

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena J. Žakula

**Inaktivacija ćelija melanoma čoveka
zračenjem jonima ugljenika: određivanje
radiobioloških parametara i analiza
signalnih puteva ćelijske smrti**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena J. Žakula

**Inactivation of human melanoma cells by
carbon ion radiation: evaluation of
radiobiological parameteres and analysis
of cell death signaling pathways**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

dr Goran Brajušković, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Lela Korićanac, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Članovi komisije:

dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u okviru međunarodne saradnje sa Istituto Nazionale di Fisica Nucleare – Laboratori Nazionale del Sud (INFN-LNS), Italija, kojom rukovodi dr Aleksandra Ristić-Fira.

Mentoru dr Leli Korićanac, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, se posebno zahvaljujem na ukazanom poverenju i razumevanju, kao i na nesebičnoj pomoći i podršci tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije.

Zahvaljujem se mentoru dr Goranu Brajuškoviću, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na prihvatanju mentorstva, kritičkom čitanju disertacije i na svim korisnim sugestijama u završnoj fazi izrade disertacije.

Dr Ivanu Petroviću, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na velikoj pomoći i podršci tokom zračenja jonima ugljenika, na dragocnim sugestijama za konačno formiranje teksta ove teze, kao i na trudu uloženom u pregled i ocenu doktorske disertacije.

Članu Komisije za odbranu, dr Dušanki Savić Pavićević, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na podršci u finalizaciji doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Aleksandri Ristić-Fira, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, koja me je uvela u svet nauke, učestvovala u definisanju ove disertacije, nesebično pomagala i podržavala tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije. Zahvaljujem joj na ukazanom poverenju i dragocnim savetima.

Zahvalnost dugujem dr Giacomo Cuttone-u, direktoru INFN-LNS koji mi je omogućio korišćenje snopa jona ugljenika kao i njegovim saradnicima Pablu Cirrone-u i Francescu Roman-u na velikoj pomoći tokom zračenja.

Zahvaljujem se mojim kolegicama, Otiliji Keta, Tanji Bulat i dr Danijeli Todorović na nesebičnoj podršci i pomoći, kao i prijatnoj atmosferi tokom svakodnevnog rada.

Zahvaljujem se dr Ani Đorđević na pomoći u eksperimentalnom radu. Mr Nataši Popović i dr Jeleni Đorđević hvala na podršci i prijateljstvu.

Želim da se zahvalim i svim kolegama iz Laboratorije 090 na prijateljskoj atmosferi i svakodnevnoj podršci, a posebno direktorki Laboratorije prof. dr Snežani Pajović na korisnim i praktičnim savetima.

Zahvaljujem se mojoj porodici na podršci i razumevanju.

Rezime

Inaktivacija ćelija melanoma čoveka zračenjem jonima ugljenika: određivanje radiobioloških parametara i analiza signalnih puteva ćelijske smrti

Zračenje jonima ugljenika se koristi u terapiji različitih malignih oboljenja poput tumora glave i vrata, baze lobanje, kancera pluća, jetre, prostate itd. Zahvaljujući fizičkim svojstvima jona ugljenika ova vrsta zračenja ima niz prednosti u poređenju sa konvencionalnom, kao i protonskom terapijom. Pokazala je efikasnost čak i u eliminaciji radio-rezistentnih tumora. Za razliku od konvencionalnog zračenja, zračenje jonima ugljenika karakteriše blagi porast relativne doze u funkciji dubine prostiranja, koji se završava naglim rastom do maksimuma doze, označenom kao Bragg-ov vrh.

Dosadašnja *in vitro* istraživanja na HTB140 ćelijskoj liniji melanoma čoveka su pokazala da su ove ćelije visoko radio-rezistentne na γ i protonsko zračenje. Iz tog razloga je ova ćelijska linija odabrana kao model sistem za praćenje anti-tumorskog efekta jona ugljenika. Ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta su ozračene u tri pozicije duž Bragg-ove krive, koje karakterišu vrednosti linearnog transfera energije (LET) od 84.7 (pozicija A), 197.2 (pozicija B) i 382.4 keV/ μ m (pozicija C). Primenjene su doze od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Radio-osetljivost HTB140 ćelija na jone ugljenika je određena pomoću radiobioloških parametara, preživljavanja za dozu od 2 Gy (SF2) i relativne biološke efektivnosti za 2 Gy u odnosu na γ -zračenje (RBE(2 Gy, γ)). Antitumorski efekat jona ugljenika je praćen i na nivou ćelijske vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta 48 h i 7 dana nakon ozračivanja ćelija. U cilju boljeg razumevanja načina delovanja zračenja jonima ugljenika, u pozicijama B i C je ispitivana indukcija procesa apoptoze i promena u propagaciji ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa 48 h nakon ozračivanja. U istim eksperimentalnim uslovima su praćene i promene na nivou molekula uključenih u proces apoptoze.

Vrednosti SF2 u svim pozicijama zračenja jonima ugljenika ukazuju na veoma visok nivo radio-rezistentnosti HTB140 ćelija melanoma čoveka. Vrednosti RBE(2Gy, γ) ukazuju na jaču inaktivaciju jonima ugljenika u sve tri pozicije zračenja u odnosu na

efekat γ zraka, kao i u odnosu na protonsko zračenje. Takođe je pokazano da je zračenje jonima ugljenika dovelo do značajnog smanjenja vijabilnosti i proliferativne sposobnosti HTB140 ćelija melanoma čoveka nakon 48 h i 7 dana u svim ozračenim uzorcima. Citofluorimetrijska analiza broja apoptotskih ćelija je ukazala na sposobnost jona ugljenika da eliminišu rezistentne HTB140 ćelije indukcijom apoptoze, dok je analiza ćelijskog ciklusa pokazala da u ozračenim uzorcima dolazi do značajnog povećanja broja HTB140 ćelija u G₂ fazi. Rezultati ove studije ukazuju da je povećan broj apoptotskih ćelija praćen povećanjem nivoa proteina p53, kao i odnosa Bax/Bcl-2 u svim ozračenim uzorcima u obe pozicije zračenja, kako na nivou proteina, tako i na genskom nivou. Indukcija apoptoze kod HTB140 ćelija melanoma čoveka nakon zračenja jonima ugljenika potvrđena je prisustvom PARP subjedinice od 89 kDa. U ozračenim uzorcima je detektovana povećana količina proteina NF κ B, dok nivo odgovarajuće iRNK nije promenjen pod delovanjem jona ugljenika.

Radiobiološki parametri, određeni na osnovu klonogenog preživljavanja ćelija, kao i rezultati dobijeni praćenjem ćelijske vijabilnosti i proliferacije su pokazali da je najbolji efekat zračenja jonima ugljenika na HTB140 ćelije melanoma čoveka postignut u poziciji B gde vrednost LET-a iznosi 197 keV/ μ m. Inhibitorni efekat zračenja jonima ugljenika je ostvaren zaustavljanjem ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa i indukcijom apoptoze.

Ključne reči: *melanom čoveka, γ -zračenje, zračenje jonima ugljenika, klonogeno preživljavanje, radiobiološki parametri, apoptoza, ćelijski ciklus.*

Naučna oblast: *Biologija*

Uža naučna oblast: *Radijaciona biologija*

UDK broj: 613.648.4:[616-006.81:576.36] (043.3)

Abstract

Inactivation of human melanoma cells by carbon ion radiation: evaluation of radiobiological parameters and analysis of cell death signaling pathways

Carbon ion radiation is used in the treatment of various malignancies such as tumors of head and neck, skull base, lung cancer, liver, prostate, etc. This type of radiation has many advantages as compared to conventional, as well as to proton therapy, due to its physical properties. It is efficient even in the elimination of radio-resistant tumors. In contrast to conventional radiation, carbon ion radiation is characterized by a slow increase of relative dose with depth, followed by a rise to the dose maximum at the Bragg peak.

Previous *in vitro* studies on HTB140 human melanoma cell line showed that these cells are highly radio-resistant to the γ and proton radiation. For this reason, this cell line was chosen as a model system for the monitoring of the antitumor effect of carbon ions. Exponentially growing cells were irradiated at three positions along the Bragg curve, characterised by the linear energy transfer (LET) of 84.7 (position A), 197.2 (position B) and 382.4 keV/ μm (position C). The applied doses were 2, 4, 8, 12 and 16 Gy. The radio-sensitivity of the HTB140 cells after carbon ion irradiation was estimated by the radiobiological parameters, the surviving fraction at 2 Gy (SF2), and the relative biological effectiveness at 2 Gy with respect to γ -rays (RBE(2Gy, γ)). The anti-tumor effect of carbon ions was analysed by cell viability and proliferative capacity 48 h and 7 days after irradiation. In order to better understand the carbon ion action, induction of apoptosis and analysis of cell cycle arrests 48 h after irradiation were studied in the positions B and C. Changes in the expression of molecules involved in the regulation of apoptosis were analysed under the same experimental conditions.

The obtained values of SF2 in all irradiation positions reveal rather high level of radio-resistance of HTB140 melanoma cells. RBE(2Gy, γ) values indicate significant level of carbon ion induced cell inactivation, throughout the whole Bragg curve, compared to γ rays, as well as to protons. Significant decrease of cell viability and

proliferation capacity of HTB140 human melanoma cells is also shown 48 h and 7 days after irradiation. Number of apoptotic cells evaluated by flow cytometry suggest the ability of carbon ions to eliminate resistant HTB140 human melanoma cells by induction of apoptosis, while the analysis of cell cycle phase distribution show significant accumulation in G₂ phase in irradiated samples. Results obtained in this study clearly indicate that the induction of apoptosis is caused by the increase of p53 tumor suppressor protein and Bax/Bcl-2 ratio, both on protein and gene expression levels. Apoptotic cell death is confirmed by the cleavage of PARP protein and presence of 89 kDa cleaved product. Results obtained in this study show that level of NFκB transcription factor is increased while level of NFκB mRNA was not changed after carbon ion irradiation.

Radiobiological parameters determined by analysis of cell survival, as well as the results obtained by cell viability and proliferation indicate that the best effect of carbon ion radiation on HTB140 human melanoma cells inactivation is obtained in the position B with LET of 197 keV/μm. The inhibitory effect of carbon ion irradiation is accomplished by G₂ arrest of the cell cycle as well as by induction of apoptosis.

Keywords: *human melanoma, γ-rays, carbon ions, clonogenic survival, radiobiological parameters, apoptosis, cell cycle.*

Scientific field: *Biology*

Scientific subfield: *Radiation biology*

UDC number: 613.648.4:[616-006.81:576.36] (043.3)

Skraćenice

AIF	faktor indukcije apoptoze (eng. <i>apoptosis inducing factor</i>)
APAF-1	faktor aktivacije apoptotskih proteaza 1 (eng. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>)
APS	amonijum persulfat
ARF	eng. <i>alternate open reading frame</i>
ATCC	American Type Culture Collection
Bax	eng. <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	eng. <i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	bazni par
BrdU	5-bromo-2-deoksiuridin
BSA	albumin goveđeg seruma (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
CDK	ciklin zavisna kinaza (eng. <i>cycline-dependant kinase</i>)
CDKN2A	ciklin zavisni kinazni inhibitor 2A (eng. <i>cycline-dependant kinase inhibitor 2A</i>)
cDNK	komplementarna DNK (eng. <i>complementary DNA</i>)
CNAO	Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica
CT	kompjuterizovana tomografija (eng. <i>computed tomography</i>)
DEPC	dietilpirokarbonat
DISC	engl. <i>death-inducing signaling complex</i>
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleotid
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
DSB	dvolančani prekid (eng. <i>double strand break</i>)
DTIC	Dakarbazin
DTT	ditiotreitol
ECL	eng. <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	etilendiamino-tetrasirćetna kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGTA	etilenglicerol-tetrasirćetna kiselina (eng. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>)

ELISA	eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EndoG	endonukleaza G
FACS	eng. <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	fetalni teleći serum (eng. <i>foetal calf serum</i>)
FDA	eng. <i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fotemustin
GEANT4	GEometryANd Tracking
HIBMC	Hyogo Ion Beam Medical Center
HIT	Heidelberg Ion-Beam Therapy Center
HR	homologna rekombinacija (eng. <i>homologous recombination</i>)
HRP	peroksidaza iz rena (eng. <i>horse-radish peroxidase</i>)
HRS	hiper radio-osetljivost pri niskim dozama (eng. <i>low-dose hyper radiosensitivity</i>)
IAEA-TRS	International Atomic Energy Agency Technical Report Series
IAPs	proteini inhibitori apoptoze (eng. <i>inhibitor of apoptosis proteins</i>)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INFN – LNS	Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali del Sud
INK4A	eng. <i>inhibitor of cyclin-dependent kinase 4</i>
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
LET	linearni transfer energije (eng. <i>linear energy transfer</i>)
MAP	eng. <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MC1-R	melanokortinski receptor 1
Mdm2	eng. <i>mouse double minute 2 homolog</i>
α -MSH	α -melanocitni stimulirajući hormon (eng. <i>α-melanocyte stimulating hormone</i>)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF κ B	nuklearni faktor kapa B (eng. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NHEJ	nehomologna rekombinacija (eng. <i>non-homologous end joining</i>)
NIRS	National Institute of Radiological Sciences
OER	eng. <i>oxygen enhancement ratio</i>

PARP	Poli (ADP-ribozil) polimeraza (eng. <i>poly (ADP ribose) polymerase</i>)
PBS	fosfatno puferisani fiziološki rastvor (eng. <i>phosphate buffer saline</i>)
PE	efikasnost zasejavanja (eng. <i>plating efficiency</i>)
PI	propidijum jodid
PMMA	Polymethyl methacrylate
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PUMA	eng. <i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	eng. <i>polyvinylidene difluoride</i>
Rb	retinoblastoma protein
RBE	relativna biološka efektivnost (eng. <i>relative biological effectiveness</i>)
RHD	Rel homologni domen (eng. <i>Rel homology domain</i>)
RIP	eng. <i>receptor interacting protein kinase</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
SDS	natrijum dodecil sulfat (eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu deterdženta natrijum dodecil sulfata (eng. <i>Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SF	frakcija preživljavanja (eng. <i>surviving fraction</i>)
SOBP	proširen Bragg-ov vrh (eng. <i>spread out Bragg peak</i>)
SRB	sulforodamin B
SSB	jednolančani prekid (eng. <i>single strand break</i>)
TCA	trihlorsirćetna kiselina (eng. <i>trichloroacetic acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TNFR	eng. <i>tumor necrosis factor receptor</i>
TPS	sistem za planiranje tretmana (eng. <i>treatment planing system</i>)
UV	ultraljubičasto (eng. <i>ultraviolet</i>)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 ZRAČENJE JONIMA UGLJENIKA	1
1.1.1 Jonizujuće zračenje	1
1.1.2 Fizičke osobine jonizujućeg zračenja	3
1.1.3 Terapija jonima ugljenika	6
1.1.4 Biološki efekti zračenja	8
1.2 ĆELIJSKA SMRT	10
1.2.1 Tipovi ćelijske smrti	10
1.2.2 Molekularni mehanizmi apoptoze	11
1.2.3 Uloga proteina Bcl-2 familije u apoptozi	14
1.2.4 Uloga p53 u apoptozi.....	15
1.2.5 Nuklearni faktor kappa B i apoptoza	15
1.2.6 Poli (ADP-ribozil) polimeraza i apoptoza	16
1.3 ĆELIJSKI CIKLUS	17
1.3.1 Molekularni mehanizmi regulacije ćelijskog ciklusa	18
1.4 MALIGNI MELANOM	19
1.4.1 Epidemiologija i faktori rizika za nastanak malignog melanoma	19
1.4.2 Molekularna osnova malignog melanoma.....	21
1.4.3 Lečenje malignog melanoma.....	23
2. CILJ RADA.....	26
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1 MATERIJAL	28
3.1.1 Ćelijska linija.....	28
3.1.2 Hemikalije.....	28
3.1.3 Antitela	29
3.1.4 Puferi.....	30
3.2 METODE.....	30
3.2.1 Gajenje ćelija u kulturi.....	30
3.2.2 Uslovi zračenja	30
3.2.3 Određivanje klonogenog preživljavanja	34
3.2.4 Linearno kvadratni model i određivanje relevantnih parametara zakrivljenja fitovane krive (α i β), frakcije preživljavanja za dozu 2 Gy (SF2) i relativne biološke efektivnosti (RBE).....	35

3.2.5	Određivanje ćelijske vijabilnosti pomoću MTT eseja	36
3.2.6	Određivanje ćelijske vijabilnosti pomoću SRB eseja	36
3.2.7	Određivanje ćelijske proliferacije	37
3.2.8	Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze	37
3.2.9	Izolacija ukupnih ćelijskih proteina	38
3.2.10	Određivanje koncentracije proteina	38
3.2.11	Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	39
3.2.12	Imuno blot (Western blot)	39
3.2.13	Izolovanje i elektroforetska provera kvaliteta RNK	41
3.2.14	Reverzna transkripcija	42
3.2.15	Kvantifikacija ekspresije gena	42
3.2.16	Statistička obrada podataka	44
4.	REZULTATI	45
4.1	Optimizacija uslova rasta ćelija	45
4.2	Efekat zračenja jonima ugljenika na klonogeno preživljavanje	46
4.3	Efekat zračenja jonima ugljenika na vijabilnost HTB140 ćelija	50
4.4	Efekat zračenja jonima ugljenika na proliferativnu sposobnost HTB140 ćelija	52
4.5	Efekat zračenja jonima ugljenika na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	55
4.6	Efekat zračenja jonima ugljenika na indukciju apoptoze	56
4.7	Analiza apoptotskog signalnog puta indukovano zračenjem jonima ugljenika	58
4.7.1	Efekat zračenja jonima ugljenika na nivo p53 proteina	58
4.7.2	Efekat zračenja jonima ugljenika na relativni odnos Bax i Bcl-2 proteina	60
4.7.3	Efekat zračenja jonima ugljenika na PARP protein	62
4.7.4	Efekat zračenja jonima ugljenika na nivo nuklearnog faktora kappa B (NFκB)	63
4.7.5	Relativni odnos ekspresije Bax i Bcl-2 gena nakon zračenja jonima ugljenika	65
4.7.6	Efekat zračenja jonima ugljenika na ekspresiju NFκB gena	67
5.	DISKUSIJA	70
6.	ZAKLJUČCI	81
7.	LITERATURA	83

1. UVOD

1.1 ZRAČENJE JONIMA UGLJENIKA

1.1.1 Jonizujuće zračenje

Jonizujuće zračenje predstavlja elektromagnetno (fotonsko) i čestično zračenje koje ima dovoljno energije da pri prolasku kroz materiju izbaci elektrone iz atoma i tako formira jone. Ovaj proces se zove jonizacija. Tokom jonizacije ove čestice gube energiju duž putanje kojom se kreću interagujući sa elektronima obližnjih atoma (Hall i Giaccia, 2006). Intenzitet jonizacije se izražava pomoću linearnog transfera energije (eng. *linear energy transfer*, LET). LET označava energiju koju različite vrste čestica predaju po jedinici dužine materije kroz koju prolaze, a izražava se u kiloelektronvoltima po mikrometru (keV/ μm). Što je količina apsorbovane energije veća, odnosno što je jonizacija u datom volumenu gušća, to će i nastala oštećenja biti izraženija (Goodhead, 1994; Nikjoo *et al.*, 2001). U odnosu na LET zračenje se može podeliti na zračenje niskog LET-a i zračenje visokog LET-a (Okayasu, 2012; Hall i Giaccia, 2006). U zračenje niskog LET-a spadaju X i γ zraci. Ovo zračenje dovodi do izolovanih oštećenja na molekulu DNK, jednolančanih (eng. *single strand breaks*, SSB) i dvolančanih (eng. *double strand breaks*, DSB) prekida kao i oštećenja baza. Većinu oštećenja nastalih nakon zračenja niskog LET-a ćelija može uspešno da popravi (Pouget *et al.*, 2002; Asaithamby *et al.*, 2011). Sa druge strane, zračenje visokog LET-a se odnosi na protone i druge jone, koji na DNK molekulu dovode uglavnom do DSB kao i grupisanih (eng. *clustred*), kompleksnih oštećenja. Ona se sastoje od dva i više pojedinačnih oštećenja (SSB, DSB, i oštećenja baza) na segmentu od 20 baznih parova DNK molekula. Ova oštećenja ćelija znatno teže može da popravi (Jenner *et al.*, 1993; Blaisdell *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2000; Kawata *et al.*, 2004). Dvolančani prekidi, a naročito grupisana kompleksna oštećenja na molekulu DNK, su za ćeliju najčešće letalni događaji (Hamada *et al.*, 2010; Sage i Harrison, 2011).

Kao kvantitativna mera zračenja definiše se fizička doza koja predstavlja količinu apsorbovane energije po jedinici mase tkiva, dok se biološka doza izražava kao proizvod fizičke doze i relativne biološke efektivnosti (eng. *relative biological effectiveness*, RBE) (Paganetti *et al.*, 1997). RBE(2Gy, γ) predstavlja odnos apsorbovane doze od 2 Gy referentnog zračenja (X ili γ zračenje) i apsorbovane doze analiziranog tipa zračenja koja izaziva isti nivo klonogenog preživljavanja, odnosno izoefekat (Belli *et al.*, 2000). Ova definicija RBE se najčešće koristi u radiobiologiji. Osim toga, koristi se i definicija RBE(2Gy, γ), koja predstavlja odnos klonogenog preživljavanja ispitivanog zračenja i γ zračenja za dozu 2 Gy, odnosno izodozni efekat (DeLaney i Kooy, 2008). RBE se može definisati i kao RBE₁₀, RBE₃₇ i RBE₆₀ koje porede doze neophodne za redukovanje preživljavanja na 10, 37 ili 60% (Aoki-Nakano *et al.*, 2014; Howell *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 2014). Za izračunavanje RBE za male doze zračenja koristi se RBE α , koji predstavlja količnik α parametara (parametar fitovanja koji definiše početni nagib krive), za krive preživljavanja ispitivanog i γ zračenja (Paganetti *et al.*, 1997). Pored toga biološki parametri za izračunavanje RBE mogu biti formiranje DSB i fosforilacija histona H2AX (Belli *et al.*, 2000; Depuydt *et al.*, 2013), formiranje mikronukleusa (Groesser *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2010), indukcija apoptoze (Lee *et al.*, 2008; Al-Jahdari *et al.*, 2009), itd. RBE određenog tipa zračenja zavisi od vrste čestice i njene energije (Belli *et al.*, 1998), doze (Wouters *et al.*, 1996), tipa ćelije ili tkiva koje se ozračuje (Paganetti *et al.*, 2002). Vrednost RBE raste sa porastom LET-a, ali samo do određene granice. Kod jona ugljenika RBE dostiže maksimalnu vrednost pri LET-u od oko 200 keV/ μ m (Ando *et al.*, 2005; Fokas *et al.*, 2009; Weber i Kraft, 2009; Okayasu, 2012). Određivanje RBE za određeni tip zračenja, je veoma bitno za radioterapiju, jer predstavlja relativnu meru sposobnosti tog tipa zračenja, u odnosu na referentno konvencionalno zračenje (npr. γ zračenje) da inaktivira ćelije (Krämer *et al.*, 2003).

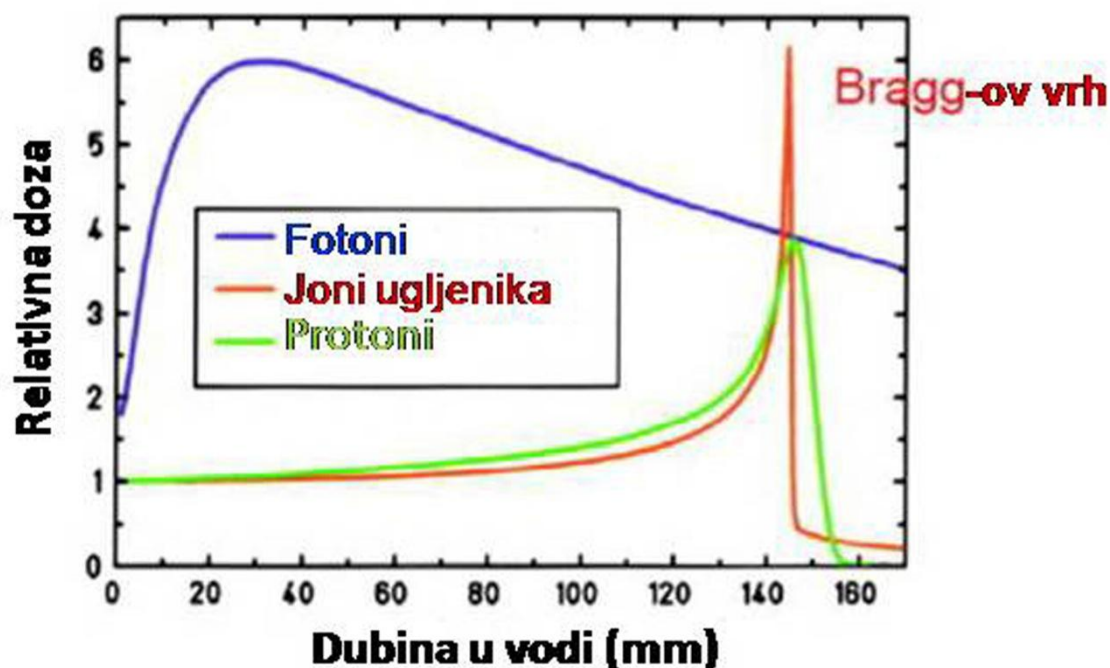
X i γ zraci, odnosno fotoni, se već decenijama koriste u terapiji malignih tumora i smatraju se konvencionalnom radioterapijom (Baskar *et al.*, 2012).

Rutherford je 1919. godine prvi ukazao na postojanje protona i time započeo studije različitih formi jonizujućeg zračenja koje se sastoje od naelektrisanih čestica. Ove čestice obuhvataju protone (atomi vodonika kojima je oduzet jedan elektron), α čestice (jezgra helijuma) i teže čestice visoke energije, kao što su na primer joni litijuma

(^7Li), bora (^{11}B), ugljenika (^{12}C), gvožđa (^{56}Fe), itd. (Allen *et al.*, 2011).

1.1.2 Fizičke osobine jonizujućeg zračenja

Osnovne osobine različitih tipova jonizujućeg zračenja se mogu ilustrovati na osnovu distribucije doze u funkciji dubine u vodi (Slika 1). Konvencionalno zračenje karakteriše brzi porast i postizanje maksimuma doze na relativno malim dubinama, praćen eksponencijalnim opadanjem doze sa povećanjem dubine. Bočno rasejanje koje karakteriše ovo zračenje je veliko što u praksi dovodi do oštećenja okolnog zdravog tkiva (Ohno, 2013). Za razliku od konvencionalnog zračenja, zračenje protonima i težim jonima karakteriše blagi porast doze u funkciji dubine prostiranja, koji predstavlja plato, praćen naglim usponom do maksimuma doze, koji je označen kao Bragg-ov vrh (eng. *Bragg peak*) (Chu *et al.*, 1993) (Slika 1). Iza Bragg-ovog vrha kod protona dolazi do

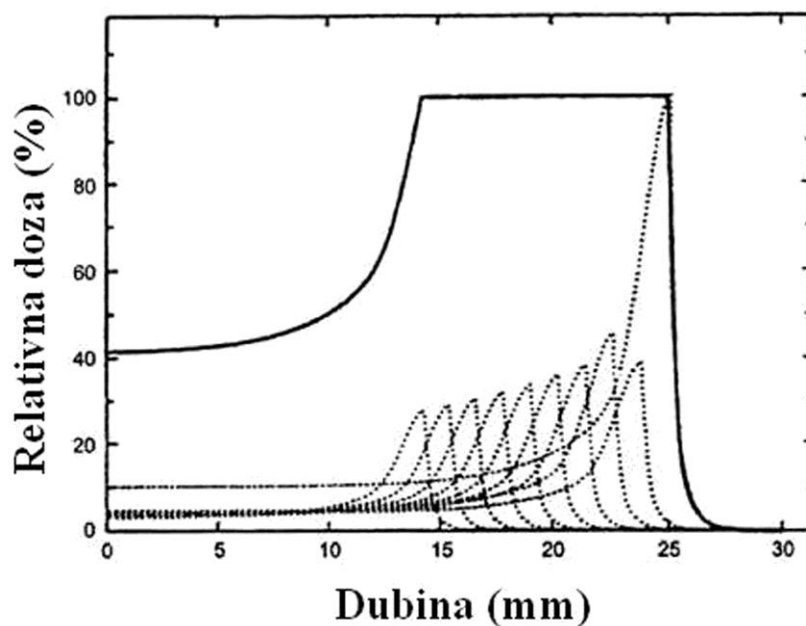


Slika 1. Poređenje distribucije doze za fotone, protone i jone ugljenika (Fukumura *et al.*, 2009).

naglog pada doze na nulu, dok kod jona ugljenika doza pada, ali ne na nulu, već stvara takozvani dozni rep. Ova pojava je posledica fragmentacije jona ugljenika na čestice sa

manjim atomskim brojem, kao što su protoni, α čestice, litijum, bor, berilijum, itd. (Tsujii i Kamada, 2012). Odnos doze u Bragg-ovom vrhu i ulaznom regionu je veći za jone ugljenika u poređenju sa lakšim jonima (Jäkel *et al.*, 2001). Zahvaljujući ovakvim karakteristikama Bragg-ove krive u celini, joni ugljenika minimalno oštećuju okolno tkivo. Zračenje jonima ugljenika karakteriše 3 puta manje bočno rasejanje od protonskog zračenja, kao i u odnosu na ostale lakše jone od ugljenika (Amaldi i Kraft, 2005). Takođe, parametar OER (eng. *oxygen enhancement ratio*), koji se definiše kao odnos doza potrebnih da proizvedu isti biološki efekat pod anoksičnim i aerobnim uslovima, je redukovano kod zračenja jonima ugljenika što omogućava efikasniji tretman hipoksičnih tumora (Remmes *et al.*, 2011).

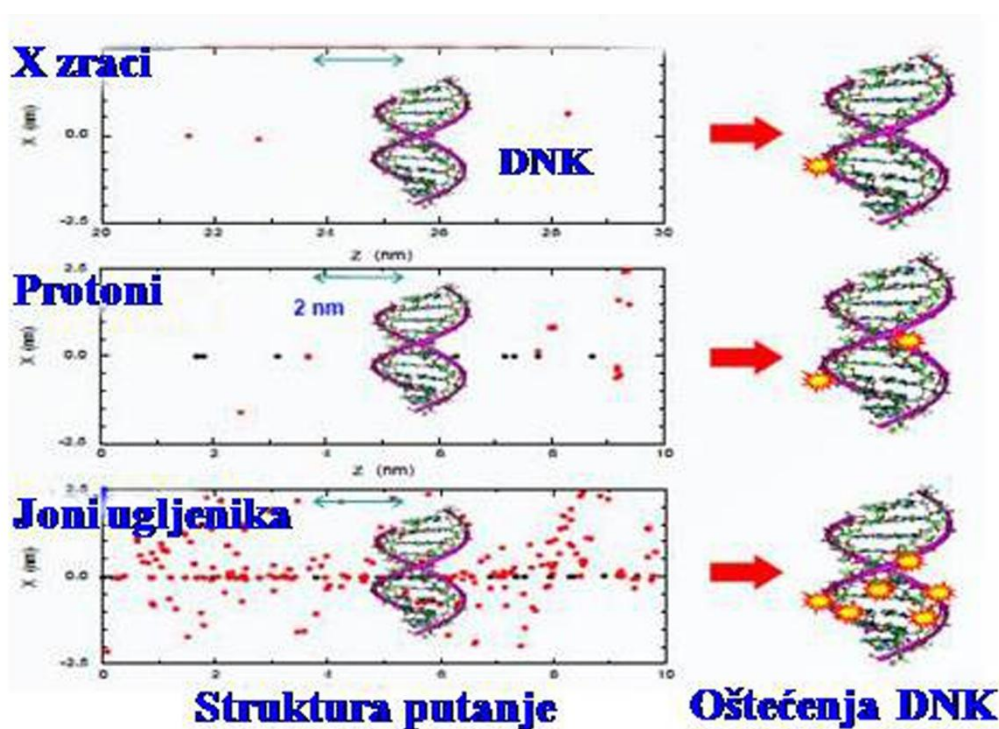
Bragg-ov vrh je veoma uzak, tako da za potrebe terapije malignih tumora mora biti modifikovan, odnosno proširen. Proširenje se postiže serijskim smanjivanjem energije jona koje dovodi do preklapanja, odnosno superpozicije brojnih monoenergetskih Bragg-ovih krivih koje imaju bliske energije (Slika 2). Tako nastali proširen Bragg-ov vrh (eng. *spread out Bragg peak*, SOBP) omogućava da cela zapremina tumora bude izložen uniformnoj dozi zračenja (Kanai *et al.*, 1997). Proširen Bragg-ov vrh karakterišu veće vrednosti LET-a u odnosu na plato, kao i postojanje gradijenta rasta LET-a duž samog SOBP u pravcu dometa čestica (Bettega *et al.*, 2000; Petrović *et al.*, 2010).



Slika 2. Prošireni Bragg-ov vrh (Chu *et al.*, 1993).

RBE terapijskog protonskog zračenja je u opsegu od 1.1 do 1.2, a u eksperimentima sa ćelijskim linijama dostiže vrednosti do oko 7 (Paganetti *et al.*, 2002; Petrović *et al.*, 2010). Zračenje jonima ugljenika u terapijskoj primeni karakteriše RBE od 2 do 3, dok su u eksperimentalnim istraživanjima vrednosti RBE od 2 do 9.6 (Suzuki *et al.*, 2000; Tsujii *et al.*, 2007; Belli *et al.*, 2008; Beuve *et al.*, 2008; Hamada *et al.*, 2008; Ando i Kase, 2009; Frese *et al.*, 2012). Veća vrednost RBE predstavlja glavnu prednost zračenja jonima ugljenika u odnosu na konvencionalno zračenje i terapiju protonima. Osim toga, nakon primene ovog tipa zračenja znatno je manja popravka oštećenja u molekulima DNK, kao i mogućnost regeneracije tumorskog tkiva (Tsujii i Kamada, 2012).

Razlike u RBE između fotona, protona i jona ugljenika potiču od razlika u jonizacionim putanjama koje ih karakterišu. U poređenju sa fotonima, snopove čestica karakteriše veća gustina jonizacije duž putanje kojom se kreću, što dovodi do značajnih oštećenja na DNK molekulima koja se teško ili uopšte ne mogu popraviti (Slika 3) (Goodhead, 1994; Goodhead, 1999; Kraft *et al.*, 1992). Broj i prostorna raspodela DSB

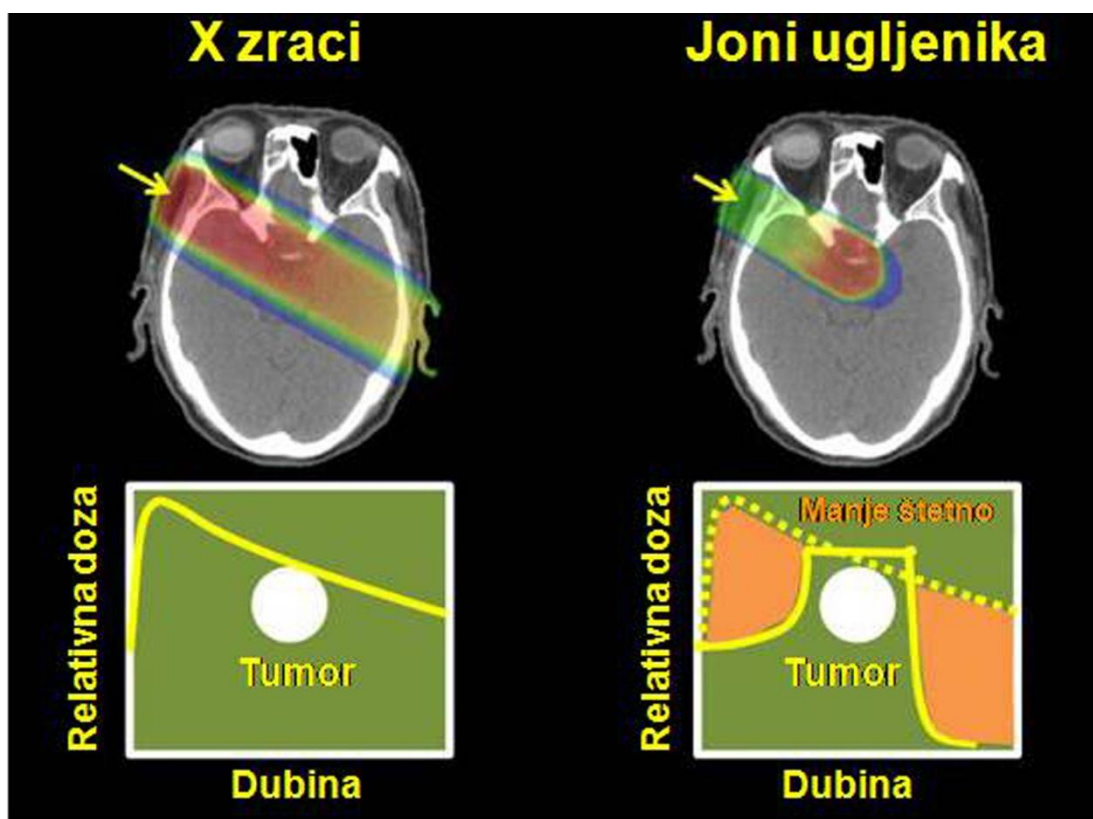


Slika 3. Strukture putanja X zraka, protona i jona ugljenika i oštećenja do kojih dovode na molekulu DNK (Murakami, 2012, www.phys.cts.ntu.edu.tw).

zavise od vrste jona i deponovane energije. Snopovi jona imaju kompleksne putanje koje karakteriše deponovanje energije ne samo duž primarne putanje jona, već i radialno oko nje. Ovo je posledica „ δ zraka“, tj. sekundarnih elektrona visoke energije koji mogu da prelaze rastojanja od nekoliko desetina mikrometara u biološkim sistemima (Fokas *et al.*, 2009; Ballarini *et al.*, 2008). Distribucija elektrona duž putanje je različita među snopovima jona sa različitim atomskim brojevima i energijama (Weyrather i Kraft, 2004).

1.1.3 Terapija jonima ugljenika

Opisane prednosti jona ugljenika u poređenju sa konvencionalnim X ili γ zračenjem, kao i zračenjem protonima, omogućavaju predavanje veće doze i bolji terapijski efekat u tretmanu tumora koji se nalaze dublje u telu, uz istovremeno smanjenje doze i toksičnosti za okolno zdravo tkivo (Slika 4).



Slika 4. Distribucija doze X-zraka i jona ugljenika u tkivu (Ohno, 2013).

Sistem za planiranje tretmana (eng. *treatment planing system*, TPS) je softver u kojem se planiranje zračenja izvodi na osnovu serije preseka kompjuterizovane tomografije (eng. *computed tomography*, CT) na kojima je moguće precizno definisanje kontura tumora i rizičnih organa. Rekonstrukcijom ovih CT preseka zapravo se dobija trodimenzionalni anatomski model pacijenta koji služi kao osnova za precizno planiranje zračenja. Da bi se postiglo precizno usmeravanje snopa zračenja ka tumoru i ujedno isključilo ozračivanje okolnog zdravog tkiva neophodno je da položaj pacijenta bude precizno definisan i stabilan tokom snimanja CT i trajanja tretmana. Za pozicioniranje i imobilizaciju pacijenta koriste se razni imobilizacioni sistemi koji se prilagođavaju svakom pacijentu. TPS medicinskim fizičarima omogućava simulaciju geometrijskih odnosa između ciljane zapremine, rizičnih organa i snopova zračenja na osnovu kojih se definiše geometrija snopa zračenja. Na osnovu propisane doze proračunava se distribucija doze u odnosu na tumor i okolno zdravo tkivo. Tek kada se izvrši provera i potvrda terapijskog plana svi neophodni parametri se prenose na terapijski aparat koji emituje zračenje (Tsuji i Kamada, 2012; Mileusnić i Durbaba, 2012; Fukumura *et al.*, 2009; Jäkel *et al.*, 2001).

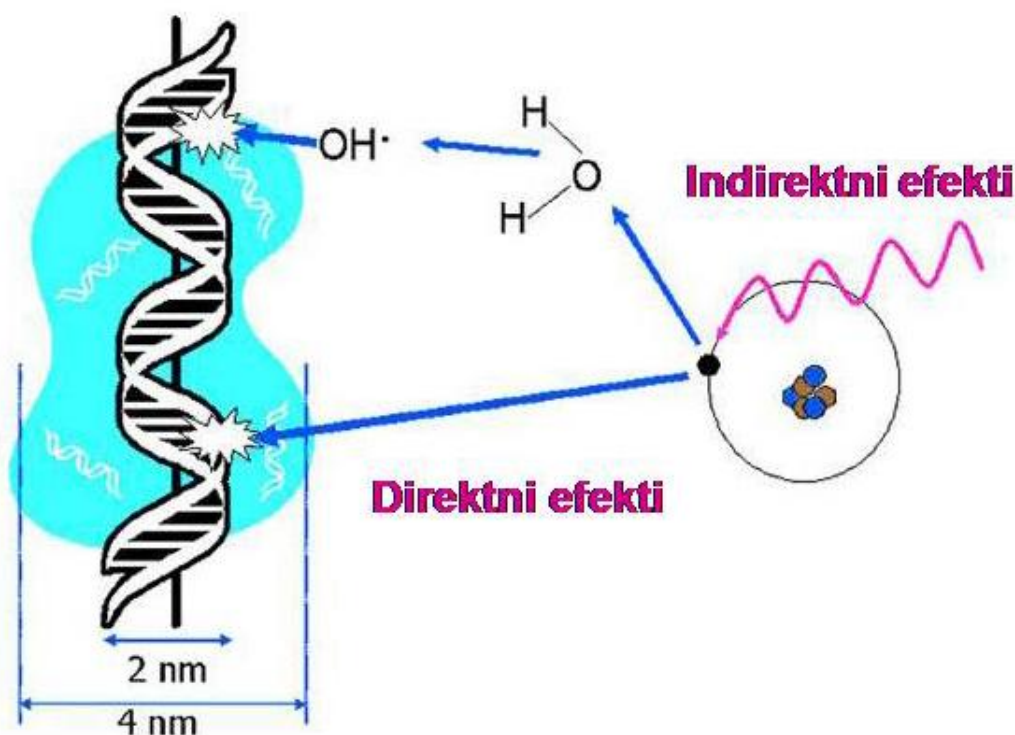
Zračenje jonima ugljenika se koristi u terapiji tumora glave i vrata, baze lobanje, pluća, jetre, prostate, kostiju i mekih tkiva, adenokarcinoma, metastatskog melanoma i različitih tipova sarkoma. Radioterapija jonima ugljenika je u upotrebi od 1994. godine. Do kraja 2013. godine jonima ugljenika je tretirano više od 13000 pacijenata širom sveta (Jermann, 2014). Klinička primena ovih jona počela je u Japanu u National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Chiba, gde je do sada tretirano više od 8100 pacijenata (Jermann, 2014). U Evropi su prvi pacijenti lečeni 1997. godine u Nemačkoj u GSI Helmholtz Centre for Heavy Ion Research, Darmstadt u kome je do 2009. godine tretirano 440 pacijenata. U svetu postoji još pet terapijskih centara: Hyogo Ion Beam Medical Center (HIBMC), Hyogo, Japan od 2002. godine sa ukupno 1935 pacijenata, Institute of Modern Physics u Lanzhou, Kina, u kome je od 2006. godine tretirano 213 pacijenata, Heidelberg Ion-Beam Therapy Center (HIT), Heidelberg, Nemačka od 2009. godine sa ukupno 1368 pacijenata, Gunma University Heavy Ion Medical Center, Gunma, Japan, od 2010. godine i 985 tretiranih pacijanata, i Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica (CNAO), Pavia, Italija u kome je od 2012. tretirano 105 pacijenata (Jermann, 2014). U toku je izgradnja 6 novih terapijskih centara za primenu

jona ugljenika, i to u Nemačkoj, Austriji, Kini i Japanu (Tsujii i Kamada, 2012).

1.1.4 Biološki efekti zračenja

Jonizujuće zračenje može dovesti do oštećenja ćelija na dva načina: direktnim ili indirektnim delovanjem (Slika 5). Prilikom direktnog delovanja zračenje jonizuje atome na molekulima u ćeliji (fosfolipidi ćelijske membrane, DNK). Svoje indirektno dejstvo zračenje ostvaruje radiolizom vode koja čini oko 80% citoplazme. Za razliku od uobičajene jonizacije vode, koja je u izvesnom stepenu uvek prisutna u biološkim sistemima i podrazumeva razlaganje vode na H^+ i OH^- jon, tokom radiolize dolazi do stvaranja visokoaktivnih slobodnih radikala, tj. razdvajanja molekula vode na „akvatizovani” elektron (e_{aq}), hidroksil radikal (OH^\bullet) i vodonični (H^\bullet) radikal. Ovako nastali slobodni radikali imaju kratak poluživot i mogu se ponovo rekombinovati u molekul vode ili dimerizovati u H_2 ili H_2O_2 . Međutim, prisustvo rastvorenog kiseonika može modifikovati ove reakcije i dovesti do stvaranja hidroperoksi radikala ($H^\bullet + O_2 \rightarrow HO_2^\bullet$) i organskog peroksi radikala ($R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^\bullet$). Ovi radikali imaju dovoljno dug poluživot i mogu izazvati seriju oštećenja u ćeliji, kao što su oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida (Hall i Giaccia, 2006; Valerie *et al.*, 2007; Azzam *et al.*, 2012). Zajedno, direktni i indirektni efekti zračenja u ćeliji izazivaju seriju biohemijskih i molekularnih signalnih događaja koji za posledicu imaju ili aktivaciju reparacionih mehanizama i popravku nastalih oštećenja ili odvođe ćeliju u smrt (Spitz *et al.*, 2004).

Zračenje deluje na ćelije tako što dovodi do promena na ćelijskoj membrani (Kolesnick i Fuks, 2003) i izaziva oštećenja na molekulu DNK (Jackson i Bartek, 2009). Promene na ćelijskoj membrani odnose se pre svega na promene na nivou membranskih proteina i poremećaja propustljivosti. Pored toga oštećenja ćelijske membrane mogu indukovati signalne puteve koji dovode do apoptoze. Zračenje direktno dovodi do aktivacije sfingomijelinaze na ćelijskoj membrani koja zatim hidrolizuje fosfodiestarske veze sfingomijelina što rezultira u stvaranju ceramida. Ceramid, kao sekundarni glasnik, dovodi do indukcije apoptoze (Kolesnick i Fuks, 2003).



Slika 5. Direktni i indirektni efekti jonizujućeg zračenja. Preuzeto sa internet stranice courses.ecampus.oregonstate.edu.

Oštećenja na molekulu DNK koja indukuje jonizujuće zračenje mogu biti oštećenja baza, jednolančani i dvolančani prekidi, kao i kompleksna grupisana oštećenja (Asaithamby *et al.*, 2011). Do prekida na DNK lancu uglavnom dolazi usled cepanja fosfodiesterne veze. Kada se oštećenje nalazi samo na jednom lancu, u ćeliji se vrlo brzo pokreću mehanizmi za popravku koji veoma efikasno zamenjuju oštećene nukleotide novim nukleotidima, koji su komplementarni sa nukleotidima u neoštećenom lancu (Watson *et al.*, 2013). Kada zračenje dovede do prekida na oba lanca DNK ili izazove kompleksna grupisana oštećenja, kontrolni mehanizmi zaustavljaju ćelijski ciklus i na taj način omogućavaju ćeliji da popravi nastala oštećenja. Postoje dva mehanizma za popravku DSB, nehomologna rekombinacija (eng. *non-homologous end joining*, NHEJ) i homologna rekombinacija (eng. *homologous recombination*, HR). NHEJ je aktivna u svim fazama ćelijskog ciklusa. Tokom ovog tipa reparacije DNK ligaza IV direktno povezuje prekinute krajeve DNK molekula (Budman i Chu, 2005). HR je aktivna u G2 fazi ćelijskog ciklusa i bazira se na popravci DNK na osnovu homologe sekvence na sestrinskoj hromatidi (Zahradka *et al.*, 2006).

Ako su nastala oštećenja suviše kompleksna i ćelija ne može uspešno da ih popravi, dolazi do inicijacije unutarćelijskih signalnih puteva koji dovode do ćelijske smrti (Jackson i Bartek, 2009). Ćelijska smrt izazvana zračenjem se može podeliti na interfaznu i mitotičku (reproduktivnu). Interfazna ćelijska smrt predstavlja smrt ozračenih ćelija koja se događa pre nego što ćelije uđu u mitozu i javlja se vrlo brzo nakon zračenja. U odgovoru na ozračivanje mnogo češće dolazi do mitotičke smrti, koja je posledica hromozomskih oštećenja koja se ne mogu popraviti (Stevens *et al.*, 2010).

1.2 ĆELIJSKA SMRT

1.2.1 Tipovi ćelijske smrti

Ćelijska smrt ima veoma važnu ulogu u razvoju i homeostazi tkiva. Ovaj proces je, kao i procesi odgovorni za proliferaciju ćelija, strogo regulisan. Poremećaj u regulaciji ćelijske smrti je povezan sa mnogim bolestima kod čoveka, uključujući imunološke poremećaje, poremećaje u razvoju, neurodegeneraciju i maligne bolesti (Baehrecke, 2002).

Ćelijska smrt može se klasifikovati prema morfološkom izgledu na nekrozu, apoptozu i autofagiju (Galluzzi *et al.*, 2012).

Nekroza predstavlja „ćelijsku smrt ubistvom“ i može biti izazvana različitim stimulusima (Trump *et al.*, 1997). Karakteriše je oštećenje i pucanje ćelijske membrane, bubrenje organela i izlivanje ćelijskog sadržaja u međućelijski prostor što dovodi do inflamatorne reakcije u okolnom tkivu. Poslednjih godina pojavilo se dosta literaturnih podataka o tome da nekroza može biti regulisana. Taj tip nekroze označen je kao nekroptoza ili programirana nekroza (Christoffersom i Yuan, 2010). Kao potencijalne signalne komponente programirane nekroze identifikovane su RIP kinaza (eng. *receptor interacting protein kinase*), poli (ADP-ribozil) polimeraza-1 (eng. *poly (ADP-ribose) polymerase-1*, PARP-1), oksidaza redukovanog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) i kalpain (Ouyang *et al.*, 2012).

Autofagija je evolutivno konzerviran katabolički proces koji uključuje

degradaciju nefunkcionalnih ćelijskih komponenti kroz razgradnju u lizozomima. Ovaj proces započinje formiranjem autofagozoma, strukture oivičene dvostrukom membranom koja okružuje citoplazmatske makromolekule i organele koje su predodređene da budu razgrađene. Autofagozom se zatim spaja sa lizozomom i biva degradovan (Kim *et al.*, 2005).

Apoptoza predstavlja oblik programirane ćelijske smrti koji je odgovoran za fiziološku eliminaciju ćelija tokom normalnog razvoja višćelijskih organizama. Ćelijska smrt je, kao i rast i diferencijacija, od esencijalnog značaja u životnom ciklusu ćelije (Schwartzman i Cidlowski, 1993). Tokom procesa apoptoze smanjuje se volumen ćelija, ćelije se deformišu i gube kontakte sa susednim ćelijama. Kondenzaciju citoplazme prati i kondenzacija jedra. Takođe, dolazi do kondenzacije hromatina i njegovog pozicioniranja uz membranu jedra. Ova faza naziva se i kondenzacijska faza procesa apoptoze. Kasnu fazu procesa apoptoze karakteriše fragmentacija apoptotske ćelije i formiranje apoptotskih tela. To su kompaktne strukture oivičene membranom koje u sebi sadrže citosol, kondenzovani hromatin i organele. Apoptotska tela bivaju obuhvaćena od strane makrofaga i uklonjena bez inflamacije okolnog tkiva. Ove morfološke promene su posledica karakterističnih molekularnih i biohemijskih događaja u apoptotskoj ćeliji (Fink i Cookson, 2005; Elmore, 2007).

1.2.2 Molekularni mehanizmi apoptoze

Apoptoza može biti izazvana različitim signalima kako iz spoljašnje sredine tako i unutar same ćelije. Važnu ulogu u procesu apoptoze imaju enzimi kaspaze (eng. *caspase*). To su aspartat specifične cisteinske proteaze. Do sada je opisano ukupno 14 kaspaza kod sisara (McIlwain *et al.*, 2013). Kaspaze su prisutne u skoro svim životinjskim ćelijama kao neaktivni zimogeni označeni kao prokaspaze. Mogu se podeliti prema svojoj ulozi koju imaju u apoptozi (kaspaza-2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10) i inflamaciji (kaspaza-1, -4, -5, -12 kod čoveka, odnosno kaspaza-1, -11 i -12 kod miševa) (McIlwain *et al.*, 2013). Kaspaza-13 je detektovana samo kod goveda i homologa je humanoj kaspazi-4 (Koenig *et al.*, 2001), dok kaspaza-14 ima ulogu u diferencijaciji epitela (Al-Shabrawey *et al.*, 2012). Kaspaze koje učestvuju u apoptozi se pod dejstvom različitih stimulusa proteolitički aktiviraju i pokreću kaskade koje vode

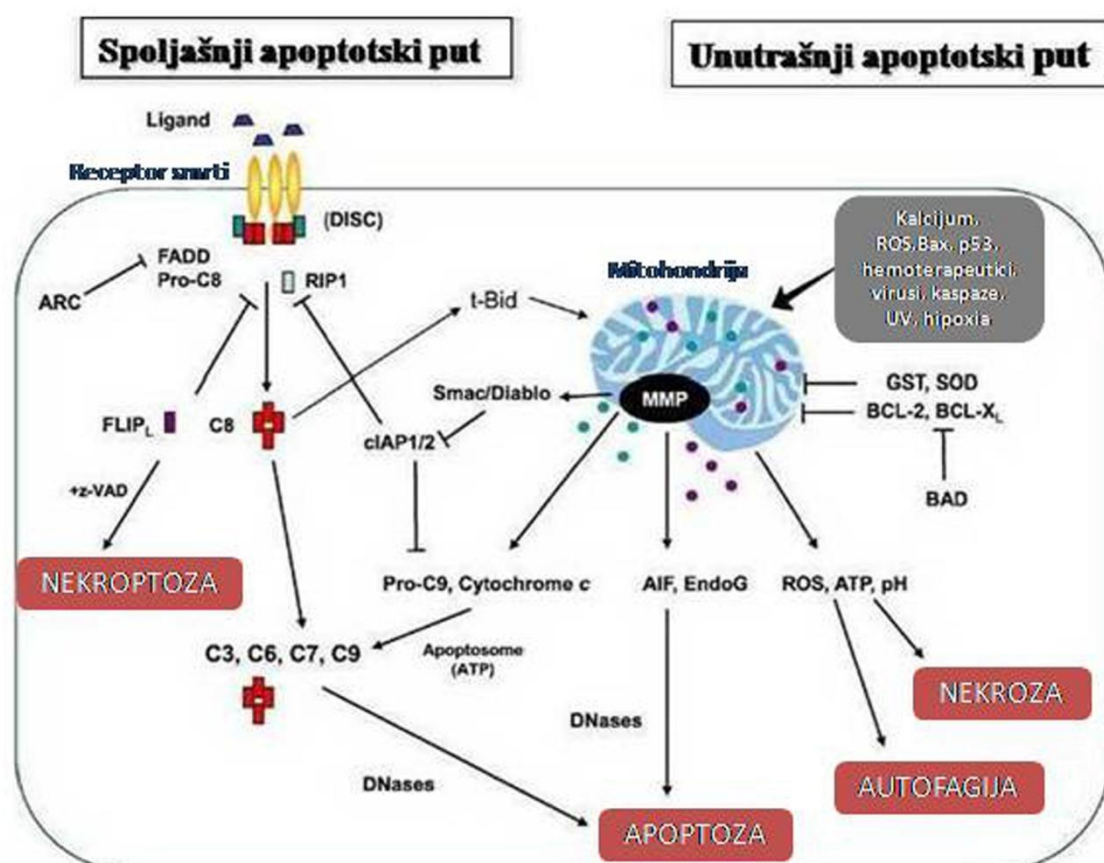
ćeliju u apoptozu. Mogu se podeliti na dve grupe: inicijatorske i efektorske. Inicijatorske kaspaze obuhvataju kaspaze -2, -8, -9 i -10, i one pod dejstvom signala uvode ćeliju u apoptotsku smrt. Efektorske kaspaze obuhvataju kaspazu-3, -6 i -7 i one bivaju aktivirane od strane inicijatorskih kaspaza čime se početni signal amplifikuje (Elmore, 2007).

Apoptotski put zavistan od kaspaza predstavlja klasičan put programirane ćelijske smrti i u njega su najčešće uključene kaspaza-8, -9, -12, -7 i -3. U zavisnosti od toga da li signal dolazi iz spoljašnje sredine ili potiče iz unutrašnjosti ćelije razlikujemo spoljašnji i unutrašnji apoptotski put (Marsden i Strasser, 2003).

Spoljašnji apoptotski put aktivira se posredstvom tzv. receptora smrti koji se nalaze na površini ćelije i prenose apoptotski signal nakon vezivanja specifičnih liganada za njih. Oni pripadaju superfamiliji TNFR (eng. *tumor necrosis factor receptor*) i uključuju TNFR-1, Fas/CD95 i TRAIL receptore DR-4 i DR-5 (Ashkenazi, 2002). Svi članovi ove familije se sastoje od vanćelijskih domena bogatih cisteinom koji im omogućavaju da specifično prepoznaju ligande. Vezivanje liganada dovodi do trimerizacije receptora a za posledicu ima aktivaciju citoplazmatskih domena receptora, tzv. domena smrti. Za ove domene vezuju se adaptorni proteini, kao što su FADD i TRADD koji dalje vezuju inaktivnu prokaspazu 8 i formiraju kompleks DISC (eng. *death inducing signalling complex*) u okviru kog se aktivira kaspaza-8 (Slika 6). Aktivacija kaspaze-8 dalje pokreće proteolitičku kaskadu i dovodi do aktivacije kaspaze-3, -6 i -7 koje vode ćeliju u smrt (Hirata *et al.*, 1998).

Pored signala iz spoljašnje sredine stimulus za indukciju apoptoze može biti unutarćelijski, kao što su oštećenja DNK (Israels i Israels, 1999). Centralnu ulogu u ovom putu aktivacije apoptoze, označenom kao unutrašnji apoptotski put, imaju mitohondrije i Bcl-2 familija proteina. Ovi proteini omogućavaju oslobađanje apoptotskih proteina iz mitohondrija (Slika 6) promenom propustljivosti njene membrane i mogu se podeliti u dve grupe. Prva grupa obuhvata proteine koji aktiviraju kaspaze i vode ćeliju u smrt tzv. kaspazno-zavisnim putem. Ova grupa obuhvata proteine kao što su citohrom c i Smac/Diablo (Indran *et al.*, 2011). Citohrom c nakon apoptotskog stimulusa prelazi iz mitohondrija u citosol i aktivira kaspaznu kaskadu. On se vezuje za apoptotski aktivator APAF-1 (eng. *apoptotic protease activating factor-1*)

koji u ATP zavisnoj konformacionoj promeni oligomerizuje u kompleks označen kao apoptozom. Njegovo formiranje se smatra ključnim događajem ovog puta aktivacije apoptoze (Baliga i Kumar, 2003) i vodi aktivaciji inicijatorske kaspaze-9 (Acehan *et al.*, 2002). Tako aktivirana kaspaza-9 inicira kaspaznu kaskadu posredstvom aktivacije kaspaza -3, -6 i -7. Smac/Diablo protein se vezuje za proteine inhibitore apoptoze (eng. *inhibitor of apoptosis proteins*, IAPs) i vodi njihovoj deaktivaciji, sprečavajući na taj način inhibiciju procesa apoptoze (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000).



Slika 6. Spoljašnji i unutrašnji put inicijacije apoptoze (Indran *et al.*, 2011).

Druga grupa proteina koji su uključeni u inicijaciju apoptoze tzv. kaspazno-nezavisnim putem obuhvata pro-apoptotske proteine kao što su faktor indukcije apoptoze (eng. *apoptosis inducing factor*, AIF) i endonukleaza G (EndoG). Ovi proteini pod dejstvom apoptotskih stimulusa iz mitohondrija prelaze u citosol i jedro gde dovode do kondenzacije hromatina i degradacije DNK što rezultira programiranom ćelijskom smrću (Li *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999).

1.2.3 Uloga proteina Bcl-2 familije u apoptozi

Bcl-2 familija proteina je dobila naziv po Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) proteinu koji je prvi put identifikovan u humanim limfocitima B ćelija gde je prekomerno eksprimiran zahvaljujući t(14;18) hromozomskoj translokaciji (Tsujiimoto *et al.*, 1984). Ova familija proteina obuhvata ključne regulatore apoptoze, čija ekspresija je poremećena u mnogim tipovima malignih ćelija (Llambi i Green, 2011). Bcl-2 familiju proteina čini veliki broj pro- i anti-apoptotskih proteina čija je glavna karakteristika posedovanje visoko konzerviranih Bcl-2 homolognih domena (eng. *Bcl-2 homology domains*, BH), koji su označeni kao: BH-1, BH-2, BH-3 i BH-4 (Reed, 1998). Anti-apoptotski proteini, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1 poseduju sva četiri domena (BH1-4). Ovi proteini takođe sadrže i hidrofobni karboksi-terminalni domen, koji im omogućava pozicioniranje u spoljašnju membranu mitohondrija (Cory i Adams, 2002). Pokazano je da oni štite ćeliju u uslovima postojanja apoptotskog signala onemogućavajući formiranje pora na mitohondrije i na taj način blokiraju oslobađanje apoptotskih proteina kao što je citohrom c (Brenner *et al.*, 2000).

Drugu grupu Bcl-2 familije čine pro-apoptotski proteini Bax, Bak i Bok koji poseduju domene 1, 2 i 3 (BH1-3). Ovi proteini se u fiziološkim uslovima uglavnom nalaze u citosolu a pod dejstvom apoptotskih stimulusa prolaze konformacionu promenu koja im omogućava integraciju u spoljašnju membranu mitohondrija. Na mitohondrijalnoj membrani dolazi do homodimerizacije Bax proteina ili njegove heterodimerizacije sa drugim pro-apoptotskim molekulima kao što su Bak ili Bid. Na ovaj način se formiraju pore. Kroz ove pore zatim dolazi do oslobađanja apoptotskih proteina kao što je citohrom c (Vyssokikh *et al.*, 2002).

Treću grupu proteina Bcl-2 familije karakteriše prisustvo samo trećeg domena (BH3). U ovu familiju spadaju Bim, Bad, Bmf, Bik, Noxa i Puma (eng. *p53 up-regulated modulator of apoptosis*). Oni ostvaruju svoje dejstvo tako što neutralizuju anti-apoptotske proteine (Reed, 1998). Bim, Bad, Bmf i Puma proteini heterodimerizuju sa Bcl-2 i Bcl-X_L proteinima i na taj način vode blokiranju njihove anti-apoptotske funkcije u mitohondrijama (Indran *et al.*, 2011).

1.2.4 Uloga p53 u apoptozi

Protein p53 je kodiran tumor supresor genom TP53. U normalnim uslovima p53 je kratkoživeći protein. Kada ćelija nije izložena stresu nivo p53 proteina se održava na niskom nivou zahvaljujući kontinuiranoj degradaciji pomoću Mdm2 proteina. Mdm2 protein (označen i kao HDM2 kod čoveka), se vezuje za p53, sprečava njegovu transkripcionu aktivnost i potpomaže degradaciju od strane proteazoma (Haupt *et al.*, 2003).

Nakon oštećenja DNK p53 protein se stabilizuje. U zavisnosti od stepena DNK oštećenja, p53 dovodi do blokiranja ćelijskog ciklusa omogućavajući ćeliji reparaciju i preživljavanje ili vodi ćeliju u apoptozu (Pietenpol i Stewart, 2002). U odgovoru na različite tipove stresa koji dovode do oštećenja u molekulu DNK, protein p53 kao regulatorni protein učestvuje u ekspresiji brojnih gena čiji su proteinski produkti uključeni u proces apoptoze, kao što su Puma, Bax, Noxa, PIG3, Killer/DR5, Fas, Perp, p53AIP1 (Riley *et al.*, 2008). Pored toga p53 reguliše i tzv. transkripciono-nezavisnu apoptozu. U odgovoru na stres p53 se premešta u mitohondrije gde interaguje sa anti-apoptotskim proteinima Bcl-xL i Bcl-2, inhibira ih i na taj način dovodi do oslobađanja citohroma c iz mitohondrija koji vodi indukciji apoptoze (Vaseva i Moll, 2009).

1.2.5 Nuklearni faktor kappa B i apoptoza

Nuklearni faktor *kappa* B (NFκB) je proteinski kompleks koji se eksprimira u ćelijama sisara i evolutivno je visoko konzerviran među različitim vrstama. Ova familija proteina poznata i kao Rel familija se sastoji od pet članova, a to su: p105 (proizvod NFκB1 gena), p100 (proizvod NFκB2 gena), p65, c-Rel i RelB (Chen i Green, 2004). Sve članove ove familije karakteriše prisustvo Rel homolognog domena (eng. *Rel homology domain*, RHD) na N-terminusu koji je uključen u vezivanje za molekul DNK, dimerizaciju i interakciju sa IκB inhibitornim proteinima. Samo RelA, c-Rel i RelB poseduju transaktivacione domene (eng. *transactivation domen*, TAD) na C-terminalnom regionu (Chen i Green, 2004). Proteini p105 i p100 su podložni proteolitičkom sečenju na p50 i p52. Svi članovi ove familije proteina formiraju

različite kombinacije heterodimera i homodimera od kojih je najčešći p65/p50 heterodimer (Baldwin, 1996). NF κ B je veoma bitan u regulisanju ćelijskog odgovora jer spada u grupu “brzo delujućih” regulatornih proteina transkripcije koji se u ćeliji nalaze u neaktivnom obliku i ne zahtevaju *de novo* sintezu. Iz tog razloga NF κ B se prvi aktivira u odgovoru na stimulse koji oštećuju ćeliju. U eukariotskim ćelijama NF κ B deluje kao regulatorni protein koji učestvuje u regulaciji ekspresije gena koji kontrolišu ćelijsku smrt i proliferaciju (Baichwal i Baeuerle, 1997). Kod mnogih tumora dolazi do poremećaja u regulaciji NF κ B, tako da on postaje konstitutivno aktivan (Munshi *et al.*, 2004). Aktivan NF κ B pokreće ekspresiju gena koji održavaju proliferaciju ćelije i štite ćeliju od apoptoze. Blokiranje NF κ B u tumorskim ćelijama može dovesti do zaustavljanja proliferacije i ćelijske smrti zahvaljujući čemu ćelije postaju osetljivije na delovanje antitumorskih agenasa (Escárcega *et al.*, 2007).

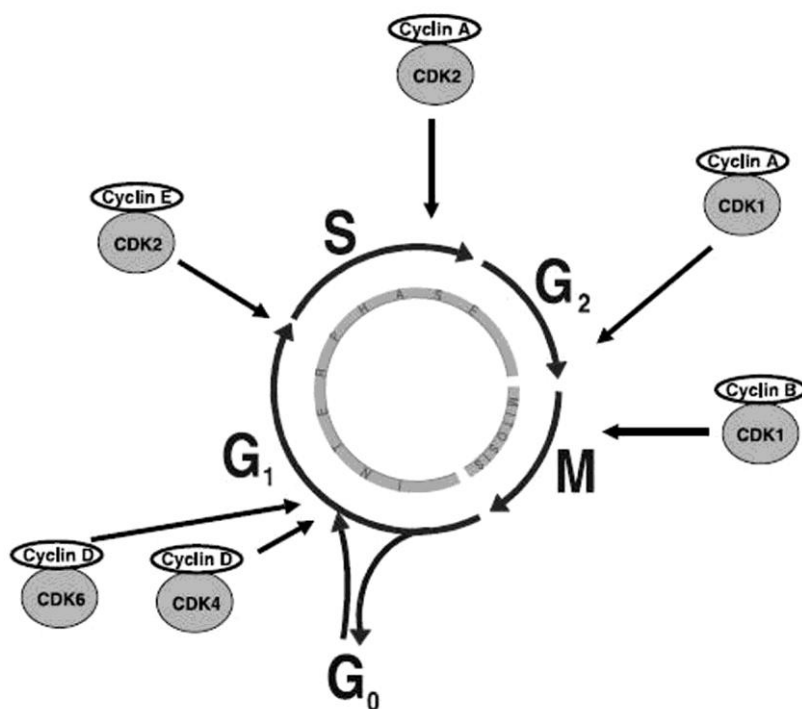
1.2.6 Poli (ADP-ribozil) polimeraza i apoptoza

Poli (ADP-ribozil) polimeraza (PARP) je jedan od 18 članova super familije PARP proteina (Diefenbach i Burkle, 2005). Uključen je u brojne procese u ćeliji, pre svega u procese reparacije molekula DNK i programirane ćelijske smrti. On se aktivira ako u ćeliji postoje prekidi u molekulima DNK koji mogu biti indukovani različitim stimulusima iz spoljašnje sredine ili reaktivnim kiseoničnim vrstama (Andrabi *et al.*, 2006; Virág i Szabó, 2002). U odsustvu DNK oštećenja u ćeliji je prisutan mali broj molekula PARP-a, dok se nakon nastanka oštećenja u molekulima DNK njegova količina povećava i do 100 puta. Uloga PARP-a u apoptozi je povezana sa apoptotskim indukujućim faktorom (eng. *apoptosis inducing factor*, AIF) koji se oslobađa u citoplazmu nakon aktivacije PARP-a. Pod dejstvom kaspaze-3, PARP protein od 116 kDa biva isečen na fragmente od 89kDa i 24kD (Kaufmann *et al.*, 1993). Sečenje PARP-a kaspazom se smatra jednim od glavnih događaja u apoptozi i detekcija isečenog PARP-a u ćeliji je dokaz njene aktivacije (Burlacu, 2003).

S obzirom da PARP ima bitnu ulogu u reparaciji DNK prekida uključujući i prekide nastale pod dejstvom hemoterapeutika, inhibitori ovog enzima imaju potencijal da poboljšaju hemo- i radioterapiju (Southan i Szabó, 2003, Beneke *et al.*, 2004).

1.3 ĆELIJSKI CIKLUS

Ćelijski ciklus je veoma bitan i visoko koordinisan ćelijski proces koji vodi njenoj podeli na dve identične ćerke ćelije. Sastoji se iz interfaze tokom koje se odvija rast ćelije i sinteza DNK, i mitoze ili M faze tokom koje se ćelija deli. Glavni događaj u interfazi je sinteza DNK označena i kao S faza (Slika 7). Pored S i M faze, ćelijski ciklus karakteriše i postojanje dve G faze (Sherr, 1996). G_1 faza prethodi S fazi, dok G_2 faza prethodi mitozu. Tokom G_1 faze ćelija povećava zalihe proteina, povećava broj organela (ribozoma i mitohondrija) i raste. U G_2 fazi ćelija nastavlja da raste i priprema se za ulazak u deobu (Israels i Israels, 2000).



Slika 7. Ćelijski ciklus sa naznačenim mestima aktivnosti regulatornih CDK/ciklin kompleksa (Vermeulen et al., 2003).

Ćelije se pod uticajem spoljašnjih ili unutrašnjih faktora, koji u njima izazivaju oštećenja, mogu zaustaviti u određenoj fazi ćelijskog ciklusa. Zaustavljanjem u G_1 fazi ćelije popravljaju nastala oštećenja na DNK pre duplikacije, dok zaustavljanje u G_2 fazi omogućava reparaciju molekula DNK pre deobe (Maity et al., 1994).

1.3.1 Molekularni mehanizmi regulacije ćelijskog ciklusa

Najznačajniji proteini regulatori ćelijskog ciklusa su ciklini i ciklin-zavisne kinaze (eng. *cycline-dependent kinase*, *CDK*). CDK su serin-treonin kinaze koje se aktiviraju u određenim vremenskim tačkama u ćelijskom ciklusu vezivanjem za cikline. Ciklini se periodično eksprimiraju tokom ćelijskog ciklusa. Po završetku određene faze ciklusa ciklini se razgrađuju i počinje sinteza ciklina za narednu fazu ciklusa (Sherr, 1996).

Ciklini D familije (D1, D2 i D3) su neophodni za ulazak ćelije u G_1 fazu. Oni se vezuju za CDK4 i CDK6 i vode aktivaciji ovih kinaza (Georgieva *et al.*, 2001). Aktivirane CDK fosforilišu tumor supresor protein Rb koji kada je u hipofosforilisanom stanju pravi kompleks sa transkripcionim faktorom E2F (Gottlieb i Oren, 1998). Nakon fosforilacije Rb proteina pomoću CDK4 i CDK6, E2F se oslobađa iz kompleksa sa Rb i dolazi do transkripcije ciljnih gena neophodnih za ulazak ćelije u S fazu (Sherr, 1996).

Ciklin E se sintetiše nakon sinteze ciklina D. Kompleks ovog proteina sa CDK2 je neophodan za ulazak ćelije u S fazu. Kompleks ciklin E/CDK2 se na prelazu iz G_1 u S fazu raspada, nakon čega se ciklin A vezuje za CDK2. Ovaj kompleks omogućava sintezu DNK u S fazi. Ciklin B/CDK1 kompleks je aktivan tokom G_2 faze i mitoze a njegova degradacija je neophodna za kompletiranje ćelijskog ciklusa (King *et al.*, 1996).

Pored ciklina koji regulišu aktivnost CDK, u regulaciju ćelijskog ciklusa uključeni su i inhibitori CDK. Podeljeni su u dve familije, INK4 i Cip/Kip (Sherr i Roberts, 1995). INK4 familija obuhvata p15, p16, p18 i p19 proteine koji formiraju stabilne komplekse sa CDK4 i CDK6 i sprečavaju vezivanje ciklina D za ove CDK (Carnero i Hannon, 1998). Cip/Kip familija obuhvata p21, p27 i p57 proteine koji inaktiviraju kompleks CDK i ciklina (Polyak *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995).

Prelazak ćelije iz jedne faze ćelijskog ciklusa u drugu je moguć samo ako su svi procesi u prethodnoj fazi ispravno realizovani. Ako u ćeliji dođe do oštećenja DNK ćelijski ciklus se zaustavlja u jednoj od kontrolnih tačaka kako bi ćelija popravila nastalo oštećenje (Pietenpol i Stewart, 2002).

Protein p53 je najznačajniji regulator kontrolne tačke na prelasku iz G_1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Kao transkripcioni aktivator učestvuje u regulaciji ekspresije gena

koji kodira za protein *p21* koji je inhibitor CDK. Na taj način, dolazi do zaustavljanja ćelija u G_1 fazi ćelijskog ciklusa u kome reper mehanizmi vrše ispravke u molekulu DNK. Ukoliko je stepen oštećenja visok, ćelija ne može da popravi oštećenje i p53 uvodi ćeliju u apoptozu (Sherr, 1996).

Do zaustavljanja ćelijskog ciklusa takođe može doći u G_2 fazi i to kod ćelija koje nemaju funkcionalan p53, kao što su neke tumorske ćelije, pa se ne mogu zaustaviti u G_1 fazi. Zaustavljanje ćelija u G_2 fazi može nastati na dva načina: blokiranjem aktivacije CDK1 ili blokiranjem aktivacije povratne sprege ciklin B/CDK1-cdc25. Do blokiranja aktivacije CDK1 dolazi usled sprečavanja defosforilacije na treoninu 14 i tirozinu 15, dok blokiranje aktivacije povratne sprege ciklin B/CDK1-cdc25 nastaje usled onemogućavanja hiperfosforilacije cdc25 (Huynh *et al.*, 2004). Pored toga značajnu ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G_2 fazi ima protein GADD45 koji interaguje sa CDK1 i dovodi do disocijacije kompleksa ciklin B/CDK1 (Gao *et al.*, 2005). Brojna istraživanja su pokazala da p53 takođe učestvuje u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G_2 fazi. Pretpostavlja se da p53 nije direktno uključen u sam proces zaustavljanja ćelije u G_2 fazi već da omogućava dugoročno zadržavanje ćelije u ovoj fazi (Stark i Taylor, 2006).

1.4 MALIGNI MELANOM

1.4.1 Epidemiologija i faktori rizika za nastanak malignog melanoma

Maligni melanom nastaje neoplastičnom transformacijom melanocita i predstavlja jedan od najtežih oblika malignih bolesti. Melanociti su ćelije koje proizvode tamni pigment melanin, odgovoran za boju kože i kose. Oni nastaju iz neuralne kreste u toku intrauterinog razvića odakle nakon zatvaranja neuralne tube migriraju u bazalni sloj epidermisa i folikule dlaka (Tsatmali *et al.*, 2002). Poseduju nastavke koji po izgledu podsećaju na dendrite, pomoću kojih se melanin transportuje u keratinocyte i tako dospeva u gornje slojeve epidermisa. Melanin akumuliran u

keratinocitima primarno ima ulogu u zaštiti kože od ultraljubičastog (eng. *ultraviolet*, UV) zračenja (Brenner i Hearing, 2008).

Sinteza melanina odvija se u specijalizovanim organelama, melanozomima. Osnovni prekursor u procesu sinteze melanina je tirozin. U prisustvu enzima tirozinaze dolazi do hidroksilacije tirozina u 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) kao i do oksidacije DOPA u dopakvinon (Hearing, 1993). Dopakvinon preko dopahroma učestvuje u sintezi dve vrste melanina, eumelanina i feomelanina. Eumelanin je crni ili braon pigment koji preovlađuje kod osoba tamnije kože i kose i znatno je efikasniji u zaštiti od UV zraka od feomelanina. Feomelanin je karakterističan za osobe sa svetlom i crvenom kosom i svetlom kožom kod kojih su tumori na koži znatno učestaliji (Tsatmali *et al.*, 2002). Fenotipska razlika u pigmentaciji kože nije posledica različitog broja melanocita već zavisi od broja i veličine melanozoma, količine i tipa melanina i distribucije melanina u keratinocite (Lin i Fisher, 2007). Melanozomi osoba sa tamnijom kožom su veći, brojniji i izduženi, pa je u njima degradacija melanina u keratinocitima produžena i samim tim je pigmentacija izraženija (Tsatmali *et al.*, 2002). Ove razlike u melanozomima se javljaju na rođenju i nisu uslovljene spoljašnjim faktorima kao što je UV zračenje (Costin i Hearing, 2007).

Faktori rizika koji utiču na nastanak melanoma su mnogobrojni. Najznačajnijim faktorom smatra se UV zračenje, odnosno sunčevo zračenje kao njegov glavni izvor (Jelfs *et al.*, 1994). Takođe, postoji i genetička predispozicija za pojavu ove bolesti (Fargnoli *et al.*, 2006). Osobe sa svetlom bojom kože imaju 10 puta veći rizik oboljevanja od Afroamerikanaca. Mnogobrojni benigni nevasi koji nastaju tokom života takođe povećavaju rizik od nastanka melanoma (Titus-Ernstoff *et al.*, 2005).

UV zračenje izaziva oksidativni stres i oštećenja na molekulu DNK. Pored toga, poseduje mutageno i imunosupresivno dejstvo, što prouzrokuje starenje kože i nastanak malignih tumora. Postoje dva tipa UV zraka: UVA i UVB zraci. UVA zraci prodiru dublje u kožu od UVB zraka, oštećuju ćelijsku membranu i dovode do formiranja slobodnih radikala. UVB zraci dovode do direktnih oštećenja u molekulu DNK (Narayanan *et al.*, 2010).

Promene u veličini, obliku, boji ili teksturi mladeža i drugih lezija na koži, kao i pojava novih izraslina su bitni klinički znaci nastanka melanoma. Melanom se može

javiti na svim mestima u organizmu gde se nalaze melanociti. U 80% slučajeva javlja se na koži, u 19% slučajeva u srednjoj očnoj ovojnici oka (uvealni melanom), dok se u mukozni digestivnog trakta, urogenitalne regije, gornjeg respiratornog trakta, mekih moždanih ovojnica javlja sa učestalošću od 1%. Maligni melanom iako čini svega 4% svih kancera kože, odgovoran je za 65% smrtnih slučajeva vezanih za maligna oboljenja kože (Cummins *et al.*, 2006). Takođe, veoma bitna karakteristika melanoma je sklonost ka ranom metastaziranju. Metastatski melanom je veoma agresivan sa preživljavanjem od 6 do 9 meseci.

1.4.2 Molekularna osnova malignog melanoma

Proces neoplastične transformacije ne obuhvata melanozome tako da se ćelije melanoma ne razlikuju od netrasformisanih melanocita u pogledu produkcije melanina. Maligno transformisane melanocite karakteriše povećanje jedra, koje dobija nepravilan oblik i veći broj jedaraca lociranih uz jedarni ovoj (Jara *et al.*, 1990).

Epidemiološko-genetičke studije pokazale su da više od trećine malignih melanoma nastaju kao posledica mutacija u genu za ciklin zavisni kinazni inhibitor 2A (eng. *cycline-dependant kinase inhibitor 2A*, CDKN2A). Ovaj gen kodira dva proteina: inhibitor ciklin zavisne kinaze 4 (eng. *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*, INK4A označen i kao p16INK4A) i ARF (eng. *alternate open reading frame*, p14ARF). Oba proteina uključena su u procese regulacije ćelijskog ciklusa. Protein p16INK4A blokira ćelijski ciklus u G₁ fazi. Enzimski kompleks ciklin zavisne kinaze 4 (eng. *cycline-dependant kinase*, CDK4) i ciklina D pozitivno reguliše ćelijski ciklus fosforilacijom retinoblastoma proteina (Rb). Protein p16INK4A vezuje se za CDK4, narušava ovaj kompleks i inhibira fosforilaciju proteina Rb čime negativno reguliše ćelijski ciklus (Sherr, 1996). Naime, nefosforilisani Rb protein inhibira biološku aktivnost regulatornog proteina E2F koji učestvuje u regulaciji ekspresije gena čiji su proteinski produkti uključeni u procese prelaska ćelije iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa (Ross *et al.*, 1999; Harbour i Dean, 2000). Gubitak funkcije p16INK4A proteina, kao posledica mutacija u genu koji kodira CDKN2A, dovodi do hiperfosforilacije proteina Rb i nekontrolisane proliferacije ćelija. Protein p14ARF ima ulogu u procesima koji dovode do zastoja u G₁ fazi ćelijskog ciklusa i to stabilizacijom proteina p53 (Pomerantz *et al.*,

1998; Zhang *et al.*, 1998).

Mutacije u genu *CDK4*, takođe predstavljaju faktor rizika za pojavu melanoma. Najčešće, mutacije u ovom genu pogađaju domen odgovoran za protein-protein interakcije sa proteinom p16. Bez mogućnosti vezivanja p16, CDK4 formira kompleks sa ciklinom D, blokira fosforilaciju proteina Rb i omogućava prelazak ćelije iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa (Bloethner *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2002).

Protein MDM2 ima sposobnost formiranja heterodimera sa proteinom p53 što za posledicu ima njegovu inaktivaciju. Rezultati studija su pokazali da mutacije u genu koji kodira za MDM2 kod žena ispod 50 godina starosti povećavaju rizik za nastanak melanoma (Firoz *et al.*, 2009).

Jedan od ključnih proteina u procesu regulacije boje kože i kose kod sisara je melanokortinski receptor 1 (MC1R) koji je lociran na plazma membrani melanocita. Za ovaj receptor vezuje se α -melanocitni stimulišući hormon (eng. *α -melanocyte stimulating hormone*, α -MSH). Kod čoveka gen MC1R sastoji se od jednog egzona lociranog na hromozomu 16q24.3 (Bloethner *et al.*, 2009). Osnovna funkcija ovog proteina je kontrola produkcije melanina. MC1R gen je visoko polimorfan i pokazano je da ljudi svetle puti najčešće poseduju p.D84E, p.R151C, p.R160W i p.D294H alele koji su povezani sa smanjenom produkcijom eumelanina što značajno povećava rizik od nastanka melanoma (Beaumont *et al.*, 2008).

Melanom takođe karakteriše i aktivacija MAP (eng. *Mitogen Activated Protein Kinase*) signalnog puta koji je, pored ostalog, uključen u regulaciju procesa apoptoze post-translacionom fosforilacijom apoptotskih proteina kao što su Bad, kaspaza 9 i Bcl-2 (McCubrey *et al.*, 2007). Nekontrolisana aktivacija ovog signalnog puta je uglavnom posledica mutacija u genima *BRAF* ili *N-RAS* (Satyamoorthy *et al.*, 2003). Gen *BRAF* je mutiran u brojnim malignim tumorima, kao što su melanom, karcinom debelog creva i karcinom jajnika (Davies *et al.*, 2002). Geni familije RAS mutirani su u oko 30% svih malignih tumora kod čoveka. Mutacije u genu *N-RAS* česte su kod akutnih mijeloidnih leukemija i melanoma (Bos, 1989).

1.4.3 Lečenje malignog melanoma

Maligni melanom predstavlja izazov za dermatologe, onkologe i molekularne biologe kako zbog visoke i rastuće učestalosti tako i zbog loše prognoze (Bhatia *et al.*, 2009). Pored toga, melanom karakteriše i veoma kompleksna rezistencija na primenjenu anti-tumorsku terapiju. U slučaju ovog malignog tumora nije prisutna samo tzv. stečena rezistencija koja se razvija tokom ili posle terapije, već i inherentna rezistencija koja je posledica same maligne transformacije melanocita (Rass i Hassel, 2009).

Tri najčešća pristupa u lečenju malignih oboljenja su: hirurško odstranjivanje tumora, hemoterapija i radioterapija. Izbor tretmana zavisi od tipa tumora i stadijuma u kojem se nalazi (Baskar *et al.*, 2012).

Hirurško odstranjivanje melanoma je veoma uspešno kod tumora dijagnostifikovanih u početnoj fazi razvoja bolesti. Preživljavanje duže od 5 godina je konstatovano kod 90 do 95% pacijenata nakon hirurškog zahvata (Danialan *et al.*, 2012).

Citostatici su hemijske supstance sa antiproliferativnim dejstvom koje se koriste u hemoterapiji kako bi se zaustavio rast malignih ćelija. Već više od 30 godina u terapiji metastatskog melanoma koristi se dakarbazin (DTIC) kao jedini hemoterapeutik prihvaćen od strane američke državne komisije za lekove i hranu (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) u tretmanu ove bolesti. Pozitivan odgovor na tretman ovim citostatikom postoji kod 15 do 20% pacijenata, dok se remisija javlja kod manje od 5% pacijenata u trajanju od nekoliko meseci (Tentori *et al.*, 2013). Pored njega u terapiji se takođe koristi i njegov oralni analog temozolomid, a u nekim zemljama Evrope u upotrebi je fotemustin (FM) (Friedman *et al.*, 2000; Quéreux i Dréno, 2011).

S obzirom da je odgovor melanoma na klasičnu hemoterapiju loš, poslednjih godina se intenzivno radi na proučavanju molekularnih mehanizama i signalnih puteva vezanih za melanom, sa ciljem razvijanja novih strategija za prevazilaženje rezistencije melanoma (Qin *et al.*, 2006; Machnicki i Stoklosa, 2014; Homet i Ribas, 2014). Vemurafenib (Zelboraf, Roche) i dabrafenib (Tafinlar, GlaxoSmithKline) su BRAF inhibitori odobreni od strane FDA pre dve godine i nalaze se u kliničkoj primeni kod pacijenata koji nose mutaciju u genu *BRAF*. Trametinib (Mekinist, GlaxoSmithKline),

takođe odobren od strane FDA, predstavlja specifični inhibitor kinaza signalnog puta MAP (MEK1 i MEK2). Rezultati skorašnje studije pokazuju da trametinib u kombinaciji sa dabrafenibom daje bolje rezultate u terapiji malignog melanoma u odnosu na primenu pojedinačnih agenasa (Flaherty *et al.*, 2012).

Radioterapija u većini slučajeva prati kako hiruški pristup tako i hemoterapiju. Primjenjuje se na dva načina, kao spoljašnja i unutrašnja radioterapija. Spoljašnja radioterapija (teleterapija) podrazumeva da se izvor jonizujućeg zračenja nalazi na određenoj udaljenosti od pacijenta dok se kod unutrašnje terapije (brahiterapije) izvor jonizujućeg zračenja u obliku kapsule koja sadrži izotope postavlja u neposrednu blizinu tumora (Baskar *et al.*, 2012; Fogarty i Hong, 2014).

Cilj radioterapije je da primenjena doza zračenja dovede do oštećenja ćelija tumora uz istovremeno minimalno oštećenje okolnog zdravog tkiva (Fukumura *et al.*, 2009). Upravo ovakav način eliminacije ćelija omogućava protonsko zračenje. Prednosti protonske terapije u odnosu na konvencionalno zračenje su posledica fizičkih osobina protona, kao što su dobro definisan domet, relativno malo bočno rasejanje i visoka depozicija energije na samom kraju dometa. Ideja o upotrebi protona u terapiji kancera potiče još iz 1946. godine od Roberta Wilson-a. Prva klinička upotreba protona je realizovana na Berkliju, SAD, 1954. godine u tretmanu tumora hipofize a ubrzo potom i u Evropi, 1957. godine u Upsali, Švedska. 1990. godine pri Loma Linda Univerzitetu u Kaliforniji izgrađen je prvi medicinski centar za protonsku terapiju (Slater, 2006). Do kraja 2013. godine protonskoj terapiji podvrgnuto preko 105000 pacijenta u 42 centara za protonsku terapiju širom sveta (Jermann, 2014). Trinaest centara za protonsku terapiju se nalazi u SAD a 29 centara u 14 drugih zemalja (Rusiji, Švajcarskoj, Švedskoj, Engleskoj, Francuskoj, Južnoafričkoj Republici, Kanadi, Nemačkoj, Japanu, Italiji, Kini, Južnoj Koreji i Poljskoj, Češka). Još 13 postrojenja za protonsku terapiju je u izgradnji u Švajcarskoj, Austriji, Italiji, Kini, Nemačkoj, Tajvanu, Rusiji, Slovačkoj, Švedskoj i SAD (Foote *et al.*, 2012). Pored sarkoma, tumora mozga, pluća, glave i vrata, dojke, prostate i drugih solidnih tumora terapija protonima ima značajnu primenu u terapiji različitih tumora oka (MacDonald *et al.*, 2006; Foote *et al.*, 2012). Upravo za tretman tumora oka protonskim snopom je dizajnirano CATANA (Centro di AdroTerapia e Applicazioni Nucleari Avanzate) terapijsko postrojenje u Istituto Nazionale di Fisica Nucleare – Laboratori Nazionali del Sud (INFN – LNS) u

Kataniji, u Italiji (Spatola *et al.*, 2003). U ovom terapijskom postrojenju je od 2002. godine do danas tretirano oko 300 pacijenata, od čega je najveći broj sa melanomom oka. Podaci koji se odnose na pacijente koji su dalje praćeni, pokazuju da je procenat preživljavanja veoma visok i iznosi 97%.

* * * * *

Kao model sistem u ovoj doktorskoj disertaciji korišćena je HTB140 ćelijska linija melanoma čoveka. Prethodni eksperimenti na ovoj ćelijskoj liniji su pokazali visok nivo rezistencije ovih ćelija na γ i protonsko zračenje (Petrović *et al.*, 2006; Ristić-Fira *et al.*, 2007; Ristić-Fira *et al.*, 2008; Todorović, 2009; Petrović *et al.*, 2010). Pored toga ova ćelijska linija je rezistentna i na tretmane alkilirajućim agensima (fotemustin i dakarbazin), kao i na kombinovane tretmane protonskim zračenjem sa ovim alkilirajućim agenasima (Petrović *et al.*, 2007; Korićanac *et al.*, 2007; Ristić-Fira *et al.*, 2008; Ristić-Fira *et al.*, 2009; Korićanac, 2009). S obzirom da je zračenje jonima ugljenika pokazalo efikasnost u eliminaciji radio-rezistentnih tumora (Kraft, 2009; Brower, 2009; Peschke *et al.*, 2011) HTB140 ćelijska linija melanoma čoveka je odabrana za ispitivanje inhibitornog efekta jona ugljenika u *in vitro* uslovima.

2. CILJ RADA

Zračenje jonima ugljenika ima niz prednosti u poređenju sa konvencionalnom i protonskom radioterapijom. Zahvaljujući fizičkim svojstvima jona ugljenika, moguće je vrlo precizno ozračivanje tumora uz veoma malo oštećenje okolnog zdravog tkiva, kako zbog same raspodele doze duž Bragg-ove krive (maksimum doze predaje se u okviru Bragg-ovog vrha), tako i zbog malog lateralnog (bočnog) rasejanja. Visoke RBE vrednosti koje postižu joni ugljenika daju prednost ovom tipu zračenja, kako u odnosu na konvencionalno tako i na protonsko zračenje.

HTB140 ćelije predstavljaju visoko radio-rezistentne ćelije sa vrednošću SF2 od 0.93 posle ozračivanja γ zracima (Petrović *et al.*, 2006; Petrović *et al.*, 2010). Ove ćelije su takođe pokazale rezistentnost na protonsko zračenje, kao i na alkilirajuće agense dakarbazin i fotemustin (Petrović *et al.*, 2006; Ristić-Fira *et al.*, 2009). Najčešći uzrok rezistencije ćelija predstavljaju poremećaji na nivou apoptoze i ćelijskog ciklusa.

Imajući u vidu navedene podatke osnovni cilj ovog rada je bio ispitivanje inhibitornog efekta jona ugljenika na visoko radio-rezistentne HTB140 ćelije melanoma čoveka *in vitro*. Analiziran je uticaj jona ugljenika koji su imali različite vrednosti LET-a (84.7, 197.2 i 382.4 keV/ μ m) na radiobiološke parametre koji određuju efikasnost zračenja u eliminaciji HTB140 ćelija melanoma čoveka. Uticaj zračenja jonima ugljenika je praćen na sledeće načine:

- Ispitivanje i poređenje efekata γ zračenja i zračenja jonima ugljenika na klonogeno preživljavanje HTB140 ćelija melanoma čoveka;
- Određivanje radiobioloških parametara HTB140 ćelija: parametara fitovanja α i β , koji se dobijaju iz najbolje fitovane krive korišćenjem linearno-kvadratnog modela, frakcije preživljavanja za dozu 2 Gy (SF2) i radiobiološke efektivnosti zračenja (RBE);
- Ispitivanje efekta zračenja jonima ugljenika na vijabilnost HTB140

ćelija melanoma čoveka;

- Ispitivanje efekta zračenja jonima ugljenika na proliferativnu aktivnost HTB140 ćelija melanoma čoveka;
- Ispitivanje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa posle ozračivanja jonima ugljenika;
- Ispitivanje efekta zračenja jonima ugljenika na indukciju apoptotske ćelijske smrti HTB140 ćelija melanoma čoveka i analiza apoptotskog signalnog puta indukovano zračenjem jonima ugljenika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Ćelijska linija

U ovom radu je korišćena ćelijska linija melanoma čoveka Hs 294T, nabavljena iz kolekcije ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, SAD) sa kataloškom oznakom ATCC[®]HTB-140[™].

3.1.2 Hemikalije

Sve hemikalije korišćene u ovom radu su p.a. (pro analisi) stepena čistoće. Od firme Sigma-Aldrich Company, Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka, nabavljeni su tripsin, etilendiamino tetrasirćetna kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), etilen glikol tetrasirćetna kiselina (eng. *ethylene glycol tetraacetic acid*, EGTA), trihlorsirćetna kiselina (eng. *trichloroacetic acid*, TCA), propidijum jodid (PI), Tris baza, albumin govedeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA), natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), natrijum-deoksiholat, natrijum ortovanadat (Na₃VO₄), Folin reagens, akrilamid, bisakrilamid, glicin, β-merkaptolanol, brom fenol plavo, PonceauS, Tween 20 i dietilpirokarbonat (DEPC).

Ćelije su gajene u standardnoj podlozi RPMI 1640 sa dodatkom fetalnog telećeg seruma (eng. *foetal calf serum*, FCS) i penicilin/streptomycin smeše koji su svi proizvod Sigma-Aldrich Company.

Od firme SERVA electrophoresis, Heidelberg, Nemačka, su nabavljene sledeće hemikalije: ditiotreitrol (DTT), spermidin, aprotinin, antipain, leupeptin, fenilmetilsulfonil hlorid (PMSF), amonijum persulfat (APS) i N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED).

Komercijalni kompleti kompanije Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemačka, su korišćeni za praćenje ćelijske vijabilnosti (Cell Proliferation Kit I, MTT esej) i za test proliferacije (Cell Proliferation ELISA, BrdU-colorimetric). Za praćenje ćelijske vijabilnosti je takođe korišćena i boja sulforodamin B (MP Biomedicals, Eschwege, Nemačka).

Totalna RNK je izolovana iz ćelija korišćenjem Qiagen RNeasy Total RNA Preparation Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka). Za prepisivanje RNK u cDNK korišćen je *The RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* firme Fermentas, Vilnius, Litvanija. Hemikalije korišćene za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) su proizvodi firme Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD, a korišćeni „prajmeri” su proizvodi firme Metabion, Martinsried, Nemačka.

Za hemiluminiscentnu detekciju proteina korišćen je ECL (eng. *enhanced chemiluminescence*) supstrat čiji sastojci, luminol i p-kumarična kiselina su proizvodi firme Sigma Chemical Company.

Metanol, sirćetna kiselina, sumporna kiselina i glicerol su nabavljeni od firme Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija, dok je Giemsa proizvod Alkaloid a.d., Skopje, Makedonija.

3.1.3 Antitela

Antitela korišćena u Western blot analizi su od sledećih proizvođača: zečija poliklonska antitela na Bax (#2772), Bcl-2 (#2876), p53 (#9282), NFκB p65 (#3034) i PARP (#9542) su proizvod firme Cell Signaling, Technology, Inc. Danvers, MA, SAD. Zečije poliklonsko antitelo na β-aktin (A2066) je proizvod firme Sigma-Aldrich Company. Sekundarno kozje anti-zečije IgG antitelo (#7074) obeleženo peroksidazom iz rena (eng. *horse-radish peroxidase*, HRP) je takođe proizvod firme Cell Signaling.

3.1.4 Puferi

Fosfatno puferisani fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffer saline*, PBS), pH 7.4: 0.137 M NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 16.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl.

2 x Laemmli pufer: 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% β-merkaptoetanol, 4% SDS, 1% brom fenol plavo i 20% glycerol.

SDS pufer za elektroforezu: 25 mM Tris baza, 192 mM glicin i 0.1% SDS.

Transfer pufer: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin i 20% metanol.

PBS-T pufer: 0.1% Tween 20 u PBS puferu.

Svi puferi su pripremani po procedurama navedenim u knjizi *Molecular Cloning- A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2 METODE

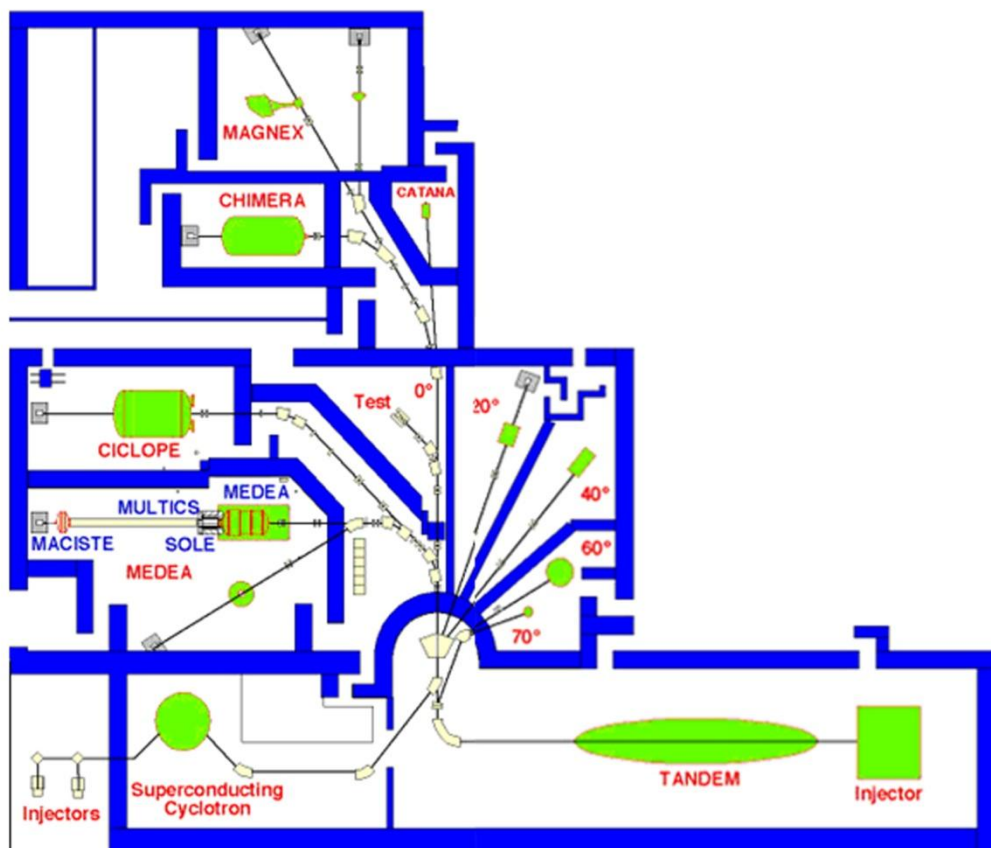
3.2.1 Gajenje ćelija u kulturi

Melanomske HTB140 ćelije čoveka su gajene kao jednoslojne kulture u RPMI 1640 podlozi sa dodatkom 10% FCS i smeše penicilina (5000U) i streptomocina (5 mg/ml u 0.9% natrijum hloridu), u vlažnoj atmosferi (95%) sa 5% CO₂ na temperaturi od 37 °C (Haeraus, Manheim, Germany). Za gajenje ćelija korišćeni su plastični flaskovi površine 25 cm² (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Nemačka). U ovim uslovima efikasnost zasejavanja za HTB140 ćelije je 62 ± 7.3%. Konfluentne ćelije su od površine flaska odvajane pomoću smeše 0.25% tripsina i 0.53 mM EDTA u PBS-u i subkultivisane dva puta nedeljno.

3.2.2 Uslovi zračenja

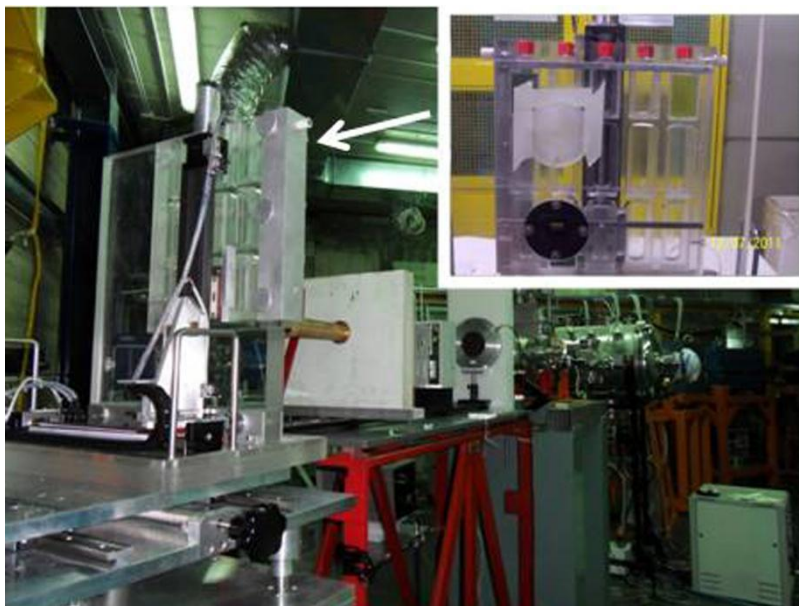
Za zračenje su korišćeni joni ugljenika koji su ubrzani na energiju od 62 MeV/n u superprovodnom ciklotronu u Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori

Nazionali del Sud (INFN - LNS), Katanija, Italija. Neposredno ozračivanje je urađeno na kanalu 0° , koji je jedan od 12 eksperimentalnih linija za transport jonskih snopova za primene u fizici, hemiji, biologiji i medicini (Slika 8).



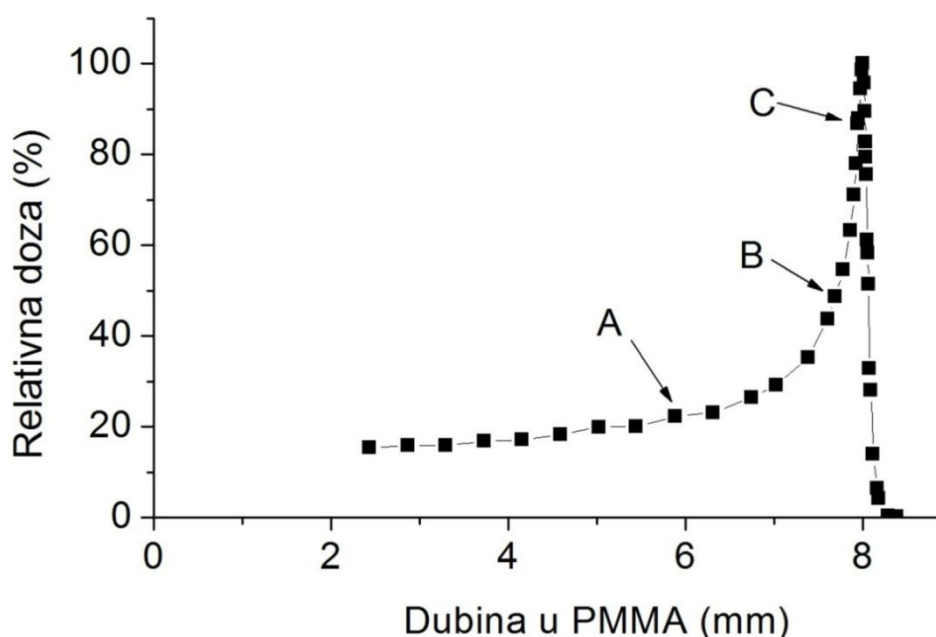
Slika 8. Šematski prikaz eksperimentalnih linija za transport jonskih snopova u INFN-LNS. Preuzeto sa internet stranice www.lns.infn.it.

Flaskovi sa konfluentnim monoslojem HTB140 ćelija su fiksirani, u vertikalnom položaju normalnom na pravac snopa. Za ovu namenu projektovan je poseban nosač koji se pomoću elektromotora automatski pomera u horizontalnom i vertikalnom pravcu (Slika 9). Preciznost pomeranja je $50\ \mu\text{m}$. Sva ozračivanja su izvedena na sobnoj temperaturi.



Slika 9. Eksperimentalna linija za zračenje jonima ugljenika sa prikazom posebno dizajniranog nosača u kome su flaskovi sa ćelijskim monoslojem fiksirani tokom zračenja, u vertikalnom položaju normalnom na pravac snopa (fotografije Tanje Bulat).

Položaji na Bragg-ovoj krivoj u kojima su ćelije ozračene su dobijeni postavljanjem Perspex ploča (Polymethyl methacrylate – PMMA) različite debljine između finalnog kolimatora i ćelijskog monosloja. Tako su dobijena tri položaja na dubinama od: 6.0 mm (A), 7.7 mm (B) i 7.9 mm (C), koja su prikazana na slici 10.



Slika 10. Raspodela doze u funkciji dubine prodiranja snopa jona ugljenika od 62 MeV/n u Perspex-u. Strelice pokazuju pozicije zračenja koje odgovaraju vrednostima LET-a od 84.7 keV/μm (pozicija A), 197.2 keV/μm (pozicija B) i 382.4 keV/μm (pozicija C).

Odgovarajuće rlativne doze u pozicijama A, B i C iznosile su 22.1 ± 1.4 %, 49.0 ± 3.9 % i 87.5 ± 5.7 %. U ovim pozicijama vrednosti LET-a su iznosile: 84.7, 197.2 i 382.4 keV/μm. Energija (E) i LET vrednosti su izračunate numeričkim simulacijama GEANT4 (GEometryANd Tracking) računarskim programom (GEANT4, 1998) i prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Procenat doze, energija i LET u pozicijama A, B i C na Bragg-ovoj krivoj




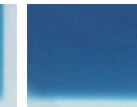


Pozicija zračenja	Dubina u PMMA (mm)	Relativna doza (%)	E (MeV/n)	LET (keV/μm)
A	6.0	22.1 ± 1.4	328.7 ± 6.3	84.7 ± 0.8
B	7.7	49.0 ± 3.9	117.1 ± 2.6	197.2 ± 1.8
C	7.9	87.5 ± 5.7	56.4 ± 1.1	382.4 ± 3.2

Referentna dozimetrija je izvedena pomoću Markusove jonizacione komore

(Advanced Markus Chamber, 0.02 cm², Type 34045, Physikalisch-Technische Werkstätten - PTW Freiberg, Nemačka) koja je kalibrisana prema pravilima International Atomic Energy Agency Technical Report Series (IAEA-TRS-398, 2000; Cirrone *et al.*, 2004; Petrović *et al.*, 2006). Primenjene su doze od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Prosečna brzina doze je iznosila 11.03 ± 0.27 Gy/min.

S obzirom da je Bragg-ov vrh veoma uzak, preciznost postavljanja uzoraka u izabrane položaje je proveravana, pre i posle ozračivanja, korišćenjem GafChromic HS (high sensitivity) filmova (Signal Processing - ISP Technologies, Wayne, New Jersey, SAD) umesto ćelijskog monosloja. Relativne optičke gustine ozračenih filmova očitavane su pomoću aparata Epson Scan Expression 1680, koristeći transmisionu tehniku očitavanja (tabela 2).

Tabela 2. GafChromic HS filmovi i relativna optička gustina za različite položaje ozračivanja unutar Bragg-ove krive.

GafChromic HS filmovi						
Pozicija zračenja	A	B	C			
PMMA (mm)	1.1	6.0	7.7	7.9	8.1	8.2
Relativna optička gustina	0.29	0.40	0.56	0.66	0.15	0

Ozračivanje HTB140 ćelija γ zracima obavljeno je na ⁶⁰Co izvoru u Institutu za nuklearne nauke Vinča u Beogradu. Ćelije su ozračene na sobnoj temperaturi dozama od 2 do 16 Gy, pri brzini doze od ~ 1 Gy/min.

3.2.3 Određivanje klonogenog preživljavanja

Klonogeni esej predstavlja standardni radiobiološki esej za praćenje efekata

zračenja na preživljavanje ćelija. Nakon ozračivanja jonima ugljenika ili γ zracima, HTB140 ćelije su tripsinizovane i zasejavane u flaskove površine 25 cm². Ćelije su zatim inkubirane 7 dana u standardnim uslovima na 37°C. Posle isteka perioda inkubacije od minimum 6 vremena dupliranja, ćelije su fiksirane hladnim metanolom i bojene rastvorom Giemsa-e. Kao kolonije su brojane grupe od 50 i više ćelija.

3.2.4 Linearno kvadratni model i određivanje relevantnih parametara zakrivljenja fitovane krive (α i β), frakcije preživljavanja za dozu 2 Gy (SF2) i relativne biološke efektivnosti (RBE)

Podaci o klonogenom preživljavanju HTB140 ćelija melanoma čoveka dobijeni su brojanjem formiranih kolonija 7 dana nakon ozračivanja ćelija.

Frakcija preživljavanja (eng. *surviving fraction*, SF), koja predstavlja jedan od kriterijuma za određivanje radio-osetljivosti normalnih i maligno transformisanih ćelija, određena je na osnovu formule:

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

U ovoj formuli PE označava efikasnost zasejavanja (eng. *plating efficiency*) i predstavlja odnos broja formiranih kolonija i zasejanih ćelija u neozračenim kulturama.

Krive preživljavanja predstavljaju najbolje fitovanje eksperimentalnih tačaka frakcija preživljavanja pomoću linearno kvadratne jednačine:

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

U ovoj formuli S predstavlja frakciju preživljavanja za dozu D, a α i β su parametri fitovanja. Parametar α definiše početni nagib krive, dok parametar β definiše

njen završni deo (Fowler, 2005). Frakcija preživljavanja za dozu od 2 Gy (SF2) dobijena je iz najbolje fitovane krive preživljavanja.

Na osnovu dobijenih podataka o ćelijskom preživljavanju određena je RBE vrednost zračenja jonima ugljenika u odnosu na γ zračenje od 2 Gy.

3.2.5 Određivanje ćelijske vijabilnosti pomoću MTT eseja

Za optimizaciju uslova eksperimenta korišćen je kolorimetrijski MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) esej. Esej je raden po uputstvu proizvođača (Roche) a zasniva se na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da prevedu žutu tetrazolijumsku so MTT u purpurne kristale formazana. Različite gustine ćelija ($1 \times 10^3 - 10 \times 10^3$) su zasejavane u bunare na ploči sa 96 bunara (Greiner Bio-One). Ćelije su zatim gajene u standardnim uslovima na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Po isteku odgovarajućeg vremena inkubacije (1-9 dana) u bunare je dodavan rastvor MTT-a, a nakon 4 h na 37 °C i rastvarač (Solubilisation Solution, 10% SDS u 0.01 M HCl). Ploče sa ćelijama su ostavljene preko noći u standardnim uslovima u CO₂ inkubatoru. ApSORBANCA uzoraka je merena na ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) čitaču (Wallac, Victor2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finland) na talasnoj dužini od 550 nm. Referenta vrednost je merena na talasnoj dužini od 690 nm.

3.2.6 Određivanje ćelijske vijabilnosti pomoću SRB eseja

Za određivanje vijabilnosti ćelija nakon ozračivanja jonima ugljenika korišćen je kolorimetrijski sulforodamin B (SRB) esej koji je izveden po proceduri Skehan-a i saradnika (Skehan *et al.*, 1990). Ovaj esej se zasniva na merenju mase ukupnih ćelijskih proteina koja je proporcionalna broju ćelija. SRB boja se vezuje za bazne amino kiseline u proteinima omogućavajući njihovu kolorimetrijsku detekciju. Ćelije su nakon ozračivanja odvajane od površine flaska smešom tripsina i EDTA i po 3×10^3 ćelija je zasejavano u svaki bunar na ploči sa 96 bunara (Greiner Bio-One). Ćelije su zatim gajene u standardnim uslovima na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Nakon isteka vremena inkubacije od 48 h ili 7 dana ćelijski monosloj je fiksiran hladnom (+4 °C)

10% TCA a zatim obojen rastvorom 0.4% SRB-a u 1% sirćetnoj kiselini. Posle 15 min višak boje je odstranjen ispiranjem monosloja 5 puta 1% sirćetnom kiselinom. Vezana boja je rastvorena u 10 mM Tris-u i izmerena je apsorbancu u ELISA čitaču (Wallac, Victor2) na 550 nm. Referenta vrednost je merena na talasnoj dužini od 690 nm.

3.2.7 Određivanje ćelijske proliferacije

Za određivanje ćelijske proliferacije je korišćena metoda koja se bazira na merenju inkorporacije 5-bromo-2-deoksiuridina (BrdU) u toku sinteze DNK. Prisustvo BrdU je određivano kolorimetrijski, pomoću komercijalnog kompleta (Roche). Ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta su ozračivane jonima ugljenika. Nakon ozračivanja ćelije su prebacivane u ploče sa 96 bunara (Greiner Bio-One) i gajene u standardnim uslovima na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Dva sata pre isteka vremena inkubacije od 48 h ili 7 dana, ćelije su obeležene BrdU-om finalne koncentracije 10 μM. Ćelije su zatim fiksirane i inkubirane u prisustvu anti-BrdU-POD antitela 90 min. Nakon inkubacije odstranjeno je nevezano antitelo a u svaki bunar je dodat rastvor supstrata i inkubiran na sobnoj temperaturi ~15 minuta, tj. do razvijanja boje za fotometrijsku reakciju. Reakcija je stopirana rastvorom 1 M H₂SO₄. Apsorbancu je merena u roku od 5 min na 450 nm, sa referentnom talasnom dužinom na 690 nm, na ELISA čitaču (Wallac, Victor2).

3.2.8 Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze

Za analizu distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa korišćena je citofluorimetrijska metoda. Metoda se zasniva na činjenici da ćelije u različitim fazama ćelijskog ciklusa sadrže različitu količinu DNK. Za obeležavanje ćelija je korišćena fluorescentna boja PI, koja se ugrađuje u molekul DNK i fluorescira u narandžasto-crvenoj boji. Intenzitet fluorescencije PI proporcionalan je sadržaju DNK u ćeliji i ukazuje u kojoj fazi ćelijskog ciklusa se ćelija nalazi. Takođe, modifikacija ove metode poznata kao Nicoletti esej se koristi za detekciju i merenje apoptoze, analizom ćelija sa sadržajem DNK manjim od 2n (sub-G₁ ćelije). Ovakve ćelije su uglavnom rezultat fragmentacije DNK tokom apoptoze, od strane ćelijskih endonukleaza (Nicoletti *et al.*,

1991). Zbog toga se na grafičkom zapisu FACS (eng. *Fluorescence Activated Cell Sorter*) analize može uočiti vrh ispred G₀/G₁ ćelija, označen kao sub-G₁. Na ovaj način se istovremeno sa analizom ćelijskog ciklusa dobijaju i podaci o procentu apoptotičnih ćelija.

Prvi korak u pripremi uzoraka je permeabilizacija ćelijske membrane fiksacijom preko noći u etanolu, jer većina boja koje se vezuju za DNK nije sposobna da prođe kroz nju. Nako toga su ćelije bojene pomoću PI u prisustvu Ribonukleaze A, enzima koji razgrađuje RNK. Na ovaj način se PI vezuje samo za DNK i onemogućava se stvaranje lažnih rezultata vezivanjem PI za RNK. Ćelije su nakon toga analizirane pomoću citofluorimetra (Coulter EPICS XL; Beckman Coulter). Za svaki uzorak je analizirano približno 10000 ćelija. Dobijeni podaci su obrađeni pomoću XL SYSTEM II programa za analizu uzoraka.

3.2.9 Izolacija ukupnih ćelijskih proteina

Izolacija ukupnih proteina iz HTB140 ćelija izvođena je u puferu za liziranje koji sadrži 50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄ i proteazne inhibitore (0.15 mM spermidin, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml antipain i 10 mM PMSF). Ćelije su nakon tretmana zračenjem prikupljane a zatim inkubirane 1 h na ledu (+4 °C) u puferu za liziranje i nakon toga lizirani uzorci su centrifugirani 20 minuta na 13000 g na temperaturi od +4 °C.

3.2.10 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je metodom po Lowry-ju (Lowry *et al.*, 1951). Ova metoda se koristi kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 5 do 50 µg/ml. Standard za određivanje koncentracije proteina je BSA, od koga je pripremljen osnovni rastvor koncentracije 50 µg/ml. Od ovog rastvora je pripremljeno pet razblaženja koncentracija 5, 10, 20, 30, 40 i 50 µg/ml. Zatim su za svaki uzorak i različita razblaženja standarda urađena po tri merenja. Merenja su urađena

dodavanjem 2.5 ml reagensa A (reagens A - 1 ml 1% CuSO₄, 1 ml 2% KNa-tartarata i 98 ml 2% Na₂CO₃ u 0.1 M NaOH) u 1 ml uzorka ili standarda, nakon čega je smeša inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. U tu smešu je nakon inkubacije dodato 160 µl Folin-Ciocalteu reagensa i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije očitana je apsorbancija na 750 nm (OD_{750nm}). Od očitanih vrednosti standarda je konstruisana standardna kriva i sa nje je određena koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD_{750nm} za uzorak.

3.2.11 Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Prvi korak u imuno-blot proceduri je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisustvu deterdženta natrijum dodecil sulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), po modifikovanoj metodi Laemmlija (Laemmli, 1970). Ova specifična elektroforetska tehnika obezbeđuje razdvajanje proteina po molekularnoj masi. Proteini su razdvajani na 10% poliakrilamidnom denaturišućem gelu (1.5M Tris-HCl pH 8.95, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H₂O) u puferu za elektroforezu. Uzorci proteina (20 µg) su pripremani u jednakoj zapremini 2 x Laemmli pufera, zagrevani 5 min na ~100 °C kako bi se proteini potpuno denaturisali. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni u bunariće i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom na aparatu Mini Protein Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) pri konstantnom naponu od 100 V. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za imuno blot analizu. Radi lokalizovanja ispitivanih proteina po završetku elektroforeze kao molekularni marker korišćen je Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas), koji se sastoji od 9 proteina različitih molekularnih masa (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 i 10 kDa).

3.2.12 Imuno blot (Western blot)

Po završetku razdvajanja proteina elektroforezom na gelu, izvođena je imuno blot (Western blot) analiza za prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF (eng.

Polyvinylidene Difluoride) membranu (Immobilon-P Transfer Membrane, veličine pora 0.45 μm , Millipore Corporation, Bedford, SAD) i detekciju specifičnih proteina u proteinskim lizatima melanomskih ćelija čoveka. Identifikacija ispitivanih proteina u uzorcima je vršena na osnovu reakcije sa specifičnim antitelima.

Elektrotransfer razdvojenih proteina sa gelova na membrane vršen je tokom noći pri struji konstantnog intenziteta od 80 mA na $+4^{\circ}\text{C}$ pomoću sistema za transfer (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). PVDF membrane su neposredno pre transfera aktivirane 15 s u metanolu, ispirane u vodi a potom u hladnom transfer puferu. Efikasnost prenosa proteina proveravana je bojenjem membrana 1% rastvorom PonceauS u 3%-noj sirćetnoj kiselini, tokom jednog minuta. Po vizuelizaciji crveno obojenih proteinskih traka, boja PonceauS je ispirana destilovanom vodom i PBS-T puferom. Membrane su zatim inkubirane tokom sat vremena na sobnoj temperaturi, u puferu za blokiranje (5% nemasno mleko u PBS puferu) kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela za PVDF membranu.

Nakon blokiranja, membrane su presećane u nivou traka koje označavaju određene molekulske težine i inkubirane preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$ sa primarnim antitelima na PARP, NF κ B, p53, Bax, Bcl-2 i β - aktin. Sva antitela su bila razblažena u PBS-T puferu sa 2.5% mlekom.

Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 min PBS-T puferom na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon ispiranja membrane su inkubirane 2 h, uz stalno mućkanje, sa sekundarnim kozjim anti-zečijim antitelom konjugovanim sa HRP. Sekundarna antitela razblaživana su do odgovarajućih koncentracija (1:5000 za Bax, Bcl-2, NF κ B, PARP i β – aktin i 1:7500 za p53) u 2.5% nemasnom mleku u PBS-T puferu. Nakon inkubacije, membrane su opet ispirane 3 puta po 10 min u PBS-T puferu, nakon čega je na membrane nanošen reagens za hemiluminescenciju, ECL supstrat. On se dobija mešanjem istih zapremina luminola, p-kumarične kiseline i rastvora vodonik-peroksida, koji u prisustvu HRP enzima na sekundarnom antitelu dovodi do hemijske reakcije (oksidacije luminola) i do oslobađanja energije u obliku svetlosti. Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min, nakon čega su osušene, pokrivene tankom providnom folijom i postavljene u kasete za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD). Detekcija je vršena

u mračnoj sobi sa crvenom svetlošću. Na pokrivene membrane su postavljani rendgen filmovi (AGFA, Medical X-ray film, Belgija), pri čemu je dužina ekspozicije varirala od nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Intenzitet signala na filmu odgovara intenzitetu emitovane svetlosti, a ona količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Kvantifikacija signala je vršena denzitometrijski. Filmovi su skenirani, a optička gustina detektovanih proteinskih traka kvantifikovana je pomoću računarskog programa Image J 1.37 V. software (<http://rsb.info.nih.gov>).

3.2.13 Izolovanje i elektroforetska provera kvaliteta RNK

Izolacija ukupne RNK je obavljena u sterilnim uslovima, na sobnoj temperaturi pomoću komercijalnog kompleta (RNeasy mini kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Metoda se zasniva na specifičnom vezivanju RNK za membranski sistem sa silika gelom u specijalnim kolonama. Nakon zračenja ćelije su gajene 48 h u flaskovima površine 25 cm² pod standardnim uslovima. Čelijski monosloj je ispiran sterilnim PBS-om, ćelije su lizirane RLT puferom i lizat je nanošen na kolonu. Na kolonu je zatim nanošen 70% etanol u dietil pirokarbonat (DEPC) vodi i kolone su centrifugirane 1 min na 15300 g (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Kolone su potom ispirane RW1 puferom i centrifugirane 1 minut na 15300 g nakon čega su sledila dva ispiranja RPE puferom praćena centrifugiranjem 1 minut na 10600 g. Finalno, RNK je isprana sa kolone u sterilnu tubu dodavanjem 50 µl DEPC vode i centrifugiranjem 1 minut na 15300 g. Ovako izolovana RNK je čuvana na -70°C. Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) merenjem apsorbance uzorka na 260 nm. Za određivanje čistoće izolovane RNK je korišćen odnos apsorbance na 260 i 280 nm (OD_{260/280}) dok je za proveru integriteta dobijene RNK rađena elektroforeza ukupne RNK na 2% agaroznom gelu u trajanju od 30 minuta pri konstantnoj voltaži od 80 V.

3.2.14 Reverzna transkripcija

Za prepis RNK u komplementarnu DNK (eng. *Complementary DNA*, cDNK) korišćen je komplet za sintezu cDNK: *The RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). Ukupna RNK izolovana iz kontrolnih i ozračenih HTB140 ćelija (1 µg) inkubirana je sa 1 µl (0.2 µg/µl) heksamera (Random Hexamer Primer) 5 minuta na 70 °C. Nakon toga dodavano je 4 µl pufera (5 x Reaction Buffer for M- MuLV Reverse Transcriptase), 1 µl (20 U/µl) inhibitora RNaze (RiboLock-Ribonuclease inhibitor) i 2 µl 10 mM deoksiribonukleotida (dNTP) po uzorku i inkubirano 5 minuta na 25°C. Nakon toga dodavano je 2 µl (200 U/µl) reverzne transkriptaze (Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase) i inkubirano 1 h na 60 °C. Reakcija je zaustavljena grejanjem na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Dobijena cDNK je čuvana na -20 °C i korišćena je za kvantifikaciju ekspresije gena za Bax, Bcl-2 i NFκB.

3.2.15 Kvantifikacija ekspresije gena

Posle prepisivanja RNK u cDNK urađena je relativna kvantifikacija ekspresije gena za Bax, Bcl-2 i NFκB metodom qRT-PCR. Metoda se zasniva se na standardnoj PCR metodi, u kojoj se željena sekvenca DNK umnožava u ciklusima, tako da početni broj kopija sekvence raste eksponencijalno do 10^9 puta, uz pomoć „prajmera” (oligonukleotidi specifični za početak i kraj DNK sekvence koju umnožavamo) i enzima DNK polimeraze, pri čemu se promene u temperaturi koriste za denaturaciju DNK, kontrolu vezivanja „prajmera” za jednolančanu DNK i kontrolu aktivnosti DNK polimeraze. U svakom ciklusu nakon denaturacije, „prajmer” prepoznaje komplementarnu sekvencu i vezuje se za nju. Nakon što se „prajmer” veže, započinje aktivnost DNK polimeraze. U odnosu na standardni PCR, osnovna prednost ove metode je mogućnost da se PCR amplifikacija prati u realnom vremenu, odnosno informacije o količini ciljnog molekula se dobijaju u svakom ciklusu amplifikacije, a ne samo na kraju procesa.

Reakcija qRT-PCR je izvođena u qRT-PCR aparatu (7500 Real-time PCR System, Applied Biosystems) u pločama sa 96 bunara (MicroAmp Optical, Applied

Biosystems). U svaki bunar je dodavano 5 μ l 2 x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 50 ng uzorka i uzvodni i nizvodni „prajmeri“ za Bax, Bcl-2, Nf κ B i Rpl19 (Metabion) u finalnoj koncentraciji od 50 nm. Ploče su zatvarane optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems) i centrifugirane 1 minut na 3000 g, a zatim smeštane u qRT-PCR aparat. Temperaturni profil reakcije u qRT-PCR aparatu je obuhvatao 2 minuta na 50 °C, 10 minuta na 95 °C, zatim 40 ciklusa u trajanju od po 15 sekundi na 95 °C i po minut na 60 °C. Apsolutne vrednosti ekspresije informacione RNK (iRNK) svih uzoraka su normalizovane u odnosu na ekspresiju Rpl19 gena. Pri svakoj reakciji podešavani su uslovi za određivanje krive topljenja PCR produkta, koja se radi u cilju provere specifičnosti PCR produkta: 15 sekundi na 95 °C, 1 minut na 60 °C, 30 sekundi na 95 °C i 15 sekundi na 60 °C.

U qRT-PCR reakciji korišćeni su specifični „prajmeri“ (Tabela 3) za amplifikaciju Bax, Bcl-2 i NF κ B gena i Rpl19 kao endogene kontrole.

Tabela 3. Sekvence „prajmera“ korišćenih u analizi ekspresije gena za Bax, Bcl-2, NF κ B i Rpl19.

cDNK produkt		Sekvenca „prajmera“	Temperatura hibridizacije (°C)	Dužina PCR produkta (bp)	Reference
Bax	Uzvodni	5'GGGGACGAACTGGACAGTAA -3'	59	122	Yoon i Roh, 2012
	Nizvodni	5'- CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA -3'			
Bcl-2	Uzvodni	5'- ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA -3'	58	136	Yoon i Roh, 2012
	Nizvodni	5'- ACAGTTCCACAAAGGCATCC -3'			
Rpl 19	Uzvodni	5'- TCGCCAATGCCAACTCTC -3'	63	118	Bergenheim, 2007
	Nizvodni	5'- AGCCCGGGAATGGACAGT -3'			
NFκB	Uzvodni	5'-AAACACTGTGAGGATGGGATC-3'	60	141	Cavalcante, 2010
	Nizvodni	5'- CGAAGCCGACCACCATGT -3'			

Standardne krive za svaki par „prajmera“ su određene i korišćene u cilju procene efikasnosti amplifikacije. Efikasnost PCR reakcije je bila slična za sve parove „prajmera“ i kretala se u opsegu 0.96–0.99. Kvantifikacija relativne količine transkripata je određena korišćenjem $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode (Livak i Schmittgen, 2001) i

rezultati su izraženi kao stepen promene u odnosu na kontrolu. Rezultati su analizirani korišćenjem Standard 7500 sistema.

3.2.16 Statistička obrada podataka

Eksperimenti u kojima je praćeno klonogeno preživljavanje su izvedeni u duplikatu i ponovljeni najmanje četiri puta. Svi ostali eksperimenti su rađeni najmanje u duplikatu i ponovljeni su bar dva puta. Dobijeni rezultati su izraženi kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama ($SV \pm SD$). Statistička značajnost razlika između eksperimentalnih grupa određena je Studentovim t-testom sa granicom značajnosti $p < 0.05$.

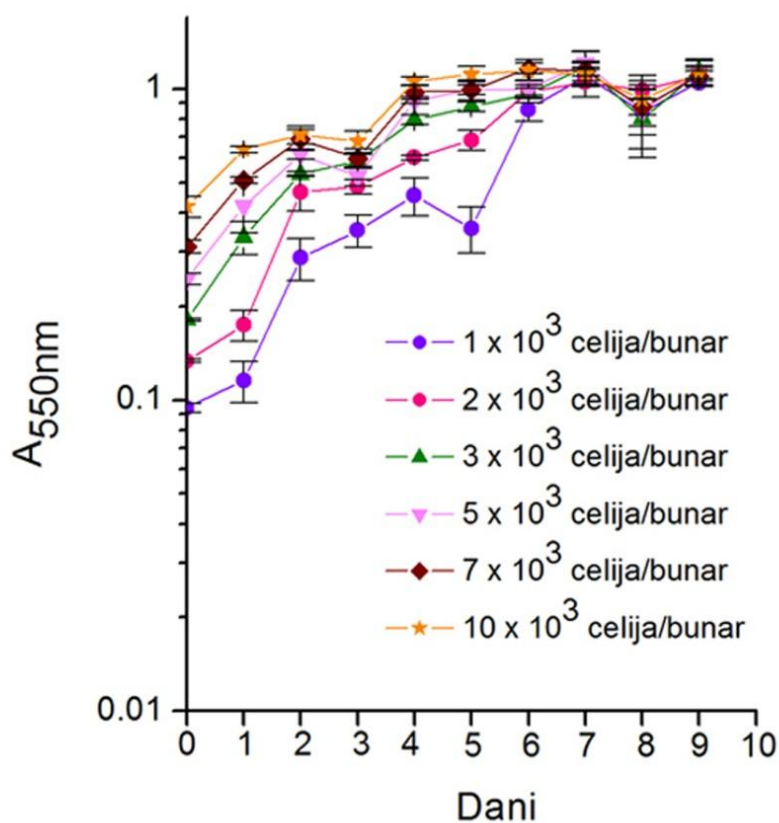
4. REZULTATI

Rezultati koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su deo istraživačkog programa u koji su uključeni Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu, Srbija i Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali del Sud (INFN-LNS), Katanija, Italija. U okviru ovih eksperimenata praćena je inaktivacija ćelija melanoma čoveka zračenjem jonima ugljenika u kulturi.

Kao model sistem u ovom radu je korišćena HTB140 ćelijska linija melanoma čoveka koja je izolovana iz metastaza u limfnim čvorovima pacijenta muškog pola starog 56 godina (Creasey *et al.*, 1979).

4.1 Optimizacija uslova rasta ćelija

Prvi korak u optimizaciji uslova eksperimenta je podrazumevao optimizaciju gustine zasejavanja ćelija u cilju praćenja njihovog rasta. Za potrebe ovog eksperimenta HTB140 ćelije su gajene u mikrotitar pločama sa 96 bunara. Početni broj ćelija se kretao u rasponu od 1000 do 10000 po bunaru. Rast ćelija je praćen pomoću MTT eseja tokom 9 dana, tj. do ulaska ćelija u plato fazu (Slika 11).



Slika 11. Kriva rasta HTB140 ćelija melanoma čoveka

MTT esej karakteriše linearna zavisnost apsorbance od broja ćelija, za vrednosti apsorbance do 1. S obzirom na ovu činjenicu za dalja istraživanja je izabrana početna gustina od 3000 ćelija po bunaru kao najveća analizirana gustina ćelija pri kojoj apsorbance ne prelaze vrednost 1 do 7. dana, do kada su praćeni efekti zračenja.

4.2 Efekat zračenja jonima ugljenika na klonogeno preživljavanje

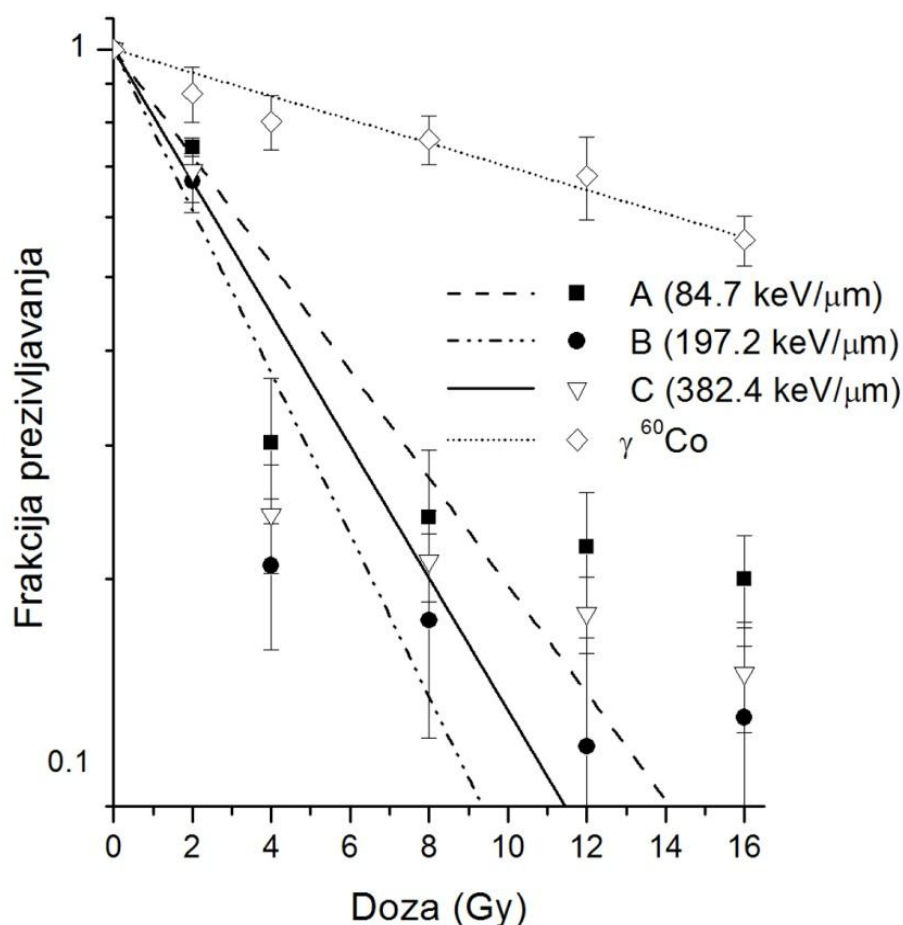
Frakcije preživljavanja HTB140 ćelija melanoma čoveka, koje su dobijene praćenjem klonogenog preživljavanja 7 dana posle ozračivanja γ zracima i jonima ugljenika prikazane su na slici 12. Na slici su prikazane i najbolje fitovane krive, dobijene fitovanjem frakcija preživljavanja pomoću linearno-kvadratne jednačine: $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$, gde S predstavlja frakciju preživljavanja za dozu D , dok su α i β parametri fitovanja. Kako β parametar ima veoma malu vrednost za sve fitovane krive,

linearno-kvadratna jednačina je redukovana samo na njen linearni deo.

Sve primenjene doze u analiziranim pozicijama zračenja jonima ugljenika izazivaju veću inaktivaciju ćelija u odnosu na γ zračenje (Slika 12). Najbolji efekat jona ugljenika na smanjenje preživljavanja ćelija se može konstatovati u poziciji B (LET 197.2 keV/ μ m). Najmanja efikasnost jona ugljenika u eliminaciji malignih ćelija je dobijena u poziciji A (LET 84.7 keV/ μ m). Efikasnost ozračivanja jonima ugljenika analiziranih vrednosti LET-a je ilustrovana parametrom α koji iznosi 0.163 Gy⁻¹ u poziciji A, 0.246 Gy⁻¹ u poziciji B i 0.201 Gy⁻¹ u poziciji C. Vrednost parametra α za primenjeno γ zračenje je 0.036 Gy⁻¹ (Tabela 4).

Analiza podataka o preživljavanju ćelija u okviru svake primenjene pozicije zračenja pokazuje relativno visok gradijent inaktivacije ćelija za doze do 8 Gy. Primena većih doza je dovela do dalje inaktivacije ćelija, ali sa manjim gradijentom. Gradijent inaktivacije ćelija za doze manje od 8 Gy je najveći u poziciji B, a najmanji u poziciji A. Ćelijsko preživljavanje nakon primene većih doza zračenja se ne razlikuje značajno u analiziranim pozicijama. Postojanje dva različita gradijenta inaktivacije ćelija za manje i veće doze prouzrokovalo je smanjenu preciznost fitovanja krivih. Koeficijent određenosti (r^2) definiše se kao količnik sume kvadrata odstupanja opisanih regresionom funkcijom i sume kvadrata odstupanja podataka od aritmetičke sredine, ili kao 1 - količnik sume kvadrata odstupanja koja nisu opisana regresionom funkcijom i sume kvadrata odstupanja podataka od aritmetičke sredine.

Ovaj koeficijent predstavlja relativnu meru preciznosti fitovanja eksperimentalnih podataka. Vrednost r^2 u našem eksperimentu je 0.874 u poziciji A, 0.926 u poziciji B i 0.898 u poziciji C.



Slika 12. Klonogeno preživljavanje HTB140 ćelija melanoma čoveka 7 dana posle ozračivanja γ zracima i jonima ugljenika. Pozicija A odgovara vrednosti LET-a od $84.7 \text{ keV}/\mu\text{m}$, pozicija B vrednosti LET-a od $197.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$, a pozicija C vrednosti LET-a od $382.4 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy.

Frakcija preživljavanja je dobijena iz najbolje fitovanih krivih preživljavanja uz pomoć kompjuterskog programa TableCurve 2D v5.00 (AISN Software). Odgovarajuće vrednosti parametra fitovanja α koji definiše nagib krive, koeficijent određenosti (r^2) i standardna greška fitovanja su prikazani u Tabeli 4. Takođe su prikazane i vrednosti frakcije preživljavanja za dozu od 2 Gy (SF2), koja predstavlja meru radio-osetljivosti ćelija. Ove vrednosti su određene sa krivih preživljavanja. Najviša SF2 vrednost od 0.93 ± 0.01 je dobijena nakon ozračivanja γ zracima. Visoke SF2 vrednosti dobijene su i u sve tri pozicije ozračivanja jonima ugljenika (A, B i C) i iznose 0.72 ± 0.01 , 0.61 ± 0.02 i 0.67 ± 0.02 , redom. Ovako dobijene SF2 vrednosti ukazuju na visoku radio-rezistentnost HTB140 ćelija.

Još jedan važan radio-biološki parametar D_{10} , koji predstavlja dozu koja redukuje klonogeno preživljavanje na 10%, određen je za HTB140 ćelije. Vrednost D_{10} posle ozračivanja jonima ugljenika, u poziciji A je 14.12 Gy, u poziciji B 9.35 Gy, a u poziciji C iznosi 11.44 Gy.

Odnos α parametara za krive preživljavanja posle ozračivanja jonima ugljenika i γ zracima (α/α_γ) predstavlja efektivnost zračenja za male doze i definisana je kao RBE_α . RBE_α za HTB140 ćelije u poziciji A je 4.53 ± 0.48 , u poziciji B 6.83 ± 0.43 a u poziciji C iznosi 5.58 ± 0.46 (Tabela 4).

Tabela 4. Parametri fitovanja, $SF2$ i RBE_α za HTB140 ćelije melanoma čoveka nakon γ zračenja i zračenja jonima ugljenika.

Vrsta zračenja	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	r^2	St. greška fitovanja	SF2	RBE_α
γ zračenje					
	0.036 ± 0.009	0.928	0.046	0.93 ± 0.01	1.00
Joni ugljenika					
Pozicija zračenja					
A	0.163 ± 0.069	0.874	0.134	0.72 ± 0.01	4.53 ± 0.48
B	0.246 ± 0.088	0.926	0.111	0.61 ± 0.02	6.83 ± 0.43
C	0.201 ± 0.079	0.898	0.125	0.67 ± 0.02	5.58 ± 0.46

Biološki efekat jona ugljenika u odnosu na γ zračenje je procenjen pomoću RBE vrednosti određene u odnosu na izoefekat za γ zračenje od 2 Gy. Ova vrednost označena je kao $RBE(2\text{Gy}, \gamma)$ i predstavlja količnik doze 2Gy γ zračenja i doze jona ugljenika koja dovodi do istog nivoa inaktivacije ćelija kao i referentno γ zračenje od 2 Gy (Tabela 5). Najveća vrednost $RBE(2\text{Gy}, \gamma)$ je konstatovana u poziciji B i iznosi 7.06 ± 0.18 . U tabeli 3 su takođe prikazane i vrednosti $RBE(\text{Doza}, \gamma)$ izračunate prema istoj definiciji kao i $RBE(2\text{Gy}, \gamma)$ za doze 4 Gy, 8 Gy, 12 Gy i 16 Gy. Sa povećanjem doze od 2 do 16 Gy vrednosti $RBE(\text{Doza}, \gamma)$ su vrlo ujednačene i kreću se od 4.55 ± 0.17

do 4.58 ± 0.15 u poziciji A, 6.87 ± 0.19 do 7.06 ± 0.18 u poziciji B i 5.58 ± 0.12 do 5.65 ± 0.14 u poziciji C. To potvrđuju fitovane krive s obzirom da je njihov nagib proporcionalan dozi (Slika 12).

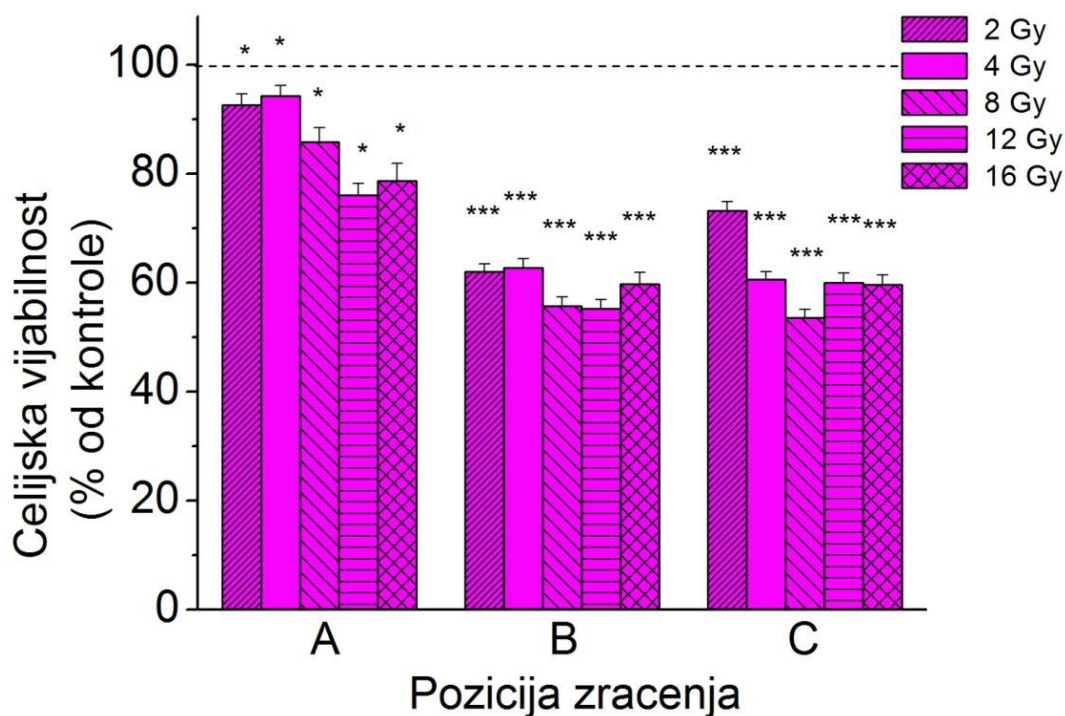
Tabela 5. $RBE\alpha$ i $RBE(Doza, \gamma)$ vrednosti za HTB140 ćelije melanoma čoveka.

Pozicija zračenja	$RBE\alpha$	RBE (2Gy, γ)	RBE (4Gy, γ)	RBE (8Gy, γ)	RBE (12Gy, γ)	RBE (16Gy, γ)
A	4.53 ± 0.48	4.56 ± 0.16	4.58 ± 0.15	4.57 ± 0.18	4.55 ± 0.17	4.56 ± 0.15
B	6.83 ± 0.43	7.06 ± 0.18	6.92 ± 0.20	6.93 ± 0.17	6.88 ± 0.16	6.87 ± 0.19
C	5.58 ± 0.46	5.58 ± 0.12	5.62 ± 0.15	5.65 ± 0.14	5.63 ± 0.12	5.62 ± 0.11

4.3 Efekat zračenja jonima ugljenika na vijabilnost HTB140 ćelija

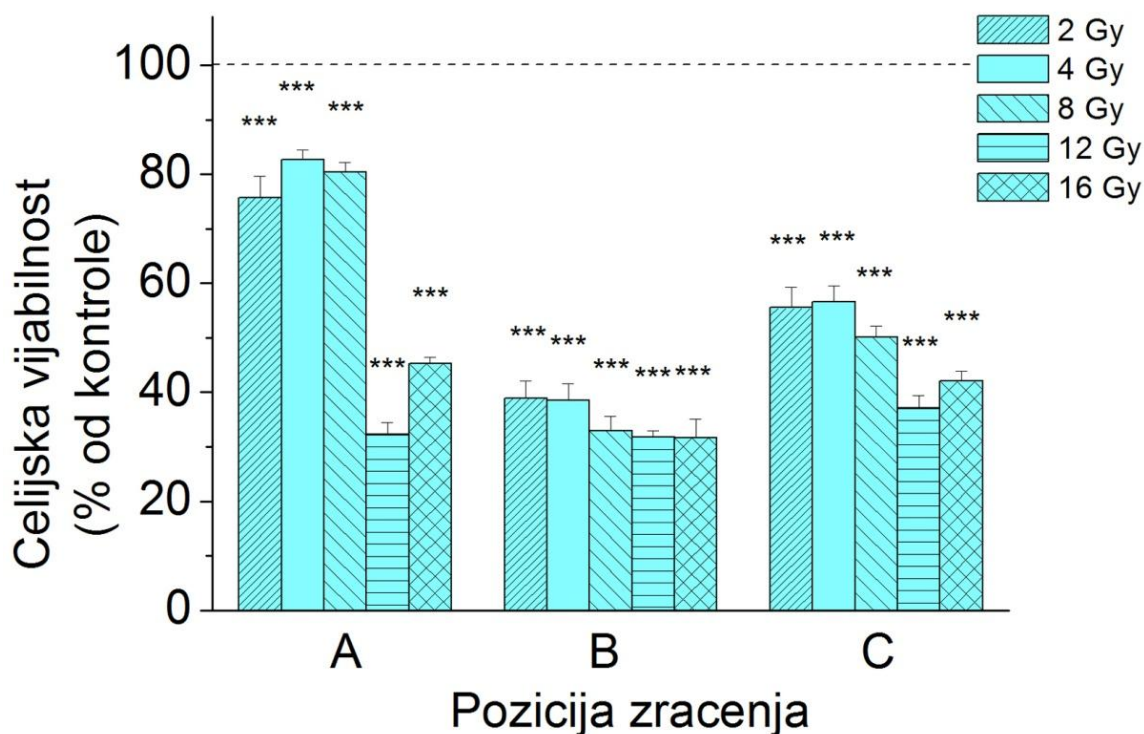
Efikasnost zračenja jonima ugljenika na inaktivaciju rezistentnih melanomskih HTB140 ćelija čoveka je praćena na nivou ćelijske vijabilnosti koja je određena SRB metodom 48 h i 7 dana nakon zračenja.

Dobijeni rezultati pokazuju da je vijabilnost HTB140 melanomskih ćelija značajno smanjena 48 h nakon ozračivanja jonima ugljenika u svim analiziranim pozicijama zračenja. Procenat vijabilnih ćelija u ovim uzorcima je od 76.1 – 92.6% u poziciji A ($p < 0.05$), 55.3 – 62% u poziciji B ($p < 0.001$) i 53.5 – 73.2% u poziciji C ($p < 0.001$) (Slika 13).



Slika 13. Vijabilnost HTB140 ćelija melanoma čoveka određena SRB metodom 48 h nakon ozračivanja jonima ugljenika, izražena u odnosu na kontrolu. Vrednost kontrole normirana je na 100%. Pozicija A odgovara vrednosti LET-a od 84.7 keV/ μ m, pozicija B vrednosti LET-a od 197.2 keV/ μ m, a pozicija C vrednosti LET-a od 382.4 keV/ μ m. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

Produženje inkubacije do 7 dana nakon ozračivanja ćelija je dovelo do smanjenja broja vijabilnih ćelija u odnosu na vremensku tačku 48 h. Najbolji efekat na inaktivaciju ćelija u ovoj vremenskoj tački postignut je ozračivanjem jonima ugljenika u poziciji B (LET 197.2 keV/ μ m). Nivo inaktivacije ozračenih ćelija u odnosu na neozračene je značajano povećan u celom opsegu primenjenih doza u svim pozicijama zračenja ($p < 0.001$). Procenat vijabilnih ćelija u ovim uzorcima je od 32.3 – 82.7% u poziciji A, 31.7 – 38.9% u poziciji B i 37.1 - 56.6% u poziciji C (Slika 14).



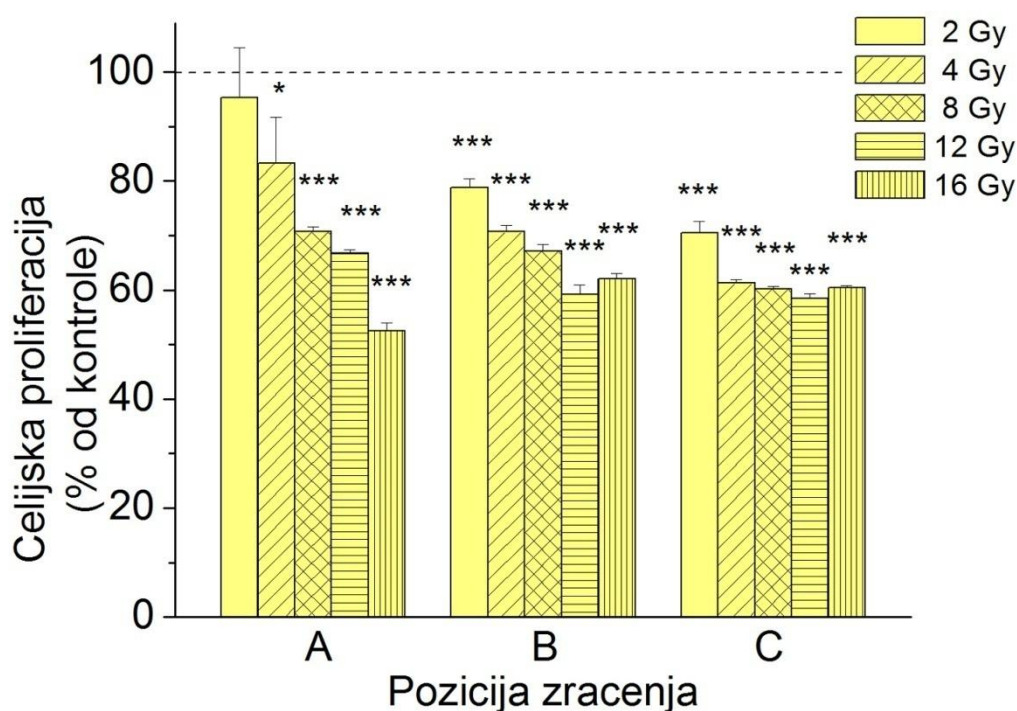
Slika 14. Vijabilnost HTB140 ćelija melanoma čoveka određena SRB metodom 7 dana nakon ozračivanja jonima ugljenika, izražena u odnosu na kontrolu. Vrednost kontrole normirana je na 100%. Pozicija A odgovara vrednosti LET-a od 84.7 keV/μm, pozicija B vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm, a pozicija C vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.

4.4 Efekat zračenja jonima ugljenika na proliferativnu sposobnost HTB140 ćelija

Proliferativni kapacitet HTB140 ćelija praćen je 48 h i 7 dana nakon ozračivanja jonima ugljenika merenjem ugradnje BrdU u molekul DNK tokom ćelijske proliferacije.

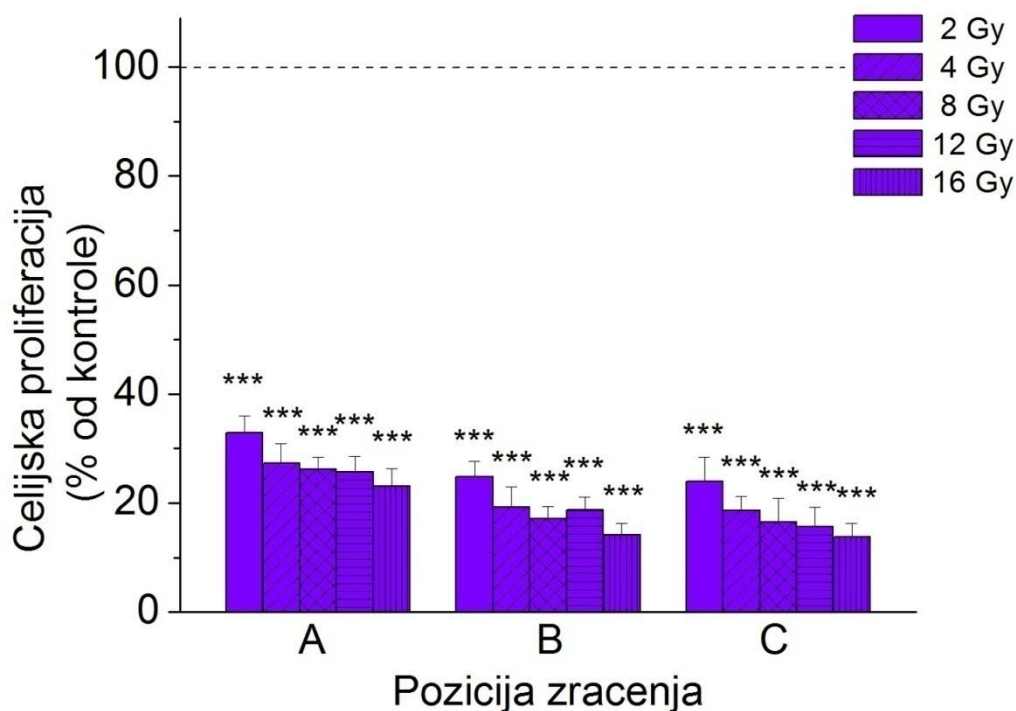
Na slici 15 je prikazan nivo ćelijske proliferacije u funkciji doze u tri pozicije zračenja duž Bragg-ove krive 48 h nakon ozračivanja ćelija. Smanjena proliferativna sposobnost ćelija je detektovana nakon zračenja jonima ugljenika u sve tri pozicije zračenja. Proliferativni kapacitet ćelija je najviši u poziciji A (LET 84.7 keV/μm) pri primeni doza od 2 i 4 Gy i iznosi 95.4 i 83.3% (p<0.05) dok se sa primenom većih doza

proliferacija značajno smanjuje i iznosi od 52.5 – 70.7% u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$). U pozicijama B (LET 197.2 keV/ μ m) i C (LET 382.4 keV/ μ m) nivo proliferacije ćelija je u sličnom opsegu, od 59.3 – 78.8% u poziciji B ($p < 0.001$), odnosno 58.5 – 70.5% u poziciji C ($p < 0.001$).



Slika 15. Proliferativna aktivnost HTB140 ćelija melanoma čoveka 48 h nakon ozračivanja jonima ugljenika određena BrdU metodom. Vrednost kontrole normirana je na 100%. Pozicija A odgovara vrednosti LET-a od 84.7 keV/ μ m, pozicija B vrednosti LET-a od 197.2 keV/ μ m, a pozicija C vrednosti LET-a od 382.4 keV/ μ m. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

Nivo proliferacije ćelija 7 dana nakon ozračivanja je značajno smanjen u odnosu na neozračene ćelije i ne prelazi 35% (slika 16). Najviši nivo proliferacije detektovan je u poziciji A, 23.1 - 32.8% ($p < 0.001$). U pozicijama B i C detektovani nivo proliferacije ćelija je u sličnom opsegu i iznosi 14.1 - 24.8% u poziciji B ($p < 0.001$), odnosno 13.2 - 23.9% u poziciji C ($p < 0.001$).



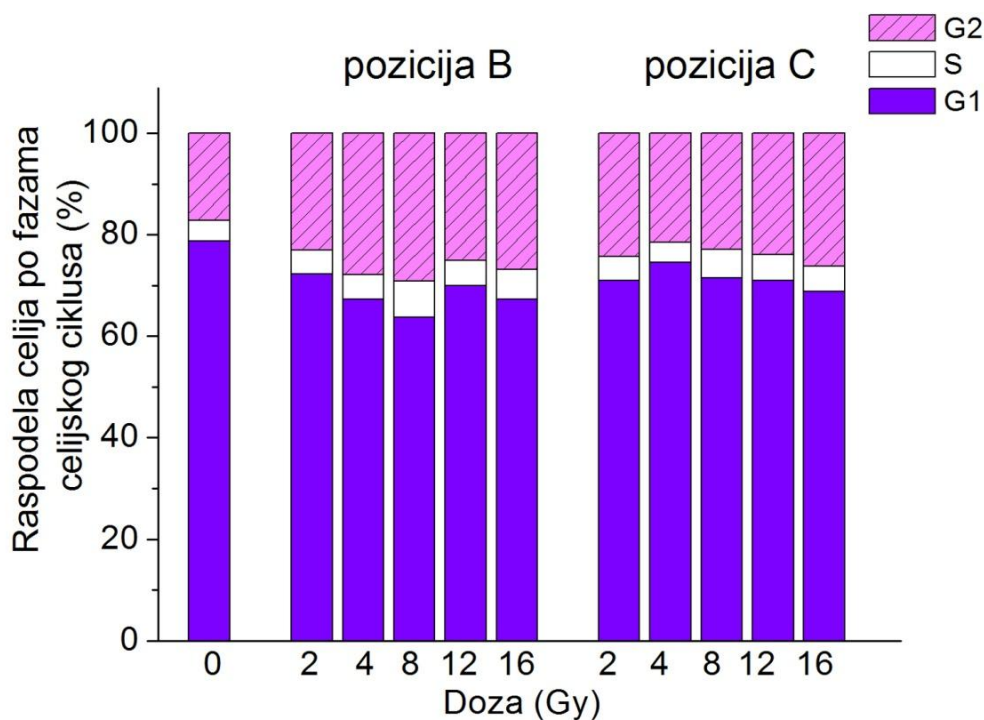
Slika 16. Proliferativna aktivnost HTB140 ćelija melanoma čoveka 7 dana nakon ozračivanja jonima ugljenika određena BrdU metodom. Vrednost kontrole normirana je na 100%. Pozicija A odgovara vrednosti LET-a od 84.7 keV/μm, pozicija B vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm, a pozicija C vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.

* * * * *

Za praćenje efekata zračenja jonima ugljenika na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa i indukciju apoptoze odabrane su pozicije B i C. Eksperimentalno određeni radiobiološki parametri su pokazali da je najbolji efekat zračenja jonima ugljenika na HTB140 ćelije postignut u poziciji B (LET 197.2 keV/μm). Dalje povećanje vrednosti LET-a do vrednosti od 382.4 keV/μm (pozicija C) nije imalo bolji inhibitorski efekat na ćelije, ali je efekat ovog LET-a analiziran u daljim eksperimentima u cilju ispitivanja promena na molekularnom nivou do kojih je dovelo zračenje jonima ugljenika a koje bi mogle biti uzrok lošijeg anti-tumorskog efekta u poziciji C.

4.5 Efekat zračenja jonima ugljenika na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Zbog smanjene proliferativne sposobnosti HTB140 ćelija uočene nakon zračenja jonima ugljenika u daljim eksperimentima praćene su promene na nivou ćelijskog ciklusa. Distribucija HTB140 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa praćena je 48 h nakon ozračivanja jonima ugljenika i prikazana je na slici 17. Citofluorimetrijskom metodom, bojenjem pomoću PI pokazano je da je u kontrolnom uzorku 71 % ćelija u G_1 fazi, 4 % ćelija u S fazi i 17 % ćelija u G_2 fazi. Ozračivanje jonima ugljenika u obe pozicije i pri svim primenjenim dozama je indukovalo statistički značajno povećanje broja ćelija u G_2 fazi ($p < 0.05$), praćeno smanjenjem broja ćelija u G_1 fazi. Broj ćelija u S fazi nije značajno promenjen u ozračenim uzorcima. U poziciji B procenat ćelija u G_2 fazi je u opsegu 23 do 29 %, dok je u poziciji C između 21.8 i 26.2 %. Dozna zavisnost nije izražena ni u jednoj od analiziranih pozicija zračenja.



Slika 17. Grafički prikaz raspodele HTB140 ćelija melanoma čoveka po fazama ćelijskog ciklusa 48 h nakon zračenja jonima ugljenika. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm, a pozicija C vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm.

4.6 Efekat zračenja jonima ugljenika na indukciju apoptoze

Citofluorimetrijska metoda bojenjem pomoću PI je korišćena i za detekciju apoptoze nakon ozračivanja HTB140 ćelija jonima ugljenika. Procenat apoptotskih ćelija i vrednosti apoptotskog indeksa, koji predstavlja odnos procenta apoptoze ozračenih ćelija i kontrolnih ćelija, su određeni 48 h nakon zračenja. Dobijene vrednosti su predstavljene u Tabeli 6. U uzorcima koji su bili izloženi ozračivanju jonima ugljenika broj ćelija u sub-G₁ fazi je značajno povećan i nalazi se u opsegu od 8 do 21.8% u poziciji B, odnosno 6.4 do 15.4% u poziciji C. Odgovarajući apoptotski indeksi iznose 3.5 do 9.6 u poziciji B i 2.8 do 6.8 u poziciji C. Dozno zavisno povećanje nivoa apoptoze detektovano je u svim ozračenim uzorcima, sa najvećim vrednostima dobijenim nakon primene doze od 16 Gy. U ovim uzorcima procenat apoptoze iznosi 21.8 ± 0.16 u poziciji B i 15.4 ± 0.04 u poziciji C ($p < 0.001$).

Tabela 6. Procenat apoptotskih ćelija 48 h nakon zračenja jonima ugljenika.

Pozicija zračenja	Doza (Gy)	Apoptoza (%)	Statistička značajnost	Apoptotski indeks
B	0	2.26±0.12		1
	2	7.99±0.21	*	3.5
	4	10±0.18	**	4.4
	8	11.84±0.19	**	5.2
	12	19.6±0.26	***	8.7
	16	21.8±0.16	***	9.6
	C	0	2.26±0.12	
2		6.44±0.05	*	2.8
4		6.98±0.11	*	3.1
8		15.1±0.02	***	6.7
12		12.8±0.08	**	5.7
16		15.4±0.04	***	6.8

Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm, a pozicija C vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.

4.7 Analiza apoptotskog signalnog puta indukovanog zračenjem jonima ugljenika

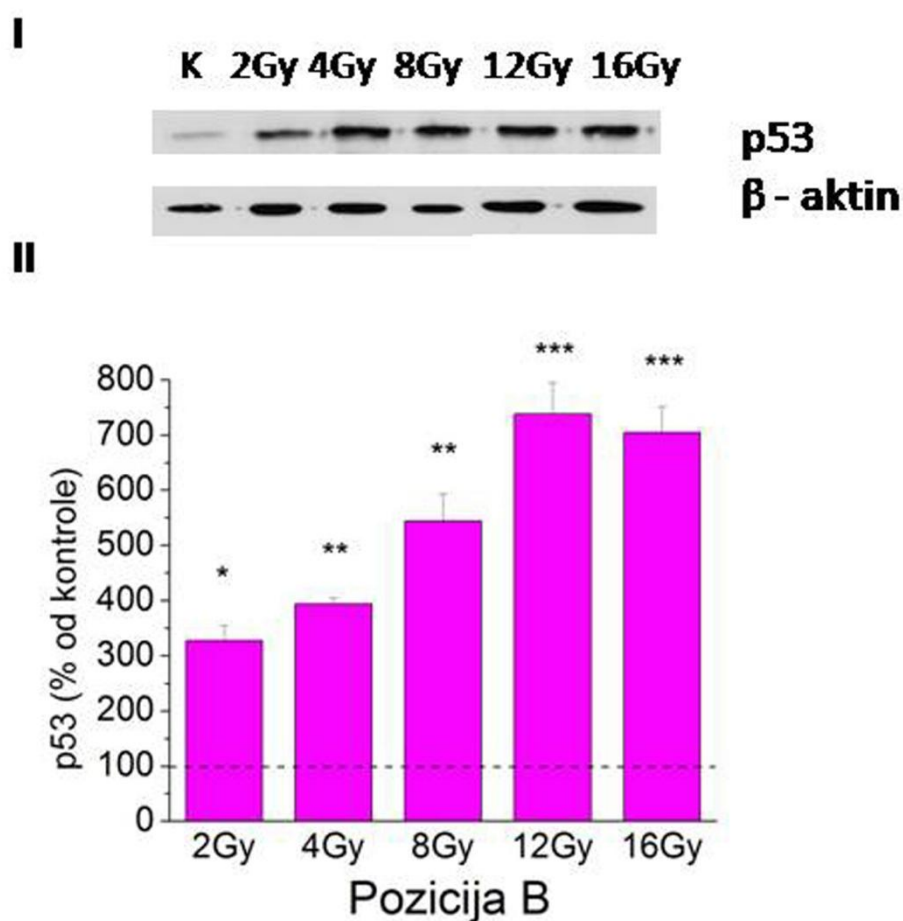
Kako je citofluorimetrijska analiza pokazala da sve primenjene doze u obe pozicije zračenja HTB140 ćelija jonima ugljenika dovode do značajnog povećanja broja apoptotskih ćelija, dalji eksperimenti su bili usmereni na ključne molekule uključene u proces apoptoze.

Promene nivoa apoptotskih regulatornih proteina p53, Bax i Bcl-2, kao i isecanje PARP proteina praćene su Western blot tehnikom. Takođe je praćena i ekspresija transkripcionog faktora NF κ B koji ima ulogu u negativnoj regulaciji apoptoze. Ekspresija *Bax*, *Bcl-2* i *NF κ B* gena je praćena qRT-PCR metodom. Efekat zračenja jonima ugljenika na sve ispitivane proteine i gene je praćen 48 h nakon zračenja.

4.7.1 Efekat zračenja jonima ugljenika na nivo p53 proteina

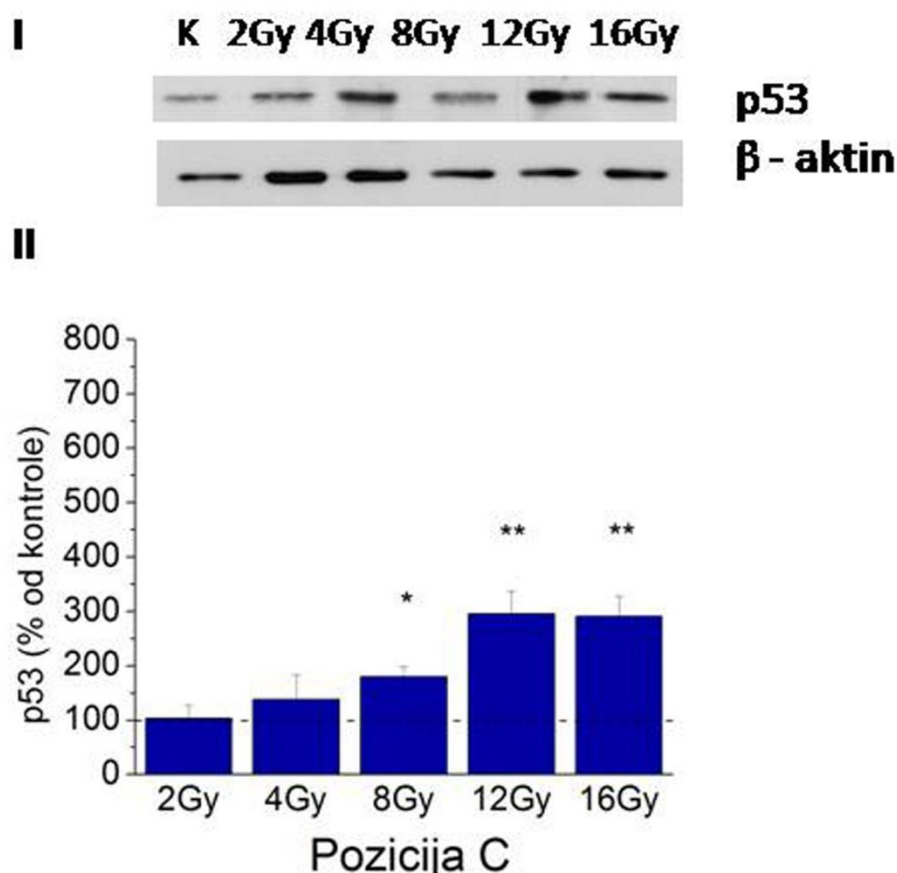
Analiza p53 proteina je pokazala značajno povećanje nivoa ovog proteina kod HTB140 ćelija nakon ozračivanja jonima ugljenika. Dozno zavisno povećanje je konstatovano u obe pozicije zračenja.

U poziciji B nivo p53 proteina u svim ozračenim uzorcima je značajno povećan. Reprezentativni filmovi za p53 protein i β -aktin, dobijeni Western blot tehnikom su prikazani na slici 18-I. Uočeno povećanje je dozno zavisno i kreće se od 327.3 do 737.5% u odnosu na kontrolne, neozraćene ćelije ($p < 0.05$ za 2 Gy; $p < 0.01$ za 4 i 8 Gy; $p < 0.001$ za 12 i 16 Gy) (Slika 18-II).



Slika 18. Reprezentativni Western blot za p53 protein 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika (I). Relativna kvantifikacija nivoa p53 proteina (II). β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina u svim uzorcima. Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/ μ m. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja \pm SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

U poziciji C nivo proteina p53 kod ćelija ozračenih dozama od 2 i 4 Gy nije značajno promenjen u odnosu na kontrolu. Reprezentativni filmovi za p53 protein i β -aktin, dobijeni Western blot tehnikom su prikazani na slici 19–II. Ozračivanje većim dozama dovelo je do značajnog povećanja nivoa p53 proteina u opsegu od 180 do 295.5% ($p < 0.05$ za dozu od 8 Gy; $p < 0.01$ za doze od 12 i 16 Gy) (Slika 19-II).



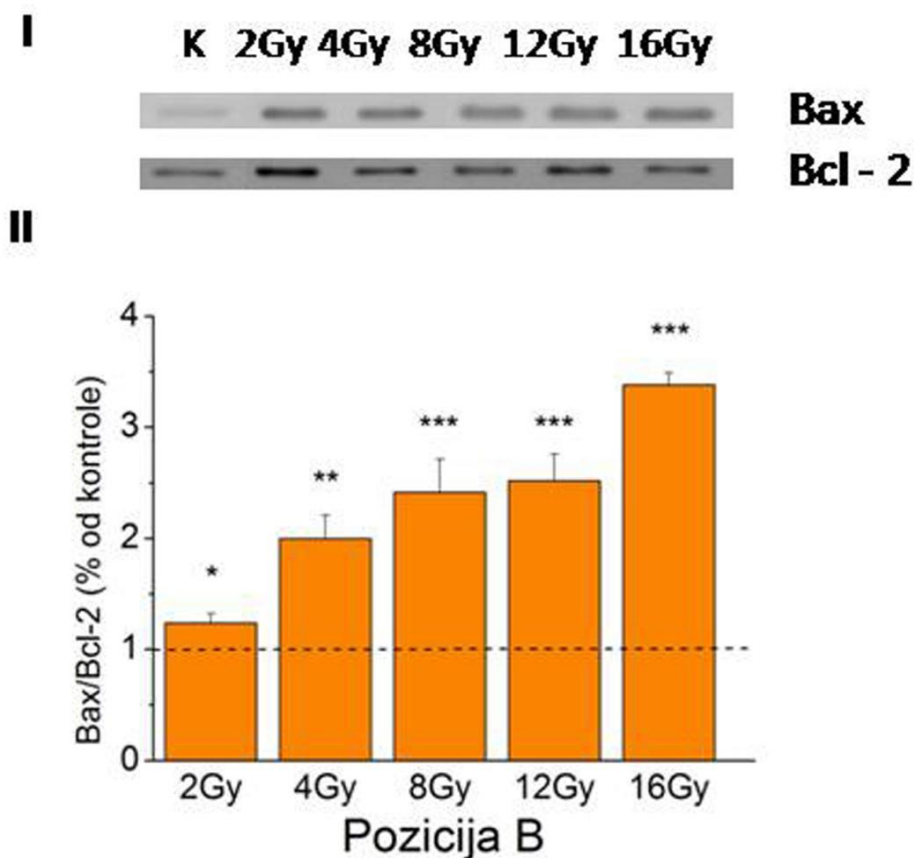
Slika 19. Reprezentativni Western blot za p53 protein 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika (I). Relativna kvantifikacija nivoa p53 proteina (II). β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina u svim uzorcima. Pozicija C odgovara vrednosti LET-a od 382.4 keV/ μ m. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja \pm SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

4.7.2 Efekat zračenja jonima ugljenika na relativni odnos Bax i Bcl-2 proteina

Nivo pro-apoptotskog proteina Bax i anti-apoptotskog proteina Bcl-2 je određen Western blot tehnikom 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija jonima ugljenika i izražen kao odnos Bax/Bcl-2.

Reprezentativni filmovi dobijeni Western blot metodom za Bax i Bcl-2 protein u

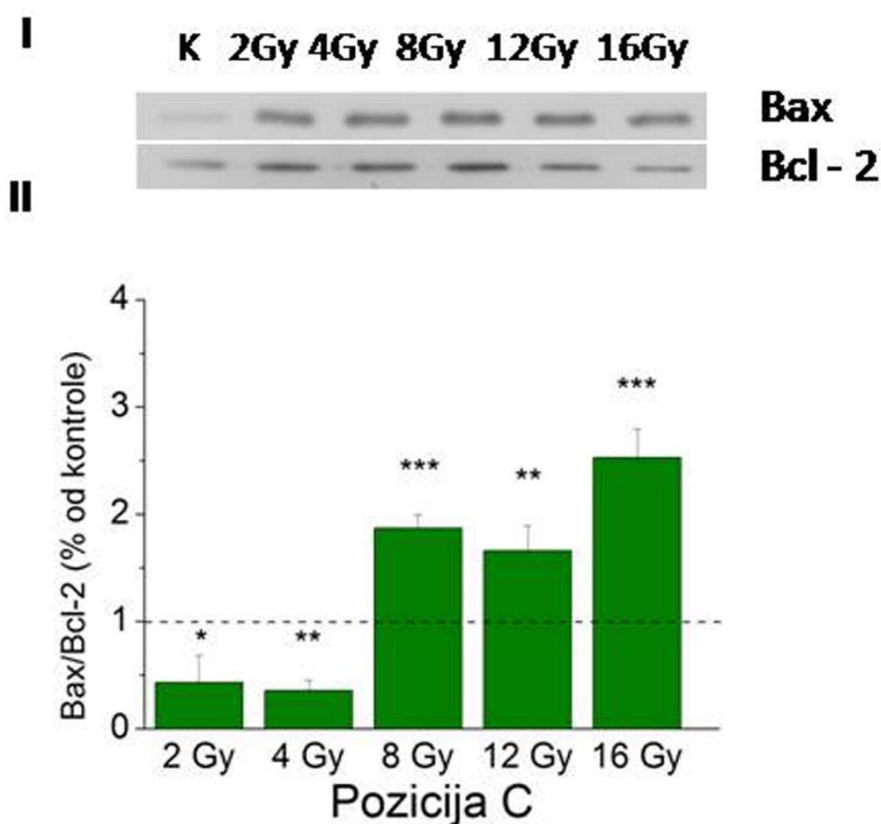
poziciji B su prikazani na slici 20–I. Izračunati odnosi pokazali su dozno zavisno povećanje Bax/Bcl-2 u poziciji B u odnosu na kontrolu (Slika 20-II). Bax/Bcl-2 kod ćelija ozračenih dozom od 2 Gy karakteriše povećanje na 1.2 ($p < 0.05$), dok je primena većih doza povećala ovaj odnos na 2 do 3.4 ($p < 0.01$ za 4 Gy; $p < 0.001$ za 8 do 16 Gy).



Slika 20. Reprezentativni Western blot za Bax i Bcl-2 proteine 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika (I). Relativni odnos Bax i Bcl-2 proteina (II). Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja \pm SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

Reprezentativni filmovi dobijeni Western blot metodom za Bax i Bcl-2 protein u poziciji C su prikazani na slici 21–I. U poziciji C Bax/Bcl-2 odnos je smanjen u odnosu na kontrolu pri primeni malih doza zračenja od 2 i 4 Gy ($p < 0.05$ i $p < 0.01$). Pri primeni većih doza relativni odnos Bax i Bcl-2 proteina je značajno povećan i iznosi 1.6 do 2.5

($p < 0.01$ za 12 Gy; $p < 0.001$ za 8 i 16 Gy) (Slika 21-II).



Slika 21. Reprezentativni Western blot za Bax i Bcl-2 proteine 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika (I). Relativni odnos Bax i Bcl-2 proteina (II). Pozicija C odgovara vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja \pm SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

4.7.3 Efekat zračenja jonima ugljenika na PARP protein

PARP ima veoma važnu ulogu u programiranoj ćelijskoj smrti. To je protein od 116 kDa koji pod dejstvom kaspaza biva isečen što predstavlja jedan od ključnih događaja u apoptozi. Detekcija isečenog PARP proteina od 89 kDa je dokaz indukcije apoptoze u ćeliji.

Prisustvo isečenog PARP proteina je konstatovano u svim uzorcima HTB140 ćelija ozračenim jonima ugljenika i posebno je izraženo pri primeni doza od 4 do 16 Gy (Slika 22).

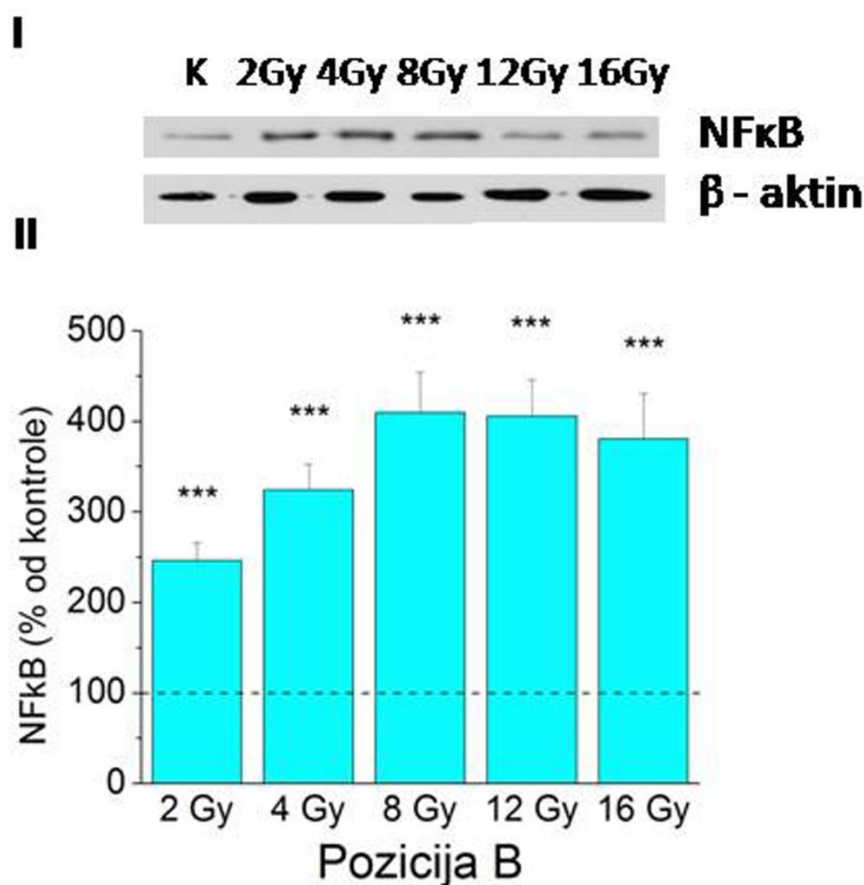


Slika 22. Reprezentativni Western blot za PARP (116 kD) protein i isečeni PARP (89 kD) protein, 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika. Pozicije B i C odgovaraju vrednostima LET-a od 197.2 i 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy.

4.7.4 Efekat zračenja jonima ugljenika na nivo nuklearnog faktora kappa B (NFκB)

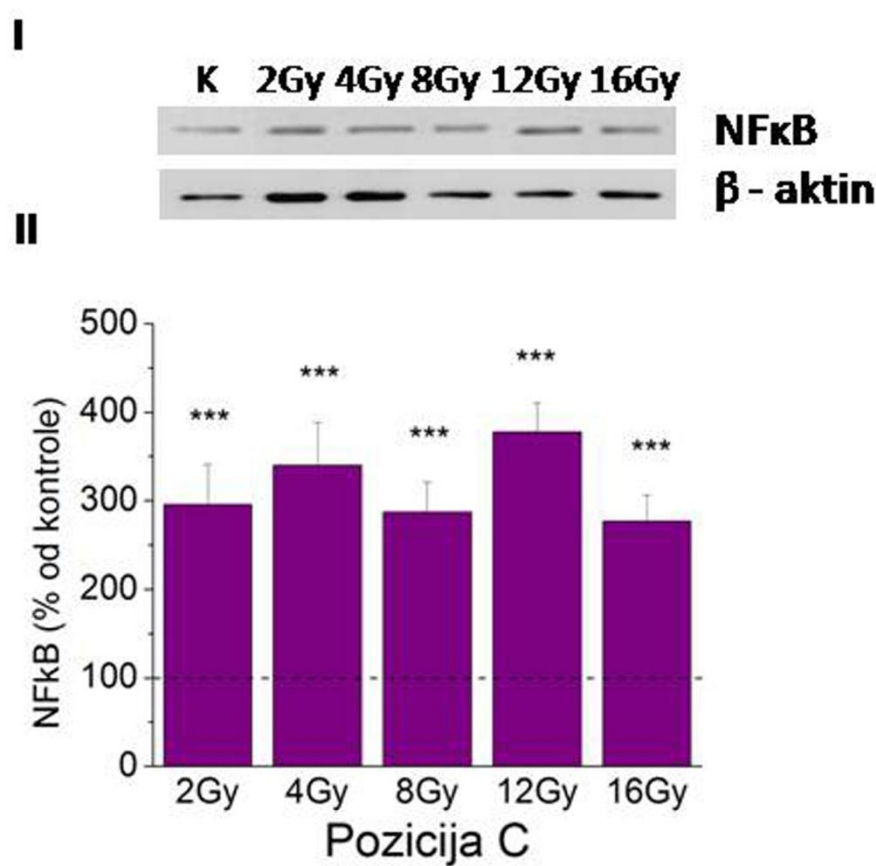
NFκB je transkripcioni faktor koji ima veoma važnu ulogu u regulaciji apoptotskih gena. Western blot metodom je praćen nivo njegove transkripciono aktivne subjedinice p65.

Reprezentativni filmovi za NFκB protein i β-aktin, dobijeni Western blot tehnikom u poziciji B su prikazani na slici 23-I. Konstatovano je povećanje nivoa ovog proteina u svim ozračenim uzorcima od 246 do 410 % u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Slika 23-II).



Slika 23. Reprezentativni Western blot za p65 subjedinicu NFκB proteina 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika (I). Relativna kvantifikacija nivoa NFκB (p65) proteina (II). β-aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina u svim uzorcima. Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja ± SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.

Kao što je prikazano na slici 24-II nivo p65 subjedinice NFκB proteina u poziciji C je značajno povećan u svim ozračenim uzorcima i iznosi od 277 do 340 % u odnosu na kontrolu (p<0.001). Reprezentativni filmovi za NFκB protein i β-aktin, dobijeni Western blot tehnikom u poziciji C su prikazani na slici 24-I.

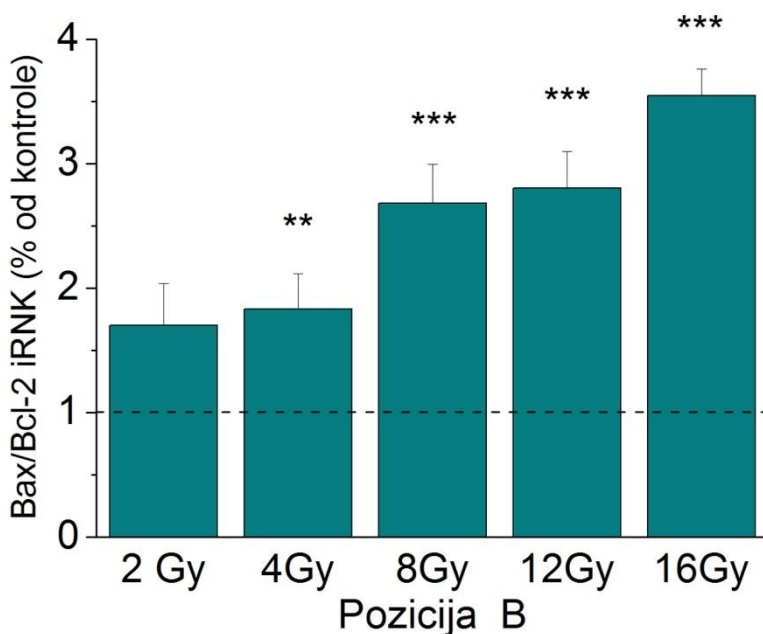


Slika 24. Reprezentativni Western blot za p65 subjedinicu NFκB proteina 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika (I). Relativna kvantifikacija nivoa NFκB (p65) proteina (II). β-aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina u svim uzorcima. Pozicija C odgovara vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja ± SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.

4.7.5 Relativni odnos ekspresije Bax i Bcl-2 gena nakon zračenja jonima ugljenika

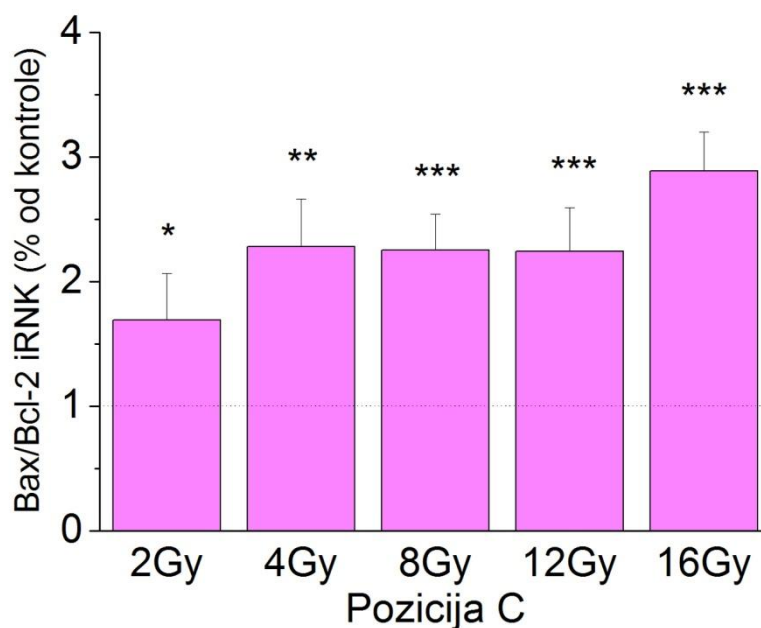
Osim praćenja promena relativnog odnosa Bax i Bcl-2 proteina, praćen je i efekat jona ugljenika na relativni odnos ekspresije gena za Bax i Bcl-2 proteine qRT-PCR metodom. Detektovano povećanje *Bax/Bcl-2* iRNK je dozno zavisno (Slika 25). Povećanje *Bax/Bcl-2* iRNK u poziciji B je u opsegu od 1.7 do 3.5 (p<0.01 za 4 Gy;

$p < 0.001$ za 8 - 16 Gy).



Slika 25. Relativni odnos Bax i Bcl-2 iRNK 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika. Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/ μ m. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja \pm SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - $0.01 < p < 0.05$; ** - $0.001 < p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

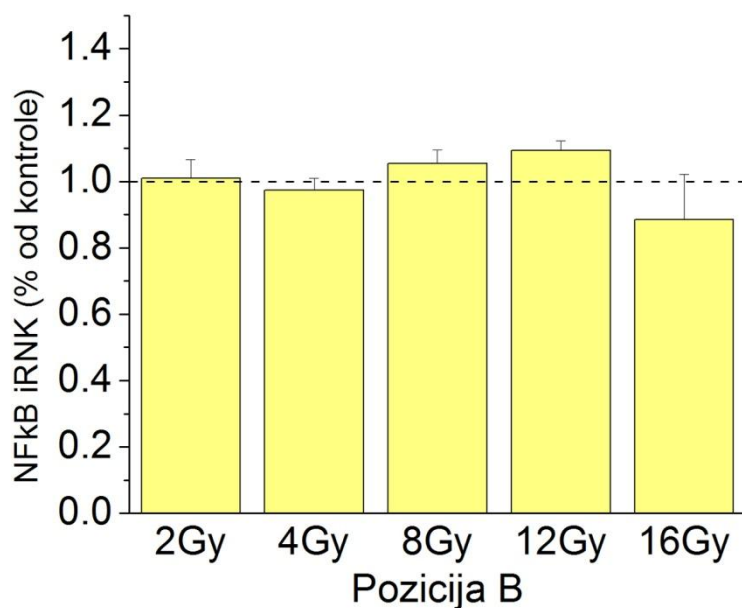
U poziciji C odnos Bax/Bcl-2 je takođe pokazao doznu zavisnost i nalazi se u opsegu od 1.7 do 2.9 ($p < 0.05$ za 2 Gy; $p < 0.001$ za 4 - 16 Gy) (Slika 26).



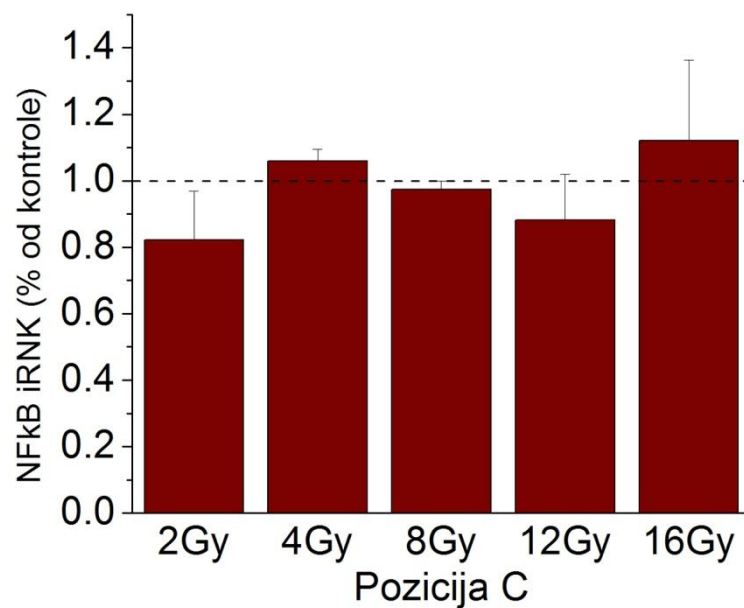
Slika 26. Relativni odnos Bax i Bcl-2 iRNK 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika. Pozicija C odgovara vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja ± SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.

4.7.6 Efekat zračenja jonima ugljenika na ekspresiju NFκB gena

Istovremeno sa praćenjem nivoa proteina NFκB kod HTB140 ćelija nakon ozračivanja jonima ugljenika, praćen je i nivo iRNK za p65 subjedinicu NFκB proteina. Dobijeni rezultati pokazuju da nivo iRNK za p65 nije značajno promenjen u uzorcima HTB140 ćelija izloženim primenjenim dozama u obe analizirane pozicije zračenja (Slika 27 i 28).



Slika 27. Relativna promena nivoa iRNAK za NFκB 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika. Pozicija B odgovara vrednosti LET-a od 197.2 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja ± SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001.



Slika 28. Relativna promena nivoa iRNK za NFκB 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka jonima ugljenika. Pozicija C odgovara vrednosti LET-a od 382.4 keV/μm. Primenjene su doze zračenja od 2, 4, 8, 12 i 16 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja ± SD. * - statistička značajnost u odnosu na kontrolu; * - 0.01 < p < 0.05; ** - 0.001 < p < 0.01; *** - p < 0.001

5. DISKUSIJA

Jonizujuće zračenje proizvodi širok spektar oštećenja na molekulu DNK, kao što su oštećenja baza, jednolančani i dvolančani prekidi (Sutherland *et al.*, 2000; Kawata *et al.*, 2004; Hamada *et al.*, 2010). Najznačajnije posledice po ćeliju ima indukcija dvolančanih prekida molekula DNK (Belli *et al.*, 2000; Rothkamm i Löbrich, 2003; Barnard *et al.*, 2013). Rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazuju da je ćelijsko preživljavanje u korelaciji sa brojem ovih prekida (Belli *et al.*, 2002). Zračenje visokog LET-a indukuje kompleksnija oštećenja u molekulu DNK, kao što su grupisani prekidi DNK (eng. *cluster*), koji se znatno teže repariraju (Goodhead, 1995). To je razlog što ovaj tip zračenja poseduje znatno veći potencijal u eliminaciji malignih ćelija u odnosu na konvencionalno zračenje (Hada i Georgakilas, 2008).

Izučavanje biološkog efekta zračenja visokog LET-a je od velikog interesa, kako na polju fundamentalne nauke, tako i za kliničku primenu. Terapija jonima ugljenika se efikasno primenjuje u lečenju malignih oboljenja glave i vrata, tumora baze lobanje, karcinoma pluća, jetre, prostate, kostiju itd. (Ando i Kase, 2009). Zračenje visokog LET-a, kao što je zračenje jonima ugljenika pokazalo je svoju efikasnost i u tretmanu radio-rezistentnih tumora (Kraft, 2009; Brower, 2009; Peschke *et al.*, 2011).

HTB140 ćelije predstavljaju visoko radio-rezistentne ćelije sa SF2 vrednošću od 0.93 za γ zračenje (Petrović *et al.*, 2006; Petrović *et al.*, 2010). Kriterijum za poređenje ćelija u pogledu radio-osetljivosti, odnosno radio-rezistentnosti, je frakcija preživljavanja posle ozračivanja dozom od 2 Gy (SF2). Ćelije koje imaju SF2 vrednost manju od 0.35 smatraju se radio-osetljivim, dok one čija je SF2 veća od ove vrednosti su označene kao radio-rezistentne (McIlwrath *et al.*, 1994; Ismail *et al.*, 2004). HTB140 ćelije pokazuju visok stepen rezistentnosti i na protonsko zračenje (Petrović *et al.*, 2006; Ristić-Fira *et al.*, 2007; Petrović *et al.*, 2010; Ristić-Fira *et al.*, 2011a), kao i na kombinovane tretmane protonima i alkilirajućim agensima (Petrović *et al.*, 2007; Ristić-Fira *et al.*, 2009; Ristić-Fira *et al.*, 2011b; Korićanac *et al.*, 2012).

U ovoj studiji praćen je efekat jona ugljenika, koje karakterišu vrednosti LET-a od 84.7, 197.2 i 382.4 keV/ μ m, na radio-rezistentne HTB140 ćelije melanoma čoveka.

Vrednost LET-a od 84.7 keV/ μm odgovara poziciji na platou Bragg-ove krive (pozicija A), dok vrednosti LET-a od 197.2 i 382.4 keV/ μm odgovaraju pozicijama na proksimalnom, odnosno rastućem delu Bragg-ovog vrha (pozicija B i pozicija C). Vrednost LET-a od 197.2 keV/ μm je izabrana imajući u vidu rezultate prethodnih istraživanja koji ukazuju da je najveća biološka efikasnost jona ugljenika pri vrednostima LET-a od ~ 200 keV/ μm (Ando *et al.*, 2005; Fokas *et al.*, 2009; Weber i Kraft, 2009; Okayasu, 2012). Vrednosti LET-a od 84.7 i 382.4 keV/ μm su odabrane u cilju ispitivanja inhibitornih efekata jona ugljenika, za vrednosti LET-a koje su manje i veće od one koja postiže maksimalnu efikasnost u eliminaciji ćelija. Sam izbor ćelijske linije koja se nalazi na gornjoj granici radio-rezistencije je sam po sebi interesantan za istraživanje.

Primenjene doze zračenja su bile u opsegu od 2 do 16 Gy. S obzirom na izraženu radio-rezistentnost HTB140 ćelija (Petrović *et al.*, 2006; Petrović *et al.*, 2010), doze zračenja koje su korišćene u ovom radu su prilagođene specifičnosti ove ćelijske linije i zbog toga su veće u odnosu na one koje se uobičajeno koriste za analizu inhibicije ćelijskog rasta. Ove doze odgovaraju dozama koje se primenjuju u terapiji metastatskog melanoma jonima ugljenika (Fogarty i Hong, 2014).

Radio-osetljivost HTB140 ćelija na jone ugljenika je određena pomoću radiobioloških parametara, preživljavanja za dozu od 2 Gy (SF2) i relativne biološke efektivnosti za 2 Gy (RBE(2 Gy, γ)).

Za praćenje klonogenog preživljavanja ćelija korišćen je klonogeni esej koji se bazira na sposobnosti pojedinačne ćelije da formira koloniju. Uobičajeno vreme za praćenje formiranja kolonija je 7 do 21 dan (Franken *et al.*, 2006; Fiebig *et al.*, 2004). S obzirom da su prethodne studije na HTB140 ćelijama melanoma čoveka pokazale da nema značajne razlike u formiranju kolonija nakon 7 i 14 dana (Petrović *et al.*, 2006), u ovom radu praćeno je klonogeno preživljavanje ovih ćelija 7 dana nakon ozračivanja jonima ugljenika. Pokazano je dozno zavisno smanjenje klonogenog preživljavanja u svim analiziranim pozicijama zračenja. Takođe se zapaža prisustvo dva različita gradijenta inaktivacije ćelija, jedan za manje i drugi za veće doze zračenja jonima ugljenika. Postojanje ova dva gradijenta inaktivacije podseća na efekat hiper radio-osetljivosti pri niskim dozama zračenja (eng. *low-dose hyper radiosensitivity, HRS*), ali

za opseg doza koje su za red veličine veće. Poznato je da HRS karakteriše povećana osetljivost pojedinih ćelijskih linija na ubijanje zračenjem, dozama manjim od 1 Gy ili čak manjim od 0.5 Gy. Ovaj fenomen je detektovan kod ~80% neizmenjenih i maligno transformisanih ćelijskih linija čoveka (Marples i Joiner, 1993; Tsoulou *et al.*, 2001; Beauchesne *et al.*, 2003). Može se objasniti odsustvom aktivacije reparacionih mehanizama u analiziranim ćelijama nakon primene manjih doza, dok veće doze dovode do oštećenja koja pokreću mehanizme popravke i povećavaju radio-rezistentnost ćelija (Joiner *et al.*, 1993; Lambin *et al.*, 1996; Marples i Joiner, 2000). Kod HTB140 ćelija melanoma čoveka doze jona ugljenika koje su dovele do povećane senzitivnosti bile su ispod 8 Gy. Za doze iznad 8 Gy primetno je zasićenje inaktivacije ćelija. To se može pripisati takozvanom „overkill” efektu koji se pojavljuje kod većih doza (Ando *et al.*, 2005). Vrlo slično ponašanje HTB140 melanomskih ćelija čoveka zabeleženo je i nakon primene protonskog zračenja duž SOB (Petrović *et al.*, 2010).

Prikazane SF2 vrednosti za γ zračenje (~0.93) i za zračenje jonima ugljenika u svim pozicijama predstavljaju frakcije preživljavanja ćelija nakon primene doze od 2 Gy dobijene sa fitovanih krivih. Vrednosti SF2 u svim pozicijama zračenja jonima ugljenika ukazuju na visok nivo radio-rezistentnosti HTB140 ćelija melanoma čoveka. Posmatrano duž Bragg-ove krive, SF2 vrednost opada sa 0.72, koliko iznosi u poziciji A (LET 84.7 keV/ μ m), na 0.61 u poziciji B (LET 197.2 keV/ μ m). U poziciji C (LET 382.4 keV/ μ m), SF2 vrednost iznosi 0.67. Ovakvo ponašanje HTB140 ćelija u odgovoru na zračenje jonima ugljenika je u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju da jone ugljenika karakteriše najveća efikasnost pri vrednostima LET-a od ~200 keV/ μ m (Ando *et al.*, 2005; Fokas *et al.*, 2009; Weber i Kraft, 2009; Okayasu, 2012).

Iako SF2 vrednosti ukazuju na veoma visoku radio-rezistentnost HTB140 ćelija, vrednosti RBE pokazuju da su joni ugljenika doveli do značajne inaktivacije ovih ćelija u poređenju sa γ zračenjem. Najniža vrednost je u poziciji A i iznosi 4.56 ± 0.16 , dok je njena najveća vrednost u poziciji B, 7.06 ± 0.18 , pa onda pada u poziciji C, gde je 5.58 ± 0.12 . Ovakve visoke vrednosti RBE su posledica veoma niske inaktivacije γ zračenjem. Vrednost RBE(Doza, γ) se ne menja značajno sa povećanjem doze u svakoj od tri pozicije, što pokazuje da za svaku poziciju ozračivanja RBE ne zavisi od doze i predstavlja jedinstvenu vrednost. Slične vrednosti RBE za zračenje jonima ugljenika sa LET vrednostima bliskim onima koje su primenjene u ovoj studiji, su dobijene i za

ćelije karcinoma glave i vrata, adenokarcinoma pluća i glioblastoma (Beuve *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2000). Ove vrednosti su više od vrednosti RBE(2Gy, γ) koje su za istu ćelijsku liniju dobijene posle zračenja protonima duž Bragg-ove krive (Petrović *et al.*, 2006; Petrović *et al.*, 2010).

Vrednost doze koja redukuje preživljavanje na 10% (D_{10}) posle ozračivanja jonima ugljenika je u opsegu od 9.35 do 14.12 Gy. Ovu dozu praktično nije moguće očitati sa fitovane krive preživljavanja za γ zračenje, u opsegu doza ni do 24 Gy, s obzirom da ima znatno manji nagib u odnosu na fitovane krive za zračenja jonima ugljenika. Teoretski je moguće izvršiti ekstrapolaciju iz krive preživljavanja i tako dobiti D_{10} za γ zračenje. Međutim, ranije studije na HTB140 ćelijskoj liniji melanoma čoveka pokazuju neslaganje u vrednostima D_{10} dobijenim u eksperimentalnim merenjima i vrednostima dobijenim ekstrapolacijom iz krive preživljavanja. Vrednost D_{10} dobijena iz krive preživljavanja za opseg primenjenih doza od 8 do 44 Gy iznosila je 39.4 Gy, dok je izmerena eksperimentalna vrednost iznosila 36 Gy. Parametri fitovanja u ovom eksperimentu imali su vrednost $\alpha=0.0183\pm 0.0069$ i $\beta=0.0010\pm 0.0005$. D_{10} koja je dobijena ekstrapolacijom iz krive preživljavanja za opseg doza od 8 do 24 Gy je bila oko 45 Gy, a vrednosti parametara α i β su 0.0171 ± 0.0084 i 0.0010 ± 0.0005 . Ovakvi rezultati ukazuju da kada α i β parametri imaju niske vrednosti, što je slučaj kod visoko radio-rezistentnih ćelijskih linija, i male varijacije parametara fitovanja mogu dovesti do velikih promena u vrednostima D_{10} . Iz tog razloga se vrednosti D_{10} dobijene ekstrapolacijom iz fitovane krive ne mogu smatrati pouzdanim (Petrović *et al.*, 2006).

Antitumorski efekat jona ugljenika je praćen i na nivou ćelijske vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta 48 h i 7 dana nakon ozračivanja ćelija. Vremenska tačka 48 h je karakteristična za praćenje biološkog odgovora ćelije na tretman, dok vremenska tačka 7 dana odgovara vremenu u kome je ispoljen efekat zračenja, što odgovara vremenu od najmanje 6 ćelijskih deoba (Ristić-Fira *et al.*, 2009).

Prvi korak u optimizaciji uslova za ELISA eseje za koje su ćelije gajene u pločama sa 96 bunara imao je za cilj definisanje rasta HTB140 ćelija melanoma čoveka u *in vitro* uslovima. Vijabilnost netretiranih melanomskih ćelija je praćena pomoću MTT eseja kojim je određena apsorbancia uzoraka na talasnoj dužini od 550 nm. Apsorbancia je linearno zavisna od broja ćelija za vrednosti koje nisu veće od 1 (Van de

Loosdrecht *et al.*, 1994). Na osnovu dobijenih rezultata ove studije zaključeno je da je gustina od 3000 ćelija po bunaru najveća od analiziranih pri kojoj apsorbancija ne prelazi vrednost 1 tokom prvih 7 dana praćenja rasta ćelija i ova gustina ćelija je izabrana za dalje eksperimente.

Za procenu ćelijske vijabilnosti 48 h i 7 dana posle ozračivanja jonima ugljenika korišćen je SRB esej. Pokazano je da zračenje jonima ugljenika dovodi do umerenog smanjenja broja ćelija u poziciji A 48 h nakon zračenja. U pozicijama B i C nivo inaktivacije HTB140 ćelija je sličan i veći u odnosu na inaktivaciju HTB140 ćelija ozračivanjem u poziciji A. Smanjenje vijabilnosti u analiziranim pozicijama nije linearno u odnosu na primenjene doze, što se može objasniti činjenicom da HTB140 ćelije, koje su u različitim stadijumima diferencijacije, različito reaguju na zračenje jonima ugljenika. Broj preživelih ćelija je značajno manji 7 dana nakon zračenja jonima ugljenika u odnosu na broj ćelija preživelih 48 h posle ozračivanja. Efekat zračenja jonima ugljenika na ćelijsku vijabilnost u ovoj vremenskoj tački je najizraženiji u poziciji B.

Proliferativni kapacitet HTB140 ćelija omogućava razlikovanje ćelija koje se nalaze u fazi replikacije molekula DNK od ćelija koje su mrtve ili onih zaustavljenih u nekoj od faza ćelijskog ciklusa, a u cilju popravke oštećenja koja su nastala delovanjem zračenja. Analiza proliferativne sposobnosti HTB140 ćelija pokazuje da zračenje značajno inhibira ćelijsku proliferaciju već posle 48 h, ali da se puni efekat zračenja ostvaruje nakon 7 dana, tj. posle nekoliko ćelijskih deoba. Paralelno ispitivanje ćelijske vijabilnosti, klonogenog preživljavanja ćelija i njihovog proliferativnog kapaciteta u ispitivanim pozicijama 7 dana nakon zračenja omogućava bolji uvid u način eliminacije melanomskih ćelija nakon zračenja jonima ugljenika. Rezultati ovih eseja pokazuju da je broj preživelih ćelija veći od broja proliferativno aktivnih ćelija, kao i ćelija koje formiraju kolonije, što ukazuje da je kod HTB140 ćelija došlo do zaustavljanja u nekoj od faza ćelijskog ciklusa kako bi popravile oštećenja u molekulu DNK izazvana zračenjem.

Najznačajniji uzroci inhibicije rasta malignih ćelija mogu biti indukcija procesa apoptoze i promena u propagaciji ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa. Poremećaji na nivou regulacije ovih procesa su veoma značajni kako u razvoju i progresiji melanoma, tako i

u odgovoru melanomskih ćelija na anti-tumorske tretmane (Sekulic *et al.*, 2008). U cilju boljeg razumevanja načina delovanja zračenja jonima ugljenika, ispitivano je da li oni dovode do indukcije procesa apoptoze i promena u propagaciji ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa. Apoptoza se u radio-osetljivim malignim ćelijama obično indukuje veoma brzo posle ozračivanja, u okviru prvih 24 h. Međutim, za većinu ćelija u kulturi, apoptoza se ne odigrava tako brzo, već se može dogoditi posle jedne ili više ćelijskih deoba. Maksimalan broj apoptotskih ćelija u *in vitro* uslovima najčešće se može konstatovati 48 h posle ozračivanja (Dewey *et al.*, 1995). Na osnovu ovih podataka za detekciju apoptoze je odabrana vremenska tačka od 48 h nakon zračenja.

Za ove eksperimente odabrane su samo pozicije koje se nalaze u oblasti Bragg-ovog vrha (pozicije B i C). U poziciji B (LET 197.2 keV/μm) je, prema svim radiobiološkim parametrima koji su eksperimentalno određeni, pokazan najbolji efekat zračenja jonima ugljenika na HTB140 ćelije. Dalje povećanje vrednosti LET-a u poziciji C (LET 382.4 keV/μm) nije imalo bolji inhibitorski efekat na ćelije, ali je efekat ovog LET-a analiziran u daljim eksperimentima u cilju ispitivanja promena na molekularnom nivou do kojih je dovelo zračenje jonima ugljenika a koje bi mogle biti uzrok lošijeg anti-tumorskog efekta u poziciji C.

Citofluorimetrijska analiza broja apoptotskih ćelija i izračunati apoptotski indeksi jasno ukazuju na sposobnost jona ugljenika da eliminišu rezistentne HTB140 ćelije indukcijom ćelijske smrti po tipu apoptoze. Dosadašnja istraživanja pokazala su da joni ugljenika indukuju apoptozu i u drugim ćelijskim linijama, kao što su ćelije karcinoma pljuvačnih žlezda (eng. *human salivary gland tumor cells, HCG*) (Furusawa *et al.*, 2000), NP-2 ćelije glioma (Jinno-Oue *et al.*, 2010), U87MG ćelije glioma i SQ20B skvamozne ćelije glave i vrata (eng. *head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC*) (Alphonse *et al.*, 2013).

U nekim tipovima ćelija, kao što su epitelijalne ćelije želuca čoveka, apoptoza se ne indukuje ni 48 h posle ozračivanja. Umesto toga ćelije se zaustavljaju u G₁ ili G₂ fazi ćelijskog ciklusa (Jonathan *et al.*, 1999). Iz tog razloga, u ovom radu su, u istoj vremenskoj tački, pored indukcije apoptoze, praćene i promene na nivou ćelijskog ciklusa.

Citofluorimetrijskom analizom distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

pokazano je da se kontrolne, neozračene HTB140 ćelije melanoma čoveka u najvećem procentu nalaze u G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Ovako dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija u kojima je pokazano da je veliki procenat melanomskih ćelija u G₁ fazi ćelijskog ciklusa i to kao posledica specifične pojačane metaboličke aktivnosti melanomskih ćelija (Smalley i Eisen, 2002; Cunha *et al.*, 2012). Rezultati naših istraživanja su pokazali da joni ugljenika dovode do značajnog povećanja broja HTB140 ćelija u G₂ fazi, praćenog smanjenjem broja ćelija u G₁ fazi. Procenat ćelija u G₂ fazi je nešto veći u uzorcima ozračenim u poziciji B, a dozna zavisnost nije pokazana. Dobijeni rezultati koji ukazuju na zaustavljanje ćelija u G₂ fazi su u saglasnosti sa detektovanim smanjenjem proliferativnog kapaciteta i klonogenog preživljavanja HTB140 ćelija. Ovakvi rezultati ukazuju da zračenje jonima ugljenika oštećuje inače izrazito radio-rezistentne HTB140 ćelije u većoj meri od protonskog zračenja (Petrović *et al.*, 2006, Petrović *et al.*, 2010).

Jonizujuće zračenje deluje na radio-osetljive ćelije tako što dovodi do zaustavljanja ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa, dok je broj ćelija u G₁ fazi proporcionalno smanjen (Sasaki *et al.*, 1997; Green *et al.*, 2001). Zračenje jonima ugljenika efikasnije je u zaustavljanju V79 ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na konvencionalno zračenje. Indukcija zaustavljanja ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa nakon primene jona ugljenika direktno je proporcionalna smanjenju broja ćelija (Lücke-Huhle *et al.* 1979, Zhou *et al.* 2006). Matsumoto i saradnici su pokazali da inhibicija ekspresije gena koji utiču na ćelijski ciklus i produženo zadržavanje u G₂ fazi kod V79 ćelija predstavljaju jedan od mehanizama odgovornih za osetljivost ovih ćelija na jone ugljenika. Slični rezultati dobijeni su za TK6 ćelije limfoblastoma (Matsumura *et al.*, 2003), ćelije adenokarcinoma debelog creva čoveka (Tseng *et al.* 2002) i SMMC-7721 ćelijsku liniju kancera jetre (Gong *et al.*, 2007).

U cilju detaljnijeg izučavanja signalnih puteva odgovornih za indukciju apoptoze i inhibiciju rasta HTB140 ćelija u daljem radu praćen je efekat jona ugljenika na ekspresiju molekula uključenih u proces apoptoze.

Tumor supresor p53 ima važnu ulogu u supresiji procesa neoplastične transformacije (Levine *et al.*, 2006; Vousden i Prives, 2009; Levine i Oren, 2009). Istovremeno, rezultati epidemiološko-genetičkih studija pokazali su da je gen *p53*

najčešće mutiran gen u malignim tumorima čoveka, sa više od 25000 mutacija objavljenih u TP53 bazi podataka *International Agency for Research on Cancer (IARC)* (Lehmann i Pietenpol, 2012). Mutacije u ovom genu registrovane su u gotovo svim tipovima malignih ćelija i prisutne su u više od 50% svih tumora (Liu *et al.*, 2014). Pronađene su u ~ 30 – 50% malignih tumora pluća, jednjaka, glave i vrata, kao i jajnika i debelog creva, a u manjem procentu i kod leukemija, sarkoma, melanoma, malignih tumora testisa i grlića materice (Olivier *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2014). U većini melanoma kod čoveka, gen *p53* nije mutiran već je uglavnom detektovana promena u nivou njegove ekspresije (Houben *et al.*, 2014).

Ovaj protein svoju funkciju uglavnom ispoljava kroz regulatorni protein transkripcije (Levine *et al.*, 2006; Vousden i Prives, 2009; Levine i Oren, 2009). U odgovoru na signale stresa kako unutarćelijske, tako i iz spoljašnje sredine, protein *p53* se aktivira pre svega kroz posttranslacione modifikacije (Liang *et al.*, 2013). Do sada je identifikovano preko sto gena u čijoj se okolini nalaze regulatorni elementi za koje se protein *p53* može vezati (Riley *et al.*, 2008; Paz *et al.*, 2011). Ekspresija ciljnih gena dovodi do indukcije signalnih puteva uključenih u reparacione sisteme, regulaciju ćelijskog ciklusa, indukciju apoptoze i proces ćelijskog starenja (Goh *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2013).

Mutacije u genu *p53* su veoma česte u različitim tipovima malignih oboljenja i odgovorne su za razvoj rezistencije na konvencionalnu radioterapiju i hemoterapiju (Gudkov i Komarova, 2003; Stiewe, 2007). Podaci iz literature pokazuju da su joni ugljenika veoma efikasni u eliminaciji radio-rezistentnih ćelija, kao što su ćelije glioma, karcinoma pluća, adenokarcinoma, kancera skvamoznih ćelija i da mogu dovesti do indukcije procesa apoptoze nezavisno od mutacionog statusa gena *p53* (Takahashi *et al.*, 2004; Iwadate *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). Ova činjenica je od velikog značaja u kliničkoj praksi, s obzirom na to da nije uvek lako odrediti mutacioni status gena *p53* pre početka terapije. Osim toga zračenje jonima ugljenika efikasnije indukuje apoptozu od X zračenja i kod malignih ćelija koji imaju neizmenjen protein *p53* (Yamakawa *et al.*, 2008).

Rezultati naše studije ukazuju da je povećan broj apoptoskih ćelija u izrazito radio-rezistentnim HTB140 ćelijama nakon zračenja jonima ugljenika verovatno

posledica povećanja količine proteina p53. Naime, povećanje nivoa ovog proteina je izrazitije u poziciji B što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim citofluorimetrijskom analizom broja apoptotskih ćelija. Slični rezultati objavljeni su i za radio-rezistentne ćelije glioblastoma nakon zračenja jonima ugljenika (Jinno-Oue *et al.*, 2010).

Jedan od mehanizama kojim p53 pokreće apoptotsku mašineriju u ćeliji uključuje transkripcionu aktivaciju pro-apoptotskih i inhibiciju anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije gena (Thornborrow *et al.*, 2002; Kanamaru *et al.*, 2012). U odgovoru na stres frakcija proteina p53 premešta se na membrane mitohondrija gde ostvaruje proteinske interakcije sa anti-apoptotskim proteinima Bcl-xL i Bcl-2. Ove protein-protein interakcije za posledicu imaju inhibiciju njihove funkcije. U tim okolnostima, proteini Bax formiraju dimere koji su odgovorni za formiranje kanala na membranama mitohondrija kroz koje citohrom c napušta mitohondriju. Citohrom c je ključni molekul za formiranje proteinskog kompleksa apoptozoma u procesu indukcije apoptoze kao odgovora na stanje ćelijskog stresa (Green i Kroemer, 2009; Vaseva i Moll, 2009). Odnos pro-apoptotskih i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije (naročito odnos proteina Bax i Bcl-2) predstavlja vrstu ćelijskog reostata koji opredeljuje vrstu ćelijskog odgovora na stanje ćelijskog stresa u smislu indukovanja procesa apoptoze (Adams i Cory, 2001; Borner, 2003).

Istovremeno, istraživanja su pokazala da od odnosa proteina Bcl-2 familije zavisi i vrsta ćelijskog odgovora na dejstvo antitumorskih agensa (Kirkin *et al.*, 2004). U ovom radu ispitivana je i ekspresija pro-apoptotskog proteina Bax i anti-apoptotskog proteina Bcl-2 u HTB140 ćelijama nakon zračenja jonima ugljenika. Prekomerna ekspresija proteina Bcl-2 je detektovana u mnogim tipovima malignih tumora, uključujući i melanom gde je njegova ekspresija povećana u čak 65% tumora (Hamada *et al.*, 2008). Uticaj jona ugljenika na maligne ćelije kod kojih postoji prekomerna ekspresija proteina Bcl-2 još uvek nije u potpunosti ispitan. U eksperimentima u ovom radu analiza proteinske ekspresije Wesern blot tehnikom je pokazala da je kod HTB140 ćelija protein Bcl-2 visoko eksprimiran, što bi mogao biti jedan od razloga njihove veoma izražene radio-rezistencije. Da bi ispitali kakav je uticaj apoptotskih proteina Bcl-2 familije na detektovane inhibitorne efekte jona ugljenika na HTB140 ćelije, praćen je odnos proteina Bax i Bcl-2 u ćelijskim ekstraktima kao i odnos nivoa ekspresije ova dva gena. Dozno zavisno povećanje odnosa Bax/Bcl-2 detektovano je u

svim ozračenim uzorcima u obe pozicije zračenja, kako na nivou proteina, tako i na genskom nivou. To ukazuje da je zračenje izrazito radio-rezistentnih HTB140 ćelija jonima ugljenika primenom obe analizirane vrednosti LET-a indukovalo apoptozu kroz pomeranje odnosa Bax/Bcl-2 u korist pro-apoptskog proteina Bax.

Brojne studije pokazale su da je apoptoza indukovana zračenjem visokog LET-a zavisna od kaspaza (Yamakawa *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2009). Aktivacija kaspaze-3 u odgovoru na protonsko zračenje i zračenje jonima ugljenika pokazana je u ranijim istraživanjima na HTB140 ćelijama (Korićanac *et al.*, 2012; Korićanac *et al.*, 2013). Imajući u vidu da aktivirana kaspaza-3 dovodi do isecanja PARP-a i da je prisustvo isečenog PARP-a u ćeliji specifičan indikator apoptoze (Burlacu, 2003) u ovoj studiji praćeno je isecanje ovog proteina nakon zračenja jonima ugljenika. Prisustvo PARP subjedinice od 89 kDa ukazuje na indukciju apoptoze kod HTB140 ćelija nakon zračenja jonima ugljenika. Najviše isečenog proteina PARP detektovano je nakon primene većih doza jona ugljenika u poziciji B (LET 197.2 keV/ μ m).

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je i ekspresija molekula NF κ B. Regulatorni protein NF κ B aktiviraju različiti signali, proinflamatorni citokini (kao na primer TNF- α , interleukin-1), T i B ćelijski mitogeni, bakterije, lipopolisaharidi, virusi, dvolančane RNK, kao i jonizujuće zračenje i hemoterapeutici (Aggarwal *et al.*, 2009). Poznato je da aktivirani protein NF κ B reguliše transkripciju preko 400 gena čiji su proteinski produkti uključeni u brojne procese. Regulacija rasta i imunološkog odgovora, inflamacija, neoplastična transformacija i apoptoza su neki od njih (Li i Sethi, 2010). Rezultati eksperimentalnih studija pokazali su da je proteinom NF- κ B regulisana i ekspresija onih gena čiji proteinski produkti, posreduju u procesima odgovornim za razvoj hemo-rezistencije i radio-rezistencije u različitim tipovima malignih ćelija (Baud i Karin, 2009). Regulatorni protein NF κ B je konstitutivno aktivan u mnogim malignim ćelijama, uključujući i ćelije melanoma (Lindholm *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 2001; Amiri i Richmond, 2005). Kod melanoma je pokazano da je aktivnost proteina NF κ B povezana sa progresijom melanoma (Kashani-Sabet *et al.*, 2004) i povećanjem njegovog metastatskog potencijala (Kashani-Sabet *et al.*, 2002). Efekat zračenja jonima ugljenika na NF κ B signalni put kod melanoma još uvek nije dovoljno proučen. Na embrionskim 293 ćelijama bubrega pokazano je da joni ugljenika u poređenju sa X zracima imaju veći potencijal da aktiviraju protein NF κ B (Hellweg *et al.*, 2011). Rezultati naše studije

na izrazito radio-rezistentnoj ćelijskoj liniji melanoma čoveka su pokazali da je NFκB konstitutivno aktivan i da je u obe pozicije zračenja povećana količina ovog proteina u odnosu na neozračene ćelije. Nivo iRNK NFκB nije značajno promenjen nakon zračenja jonima ugljenika.

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije može se zaključiti da zračenje jonima ugljenika pokazuje značajne anti-tumorske efekte i da njihov intenzitet zavisi od vrednosti primenjenog LET-a.

Najizraženiji antitumorski efekat postignut je primenom jona ugljenika čija je vrednost LET-a 197.2 keV/μm. Povećanje vrednosti LET-a na 382.4 keV/μm nije pokazalo bolji inhibicioni efekat na ćelije HTB140 melanoma čoveka. Ovo se može objasniti prirodom jona ugljenika i njihovom putanjom kroz biološki sistem. Naime, oštećenja izazvana zračenjem visokog LET-a nisu uniformno distribuirana. Verovatnoća da pojedinačna ćelija ne bude pogođena je veća kod zračenja visokog LET-a u odnosu na zračenje niskog LET-a (Mehnati *et al.*, 2006; Goodhead *et al.*, 1999). Rezultati dobijeni u ovoj studiji na izrazito radio-rezistentnim ćelijama su u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju da se najveća efikasnost jona ugljenika postiže pri primeni zračenja sa LET-om od ~200 keV/μm (Ando *et al.*, 2005; Fokas *et al.*, 2009; Weber i Kraft, 2009; Okayasu, 2012).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. HTB140 ćelije melanoma čoveka posle ozračivanja jonima ugljenika karakterišu vrednosti SF2 od 0.72 u poziciji A (LET 84.7 keV/μm), 0.61 u poziciji B (LET 197.2 keV/μm) i 0.67 u poziciji C (LET 382.4 keV/μm) koje ukazuju na visoku radio-rezistentnost ovih ćelija.
2. Vrednosti relativne biološke efektivnosti jona ugljenika u odnosu na izoefekat za γ zračenje od 2 Gy (RBE(2Gy, γ)) ukazuju na jaču inaktivaciju jonima ugljenika u sve tri pozicije zračenja duž Bragg-ove krive u odnosu na efekat γ zraka, sa najvećom vrednosti od 7.06 ± 0.18 u poziciji B, pri LET-u od 197.2 keV/μm. Takođe, efikasnost ozračivanja jonima ugljenika je veća i u odnosu na protone.
3. Zračenje jonima ugljenika dovelo je do značajnog smanjenja vijabilnosti i proliferativne sposobnosti HTB140 ćelija melanoma čoveka u obe analizirane vremenske tačke. Izraženiji inhibicioni efekat je konstatovan 7 dana nakon ozračivanja. Smanjenje vijabilnosti i proliferativne sposobnosti je detektovano u sve tri pozicije zračenja duž Bragg-ove krive, a najbolji efekat je postignut u poziciji B, u kojoj je vijabilnost ćelija manja od 40%, a proliferacija ispod 25%.
4. Značajna akumulacija ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa je konstatovana 48 h nakon ozračivanja jonima ugljenika u pozicijama B i C. Bolji efekat je postignut u poziciji B, gde je procenat ćelija u G₂ fazi u opsegu od 23 do 29 %.
5. Zračenje jonima ugljenika dovelo je do indukcije apoptoze 48 h nakon ozračivanja HTB140 ćelija melanoma čoveka. Dozno zavisno povećanje broja

apoptotskih ćelija detektovano je u svim ozračenim uzorcima, dostižući 21.8% nakon primene doze od 16 Gy u poziciji B (LET 197.2 keV/μm).

6. Povećan broj apoptotskih ćelija u izrazito radio-rezistentnim HTB140 ćelijama melanoma čoveka nakon zračenja jonima ugljenika je praćen povećanjem nivoa proteina p53. Povećanje je izraženije u poziciji B (LET 197.2 keV/μm) i dostiže vrednosti preko 700% nakon ozračivanja dozama od 12 i 16 Gy.
7. Dozno zavisno povećanje odnosa Bax/Bcl-2 detektovano je u svim ozračenim uzorcima u obe pozicije zračenja, kako na nivou proteina, tako i na nivou iRNK. To ukazuje da je zračenje izrazito radio-rezistentnih HTB140 ćelija jonima ugljenika primenom obe analizirane vrednosti LET-a indukovalo apoptozu kroz pomeranje odnosa Bax/Bcl-2 u korist pro-apoptskog proteina Bax.
8. Indukcija apoptoze kod HTB140 ćelija nakon zračenja jonima ugljenika potvrđena je prisustvom PARP subjedinice od 89 kDa.
9. Transkripcioni faktor NFκB je konstitutivno aktivan kod HTB140 ćelija melanoma čoveka i u obe pozicije zračenja jonima ugljenika je povećana količina ovog proteina u odnosu na neozračene ćelije. Nivo ovog proteina dostiže 410% u poziciji B, odnosno 340% u poziciji C.

Na osnovu ovako sumiranih rezultata može se zaključiti da je najbolji efekat zračenja jonima ugljenika na inhibiciju rasta HTB140 ćelije melanoma čoveka postignut u poziciji B (LET 197.2 keV/μm). Antitumorski efekat jona ugljenika je ostvaren kroz indukciju apoptoze kao i G₂ bloka ćelijskog ciklusa.

7. LITERATURA

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. **2002**. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9(2): 423-432.
- Adams JM, Cory S. **2001**. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, 26(1): 61-66.
- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. **2009**. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*, 15(2): 425-430.
- Al-Jahdari WS, Suzuki Y, Yoshida Y, Hamada N, Shirai K, Noda SE, Funayama T, Sakashita T, Kobayashi Y, Saito S, Goto F, Nakano T. **2009**. The radiobiological effectiveness of carbon-ion beams on growing neurons. *Int J Radiat Biol*, 85(8): 700-709.
- Allen C, Borak TB, Tsujii H, Nickoloff JA. **2011**. Heavy charged particle radiobiology: using enhanced biological effectiveness and improved beam focusing to advance cancer therapy. *Mutat Res*, 711(1-2): 150-157.
- Alphonse G, Maalouf M, Battiston-Montagne P, Ardail D, Beuve M, Rousson R, Taucher-Scholz G, Fournier C, Rodriguez-Lafrasse C. **2013**. p53-independent early and late apoptosis is mediated by ceramide after exposure of tumor cells to photon or carbon ion irradiation. *BMC Cancer*, 13(151): doi: 10.1186/1471-2407-1113-1151.
- Al-Shabrawey M, Ahmad S, Megyerdi S, Othman A, Baban B, Palenski TL, Shin ES, Gurel Z, Hsu S, Sheibani N. **2012**. Caspase-14: a novel caspase in the retina with a potential role in diabetic retinopathy. *Mol Vis*, 18: 1895-1906.
- Amaldi U, Kraft G. **2005**. Radiotherapy with beams of carbon ions. *Reports on progress in physics*, 68(8): 1861, doi:10.1088/0034-4885/68/8/R04.

- Amiri KI, Richmond A. **2005**. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 24(2): 301-313.
- Ando K, Koike S, Uzawa A, Takai N, Fukawa T, Furusawa Y, Aoki M, Miyato Y. **2005**. Biological gain of carbon-ion radiotherapy for the early response of tumor growth delay and against early response of skin reaction in mice. *J Radiat Res*, 46(1): 51-57.
- Ando K, Kase Y. **2009**. Biological characteristics of carbon-ion therapy. *Int J Radiat Biol*, 85(9): 715-728.
- Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. **2006**. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48): 18308-18313.
- Aoki-Nakano M, Furusawa Y, Uzawa A, Matsumoto Y, Hirayama R, Tsuruoka C, Ogino T, Nishio T, Kagawa K, Murakami M, Kagiya G, Kume K, Hatashita M, Fukuda S, Yamamoto K, Fuji H, Murayama S, Hata M, Sakae T, Matsumoto H. **2014**. Relative biological effectiveness of therapeutic proton beams for HSG cells at Japanese proton therapy facilities. *J Radiat Res*: doi: 10.1093/jrr/rru1003.
- Asaithamby A, Hu B, Delgado O, Ding LH, Story MD, Minna JD, Shay JW, Chen DJ. **2011**. Irreparable complex DNA double-strand breaks induce chromosome breakage in organotypic three-dimensional human lung epithelial cell culture. *Nucleic Acids Res*, 39(13): 5474-5488.
- Ashkenazi, A. **2002**. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, 2(6): 420-430.
- Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. **2012**. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, 327(1): 48-60.
- Baehrecke, E. **2002**. How death shapes life during development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(10): 779-787.
- Baichwal VR, Baeuerle PA. **1997**. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol*, 7(2): 94-96.

- Baldwin, A. **1996**. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14: 649-683.
- Baliga B, Kumar S. **2003**. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ*, 10(1): 16-18.
- Ballarini F, Alloni D, Facchetti A, Ottolenghi A. **2008**. Heavy-ion effects: from track structure to DNA and chromosome damage. *New Journal of Physics*, 10(7): 075008, doi:10.1088/1367-2630/10/7/075008.
- Barnard S, Bouffler S, Rothkamm K. **2013**. The shape of the radiation dose response for DNA double-strand break induction and repair. *Genome Integr*, 4(1): 1-8.
- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. **2012**. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*, 9(3): 193-199.
- Baud V, Karin M. **2009**. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 8(1): 33-40.
- Beaumont KA, Shekar SN, Cook AL, Duffy DL, Sturm RA. **2008**. Red hair is the null phenotype of MC1R. *Hum Mutat*, 29(8): 88-94.
- Beauchesne PD, Bertrand S, Branche R, Linke SP, Revel R, Dore JF, Pedoux RM. **2003**. Human malignant glioma cell lines are sensitive to low radiation doses. *Int J Cancer*, 105(1): 33-40.
- Belli M, Cera F, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Haque AM, Ianzini F, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA, Tiveron P. **1998**. RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in V79 cells: further results at the LNL facility. *Int J Radiat Biol*, 74(4): 501-509.
- Belli M, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Dini V, Moschini G, Signoretti C, Simone G, Tabocchini MA, Tiveron P. **2000**. DNA DSB induction and rejoining in V79 cells irradiated with light ions: a constant field gel electrophoresis study. *Int J Radiat Biol*, 76(8): 1095-1104.
- Belli M, Sapora O, Tabocchini MA. **2002**. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res*, 43: S13-19.

- Belli M, Bettega D, Calzolari P, Cherubini R, Cuttone G, Durante M, Esposito G, Furusawa Y, Gerardi S, Gialanella G, Grossi G, Manti L, Marchesini R, Pugliese M, Scampoli P, Simone G, Sorrentino E, Tabocchini MA, Tallone L. **2008**. Effectiveness of monoenergetic and spread-out Bragg peak carbon-ions for inactivation of various normal and tumour human cell lines. *Journal of radiation research*, 49(6): 597-607.
- Beneke S, Diefenbach J, Bürkle A. **2004**. Poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. *Int J Cancer*, 111(6): 813-818.
- Bergenheim, V. **2007**. Effects of nicotine on GABAA subunit expression in the rat brain. App 46.
- Bettega D, Calzolari P, Chauvel P, Courdi A, Herault J, Iborra N, Marchesini R, Massariello P, Poli GL, Tallone L. **2000**. Radiobiological studies on the 65 MeV therapeutic proton beam at Nice using human tumour cells. *Int J Radiat Biol*, 76(10): 1297-1303.
- Beuve, M., Alphonse, G., Maalouf, M., Colliaux, A., Battiston-Montagne, P., Jalade, P., Balanzat, E., Demeyer, A., Bajard, M., Rodriguez-Lafrasse, C. **2008**. Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 71(2): 635-642.
- Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. **2009**. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*, 23(6): 488-496.
- Blaisdell JO, Harrison L, Wallace SS. **2001**. Base excision repair processing of radiation-induced clustered DNA lesions. *Radiat Prot Dosimetry*, 97(1): 25-31.
- Bloethner S, Scherer D, Drechsel M, Hemminki K, Kumar R. **2009**. Malignant melanoma--a genetic overview. *Actas Dermosifiliogr*, 100 Suppl 1: 38-51.
- Borner, C. **2003**. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, 39(11): 615-647.
- Bos, J. **1989**. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res*, 49(17): 4682-4689.

- Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC, Kroemer G. **2000**. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene*, 19(3): 329-336.
- Brenner M, Hearing VJ. **2008**. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 84(3): 539-549.
- Brower, V. **2009**. Carbon ion therapy to debut in Europe. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(2): 74-76.
- Budman J, Chu G. **2005**. Processing of DNA for nonhomologous end- joining by cell- free extract. *The EMBO journal*, 24(4): 849-860.
- Burlacu, A. **2003**. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*, 7(3): 249-257.
- Carnero A, Hannon GJ. **1998**. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol*, 227: 43-55.
- Cavalcante LO, Melo MR, Dinis VG, Castro RB, Souza BD, Longui CA. **2010**. Quantitation of glucocorticoid receptor alpha and NF- κ B pathway mRNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Genet Mol Res*, 9(4): 2300-2310.
- Chen LF, Greene WC. **2004**. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(5): 392-401.
- Christofferson DE, Yuan J. **2010**. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2): 263-268.
- Chu WT, Ludewigt BA, Renner TR. **1993**. Instrumentation for the treatment of cancer using proton and light ion beams. *Rev Sci Instrum*, 64: 2055-2122.
- Cirrone P, Cuttone G, Lojacono PA, Lo Nigro S, Mongelli V, Patti IV, Privitera G, Raffaele L, Rifuggiato D, Sabini MG, Salamone V, Spatola C, Valastro LM. **2004**. A 62-MeV proton beam for the treatment of ocular melanoma at Laboratori Nazionali del Sud-INFN. *IEEE T Nucl Sci* 2004, 51: 860-865.

- Cory S, Adams JM. **2002**. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2(9): 647-656.
- Costin GE, Hearing VJ. **2007**. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*, 21(4): 976-994.
- Creasey AA, Smith HS, Hackett AJ, Fukuyama K, Epstein WL, Madin SH. **1979**. Biological properties of human melanoma cells in culture. *In Vitro*, 15(5): 342-350.
- Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. **2006**. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*, 81(4): 500-507.
- Cunha ES, Kawahara R, Kadowaki MK, Amstalden HG, Noleto GR, Cadena SM, Winnischofer SM, Martinez GR. **2012**. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. *Exp Cell Res*, 318(15): 1913-1925.
- Danialan R, Gopinath A, Phelps A, Murphy M, Grant-Kels JM. **2012**. Accurate identification of melanoma tumor margins: a review of the literature. *Expert Review of Dermatology*, 7(4): 343-358.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. **2002**. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(9892): 949-954.
- DeLaney TF, Kooy HM. **2008**. Proton and Charged Particle Radiotherapy. *Lippincott Williams&Wilkins*, ISBN: 978-0-7817-6552-7.

- Depuydt J, Baert A, Vandersickel V, Thierens H, Vral A. **2013**. Relative biological effectiveness of mammography X-rays at the level of DNA and chromosomes in lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 89(7): 532-538.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. **1995**. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33(4): 781-796.
- Diefenbach J, Bürkle A. **2005**. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 62(7-8): 721-730.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. **2000**. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1): 33-42.
- Elmore, S. **2007**. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4): 495-516.
- Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. **2007**. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 19(2): 154-161.
- Fargnoli MC, Argenziano G, Zalaudek I, Peris K. **2006**. High- and low-penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(5): 657-670.
- Fiebig HH, Maier A, Burger AM. **2004**. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *European Journal of Cancer*, 40(6): 802-820.
- Fink SL, Cookson BT. **2005**. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4): 1907-1916.
- Firoz EF, Warycha M, Zakrzewski J, Pollens D, Wang G, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Manga P, Ostrer H, Celebi JT, Kamino H, Darvishian F, Rolnitzky L, Goldberg JD, Osman I, Polsky D. **2009**. Association of MDM2 SNP309, age of onset, and gender in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*, 15(7): 2573-2580.

- Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA 3rd, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J. **2012**. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367(18): 1694-1703.
- Fogarty GB, Hong A. **2014**. Radiation therapy for advanced and metastatic melanoma. *J Surg Oncol*, 109(4): 370-375.
- Fokas E, Kraft G, An H, Engenhardt-Cabillic R. **2009**. Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. *Biochim Biophys Acta*, 1796(2): 216-229.
- Foote RL, Stafford SL, Petersen IA, Pulido JS, Clarke MJ, Schild SE, Garces YI, Olivier KR, Miller RC, Haddock MG, Yan E, Laack NN, Arndt CA, Buskirk SJ, Miller VL, Brent CR, Kruse JJ, Ezzell GA, Herman MG, Gunderson LL, Erlichman C, Diasio RB. **2012**. The clinical case for proton beam therapy. *Radiat Oncol*, 7: 174-183.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. **2006**. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5): 2315-2319.
- Frese MC, Yu VK, Stewart RD, Carlson DJ. **2012**. A mechanism-based approach to predict the relative biological effectiveness of protons and carbon ions in radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 83(1): 442-450.
- Friedman H, Kerby T, Calvert H. **2000**. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research*, 6(7): 2585-2597.
- Fukumura A, Tsujii H, Kamada T, Baba M, Tsuji H, Kato H, Kato S, Yamada S, Yasuda S, Yanagi T, Kato H, Hara R, Yamamoto N, Mizoe J, Akahane K, Fukuda S, Furusawa Y, Iwata Y, Kanai T, Kanematsu N, Kitagawa A, Matsufuji N, Minohara S, Miyahara N, Mizuno H, Murakami T, Nishizawa K, Noda K, Takada E, Yonai S. **2009**. Carbon-ion radiotherapy: clinical aspects and related dosimetry. *Radiat Prot Dosimetry*, 137(1-2): 149-155.
- Furusawa Y, Fukutsu K, Aoki M, Itsukaichi H, Eguchi-Kasai K, Ohara H, Yatagai F, Kanai T, Ando K. **2000**. Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three

- different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams. *Radiat Res*, 154(5): 485-496.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. **2012**. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19(1): 107-120.
- Gao H, Jin S, Song Y, Fu M, Wang M, Liu Z, Wu M, Zhan Q. **2005**. B23 regulates GADD45a nuclear translocation and contributes to GADD45a-induced cell cycle G2-M arrest. *J Biol Chem*, 280(12): 10988-10996.
- GEANT4. **1998**. GEANT4: Detector Description and Simulation Tool. *CERN Program Library*.
- Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. **2001**. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol*, 54(3): 229-235.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. **2011**. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*, 223(2): 116-126.
- Gong L, Jin X, Li Q, Liu J, An L. **2007**. Heavy ion beams induce survivin expression in human hepatoma SMMC-7721 cells more effectively than X-rays. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39(8): 575-582.
- Goodhead, D. **1994**. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol*, 65(1): 7-17.
- Goodhead, D. **1995**. Molecular and cell models of biological effects of heavy ion radiation. *Radiat Environ Biophys*, 34(2): 67-72.
- Goodhead, D. **1999**. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *J Radiat Res*, 40: 1-13.

- Gottlieb E, Oren M. **1998**. p53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53. *EMBO J*, 17(13): 3587-3596.
- Green LM, Murray DK, Bant AM, Kazarians G, Moyers MF, Nelson GA, Tran DT. **2001**. Response of thyroid follicular cells to gamma irradiation compared to proton irradiation. I. Initial characterization of DNA damage, micronucleus formation, apoptosis, cell survival, and cell cycle phase redistribution. *Radiat Res*, 155: 32-42.
- Green DR, Kroemer G. **2009**. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242): 1127-1130.
- Groesser T, Chun E, Rydberg B. **2007**. Relative biological effectiveness of high-energy iron ions for micronucleus formation at low doses. *Radiat Res*, 168(6): 675-682.
- Gudkov AV, Komarova EA. **2003**. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer*, 3(2): 117-129.
- Hada M, Georgakilas AG. **2008**. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res*, 49(3): 203-210.
- Hall E, Giaccia A. **2006**. Radiobiology for the radiologist, 6th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hamada, N., Hara, T., Omura-Minamisawa, M., Funayama, T., Sakashita, T., Sora, S., Yokota, Y., Nakano, T., Kobayashi, Y. **2008**. Energetic heavy ions overcome tumor radioresistance caused by overexpression of Bcl-2. *Radiother. Oncol.*, 89(2): 231-236.
- Hamada N, Imaoka T, Masunaga S, Ogata T, Okayasu R, Takahashi A, Kato TA, Kobayashi Y, Ohnishi T, Ono K, Shimada Y, Teshima T. **2010**. Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy. *J Radiat Res*, 51(4): 365-383.
- Harbour JW, Dean DC. **2000**. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14(19): 2393-2409.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. **2003**. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 116(20): 4077-4085.

- Hearing, V. **1993**. Unraveling the melanocyte. *Am J Hum Genet*, 52(1): 1-7.
- Hellweg CE, Baumstark-Khan C, Schmitz C, Lau P, Meier MM, Testard I, Berger T, Reitz G. **2011**. Carbon-ion-induced activation of the NF- κ B pathway. *Radiat Res*, 175(4): 424-431.
- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. **1998**. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*, 187(4): 587-600.
- Homet B, Ribas A. **2014**. New drug targets in metastatic melanoma. *J Pathol*, 232(2): 134-141.
- Houben R, Schmid CP, Maier M, Wobser M, Motschenbacher S, Becker JC, Vetter-Kauczok CS, Weyandt G, Hesbacher S, Haferkamp S. **2014**. p53 regulation by TRP2 is not pervasive in melanoma. *PLoS One*, 9(1): e87440. doi: 87410.81371/journal.pone.0087440. eCollection 0082014.
- Howell RW, Azure MT, Narra VR, Rao DV. **1994**. Relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo at low doses. *Radiat Res*, 137(3): 352-360.
- Huynh H, Do PT, Nguyen TH, Chow P, Tan PH, Quach TH, Van T, Soo KC, Tran E. **2004**. Extracellular signal-regulated kinase induces cyclin D1 and Cdk-2 expression and phosphorylation of retinoblastoma in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 25(6): 1839-1847.
- IAEA Technical Report Series N. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: an international code of practise for dosimetry based on standards of absorbed dose to water (2000). 398: 135-150.
- Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. **2011**. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1807(6): 735-745.
- Ismail SM, Puppi M, Prithivirajsingh S, Munshi A, Raju U, Meyn RE, Buchholz TA, Story MD, Brock WA, Milas L, Thames HD, Stevens CW. **2004**. Predicting radiosensitivity using DNA end-binding complex analysis. *Clin Cancer Res*, 10(4): 1226-1234.

- Israels LG, Israels ED. **1999**. Apoptosis. *Stem Cells*, 17(5): 306-313.
- Israels ED, Israels LG. **2000**. The cell cycle. *Oncologist*, 5(6): 510-513.
- Iwadata Y, Mizoe J, Osaka Y, Yamaura A, Tsujii H. **2001**. High linear energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(3): 803-808.
- Jackson SP, Bartek J. **2009**. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267): 1071-1078.
- Jäkel O, Krämer M, Karger CP, Debus J. **2001**. Treatment planning for heavy ion radiotherapy: clinical implementation and application. *Physics in medicine and biology*, 46(4): 1101, doi:10.1088/0031-9155/46/4/314.
- Jara JR, Martinez-Liarte JH, Solano F. **1990**. Transport of L-tyrosine by B16/F10 malignant melanocytes: characterization of the process. *Pigment Cell Res*, 3(6): 290-296.
- Jelfs PL, Giles G, Shugg D, Coates M, Durling G, Fitzgerald P, Ring I. **1994**. Cutaneous malignant melanoma in Australia, 1989. *Med J Aust*, 161(3): 182-187.
- Jenner TJ, deLara CM, O'Neill P, Stevens DL. **1993**. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells following gamma- and alpha-irradiation. *Int J Radiat Biol*, 64(3): 265-273.
- Jermann, M. **2014**. Particle Therapy Statistics in 2013. *International Journal of Particle Therap*, 1(1): DOI 10.14338/IJPT.14314-editorial-14332.14331.
- Jinno-Oue A, Shimizu N, Hamada N, Wada S, Tanaka A, Shinagawa M, Ohtsuki T, Mori T, Saha MN, Hoque AS, Islam S, Kogure K, Funayama T, Kobayashi Y, Hoshino H. **2010**. Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76(1): 229-241.
- Joiner MC, Marples B, Johns H. **1993**. The response of tissues to very low doses per fraction: a reflection of induced repair? *Recent Results Cancer Res*, 130: 27-40.
- Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. **1999**. How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol*, 3(1): 77-83.

- Kanai T, Furusawa Y, Fukutsu K, Itsukaichi H, Eguchi-Kasai K, Ohara H. **1997**. Irradiation of mixed beam and design of spread-out Bragg peak for heavy-ion radiotherapy. *Radiat Res*, 147(1): 78-85.
- Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H, Takeda K. **2012**. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J Signal Transduct*: 2012:931215.
- Kashani-Sabet M, Liu Y, Fong S, Desprez PY, Liu S, Tu G, Nosrati M, Handumrongkul C, Liggitt D, Thor AD, Debs RJ. **2002**. Identification of gene function and functional pathways by systemic plasmid-based ribozyme targeting in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6): 3878-3883.
- Kashani-Sabet M, Shaikh L, Miller JR 3rd, Nosrati M, Ferreira CM, Debs RJ, Sagebiel RW. **2004**. NF-kappa B in the vascular progression of melanoma. *J Clin Oncol*, 22(4): 617-623.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. **1993**. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53(17): 3976-3985.
- Kawata T, Ito H, George K, Wu H, Cucinotta FA. **2004**. Chromosome aberrations induced by high-LET radiations. *Biol Sci Space*, 18(4): 216-223.
- Kim R, Emi M, Tanabe K. **2005**. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncol Rep*, 14(3): 595-599.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. **1996**. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, 274(5293): 1652-1659.
- Kirkin V, Joos S, Zörnig M. **2004**. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1644(2-3): 229-249.
- Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. **2001**. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(5): 1150-1154.
- Kolesnick R, Fuks Z. **2003**. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*, 22(37): 5897-5906.

- Korićanac L, Petrović I, Privitera G, Cuttone G, Ristić-Fira A. **2007**. HTB140 melanoma cells under proton irradiation and/or alkylating agents. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 81(9): 1467-1470.
- Korićanac L. **2009**. Efekat hemoterapeutika fotemustina i dakarbazina i visoko jonizujućeg zračenja na modulaciju ćelijskih funkcija humanog melanoma in vitro. *Doktorska disertacija*, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Korićanac LB, Žakula JJ, Petrović IM, Valastro LM, Cirrone GA, Cuttone G, Ristić-Fira AM. **2010**. Anti-tumour activity of fotemustine and protons in combination with bevacizumab. *Chemotherapy*, 56(3): 214-222.
- Korićanac L, Žakula J, Cirrone GAP, Privitera G, and P. I. Cuttone G, Ristić-Fira A. **2012**. Variation of Apoptotic Pathway Regulators by Fotemustine and Protons in a Human Melanoma Cell Line. *Adv Sci Lett*, 5: 1-8.
- Korićanac LB, Žakula JJ, Keta OD, Cirrone P, Cuttone G, Ristić-Fira AM, Petrović IM **2013**. Carbon Ions Induce Dna Double Strand Breaks and Apoptosis in Htb140 Melanoma Cells. *NUCL TECHNOL RADIAT*, 28(2): 195-203.
- Kraft, G. **2009**. Heavy ion tumor therapy. *Med Monatsschr Pharm*, 32(9): 328-334.
- Kraft G, Krämer M, Scholz M. **1992**. LET, track structure and models. *Radiation and environmental biophysics*, 31(3): 161-180.
- Krämer M, Weyrather WK, Scholz M. **2003**. The increased biological effectiveness of heavy charged particles: from radiobiology to treatment planning. *Technol Cancer Res Treat*, 2(5): 427-436.
- Laemmli, U. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lambin P, Malaise EP, Joiner MC. **1996**. Might intrinsic radioresistance of human tumour cells be induced by radiation? *Int J Radiat Biol*, 69(3): 279-290.
- Lee MH, Reynisdóttir I, Massagué J. **1995**. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, 9(6): 639-649.

- Lee HJ, Kim JS, Moon C, Kim JC, Jo SK, Kim SH. **2008**. Relative biological effectiveness of fast neutrons in a multiorgan assay for apoptosis in mouse. *Environ Toxicol*, 23(2): 233-239.
- Lehmann BD, Pietenpol JA. **2012**. Targeting mutant p53 in human tumors. *J Clin Oncol*, 30(29): 3648-3650.
- Levine AJ, Hu W, Feng Z. **2006**. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*, 13(6): 1027-1036.
- Levine AJ, Oren M. **2009**. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, 9(10): 749-758.
- Li F, Sethi G. **2010**. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1805(2): 167-180.
- Li LY, Luo X, Wang X. **2001**. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842): 95-99.
- Liang Y, Liu J, Feng Z. **2013**. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci*, 3(1): 9-18.
- Lin JY, Fisher DE. **2007**. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130): 843-850.
- Lindholm PF, Bub J, Kaul S, Shidham VB, Kajdacsy-Balla A. **2000**. The role of constitutive NF-kappaB activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. *Clin Exp Metastasis*, 18(6): 471-479.
- Liu J, Zhang C, Feng Z. **2014**. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46(3): 170-179.
- Livak KJ, Schmittgen TD. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Llambi F, Green DR. **2011**. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev*, 21(1): 12-20.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-267.
- Lücke-Huhle C, Blakely EA, Chang PY, Tobias CA. **1979**. Drastic G2 arrest in mammalian cells after irradiation with heavy-ion beams. *Radiat Res*, 79(1): 97-112.
- MacDonald SM, DeLaney TF, Loeffler JS. **2006**. Proton beam radiation therapy. *Cancer Invest*, 24(2): 199-208.
- Machnicki MM, Stoklosa T. **2014**. BRAF - A new player in hematological neoplasms. *Blood Cells Mol Dis*, 53(1-2): 77-83.
- Maity A, McKenna WG, Muschel RJ. **1994**. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol*, 31(1): 1-13.
- Marples B, Joiner MC. **1993**. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat Res*, 133(1): 41-51.
- Marples B, Joiner MC. **2000**. Modification of survival by DNA repair modifiers: a probable explanation for the phenomenon of increased radioresistance. *Int J Radiat Biol*, 76(3): 305-312.
- Marsden VS, Strasser A. **2003**. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol*, 21: 71-105.
- Matsumoto Y, Matsuura T, Wada M, Egashira Y, Nishio T, Furusawa Y. **2014**. Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: in vitro study. *J Radiat Res*, 13: doi: 10.1093/jrr/rrt1230.
- Matsumura S, Matsumura T, Ozeki S, Fukushima S, Yamazaki H, Inoue T, Inoue T, Furusawa Y, Eguchi-Kasai K. **2003**. Comparative analysis of G2 arrest after irradiation with 75 keV carbon-ion beams and ¹³⁷Cs gamma-rays in a human lymphoblastoid cell line. *Cancer Detect Prev*, 27(3): 222-228.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. **2007**. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in

- cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8): 1263-1284.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. **2013**. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4): a008656.
- McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. **1994**. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res*, 54(14): 3718-3722.
- Mehnati P, Keshtkar A, Mesbahi A, Sasaki H. **2006**. Track detection on the cells exposed to high LET heavy-ions by CR-39 plastic and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). *Iran J Radiat Res*, 4(3): 137-141.
- Mileusnić D, Durbaba M. **2012**. Radijaciona onkologija. Alta nova, Beograd.
- Mori E, Takahashi A, Yamakawa N, Kirita T, Ohnishi T. **2009**. High LET heavy ion radiation induces p53-independent apoptosis. *J Radiat Res*, 50(1): 37-42.
- Munshi, A., Kurland, J.F., Nishikawa, T., Chiao, P.J., Andreeff, M., Meyn, R.E. **2004**. Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB radiosensitizes human melanoma cells. *Mol. Cancer. Ther.*, 3(8): 985-992.
- Murakami, T. **2012**. Cancer Treatment by Charged Particles - Carbon Ion Radiotherapy – Part 1. www.phys.cts.ntu.edu.tw.
- Nakayama H, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. **2001**. High expression levels of nuclear factor kappaB, IkappaB kinase alpha and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett*, 92(12): 3037-3044.
- Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. **2010**. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*, 49(9): 978-986.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. **1991**. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139(2): 271-279.
- Nikjoo H, O'Neill P, Wilson WE, Goodhead DT. **2001**. Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. *Radiat Res*, 156(5 Pt 2): 577-583.

- Ohno, T. **2013**. Particle radiotherapy with carbon ion beams. *EPMA J*, 4(1): doi: 10.1186/1878-5085-1184-1189.
- Okayasu, R. **2012**. Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions--a mini review. *Int J Cancer*, 130(5): 991-1000.
- Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. **2004**. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*, 157: 247-270.
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. **2002**. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1602(1): 73-87.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. **2012**. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45(6): 487-498.
- Paganetti H, Olko P, Kobus H, Becker R, Schmitz T, Waligorski MP, Filges D, Müller-Gärtner HW. **1997**. Calculation of relative biological effectiveness for proton beams using biological weighting functions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 37(3): 719-729.
- Paganetti H, Niemierko A, Ancukiewicz M, Gerweck LE, Goitein M, Loeffler JS, Suit HD. **2002**. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 53(2): 407-421.
- Paz A, Brownstein Z, Ber Y, Bialik S, David E, Sagir D, Ulitsky I, Elkon R, Kimchi A, Avraham KB, Shiloh Y, Shamir R. **2011**. SPIKE: a database of highly curated human signaling pathways. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue): D793-799.
- Peschke P, Karger CP, Scholz M, Debus J, Huber PE. **2011**. Relative biological effectiveness of carbon ions for local tumor control of a radioresistant prostate carcinoma in the rat. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 79(1): 239-246.
- Petrović, I., Ristić-Fira, A., Todorović, D., Valastro, L., Cirrone, P., Cuttone, G. **2006**. Radiobiological analysis of human melanoma cells on the 62 MeV CATANA proton beam. *Int. J. Radiat. Biol.*, 82(4): 251-265.

- Petrović IM, Korićanac LB, Todorović DV, Ristić-Fira AM, Valastro LM, Privitera G, Cuttone G. **2007**. Viability of a human melanoma cell after single and combined treatment with fotemustine, dacarbazine, and proton irradiation. *Ann N Y Acad Sci*, 1095: 154-164.
- Petrović I, Ristić-Fira A, Todorović D, Korićanac L, Valastro L, Cirrone P, Cuttone G. **2010**. Response of a radioresistant human melanoma cell line along the proton spread-out Bragg peak. *Int J Radiat Biol*, 86(9): 742-751.
- Pietenpol JA, Stewart ZA. **2002**. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181-182: 475-481.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. **1994**. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, 8(1): 9-22.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. **1998**. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92(6): 713-723.
- Pouget JP, Frelon S, Ravanat JL, Testard I, Odin F, Cadet J. **2002**. Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiat Res*, 157(5): 589-595.
- Qin JZ, Xin H, Sitailo LA, Denning MF, Nickoloff BJ. **2006**. Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA. *Cancer Res*, 66(19): 9636-9645.
- Quéreux G, Dréno B. **2011**. Fotemustine for the treatment of melanoma. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 12(18): 2891-2904.
- Rass K, Hassel JC. **2009**. Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. *G Ital Dermatol Venereol*, 144(1): 61-78.
- Reed, J. **1998**. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17(25): 3225-3236.

- Remmes NB, Herman MG, Kruse JJ. **2012**. Optimizing normal tissue sparing in ion therapy using calculated isoeffective dose for ion selection. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 83(2): 756-762.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. **2008**. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5): 402-412.
- Ristic-Fira AM, Todorovic DV, Koricanac LB, Petrovic IM, Valastro LM, Cirrone PG, Raffaele L, Cuttone G. **2007**. Response of a human melanoma cell line to low and high ionizing radiation. *Ann N Y Acad Sci*, 1095: 165-174.
- Ristić-Fira AM, Petrović IM, Korićanac LB, Valastro LM, Privitera G, Cuttone G. **2008**. Assessment of the inhibitory effects of different radiation qualities or chemotherapeutic agents on a human melanoma cell line. *Physica Medica*, 24(4): 187-195.
- Ristić-Fira AM, Korićanac LB, Žakula JJ, Valastro LM, Iannolo G, Privitera G, Cuttone G, Petrović IM. **2009**. Effects of fotemustine or dacarbazine on a melanoma cell line pretreated with therapeutic proton irradiation. *J Exp Clin Cancer Res*, 28(50).
- Ristić-Fira A, Todorović D, Žakula J, Keta O, Cirrone P, Cuttone G, Petrović I. **2011a**. Response of human HTB140 melanoma cells to conventional radiation and hadrons. *Physiol Res*, 60(Suppl 1): S129-135.
- Ristić-Fira A, Korićanac L, Žakula J, Keta O, Iannolo G, Cuttone G, Petrović I. **2011b**. Proton inactivation of melanoma cells enhanced by fotemustine. *Radiat Prot Dosimetry*, 143(2-4): 503-507.
- Ross JF, Liu X, Dynlacht BD. **1999**. Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell*, 3(2): 195-205.
- Rothkamm K, Löbrich M. **2003**. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9): 5057-5062.
- Sage E, Harrison L. **2011**. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival. *Mutat Res*, 711(1-2): 123-133.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **1989**. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sasaki H, Yatagai F, Kanai T, Furusawa Y, Hanaoka F, Zhu WG, Mehnati P. **1997**. Dependence of induction of interphase death of Chinese hamster ovary cells exposed to accelerated heavy ions on linear energy transfer. *Radiat Res*, 148(5): 449-454.
- Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. **2003**. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*, 63(4): 756-759.
- Schmid TE, Dollinger G, Hable V, Greubel C, Zlobinskaya O, Michalski D, Molls M, Röper B. **2010**. Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20 MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue. *Radiother Oncol*, 95(1): 66-72.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. **1993**. Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. *Endocr Rev*, 14(2): 133-151.
- Sekulic A, Haluska P Jr, Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, Salomao DR, Thorland EC, Vile RG, Swanson DL, Pockaj BA, Laman SD, Pittelkow MR, Markovic SN. **2008**. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc*, 83(7): 825-846.
- Sherr CJ, Roberts JM. **1995**. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9(10): 1149-1163.
- Sherr, C. **1996**. Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293): 1672-1677.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. **1990**. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 82(13): 1107-1112.
- Slater, J. **2006**. Clinical Applications of Protons Radiation Treatment at Loma Linda University: Review of Fifteen-year Experience *Technology in Cancer Research and Treatment*, 5(2): 81-89.

- Smalley KS, Eisen TG. **2002**. Differentiation of human melanoma cells through p38 MAP kinase is associated with decreased retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle arrest. *Melanoma Res*, 12(3): 187-192.
- Southan GJ, Szabó C. **2003**. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Curr Med Chem*, 10(4): 321-340.
- Spatola C, Privitera G, Raffaele L, Salamone V, Cuttone G, Cirrone P, Sabini MG, Lo Nigro S. **2003**. Clinical application of proton beams in the treatment of uveal melanoma: the first therapies carried out in Italy and preliminary results (CATANA Project). *Tumori*, 89(5): 502-509.
- Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. **2004**. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(3-4): 311-322.
- Stark GR, Taylor WR. **2006**. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol*, 32(3): 227-248.
- Stevens JB, Abdallah BY, Regan SM, Liu G, Bremer SW, Ye CJ, Heng HH. **2010**. Comparison of mitotic cell death by chromosome fragmentation to premature chromosome condensation. *Mol Cytogenet*, 3(20): doi: 10.1186/1755-8166-1183-1120.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. **1999**. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718): 441-446.
- Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. **2000**. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1): 103-108.
- Stiewe, T. **2007**. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(3): 165-168.
- Suzuki, M., Kase, Y., Yamaguchi, H., Kanai, T., Ando, K. **2000**. Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with

- heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 48(1): 241-250.
- Takahashi A, Ohnishi K, Wang X, Kobayashi M, Matsumoto H, Tamamoto T, Aoki H, Furusawa Y, Yukawa O, Ohnishi T. **2000**. The dependence of p53 on the radiation enhancement of thermosensitivity at different let. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47(2): 489-494.
- Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Asakawa I, Tamamoto T, Furusawa Y, Matsumoto H, Ohnishi T. **2001**. p53-dependent thermal enhancement of cellular sensitivity in human squamous cell carcinomas in relation to LET. *Int J Radiat Biol*, 77(10): 1043-1051.
- Takahashi, A., Matsumoto, H., Yuki, K., Yasumoto, J., Kajiwara, A., Aoki, M., Furusawa, Y., Ohnishi, K., Ohnishi, T. **2004**. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 60(2): 591-597.
- Tentori L, Lacal PM, Graziani G. **2013**. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol Sci*, 34(12): 656-666.
- Thornborrow EC, Patel S, Mastropietro AE, Schwartzfarb EM, Manfredi JJ. **2002**. A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. *Oncogene*, 21(7): 990-999.
- Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. **2005**. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer*, 116(1): 144-149.
- Todorović, D. **2009**. Uperedna analiza efekata gama i protonskog zračenja na malignotransformisane humane melanocyte u kulturi. *Doktorska disertacija*, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. **1997**. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*, 25(1): 82-88.
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. **2002**. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem*, 50(2): 125-133.

- Tseng CJ, Wang YJ, Liang YC, Jeng JH, Lee WS, Lin JK, Chen CH, Liu IC, Ho YS. **2002**. Microtubule damaging agents induce apoptosis in HL 60 cells and G2/M cell cycle arrest in HT 29 cells. *Toxicology*, 175(1-3): 123-142.
- Tsoulou E, Baggio L, Cherubini R, Kalfas CA. **2001**. Low-dose hypersensitivity of V79 cells under exposure to gamma-rays and 4He ions of different energies: survival and chromosome aberrations. *Int J Radiat Biol*, 77(11): 1133-1139.
- Tsujii H, Mizoe J, Kamada T, Baba M, Tsuji H, Kato H, Kato S, Yamada S, Yasuda S, Ohno T, Yanagi T, Imai R, Kagei K, Kato H, Hara R, Hasegawa A, Nakajima M, Sugane N, Tamaki N, Takagi R, Kandatsu S, Yoshikawa K, Kishimoto R, Miyamoto T. **2007**. Clinical Results of Carbon Ion Radiotherapy at NIRS. *J Radiat Res*, Suppl A(A1-A13).
- Tsujii H, Kamada T. **2012**. A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol*, 42(8): 670-685.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. **1984**. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678): 1097-1099.
- Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P. **2007**. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular cancer therapeutics*, 6(3): 789-801.
- Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. **1994**. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*, 174(1-2): 311-320.
- Vaseva AV, Moll UM. **2009**. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1787(5): 414-420.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. **2000**. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1): 43-53.

- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. **2003**. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36(3): 131-149.
- Virág L, Szabó C. **2002**. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54(3): 375-429.
- Vousden KH, Prives C. **2009**. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3): 413-431.
- Vyssokikh MY, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jürgensmeier JJ, Brdiczka D. **2002**. Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect. *Mol Biol Rep*, 29(1-2): 93-96.
- Watson JD, Baker TA, Gann A, Levine M, Losick R. **2013**. Molecular Biology of the Gene. *Pearson*, Seventh Edition.
- Weber U, Kraft G. **2009**. Comparison of carbon ions versus protons. *Cancer J*, 15(4): 325-332.
- Weyrather WK, Kraft G. **2004**. RBE of carbon ions: experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. *Radiotherapy and Oncology*, 73: S161-S169.
- Wouters BG, Lam GK, Oelfke U, Gardey K, Durand RE, Skarsgard LD. **1996**. Measurements of relative biological effectiveness of the 70 MeV proton beam at TRIUMF using Chinese hamster V79 cells and the high-precision cell sorter assay. *Radiat Res*, 146(2): 159-170.
- Yamakawa, N., Takahashi, A., Mori, E., Imai, Y., Furusawa, Y., Ohnishi, K., Kirita, T., Ohnishi, T. **2008**. High LET radiation enhances apoptosis in mutated p53 cancer cells through Caspase-9 activation. *Cancer. Sci.*, 99(7): 1455-1460.
- Yoon OK, Roh J. **2012**. Downregulation of KLF4 and the Bcl-2/Bax ratio in advanced epithelial ovarian cancer. *Oncology letters*, 4(5): 1033-1036.

Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbek D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M. **2006**. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature*, 443(7111): 569-573.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. **1998**. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92(6): 725-734.

Zhou G, Kawata T, Furusawa Y, Aoki M, Hirayama R, Ando K, Ito H. **2006**. Protective effects of melatonin against low- and high-LET irradiation. *J Radiat Res*, 47(2): 175-181.

BIOGRAFIJA

Jelena Žakula je rođena 22.06.1980. godine u Boru. Diplomirala je na grupi za Molekularnu biologiju i fiziologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2005. godine. Diplomski rad sa temom „Kloniranje siRNK za degradaciju RNK Air” je uradila pod rukovodstvom dr Đorđa Fire, redovnog profesora Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo diplomskog rada urađen je u Institute of Molecular Biology of the Austrian Academy of Sciences, University of Vienna. Doktorske studije u okviru studijskog programa Molekularna biologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2006. godine.

Zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča” od 2006. godine. Od 2006. do 2010. god. je bila angažovana na projektu „Signalni putevi delovanja steroidnih hormona i uticaj endogenih i egzogenih faktora na modulaciju procesa u ćelijama sisara” (143044B), a od 2010. na projektu „Radiosenzitivnost humanog genoma” (173046), finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. 2008. godine je izabrana u zvanje istraživač saradnik. Od 2006. godine je aktivno uključena u međunarodnu saradnju sa Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali del Sud (INFN-LNS), Katanija, Italija, na projektu “Radiobiological studies of human malignant cells after irradiation with light and heavy ions”.

Do sada je publikovala šest radova u časopisima međunarodnog značaja, osam radova u časopisima domaćeg značaja i jedanaest kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Ј. Жакула

број индекса io 060040

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Инактивација ћелија меланома човека зрачењем јонима угљеника: одређивање радиобиолошких параметара и анализа сигналних путева ћелијске смрти

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2014.

Јелена Жакула

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Ј. Жакула

Број индекса io 060040

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Инактивација ћелија меланома човека зрачењем јонима угљеника:
одређивање радиобиолошких параметара и анализа сигналних путева ћелијске
смрти

Ментор др Горан Брајушковић и др Лела Корићанац

Потписани/а Јелена Ј. Жакула

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2014.

Јелена Жакула

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Инактивација ћелија меланома човека зрачењем јонима угљеника: одређивање радиобиолошких параметара и анализа сигналних путева ћелијске смрти

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2014.

