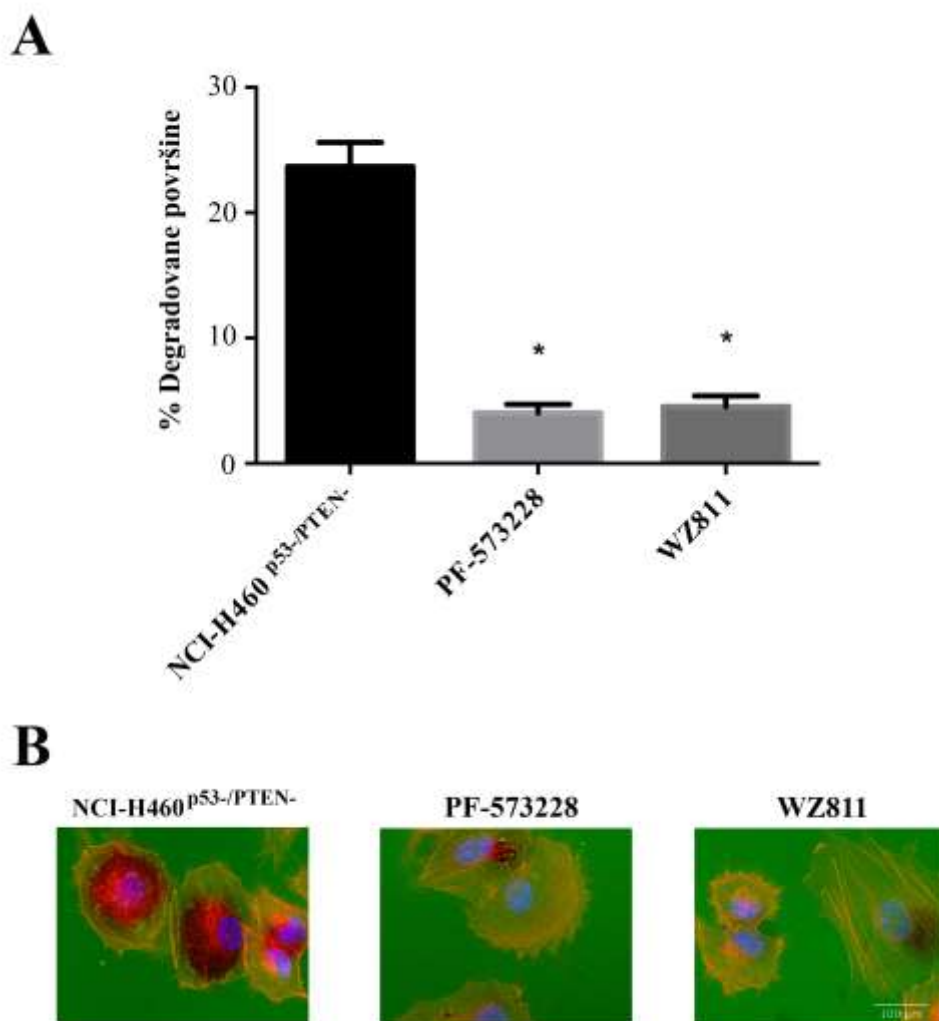
4.4. ANTI-INVAZIVNI EFEKTI PF-573228 I WZ811 INHIBITORA NA NSCLC ĆELIJSKIM LINIJAMA SA NEAKTIVNIM P53 I PTEN TUMOR SUPRESORIMA

U daljim eksperimentima ispitivano je da li inhibicija CXCR4 i FAK-a ima uticaj na smanjenje invazivnih sposobnosti NSCLC ćelija sa istovremeno neaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima (NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija).



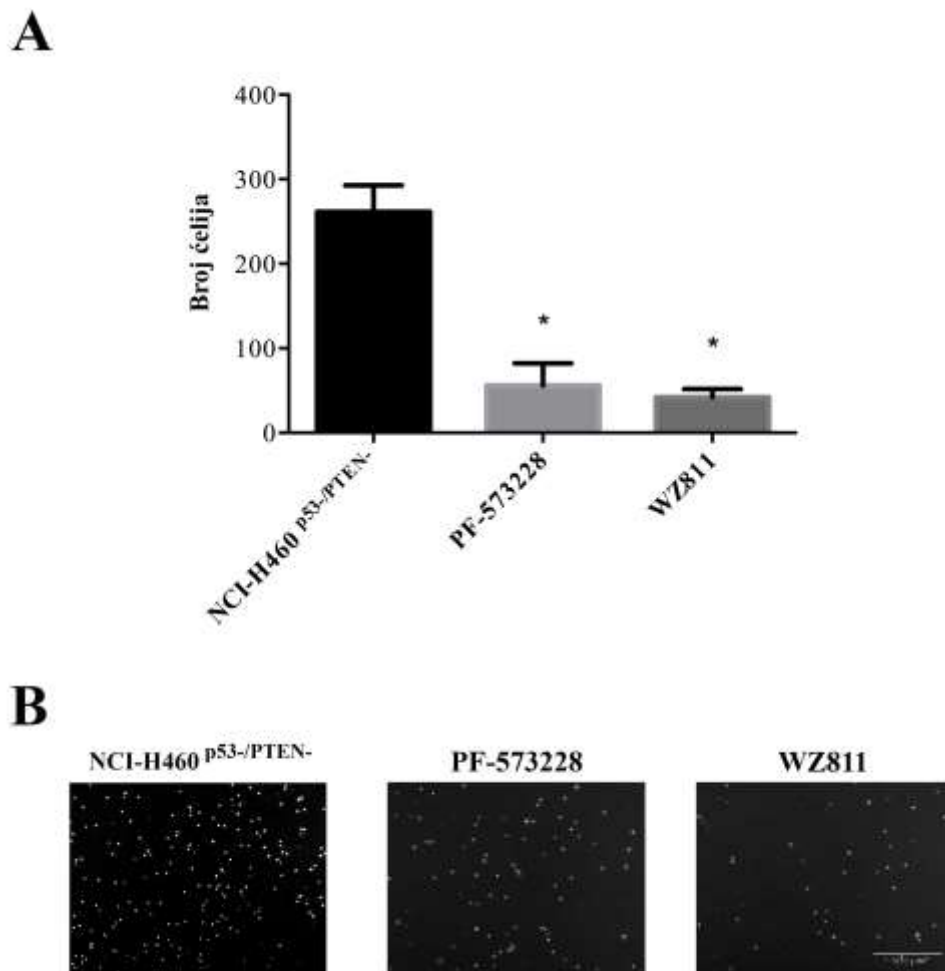
Slika 17. Efekti 1 μ M PF-573228 i 1 μ M WZ811 inhibitora na migraciju NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija. Histogram prikazuje relativni stepen migracije tretiranih ćelija u poređenju sa kontrolnim NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelijama nakon 24 sata (A). Prikazane su reprezentativne slike (B), gde su povrede u obliku krsta predstavljene u trenutku nastanka (T 0) i nakon 24 sata (T 24). Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su relativne vrednosti u odnosu na migraciju NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija. Statistički značajne razlike migraciji u odnosu na netretirane NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

Testom zarastanja povrede pokazano je da NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije migriraju značajno sporije nakon tretmana sa 1 μ M PF-573228 (1,34 puta; $p=0,001$) i 1 μ M WZ811 (1,42 puta; $p=0,001$) u poređenju sa netretiranim NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelijama (Slika 17.).



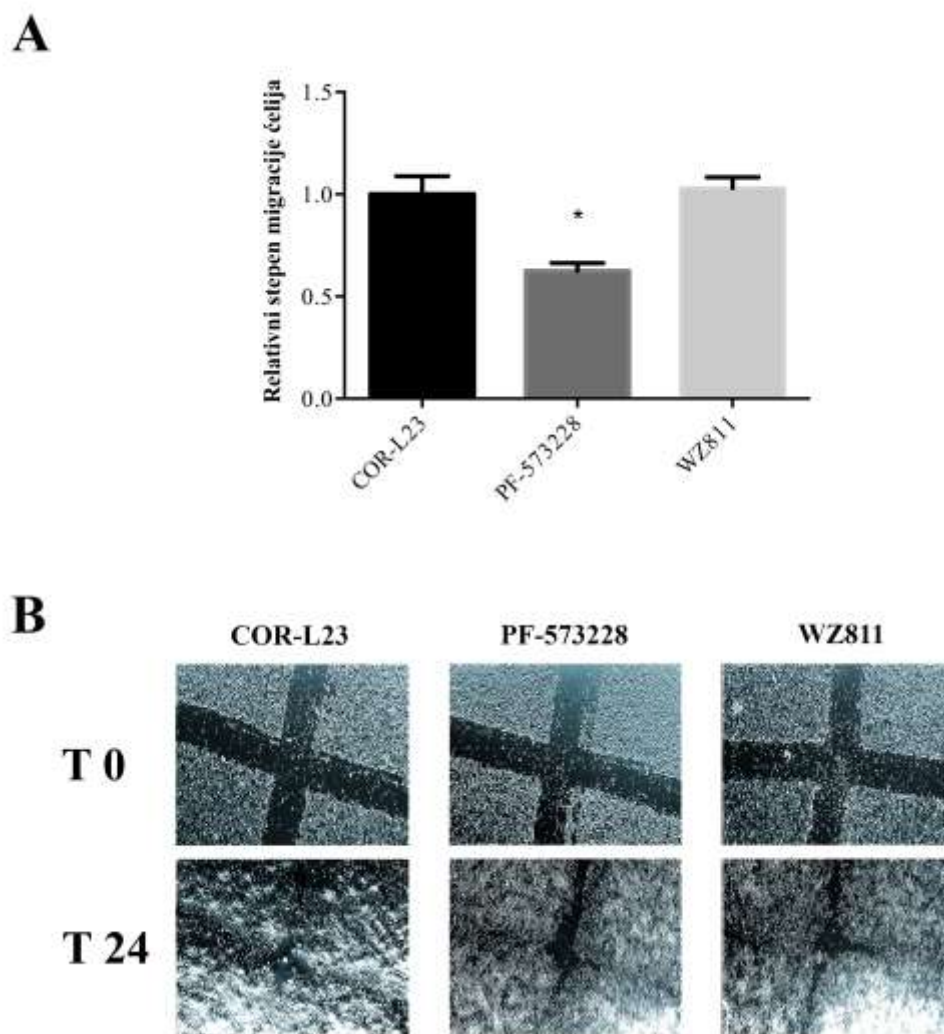
Slika 18. Efekti 1 μ M PF-573228 i 1 μ M WZ811 na sposobnost NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija da degraduju želatin. Histogram pokazuje stepen degradacije želatina izražen u procentima kao odnos obima degradirane oblasti želatina u odnosu na obim ćelije (A). Intenzitet degradacije želatina je izražen kao odnos obima degradirane oblasti želatina u odnosu na obim ćelije. Prikazane su reprezentativne slike ćelija zasejanih na želatinu (B). Crvena fluorescencija potiče od fluorescentnog obeležavanja ćelija sa ActinRedTM 555. Jedra su kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju. Želatin fluorescira zelenom bojom. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i analizirano je najmanje 100 ćelija. Statistički značajne razlike degradacije želatina u odnosu na netretirane NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$). Skala = 100 μ m.

Tretmani su pokazali još izraženije efekte na NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelijama u testovima degradacije želatina i invazivnosti. Sposobnost NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija da degradiraju želatin smanjena je 5,8 puta nakon tretmana sa 1 μM PF-573228 ($p=0,0001$), odnosno 5,1 puta nakon tretmana sa 1 μM WZ811 ($p=0,0001$), u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 18.). Takođe, NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije statistički značajno manje invadiraju nakon tretmana 1 μM PF-573228 (4,7 puta; $p=0,0002$) i 1 μM WZ811 (6,2 puta; $p=0,0001$) u poređenju sa netretiranim NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelijama (Slika 19.).



Slika 19. Efekti 1 μM PF-573228 i 1 μM WZ811 inhibitora na invaziju NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija. Histogram pokazuje sposobnost ispitivanih ćelija da invadiraju kroz poroznu membranu obloženu matrigelom (A). Prikazane su reprezentativne slike (B). Na slikama se vide jedra ćelija koje su invadirale kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. Statistički značajne razlike u odnosu na netretirane NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije su predstavljene kao * ($p\leq 0,05$). Skala = 500 μm.

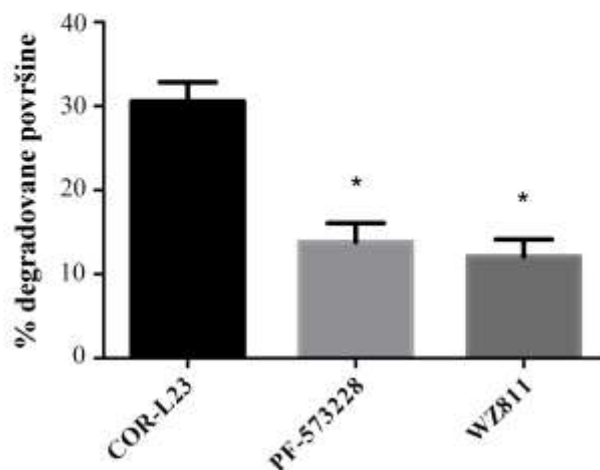
COR-L23 ćelije su pokazale sličan odgovor na tretmane sa 1 μM PF-573228 i 1 μM WZ811 kao i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije. Test zarastanja povrede je pokazao da samo tretman 1 μM PF-573228 statistički značajno ($p=0,037$) smanjuje migraciju COR-L23 ćelija i to 1,6 puta u odnosu na netretirane ćelije (Slika 20.).



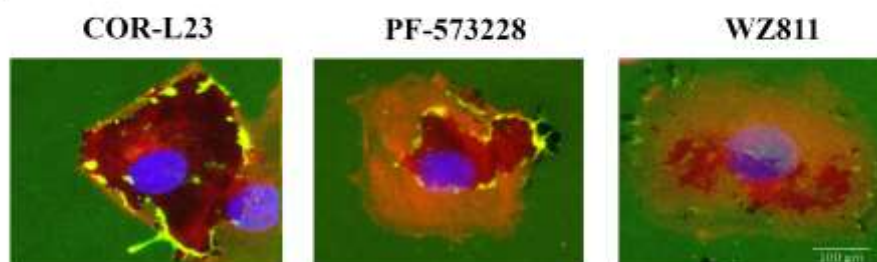
Slika 20. Efekti 1 μM PF-573228 i 1 μM WZ811 inhibitora na migraciju COR-L23 ćelija. Histogram prikazuje relativni stepen migracije tretiranih ćelija u poređenju sa kontrolnim COR-L23 ćelijama nakon 24 sata (**A**). Prikazane su reprezentativne slike (**B**), gde su povrede u obliku krsta predstavljene u trenutku nastanka (T 0) i nakon 24 sata (T 24). Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na migraciju netretiranih COR-L23 ćelija. Statistički značajne razlike u odnosu na migraciju netretiranih COR-L23 ćelija su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

Slično rezultatima dobijenim na NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelijama, ispitivani tretmani su ostvarili izraženije efekte na COR-L23 ćelija u testovima degradacije želatina i invazivnosti. Degradacija želatinaje značajno smanjena ($p < 0,0001$) nakon tretmana 1 μM PF-573228 i 1 μM WZ811 u odnosu na kontrolne ćelije, i to redom 2,2 i 2,5 puta (Slika 21.).

A

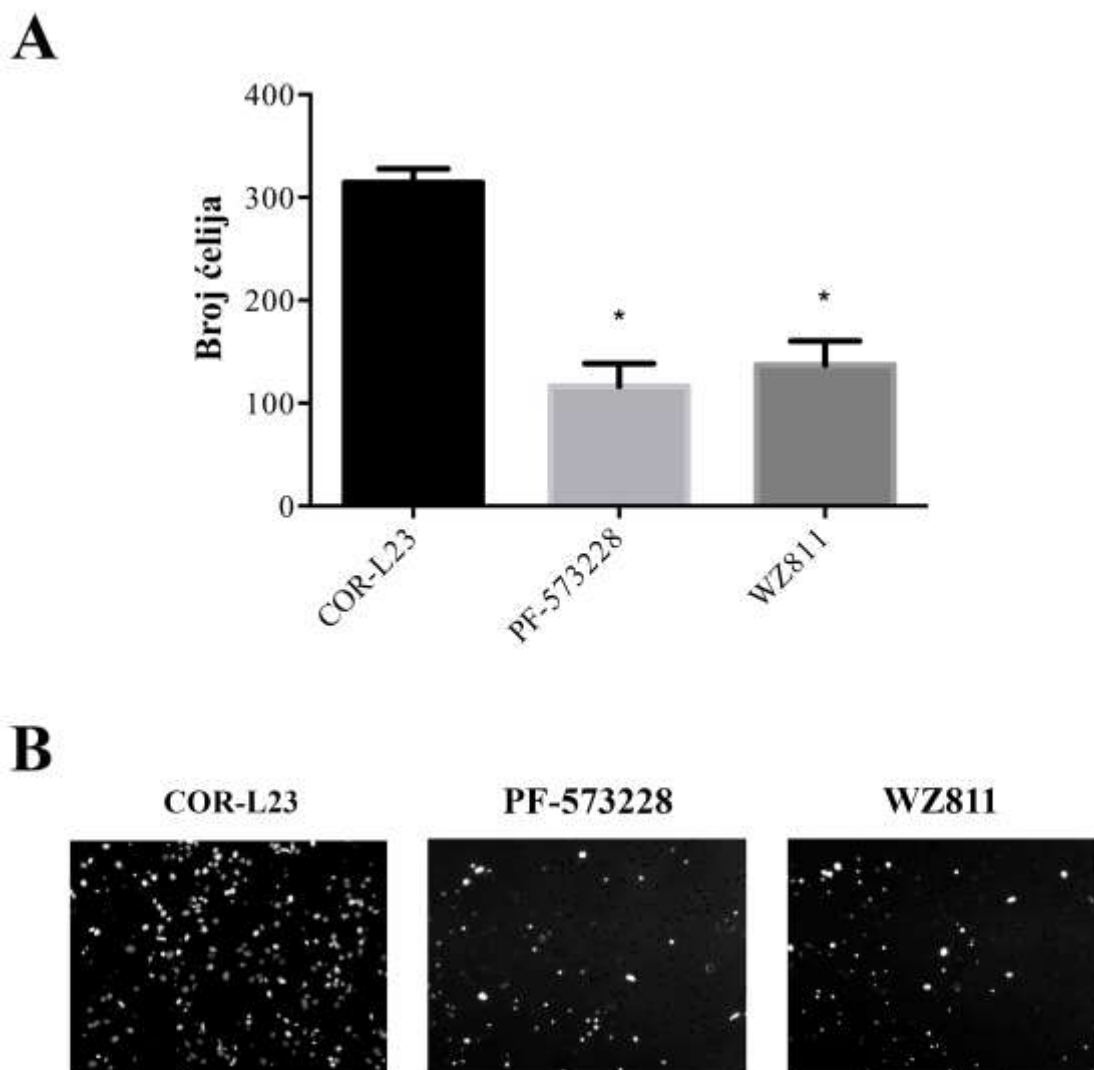


B



Slika 21. Efekti 1 μM PF-573228 i 1 μM WZ811 inhibitora na degradaciju želatina COR-L23 ćelija. Histogram pokazuje sposobnost ispitivanih ćelija da degraduju želatin nakon tretmana FAK i CXCR4 inhibitorima (A). Intenzitet degradacije želatina je izražen kao odnos obima degradirane oblasti želatina u odnosu na obim ćelije. Prikazane su reprezentativne slike ćelija zasejanih na želatinu (B). Crvena fluorescencija potiče od fluorescentnog obeležavanja ćelija sa ActinRedTM 555. Jedra su kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju. Želatin fluorescira zelenom bojom. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i analizirano je najmanje 100 ćelija. Statistički značajne razlike degradacije želatina u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije su predstavljene kao: $p \leq 0,05$ (*). Skala = 100 μm .

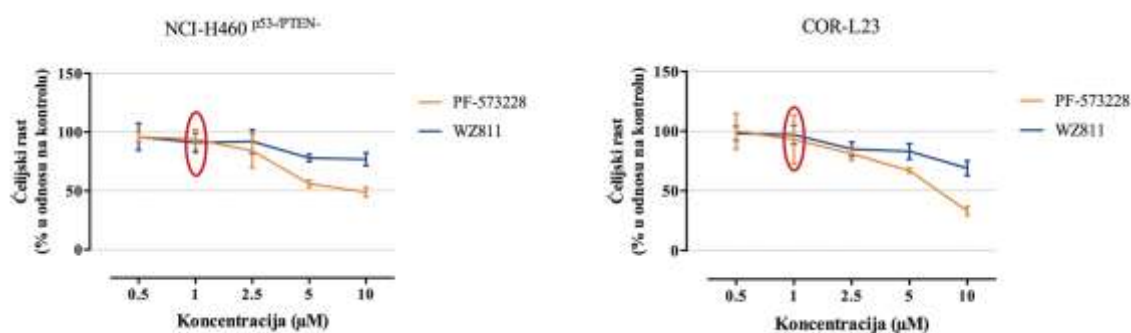
Takođe, u testu invazivnosti značajno manji broj ćelija ($p < 0,0001$) invadira kroz matrigel i migrira kroz poroznu membranu nakon ispitivanih tretmana (Slika 22B). Pri tretmanu sa 1 μM PF-573228 invazivne sposobnosti COR-L23 ćelija su smanjene 2,8 puta, dok 1 μM WZ811 tretman smanjuje invazivne sposobnosti 2,6 puta u odnosu na netretirane ćelije (Slika 22A).



Slika 22. Efekti 1 μM PF-573228 i 1 μM WZ811 inhibitora na invaziju COR-L23 ćelija. Histogram pokazuje sposobnost COR-L23 ćelija da invadiraju kroz poroznu membranu i matrigel nakon tretmana inhibitorima (A). Prikazane su reprezentativne slike (B). Na slikama se vide jedra ćelija koje su invadirale obojena Hoechst 33342 bojom. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. Statistički značajne razlike invazije u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$). Skala = 100 μm .

4.5. CITOTOKSIČNI EFEKTI PF-573228 I WZ811 INHIBITORA NA NCI-H460^{p53-/PTEN-} I COR-L23 ĆELIJAMA

MTT testom ispitani su efekti tretmana CXCR4 i FAK inhibitora na inhibiciju ćelijskog rasta NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija, u cilju isključivanja mogućnosti da su dobijene razlike u testovima migracije i invazije posledica značajnog uticaja tretmana na vijabilnost ćelija. Rastućim koncentracijama PF-573228 i WZ811 inhibitora (0,5-10 μ M) tretirane su ispitivane ćelije u trajanju od 24 sata, kao i u testovima migracije i invazije. Rezultati su pokazali da tretmani 1 μ M PF-573228 i 1 μ M WZ811, korišćeni u testovima migracije i invazije, ne utiču značajno na inhibiciju ćelijskog rasta kod obe ćelijske linije i ne smanjuju njihovu vijabilnost (Slika 23.).

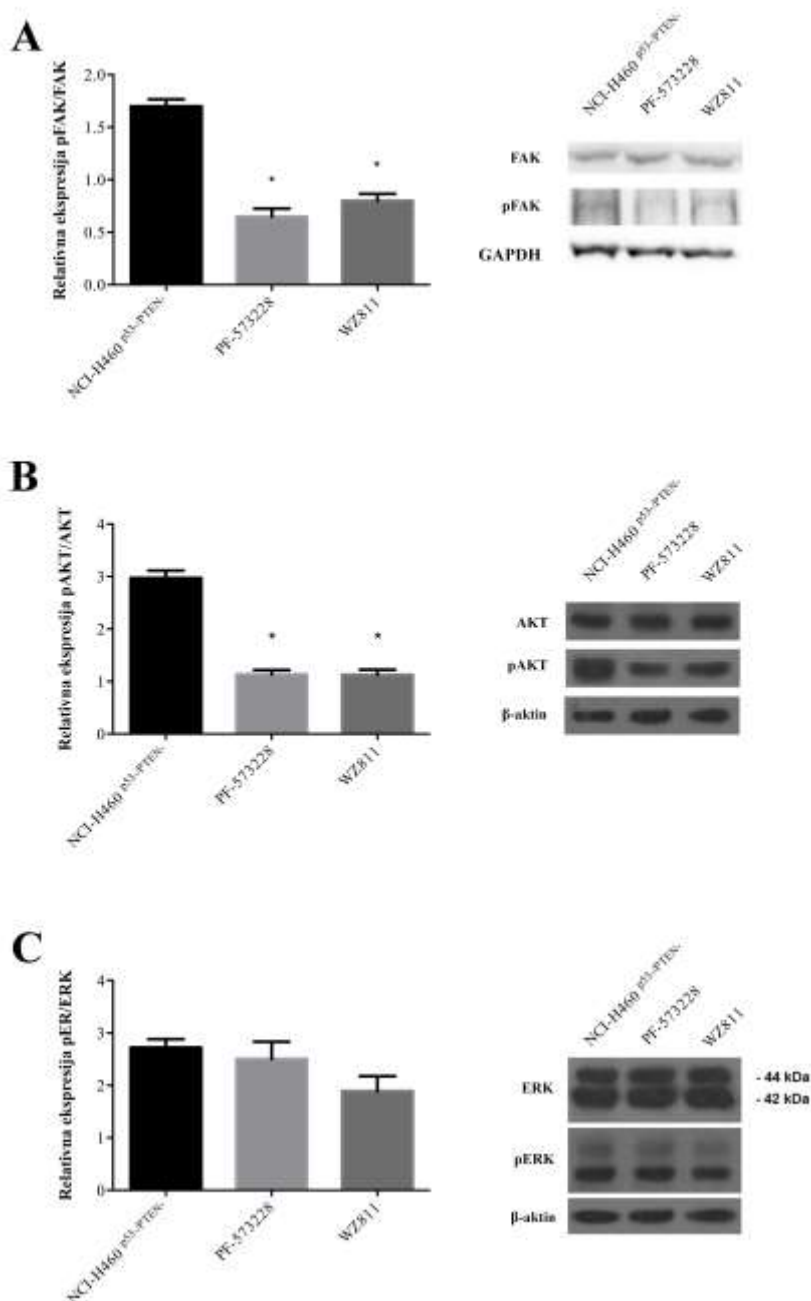


Slika 23. Efekti tretmana PF-573228 i WZ811 na vijabilnost NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija nakon 24 sata. Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana MTT testom nakon tretmana rastućim koncentracijama PF-573228 i WZ811 inhibitorau trajanju od 24 sata. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Prikazane su srednje vrednosti i standardne greške. Koncentracije korišćene u testovima zarastanja povrede, degradacije želatina i invazivnosti obeležene su crvenim krugom.

4.6. PROMENE U NIVOU pFAK, pAKT I pERK PROTEINA KOD NCI-H460^{p53-/PTEN-} I COR-L23 ĆELIJA NAKON TRETMANA SA PF-573228 I WZ811

Da bi se utvrdile molekularne promene koje su odgovorne za smanjenje invazivne i migratorne sposobnosti ćelija sa inaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima nakon tretmana 1 μ M PF-573228 i 1 μ M WZ811, ispitivane su promene

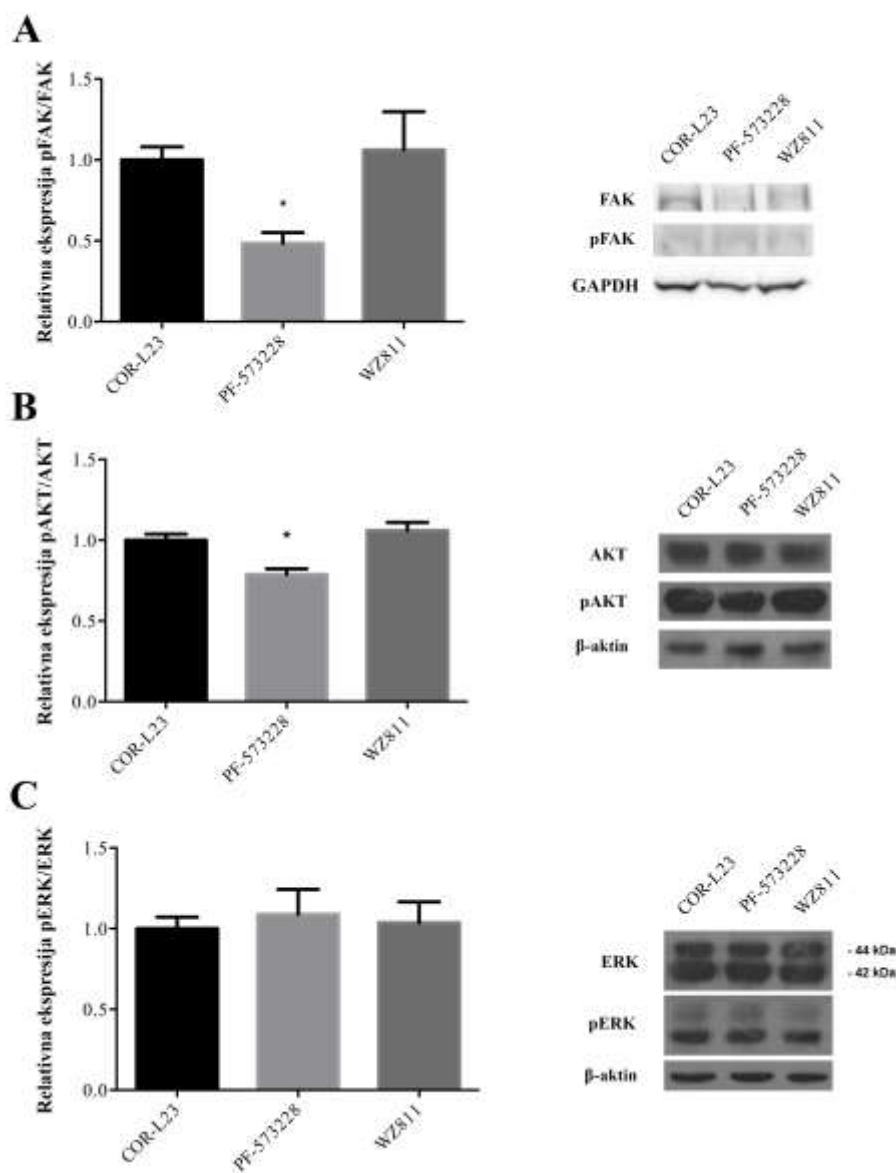
u količini pFAK, pAKT i pERK proteina *Western blot* metodom nakon pomenutih tretmana.



Slika 24. Efekti PF-573228 i WZ811 inhibitora na promenu količine pFAK (A), pAKT (B) i pERK (C) proteina kod NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija. Histogram prikazuje nivo fosforilisane forme proteina u odnosu na nivo ukupne forme proteina, sve normalizovano u odnosu na β -aktin ili GAPDH kao internu kontrolu. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretirane NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina u odnosu na netretirane NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

Očekivano, fosforilisana forma FAK proteina je značajno smanjena kod NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija nakon tretmana 1 μ M PF-573228 (2,6 puta; $p=0,0001$) i 1 μ M WZ811 (2,1 puta; $p=0,0001$) u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 24A). Takođe, nivo pAKT proteina je smanjen kod ovih ćelija 2,6 puta nakon oba tretmana (Slika 24B; $p=0,0015$ i $p=0,0008$). Međutim, ni jedan od ova dva tretmana ne dovodi do statistički značajne promene nivoa pERK proteina kod NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija (Slika 24C).

Za razliku od NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija, COR-L23 ćelije samo nakon tretmana sa 1 μ M PF-573228 pokazuju značajne promene u nivou pFAK (2 puta smanjenje; $p=0,0018$) i pAKT (1,5 puta smanjenje; $p=0,015$) proteina u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 25A i 25B). Sa druge strane, količina pERK proteina ostaje nepromenjena nakon tretmana sa svakim inhibitorom u poređenju sa netretiranim COR-L23 ćelijama (Slika 25C).



Slika 25. Efekti PF-573228 i WZ811 inhibitora na ekspresiju pFAK (A), pAKT (B), pERK (C) kod COR-L23 ćelija. Histogram prikazuje nivo fosforilisane forme proteina u odnosu na nivo ekspresije ukupne forme proteina, sve normalizovano u odnosu na β -aktin ili GAPDH kao interne kontrole. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

4.7. RAZLIKE U TUMORIGENOM POTENCIJALU NCI-H460 I COR-L23 ĆELIJA U *IN VIVO* SISTEMU

Dosadašnji rezultati su pokazali da ćelije sa inaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima imaju povećane migratorne i invazivne sposobnosti i da se tretmanom inhibitorima FAK i CXCR4 uspešno suprimira takav fenotip u *in vitro* uslovima. Shodno tome, dalje su proučavane invazivne sposobnosti COR-L23 ćelija u odnosu na NCI-H460 ćelije u *in vivo* uslovima. Najpre su upoređene sposobnost ovih ćelija da formiraju tumore (tumorigenost), kao i dinamika rasta nastalih tumora u mišijem modelu subkutanih ksenografta tumora pluća.

Tabela 1. *In vivo* tumorigeni esej.

	NCI-H460	COR-L23
Dan nakon inokulacije	Inokulaciona gustina 10 000 ćelija ^a	
	Bf ^b / Bi ^c	Bf / Bi
15	0 / 6	1 / 6
17	1 / 6	3 / 6
22	5 / 6	6 / 6
25	6 / 6	6 / 6
Dan nakon inokulacije	Inokulaciona gustina 100 000 ćelija ^a	
	Bf / Bi	Bf / Bi
9	0 / 6	1 / 6
11	0 / 6	2 / 6
14	2 / 6	6 / 6
17	6 / 6	6 / 6

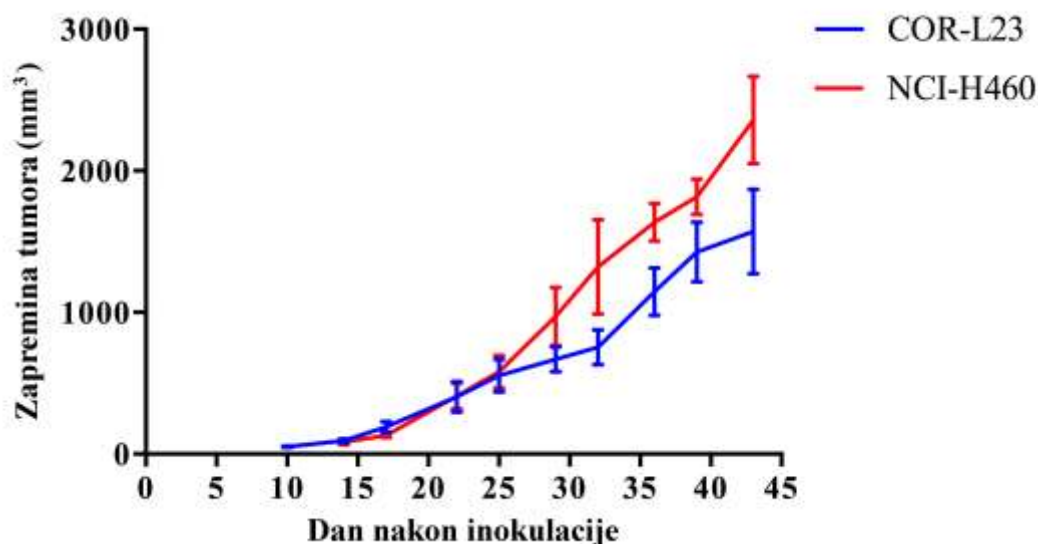
a – NCI-H460 ili COR-L23 ćelije su inokulirane NSG miševima pod kožu aksilarne regije zadnjih nogu u dve inokulacione gustine. Nakon inokulacije, formiranje opipljivih tumora praćeno je svakodnevno.

b – Broj formiranih tumora

c – Broj inokulisanih tumora

Tumorigenost ćelijskih linija ispitivana je nakon potkožnog ubrizgavanja 10 000 i 100 000 ćelija NSG miševima. Formiranje tumora prvo je primećeno kod COR-L23 ćelijske linije i to pri obe inokulacione gustine ćelija. Tačnije, u eksperimentu sa inokulisanih 10 000 ćelija, prvi opipljivi tumor primećen je kod COR-L23 ksenografta u 15. danu nakon inokulacije ćelija, dok je kod NCI-H460 ksenografta prvi formirani tumor primećen u 17. danu. Još veća razlika je primećena u eksperimentu sa inokulisanih 100 000 ćelija. U ovom slučaju prvi opipljivi tumor kod COR-L23 ksenografta je primećen u 9. danu, dok je kod NCI-H460 ksenografta detektovan u 14. danu (Tabela 1.).

Dinamika rasta tumora ispitana je u ksenografima uspostavljenim u SCID miševima. Za potrebe tog eksperimenta potkožno je ubrizgano po 10^6 NCI-H460 i COR-L23 ćelija. Slično prethodnom eksperimentu, COR-L23 ćelije su prve formirale opipljive tumore, ali nakon 25. dana NCI-H460 tumori su imali brži rast u odnosu na COR-L23 tumore. Na kraju eksperimenta zapremina NCI-H460 tumora bila je 1,5 puta veća od COR-L23 tumora (Slika 26.).

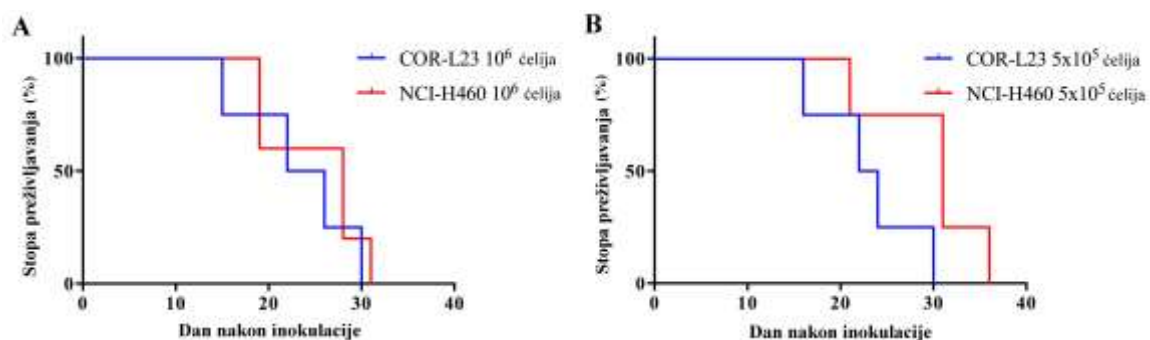


Slika 26. Dinamika rasta tumora kod NCI-H460 i COR-L23 ksenografta uspostavljenim u SCID miševima. Tri puta nedeljno je prećen rast tumora i zapremina tumora je izračunavana prema formuli $V \text{ (mm}^3\text{)} = a \times b^2/2$, gde je $V \text{ (mm}^3\text{)}$ zapremina tumora u mm^3 , a = dužina i b = širina tumora. Svaka eksperimentalna grupa se sastojala od 3 miša sa inokuliranim tumorskim ćelijama u obe aksilarne regije zadnjih nogu. Na slici su prikazane srednje vrednosti sa standardnim greškama.

4.8. RAZLIKE U INVAZIVNOM I METASTATSKOM POTENCIJALU NCI-H460 I COR-L23 ĆELIJA U *IN VIVO* SISTEMU

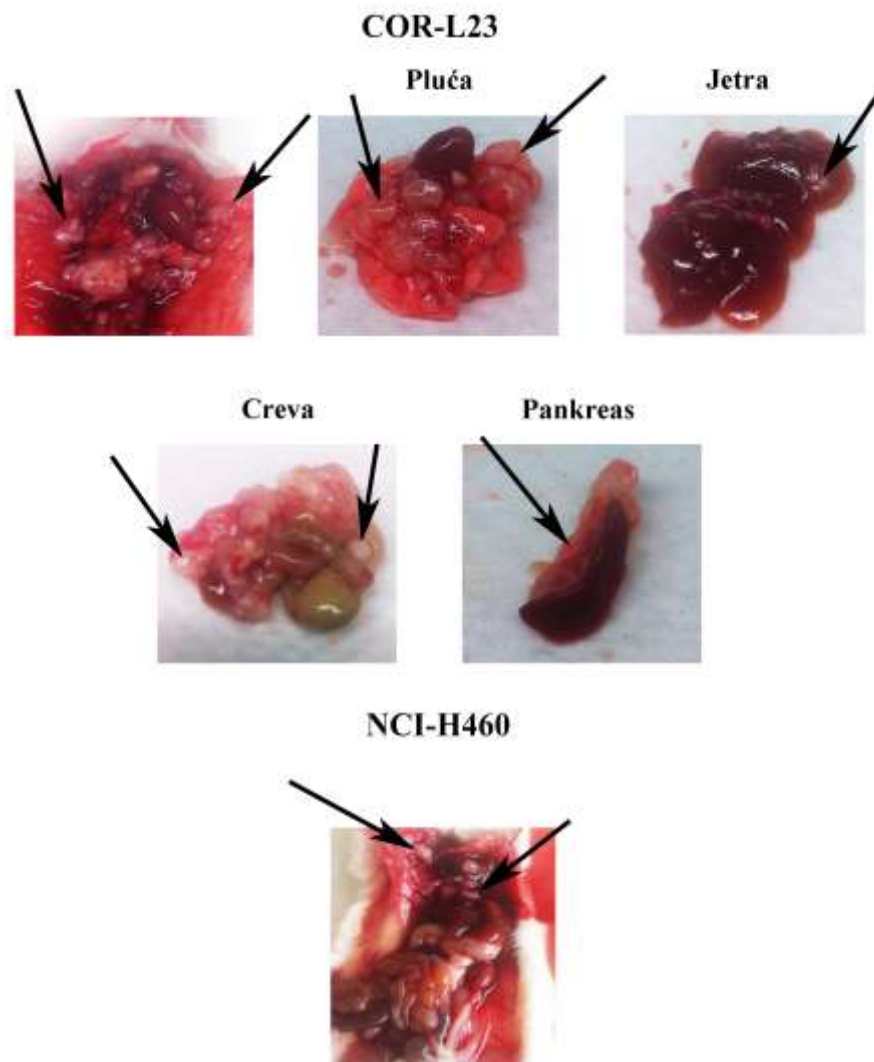
U daljim *in vivo* eksperimentima ispitana je sposobnost NCI-H460 i COR-L23 ćelija da invadiraju u plućni parenhim u mišjem ortotopnom metastatskom modelu tumora pluća koji je opisan od strane Laurence Kraus-Berthier i kolega (Kraus-Berthier i ostali, 2000). NCI-H460 i COR-L23 ćelije su implantirane u plućnu šupljinu SCID miševa, u sledećim gustinama: 1×10^6 i 5×10^5 ćelija, i praćeno je preživljavanje životinja.

Razlika u preživljavanju miševa sa NCI-H460 tumorima i COR-L23 tumorima nije uočena u modelu sa implantiranih 1×10^6 ćelija (Slika 27A). Međutim, u modelu sa implantiranih 5×10^5 ćelija postoji trend kraćeg preživljavanja životinja sa COR-L23 tumorima. Njihovo srednje preživljavanje je 24 dana u odnosu na srednje preživljavanje od 28 dana kod životinja sa NCI-H460 tumorima (Slika 27B).



Slika 27. Kaplan-Meier krive preživljavanja životinja sa ortotopno inokulisanim NCI-H460 i COR-L23 ćelijama. Razlike u preživljavanju životinja koje nose tumore nakon implantacije 1×10^6 (A) i 5×10^5 (B) NCI-H460 i COR-L23 ćelija u pleuralnu šupljinu SCID miševa.

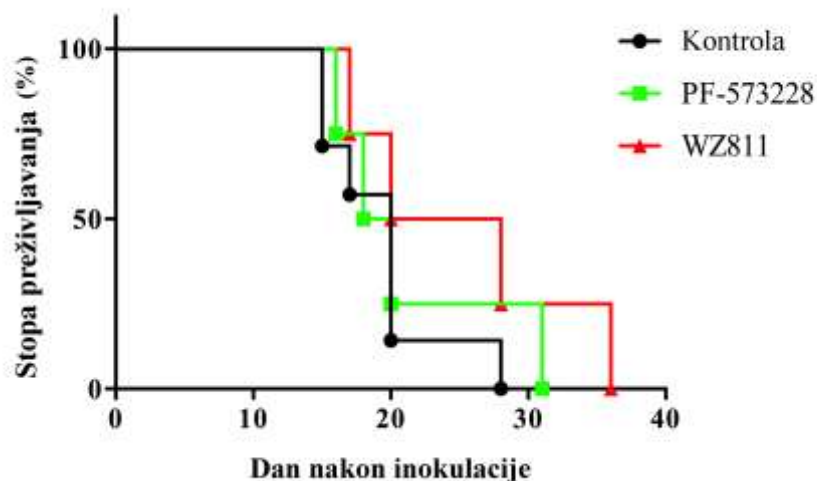
Pored toga, životinje su žrtvovane u 14. danu nakon inokulacije i analizirano je metastatsko širenje tumora u organizmu. Kod oba tipa tumora lokalno širenje u pleuralnoj šupljini je bilo veoma prisutno. Međutim, za razliku od NCI-H460 tumora, COR-L23 tumori su formirali metastaze u udaljenim organima u peritonealnoj duplji, kao što su jetra, creva i pankreas (Slika 28.).



Slika 28. Metastatsko širenje COR-L23 i NCI-H460 tumora u mišjem ortotopnom metastatskom modelu tumora pluća. Metastatsko širenje tumora kod životinja koje nose tumore nakon implantacije 5×10^5 NCI-H460 ili COR-L23 ćelija u pleuralnu šupljinu SCID miševa. Strelice pokazuju tumorsku masu u pleuralnoj duplji i u udaljenim organima.

4.9. ULOGA PF-573228 I WZ811 INHIBITORA U SMANJIVANJU METASTATSKOG POTENCIJALA COR-L23 ĆELIJA U *IN VIVO* SISTEMU

Za praćenje efikasnosti tretmana FAK i CXCR4 inhibitora u *in vivo* uslovima implantirano je 5×10^5 COR-L23 ćelija u plućnu šupljinu SCID miševa. Životinje su tretirane intraperitonealno i antitumorska aktivnost PF-573228 i WZ811 inhibitora je određivana na osnovu vremena preživljavanja životinja. Rezultati sugerišu da, iako ne postoje statistički značajne razlike u preživljavanju netretiranih i tretiranih životinja, tretmani PF-573228 i WZ811 inhibitorima pokazuju trend ka dužem preživljavanju. To se posebno odnosi na tretman WZ811 inhibitorom, koji produžava srednje preživljavanje za 4 dana u odnosu na kontrolnu grupu. Konkretno, srednje preživljavanje grupe tretirane WZ811 inhibitorom je 24 dana, dok je srednje preživljavanje grupe tretirane kontrolnim tretmanom 20 dana (Slika 29.).

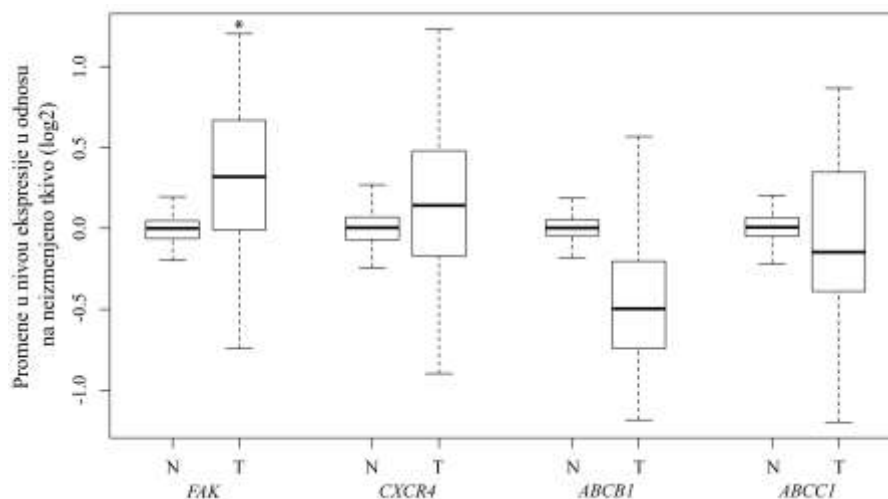


Slika 29. Efekat PF-573228 i WZ811 na preživljavanje životinja u ortotopnom metastatskom modelu tumora pluća. Krive preživljavanja životinja sa formiranim tumorima nakon implantacije 5×10^5 COR-L23 ćelija u pleuralnu šupljinu SCID miševa i nakon tretmana inhibitorima FAK i CXCR4 receptora.

4.10. ANALIZE POVEZANOSTI EKSPRESIJE GENA *FAK* I *CXCR4* SA *ABCBI* I *ABCCI* U UZORCIMA PACIJENATA OBOLELIH OD NSCLC-a

Pored toga što je prethodnim eksperimentima pokazano da *FAK* i *CXCR4* imaju značajnu ulogu u regulisanju migracije i invazije kod NSCLC ćelija, takođe je ispitana i povezanost ovih molekula sa razvojem rezistencije na standardne terapije. Shodno tome, najpre je analizirana povezanost ekspresije gena *FAK* i *CXCR4* sa genskom ekspresijom ABC pumpi, *ABCBI* i *ABCCI*, u uzorcima pacijenata obolelih od NSCLC-a.

Prvo je ispitano nivo ekspresije pojedinačnih gena *FAK*, *CXCR4*, *ABCBI* i *ABCCI* u uzorcima pacijenata obolelih od NSCLC-a RT-qPCR metodom. Pokazano je da je nivo ekspresije *FAK*-a povećan u 47% tumorskih uzoraka pacijenata u odnosu na neizmenjeno kontrolno tkivo, a ekspresija gena *CXCR4* je povećana kod tumora 33% pacijenata. Povećana ekspresija gena *ABCBI* je detektovana kod 17% pacijenata, dok je nivo ekspresije gena *ABCCI* povećan kod 37% pacijenata. Sve ukupno gledano, samo je nivo ekspresije *FAK*-a statistički značajno ($p < 0,0001$) povećan kod NSCLC uzoraka u odnosu na uzorke neizmenjenog plućnog tkiva pacijenata (Slika 30.).



Slika 30. RT-qPCR analiza ekspresije gena *FAK*, *CXCR4*, *ABCBI* i *ABCCI* u uzorcima pacijenata obolelih od NSCLC. Box-plot prikaz ekspresije iRNK gena *FAK*, *CXCR4*, *ABCBI* i *ABCCI* u tumorskim uzorcima (T) i neizmenjenom plućnom tkivu (N) pacijenata obolelih od NSCLC-a. Promene u nivou ekspresije su prikazane logaritamski (\log_2) kao relativne vrednosti u odnosu na nivo ekspresije u neizmenjanom tkivu. Statistički značajna povećanja ekspresije iRNK u odnosu na neizmenjeno tkivo su predstavljena kao * ($p < 0,05$).

Fisher exact testom je pokazana statistički značajna povezanost između promena u ekspresiji gena *FAK* i *ABCB1* ($p=0,01$), kao i između gena *CXCR4* i *ABCB1* ($p=0,002$). Tačnije, pokazano je da je ekspresija gena *ABCB1* povećana isključivo u uzorcima kod kojih je povećana i ekspresija gena *CXCR4*, odnosno *FAK* (Tabela 2.). Slično, statistička analiza je pokazala da je učestalost povećane ekspresije gena *ABCCI* statistički značajno ($p=0,007$) veća kod tumora koji imaju povećanu ekspresiju gena *FAK* (Tabela 2.).

Tabela 2. Analiza povezanosti ekspresije gena

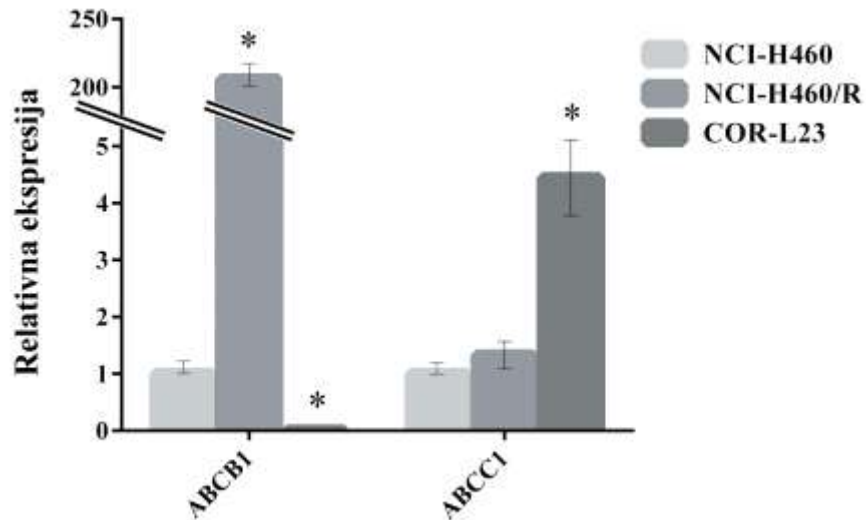
		<i>CXCR4</i>			<i>FAK</i>		
		Povećana ekspresija			Povećana ekspresija		
		Da	Ne	<i>P</i> vrednost	Da	Ne	<i>P</i> vrednost
		BP ^a (%)	BP (%)		BP (%)	BP (%)	<i>P</i> vrednost
<i>ABCB1</i> Povećana ekspresija	Da	5 (100,0)	0 (0,0)		5 (100,0)	0 (0,0)	
	Ne	5 (20,0)	20 (80,0)	0,002^b	9 (36,0)	16 (64,0)	0,01
<i>ABCCI</i> Povećana ekspresija	Da	5 (45,4)	6 (54,6)		9 (81,8)	2 (18,2)	
	Ne	5 (26,3)	14 (73,7)	0,4	5 (26,3)	14 (64,0)	0,007

^aBP, broj pacijenata po grupi; ^b podebljani brojevi predstavljaju statistički značajne vrednosti, $p \leq 0,05$.

4.11. ANALIZA EKSPRESIJE GENA *ABCB1* I *ABCCI* KOD NSCLC ĆELIJSKIH LINIJA

S obzirom da je pokazana povezanost ispitivanih promena u tumorskim uzorcima pacijenata, analizirane su promene u ekspresiji ABC pumpi u ćelijskim linijama NSCLC-a. RT-qPCR metodom analizirane su razlike u nivou ekspresije gena *ABCB1* i *ABCCI* kod NCI-H460 i izvedene rezistentne ćelijske linije, NCI-H460/R. Takođe, razlike u nivoima ekspresije pomenutih gena ispitivane su i kod COR-L23 ćelija, za koje pretpostavljamo da su urođeno rezistentne na hemioterapeutike. Pokazano je da NCI-H460/R ćelije imaju 206 puta veću ($p < 0,0001$) ekspresiju gena

ABCB1 u odnosu na NCI-H460 ćelije, dok promene u nivou ekspresije gena *ABCC1* nisu uočene (Slika 24.). Nasuprot ovim rezultatima, COR-L23 ćelije imaju 4,5 puta povećanu ($p=0,006$) ekspresiju gena *ABCC1* u odnosu na NCI-H460 ćelije, dok je ekspresija gena *ABCB1* 10 puta manja ($p=0,0007$) u odnosu na NCI-H460 ćelije (Slika 31.).



Slika 31. RT-qPCR analiza ekspresije gena *ABCB1* i *ABCC1* kod NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23 ćelijske linije. Relativna ekspresija ispitivanih gena je preračunata u odnosu na ekspresiju *ACTB* gena kao interne kontrole. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na NCI-H460 ćelijsku liniju. Statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK u odnosu na NCI-H460 ćelijsku liniju su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

4.12. SENZITIVNOST NSCLC ĆELIJSKIH LINIJA NA KLASIĀNE HEMIOTERAPEUTIKE

Senzitivnost NSCLC ćelijskih linija (NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23) na klasiĀne hemioterapeutike (DOX, PTX i CPT) analizirana je MTT testom. U saglasnošću sa prethodnim rezultatom, NSCLC ćelijske linije sa povećanom ekspresijom gena ABC transportera su pokazale određeni stepen rezistencije na hemioterapeutike. Konkretno, COR-L23 ćelije su pokazale rezistenciju na DOX, dok su NCI-H460/R ćelije rezistentne na sve ispitivane hemioterapeutike (DOX, PTX i CPT). IC₅₀ vrednosti su prikazane u Tabeli 3.

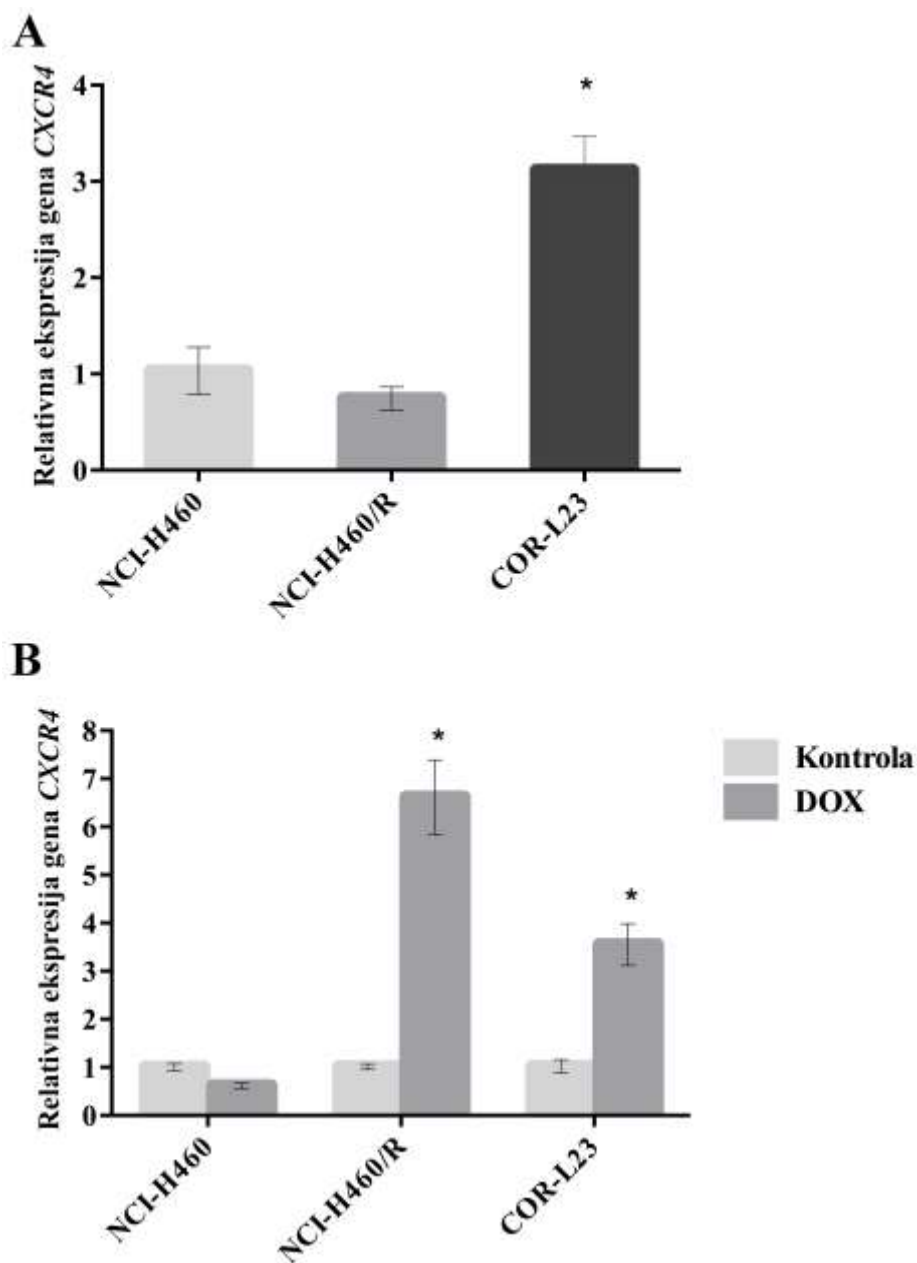
Tabela 3. IC₅₀^a vrednosti klasiĀnih hemioterapeutika

	NCI-H460	NCI-H460/R	COR-L23
DOX	30 nM	3.7 µM	550 nM
PTX	4.3nM	447 nM	9 nM
CPt	1.4µM	3.5 µM	1.7 µM

^a IC₅₀ vrednost – koncentracija koja dovodi do 50% inhibicije ćelijskog rasta

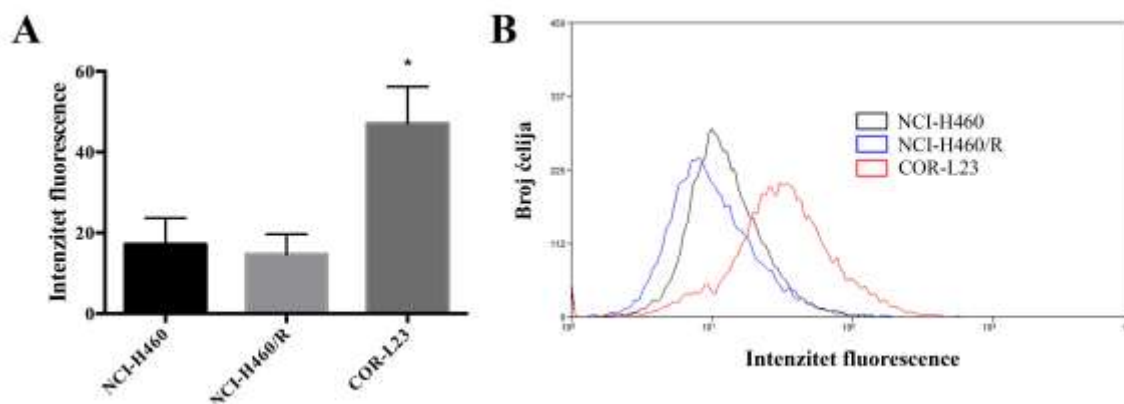
4.13. EKSPRESIJA CXCR4 RECEPTORA KOD NSCLC ĆELIJA

U daljem toku studije smo analizirali promene u nivou ekspresije CXCR4 receptora na nivou iRNK i na proteinskom nivou kod NSCLC ćelijskih linija. Dobijeni rezultati su pokazali da je ekspresija gena *CXCR4* nepromenjena kod NCI-H460/R ćelija, dok je kod COR-L23 ćelija povećana 3,1 puta ($p=0,008$) u odnosu na NCI-H460 ćelije (Slika 32A.).



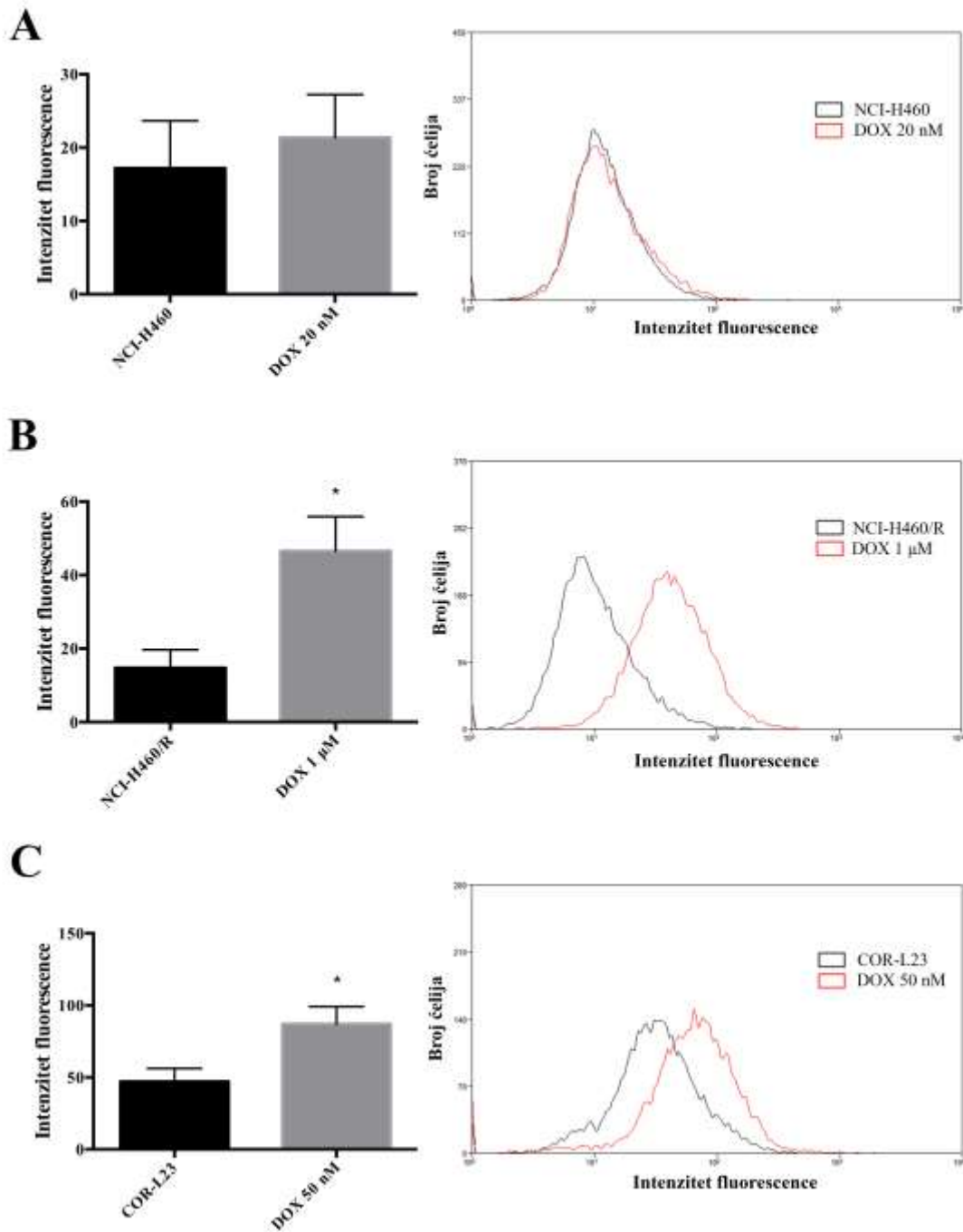
Slika 32. RT-qPCR analiza ekspresije gena *CXCR4* kod NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23 ćelijskih linija. Histogrami prikazuju razlike u ekspresiji gena *CXCR4* kod NSCLC ćelijskih linija (A) i (B) ćelijskih linija tretiranih DOX-om. Relativna ekspresija ispitivanog gena je preračunata u odnosu na ekspresiju *ACTB* gena kao interne kontrole. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK nakon tretmana DOX-om su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

Sa druge strane, upoređujući nivo ekspresije na proteinskom nivou pokazano je da je ekspresija CXCR4 receptora kod NCI-H460/R ćelija nepromenjena, dok je kod COR-L23 ćelija statistički značajno ($p=0,0099$) povećana 2,8 puta u odnosu na NCI-H460 ćelije (Slika 33.).



Slika 33. Citofluorimetrijska analiza ekspresije CXCR4 receptora kod NCI-H460, NCI-H460/R i COR-L23 ćelija. Nivo CXCR4 proteina je analiziran metodom protočne citofluorimetrije. Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta i srednje vrednosti sa standardnim greškama su prikazane na histogramu. Zapis reprezentativnog eksperimenta je takođe prikazan na slici. Statistički značajne razlike ekspresije CXCR4 u odnosu na NCI-H460 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

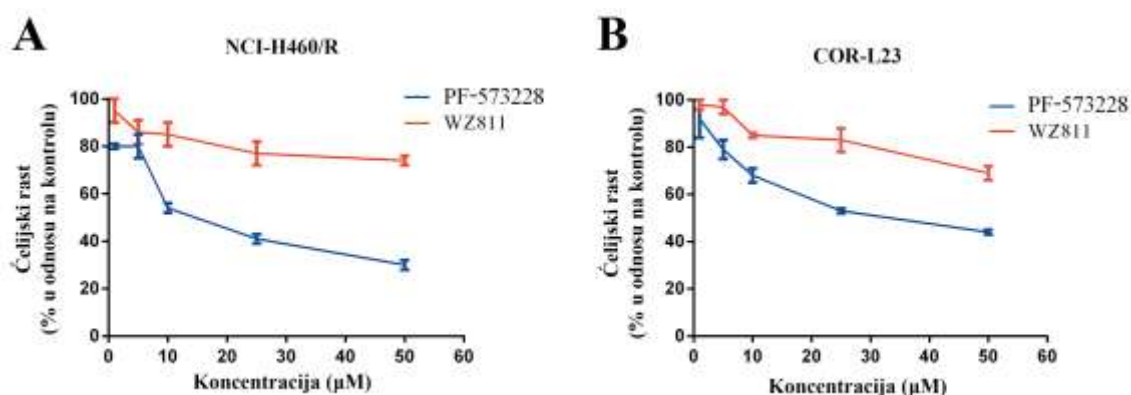
Međutim, NCI-H460/R i COR-L23 ćelije tretirane DOX-om pokazuju statistički značajno povećanje nivoa ekspresije CXCR4 u poređenju sa netretiranom kontrolom. Tačnije, nivo ekspresije gena *CXCR4* nakon tretmana DOX-om kod NCI-H460/R ćelija se povećao 6,6 puta ($p=0,008$), dok se kod COR-L23 ćelija povećao 3,6 puta ($p=0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 32B.). Slično, nakon tretmana DOX-om ekspresija na proteinskom nivou CXCR4 se značajno povećala kod NCI-H460/R ćelija za 3 puta ($p=0,0065$), dok se kod COR-L23 ćelija povećala 1,8 puta ($p=0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 34.). Tretman DOX-om kod NCI-H460 ćelija ne dovodi do promena na nivou ekspresije CXCR4 gena niti proteina (Slika 32B i 34.).



Slika 34. Citofluorimetrijska analiza ekspresije CXCR4 receptora kod NCI-H460 (A), NCI-H460/R (B) i COR-L23 (C) ćelija nakon tretmana DOX-om. Nivo CXCR4 proteina je analiziran metodom protočne citofluorimetrije. Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta i srednje vrednosti sa standardnim greškama su prikazane na histogramu. Zapis reprezentativnog eksperimenta je takođe prikazan na slici. Statistički značajne razlike ekspresije CXCR4 u odnosu na netretiranu kontrolu su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

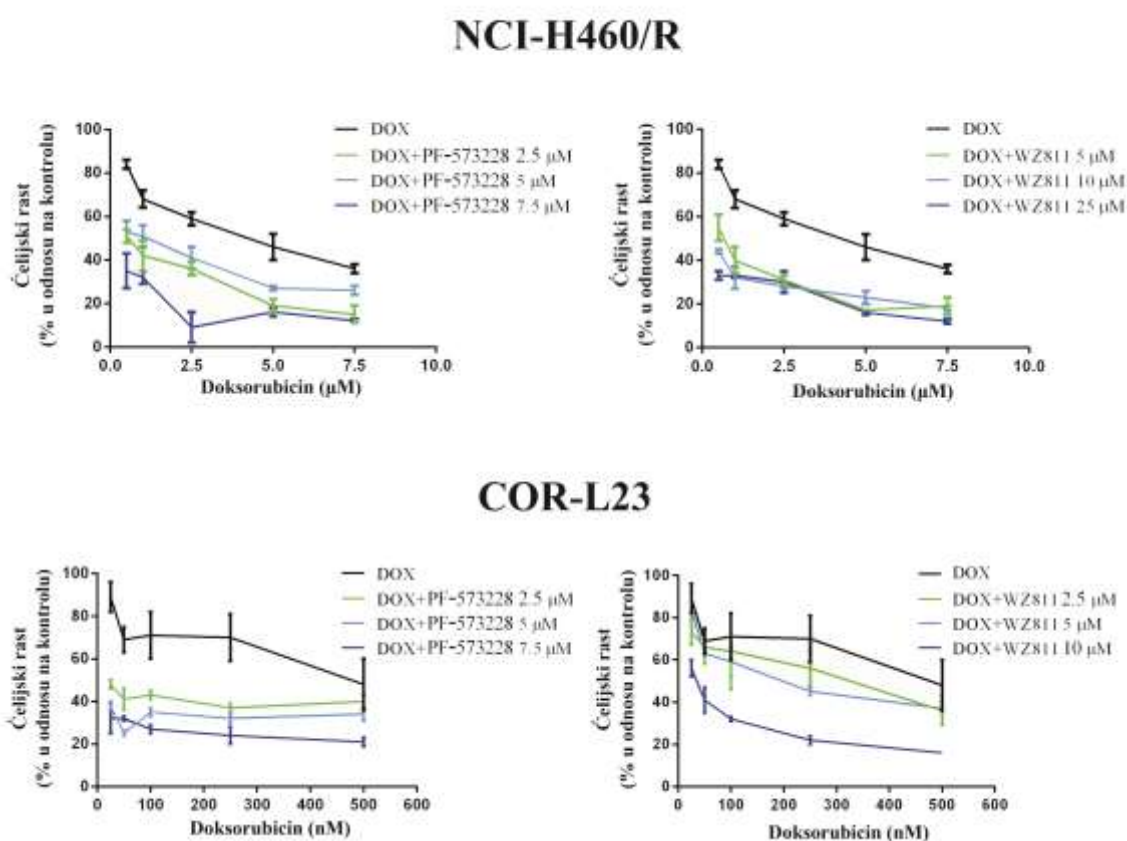
4.14. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA SENZITIVNOST NCI-H460/R I COR-L23 ĆELIJA NA DOX

Da bi se ispitala mogućnost korišćenja FAK i CXCR4 inhibitora u cilju prevazilaženja rezistencije na DOX, najpre je analizirana njihova pojedinačna citotoksičnost. Rastućim koncentracijama PF-573228 (1-50 μ M) i WZ811 (1-50 μ M) tretirane su NCI-H460/R i COR-L23 ćelije. U MTT testu kod obe ćelijske linije tretmani su prouzrokovali dozno zavisno smanjenje vijabilnosti, sa niskim do umerenim efektom na ćelijski rast. Konkretno, tretman 10 μ M PF-573228 inhibitorom je doveo do smanjanjenja vijabilnosti od 50% kod NCI-H460/R ćelija i 40% kod COR-L23 ćelija, dok je tretman 10 μ M WZ811 inhibitorom prouzrokovao smanjenje vijabilnosti ne veće od 20% kod obe ćelijske linije (Slika 35.).



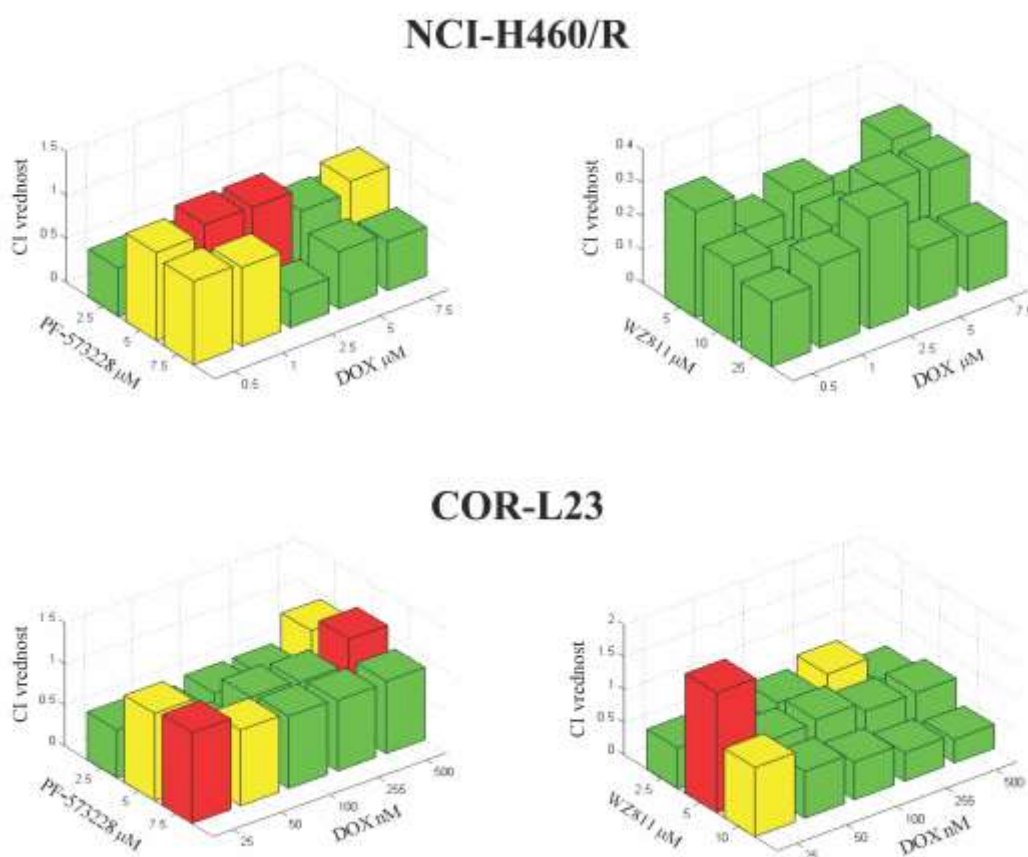
Slika 35. Vijabilnost NCI-H460/R (A) i COR-L23 (B) ćelija pod dejstvom PF-573228 i WZ811 inhibitora. Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana MTT testom nakon tretmana rastućim koncentracijama PF-573228 (1-50 μ M) i WZ811 (1-50 μ M) u trajanju od 72h. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i prikazane su njihove srednje vrednosti i odgovarajuće standardne greške.

Dalje je ispitivan potencijal PF-573228 i WZ811 inhibitora da senzitivizuju NCI-H460/R i COR-L23 ćelije na DOX u istovremenom tretmanu sa ovim citostatikom. U kombinovanim tretmanima PF-573228 i WZ811 senzitivizuju obe rezistentne ćelijske linije na tretman DOX-om. Tačnije, iako inhibitori CXCR4 i FAK-a pojedinačno ne ostvaruju značajan efekat na smanjenje vijabilnosti NCI-H460/R i COR-L23 ćelija, u kombinaciji sa DOX oba inhibitora, PF-573228 i WZ811, povećavaju osetljivost rezistentnih ćelijskih linija na DOX pri svim ispitivanim koncentracijama (Slika 36.).



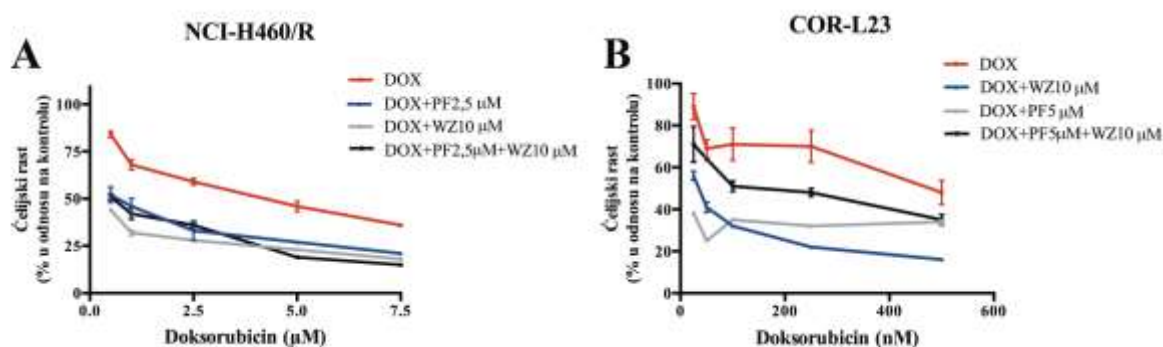
Slika 36. Efekti istovremenih tretmana FAK i CXCR4 inhibitora sa DOX-om na vijabilnost NCI-H460/R i COR-L23 ćelija. Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana MTT testom nakon kombinovanog tretmana tri različite koncentracije PF-573228, odnosno WZ811, inhibitora sa rastućim koncentracijama DOX-a u trajanju od 72h. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i prikazane su njihove srednje vrednosti i odgovarajuće standardne greške.

Izračunavanjem kombinacionog indeksa utvrđeno je da inhibitori u kombinaciji sa DOX-om pri većini koncentracija ostvaruju sinergistički efekat na inhibiciju ćelijskog rasta obe rezistentne ćelijske linije kao što je prikazano na slici 37.



Slika 37. Priroda uzajamnog dejstva PF-573228 i WZ811 sa DOX-om u kombinovanim tretmanima kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelijskih linija. Interakcija PF-573228 i WZ811 sa DOX-om je određena izračunavanjem kombinacionog indeksa (CI) pomoću CalcuSyn programa. Vrednost CI < 0.9 ukazuju na sinergistički efekat (zeleni stubići), vrednost CI = 0.9-1.1 ukazuju na aditivni efekat (žuti stubići), dok vrednosti CI veće od 1.1 ukazuju na antagonistički efekat (crveni stubići) kombinovanih tretmana na inhibiciju rasta NCI-H460/R i COR-L23 ćelija.

Međutim, zajednički tretman oba inhibitora istovremeno sa DOX-om ne doprinosi dodatnom povećanju inhibicije ćelijskog rasta u poređenju sa efektima svakog od inhibitora pojedinačno sa DOX-om (Slika 38.).



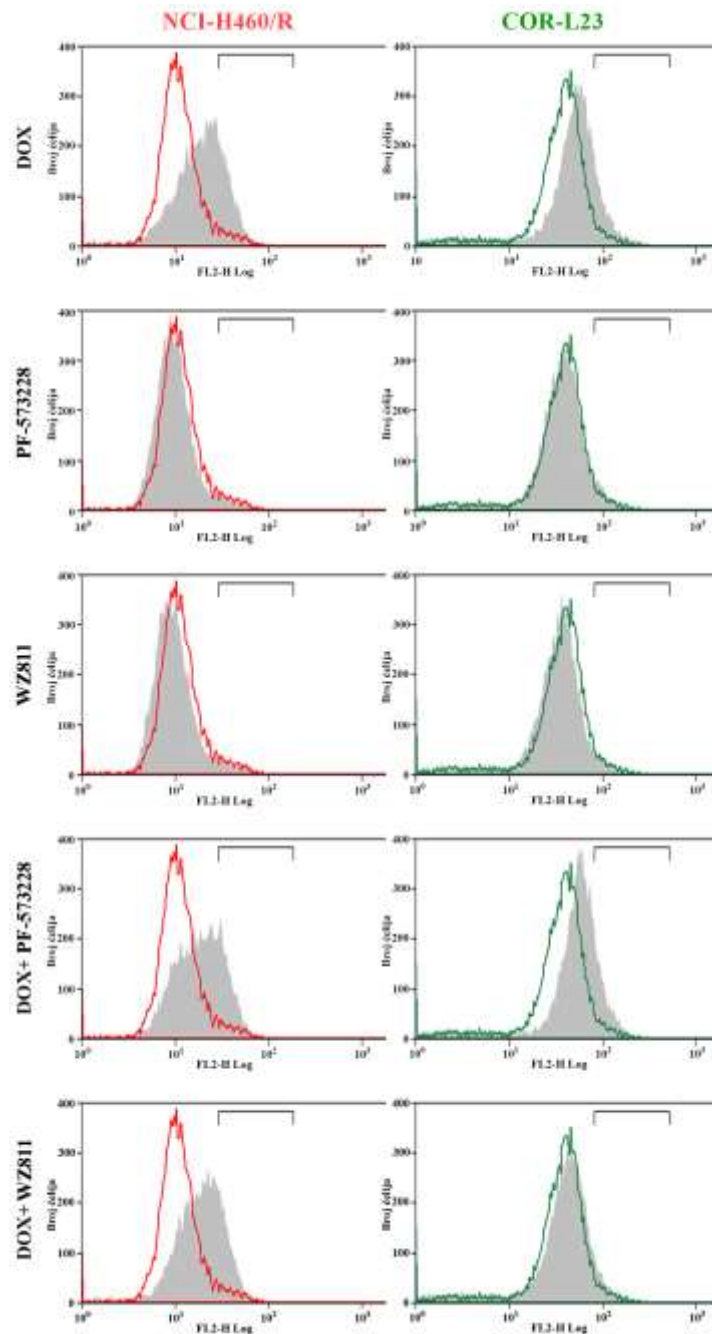
Slika 38. Efekti istovremenih tretmana oba inhibitora, FAK i CXCR4, sa DOX-om na vijabilnost NCI-H460/R (A) i COR-L23 ćelija (B). Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana MTT testom nakon zajedničkog tretmana PF-573228 i WZ811 inhibitora sa rastućim koncentracijama DOX-a u trajanju od 72h. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Shodno dobijenim rezultatima, u daljim eksperimentima su korišćeni kombinovani tretmani svakog inhibitora sa DOX-om u koncentracijama koje su pokazale najizraženiji sinergistički efekat na inhibiciju rasta rezistentnih ćelijskih linija: 1 μM DOX sa 2,5 μM PF-573228, kao i 10 μM WZ811, kod NCI-H460/R ćelija, odnosno (50 nM DOX sa 5 μM PF-573228 i 10 μM WZ811 kod COR-L23 ćelija.

4.15. AKUMULACIJA DOX-a KOD REZISTENTNIH ĆELIJA NAKON KOMBINOVANIH TRETMANA

U cilju ispitivanja mehanizma kojim FAK ili CXCR4 inhibitori dovode do senzitivizacije ćelija na DOX, metodom protočne citofluorimetrije prvo su ispitivane razlike u akumulaciji DOX-a kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelija nakon kombinovanih tretmana.

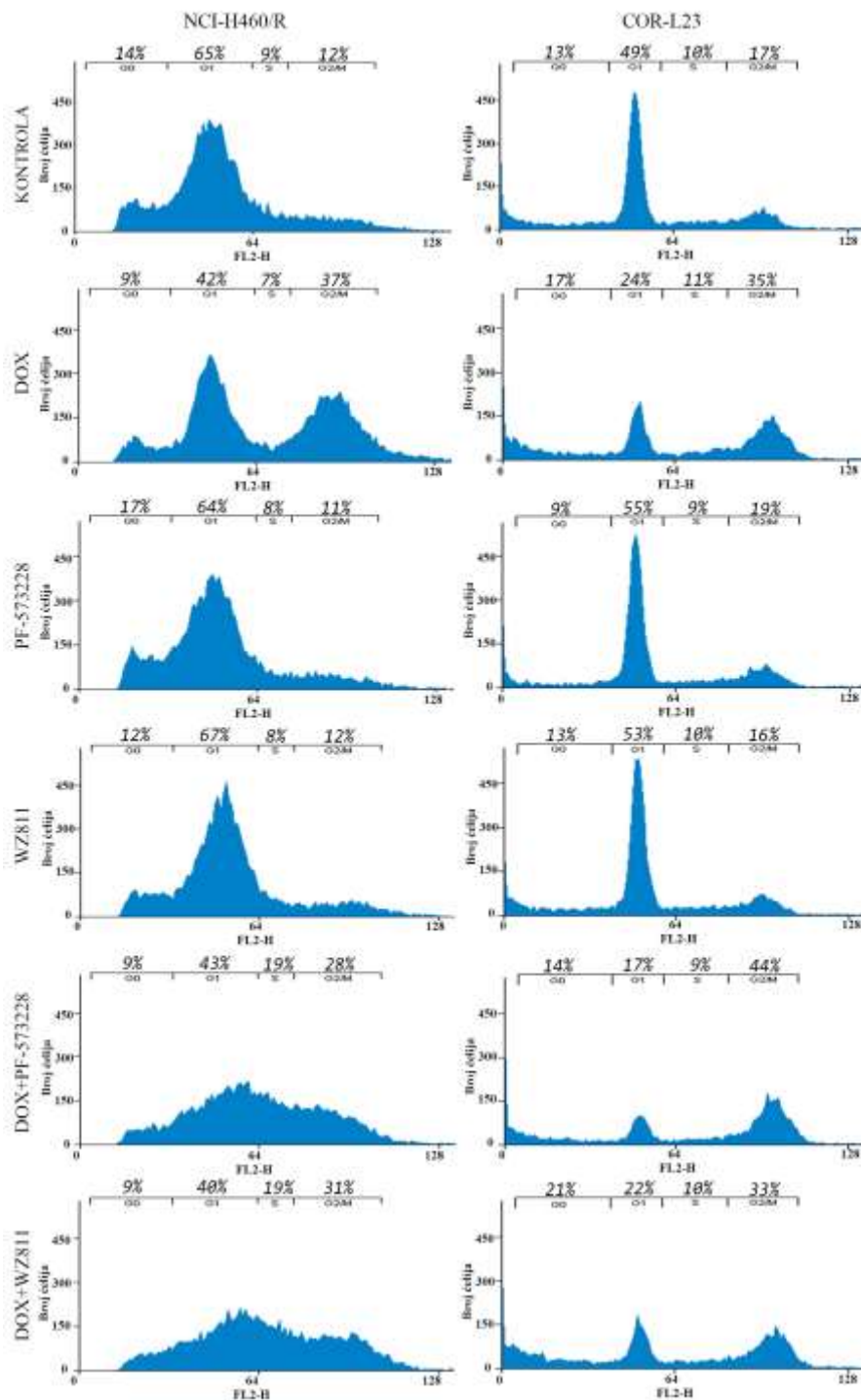
Dobijeni rezultati su pokazali da inhibitori ne dovode do povećanja unutarćelijske koncentracije DOX-a kod obe ćelijske linije, niti pojedinačno niti u kombinaciji sa DOX-om (Slika 39.).



Slika 39. Stepen akumulacije DOX-a nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelija. Analiza akumulacije DOX-a ($10 \mu\text{M}$ u trajanju od 30 minuta) nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelija metodom protočne citofluorimetrije. X osa: intenzitet fluorescence srazmeran akumulaciji DOX-a u vijabilnim ćelijama izmereno na FL2-H kanalu, Y osa: broj ćelija. Crvenom bojom označen je nivo fluorescence netretiranih NCI-H460/R ćelija, zelenom bojom je označen nivo fluorescence netretiranih COR-L23 ćelija, dok se siva boja odnosi na nivo fluorescence ćelija nakon odgovarajućih tretmana. Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta. Reprezentativni eksperiment je prikazan na slici.

4.16. DISTRIBUCIJA ĆELIJSKOG CIKLUSA KOD REZISTENTNIH ĆELIJA NAKON KOMBINOVANIH TRETMANA

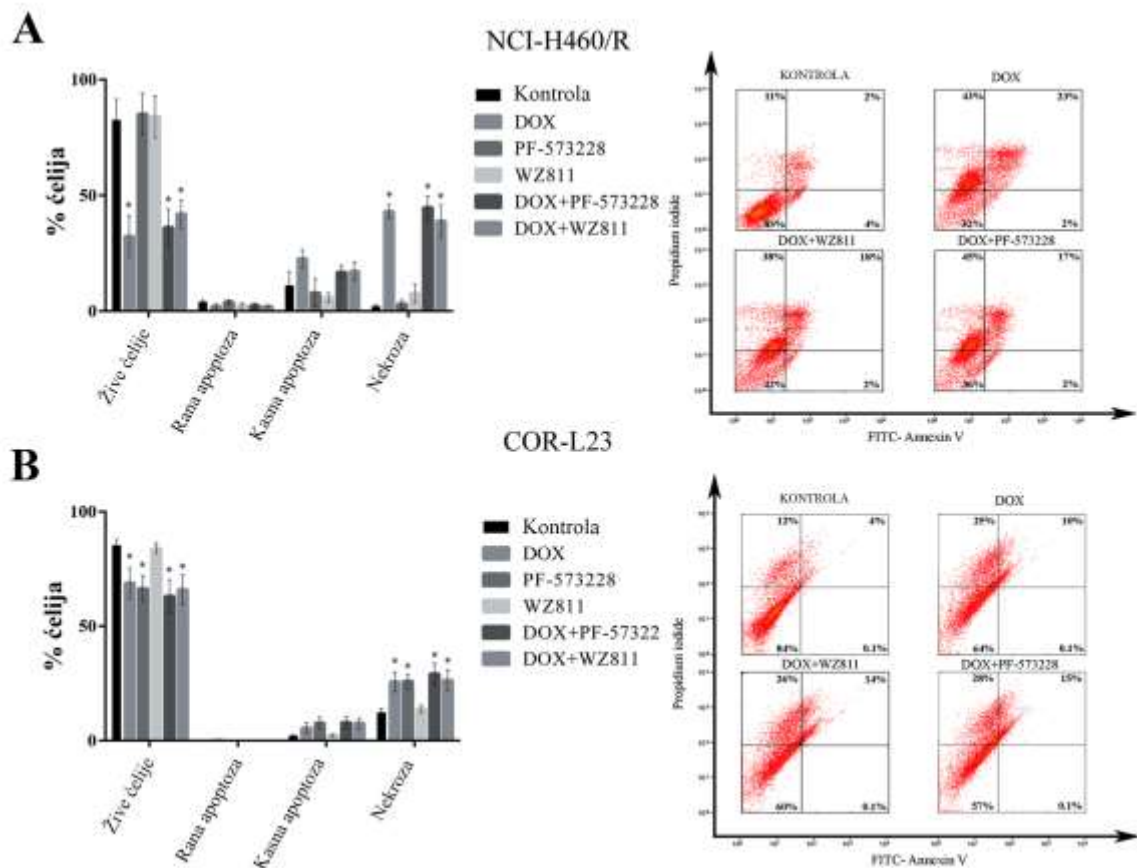
Ispitujući promene u ćelijskom ciklusu pokazano je da sam tretman DOX-om dovodi do povećanja broja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, dok njegovi kombinovani tretmani sa inhibitorima dovode do dodatnih promena u distribuciji ćelijskog ciklusa. Tretmani sa DOX-om i PF-573228, kao i sa DOX-om i WZ811, kod NCI-H460/R ćelija dovode do kompletne redistribucije ćelijskog ciklusa i do povećanja broja ćelija koje se nalaze u S fazi (19%) u odnosu na njihov broj kod netretiranog uzorka (9%) i uzorka tretiranog samo DOX-om (7%). S druge strane, kombinovani tretman sa DOX-om i PF-573228 inhibitorom kod COR-L23 ćelija, dovodi do značajnog povećanja broja ćelija u G2/M fazi (44%) u odnosu na netretirane ćelije (17%) i na ćelije tretirane samo DOX-om (35%). Međutim, kombinovani tretman DOX-a i WZ811 inhibitora kod COR-L23 ćelija ne dovodi do dodatnih promena u distribuciji ćelijskog ciklusa kada se uporedi sa efektom samog tretmana sa DOX-om (Slika 40.).



Slika 40. Distribucija ćelijskog ciklusa kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelija nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana. NCI-H460/R i COR-L23 ćelije tretirane 72 sata DOX-om, PF-573228 i WZ811 inhibitorima, pojedinačno i u kombinacijama, analizirane su metodom protočne citofluorimetrije pomoću PI obeležavanja. X osa: intenzitet fluorescence obeležavanja ćelija PI izmeren na FL2-H kanalu, Y osa: broj ćelija. Procenat ćelija distribuiran između G0, G1, S i G2M faza prikazan je na slici. Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta. Reprezentativni eksperiment je prikazan na slici.

4.17. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA INDUKCIJU ĆELIJSKE SMRTI KOD REZISTENTNIH ĆELIJA

Da bi se utvrdilo da li pored redistribucije ćelijskog ciklusa, kombinovani tretmani dovode i do indukcije ćelijske smrti, NCI-H460/R i COR-L23 ćelije su tretirane DOX-om, PF-573228 i WZ811 pojedinačno i u kombinacijama. Promene u indukciji ćelijske smrti koje su uzrokovali pomenuti tretmani registrovane su metodom protočne citofluorimetrije. Sam tretman DOX-om prouzrokovao je značajno povećanje broja nekrotičnih ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom za 32% kod NCI-H460/R i 13% kod COR-L23 ćelija. Međutim, kombinovani tretmani kod obe ćelijske linije nisu doveli do dodatnog povećanja broja ćelija u nekrozi u odnosu na sam tretman DOX-om, što sugeriše da se sve promene na nivou ćelijske smrti mogu pripisati dejstvu DOX-a (Slika 41.).

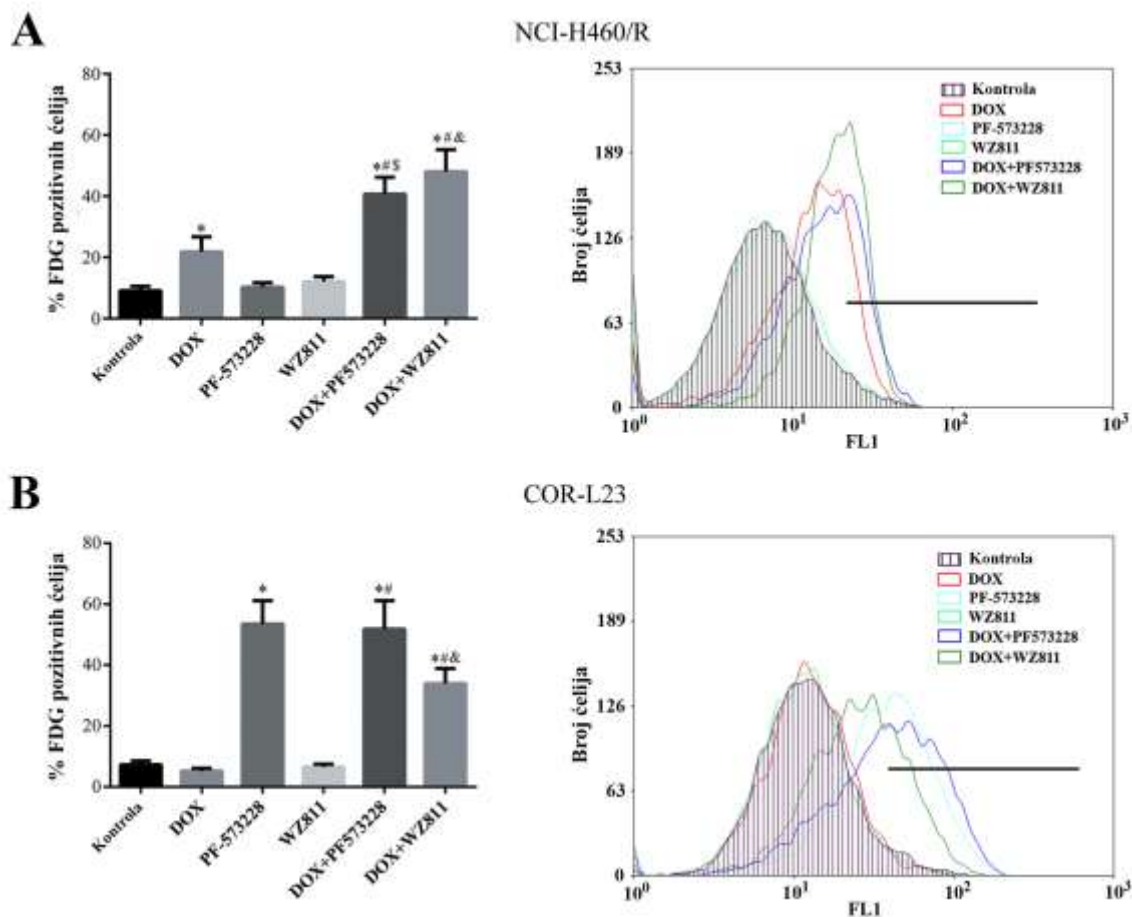


Slika 41. Analiza ćelijske smrti kod NCI-H460/R (A) i COR-L23 (B) ćelija nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana. Procenat apoptotskih, nekrotičnih i živih ćelija određivan je metodom protočne citofluorimetrije pomoću aneksin V-FITC (AV)/propidijum jodid (PI) bojenja nakon 72 sata tretmana DOX-om, PF-573228 i WZ811, pojedinačno i u kombinacijama. Ovo bojenje omogućava razlikovanje vijabilnih ćelija (AV- PI-, kvadrant dole levo), ćelija u ranoj apoptozi (AV+ PI-, kvadrant dole desno), kasno apoptotskih ćelija (AV+ PI+, kvadrant gore desno) kao i nekrotičnih ćelija (AV-PI+, kvadrant gore levo). Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta i na histogramu su prikazane srednje vrednosti i standardne greške. Reprezentativni eksperiment je prikazan na slici. Statistički značajne razlike procenta mrtvih ćelija u odnosu na kontrolu su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

4.18. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA INDUKCIJU *SENESCENCE*-a KOD REZISTENTNIH ĆELIJSKIH LINIJA

S obzirom da kombinovani tretmani ne povećavaju dodatno broj ćelija u nekrozi u odnosu na sam DOX, analiziran je njihov potencijal da indukuju *senescence* kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelijske linije. Merenjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze pokazano je da tretman DOX-om uzrokuje statistički značajno povećanje ($p=0,022$) broja NCI-H460/R ćelija koje metabolišu FDG (tj. povećanje broja ćelija u *senescence*-u) za 13% u odnosu na netretiranu kontrolu. Osim toga, uočeno je da kombinovani tretmani dovode do dodatnog povećanja broja NCI-H460/R ćelija u *senescence*-u. DOX i PF-573228 povećavaju broj ćelija u *senescence*-u za 32% ($p=0,0054$), dok je broj ovih ćelija nakon tretmana sa DOX i WZ811 veći za 39% ($p=0,0073$) u odnosu na netretirani uzorak (Slika 42.).

Kod COR-L23 ćelija sam tretman PF-573228 inhibitorom dovodi do značajnog povećanja ($p=0,006$) ćelija u *senescence*-u za 46% u odnosu na netretiranu kontrolu, dok kombinacija DOX-a i PF573228 ne dovodi do dodatnih promena u broju FDG pozitivnih ćelija. Tretmani COR-L23 ćelija DOX-om ili WZ811 inhibitorom ne dovode do promena broja ćelija koje razgrađuju FDG, već samo njihov kombinovani tretman ima uticaj na indukciju *senescence*-a i dovodi do značajnog povećanja ($p=0,0063$) FDG pozitivnih ćelija za 27% u odnosu na netretirani uzorak (Slika 42.).



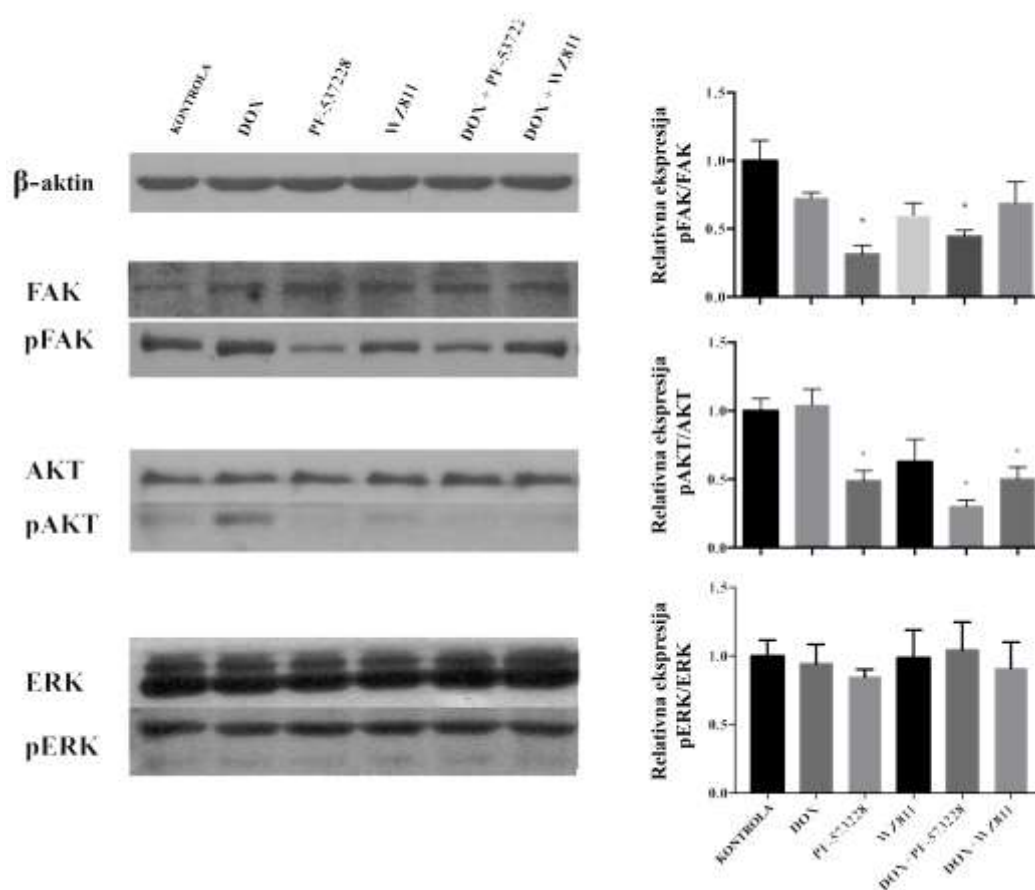
Slika 42. Analiza aktivnosti β -galaktozidaze NCI-H460/R (A) i COR-L23 (B) ćelija nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana. Procenat ćelija u *senescence*-u nakon 72 sata tretmana DOX-om, PF-573228 i WZ811, pojedinačno i u kombinacijama, određivan je metodom protočne citofluorimetrije koristeći FDG kao fluorescentno obeleženi supstrat za β -galaktozidazu. Analizirano je najmanje 10 000 događaja u tri nezavisna eksperimenta i na histogramu su prikazane srednje vrednosti sa standardnim greškama. Reprezentativni eksperiment je prikazan na slici. Statistički značajne razlike u % FDG pozitivnih ćelija u odnosu na kontrolu su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$), u odnosu na ćelije tretirane DOX-om su predstavljene kao # ($p \leq 0,05$), u odnosu na ćelije tretirane PF-573228 inhibitorom su predstavljene kao \$ ($p \leq 0,05$) i u odnosu na ćelije tretirane WZ811 inhibitorom su predstavljene kao & ($p \leq 0,05$).

4.19. PROMENE U NIVOU pFAK, pAKT I pERK PROTEINA KOD REZISTENTNIH ĆELIJA NAKON KOMBINOVANIH TRETMANA

Efekti pojedinačnih i kombinovanih tretmana na nivo ekspresije pFAK, pAKT i pERK proteina analizirani su *Western blot* metodom. Tretman PF-573228 inhibitorom, kao i njegov kombinovani tretman sa DOX-om značajno smanjuje nivo ekspresije pFAK i pAKT proteina kod obe ćelijske linije. Nivo ekspresije pFAK i pAKT proteina kod NCI-H460/R ćelija nakon tretmana FAK inhibitorom je značajno smanjen ($p=0,02$) u odnosu na netretiranu kontrolu, i to redom 2,7 puta i 2 puta, dok kombinacija PF-573228 inhibitora sa DOX-om ne dovodi do dodatnih promena na nivou ekspresije pFAK-a i pAKT-a u odnosu na pojedinačne tretmane (Slika 43.). Efekti PF-573228 tretmana su još izraženiji na COR-L23 ćelijskoj liniji. PF-573228 inhibitor kod COR-L23 ćelija uzrokuje smanjenje nivoa ekspresije pFAK-a 2 puta ($p=0,004$) i pAKT-a 3 puta ($p=0,02$), dok kombinovani tretman PF-573228 i DOX-a dovodi do obaranja nivoa ekspresije pFAK-a 5,4 puta ($p=0,0008$) i pAKT-a 4,2 puta ($p=0,01$) u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 44.)

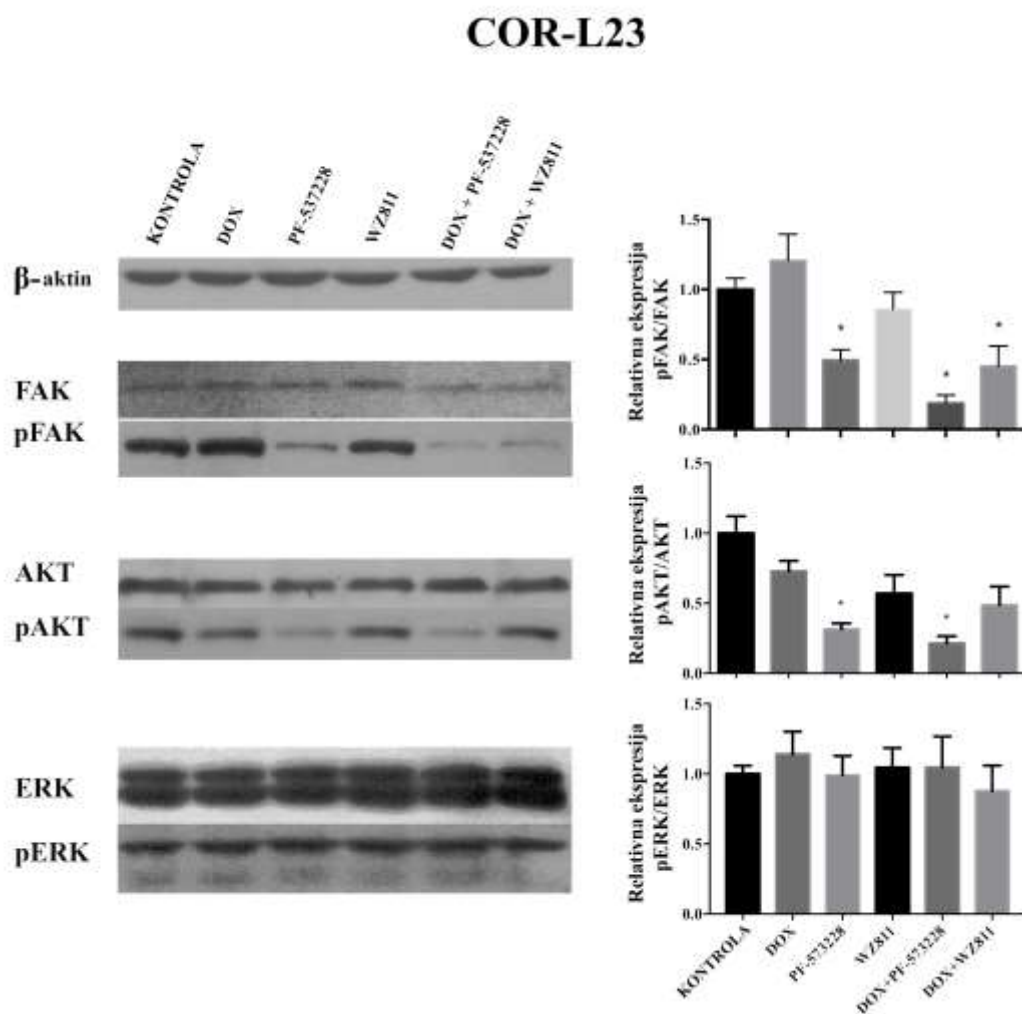
Tretman WZ811 inhibitorom pokazuje trend smanjenja nivoa ekspresije pAKT i pFAK proteina kod obe ćelijske linije. Za razliku od pojedinačnog tretmana, kombinovani tretman WZ811 inhibitora sa DOX-om dovodi do statistički značajnih promena u fosforilaciji AKT-a kod NCI-H460/R ćelija. Tačnije, ovakav kombinovani tretman dovodi do smanjenja nivoa fosforilisanog AKT-a za 2 puta ($p=0,03$) u odnosu na ne tretirane NCI-H460/R ćelije (Slika 43).

NCI-H460/R



Slika 43. Efekti tretmana na promenu količine pFAK, pAKT i pERK proteina kod NCI-H460/R ćelija. Histogram prikazuje nivo fosforilisane forme proteina u odnosu na nivo ukupne forme proteina, sve normalizovano u odnosu na β -aktin kao internu kontrolu. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretirane NCI-H460/R ćelije. Prikazane su srednje vrednosti i njihove standardne greške. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina u odnosu na netretirane NCI-H460/R ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

Za razliku od NCI-H460/R ćelija, kombinovani tretman WZ811 inhibitora sa DOX-om kod COR-L23 ćelijske linije obara nivo ekspresije pFAK-a 2,2 puta ($p=0,006$) u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije (Slika 44.). Nivo ekspresije pERK proteina je ostao nepromenjen nakon svih tretmana kod obe ćelijske linije (Slika 43. i 44.).



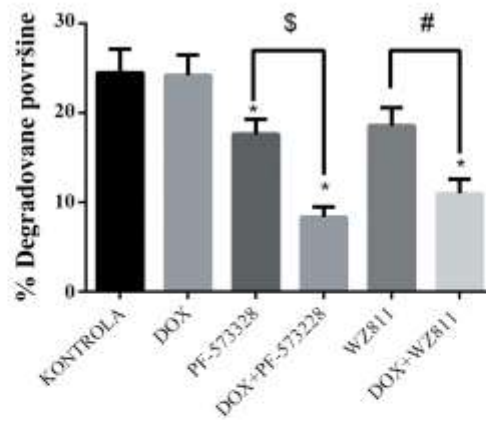
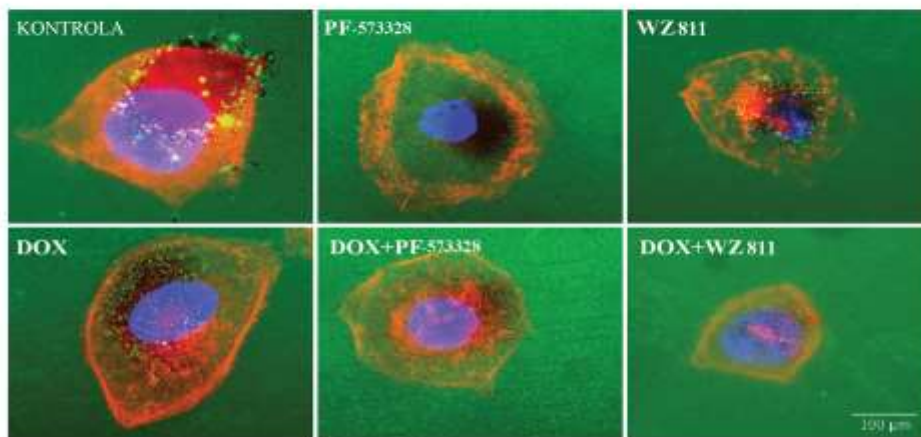
Slika 44. Efekti tretmana na promenu količine pFAK, pAKT i pERK proteina kod COR-L23 ćelija. Histogram prikazuje nivo fosforilisane forme proteina u odnosu na nivo ukupne forme proteina, sve normalizovano u odnosu na β -aktin kao internu kontrolu. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije. Prikazane su srednje vrednosti i standardne greške. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$).

4.20. EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA NA INVAZIVNE I MIGRATORNE SPOSOBNOST REZISTENTNIH ĆELIJA

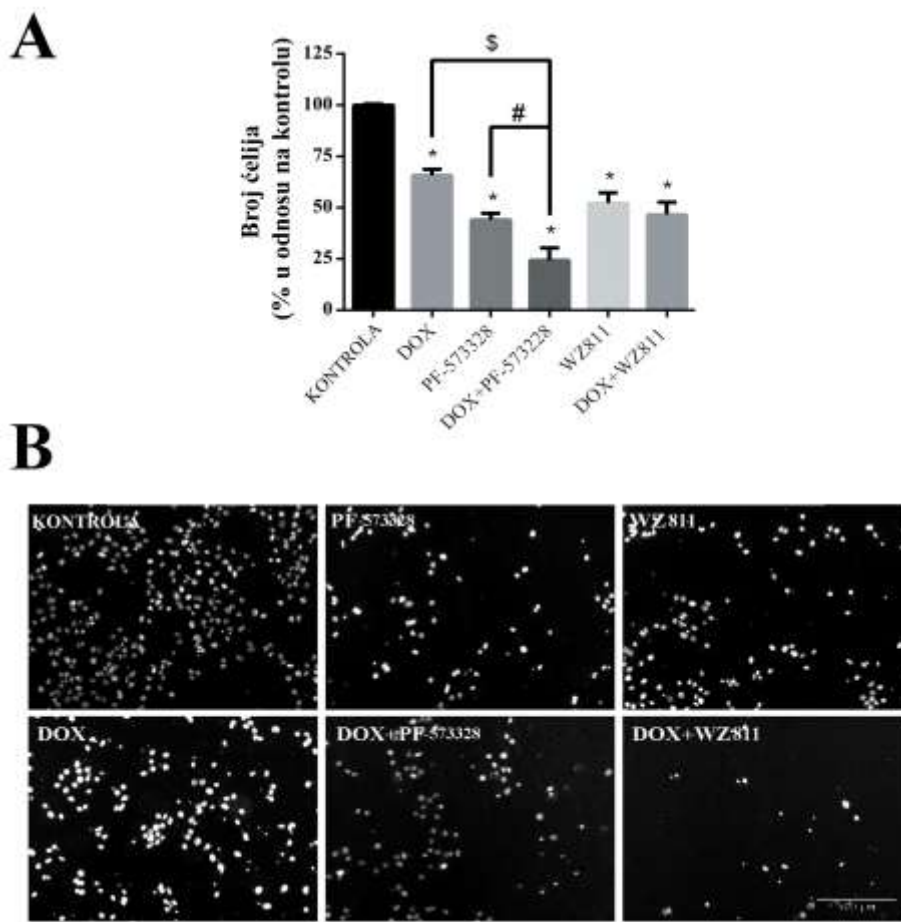
S obzirom da su se tretmani DOX-om u kombinaciji sa PF-573228 i WZ811 inhibitorima pokazali efikasnim u inhibiciji ćelijskog rasta rezistentnih NCI-H460/R i COR-L23 ćelija, u studiji su dalje ispitivani i efekti ovih kombinovanih tretmana na supresiju invazije kod pomenutih rezistentnih linija.

U testu degradacije želatina uočeno je da COR-L23 ćelije značajno manje degraduju želatin nakon tretmana sa PF-573228 inhibitorom (1,4 puta; $p=0,04$), kao i nakon kombinovanih tretmana sa DOX-om i PF-573228 (3 puta, $p<0,0001$), odnosno WZ811 (2 puta, $p<0,0001$). Takođe, ovi efekti kombinovanih tretmana na supresiju degradacije želatina COR-L23 ćelija su statistički značajno manji i u odnosu na pojedinačne tretmane (Slika 45.).

Testom invazivnosti pokazano je da svi tretmani dovode do smanjenja invazivnih sposobnosti COR-L23 ćelijske linije u odnosu na netretiranu kontrolu. Kombinovani tretman DOX-a sa PF-573228 inhibitorom najefikasnije suprimira invazivne sposobnosti COR-L23 ćelija i to za 76% ($p=0,005$) u odnosu na netretirane ćelije, za 40% ($p=0,01$) u odnosu na tretman samo sa DOX-om i za 20% ($p=0,02$) u odnosu na tretman samo sa PF-573228 inhibitorom (Slika 37). Pored toga, COR-L23 ćelije tretirane WZ811 inhibitorom imaju 48% manju sposobnost invazije ($p=0,008$) u odnosu na netretiranu kontrolu, dok kombinacija ovog inhibitora sa DOX-om ne doprinosi dodatnom suprimiranju invazivnih sposobnosti ovih ćelija (Slika 46.).

A**B**

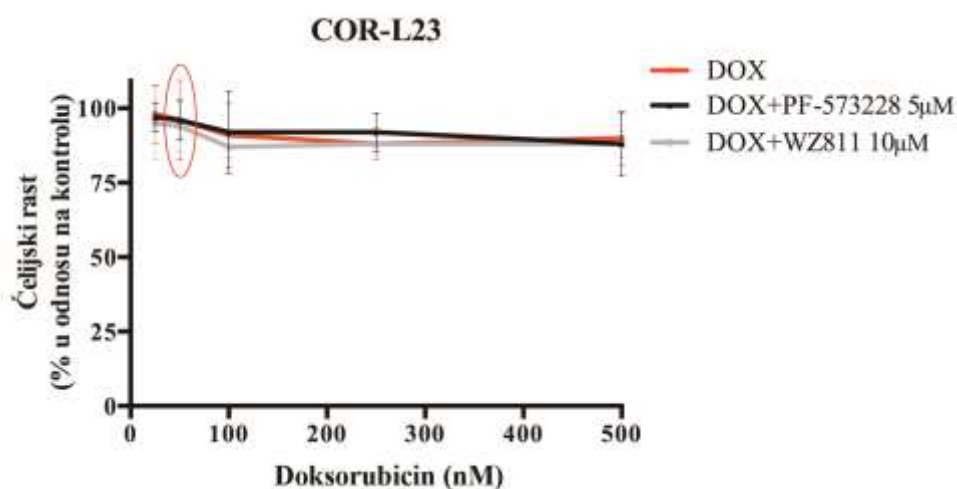
Slika 45. Efekti pojedinačnih i kombinovanih tretmana DOX-a, PF-573228 i WZ811 na sposobnost COR-L23 ćelija da degraduju želatin. Stepen degradacije želatina prikazan na histogramu izražen je kao odnos obima degradirane oblasti želatina u odnosu na obim ćelije (A). Prikazane su i reprezentativne slike ćelija zasejanih na želatinu (B). Crvena fluorescencija potiče od fluorescentnog obeležavanja ćelija sa ActinRedTM 555. Jedra su kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju, dok želatin fluorescira zelenom bojom. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti degradacije želatina u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije. Statistički značajne razlike degradacije želatina u odnosu na kontrolu su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$), u odnosu na tretman PF-573228 su predstavljene kao \$ ($p \leq 0,05$), u odnosu na WZ811 su predstavljene kao # ($p \leq 0,05$). Skala = 100 μm .



Slika 46. Efekti pojedinačnih i kombinovanih tretmana DOX-a, PF-573228 i WZ811 na invaziju NCI-H460/R i COR-L23 ćelija. Histogram pokazuje sposobnost ispitivanih ćelija da invadiraju i migriraju kroz poroznu membranu obloženu matrigelom (A). Prikazane su reprezentativne slike, na kojima se vide jedra ćelija koja su invadirale kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu (B). Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljene su kao relativne vrednosti u odnosu na netretirane COR-L23 ćelije. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su predstavljene kao * ($p \leq 0,05$), u odnosu na tretman PF-573228 su predstavljene kao \$ ($p \leq 0,05$), u odnosu na WZ811 su predstavljene kao # ($p \leq 0,05$). Skala = 500 μm .

4.21. CITOTOKSIČNI EFEKTI KOMBINOVANIH TRETMANA PF-573228 I WZ811 SA DOX-om NA REZISTENTNIM ĆELIJAMA NAKON 24 SATA

Da bismo isključili mogućnost da su dobijene razlike u testovima migracije i invazije posledica uticaja tretmana na vijabilnost ćelija, MTT testom smo ispitali efekat kombinovanog tretmana nakon 24 h na inhibiciju ćelijskog rasta rezistentnih ćelija. Rezultati su pokazali da tretmani korišćeni u testovima degradacije želatina i invazivnosti ne utiču značajno na inhibiciju ćelijskog rasta kod obe ćelijske linije nakon 24 h (Slika 47.).



Slika 47. Efekti istovremenih tretmana PF-573228 i WZ811 sa DOX-om na vijabilnost COR-L23 ćelija nakon 24 sata. Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana MTT testom nakon kombinovanih tretmana 5 µM PF-573228 i 10 µM WZ811 inhibitora sa rastućim koncentracijama DOX-a (25-500 nM) u trajanju od 24 sata. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenata i prikazane su srednje vrednosti i standardne greške. Koncentracije korišćene u testovima degradacije želatina i invazivnosti obeležene su crvenim krugom.

5. DISKUSIJA

Karcinom pluća je, sa 5-godišnjim preživljavanjem manjim od 18%, vodeći uzrok smrtnosti usled malignih oboljenja širom sveta (Torre i ostali, 2016b). Nažalost, postojećim dijagnostičkim pristupima rak pluća se najčešće detektuje u već uznapredovaloj fazi bolesti. Tačnije, oko 70% pacijenata, u vreme dijagnoze, je već u kasnom stadijumu bolesti kada pacijenti više nisu kandidati za hirurški tretman (Molina i ostali, 2008). Kod pacijenata kod kojih hirurška intervencija nije indikovana, hemioterapija je primarni pristup u lečenju. Međutim, hemioterapija je dostigla terapijski plato u lečenju karcinoma pluća. Iako su određene studije pokazale napredak u lečenju pacijenata hemioterapijom, ona ne poboljšava značajno preživljavanje kod većine pacijenata obolelih od ove bolesti (Pallis i ostali, 2009). Kao glavni razlozi neuspeha terapije klasičnim citostatcima, ističu se razvoj rezistencije i pojava metastaza. Osim toga, efikasnost hemioterapije je mala s obzirom da se izbor odgovarajuće terapije vrši na osnovu histopatoloških analiza koje ne uzimaju u obzir molekularni profil tumora i njihovu heterogenost. Shodno tome tretman karcinoma pluća treba da bude personalizovan prema kliničkoj slici pacijenta, stadijumu bolesti, histološkom tipu tumora ali najvažnije prema molekularnom profilu.

Tokom poslednje decenije, posebni naponi su usredsređeni na identifikaciju specifičnih molekularnih profila sa najboljim odgovorom na određenu ciljanu terapiju NSCLC-a, kojom bi se prevazišla dva najveća problema u lečenju ovog oboljenja, metastaze i rezistencija na klasične hemioterapeutike (Bryan A. Chan i Brett G.M. Hughes, 2015).

Ćelije raka sa većom sposobnošću metastaziranja često se karakterišu izmenjenom ekspresijom različitih markera koji su uključeni u adheziju, migraciju i invaziju, kao što su CXCR4, FAK i njihovi nishodni signalni molekuli (Ben-Baruch, 2009). Brojne kliničke studije povezale su povećanu ekspresiju CXCR4 receptora sa lošim kliničkim ishodom, invazijom u limfne čvorove i metastazama kod pacijenata obolelih od NSCLC-a (Chatterjee i ostali, 2014; Domanska i ostali, 2013; Su i ostali, 2005; Wald i ostali, 2013). Takođe, u *in vitro* i *in vivo* studijama je pokazano da aktivacija CXCR4 receptora reguliše dva veoma važna procesa koji su neophodni za

metastaziranje tumorskih ćelija. Prvo, molekularne promene koje se dešavaju nakon aktivacije CXCR4 receptora povećavaju sposobnost ćelija tumora da migriraju i invadiraju, i na taj način utiču na njihovu sposobnost da napuste primarno mesto tumora i krvotokom i limfotokom dospeju do udaljenih organa (Domanska i ostali, 2013). Pored toga, smatra se da sekrecija CXCL12 liganda od strane stromalnih ćelija udaljenih organa, privlači ćelije tumora sa eksprimiranim CXCR4 receptorom omogućavajući im ekstravaciju u tim organima i podstiče njihovo preživljavanje i formiranje metastatskih lezija (Otsuka i ostali, 2008). Pored CXCR4 receptora, FAK takođe ima važnu ulogu u procesima metastaziranja. Njegova ekspresija je povećana kod brojnih tumora, uključujući i NSCLC. Kod tumora pluća, amplifikacija gena *FAK* povezana je sa lošijim kliničkim ishodom (Carelli i ostali, 2006), dok je u *in vitro* uslovima pokazano da aktivacija FAK-a ima značajnu ulogu u regulaciji procesa koji su važni za invaziju, migraciju i proliferaciju ćelija NSCLC-a (Mukhopadhyay i ostali, 2005).

Poznato je da su ekspresija i aktivnost CXCR4 i FAK-a regulisani brojnim faktorima, uključujući p53 i PTEN (Ben-Baruch, 2009; Phillips i ostali, 2003). Ova dva proteina pripadaju grupi najčešće izmenjenih tumor supresora kod brojnih humanih maligniteta (Kasthuber i Lowe, 2017; Yin i Shen, 2008). Pojedinačno, oni deluju kao negativni regulatori ekspresije CXCR4 i FAK molekula. Konkretno, p53 tumor supresor inhibira transkripciju *CXCR4* i *FAK*-a, dok PTEN tumor supresor negativno reguliše aktivaciju FAK-a i ekspresiju CXCR4 receptora putem AKT signalizacije (Conley-LaComb i ostali, 2013; Golubovskaya i Cance, 2011; Mehta i ostali, 2007; Tamura i ostali, 1999). Međutim, efekti istovremene inaktivacije p53 i PTEN tumor supresora na CXCR4 i FAK ekspresiju i dalji uticaj na aktivnost njihovih nishodnih signalnih puteva nisu u dovoljnoj meri proučeni.

Uopšteno, dosadašnji rezultati o povezanosti promena u p53 i PTEN tumor supresorima, kao i o ulozi njihove istovremene inaktivacije u razvoju malignih tumora, su prilično oprečni.

Prva studija koja je povezala p53 i PTEN na molekularnom nivou, pokazala je direktno vezivanje p53 tumor supresora za *PTEN* promotorski region. Posledica ovog vezivanja je povećanje ekspresije PTEN-a, kako na nivou iRNK tako i na proteinskom nivou (Stambolic i ostali, 2001). Ubrzo nakon ovih rezultata pokazano je

da aktiviranje PI3K/AKT signalizacije usled mutacija u PTEN-u može dovesti do inaktivacije p53 tumor supresora prouzrokovane promenama u ekspresiji i aktivaciji Mdm2 proteina. (Chang i ostali, 2004; Freeman i ostali, 2003). S obzirom na prethodne rezultate, inaktivacija bilo kog od ova dva tumor supresora trebalo bi da rezultira nižim nivoom proteina drugog gena. Prema tome, gubitak *TP53* ili *PTEN*-a može imati slične posledice u ćeliji kao gubitak oba tumor supresora istovremeno. Upravo ova zapažanja su pomogla u tumačenju rezultata u brojnim studijama na uzorcima pacijenata koji pokazuju da se promene u *TP53* i *PTEN*-u međusobno isključuju (Danielsen i ostali, 2008; Freeman i ostali, 2003; Koul i ostali, 2002; Kurose i ostali, 2002).

Međutim, druge studije sugerišu da aktiviranje PI3K/AKT signalizacije, kao posledica promena u *PTEN*-u, može dovesti do aktivacije p53 tumor supresora. Konkretno, Chen i kolege su pokazali da specifična inaktivacija *PTEN*-a i aktivacija PI3K/AKT signalnog puta dovodi do aktiviranja p53 tumor supresora i indukcije *senescence*-a u *in vitro* i *in vivo* modelu tumora prostate (Chen i ostali, 2005). Ove studije sugerišu da gubitak i jednog i drugog tumor supresora pruža selektivnu prednost tumoru u njegovoj progresiji (Chen i ostali, 2005; Kim i ostali, 2007). Ova pretpostavka je potvrđena u *in vivo* modelu karcinoma dojke u kome su se p53/PTEN deficijentni tumori značajno brže formirali u odnosu na tumore sa pojedinačno mutiranim tumor supresorima (Liu i ostali, 2014). U saglasnosti sa ovim rezultatima, klinički podaci u radovima na hepatocelularnom karcinomu, karcinomu dojke i raku želuca pokazali su značajnu korelaciju između prisustva aberacija u genima *TP53* i *PTEN*-a, kao i povezanost istovremenog gubitka ovih tumor supresora sa lošom kliničkom prognozom i razvojem agresivnog fenotipa tumora (Hu i ostali, 2003; Liu i ostali, 2014; Oki i ostali, 2005). Slični rezultati pokazani su i na uzorcima pacijenata sa NSCLC-om. Istovremena inaktivacija p53 i PTEN tumor supresora uočena je kod čak 50% analiziranih uzoraka. Takođe, pokazano je da se ko-alteracije u genima *TP53* i *PTEN* javljaju sa značajno većom učestalošću kod pacijenata sa invazijom u limfnim čvorovima (Andjelkovic i ostali, 2011). Ovi podaci ukazuju na moguće zajedničko delovanje istovremeno inaktiviranih p53 i PTEN tumor supresora u promovisanju agresivnog, metastatskog, fenotipa kod NSCLC-a. Međutim, njihova kooperativna uloga u promovisanju metastatskog fenotipa NSCLC-a, kao i udruženi mehanizam njihovog delovanja u ovom procesu, do sada nisu proučavani. S obzirom da je

pokazano da oba tumor supresora regulišu CXCR4 i FAK, povećana ekspresija i aktivacija CXCR4 i FAK-a može da predstavlja jedan od mehanizama kojim bi istovremena inaktivacija tumor supresora promovisala metastatski fenotip NSCLC-a.

Shodno značaju p53 i PTEN molekula u promovisanju migracije i invazije, prvi zadatak ove studije je bio da se ispituju efekti istovremene inaktivacije p53 i PTEN supresora tumora na invazivne i migratorne karakteristike ćelija NSCLC-a, kao i na ekspresiju CXCR4 i FAK-a. U *in vitro* eksperimentima korišćene su humane ćelijske linije NSCLC-a sa različitim funkcionalnim statusima p53 i PTEN tumor supresora. NCI-H460 ćelijska linija korišćena je kao model ćelija sa funkcionalnim p53 i PTEN tumor supresorima kod koje su farmakološki inaktivirani p53 i/ili PTEN. Za inaktivaciju pomenutih tumor supresora korišćeni su inhibitori PFT- α i bpV(Opic), pojedinačno i u kombinaciji. Specifičnost i efikasnost inhibitora u primenjenim koncentracijama su opisani u prethodnim publikacijama (Pi i ostali, 2012; Zucco i Zunino, 2008). S druge strane, COR-L23 ćelijska linija je poslužila kao model ćelija sa urođeno neaktivna oba tumor supresora.

Kao što je i očekivano, na osnovu prethodno objavljenih rezultata na uzorcima pacijenata sa NSCLC-om (Andjelkovic i ostali, 2011), COR-L23 ćelije, kao i NCI-H460 ćelije sa istovremeno inhibiranim p53 i PTEN tumor supresorima, su pokazale najagresivniji fenotip. Ove ćelije su pokazale značajno veću sposobnost da migriraju, invadiraju i degradiraju želatin u poređenju sa ćelijama kod kojih su oba tumor supresora aktivna, kao i u poređenju sa ćelijama kod kojih su pomenuti tumor supresori pojedinačno inaktivirani. Međutim, rezultati pokazuju izrazito invazivniji fenotip COR-L23 ćelija u poređenju sa NCI-H460 ^{p53-/PTEN-} ćelijama, što se može bar delimično pripisati ograničenoj efikasnosti inhibicije p53 i PTEN tumor supresora u NCI-H460 ćelijama. Takođe, i druge urođene razlike između dve ćelijske linije mogu uticati na povećani invazivni kapacitet COR-L23 ćelija.

Slično ovim rezultatima, studija na ćelijskim linijama glioblastoma je pokazala da *TP53/PTEN* deficijentne ćelije imaju najveći invazivni potencijal (Djuzenova i ostali, 2015). Štaviše, pokazano je da neizmenjeni p53 i PTEN imaju kooperativne anti-invazivne efekte u glatkim srčanim mišićnim ćelijama i fibroblastima transformisanih Src onkogenom, inhibirajući Src/Stat3 signalni put i

njim posredovano formiranje podozoma (Mukhopadhyay i ostali, 2010; Poon i ostali, 2010).

Dalje analize su pokazale povećanu ekspresiju CXCR4 na nivou iRNA i na proteinskom nivou kod obe ćelijske linije sa neaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima, COR-L23 i NCI-H460^{p53-/PTEN-}. Međutim, ukoliko se uporedi ekspresija gena *CXCR4* kod NCI-H460^{p53-} i NCI-H460^{p53-/PTEN-} uočava se da su nivoi gotovo istovetni i značajno povećani u poređenju sa NCI-H460 ćelijama sa aktivnim tumor supresorima. Sa druge strane, rezultati ekspresije CXCR4 receptora na proteinskom nivou pokazuju povećanu ekspresiju samo kod NCI-H460 ćelija sa inhibirana oba tumor supresora. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je i pored značajnog povećanja u ekspresiji gena *CXCR4* nakon inhibicije p53 tumor supresora, u proučavanom model sistemu neophodna istovremena inhibicija p53 i PTEN tumor supresora da bi došlo do značajnog povećanja ekspresije CXCR4 receptora na proteinskom nivou. Ovo zapažanje je u skladu sa rezultatima koji pokazuju da je p53 tumor supresor negativni regulator ekspresije gena *CXCR4*, dok je PTEN tumor supresor odgovoran za regulaciju ekspresije CXCR4 receptora i na proteinskom nivou (Conley-LaComb i ostali, 2013; Mehta i ostali, 2007).

Za razliku od CXCR4 receptora, nivo ekspresije gena *FAK* je povećan samo kod COR-L23 ćelija, dok ostaje nepromenjen kod NCI-H460 ćelija nakon funkcionalne inhibicije p53 i/ili PTEN tumor supresora. Međutim, analizirajući količinu aktivne forme pomenute kinaze pokazano je da nivo FAK-a fosforilisanog na Tyr397 značajno povišen kod COR-L23 i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija. Slično ovim rezultatima, Djuzenova i kolege su pokazali da glioblastomske ćelijske linije sa mutacijama u genima *TP53* i *PTEN* tumor supresora pokazuju povećani nivo ekspresije ukupnog FAK-a, kao i povećanu aktivaciju ove kinaze fosforilacijom serinskog ostatka na poziciji 910, dok je fosforilacija tirozinskog ostatka na poziciji 397 nepromenjena (Djuzenova i ostali, 2015).

Pored ekspresije molekula CXCR4 i FAK-a, proučavan je i stepen aktivacije njihovih nishodnih signalnih molekula u ispitivanom model sistemu ćelija sa inaktivnim p53 i/ili PTEN-om. Vezivanje liganda, SDF-1, za receptor CXCR4 dovodi do aktivacije signalnih puteva koji promovišu invaziju i metastaziranje, među kojima su najvažniji PI3K/AKT i MAPK/ERK (Domanska i ostali, 2013). Pored toga,

CXCR4 povećava fosforilaciju i aktivira i FAK koji je jedan od ključnih molekula uključenih u regulaciju procesa ćelijske adhezije, kretanja i invazije (Bryan A. Chan i Brett G.M. Hughes, 2015; Lee i ostali, 2004). Kao i CXCR4 receptor, FAK reguliše pomenute procese najčešće aktivirajući PI3K/AKT i MAPK/ERK signalne puteve (Sulzmaier i ostali, 2014; Xia i ostali, 2004).

Aktivnost AKT signalnog puta povećana je nakon pojedinačne inhibicije p53 ili PTEN tumor supresora kod NCI-H460 ćelija. Međutim, funkcionalna inhibicija oba tumor supresora dovodi do dodatnog povećanje fosforilacije AKT, što je još izraženije kod COR-L23 ćelija. U prilog ovim rezultatima govori i studija na karcinomu dojke koja pokazuje da pojedinačne mutacije u *TP53* ili *PTEN* tumor supresoru dovode do blagog povećanja fosforilacije AKT-a, dok je ovaj signalni put prekomerno aktiviran u ćelijama kod kojih su oba tumor supresora istovremeno mutirana (Liu i ostali, 2014). Osim AKT puta, u modelu NSCLC ćelija s inaktivnim p53 i PTEN-om aktiviran je i ERK signalni put. Međutim, za razliku od AKT signalne kaskade, ERK je pojačano aktivan samo kod COR-L23 i NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija. Slično razlikama u invazivnim osobinama između dve ćelijske linije, promene u nivoima svih ispitivanih proteina bile su veće kod COR-L23 ćelija. Ovo se takođe može delimično pripisati nepotpunoj inhibiciji p53 i PTEN u NCI-H460 ćelijama, kao i drugim inherentnim razlikama između dve ćelijske linije.

Opisani rezultati navode na zaključak da je istovremena inaktivacija p53 i PTEN tumor supresora u ćelijama NSCLC-a odgovorna za aktivaciju CXCR4 i FAK signalnih puteva, preko kojih se bar delom povećava invazivni i migratorni potencijal p53/PTEN deficijentnih NSCLC ćelija.

Polazeći od prethodnog zaključka, sledeći zadatak studije bio je ciljano inhibiranje CXCR4 i FAK-a u svrhu smanjenja invazivnog potencijala NSCLC ćelija sa istovremeno inaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima. Korišćenjem odgovarajućih inhibitora, WZ811 ili PF-573228, koji specifično inhibiraju aktivnost CXCR4 receptora, odnosno FAK-a, uspešno su smanjene sposobnosti NCI-H460^{p53-/PTEN-} i COR-L23 ćelija da migriraju, invadiraju i degradiraju želatin. Osim toga, uočeno je da su i WZ811 i PF-573228 postigli svoje anti-invazivne efekte kod NCI-H460^{p53-/PTEN-} ćelija, barem delimično, smanjivanjem fosforilacije FAK-a i AKT-a, dok je kod COR-L23 ćelija samo FAK inhibitor je smanjio nivo pFAK-a i pAKT-a.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da migracija izazvana aktivacijom CXCR4 receptora može biti posredovana aktivacijom PI3K/AKT i / ili FAK signalnog puta (Otsuka i ostali, 2008), dok FAK može funkcionisati i uzvodno od PI3K/AKT-a (Xia i ostali, 2004).

Iako nakon aktivacije CXCR4 i FAK-a, migracija i invazija mogu biti posredovane i ERK signalnim putem, u opisanim eksperimentima fosforilacija ERK-a je ostala nepromenjena u obe ispitivane ćelijske linije nakon tretmana inhibitorima. Ovaj rezultat je u skladu s podatkom da CXCR4 posredovana aktivacija MAPK/ERK i PI3K/AKT signalnog puta zavisi od statusa PTEN-a. U slučajevima kada je PTEN neaktivan favorizuje se aktivnost PI3K/AKT signalnog puta nakon aktivacije CXCR4 receptora (Begley i ostali, 2015). S druge strane, pokazano je da inhibicija FAK-a kod NSCLC-a prvenstveno dovodi do smanjene aktivacije PI3K/AKT signalnog puta, a ne MAPK/ERK puta (Zhang i ostali, 2016).

Odsustvo bilo kakvih efekata na proučavane proteine nakon tretmana sa WZ811 inhibitorom kod COR-L23 ćelija, može ukazati na učešće drugih signalnih puteva koje treba dalje razjašnjavati. Pored pomenutih signalnih puteva, CXCR4 može aktivirati i JAK/STAT, PLC/MAPK i p38 signalni put ili voditi ka povećanju intracelularne koncentracije Ca^{2+} i na taj način uticati na migratorne i invazivne sposobnosti ćelije (Chatterjee i ostali, 2014; Teicher i Fricker, 2010).

Do sada opisani rezultati *in vitro* eksperimenata su pokazali da tumorske ćelije sa istovremeno inaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima imaju povećane migratorne i invazivne sposobnosti i da se tretmanima FAK i CXCR4 inhibitorima uspešno suprimira takav fenotip. Da bi se ispitali efekti inhibicije CXCR4 i FAK-a na supresiju metastatskog širenja p53/PTEN deficijernih tumora u *in vivo* uslovima, u daljim eksperimentima su uspostavljeni mišji modeli NSCLC-a.

Nekoliko *in vivo* studija na sarkomima i karcinomima dojke, bešike i prostate, pokazalo je da istovremena inaktivacija TP53 i PTEN tumor supresora uzrokuje izrazito agresivan fenotip tumora sa visokim metastatskim potencijalom, što dovodi do značajno smanjenog preživljavanja životinja (Guijarro i ostali, 2013; Liu i ostali, 2014; Martin i ostali, 2011; Puzio-Kuter i ostali, 2009). Konkretno, studija koju su sproveli Lui i kolege, pokazala je da kombinacija mutacija TP53 i PTEN tumor

supresora dovodi do bržeg formiranja tumora dojke u *in vivo* uslovima, agresivnijeg fenotipa tumora i do hiper-aktivacije PI3K/AKT signalnog puta (Liu i ostali, 2014).

Polazeći upravo od rezultata dobijenih na *in vivo* modelima drugih tipova tumora, u ovoj studiji su uspostavljeni mišji modeli subkutanih ksenografta COR-L23 ćelija (sa funkcionalno neaktivnim p53 i PTEN tumor supresorima i povećanom aktivnošću FAK, AKT i ERK signalnih puteva) i NCI-H460 ćelija (sa funkcionalnim p53 i PTEN tumor supresorima), kao i ortotopni metastatski mišji modeli ovih ćelija. Upoređujući ove dve ćelijske linije u ortotopnom metastatskom modelu NSCLC-a, primećen je trend kraćeg preživljavanja miševa sa COR-L23 tumorima u odnosu na životinje sa NCI-H460 tumorima. Pored toga, invazija tumora u pleuralnu šupljinu je bila prisutna u slučaju inokulacije svake od ćelijskih linija, ali za razliku od NCI-H460 tumora, COR-L23 tumori su formirali metastaze i u udaljenim organima u peritonealnoj duplji, jetri, crevima i pankreasu. S obzirom da NCI-H460 i COR-L23 ćelije nisu pokazale statistički značajno različit tumorigeni potencijal u modelima subkutanih ksenografta, kraći životni vek životinja sa COR-L23 tumorima može se pripisati upravo sposobnosti COR-L23 ćelija da formiraju metastaze u udaljenim organima.

Nekoliko specifičnih inhibitora, kao što su eEF2K i PARP/PI3K inhibitori, uspešno je korišćeno za inhibiciju rasta ksenografta p53-/PTEN- različitih tipova karcinoma (González-Billalabeitia i ostali, 2014; Liu i ostali, 2014). Međutim, naša studija je prva *in vivo* studija koja specifičnim inhibitorima cilja povećano eksprimirane CXCR4 i FAK proteine i to u ortotopnom modelu p53/PTEN deficijentnih tumora. Nakon tretmana WZ811 i PF-573228 inhibitorima uočen je trend produženog preživljavanja životinja sa ortotopno inokuliranim COR-L23 ćelijama. Ovi rezultati ukazuju da CXCR4 i FAK mogu biti korišćeni kao ciljni molekuli za terapiju agresivnih p53/PTEN deficijentnih tumora. Međutim, nedostatak statističke značajnosti u ovim eksperimentima ukazuje na potrebu da se identifikuju drugi CXCR4 i FAK inhibitori sa boljom bioraspoloživošću kao i da se testiraju efekti alternativnih metoda administracije inhibitora.

U prvom delu studije pokazano je da p53/PTEN deficijentne NSCLC ćelije imaju naročito invazivni fenotip koji utiče na preživljavanje, a koji je povezan sa aktivacijom CXCR4 i FAK signalnih puteva. Takođe, ukazano je i na potencijal

primene inhibicije CXCR4 i FAK u supresiji metastatskog širenja ovih agresivnih p53/PTEN deficijentnih tumora.

Međutim, pored pojava metastaza, i razvoj otpornosti na terapiju značajno utiče na krajnji ishod lečenja NSCLC-a. Trenutni pristup u primeni hemioterapije se zasniva na kombinaciji više lekova sa različitim mehanizmima delovanja. Ova strategija je u izvesnoj meri doprinela prevazilaženju rezistencije na lekove i smanjenju negativnih neželjenih efekata kroz smanjenje doza pojedinačnih lekova i njihovo uzajamno sinergističko dejstvo (Chang, 2011).

Povećana ekspresija *ABC* transportera predstavlja jedan od glavnih mehanizama koji dovode do promena intracelularne koncentracije lekova i pojave rezistencije na spektar hemioterapeutika (Bähr i ostali, 2001; Scherbakova i ostali, 2008). Osim toga, promene u ćelijama tumora koje narušavaju normalnu regulaciju apoptoze, *senescence*-a i ćelijskog ciklusa mogu takođe doprineti razvoju rezistencije. Nedavno je pokazano da i CXCR4 i FAK imaju važnu ulogu u regulaciji procesa koji doprinose razvoju rezistencije na hemioterapiju kod brojnih tumora, uključujući i NSCLC (Howe i ostali, 2016b; Kang i ostali, 2013; van Nimwegen i ostali, 2006; Xie i ostali, 2017). Xie i kolege su pokazale da povećana ekspresija CXCR4 receptora ima važnu ulogu u rezistenciji na cisplatin kod NSCLC-a, kao i da je smanjena ekspresija CXCR4 receptora, postignuta transfekcijom rezistentnih NSCLC ćelija antisens CXCR4 nukleotidnim fragmentom, dovela do indukcije apoptoze, smanjenog proliferativnog potencijala i senzitivizacije rezistentnih NSCLC ćelija na cisplatin (Xie i ostali, 2017). Takođe, i FAK ima važnu ulogu u razvoju rezistencije na hemioterapeutike kod NSCLC-a. Pokazano je da je aktivacija FAK-a povezana sa rezistencijom na dasatinib kod NSCLC-a, kao i da bi inhibicija FAK signalnog puta u kombinaciji sa dasatinibom mogla da bude potencijalno dobra terapijska strategija u prevazilaženju rezistencije na pomenuti hemioterapeutik kod ovog tipa karcinoma pluća (Lu i ostali, 2013).

Shodno literaturnim podacima, u ovoj studiji je ispitivana povezanost ekspresije gena *CXCR4* i *FAK* sa ekspresijom gena *ABCBI* i *ABCC1* u tumorskim uzorcima pacijenata obolelih od NSCLC-a. Učestalost povećane ekspresije svakog od ispitivanih gena je u skladu sa već objavljenim podacima u literaturi (Berger i ostali, 2005; Ji i ostali, 2013; Nooter i ostali, 1996; Ota i ostali, 1995; Su i ostali, 2005).

Dalje analize su pokazale postojanje asocijacija između ispitivanih gena, koje do sada nisu opisane u literaturi. Konkretno, povećana ekspresija gena *FAK* je značajno povezana sa povećanom ekspresijom gena *ABCB1* i *ABCC1*, dok je povećana ekspresija gena *CXCR4* značajno povezana samo sa povećanom ekspresijom gena *ABCB1*. Mehanizmi kojima bi se mogla objasniti veza između povećane ekspresije gena koji regulišu metastatske procese (*CXCR4* i *FAK*) i gena odgovornih za razvoj otpornosti na hemioterapeutike (*ABCB1* i *ABCC1*) nisu poznati. Ipak, s obzirom da je povezanost uočena na nivou iRNK, može se pretpostaviti da je barem delimično ostvarena kroz zajedničku regulaciju transkripcije ovih gena (Owen i ostali, 2004). Na osnovu uočene veze između ekspresije *CXCR4*, *FAK* i ABC pumpi pretpostavljeno je da bi *CXCR4* i *FAK* mogli da imaju ulogu i u razvoju rezistencije kod NSCLC ćelija.

Da bi se testirala ova hipoteza, prvo je ispitano da li COR-L23 ćelijska linija, pokazuje povećanu ekspresiju gena ABC transportera i da li je otpornija na tretman hemioterapeuticima u odnosu na NCI-H460 ćelijsku liniju. Pored ove dve pomenute ćelijske linije, u cilju testiranja ove hipoteze korišćena je i NCI-H460/R ćelijska linija. Ova ćelijska linija, koja je izvedena iz NCI-H460 ćelija nakon kontinuiranog izlaganja DOX-om, pokazuje klasičan stečeni MDR fenotip sa unakrsnom rezistencijom na različite hemioterapeutike (PTX, Cpt i DOX), što je posledica povećane ekspresije gena *ABCB1* (Pesic i ostali, 2006). Ispitujući nivo ekspresije gena povezanih sa rezistencijom kod COR-L23 ćelija, utvrđeno je da ova ćelijska linija ima 4,5 puta veću ekspresiju gena *ABCC1* u odnosu na NCI-H460 ćelije. Ispitujući odgovor na tretman hemioterapeuticima, utvrđeno je da COR-L23 ćelije, za razliku od NCI-H460/R koja je rezistentna na spektar klasičnih hemioterapeutika, pokazuju rezistenciju samo prema DOX-u. Smanjena osetljivost COR-L23 ćelija na DOX se može smatrati urođenim tipom rezistencije, s obzirom da ćelije prethodno nikada nisu bile izlagane ovom hemioterapeutiku (<http://www.phe-culturecollections.org.uk/>).

Kao što je već pomenuto, COR-L23 ćelije imaju povećanu ekspresiju *CXCR4* i *FAK* molekula u odnosu na NCI-H460 ćelije, dok je ekspresija ova dva molekula kod NCI-H460/R ćelija nepromenjena. Međutim, jednokratni tretman DOX-om doveo je do povećanja ekspresije *CXCR4* receptora i na nivou iRNK i na proteinskom nivou kod obe ćelijske linije rezistentne na DOX, NCI-H460/R i COR-L23. Ovaj podatak

navodi na zaključak da CXCR4 ima važnu ulogu u odgovoru na tretman DOX-om kod NSCLC ćelija sa povećanom ekspresijom ABC transportera. Upravo povećana ekspresija CXCR4 receptora i aktivacija njegovih nishodnih signalnih puteva bi mogli predstavljati dodatni mehanizam rezistencije na DOX kod COR-L23 i NCI-H460/R ćelija, pored njegovog efluksa ABC transporterima. Ranije su Dessein i kolege pokazali da se rezistentne ćelije tumora debelog creva dobijene selekcijom DOX-om, karakterišu upravo povećanom ekspresijom CXCR4 receptora (Dessein i ostali, 2010).

Uočena veza između CXCR4 i DOX-a navodi na pretpostavku da bi senzitivnost na ovaj klasični citostatik kod NSCLC ćelijskih linija mogla biti obnovljena blokiranjem CXCR4 receptora i njegovih nishodnih signalnih molekula, kao što je FAK. U cilju testiranja ove pretpostavke, ispitivano je zajedničko dejstvo specifičnih inhibitora CXCR4, odnosno FAK-a, i DOX-a. Uočeno je da kombinovani tretmani imaju izražene sinergističke efekte na inhibiciju rasta NCI-H460/R i COR-L23 ćelija. Drugim rečima, CXCR4 i FAK inhibitori su uspešno senzitivizovali obe rezistentne ćelijske linije na DOX, tj. smanjili koncentracije DOX-a neophodne da bi se postigao željeni citotoksični efekat.

Analizom nivoa ekspresije nishodnih signalnih molekula CXCR4 i FAK-a utvrđeno je da inhibitor PF-573228 efikasno smanjuje količinu fosforilane forme (Tyr397) FAK proteina, kod obe ćelijske linije rezistentne na DOX. Takođe, tretman ovim inhibitorom je doveo i do smanjenja nivoa aktivne forme AKT proteina, kao jednog od nishodnih signalnih molekula FAK protina. Za razliku od efekta inhibitora PF-573228, CXCR4 inhibitor WZ811 je ostvario efekat samo u kombinaciji sa DOX-om kod obe rezistente ćelijske linije, i to smanjenjem fosforilacije AKT kod NCI-H460/R ćelijske linije i smanjenjem aktivacije FAK kod COR-L23 ćelija. Razlog zbog čega je tretman WZ811 inhibitor ostvario značajan efekat kod rezistentnih ćelija tek u kombinaciji sa DOX-om je najverovatnije povećanje ekspresije CXCR4 proteina, tj. targeta inhibitora, tek u odgovoru na tretman DOX-om.

Slično dobijenim rezultatima na NSCLC-u, Mei i kolege su inhibicijom CXCR4 receptora uspešno senzitivizovali ćelije melanoma na tretman DOX-om. Tačnije, tretman inhibitorom CXCR4 receptora, Peptid S-om, narušena je veza ćelija melanoma sa stromalnim ćelijama i inhibirana je aktivacija PI3K/AKT signalnog puta

izazvana tretmanom DOX-om (Mei i ostali, 2014). Takođe, nekoliko studija je efikasno iskoristilo različite strategije za inhibiranje aktivnosti FAK-a u senzitivizaciji ćelija tumora na DOX. Golubovskaya i kolege su uspešno senzitivizovali HeLa ćelije na DOX uspostavljanjem stabilne ekspresije microRNA, MiR-138, koja dovodi do smanjene ekspresije FAK-a. Pored toga, kombinovani tretman inhibitora FAK-a, C4, sa DOX-om je takođe uspešno iskorišćen za senzitivizaciju ćelija karcinoma dojke na pomenuti hemioterapeutik (Golubovskaya i ostali, 2014; Kurenova i ostali, 2009).

Kao što je već rečeno, kao najčešći mehanizam razvoja rezistencije malignih ćelija na tretmane hemioterapeuticima u literaturi se opisuje povećanje ekspresije gena *ABC* transportera, koje dovodi do intenzivnijeg izbacivanja hemioterapeutika iz ćelije i smanjenja njihove intracelularne koncentracije (Khamisipour i ostali, 2016). Kombinovanjem specifičnih inhibitora *ABC* transportera sa klasičnim hemioterapeuticima moguće je uticati na povećanje intracelularne koncentracije lekova i samim tim na njihovu efikasnost (Khamisipour i ostali, 2016; Sun i ostali, 2012). Mereći stepen akumulacije DOX-a u ćelijama, analizirali smo da li PF-573228 i WZ811 inhibitori deluju i kao inhibitori *ABC* pumpi i na taj način senzitivizuju NCI-H460/R i COR-L23 ćelije na DOX. Međutim, naši rezultati su pokazali da kombinovani tretmani DOX-a sa inhibitorima CXCR4 ili FAK ne dovode do promena u njegovoj akumulaciji kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelija.

Na razvoj rezistencije tumora na citostatke, osim njihovog povećanog efluksa preko *ABC* transportera, mogu uticati i promene u regulaciji proliferacije, ćelijskog ciklusa, apoptoze i ćelijskog mirovanja (Park i ostali, 2012; Wang i ostali, 2004; Yang i ostali, 2012). Dosadašnji rezultati koji povezuju inhibiciju CXCR4 receptora i FAK-a sa senzitivizacijom malignih ćelija na DOX, sugerišu mehanizam delovanja putem indukcije apoptoze (Azab i ostali, 2009; Mei i ostali, 2014; van Nimwegen i ostali, 2006). Konkretno, pokazano je da inhibitor CXCR4 receptora povećava senzitivnost ćelija multiplog mijeloma na DOX usled narušavanja veze ćelija multiplog mijeloma sa stromalnim ćelijama kosne srži i promovisanja apoptoze (Azab i ostali, 2009). S druge strane, Van Nimwegen i kolege su pokazali da FAK ima značajnu ulogu u zaštiti tumorskih ćelija od apoptoze izazvane DOX-om, kao i da inhibicija ove tirozin kinaze ima za posledicu aktiviranje apoptotskih puteva nezavisnih od kaspaza (van Nimwegen i ostali, 2006).

Analizirajući promene na nivou apoptoze i ćelijskog ciklusa nakon tretmana DOX-om kod NCI-H460/R i COR-L23 ćelija, uočeno je značajno povećanje broja ćelija u apoptozi, kao i u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Međutim, dodatne značajne promene na nivou apoptoze nisu uočene nakon kombinovanog tretmana DOX-a sa inhibitorima CXCR4 ili FAK-a. Iako nisu uočene promene na nivou ćelijske smrti, kombinovani tretmani su doveli do povećanja broja ćelija u S fazi kod NCI-H460/R i G2/M fazi ćelijskog ciklusa kod COR-L23 ćelija.

Kao što je već pomenuto, na razvoj rezistencije na terapiju može uticati i sposobnost malignih ćelija da izbegnu aktivaciju *senescence*-a. Različite vrste hemioterapeutskih agenasa, kao i jonizujuće zračenje, izazivaju promene u ćelijama koje dovode do aktivacije β -galaktozidaze i indukcije *senescence*-a, što je pokazano i na ćelijskim linijama izvedenim iz različitih humanih malignih tumora (Shay i Roninson, 2004). Ovakav efekat je najizraženiji nakon tretmana terapeutcima koji utiču na strukturu molekula DNK, kao što su DOX, cisplatin, citarabin i etopozid. Međutim, ćelije tumora uspešno razvijaju mehanizme kojima zaobilaze aktivaciju *senescence*-a. Jedan od takvih mehanizama je i aktivacija FAK-a koja preko Ras i PI3K/AKT signalnog puta inhibira aktivaciju *senescence*-a u malignim ćelijama (Pylayeva i ostali, 2009).

Naši rezultati su pokazali da kombinovani tretman DOX-a sa inhibitorima CXCR4 receptora i FAK-a, uspevaju da senzitivizuju rezistentne ćelije na DOX dovodeći do značajnog povećanja broja ćelija u *senescence*-u. Osim toga, i sama inhibicija FAK-a dovodi do aktivacije *senescence*-a kod COR-L23 ćelija, najverovatnije kao posledica povećane ekspresije i aktivacije ove tirozin kinaze kod pomenutih ćelija.

Iako, formiranje metastaza i razvoj rezistencije na citostatike predstavljaju najveće probleme u terapiji malignih oboljenja, njihova međusobna povezanost i uzajamni doprinos progresiji bolesti do sada nisu dovoljno istraživani i tek od nedavno su u fokusu istraživanja. Pokazano je da promene u mikrosredini tumora uzrokovane terapijom mogu promovisati razvoj rezistentnih ćelija kod kojih se, kao sekundarni efekat, javlja povećani invazivni i metastatski potencijal. Takođe, genotoksični i citotoksični stres izazvan standardnom terapijom indukuje stabilne i prolazne promene u signalnim putevima koje utiču na preživljavanje i invaziju ćelija.

U nekoliko studija je pokazano da citostatički lekovi aktiviraju epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), uključujući i povećanu ekspresiju markera EMT-a koji dovode do hemorezistencije i invazije (Alexander i Friedl, 2012). Molekuli koji imaju važnu ulogu u regulaciji oba procesa i njihova ciljana inhibicija postaju fokus istraživanja kako bi se ova dva najvažnija problema u terapiji raka istovremeno uspešno prevazišla. Signalni putevi za koje je pokazano da su uključeni u invaziju i rezistenciju tumorskih ćelija, uključuju PI3K, MAPK, Src familiju kinaza i integrinske signalne puteve (Alexander i Friedl, 2012).

Prethodni rezultati studije su pokazali da inhibicija CXCR4 i FAK signalnih puteva uspešno suprimira migraciju i invaziju agresivnih p53/PTEN deficitarnih NSCLC ćelija. Takođe, pokazana je i uloga aktivacije ova dva signalna puta u rezistenciji NSCLC ćelija na DOX, kao i mogućnost uspešnog prevazilaženje ove rezistencije ciljanim inhibiranjem CXCR4 i FAK proteina. Shodno tome, sledeći zadatak studije bio je da se ispita da li kombinovana terapija DOX sa CXCR4 i FAK inhibitorima, osim reverzije rezistencije na DOX, može istovremeno ostvariti i anti-invazivne i anti-migratorne efekte na rezistentnim NSCLC ćelijama.

Pokazano je da DOX može značajno pojačati anti-invazivne i anti-migratorne efekte inhibitora CXCR4 i FAK-a kod COR-L23 ćelija. Tačnije, u testu invazije DOX povećava efikasnost PF-573228 tretmana u odnosu na efekte samog inhibitora. S druge strane, kombinacije PF-573228, odnosno WZ811, inhibitora sa DOX-om su značajno efikasnije u smanjivanju kapaciteta COR-L23 ćelija da degraduju želatin u poređenju sa pojedinačnim tretmanima. Slično ovome, Dessein i kolege su pokazali da se pored reverzije rezistencije na DOX, kombinovana terapija može koristiti i u svrhu suprimiranja invazivnog fenotipa ćelija raka debelog creva kod kojih je povećana ekspresija CXCR4 receptora usled tretmana DOX-om (Dessein i ostali, 2010).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata i njihovog razmatranja u odnosu na postojeće literaturne podatke, mogu se izvesti sledeći zaključci ove doktorske disertacije:

I - CXCR4 i FAK molekuli doprinose invazivnosti p53/PTEN deficijntnih ćelija NSCLC-a:

1. Istovremena inhibicija p53 i PTEN tumor supresora u ćelijama NSCLC-a dovodi do izraženog povećanja njihovog invazivnog i migratornog potencijala.
2. U mišjem ortotopnom metastatskom modelu NSCLC-a, inokulacija p53/ PTEN deficijntnih ćelija dovodi do nastanka agresivnih tumora koji formiraju metastaze u udaljenim organima i utiču na kraće preživljavanje životinja.
3. Povećane migratorne i invazivne sposobnosti p53/PTEN deficijntnih NSCLC ćelija su bar delimično posledica promena ekspresije CXCR4 receptora i fosforilacije FAK, AKT i ERK proteina.

II - Inhibicija CXCR4 i FAK molekula suprimira invazivnost p53/PTEN deficijntnih ćelija i tumora NSCLC-a:

1. Ciljana inaktivacija CXCR4 i FAK molekula njihovim specifičnim inhibitorima, WZ811 i PF-573228, efikasno smanjuje invazivne i migratorne sposobnosti p53/PTEN deficijntnih NSCLC ćelija, što je praćeno smanjenjem fosforilacije FAK i AKT proteina.
2. Tretmani WZ811 i PF-573228 inhibitorima utiču na produžavanje životnog veka životinja sa inokuliranim p53/PTEN deficijntnim ćelijama.

III - CXCR4 i FAK molekuli doprinose rezistenciji na klasične hemioterapeutike kod NSCLC-a sa povećanim nivoom ABC transportera:

1. Povećana ekspresija gena *CXCR4* i *FAK* je povezana sa povećanom ekspresijom gena za ABC pumpe, *ABCB1* i *ABCC1*, kod tumorskih uzoraka pacijenata obolelih od NSCLC-a, kao mogući prateći mehanizam rezistencije kod ovog tipa tumora.
2. Jednokratni tretman DOX-om dovodi do povećanja ekspresije CXCR4 receptora kod rezistentnih ćelijskih linija sa povećanom ekspresijom ABCB1, odnosno ABCC1 pumpe, kao dodatni mehanizam rezistencije na DOX.

IV - Inhibicija CXCR4 i FAK molekula dovodi do reverzije rezistencije na DOX kod NSCLC ćelija sa povećanim nivoom ABC transportera:

1. Tretmani CXCR4 i FAK inhibitorima u kombinaciji sa DOX-om uspešno senzitivizuju rezistentne ćelijske linije na DOX.
2. Kombinovani tretmani DOX-a sa inhibitorima CXCR4 i FAK-a dovode do značajnog povećanja broja rezistentnih ćelija u *senescence*-u.
3. Kombinovani tretmani CXCR4 i FAK inhibitora i DOX-a svoje efekte ostvaruju smanjivanjem fosforilacije FAK i/ili AKT molekula kod rezistentnih ćelijskih linija NSCLC-a.

V - Kombinovani tretman inhibitora CXCR4 i FAK sa DOX-om dovodi do supresije invazije kod NSCLC ćelija:

1. DOX značajno pojačava anti-invazivne i anti-migratorne efekte inhibitora CXCR4 i FAK-a kod rezistentnih ćelija NSCLC-a.

Opšti zaključak:

CXCR4 i FAK imaju veoma važne uloge u migratornim i invazivnim sposobnostima p53/PTEN deficijentnih ćelija NSCLC-a, kao i u razvoju rezistencije kod NSCLC-a sa povećanim nivoom ABC transportera. Farmakološkom ciljanom inhibicijom CXCR4 i FAK molekula, *in vitro* i *in vivo*, se efikasno suprimira invazivni fenotip p53/PTEN deficijentnih ćelija NSCLC-a. Takođe, ovim pristupom se i uspešno senzitivizuju rezistentne ćelije NSCLC-a, sa prekomerno eksprimiranim ABC pumpama, na doksorubicin uz istovremeno suprimiranje njihovih migratornih i invazivnih sposobnosti.

Imajući u vidu da su pojava rezistencije na terapiju i metastaziranje tumora dva najveća problema u lečenju karcinoma pluća, zaključci ove doktorske disertacije ukazuju na potencijal i značaj ciljane inhibicije CXCR4 i FAK molekula, samostalno ili u kombinaciji sa standardnom hemioterapijom, kao dobrog terapijskog pristupa u lečenju NSCLC-a.

7. LITERATURA

Abe, Y., Ohnishi, Y., Yoshimura, M., Ota, E., Ozeki, Y., Oshika, Y., Tokunaga, T., Yamazaki, H., Ueyema, Y., Ogata, T., i ostali (1996). P-glycoprotein-mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo. *Br. J. Cancer* 74, 1929–1934.

Alexander, S., i Friedl, P. (2012). Cancer invasion and resistance : interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol. Med.* 18, 13–26.

Alizadeh, A.M., Shiri, S., i Farsinejad, S. (2014). Metastasis review : from bench to bedside. *Tumor Biol.* 35, 8483–8523.

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., i Gottesman, M.M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361–398.

Andjelkovic, T., Bankovic, J., Stojsic, J., Milinkovic, V., Podolski-Renic, A., Ruzdijic, S., i Tanic, N. (2011). Coalterations of p53 and PTEN tumor suppressor genes in non-small cell lung carcinoma patients. *Transl. Res.* 157, 19–28.

Azab, A.K., Runnels, J.M., Pitsillides, C., Moreau, A.-S., Azab, F., Leleu, X., Jia, X., Wright, R., Ospina, B., Carlson, A.L., i ostali (2009). CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* 113, 4341–4351.

Baguley, B.C. (2010). Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer. *Mol. Biotechnol.* 46, 308–316.

Bähr, O., Wick, W., i Weller, M. (2001). Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53. *J. Clin. Invest.* 107, 643–646.

Barbuti, A.M., i Chen, Z.S. (2015). Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: Exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers (Basel).* 7, 2360–2371.

Beasley, M.B., Brambilla, E., i Travis, W.D. (2005). The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin. Roentgenol.* 40, 90–97.

Begley, L.A., Kasina, S., Shah, R.B., i Macoska, J.A. (2015). Signaling mechanisms coupled to CXCL12/CXCR4-mediated cellular proliferation are PTEN-dependent. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 3, 91–99.

Ben-Baruch, A. (2009). Site-specific metastasis formation: chemokines as regulators of tumor cell adhesion, motility and invasion. *Cell Adh. Migr.* 3, 328–333.

Bendall, L.J., Baraz, R., Juarez, J., Shen, W., i Bradstock, K.F. (2005). Defective p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Impairs Chemotactic but not Proliferative Responses to Stromal-Derived Factor-1 α in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*

Res. 65, 3290–3298.

Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E., Elbling, L., Cantonati, H., Attems, J., Gsur, A., i Micksche, M. (2005). Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131, 355–363.

Berridge, M. V., Herst, P.M., i Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology annual review*, str. 127–152.

Bösch, S., Siavoshian, S., Jacquot, C., Tomasoni, C., Dabouis, G., Elanbaloussi, Y., Leneel, T., More, M.T., i Roussakis, C. Correlation between multidrug resistance and the degree of differentiation of non-small-cell bronchopulmonary carcinoma (NSCLC) in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 17, 4595–4598.

Brami-Cherrier, K., Gervasi, N., Arsenieva, D., Walkiewicz, K., Boutterin, M.C., Ortega, A., Leonard, P.G., Seantier, B., Gasmi, L., Bouceba, T., i ostali (2014). FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J.* 33, 356–370.

Bryan A. Chan, i Brett G.M. Hughes (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res* 4, 36–54.

Calalb, M.B., Polte, T.R., i Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 15, 954–963.

Carelli, S., Zadra, G., Vaira, V., Falleni, M., Bottiglieri, L., Nosotti, M., Di Giulio, A.M., Gorio, A., i Bosari, S. (2006). Up-regulation of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 53, 263–271.

Chadderton, T., Wilson, C., Bewick, M., i Glück, S. (1997). Evaluation of three rapid RNA extraction reagents: relevance for use in RT-PCR's and measurement of low level gene expression in clinical samples. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 43, 1227–1234.

Chai, S., To, K.K., i Lin, G. (2010). Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chin. Med.* 5, 26.

Chambers, A.F., Groom, A.C., i MacDonald, I.C. (2002). Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.

Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 71, 3–10.

Chang, C.-J., Freeman, D.J., i Wu, H. (2004). PTEN Regulates Mdm2 Expression through the P1 Promoter. *J. Biol. Chem.* 279, 29841–29848.

Chatterjee, S., Behnam Azad, B., i Nimmagadda, S. (2014). The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv. Cancer Res.* 124, 31–82.

- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., i ostali (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* *436*, 725–730.
- Chen, Z., Fillmore, C.M., Hammerman, P.S., Kim, C.F., i Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 535–546.
- Chiou, J.F., Liang, J.A., Hsu, W.H., Wang, J.J., Ho, S.T., i Kao, A. (2003). Comparing the relationship of Taxol-based chemotherapy response with P-glycoprotein and lung resistance-related protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung* *181*, 267–273.
- Chittasupho, C., Lirdprapamongkol, K., Kewsuwan, P., i Sarisuta, N. (2014). Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *88*, 529–538.
- Choi, W.-T., Duggineni, S., Xu, Y., Huang, Z., i An, J. (2012). Drug discovery research targeting the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). *J. Med. Chem.* *55*, 977–994.
- Chou, T.C., i Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* *22*, 27–55.
- Conley-LaComb, M.K., Saliganan, A., Kandagatla, P., Chen, Y.Q., Cher, M.L., i Chinni, S.R. (2013). PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling. *Mol. Cancer* *12*, 85.
- Cooper, L.A., Shen, T.-L., i Guan, J.-L. (2003). Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8030–8041.
- Coussens, L.M., i Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860–867.
- d’Amato, T.A., Landreneau, R.J., McKenna, R.J., Santos, R.S., i Parker, R.J. (2006). Prevalence of In Vitro Extreme Chemotherapy Resistance in Resected Nonsmall-Cell Lung Cancer. *Ann. Thorac. Surg.* *81*, 440–447.
- Dai, X., Mao, Z., Huang, J., Xie, S., i Zhang, H. (2013). The CXCL12/CXCR4 autocrine loop increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro. *Oncol. Lett.* *5*, 277–282.
- Danielsen, S.A., Lind, G.E., Bjørnslett, M., Meling, G.I., Rognum, T.O., Heim, S., i Lothe, R.A. (2008). Novel mutations of the suppressor gene PTEN in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability- and TP53 mutation- status. *Hum. Mutat.* *29*, 252–262.
- Dessein, A.-F., Stechly, L., Jonckheere, N., Dumont, P., Monté, D., Leteurtre, E., Truant, S., Pruvot, F.-R., Figeac, M., Hebbar, M., i ostali (2010). Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant

human colon cancer cells. *Cancer Res.* *70*, 4644–4654.

Djuzenova, C.S., Fiedler, V., Memmel, S., Katzer, A., Hartmann, S., Krohne, G., Zimmermann, H., Scholz, C.-J., Polat, B., Flentje, M., i ostali (2015). Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status. *Exp. Cell Res.* *330*, 346–357.

Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., Nagengast, W.B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., De Vries, E.G.E., i Walenkamp, A.M.E. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *Eur. J. Cancer* *49*, 219–230.

Dunn, K.B., Heffler, M., i Golubovskaya, V.M. (2010). Evolving therapies and FAK inhibitors for the treatment of cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* *10*, 722–734.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., i Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* *272*, 872–877.

Ferrell, J.E., Martin, G.S., i Martin, G.S. (1989). Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 2234–2238.

Fidler, I.J. (2003). Timeline: The pathogenesis of cancer metastasis: the „seed and soil“ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 453–458.

Frame, M.C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D., i Eck, M.J. (2010). The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 802–814.

Francica, P., Aebersold, D.M., i Medová, M. (2016). Senescence as biologic endpoint following pharmacological targeting of receptor tyrosine kinases in cancer. *Biochem. Pharmacol.* *126*, 1–12.

Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.-H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., i ostali (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* *3*, 117–130.

Golden, A., Brugge, J.S., i Shattil, S.J. (1990). Role of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet proteins. *J. Cell Biol.* *111*, 3117–3127.

Golubovskaya, V.M. (2010). Focal adhesion kinase as a cancer therapy target. *Anticancer. Agents Med. Chem.* *10*, 735–741.

Golubovskaya, V.M. (2014). Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. *Front Biosci (Landmark Ed)* *100*, 130–134.

Golubovskaya, V.M., i Cance, W. (2010). Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* *15*, 901–912.

- Golubovskaya, V.M., i Cance, W.G. (2011). FAK and p53 protein interactions. *Anticancer. Agents Med. Chem.* *11*, 617–619.
- Golubovskaya, V.M., Finch, R., Kweh, F., Massoll, N.A., Campbell-Thompson, M., Wallace, M.R., i Cance, W.G. (2008). p53 regulates FAK expression in human tumor cells. *Mol. Carcinog.* *47*, 373–382.
- Golubovskaya, V.M., Zheng, M., Zhang, L., Li, J.-L., i Cance, W.G. (2009). The direct effect of Focal Adhesion Kinase (FAK), dominant-negative FAK, FAK-CD and FAK siRNA on gene expression and human MCF-7 breast cancer cell tumorigenesis. *BMC Cancer* *9*, 280.
- Golubovskaya, V.M., Sumbler, B., Ho, B., Yemma, M., i Cance, W.G. (2014). MiR-138 and MiR-135 directly target focal adhesion kinase, inhibit cell invasion, and increase sensitivity to chemotherapy in cancer cells. *Anticancer. Agents Med. Chem.* *14*, 18–28.
- González-Billalabeitia, E., Seitzer, N., Song, S.J., Song, M.S., Patnaik, A., Liu, X.-S., Epping, M.T., Papa, A., Hobbs, R.M., Chen, M., i ostali (2014). Vulnerabilities of PTEN-TP53-deficient prostate cancers to compound PARP-PI3K inhibition. *Cancer Discov.* *4*, 896–904.
- Gordon, R.R., i Nelson, P.S. (2012). Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist. Updat.* *15*, 123–131.
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D.P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., Petrella, F., Spaggiari, L., i Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* *1*, 15009.
- Guan, X. (2016). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* *5*, 402–418.
- Guan, J.-L., i Shalloway, D. (1992). Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* *358*, 690–692.
- Guijarro, M. V, Dahiya, S., Danielson, L.S., Segura, M.F., Vales-Lara, F.M., Menendez, S., Popiolek, D., Mittal, K., Wei, J.J., Zavadil, J., i ostali (2013). Dual Pten/Tp53 Suppression Promotes Sarcoma Progression by Activating Notch Signaling. *Am. J. Pathol.* *182*, 2015–2027.
- Hahn, W., i Weinberg, R. (2002). Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* *347*, 1593–1604.
- Hanahan, D., i Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., Yang, Q., Goldstein, A., Tucker, M., Walker, G., Hayward, N., Dracopoli, N., Cairns, P., Nawroz, H., i ostali (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hassan, S., Buchanan, M., Jahan, K., Aguilar-Mahecha, A., Gaboury, L., Muller,

- W.J., Alsawafi, Y., Mourskaia, A.A., Siegel, P.M., Salvucci, O., i ostali (2011). CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model. *Int. J. Cancer* *129*, 225–232.
- Hayflick, L., i Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.
- Hershman, D.L., i Shao, T. (2009). Anthracycline cardiotoxicity after breast cancer treatment. *Oncology (Williston Park)*. *23*, 227–234.
- Hochwald, S.N., Nyberg, C., Zheng, M., Zheng, D., Wood, C., Massoll, N.A., Magis, A., Ostrov, D., Cance, W.G., i Golubovskaya, V.M. (2009). A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. *Cell Cycle* *8*, 2435–2443.
- Hodges, L.M., Markova, S.M., Chinn, L.W., Gow, J.M., Kroetz, D.L., Klein, T.E., i Altman, R.B. (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet. Genomics* *21*, 152–161.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., i Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 714–726.
- Howe, G.A., Xiao, B., Zhao, H., Al-Zahrani, K.N., Hasim, M.S., Villeneuve, J., Sekhon, H.S., Goss, G.D., Sabourin, L.A., Dimitroulakos, J., i ostali (2016a). Focal Adhesion Kinase Inhibitors in Combination with Erlotinib Demonstrate Enhanced Anti-Tumor Activity in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* *11*, e0150567.
- Howe, G.A., Xiao, B., Zhao, H., Al-Zahrani, K.N., Hasim, M.S., Villeneuve, J., Sekhon, H.S., Goss, G.D., Sabourin, L.A., Dimitroulakos, J., i ostali (2016b). Focal adhesion kinase inhibitors in combination with erlotinib demonstrate enhanced anti-tumor activity in non-small cell lung cancer. *PLoS One* *11*, 1–20.
- Hu, T.-H., Huang, C.-C., Lin, P.-R., Chang, H.-W., Ger, L.-P., Lin, Y.-W., Changchien, C.-S., Lee, C.-M., i Tai, M.-H. (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* *97*, 1929–1940.
- Huang, C.-Y., Ju, D.-T., Chang, C.-F., Muralidhar Reddy, P., i Velmurugan, B.K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *BioMedicine* *7*, 23.
- Ichim, G., i Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 539–548.
- Igney, F.H., i Krammer, P.H. (2002). Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 277–288.
- Ji, H.-F., Pang, D., Fu, S.-B., Jin, Y., Yao, L., Qi, J.-P., i Bai, J. (2013). Overexpression of focal adhesion kinase correlates with increased lymph node metastasis and poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *139*, 429–435.

- Joerger, A.C., i Fersht, A.R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 375–404.
- Juliano, R.L., i Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.
- Kang, Y., Hu, W., Ivan, C., Dalton, H.J., Miyake, T., Pecot, C. V, Zand, B., Liu, T., Huang, J., Jennings, N.B., i ostali (2013). Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1485–1495.
- Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Vines, R.R., i Parsons, J.T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3328–3332.
- Kastenhuber, E.R., i Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* 170, 1062–1078.
- Khamisipour, G., Jadidi-Niaragh, F., Jahromi, A.S., Zandi, K., i Hojjat-Farsangi, M. (2016). Mechanisms of tumor cell resistance to the current targeted-therapy agents. *Tumor Biol.* 37, 10021–10039.
- Kim, J.-S., Lee, C., Bonifant, C.L., Ransom, H., i Waldman, T. (2007). Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Mol. Cell. Biol.* 27, 662–677.
- Ko, B.-S., Chang, T.-C., Chen, C.-H., Liu, C.-C., Kuo, C.-C., Hsu, C., Shen, Y.-C., Shen, T.-L., Golubovskaya, V.M., Chang, C.-C., i ostali (2010). Bortezomib suppresses focal adhesion kinase expression via interrupting nuclear factor-kappa B. *Life Sci.* 86, 199–206.
- Kokubo, Y., Gemma, A., Noro, R., Seike, M., Kataoka, K., Matsuda, K., Okano, T., Minegishi, Y., Yoshimura, A., Shibuya, M., i ostali (2005). Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA). *Br. J. Cancer* 92, 1711–1719.
- Koul, A., Willén, R., Bendahl, P.-O., Nilbert, M., i Borg, Å. (2002). Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer* 94, 2369–2379.
- Kraus-Berthier, L., Jan, M., Guilbaud, N., Naze, M., Pierré, A., i Atassi, G. (2000). Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice. *Clin. Cancer Res.* 6, 297–304.
- Kurenova, E. V, Hunt, D.L., He, D., Magis, A.T., Ostrov, D.A., i Cance, W.G. (2009). Small molecule chloropyramine hydrochloride (C4) targets the binding site of focal adhesion kinase and vascular endothelial growth factor receptor 3 and suppresses breast cancer growth in vivo. *J. Med. Chem.* 52, 4716–4724.
- Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P.H., Zhou, X.-P., i Eng, C. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma

of breast carcinomas. *Nat. Genet.* 32, 355–357.

Lee, B.-C., Lee, T.-H., Avraham, S., i Avraham, H.K. (2004). Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Cancer Res.* 2, 327–338.

Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., i Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.

Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., i Pavletich, N.P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323–334.

Levine, B., i Weisberger, A.S. (1955). The response of various types of bronchogenic carcinoma to nitrogen mustard. *Ann. Intern. Med.* 42, 1089.

Levine, A.J., Finlay, C.A., i Hinds, P.W. (2004). P53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell* 116, 67–69.

Liu, J.C., Voisin, V., Wang, S., Wang, D.-Y., Jones, R.A., Datti, A., Uehling, D., Al-Awar, R., Egan, S.E., Bader, G.D., i ostali (2014). Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. *EMBO Mol. Med.* 6, 1542–1560.

Livak, K.J., i Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.

Lu, H., Wang, L., Gao, W., Meng, J., Dai, B., Wu, S., Minna, J., Roth, J.A., Hofstetter, W.L., Swisher, S.G., i ostali (2013). IGF2BP2/FAK pathway is causally associated with dasatinib resistance in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2864–2873.

Maehama, T., i Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 13375–13378.

Malarkey, D.E., Hoenerhoff, M., i Maronpot, R.R. (2013). Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. Haschek Rousseaux's Handb. Toxicol. Pathol. Third Ed. 107–146.

Martin, P., Liu, Y.-N., Pierce, R., Abou-Kheir, W., Casey, O., Seng, V., Camacho, D., Simpson, R.M., i Kelly, K. (2011). Prostate Epithelial Pten/TP53 Loss Leads to Transformation of Multipotential Progenitors and Epithelial to Mesenchymal Transition. *AJPA* 179, 422–435.

Marusyk, A., Almendro, V., i Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* 12, 323–334.

Massagué, J., i Obenauf, A.C. (2016). Metastatic colonization. *Nature* 529, 298–306.

- Mehta, S.A., Christopherson, K.W., Bhat-Nakshatri, P., Goulet, R.J., Broxmeyer, H.E., Kopelovich, L., i Nakshatri, H. (2007). Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene* 26, 3329–3337.
- Mei, L., Liu, Y., Zhang, Q., Gao, H., Zhang, Z., i He, Q. (2014). Enhanced antitumor and anti-metastasis efficiency via combined treatment with CXCR4 antagonist and liposomal doxorubicin. *J. Control. Release* 196, 324–331.
- Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Mañes, S., i Martínez-A, C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: The Role of Receptor Dimerization and TK Pathway Activation. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 397–421.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., i Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–1805.
- Mogi, A., i Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 583929.
- Möhle, R., Failenschmid, C., Bautz, F., i Kanz, L. (1999). Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13, 1954–1959.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., i Adjei, A.A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 83, 584–594.
- Mon, N.N., Ito, S., Senga, T., i Hamaguchi, M. (2006). FAK Signaling in Neoplastic Disorders: A Linkage between Inflammation and Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086, 199–212.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mukhopadhyay, N.K., Gordon, G.J., Chen, C.J., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., i Jaklitsch, M.T. (2005). Activation of focal adhesion kinase in human lung cancer cells involves multiple and potentially parallel signaling events. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 387–397.
- Mukhopadhyay, U.K., Mooney, P., Jia, L., Eves, R., Raptis, L., i Mak, A.S. (2010). Double game: Src-Stat3 versus p53-PTEN in cellular migration and invasion. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4980–4995.
- Muller, P.A.J., Vousden, K.H., i Norman, J.C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* 192, 209–218.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., i ostali (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.

- Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., i Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* 59, 752–757.
- Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., i Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int. J. Cell Biol.* 310616, 10.
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M.R., Kwak, E.L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., i ostali (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450, 1235–1239.
- NicAmhlaoibh, R., Heenan, M., Cleary, I., Touhey, S., O’Loughlin, C., Daly, C., Nunez, G., Scanlon, K., i Clynes, M. (1999). Altered expression of mRNAs for apoptosis-modulating proteins in a low level multidrug resistant variant of a human lung carcinoma cell line that also expresses *mdr1* mRNA. *Int. J. Cancer* 82, 368–376.
- van Nimwegen, M.J., Huigsloot, M., Camier, A., Tijdens, I.B., i van de Water, B. (2006). Focal adhesion kinase and protein kinase B cooperate to suppress doxorubicin-induced apoptosis of breast tumor cells. *Mol. Pharmacol.* 70, 1330–1339.
- Nishimura, M., Machida, K., Imaizumi, M., Abe, T., Umeda, T., Takeshima, E., Watanabe, T., Ohnishi, Y., Takagi, K., i Hamaguchi, M. (1996). Tyrosine phosphorylation of 100-130 kDa proteins in lung cancer correlates with poor prognosis. *Br. J. Cancer* 74, 780–787.
- Nooter, K., Bosman, F.T., Burger, H., van Wingerden, K.E., Flens, M.J., Scheper, R.J., Oostrum, R.G., Boersma, A.W., van der Gaast, A., i Stoter, G. (1996). Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 7, 75–81.
- Oki, E., Tokunaga, E., Nakamura, T., Ueda, N., Futatsugi, M., Mashino, K., Yamamoto, M., Watanabe, M., Ikebe, M., Kakeji, Y., i ostali (2005). Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 227, 33–38.
- Oliver, T.G., Meylan, E., Chang, G.P., Xue, W., Burke, J.R., Humpton, T.J., Hubbard, D., Bhutkar, A., i Jacks, T. (2011). Caspase-2-Mediated Cleavage of Mdm2 Creates a p53-Induced Positive Feedback Loop. *Mol. Cell* 43, 57–71.
- Ota, E., Abe, Y., Oshika, Y., Ozeki, Y., Iwasaki, M., Inoue, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Takagi, K., Ogata, T., i ostali (1995). Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 72, 550–554.
- Otsuka, S., Bebb, G., Calandra, G., al., et, Keane, M., i Strieter, R. (2008). The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 3, 1379–1383.
- Owen, A., Chandler, B., Bray, P.G., Ward, S.A., Hart, C.A., Back, D.J., i Khoo, S.H. (2004). Functional correlation of P-glycoprotein expression and genotype with expression of the human immunodeficiency virus type 1 coreceptor CXCR4. *J. Virol.* 78, 12022–12029.

- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* *133*, 571–573.
- Pallis, A.G., Serfass, L., Dziadziusko, R., van Meerbeeck, J.P., Fennell, D., Lacombe, D., Welch, J., i Gridelli, C. (2009). Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC. *Eur. J. Cancer* *45*, 2473–2487.
- Park, E.-J., Kwon, H.-K., Choi, Y.-M., Shin, H.-J., i Choi, S. (2012). Doxorubicin Induces Cytotoxicity through Upregulation of pERK–Dependent ATF3. *PLoS One* *7*.
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., i ostali (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 302–317.
- Peled, A., Wald, O., i Burger, J. (2012). Development of novel CXCR4-based therapeutics. *Expert Opin. Investig. Drugs* *21*, 341–353.
- Pérez-Ramírez, C., M., Canãdas-Garre, M., Molina, M.A., Faus-Dáder, M., i Calleja-Hernández, M.A. (2015). PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics* *16*, 1843–1862.
- Pesic, M., Markovic, J.Z., Jankovic, D., Kanazir, S., Markovic, I.D., Rakic, L., i Ruzdijic, S. (2006). Induced Resistance in the Human Non Small Cell Lung Carcinoma (NCI-H460) Cell Line In Vitro by Anticancer Drugs. *J. Chemother.* *18*, 66–73.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P., i Strieter, R.M. (2003). The Stromal Derived Factor–1/CXCL12–CXC Chemokine Receptor 4 Biological Axis in Non–Small Cell Lung Cancer Metastases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *167*, 1676–1686.
- Phillips, R.J., Mestas, J., Gharaee-Kermani, M., Burdick, M.D., Sica, A., Belperio, J.A., Keane, M.P., i Strieter, R.M. (2005). Epidermal Growth Factor and Hypoxia-induced Expression of CXC Chemokine Receptor 4 on Non-small Cell Lung Cancer Cells Is Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway and Activation of Hypoxia Inducible Factor-1 α . *J. Biol. Chem.* *280*, 22473–22481.
- Pi, W., Guo, X., Su, L., i Xu, W. (2012). BMP-2 Up-Regulates PTEN Expression and Induces Apoptosis of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells under Hypoxia. *PLoS One* *7*, e35283.
- Poon, J.S., Eves, R., i Mak, A.S. (2010). Both lipid- and protein-phosphatase activities of PTEN contribute to the p53-PTEN anti-invasion pathway. *Cell Cycle* *9*, 4450–4454.
- Powell, E., Piwnica-Worms, D., i Piwnica-Worms, H. (2014). Contribution of p53 to metastasis. *Cancer Discov.* *4*, 405–414.
- Puzio-Kuter, A.M., Castillo-Martin, M., Kinkade, C.W., Wang, X., Shen, T.H., Matos, T., Shen, M.M., Cordon-Cardo, C., i Abate-Shen, C. (2009). Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev.* *23*, 675–680.

- Pylayeva, Y., Gillen, K.M., Gerald, W., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., i Giancotti, F.G. (2009). Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J. Clin. Invest.* *119*, 252–266.
- Qian, C.-N., Mei, Y., i Zhang, J. (2017). Cancer metastasis: issues and challenges. *Chin. J. Cancer* *36*, 38.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., i Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.* *317*, 575–589.
- Reiske, H.R., Kao, S.C., Cary, L.A., Guan, J.L., Lai, J.F., i Chen, H.C. (1999). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Biol. Chem.* *274*, 12361–12366.
- Reymond, N., d'Água, B.B., i Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 858–870.
- Saigusa, S., Toiyama, Y., Tanaka, K., Yokoe, T., Okugawa, Y., Kawamoto, A., Yasuda, H., Inoue, Y., Miki, C., i Kusunoki, M. (2010). Stromal CXCR4 and CXCL12 Expression is Associated with Distant Recurrence and Poor Prognosis in Rectal Cancer After Chemoradiotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 2051–2058.
- Scagliotti, G.V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., i ostali (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *26*, 3543–3551.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., i Parsons, J.T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5192–5196.
- Scherbakova, E.A., Stromskaya, T.P., Rybalkina, E.Y., Kalita, O. V., i Stavrovskaya, A.A. (2008). Role of the PTEN protein in the multidrug resistance of prostate cancer cells. *Mol. Biol.* *42*, 430–435.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., i Geer, P. van der (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* *372*, 786–791.
- Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., i Sieg, D.J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *71*, 435–478.
- Shackelford, R.E., Vora, M., Mayhall, K., i Cotelingam, J. (2014). ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Genes Cancer* *5*, 1–14.
- Shanker, M., Willcutts, D., Roth, J.A., i Ramesh, R. (2010). Drug resistance in lung cancer. *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)* *1*, 23–36.
- Sharma, R. (2012). Multidrug Resistance (MDR) in Lung Cancer: Finding the Holy Grail of MDR Reversal. *J. Cancer Sci. Ther.* *01*, 10–11.

- Shay, J.W., i Roninson, I.B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919–2933.
- Shen, Y.H., Zhang, L., Gan, Y., Wang, X., Wang, J., LeMaire, S.A., Coselli, J.S., i Wang, X.L. (2006). Up-regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten) Mediates p38 MAPK Stress Signal-induced Inhibition of Insulin Signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 7727–7736.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., i Jemal, A. (2016). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 66, 7–30.
- Singla, A.K., Downey, C.M., Bebb, G.D., i Jirik, F.R. (2015). Characterization of a murine model of metastatic human non- small cell lung cancer and effect of CXCR4 inhibition on the growth of metastases. *Oncoscience* 2.
- Sison, E.A.R., Magoon, D., Li, L., Annesley, C.E., Rau, R.E., Small, D., i Brown, P. (2014). Plerixafor as a chemosensitizing agent in pediatric acute lymphoblastic leukemia: efficacy and potential mechanisms of resistance to CXCR4 inhibition. *Oncotarget* 5, 8947–8958.
- Slack-Davis, J.K., Martin, K.H., Tilghman, R.W., Iwanicki, M., Ung, E.J., Autry, C., Luzzio, M.J., Cooper, B., Kath, J.C., Roberts, W.G., i ostali (2007). Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 282, 14845–14852.
- Soria, J.-C., Lee, H.-Y., Lee, J.I., Wang, L., Issa, J.-P., Kemp, B.L., Liu, D.D., Kurie, J.M., Mao, L., i Khuri, F.R. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin. Cancer Res.* 8, 1178–1184.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., Mak, T.W., Levine, A.J., Wu, H., i ostali (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell* 8, 317–325.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K.A., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., i ostali (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15, 356–362.
- Stoletov, K., Kato, H., Zardoujian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S., i Klemke, R. (2010). Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* 123, 2332–2341.
- Su, L., Zhang, J., Xu, H., Wang, Y., Chu, Y., Liu, R., i Xiong, S. (2005). Differential Expression of CXCR4 Is Associated with the Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 11, 8273–8280.
- Sulzmaier, F.J., Jean, C., i Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer* 14, 598–610.

Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P., i Chen, Z.-S. (2012). Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chin. J. Cancer* 31, 51–57.

Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.F., i Minna, J.D. (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491–494.

Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., i Yamada, K.M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280, 1614–1617.

Tamura, M., Gu, J., Tran, H., i Yamada, K.M. (1999). PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1820–1828.

Tang, J.-M., He, Q.-Y., Guo, R.-X., i Chang, X.-J. (2006). Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 51, 181–191.

Teicher, B.A., i Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 2927–2931.

Thomas, A., Liu, S. V., Subramaniam, D.S., i Giaccone, G. (2015). Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 1–16.

Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., i Altman, R.B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 440–446.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., i Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., i Jemal, A. (2016a). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25, 16–27.

Torre, L.A., Siegel, R.L., i Jemal, A. (2016b). Lung Cancer Statistics. In *Advances in experimental medicine and biology*, str. 1–19.

Toschi, L., Rossi, S., Finocchiaro, G., i Santoro, A. (2017). Non-small cell lung cancer treatment (r)evolution: ten years of advances and more to come. *Ecancermedalscience* 11, 787.

Travis, W.D., Brambilla, E., Nicholson, A.G., Yatabe, Y., Austin, J.H.M., Beasley, M.B., Chirieac, L.R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D.B., i ostali (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1243–1260.

Vatsyayan, R., Chaudhary, P., Lelsani, P.C.R., Singhal, P., Awasthi, Y.C., Awasthi, S., i Singhal, S.S. (2009). Role of RLIP76 in doxorubicin resistance in lung cancer. *Int. J. Oncol.* 34, 1505–1511.

Wald, O., Shapira, O.M., i Izhar, U. (2013). CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. *Theranostics* 3, 26–33.

Wang, J.-F., Park, I.-W., i Gropman, J.E. (2000). Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 95.

Wang, L., Liu, X., Ren, Y., Zhang, J., Chen, J., Zhou, W., Guo, W., Wang, X., Chen, H., Li, M., i ostali (2017). Cisplatin-enriching cancer stem cells confer multidrug resistance in non-small cell lung cancer via enhancing TRIB1/HDAC activity. *Cell Death Dis.* 8, e2746-11.

Wang, S., Konorev, E.A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., i Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms INTERMEDIACY OF H₂O₂-AND p53-DEPENDENT PATHWAYS*.

Wang, Z., Sun, J., Feng, Y., Tian, X., Wang, B., i Zhou, Y. (2016). Oncogenic roles and drug target of CXCR4/CXCL12 axis in lung cancer and cancer stem cell. *Tumor Biol.* 37, 8515–8528.

Wei, C.-L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., i ostali (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124, 207–219.

Weinberg, R. a. (2007a). *The biology of cancer* (Garland Science).

Weinberg, R.A. (2007b). *The biology of cancer* (Garland Science).

Wongvaranon, P., Pongrakhananon, V., Chunchacha, P., i Chanvorachote, P. (2013). Acquired resistance to chemotherapy in lung cancer cells mediated by prolonged nitric oxide exposure. *Anticancer Res.* 33, 5433–5444.

Xia, H., Nho, R.S., Kahm, J., Kleidon, J., i Henke, C.A. (2004). Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a β ₁ Integrin Viability Signaling Pathway*.

Xie, S., Tu, Z., Xiong, J., Kang, G., Zhao, L., Hu, W., Tan, H., Tembo, K.M., Ding, Q., Deng, X., i ostali (2017). CXCR4 promotes cisplatin-resistance of non-small cell lung cancer in a CYP1B1-dependent manner. *Oncol. Rep.* 37, 921–928.

Xu, L.-H., Yang, X., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Baldwin, A.S., Craven, R.J., i Cance, W.G. (2000). The Focal Adhesion Kinase Suppresses Transformation-associated, Anchorage-independent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 275, 30597–30604.

Xu, L.H., Owens, L. V, Sturge, G.C., Yang, X., Liu, E.T., Craven, R.J., i Cance, W.G. (1996). Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ.* 7, 413–418.

- Yabuki, N., Sakata, K., Yamasaki, T., Terashima, H., Mio, T., Miyazaki, Y., Fujii, T., i Kitada, K. (2007). Gene amplification and expression in lung cancer cells with acquired paclitaxel resistance. *Cancer Genet. Cytogenet.* *173*, 1–9.
- Yanagawa, N., Leduc, C., Kohler, D., Saieg, M.A., John, T., Sykes, J., Yoshimoto, M., Pintilie, M., Squire, J., Shepherd, F.A., i ostali (2012). Loss of Phosphatase and Tensin Homolog Protein Expression Is an Independent Poor Prognostic Marker in Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* *7*, 1513–1521.
- Yang, M.-Y., Lin, P.-M., Liu, Y.-C., Hsiao, H.-H., Yang, W.-C., Hsu, J.-F., Hsu, C.-M., i Lin, S.-F. (2012). Induction of Cellular Senescence by Doxorubicin Is Associated with Upregulated miR-375 and Induction of Autophagy in K562 Cells. *PLoS One* *7*(5).
- Yin, J., i Zhang, J. (2011). Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban* *36*, 927–938.
- Yin, Y., i Shen, W.H. (2008). PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* *27*, 5443–5453.
- Yoon, H., Dehart, J.P., Murphy, J.M., i Lim, S.-T.S. (2015). Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights. *J. Histochem. Cytochem.* *63*, 114–128.
- Young, L.C., Campling, B.G., Voskoglou-Nomikos, T., Cole, S.P., Deeley, R.G., i Gerlach, J.H. (1999). Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin. Cancer Res.* *5*, 673–680.
- Zhan, W., Liang, Z., Zhu, A., Kurtkaya, S., Shim, H., Snyder, J.P., i Liotta, D.C. (2007). Discovery of Small Molecule CXCR4 Antagonists. *J. Med. Chem.* *50*, 5655–5664.
- Zhang, H., Shao, H., Golubovskaya, V.M., Chen, H., Cance, W., Adjei, A.A., i Dy, G.K. (2016). Efficacy of focal adhesion kinase inhibition in non-small cell lung cancer with oncogenically activated MAPK pathways. *Br. J. Cancer* *115*, 203–211.
- Zhang, L.L., Liu, J., Lei, S., Zhang, J., Zhou, W., i Yu, H.G. (2014). PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression. *Cell. Signal.* *26*, 1011–1020.
- Zhao, J., i Guan, J.-L. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 35–49.
- Zlotnik, A., i Yoshie, O. (2000). Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity. *Immunity* *12*, 121–127.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., i Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 597–606.
- Zuco, V., i Zunino, F. (2008). Cyclic pifithrin-alpha sensitizes wild type p53 tumor cells to antimicrotubule agent-induced apoptosis. *Neoplasia* *10*, 587–596.

BIOGRAFIJA

Midrag Dragoj je rođen 13.03.1985. godine u Pančevu. Osnovnu školu je završio u Opovu, a srednju Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2004. godine, a diplomirao je 18.09.2013. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Doktorske studije je upisao 2013. godine na smeru Molekularna biologija (Modul Molekularna biologija eukariota) na Biološkom fakultetu. Na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” zaposlen je od 24.07.2014. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije Miodraga Dragoja urađen je u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, u okviru naučno-istraživačkog projekta III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj.

U svom dosadašnjem radu Miodrag Dragoj je učestvovao sa 29 kongresnih saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja i sa 1 kongresnim saopštenjem na skupovima domaćeg značaja. Miodrag Dragoj je autor 4 naučna rada objavljena u časopisima međunarodnog značaja i koautor još 3 radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja.