

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vladana D. Petković

DIREKTNI EFEKTI NISKO I VISOKO
JONIZUJUĆEG ZRAČENJA NA ODABRANE
HUMANE MALIGNE ĆELIJSKE LINIJE:
BIOLOŠKI ODGOVOR I UTICAJ NA
TERAPIJSKU PRIMENU

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vladana D. Petković

DIRECT EFFECTS OF HIGH AND LOW
DENSITY IONISING RADIATIONS ON
SELECTED HUMAN MALIGNANT CELL
LINES: BIOLOGICAL RESPONSE AND
THERAPEUTIC APPLICATIONS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori

dr Otilija Keta, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča“-Institut od nacionalnog značaja za republiku Srbiju

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije

dr Snežana Pajović, naučni savetnik i redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča“-Institut od nacionalnog značaja za republiku Srbiju i Univerzitet u Nišu-Medicinski fakultet

dr Bato Korać, vanredni profesor i naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet i Univerzitet u Beogradu-Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za republiku Srbiju

dr Miloš Đorđević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča“-Institut od nacionalnog značaja za republiku Srbiju

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Radiosenzitivnost humanog genoma“ (ON 173046).

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Otiliji Keta, koja je svojim iskustvom, znanjem, prijateljskim savetima i trudom pružila neophodnu podršku u toku eksperimentalnog rada, publikovanja radova i pisanja doktorske disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandri Korać, na prenetom znanju tokom celokupnih studija, na svim sugestijama, posvećenosti i svesrdnom zalaganju kako bi se ova doktorska disertacija realizovala, kao i na ukazanom poverenju.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Bati Korać, na prenetom znanju, korisnim savetima, trudu i vremenu uloženom u toku konačne izrade doktorske teze.

Izrazitu zahvalnost dugujem dr Snežani Pajović, na svim sugestijama, pomoći i podršci koju je pružala od samog početka mog istraživačkog rada, sve do poslednje faze izrade ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Milošu Đorđeviću, na znanju, konstruktivnim savetima, vremenu, trudu i pomoći u toku finalne izrade doktorske teze.

Zahvalnost na kreiranju ideje koja je osnov ovog rada, ali i na svim korisnim savetima i smernicama dugujem dr Aleksandri Ristić-Fira i dr Ivanu Petroviću, naučnim savetnicima u penziji Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Zahvaljujem se dr Danijeli Maksimović-Ivanić i dr Sanji Mijatović na dragocenoj saradnji i prenetom znanju, dr Igoru Goliću i dr Mariji Ilić na pomoći i prijateljstvu, kao i svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ i INFN-LNS iz Katanije (Italija) koji su doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima, na podršci i ljubavi koju mi pružaju svih ovih godina.

Direktni efekti nisko i visoko jonizujućeg zračenja na odabrane humane maligne ćelijske linije:
biološki odgovor i uticaj na terapijsku primenu

Sažetak

Jonizujuće zračenje izaziva različite vrste oštećenja u ćelijama, od kojih su najznačajnija oštećenja koja nastaju na DNK. Zračenje fotonima ili težim česticama može indukovati DNK oštećenja na direktan način, kao i indirektno, radiolizom vode i nastankom slobodnih radikala. Jedinjenja poput DMSO i glicerola imaju osobine sakupljača slobodnih radikala te se mogu koristiti za redukovanje indirektnih efekata i praćenje direktnih efekata zračenja. Ćelijski odgovor na DNK oštećenja nakon zračenja još uvek nije dovoljno ispitan. Takođe, istraživanja u ovoj oblasti su neophodna za bolje razumevanje procesa na kojima su zasnovani osnovni principi radioterapije. Za modelovanje efekata zračenja na nivou pojedinačnih ćelija, kao i zarad primene u radioterapiji, već duži niz godina koriste se i konstantno unapređuju kompjuterske Monte Karlo simulacije.

U ovoj doktorskoj disertaciji su praćeni efekti niskojonizujućeg γ -zračenja i visokojonizujućeg zračenja protonima i jonima ugljenika u humanim ćelijama adenokarcinoma dojke MCF-7 i ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća HTB177. Odgovor ćelija na zračenje posmatran je u prisustvu sakupljača slobodnih radikala – DMSO i glicerola, kako bi se postigli uslovi za praćenje direktnih efekata zračenja. Efekat primenjenih tretmana je praćen pomoću klonogenog preživljavanja, analize dvolančanih prekida na DNK, promena u fazama ćelijskog ciklusa i relativne ekspresije ključnih proteina koji učestvuju u popravci DNK oštećenja i ćelijskoj smrti – apoptozi.

Rezultati analize radiobioloških parametara MCF-7 i HTB177 ćelija pokazali su da se nakon γ -zračenja ove ćelije mogu svrstati među radiorezistentne linije, dok je zračenje jonima ugljenika ispoljilo veću radiobiološku efektivnost u poređenju sa protonima. Pretretman sakupljačima slobodnih radikala je doveo do povećanja ćelijskog preživljavanja i smanjenja broja dvolančanih DNK prekida, što se može dovesti u vezu sa manjim brojem indirektno nastalih oštećenja. Na osnovu analize udela direktnih i indirektnih efekata zračenja na MCF-7 i HTB177 ćelije, utvrđena je veća procentualna zastupljenost direktnih efekata nakon zračenja protonima i

jonima ugljenika u odnosu na γ -zračenje. Analiza ćelijskog ciklusa i ključnih reparacionih proteina pokazala je da u odgovoru na oštećenja izazvana γ -zračenjem, MCF-7 i HTB177 ćelije mogu pokrenuti različite mehanizme popravke DNK. Analiza relativne ekspresije ključnih proteinskih markera DNK reparacije pokazala je da ispitivane ćelije aktiviraju nehomologo spajanje krajeva kao glavni signalni put za popravku dvolančanih prekida u odgovoru na zračenje protonima i jonima ugljenika. Međutim, u poređenju sa protonima, zračenje jonima ugljenika koje je izazvalo porast nivoa rezidualnih DNK prekida, subG1 faze ćelijskog ciklusa i apoptoze, se može dovesti u vezu sa nastankom složenih oštećenja i time snažnije inhibicije ćelijskog preživljavanja. Slabiji protektivni efekat koji je DMSO ostvario nakon zračenja protonima i jonima ugljenika u poređenju sa γ -zračenjem se može objasniti prisustvom većeg broja direktno nastalih oštećenja izazvanih visokojonizujućim zračenjem.

Dobijeni rezultati su pokazali da se DMSO, kao sakupljač slobodnih radikala može koristiti za praćenje direktnih efekata zračenja u humanim ćelijama kancera. Razvoj savremenih Monte Karlo simulacija uključuje potpuno modelovanje fizičke i hemijske faze, tj. direktnih i indirektnih efekata ozračivanja *in vitro*. Očekuje se da ovi rezultati budu upotrebljeni za validaciju i unapređenje simulacija kroz uvođenje novih ćelijskih linija i različitih energija zračenja, što za krajnji cilj ima unapređenje terapijskih protokola i povećanje efikasnosti radioterapije.

Ključne reči: adenokarcinom dojke, nesitnoćelijski karcinom pluća, *in vitro*, γ -zračenje, protoni, joni ugljenika, DMSO, glicerol, direktni efekti zračenja, odgovor na DNK oštećenja.

Naučna oblast: Biologija kancera

Uža naučna oblast: Radijaciona biologija

UDK broj:

Direct effects of high and low density ionising radiations on selected human malignant cell lines:
biological response and therapeutic applications

Abstract

Ionising radiation produces different types of cellular damage, among which lesions on DNA are considered as most important. Photon or heavy ion irradiation can damage the DNA directly, or indirectly through water radiolysis and production of free radicals. Chemical compounds such as DMSO and glycerol can act as free radical scavengers and thus reduce the indirect effects. Cellular response to radiation-induced DNA damages is still not fully understood. Therefore, studies in this field would provide better understanding of cellular processes relevant to radiotherapy. The Monte Carlo computer simulations, aiming to model the irradiation effects on a single cell level, has been constantly improved during the last decade, at a benefit of future clinical treatment planning.

In this doctoral dissertation, the effects of low density γ -irradiation and high density proton and carbon ion irradiation were analysed in human MCF-7 breast adenocarcinoma and HTB177 non-small lung cancer cell lines. Cellular response to irradiation was examined in the presence of free radical scavengers, DMSO and glycerol, in order to achieve experimental conditions for examination of direct irradiation effects. The biological response to applied treatments was followed through clonogenic cell survival, DNA double strand break analysis, changes in the cell cycle and relative expression of key proteins involved in DNA repair and cell death – apoptosis.

The analysis of radiobiological parameters in MCF-7 and HTB177 cells show that they belong to the radioresistant group cells, while the irradiation with carbon ions has shown higher radiobiological effectiveness comparing to protons. Pretreatment with free radical scavengers has increased cell survival and lowered the number of DNA double strand breaks, which could be explained by reduced level of indirect DNA damages. Evaluation of direct and indirect irradiation effects in MCF-7 and HTB177 cells revealed a higher percentage of direct effects after proton and carbon ion irradiations comparing to those observed after γ -irradiation. The analysis of cell cycle and key DNA repair proteins showed that in MCF-7 and HTB177 cells different repair pathways in response to γ -irradiation are activated. The relative expression of main DNA repair protein markers implies that non-homologous end joining acts as the main signalling pathway for double

strand break repair after proton and carbon ion irradiation. As observed in carbon ion irradiated cells, the rise of residual DNA damage, increase in subG1 cell cycle phase and apoptosis could result from the higher complexity of lesions, inducing a stronger inhibition of cell survival compared to protons. The lower protective effect of DMSO observed after proton and carbon ion irradiation could be explained by increased amount of directly produced DNA damages, formed as a result of high density irradiation.

The obtained results show that DMSO could be used as a free radical scavenger to examine direct effects of irradiation in human cancer cells. The contemporary Monte Carlo simulations enable modelling of physical and chemical phases, i.e. direct and indirect effects of irradiation of cancer cells with photons and hadrons. Therefore, these results will be used for validation and further improvement of numerical simulations in comparison to the data collected on different cell lines and irradiation energies with the goal to enhance therapeutic protocols and increase the efficiency and precisions of cancer radiotherapy.

Key words: breast adenocarcinoma, non-small cell lung cancer, *in vitro*, γ -irradiation, protons, carbon ions, DMSO, glycerol, direct irradiation effects, response to DNA damages.

Research area: Cancer biology

Research field: Radiobiology

UDK number:

Skraćenice

53BP1 – p53 vezani protein 1

APS – ammonium persulfat

ATCC – Američka kolekcija kultura sojeva

ATM – ataksija teleangiektazija mutirana

ATR – proteinska kinaza povezana sa ataksija teleangiektazija i Rad3

BRCA1 – protein kancera dojke 1

BRCA2 – protein kancera dojke 2

BSA – albumin govedeg seruma

CDK – ciklin-zavisne kinase

CV – kristal violet

DAPI – diamidino-2-fenilindol hidrohlorid

DDR – odgovor na DNK oštećenja

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA-PK – DNK zavisna proteinska kinaza

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DP – stepen zaštite

DSB – dvolančani prekidi na DNK

EDTA – etilen diamino tetra sirćetna kiselina

ER – estrogenski receptor

FBS – fetalni teleći serum

HER2 – humani epidermalni fakrot rasta 2

HR – homologa rekombinacija

LET – linearni transfer energije

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

Na₃VO₄ – natrijum ortovanadat

NaF – natrijum fluorid

NHEJ – nehomologo spajanje krajeva
NSCLC – nesitnoćelijski karcinom pluća
PBS – fosfatno puferisani fiziološki rastvor
PFA – paraformaldehid
PI – propidijum jodid
PIKK – kinaze slične fosfatidilinozitol 3-kinazama
PMMA – polimetil-metakrilat
PR – progesteronski receptor
RBE – relativna biološka efektivnost
RNase A – ribonukleaza A
RPMI – hranljivi medijum za gajenje ćelija
SCLC – sitnoćelijski karcinom pluća
SDS – natrijum dodecil sulfat
SF – frakcija preživljavanja
SOBP – prošireni Bragov pik
SSB – jednolančani prekidi na DNK
TEMED – tetrametiletildiamin
WHO – Svetska zdravstvena organizacija
 γ -H2AX –fosforilisani histon H2AX

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Jonizujuće zračenje	1
1.1.1 Vrste jonizujućeg zračenja	1
1.1.2 Fizičke karakteristike jonizujućeg zračenja	2
1.1.3 Efekti jonizujućeg zračenja – direktni i indirektni efekti	4
1.1.4 Sakupljači slobodnih radikala kao modulatori efekata zračenja	6
1.2 Radioterapija	6
1.2.1 Osnovni principi radioterapije	6
1.2.2 Fotonsko zračenje u radioterapiji	7
1.2.3 Protoni i joni ugljenika u terapiji kancera	8
1.3 Odgovor ćelija na oštećenja DNK – DDR signalni put	11
1.3.1 Dvolančana oštećenja na DNK i γ -H2AX	11
1.3.2 Mehanizmi popravke oštećenja DNK	14
1.3.2.1 Nehomologo spajanje krajeva (NHEJ)	14
1.3.2.2 Homologa rekombinacija (HR)	16
1.3.3 Ćelijski ciklus	18
1.3.4 Apoptoza	21
1.4 Kanceri pluća i dojke	23
1.4.1 Epidemiologija i etiologija bolesti	23
1.4.2 Karcinomi pluća	23
1.4.3 Karcinomi dojke	24
2. Ciljevi	27
3. Materijal i metodi	29
3.1 Materijal	29
3.1.1. Hemikalije	29
3.1.2. Pufferi	29
3.1.3. Antitela	30
3.1.4. Ćelije	30
3.2 Metodi	31
3.2.1. Gajenje ćelija u kulturi	31

3.2.2. Sinhronizacija ćelija	32
3.2.3. Bojenje tripan plavim	32
3.2.4. Tretmani sakupljačima slobodnih radikala	33
3.2.5. Testovi vijabiliteta	33
3.2.5.1. MTT test	33
3.2.5.2. Kristal violet test	34
3.2.6 Uslovi zračenja	35
3.2.6.1. Nisko jonizujuće zračenje – γ -zračenje	35
3.2.6.2. Visoko jonizujuće zračenje – protoni i joni ugljenika	35
3.2.7. Test klonogenosti	38
3.2.8. Preračunavanje stepena zaštite	39
3.2.9. Preračunavanje direktnih efekata zračenja	40
3.2.10. Imunocitohemijsko obeležavanje proteina	41
3.2.11. Protočna citofluorimetrija	42
3.2.12. Western blot	43
3.2.12.1 Određivanje koncentracije proteina	43
3.2.12.2 Elektroforeza	44
3.2.12.3 Transfer proteina sa gela na membranu	44
3.2.12.4 Inkubacija sa antitelima i detekcija proteina	45
3.2.13 Statistička analiza podataka	45
4. Rezultati	46
4.2. Efekti nisko jonizujućeg zračenja: ^{60}Co γ -zraci	46
4.2.1. Radioosetljivost MCF-7 i HTB177 ćelija nakon γ -zračenja	46
4.2.2. Određivanje koncentracija DMSO i glicerola za pretretman MCF-7 i HTB177 ćelija	47
4.2.1. Efekat pretretmana DMSO i glicerolom na preživljavanje MCF-7 i HTB177 ćelija ozračenih γ -zracima	49
4.2.2. Stepen zaštite ostvaren primenom DMSO-a i glicerola u MCF-7 i HTB177 ćelijama	

	53
4.2.3. Određivanje udela direktnih efekata γ -zračenja	54
4.2.4. Analiza dvolančanih DNK oštećenja nakon γ -zračenja	54
4.2.5. Uticaj γ -zračenja na ćelijski ciklus i ekspresiju proteina uključenih u njegovu regulaciju	58
4.2.6. Analiza ekspresije proteina uključenih u DNK reparaciju i apoptozu nakon γ -zračenja	62
4.3. Efekti visoko jonizujućeg zračenja: protoni i joni ugljenika	68
4.3.1 Radioosetljivost MCF-7 i HTB177 ćelija nakon zračenja protonima i jonima ugljenika	68
4.3.2. Stepen zaštite DMSO u MCF-7 i HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika	72
4.3.3 Udeo direktnih i indirektnih efekata protona i jona ugljenika u MCF-7 i HTB177 ćelijama	74
4.3.2. Analiza dvolančanih DNK prekida nakon zračenja protonima i jonima ugljenika	75
4.3.4. Uticaj zračenja protonima i jonima ugljenika na ćelijski ciklus i ekspresiju proteina uključenih u njegovu regulaciju	77
4.3.5. Ekspresija proteina uključenih u odgovor na DNK oštećenja nakon zračenja protonima i jonima ugljenika	84
5. Diskusija	97
6. Zaključci	107
7. Literatura	108

1. UVOD

1.1 JONIZUJUĆE ZRAČENJE

1.1.1 Vrste jonizujućeg zračenja

U biološkim sistemima jonizujuće zračenje ostvaruje svoje efekte kroz jonizaciju atoma i molekula. Jonizacija je hemijski proces koji podrazumeva otpuštanje elektrona iz elektronskog omotača atoma, usled čega nastaju pozitivno naelektrisane čestice – joni. Takvo zračenje se naziva jonizujuće, a uzrokuju ga fotoni i teže čestice (Giaca i Hall 2012). Osnovni tipovi elektromagnetskog zračenja su X i γ -zračenje. U čestično zračenje se ubrajaju elektroni, protoni, α čestice, neutroni i teški joni (IAEA 2010). Fotoni izazivaju jonizaciju putem fotoelektičnog efekta, Komptonovog efekta i produkcije elektron-pozitron parova (Ward 1988). Fotoelektrični efekat je dominantan kod X i γ -zračenja energija ispod 50 keV i nastaje kao rezultat interakcije fotona sa elektronima iz unutrašnjih energetske nivoa. U ovom procesu foton svu energiju predaje elektronu i dovodi do njegovog oslobađanja iz atoma. Tada atom koji je otpustio elektron postaje jonizovan, a upražnjeno mesto se popunjava elektronima iz viših energetske nivoa istog atoma. Oslobođeni elektron prelazi određenu distancu i može dovesti do sekundarne jonizacije (IAEA 2010). Komptonov efekat je proces deponovanja energije na mestu na kome foton interaguje sa elektronom iz spoljašnjeg elektronskog omotača atoma. Prilikom sudara, foton predaje deo energije elektronu i dolazi do otpuštanja elektrona iz atoma. Foton dalje nastavlja putanju, ali pod uglom u odnosu na prvobitni pravac kretanja (rasejava se). U ovom procesu nastaje jonizovani atom koji je primio energiju fotona i slobodni elektron, koji u interakciji sa okolnim atomima uzrokuje jonizaciju. Komptonov efekat je dominantan kod X i γ -zračenja energija između 100 keV i 10 MeV, koji je ujedno i opseg koji se koristi u radijacionoj terapiji (Bourland 2015). Kada fotoni energije iznad 1.02 MeV, što odgovara dvostrukoj vrednosti mase elektrona u mirovanju, dođu u kontakt sa atomima, dolazi do interakcije fotona sa elektronskim omotačem neposredno oko atomskog jezgra. Tada se kinetička energija fotona spontano prevodi u masu putem Kulonove interakcije. Tokom ove reakcije, foton predaje kompletnu energiju atomu usled čega nastaje elektron-pozitron par koji se otpušta iz atoma. Slobodni pozitron i elektron se kreću suprotno jedan

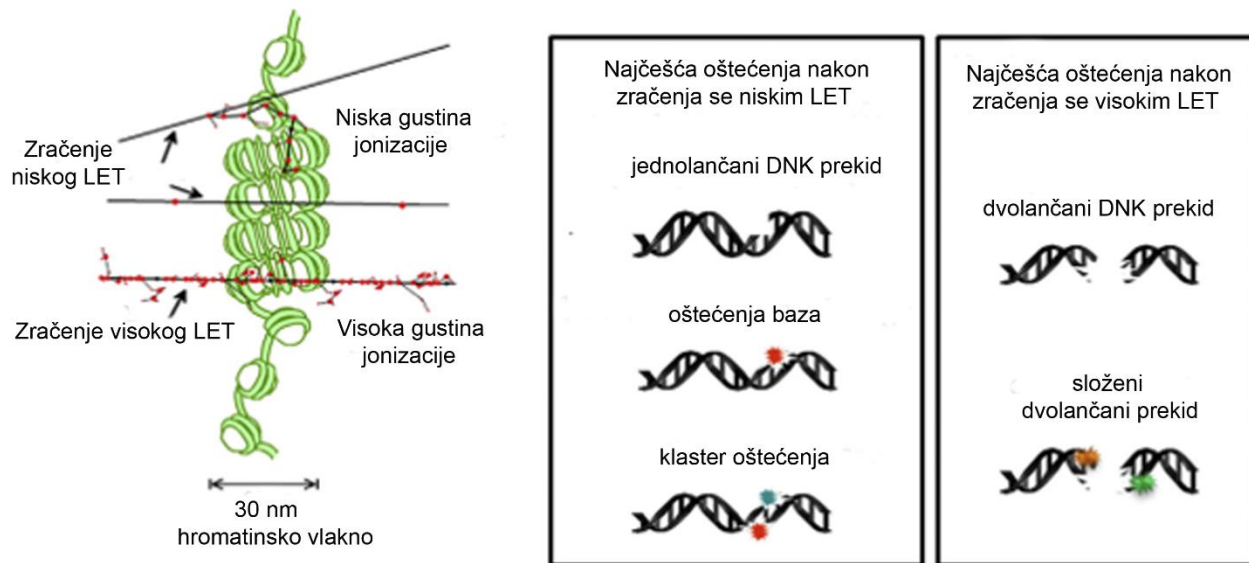
od drugog, dovodeći do jonizacije okolnih atoma (Giaca i Hall 2012). Čestično zračenje takođe ostvaruje svoje efekte u biološkim sistemima kroz nasumičnu jonizaciju i ekscitaciju atoma u molekulima. Visokoenergetski joni interaguju putem Kulonovih interakcija sa elektronima oko atomskog jezgra, dovodeći do jonizacije atoma i molekula kroz koje prolaze (Bourland 2015).

1.1.2 Fizičke karakteristike jonizujućeg zračenja

Biološki odgovor na jonizujuće zračenje u značajnoj meri zavisi od fizičkih osobina zračenja, posebno od količine apsorbovane energije i prostorne distribucije energije u tkivu. Apsorbovana doza zračenja predstavlja količinu energije koju zračenje preda materiji po jedinici mase. Izražava se u džulima (J) po kilogramu (kg), a merna jedinica je 1 grej (Gy). Pored količine predate energije, efikasnost zračenja zavisi i od brzine kojom se energija predaje tkivu. Brzina apsorbovane doze se definiše kao količina energije koju tkivo apsorbuje u jedinici vremena, a izražava se u grejima u sekundi (Gy/s) (Giaca i Hall 2012).

Linearni transfer energije (LET) je mera gustine deponovane energije u tkivu. Predstavlja prosečnu energiju koju zračenje predaje tkivu po jedinici putanje i izražava se u keV/ μ m. Vrednosti LET služe za procenu efikasnosti zračenja i zavise od naelektrisanja i brzine čestica (Durante i Loeffler 2010). Na osnovu razlika u LET, jonizujuće zračenje se može podeliti na zračenja niskog LET (X i γ -zruci) i visokog LET (čestično zračenje). Zračenje niskog LET ima malu gustinu jonizacione energije pri prolasku kroz tkivo. Fotoni su nasumično raspoređeni, tj. "rasuti" duž svoje putanje, dok je gustina zračenja homogena (Choi i Kang 2012). Kod zračenja visokog LET, čestice su gusto raspoređene duž svoje putanje i deponuju veliku količinu energije na malom rastojanju. Za razliku od fotona, čestično zračenje je usmereno i ima ograničen domet, a duž pravca kretanja ima promenljive vrednosti LET. Naime, čestice na većem delu putanje ujednačeno predaju tkivu relativno malu energiju. Neposredno pred sam kraj putanje, čestice velikom brzinom gube energiju na malom rastojanju, što rezultira naglim porastom LET. Ovaj region, u kome dolazi do skoka LET se naziva Bragov pik (Jakel 2009). U okviru Bragovog pika se tkivu isporučuje maksimalna doza zračenja. Ovakav profil isporuke energije je karakterističan za zračenje visokog LET. Visina Bragovog pika zavisi od mase jona, dok je domet čestica, odnosno pozicija Bragovog pika određena inicijalnom energijom snopa (Levin i Thomas 2015). Zahvaljujući visokoj gustini jonizacije, teže čestice mogu proizvoditi veći broj složenih lezija u

DNK molekulu u poređenju sa fotonima. Kod fotona se najčešće javljaju oštećenja koja su rezultat oksidacije baza i šećernih komponenti u DNK molekulu (Slika 1) (Durante i Loeffler 2010; Lomax i sar. 2013).



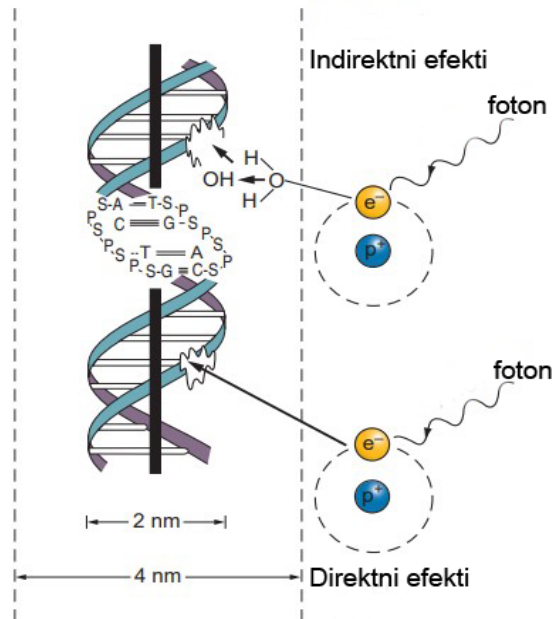
Slika 1. Shematski prikaz efekata zračenja niskog i visokog LET na DNK molekul u hromatinskom vlaknu. Zračenje niske gustine produkuje najčešće oštećenja baza i jednolančane DNK prekide, dok jonizujuće zračenje velike gustine najčešće izaziva složena DNK oštećenja. Preuzeto i modificirano iz (Lomax i sar. 2013).

Usled povećanja LET dolazi do porasta bioloških oštećenja u ćelijama. U praksi se pokazalo da određena doza čestičnog zračenja izaziva snažniji biološki odgovor u poređenju sa istom dozom konvencionalnog fotonskog zračenja (Willers i sar. 2018). Radi poređenja efekta koje čestično zračenje ostvaruje u biološkim sistemima u odnosu na fotone, uvedena je relativna biološka efektivnost (RBE). Ovaj parametar predstavlja odnos doze referentnog zračenja (fotoni) i doze ispitivanog zračenja (teže čestice), koje proizvode isti biološki efekat. Vrednost RBE zavisi od više faktora, poput LET, energije zračenja, vrste čestica, tipa tkiva ili ćelija koje se zrače, biološkog procesa koji se prati (Amaldi i Kraft 2005; Paganetti 2019). Na osnovu preporuke Međunarodne komisije za radiološku zaštitu (eng. *International Commission on Radiological Protection*, ICRP) jedinična vrednost za RBE (RBE=1) je određena za referentno fotonsko

zračenje. Iako protoni imaju veće vrednosti LET od fotona, RBE vrednosti između ovih tipova zračenja su međusobno slične. Na osnovu preporuke Međunarodne komisije za jedinice i merenje zračenja (eng. *International Commission on Radiation Units and Measurements*, ICRU) određena je fiksna vrednost za protone od 1.1 RBE koja se koriste u protonskoj terapiji malignih bolesti (Choi i Khang 2012). U slučaju jona ugljenika, vrednosti RBE se obično kreću od 3 do 5, zavisno od faktora koji utiču na njegovu vrednost (Amaldi i Kraft 2005; Durante i Loeffler 2010).

1.1.3 Efekti jonizujućeg zračenja – direktni i indirektni efekti

Prilikom prolaska kroz tkiva i ćelije, jonizujuće zračenje prouzrokuje različita oštećenja, kako na nivou organela poput ćelijske membrane, tako i na nivou pojedinačnih molekula – proteina i nukleinskih kiselina. Najznačajniji biološki efekti zračenja nastaju kao posledica oštećenja na dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) (Giacca i Hall 2012). Zračenje može izazvati oštećenja direktnim putem, odnosno neposrednom interakcijom fotona ili čestica sa ciljnim molekulima (Slika 2). Direktna jonizacija dovodi do raskidanja hemijskih veza u DNK molekulu, proteinima, fosfolipidima ćelijskih membrana (Reisz i sar. 2014; Zeman 2015). Indirektni efekti zračenja potiču od radiolize vode u citoplazmi, koja dovodi do nastanka slobodnih radikala (Slika 2). Slobodni radikali su nestabilni atomi ili molekuli koji imaju nespareni elektron u svojoj poslednjoj orbitali. Prilikom radiolize vode nastaju „aktivizovani” elektron (e_{aq}^-), hidroksil radikal ($OH\bullet$) i vodonični ($H\bullet$) radikal. Smatra se da visokoreaktivni hidroksil radikal prouzrokuje većinu oštećenja u ćelijama. Oštećenja izazvana na indirektan način su u većoj meri zastupljena kod fotonskog zračenja, dok se efekti čestičnog zračenja ostvaruju dominantno kroz direktne interakcije sa molekulima (Yokoya i sar. 2008, Zeman 2015).



Slika 2. Direktni i indirektni efekti jonizujućeg zračenja. Preuzeto i modificirano iz (Hall i Giacca 2012).

Fotoni, protoni ili teški joni u direktnoj interakciji sa molekulom DNK formiraju prekide u fosfodiastarskim vezama u okviru jednog, ili oba lanca DNK (Reisz i sar. 2014). Na taj način nastaju jednolančani (eng. *single strand breaks*, SSB) i dvolančani DNK prekidi (eng. *double strand breaks*, DSB), koji zajedno sa hemijskim modifikacijama baza narušavaju strukturu DNK heliksa (Slika 1). Među ovim oštećenjima, DSB se smatraju biološki najznačajnijim jer često dovode do nastanka genomske nestabilnosti i ćelijske smrti. Oštećenja koja nastaju kao posledica indirektnih efekata zračenja, poput oštećenja baza i SSB se lakše popravljaju u odnosu na DSB. Iz tog razloga se ovi tipovi oštećenja smatraju manje letalnim u poređenju sa DSB. Međutim, kada se pojedinačna oksidativna oštećenja formiraju u neposrednoj blizini DSB, dolazi do stvaranja klastera DSB oštećenja. Popravljanje ovako složenih oštećenja je često nedovoljno efikasno, što za posledicu obično ima nastanak sekundarnih lezija i ćelijsku smrt (Ward 1988; Goodhead 1994; Wallace 1998).

1.1.4 Sakupljači slobodnih radikala kao modulatori efekata zračenja

Saznanja o vrsti oštećenja koja nastaju pod direktnim uticajem zračenja, odnosno delovanjem slobodnih radikala, mogu doprineti boljem razumevanju biološkog odgovora na zračenja različitog kvaliteta (Ito i sar 2006; Hirayama i sar. 2009). Pokazano je da brojna hemijska jedinjenja ostvaruju radioprotektivno dejstvo tako što smanjuju oštećenja koja nastaju u prisustvu zračenja (Komaki i sar. 2011). Ovi „eksterni antioksidansi” deluju tako što uklanjaju slobodne radikale, uzimali mogu i stimulisati aktivnost unutarćelijskih antioksidanasa (Smith i sar. 2017). Dosadašnje studije su pokazale da dimetilsulfoksid (DMSO), glicerol, cisteamin i drugi tioli imaju osobine sakupljača slobodnih radikala (Roots i Okada 1972; Chapman i sar. 1979; Millar i sar. 1981). Ova jedinjenja deluju tako što vezuju primarne slobodne radikale i prevode ih u neaktivan oblik (Chapman i sar. 1979; Millar i sar. 1981; Zwicker i sar. 2019). Uklanjanje hidroksil radikala se smatra najbitnijom osobinom radioprotektora, jer se pokazalo da ova vrsta slobodnih radikala izaziva najveći broj oksidativnih oštećenja u ćeliji (Smith i sar. 2017). Pored toga što vezuju slobodne radikale iz vode, ova jedinjenja se mogu ponašati kao donori atoma vodonika oštećenim ćelijskim makromolekulima (Durand 1983). U okviru grupe tiola, amifostin se izdvaja kao snažan radioprotektor koji ima sposobnost zaštite zdravog tkiva tokom radioterapije (Komaki i sar. 2011).

1.2 RADIOTERAPIJA

1.2.1. Osnovni principi radioterapije

Terapija zračenjem ima važnu ulogu u lečenju različitih tipova karcinoma, zahvaljujući osobini da izazove ćelijsku smrt i zaustavi umnožavanje maligno transformisanih ćelija (Good i Harrington 2013). U zavisnosti od stadijuma i tipa tumora, radioterapija se sprovodi samostalno i u kombinaciji sa drugim terapijskim pristupima – operativnim uklanjanjem tumora, hemioterapijom, imunoterapijom (Huang i Zhou 2020). U kliničkoj praksi zračenje se isporučuje u vidu fracionisanih terapijskih doza od 1.8-2 Gy u određenim vremenskim intervalima. Ovakav pristup ima za cilj da poveća toksični efekat zračenja u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo i bazira se na osnovnim biološkim procesima, definisanim kao „5R” principi radiobiologije: reparacija, redistribucija, repopulacija, reoksigenacija, i radioosetljivost. Ovi faktori zajedno

određuju efikasnost zračne terapije (Baskar i sar. 2014). Reparacija, odnosno popravljanje oštećenja nakon ozračivanja se odvija u periodu između dva ciklusa zračenja. U ovom vremenskom intervalu dolazi do oporavka zdravog tkiva, koje poseduje intaktan reparacioni mehanizam, dok se tumorske ćelije teže oporavljaju usled mutacija koje nose (Bao i sar. 2006). Redistribucija podrazumeva sposobnost ozračenih ćelija da nastave svoj prolazak kroz ćelijski ciklus, dok se repopulacija odnosi na stopu proliferacije ćelija između zračenja (Pajonk i sar. 2010). S obzirom na to da su solidni tumori sa niskom koncentracijom kiseonika (hipoksični tumori) veoma radiorezistentni, promena nivoa oksigenacije– reoksigenacija može dovesti do povećanja njihove osetljivosti na zračenje (Boulefour i sar. 2021). Takođe, efikasnost radioterapije u značajnoj meri zavisi od prirodne radioosetljivosti, koja je karakteristična za svaki tip ćelija (Fertil i Malaise 1981).

U radioterapiji, zračenje fotonima (X i γ -zracima) predstavlja glavni pristup u lečenju kancera. Ovaj vid terapije je dostupan u najvećem broju medicinskih ustanova za lečenje onkoloških pacijenata. Međutim, sve veću pažnju pridobija čestično zračenje, čija se upotreba u terapiji pojedinih tumora, naročito onih koji su radiorezistentni, pokazala efikasnijom u poređenju sa fotonima (Durante i Loeffler 2010). U zavisnosti od načina primene, postoje spoljna i unutrašnja radioterapija (Sadeghi i sar. 2010). Spoljna radioterapija podrazumeva izlaganje pacijenta spoljašnjim izvorima zračenja koji se u odnosu na njega nalaze na određenom rastojanju. Kod unutrašnje radioterapije (brahiterapija) se izvor zračenja postavlja u neposrednu blizinu tumora (Allison i sar. 2014).

1.2.2 Fotonsko zračenje u radioterapiji

Kao što je već naznačeno, jedna od osnovnih karakteristika fotonskog zračenja je da uzrokuje jonizaciju duž cele svoje putanje, dok se najviša energija postiže na početku putanje. Pri prolasku kroz površinski sloj kože, fotoni predaju tkivu određenu dozu zračenja, koja odmah potom raste i dostiže maksimum na određenoj dubini u tkivu. U interakciji sa atomima i molekulima fotoni gube deo svoje energije usled čega doza eksponencialno opada (Trikalinos i sar. 2009). Pri prolasku kroz tkivo, izlazna doza je znatno manja u poređenju sa ulaznom dozom. Tom prilikom, pored ozračivanja samog malignog tkiva, visoka doza zračenja se isporučuje

zdravom tkivu koje se nalazi, pre svega, ispred samog tumora. Usled toga, zračenje fotonima nosi rizik od lokalnih neželjenih efekata, kao i do nastanka sekundarnih maligniteta. Ovo se posebno odnosi na zračenje tumora koji su pozicionirani pored vitalnih organa (srce, pluća, kičmena moždina) i u neposrednoj blizini radioosetljivih tkiva i organa (creva, bešika) (Purdy 2007).

Kao izvori γ -zračenja koriste se teleterapijske mašine koje sadrže radioaktivni izvor ^{60}Co , dok se za generisanje X-zraka najčešće primenjuju linearni akceleratori (Baskar i sar. 2012). Radioterapija modulisanog intenziteta (eng. *Intensity Modulated Radiotherapy*, IMRT) predstavlja trenutno najmoderniji pristup u radijacionoj terapiji fotonima. IMRT podrazumeva korišćenje kompjuterski kontrolisanih višelisnih kolimatora, čiji se oblik može prilagoditi obliku tumora koji se zrači. Ovaj pristup omogućava precizniju isporuku terapijskih doza malignom tkivu, uz veću zaštitu zdravog tkiva u poređenju sa konvencionalnim zračenjem (Purdy 2007; Allison i sar. 2014). Razvoj novih tehnika za medicinsko snimanje poput CT simulatora i upotreba trodimenzionalnog sistema za planiranje terapije (eng. *Three-Dimensional Treatment Planning Systems*, 3DTPS) omogućava bolji uvid u poziciju i volumen tumorskog tkiva, čime se povećava preciznost terapije fotonima (Purdy 2007).

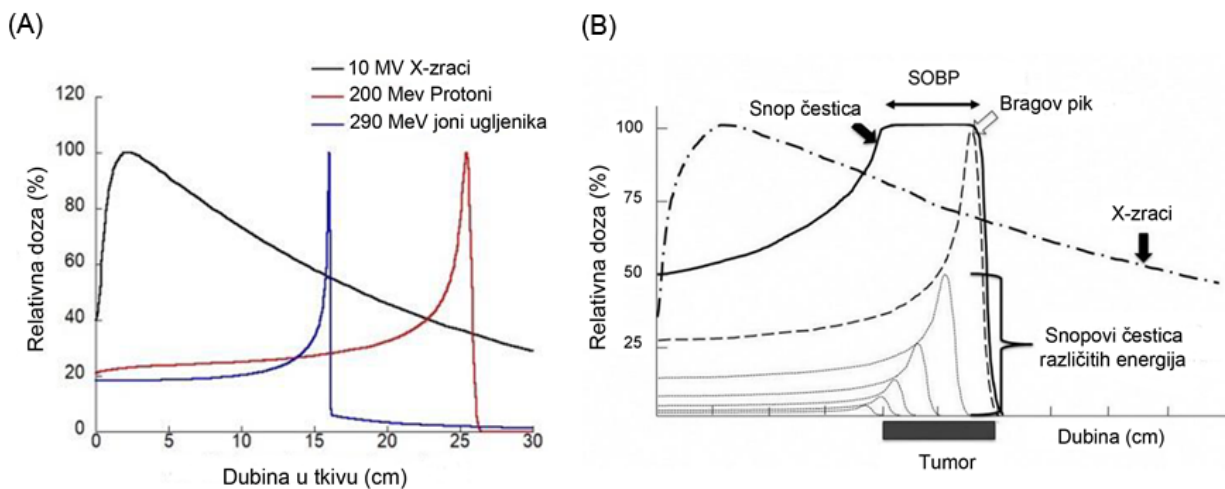
1.2.3 Protoni i joni ugljenika u terapiji kancera

Težnja da se unapredi pristup u zračnoj terapiji i poboljša kontrola tumorskog rasta uz očuvanje zdravog tkiva dovela je do razvoja čestične – hadronske terapije. Ime je dobila od grčke reči *hadρός* što znači snažan, a u fizici se odnosi na elementarne čestice koje karakterišu jake interakcije (Rossi 2022). Zahvaljujući svojim fizičkim osobinama, čestice prilikom zračenja predaju veću dozu malignom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom, koje apsorbuje znatno manju dozu zračenja. Primenom čestičnog zračenja u radijacionoj terapiji postiže se efikasnija i preciznija isporuka doze tumorima pozicioniranih dublje u tkivu, uz veću zaštitu okolnog tkiva (Shulz-Ertner i sar. 2006; Belli i sar. 2008; Suit i sar. 2010).

Energija koju čestice predaju materiji na početku putanje je relativno mala. Ovaj deo čestične putanje se naziva „plato“, u okviru kojeg se deponuje oko 30 % ukupne doze zračenja. Prilikom prolaska kroz tkivo, energija koju čestice predaju tkivu se povećava. Nagli porast energije se javlja u predelu Bragovog pika, delu čestične putanje gde se deponuje maksimalna doza zračenja u tkivu. Kao rezultat naglog gubitka energije, čestice zaustavljaju svoje kretanje. Kod protona, u

distalnom delu Bragove krive dolazi do naglog pada relativne doze zračenja na 0 Gy, usled čega tkivo iza Bragovog pika ostaje neozračeno. Ova karakteristika protonskog zračenja je posebno značajna u slučaju kada se zrače organi u čijoj okolini se nalaze strukture neophodne za očuvanje njegove funkcije (očni živac kod terapije melanoma oka) (Cirrone i sar. 2017). Teški joni poput jona ugljenika na svojoj putanji prolaze kroz proces nuklearne fragmentacije. Tom prilikom nastaju joni niskih energija – bor, berilijum, litijum, helijum i brojni protoni, koji nastavljaju svoje kretanje i prelaze određenu puranju izvan opsega Bragove krive (Haettner i sar. 2006). Deo ove putanje se naziva „fragmentacioni rep“ u okviru koje zdravo tkivo, distalno od tumora apsorbuje određenu dozu zračenja (Suit i sar. 2010). U poređenju sa protonima, joni ugljenika imaju manje bočno rasejanje što omogućava veću preciznost ozračivanja. Takođe, prednost jona ugljenika u odnosu na protone je u postizanju više vrednosti RBE u predelu Bragovog pika (Rossi 2022). Visoke vrednosti RBE se mogu objasniti nastankom velikog broja oštećenja koje maligne ćelije ne mogu popraviti, što za posledicu ima ćelijsku smrt. Zahvaljujući ovoj osobini, zračenje jonima ugljenika je našlo primenu kod radiorezistentnih i hipoksičnih tumora, koji imaju slab odgovor na konvencionalno zračenje (Uhl i sar. 2014; Malouff i sar. 2020).

Jedna od prednosti čestičnog zračenja u odnosu na fotone je i ta što se domet čestica može menjati promenom njihove inicijalne energije (Chaudhary i sar. 2014). Ovo je posebno značajno zbog činjenice da je Bragov pik prirodno veoma uzak, usled čega se maksimalna doza zračenja isporučuje na maloj površini malignog tkiva. U kliničkoj praksi se primenjuju tehnike za proširenje Bragovog pika, kako bi se omogućila isporuka maksimalne doze zračenja na većoj površini tkiva (Vitti i Parsons 2019). Izmena energije snopa se postiže ubacivanjem plastičnog modulatorskog točka u liniju snopa, koji sadrži proreze različitih debljina (Suit i sar. 2010). Pri prolasku čestica kroz rotirajući modulatorski točak dobija se niz Bragovih krivih rastućih energija. Spajanjem tako nastalih Bragovih krivih dobija se tzv. prošireni Bragov pik (eng. *Spread Out Bragg Peak*, SOBP) u okviru kojeg se postiže uniformna doza zračenja. Usled proširivanja Bragovog pika, doza zračenja u početnom delu putanje, ispred tumorskog tkiva, se umereno povećava. Kod protonskog zračenja, doza koju prima zdravo tkivo proksimalno od tumora je niža u odnosu na dozu koja se apsorbuje tokom konvencionalnog zračenja (Slika 3) (Matsumoto i sar. 2021).



Slika 3. Shematski prikaz distribucije doze zračenja u tkivu nakon ozračivanja X-zracima, protonima i jonima ugljenika različitih energija (A). Distribucija relativne doze zračenja kod X-zračenja i čestičnog zračenja u okviru proširenog Bragovog pika (B). Preuzeto i modificirano iz (Matsumoto i sar. 2021).

Pojedini centri za protonsku terapiju nude niskoenergetske protone koji su pogodni za terapiju melanoma oka, dok se protoni viših energija koriste za tretman tumora pozicioniranih dublje u tkivu (Durante i Loeffler 2010; Cirrone i sar. 2012). Većina centara za protonsku terapiju je prilagođena tretmanu pedijatrijskih tumora, zbog visokog rizika od razvoja sekundarnih maligniteta kod dece koja su podvrgnuta konvencionalnom zračenju (Schulz-Ertner i Tsujii 2007; Sardaro i sar. 2019). Takođe, terapija protonima se primenjuje kod tumora glave i vrata, mozga, abdominalnih tumora, kancera pluća, kancera dojke (Yuan i sar. 2019). U svetu je do sada izgađeno sto dvadeset centara u kojima se sprovodi protonsku terapiju. Izgradnja dvadeset osam centara je u toku, a planirano je još oko trideset ovakvih ustanova. Protonsku terapiju je do sada primilo preko 300.000 pacijenata širom sveta (preuzeto sa: <https://ptcog.site>). U poređenju sa terapijom protonima i fotonima, zračenje jonima ugljenika se smatra efikasnijim za tretman radiorezistentnih tumora poput melanoma i glioblastoma (Malouf i sar. 2020). Zaključno sa 2022. godinom, terapiji jonima ugljenika je bilo podvrgnuto oko 50.000 pacijenata sa različitim malignitetima - intrakranijalnim malignitetima, tumorima glave i vrata, primarnim i metastatskim karcinomom pluća, tumorima abdomena, kancerima dojke, kao i pojedinih pedijatrijskih tumora (Schulz-Ertner i Tsujii 2007; Durante i Loeffler 2010). U poređenju sa centrima za protonsko zračenje, terapija

jonima ugljenika je dostupna u znatno manjem broju centara i trenutno se sprovodi u četrnaest objekata u svetu. U toku je izgradnja pet centara, a još dva su u planu. Uprkos benefitima hadronske terapije, jedan od nedostataka je visoka cena izgradnje i održavanja objekata u kojima se ona sprovodi. Naime, za razliku od fotona, snop protona i jona ugljenika se dobija pomoću velikih i složenih mašina – ciklotrona i sinhrotrona, čime je dostupnost hadronske terapije za širu upotrebu značajno ograničena (Schulz-Ertner i Tsujii 2007).

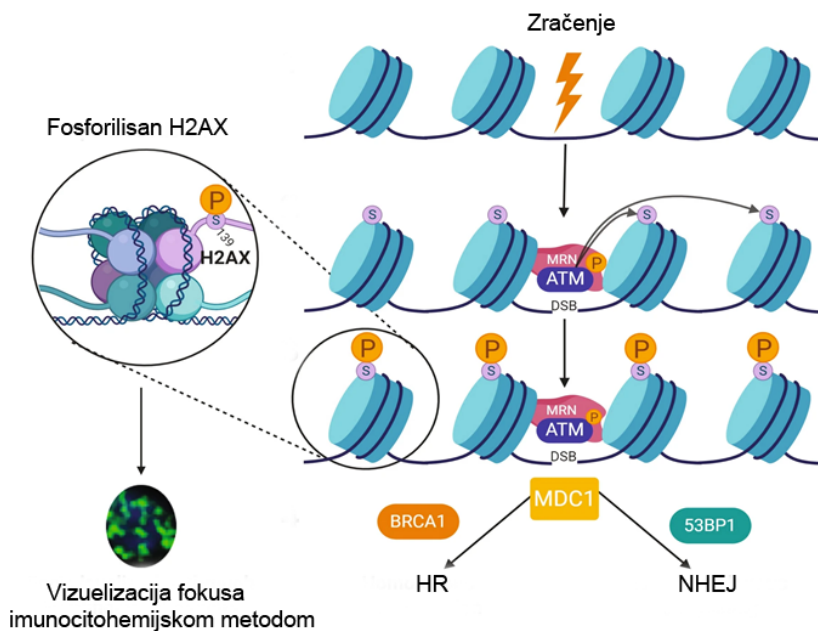
1.3 ODGOVOR ĆELIJA NA OŠTEĆENJA DNK – DDR SIGNALNI PUT

Očuvanje integriteta genoma je od ključnog značaja za preživljavanje ćelija (Löbrich, i Jeggo 2007). Kako bi se sačuvala od štetnih posledica genotoksičnih agenasa, a u koje spada i jonizujuće zračenje, ćelije su razvile složene mehanizme zaštite. Ovi signalni putevi se jednim imenom nazivaju odgovor na DNK oštećenja (eng. *DNA Damage Response*, DDR) (Lord i Ashworth 2012). DDR signalna kaskada uključuje niz proteina i proteinskih kinaza koje prepoznaju oštećenja na DNK i pokreću mehanizme za njihovu popravku. Takođe, u proteine DDR signalnog puta spadaju regulatorni proteini ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti (Sulli i sar. 2012). U zavisnosti od vrste oštećenja, ćelije pokreću određeni tip DNK reparacije i zaustavljaju propagaciju kroz ćelijski ciklus (Vignard i sar. 2013). Poremećaji u DDR signalnom putu mogu izazvati ćelijsku smrt, dok se mutacije u ključnim genima ovog signalnog puta sreću kod različitih patoloških stanja, među kojima je i kancer (Groelly i sar. 2023).

1.3.1 Dvolančana oštećenja na DNK i γ -H2AX

Iz ugla radijacione biologije, dvolančani prekidi na molekulu DNK predstavljaju najznačajniji tip oštećenja koji se može dovesti u vezu sa ćelijskom radioosetljivošću (Löbrich i sar. 2010). U eukariotskim ćelijama postoji složena mreža proteina zaduženih za prepoznavanje i popravku DSB. Jedan od glavnih proteina koji se aktivira u neposrednoj blizini DSB je histon H2AX iz H2A familije histonskih proteina (Vignard i sar. 2013). H2AX histoni učestvuju u izgradnji hromatina u nukleusu eukariotskih ćelija i gusto su raspoređeni duž čitavog hromatinskog vlakna (Rogakou i sar. 1998). Neposredno nakon nastanka DSB, histon H2AX se fosforiliše na poziciji serina 139 u okviru karboksilnog kraja i prelazi u γ H2AX. Inicijalna fosforilacija H2AX

se odigrava na mestu DSB, a zatim se velikom brzinom širi i zahvata na hiljade H2AX molekula. Ovim putem se signal za fosforilaciju prenosi na udaljenost oko 2 megabazna para od mesta prekida (Schmidt i sar. 2012). Za detekciju DSB koriste se fluorescentno obeležena anti- γ H2AX antitela, koja se pod mikroskopom vide u obliku kružnih nukleusnih domena – fokusa. Smatra se da broj γ H2AX fokusa u nukleusu odgovara broju DSB, zbog čega je odnos DSB i γ H2AX približno 1:1. Zahvaljujući ulozi koju ima u ranoj fazi nastanka DSB, γ H2AX se najčešće koristi kao marker ovih oštećenja (Rogakou i sar. 1998).



Slika 4. Fosforilacija H2AX nakon zračenja i vizuelizacija fluorescentno obeleženog proteina pomoću imunocitohemijske metode. Preuzeto i modifikovano iz (Noubissi i sar. 2021).

Porast nivoa γ H2AX proteina predstavlja jedan od početnih koraka u DDR signalnoj kaskadi, koji dalje pokreće nishodne puteve reparacije DNK i kontrole ćelijskog ciklusa. Nivo γ H2AX je pod kontrolom proteina koji se aktiviraju u prisustvu DSB i pripadaju familiji kinaza sličnim fosfatidilinozitol 3-kinazama (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*, PIKK). Prema dosadašnjim saznanjima, tri ključne kinaze učestvuju u aktivaciji γ H2AX: ataksija teleangiektazija mutirana (eng. *ataxia telangiectasia mutated*, ATM), proteinska kinaza povezana sa ataksija teleangiektazija i Rad3 (eng. *ataxia telangiectasia and rad3-related*, ATR) i DNK

zavisna proteinska kinaza (eng. *DNA-dependent protein kinase*, DNA-PK) (Blackford i Jackson 2019). Neposredno po nastanku DSB dolazi do aktivacije jedne od navedenih kinaza, koja potom fosforiliše H2AX i veliki broj proteina iz signalne kaskade DDR. Aktivnost kinaza zavisi od faze ćelijskog ciklusa i načina nastanka DSB. Pokazano je da ATM i DNA-PK prepoznaju trenutno formirane DSB i dovode do akumulacije γ H2AX na mestu prekida nezavisno od faze ćelijskog ciklusa. Oštećenja nastala tokom replikacije DNK vezuje ATR kinaza, koja učestvuje u fosforilaciji H2AX tokom S i G2 faze ćelijskog ciklusa (Löbrich i sar. 2012). Nakon aktivacije na mestu DSB, γ H2AX služi kao platforma za vezivanje proteina koji učestvuju u popravci DNK i regulaciji ćelijskog ciklusa, poput proteina kancera dojke 1 (eng. *breast cancer 1*, BRCA1) i p53 vezanog proteina 1 (eng. *p53-binding protein 1*, 53BP1) (Huang i Zhou 2020). Tokom DDR, γ -H2AX postaje deo proteinskog kompleksa za remodelovanje hromatina i dovodi do stabilizacije oštećenih krajeva DNK molekula (Sulli i sar. 2012).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da broj γ H2AX raste nekoliko minuta posle zračenja, da bi nakon 15–30 minuta dostiglo svoj maksimum (Rogakou i sar. 1999). Porast nivoa γ H2AX predstavlja jedan od početnih koraka u DDR signalnoj kaskadi, koji dalje pokreće nishodne puteve reparacije DNK i kontrole ćelijskog ciklusa. U ćelijama koje imaju očuvane reparacione mehanizme broj γ H2AX fokusa se smanjuje nekoliko sati posle zračenja, pa se nestanak fokusa objašnjava popravkom DSB (Banath i sar 2004). Rezidualni γ H2AX fokusi, koji se zadržavaju 24 h nakon zračenja mogu ukazati na povećanu radioosetljivost u ćelijama sa narušenim mehanizmom popravke DNK (Banath i sar. 2010). Pored uloge u procesu reparacije, γ H2AX može polužiti kao signal za ćelijsku smrt (apoptozu) (Sulli i sar. 2012).

U odnosu na ostale metode za analizu γ H2AX, poput protočne citofluorimetrije i relativne proteinske ekspresije, tehnika imunocitohemijskog obeležavanja se pokazala kao visoko senzitivna metoda koja omogućava analizu i kvantifikaciju pojedinačnih fokusa u ćeliji (Rogakou i sar. 1998). Međutim, visoke doze zračenja mogu dovesti do nastanka gusto raspoređenih γ H2AX fokusa, što za posledicu ima preklapanje fluorescentnog signala i nedovoljno preciznu kvantifikaciju (Böcker i Iliakis 2006). Analiza prostornog rasporeda i morfoloških karakteristika fokusa daje više podataka o složenosti DSB, što može biti od posebne koristi za analizu efekata zračenja teškim jonima (Böcker i Iliakis 2006; Mavragani i sar. 2017). U radijacionoj biologiji γ H2AX metod se pokazao pouzdanim za praćenje ćelijskog odgovora na DSB nastale pri niskim dozama zračenja koje su u opsegu od nekoliko mGy (Rothkam i Löbrich, 2003). Ovaj pristup je

našao primenu u kliničkoj praksi, gde se koristi za analizu efekata radioterapije i hemioterapije (Ivashkevich i sar. 2012).

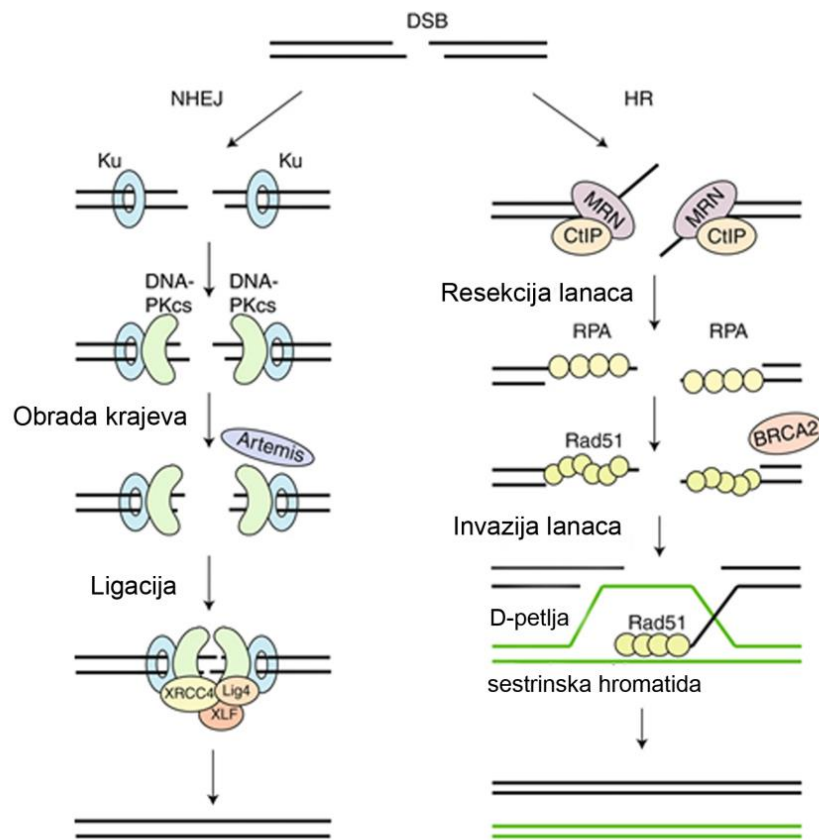
1.3.2 Mehanizmi popravke oštećenja DNK

Dvolančani prekidi na DNK mogu da budu popravljani na dva načina: mehanizmom nehomolognog spajanja krajeva (eng. *non-homologous end joining*, NHEJ) i posredstvom homologe rekombinacije (eng. *homologous recombination*, HR). Čelija koja je pretrpela oštećenja se opredeljuje za jedan od ovih signalnih puteva u zavisnosti od složenosti lezije, faze ćelijskog ciklusa i organizacije hromatina u nukleusu (Kakarougkas i Jeggo 2013). NHEJ put se može aktivirati u svim fazama ćelijskog ciklusa i omogućava brz odgovor ćelije na nastale DSB. HR učestvuje u popravci DSB koji nastaju tokom S ili G2 faze ćelijskog ciklusa, kada se kao matrica za reparaciju oštećene DNK koristi homologa sekvenca sa sestrinske hromatide (Srivastava i Raghavan 2015). Tom prilikom se popravljaju prekidi koji su nastali direktno pod uticajem genotoksičnog agensa, kao i sekundarni DSB. Do nastanka sekundarnih DSB dolazi tokom procesa DNK replikacije, usled zaustavljanja replikacione mašinerije na mestu SSB (Vignard i sar. 2013). U pojedinim uslovima, kada je ćelija izložena uticaju snažnog genotoksičnog agensa, poput visokojonizujućeg zračenja, mogu nastati složeni DSB. Ove lezije se sastoje od više različitih tipova DNK oštećenja i nastaju na međusobno maloj razdaljini, od 15–20 baznih parova. Složena DNK oštećenja ćelije teško popravljaju, a kao rezultat njihove nedovoljno efikasne popravke javljaju se sekundarni DSB, mutacije i hromozomski rearanžmani (Georgakilas i sar. 2013; Mavragani i sar. 2017).

1.3.2.1 Nehomologo spajanje krajeva (NHEJ)

Reparacija DSB putem NHEJ je proces u kojem dolazi do spajanja oštećenih lanaca DNK (DNK ligacije) i ne zahteva postojanje homologije (Srivastava i Raghavan 2015). Prosto spajanje krajeva povećava verovatnoću ugrađivanja nasumičnih nukleotida i promenu originalne sekvence DNK, zbog čega se NHEJ smatra tipom popravke koja je skolna greškama (Mladenov i sar. 2013). NHEJ signalni put podrazumeva aktivaciju proteina koji prepoznaju mesto prekida, vrše isecanje (obradu) oštećenih krajeva DNK i spajanje (ligaciju) prekinutih lanaca, čime se uspostavlja

kontinuitet u DNK molekulu. Početni korak NHEJ signalnog puta je aktivacija Ku70/Ku80 proteina i njegovo vezivanje za oštećene krajeve DNK. Ovaj heterodimerski protein regrutuje DNA-PKcs i tako formira DNA-PK holoenzim (Vignard i sar. 2013). DNA-PK se aktivira prilikom vezivanja za mesto lezije i fosforiliše proteine koji imaju nukleolitičku aktivnost. Grupa nukleaza poput Artemis, WNR (eng. *Werner syndrome protein*), APLF (eng. *Aprataxin and polynucleotide kinase like factor*) je zadužena za obradu DNK krajeva i ispoljava endonukleaznu i egzonukleaznu aktivnost. Nakon obrade (isecanja) DNK krajeva, DNK ligaza IV se zajedno sa XRCC4 (eng. *X-ray cross complementing 4*) i XLF (eng. *XRCC4-like factor*) regrutuje na mesto prekida i uzrokuje ligaciju oštećenih krajeva. Autofosforilacija DNA-PK dovodi do njegovog uklanjanja sa mesta prekida, nakon čega kompleks DNK ligaze zajedno sa XLF vrši spajanje DNK krajeva (Brandsma i Gent 2012). Pokazano je da DNA-PK igra značajnu ulogu u regulaciji procesa DNK ligacije, kao i u aktivaciji nishodnih proteina DDR kaskade (γ H2AX, p53). Mutacije u genima koji kodiraju DNA-PK su povezane kako sa nastankom različitih tipova kancera, tako i sa povećanom osetljivošću na zračenje (Davis i Chen 2013).



Slika 5. Shematski prikaz mehanizama reparacije DSB putem NHEJ i HR. Preuzeto i modifikovano iz (Brandsma i Gent 2012).

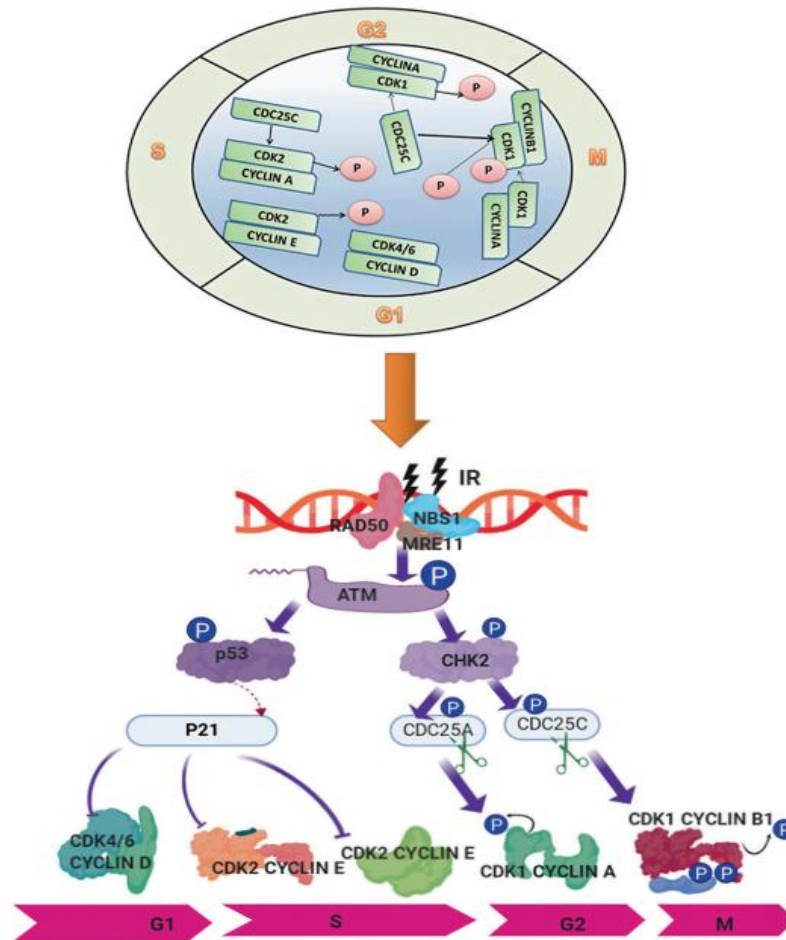
1.3.2.2 Homologa rekombinacija (HR)

Pored uloge u ćelijskoj deobi, HR vrši popravku DSB koristeći homologiju sa sestrinske hromatide (Vignard i sar. 2013). Homologa DNK se koristi kao matrica za reparaciju DSB i tako omogućava preciznu popravku oštećenja uz očuvanje originalne DNK sekvence. Signalni put HR se sastoji od više definisanih koraka i podrazumeva resekciju DNK krajeva, invaziju DNK lanaca, pretraživanje homologije, razmenu sekvenci, razdvajanje DNK lanaca i ligaciju krajeva (Wright i sar. 2018). Oštećene DNK krajeve prepoznaje MRE11-RAD50-NBS1 proteinski kompleks (MRN kompleks), koji zajedno sa CtIP (eng. *carboxy-terminal binding protein interacting protein*) reguliše resekciju DNK molekula. Pored navedenih proteina, u obradi DNK učestvuju i faktori

resekcije poput egzonukleaze 1, DNA2 (eng. *DNA replication helicase/nuclease 2*) i BLM (eng. *Bloom syndrome protein*) proteina, kako bi nastale dugačke jednolančane DNK (eng. *single stranded DNA*, ssDNA). Slobodni krajevi ssDNA učestvuju u pretraživanju homologe DNK i njihov nastanak se posmatra kao ključni korak koji ćeliju nepovratno usmerava ka HR (Mladenov i sar. 2013). Za dugačke ssDNA se vezuje RPA proteinski kompleks (eng. *replication protein A*) koji stabilizuje slobodne krajeve DNK i sprečava formiranje sekundarnih DNK struktura (Srivastava i Raghavan 2015). U narednom koraku, RPA protein se uklanja sa DNK kako bi se Rad51 protein vezao i formirao Rad51 nukleoproteinski filament. Zamena RPA proteina sa Rad51 se odvija pomoću BRCA2 proteina (eng. *breast cancer susceptibility gene 2*) i grupe Rad51-paralognih proteina (Mladenov i sar. 2013, Srivastava i Raghavan 2015). Ovako formiran Rad51 nukleoproteinski filament vrši invaziju lanaca i pretragu homologije na intaktnom DNK molekulu homologog hromozoma. Usled toga se formira karakteristična struktura D-petlje (eng. *displacement loop*, D-loop). Nakon pronalaska homologije i formiranja sinapse, Rad51 protein se uklanja sa DNK i dolazi do sinteze DNK (elongacije) na 3' kraju invazivnih lanaca. Po obavljenoj razmeni homologih sekvenci, invazivni lanci se odvajaju od donorskog DNK lanca, što dovodi do razrešenja D-petlje. U procesu ligacije dolazi do spajanja slobodnih krajeva DNK u okviru istog molekula (Shrivastav i sar. 2008). Zračenje u retkim slučajevima može izazvati rekombinaciju sekvenci sa određenim stepenom homologije unutar istog molekula DNK. U tom procesu dolazi do gubitka dela DNK između dve homologe sekvence, što za posledicu ima nastanak mutacija (Mladenov i sar 2013). Mutacije u ključnim HR genima (*Rad51*, *BRCA1* i *BRCA2*) mogu dovesti do razvoja retkih sindroma koje karakteriše izuzetna osetljivost na zračenje i nemogućnost efikasne popravke DSB (Shrivastav i sar. 2008; Lord i Ashworth 2012). Takođe, mutacije u *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* i *Rad51* se sreću kako u naslednim tako i u stečenim formama karcinoma dojke, ovarijuma i pankreasa (Moynahan i Jasin 2010). Ova saznanja su značajna za razvoj hemioterapeutika koji ciljano inhibiraju aktivnost određenih proteina poput PARP1 (PARP1 inhibitori), čime se povećava osetljivost malignih ćelija na zračenje (Lord i Ashworth 2012).

1.3.3 Ćelijski ciklus

Ćelije prolaze kroz niz molekulskih događaja koji dovode do ćelijskog rasta i deobe i jednim imenom se nazivaju ćelijski ciklus. Ovaj proces se odvija po fazama, koje se smenjuju jedna za drugom i ciklično ponavljaju uvek na isti način. U toku ćelijskog ciklusa aktiviraju se molekulski mehanizmi kojima se omogućava pravilna replikacija DNK i raspodela genetičkog materijala za vreme ćelijske deobe (mitoze) (Matthews i sar. 2022). Kako bi verno prenele kopije genoma u narednu generaciju, ćelije prolaze kroz četiri faze ćelijskog ciklusa: G1, S, G2 i M. Faza u koju ćelije ulaze neposredno nakon mitoze se označava kao G1, odnosno faza prvog prekida. U toku G1 faze dolazi do sinteze proteina potrebnih za proces DNK replikacije, do koje dolazi tokom sintetske – S faze ciklusa. Potom ćelije ulaze u fazu drugog prekida – G2, tokom koje dolazi do rasta ćelije i pripreme za mitozu – M. Ćelije koje su izgubile reproduktivni potencijal usled diferencijacije ili senescencije, ulaze u G₀ fazu mirovanja. One takođe mogu privremeno da borave u G₀ fazi kada se nađu u uslovima gladovanja (odsustva nutrijenata) ili u prisustvu određenih hemijskih jedinjenja (Suski i sar. 2021). Prolazak ćelija kroz navedene faze je regulisan zahvaljujući kontrolnim mehanizmima koji se pokreću prilikom prelaska iz jedne u drugu fazu. Kontrolne tačke se aktiviraju prilikom prelaska iz G1 u S fazu (G1/S kontrolna tačka), u toku replikacije DNK (S kontrolna tačka) i pre početka mitoze (G2/M kontrolna tačka). Ključni proteini koji učestvuju u ovom procesu su ciklini i ciklin-zavisne kinaze (eng. *cyclin dependent kinase*, CDK) (Matthews i sar. 2022). Ciklini i CDK se međusobno vezuju i grade proteinski kompleks koji fosforiliše ciljne proteine i tako menja njihovu aktivnost. Pod kontrolom ovog kompleksa su proteini koji učestvuju u procesu DNK replikacije i mitoze. Za prolazak kroz G1 fazu zaduženi su ciklin D koji vezuje CDK2 ili CDK6, kao i ciklin E/CDK2 kompleks. Kontrolna tačka u S fazi je pod kontrolom ciklina A/CDK1, dok je za prolazak kroz G2 fazu zadužen kompleks ciklina B/CDK2. Nivo ciklina raste prilikom prolaska ćelija kroz određenu fazu ćelijskog ciklusa. Nakon prolaska kroz kontrolnu tačku, ciklini se obeležavaju za proteazomsku degradaciju čime se zaustavlja aktivnost proteinskog kompleksa ciklin/CDK, a ćelije se nepovratno usmeravaju u narednu fazu ćelijskog ciklusa (Huang i Zhou 2020).



Slika 6. Kontrola prolaska ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa u uslovima kada postoji oštećenje DNK izazvano zračenjem (IR). Preuzeto i modifikovano iz (Huang i Zhou 2020).

Oštećenja koja nastaju pod uticajem zračenja, kao i drugih genotoksičnih agensa, dovode do zaustavljanja ćelija u nekoj od faza ćelijskog ciklusa. Ovaj proces se odvija posredstvom ATM i ATR kinaza koje aktiviraju nishodne proteine unutar signalne kaskade (Vignard i sar. 2013). Naime, ATM i ATR fosforilišu medijatorske proteine ćelijskog ciklusa (53BP1, BRCA1, MRN kompleks), preko kojih se signal prenosi na kinaze (CHK1, CHK2, CDC25/A) i potom na efektorske proteine (cikline i CDK) (Löbrich i Jeggo 2007). Dosadašnje studije pokazuju da p21 protein igra važnu ulogu tokom prolaska ćelija kroz G1 fazu (Abbas i Dutta 2009). U prisustvu DNK oštećenja, ATM kinaza fosforiliše p53 protein koji potom aktivira ekspresiju p21 proteina. Usled povećanja nivoa p21 i njegovog vezivanja za CDK, sprečava se aktivnost kompleksa ciklin

D-CDK4/6 i dolazi do G1 zastoja. Takođe, dosadašnja istraživanja pokazuju da p21 može inhibirati ekspresiju proteina koji učestvuju u procesu replikacije DNK, segregacije hromozoma i mitoze (Bertoli i sar. 2013; Huang i Zhou 2020). Pored signalnog puta koji uključuje aktivaciju p53 proteina, pokazano je da zastoj u G1 fazi može nastupiti nakon degradacije ciklina D1. Zračenje može izazvati pad nivoa ciklina D1, nakon čega dolazi do porasta nivoa slobodnog p21 i nastupa G1 blok (Agami i Bernards 2000). Usled velikog broja zaostalih oštećenja koja se ne mogu popraviti, ćelije se mogu trajno zaustaviti u G1 fazi ćelijskog ciklusa, tj. ući u senescenciju (Xu i sar. 2018). Takođe, visok nivo rezidualnih DNK oštećenja mogu biti signal za pokretanje programirane ćelijske smrti po tipu apoptoze (Chaudry 2007). Prolazak ćelija kroz S fazu je regulisan od strane vršnih kinaza i složenog signalnog puta DNK replikacije. Neposredno nakon nastanka DNK oštećenja dolazi do aktivacije ATM kinaze, dok se ATR kinaza aktivira nakon zaustavljanja replikacione viljuške na mestu DNK oštećenja. ATM i ATR dalje dovode do fosforilacije nishodnih proteina, čime se inhibira aktivnost ciklin E/A-CDK2 kompleksa i proteina koji regulišu DNK replikaciju (Bertoli i sar. 2013; Huang i Zhou 2020). Ćelije aktiviraju S blok kako bi izbegle replikaciju aberantne DNK, dok G2/M zastoj sprečava segregaciju defektnih hromozoma tokom mitoze. G2/M blok je takođe pod kontrolom ATM i ATR kinaza, koje pokreću signalnu kaskadu fosforilacije nishodnih proteina, kako bi se inhibirala aktivnost ciklin B-CDK1 i sprečio ulazak ćelije u mitozu (Löbrich i Jeggo 2007; Huang i Zhou 2020).

Pokazano je da radioosetljivost ćelija zavisi od faze ćelijskog ciklusa, a da najveću osetljivost ćelije imaju tokom rane S i G2/M faze (Iliakis i Okayasu 1990; Bernhard i sar. 1995). Naime, uočeno je da ćelije koje imaju određen broj nepopravljenih DSB mogu proći G2/M kontrolnu tačku i ući u deobu, što dovodi do hromozomskih rearanžmana i genomske nestabilnosti. Nasuprot tome, pokazano je da tokom G1 faze pojedinačni DSB mogu izazvati G1 zastoj. Smatra se da dvojna regulacija G1/S kontrolne tačke, na p53-zavisan i p53-nezavisan način povećava osetljivost i omogućava efikasniju popravku DNK oštećenja (Löbrich i Jeggo 2007). Takođe, mutacije u genima koji kodiraju za regulatorne proteine ćelijskog ciklusa i popravke DNK značajno utiču na ćelijsku radioosetljivost. Mutacije u p53 proteinu se sreću kod velikog broja karcinoma i menjaju dinamiku prolaska kroz ćelijski ciklus, posebno kroz G1 fazu. Takve ćelije zaobilaze kontrolne mehanizme, nastavljaju da proliferišu i akumuliraju mutacije (Pawlik i Keyomarsi 2004; Chaudry 2007). Zahvaljujući ulozi koju ostvaruju u očuvanju integriteta genoma,

regulatorni proteini ćelijskog ciklusa se posmatraju kao važni ciljni molekuli za razvoj agenasa koji povećavaju radioosetljivost tumorskih ćelija i efikasnost radioterapije (Pilić i sar. 2019).

1.3.4 Apoptoza

Kao vid programirane ćelijske smrti, apoptoza predstavlja evolutivno konzerviran i precizno regulisan proces zadužen za održavanje homeostaze tkiva. U procesu apoptoze dolazi do orkestriranog uklanjanja ćelija tokom embrionskog razvoja, ali i kasnije, do eliminacije onih ćelija koje su pretrpele oštećenja i kao takve predstavljaju opasnost za pravilno funkcionisanje organizma (Singh i sar. 2019). Apoptoza obuhvata niz molekulskih događaja koji uzrokuju morfološke i biohemijske promene u ćeliji: aktivaciju proteolitičkih enzima – kaspaza, smanjivanje volumena ćelija (eng. *cell shrinkage*), gubitak međućelijskih veza, kondenzaciju hromatina, fragmentaciju nukleusa, bubrenje membrana i nastanak apoptotskih vezikula sa razloženim ćelijskim sadržajem koje se uklanjaju od strane makrofaga (Elmore 2007).

Na osnovu dosadašnjih saznanja definisana su dva signalna puta apoptoze: spoljašnji i unutrašnji put (Singh i sar. 2019). Spoljašnji put je povezan sa “receptorima smrti” na ćelijskoj membrani, što omogućava ćeliji da pokrene proces apoptoze u odgovoru na signale iz spoljašnje sredine. Unutrašnji apoptotski put se pokreće u prisustvu unutarćelijskog stresa i regulisan je od strane mitohondrijalnih proteina (Chen i sar. 2018). Oba signalna puta aktiviraju proteolitičke enzime iz porodice kaspaza, koji dovode do vakuolizacije i fragmentacije ćelija (Neophytou i sar. 2021). Početni korak u aktivaciji spoljašnjeg apoptotskog puta je vezivanje liganda za odgovarajuće receptore na ćelijskoj membrani. Ovi receptori se nazivaju receptori smrti i pripadaju superfamiliji TNF receptora (eng. *tumor necrosis factor*). Posredstvom FADD proteina (eng. *Fas-associated protein with death domain*), signal se prenosi sa receptora na citoplazmatske proteine – kaspaze koje se tom prilikom aktiviraju. Aktivirane inicijatorske kaspaze (kaspaze 8 ili 10) uzrokuju proteolitičku aktivaciju efektorskih kaspaza (kaspaze 3, 6 i 7) koje razgrađuju ćelijske proteine i uvode ćeliju u apoptozu (Sprick i Walczak 2004). Unutrašnji apoptotski mehanizam se pokreće u prisustvu oštećenja koja dovode do oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija. Ovaj signalni put je regulisan od strane velike porodice Bcl-2 proteina (eng. *B-cell lymphoma 2*), u koju spadaju pro- i anti-apoptotski proteini (Jan i Chaudhry 2019). Proteini koji podstiču apoptozu se

nazivaju pro-apoptotskim proteinima i u njih spadaju Bax, Bad, Bik, Bid, Bcl-XS. U anti-apoptotske proteine se svrstavaju inhibitori apoptoze poput Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w proteina (Adams i Cory 2007). Odnos pro- i anti-apoptotskih proteina određuje da li će proces apoptoze biti aktiviran ili ne. Visok nivo anti-apoptotskih u odnosu na pro-apoptotske proteine deluje citoprotektivno, dok povećana ekspresija pro-apoptotskih faktora u odnosu na anti-apoptotske predstavlja signal za pokretanje apoptoze (Neophytou i sar. 2021). Povišen nivo pro-apoptotskih proteina dovodi do nastanka pora na spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani i izlaska citohroma *c* u citoplazmu. Citohrom *c* zajedno sa Apaf-1 (eng. *Apoptotic peptidase activating factor 1*) proteinom gradi proteinski kompleks – apoptozom, koji regrutuje i aktivira kaspazu 9 (Tait i Green 2013). Poput kaspaze 8, kaspaza 9 aktivira efektorske kaspaze, što dovodi do proteolitičke razgradnje ćelije i nastanka apoptotskih tela (Yuan i Akey 2014). Iako se aktiviraju na različite načine, spoljašnji i unutrašnji apoptotski put su međusobno povezani i u određenoj meri se preklapaju tokom prenosa signala. Naime, pokazano je da kaspaza 8 može uticati na aktivaciju pro-apoptotskog Bid proteina unutrašnjeg apoptotskog puta, što dovodi do oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija. Sa druge strane, apoptoza koja zavisi od mitohondrijalnog Bcl-2 proteina se može odvijati u odsustvu proteina Apaf-1 i kaspaze-9 (Neophytou i sar. 2021).

Pokazano je da poremećaji u signalnom putu apoptoze dovode do razvoja različitih oboljenja, poput kancera, autoimunskih i degenerativnih bolesti (Zhivotovsky i Orrenius 2010). U tumorskim ćelijama se najčešće sreću mutacije u genu za p53 protein, koji spada u klasu tumor supresorskih proteina. Izmenjena aktivnost p53 proteina može dovesti do inhibicije apoptoze, usled čega tumori ispoljavaju rezistenciju na tretman citostaticima i zračenjem (Neophytou i sar. 2021). Mutacije u nekom od anti-apoptotskih proteina (Bcl-2, Bcl-xL ili Mcl-1) se često sreću kod kancera koji su rezistentni na terapiju i povezuju se sa agresivnošću tumora (Jan i Chaudhry 2019). Mehanizam za izbegavanje apoptoze je svojstven kancerskim ćelijama i omogućava proliferaciju ćelija i nakon DNK oštećenja. Na taj način ćelije akumuliraju mutacije i stiču aberantni broj hromozoma, zbog čega je poliploidija česta pojava kod tumora (Thomas i sar. 2013).

1.4 KANCERI PLUĆA I DOJKE

1.4.1 Epidemiologija i etiologija bolesti

Kancer je jedan od vodećih uzroka smrti u razvijenim zemljama širom sveta. Podaci prikupljeni od strane Međunarodne agencije za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), objedinjeni u okviru GLOBOCAN 2020 baze podataka, pokazuju da je u 2020. godini broj obolelih od kancera dostigao 19.3 miliona, dok je broj smrtnih ishoda bio 10 miliona. Najčešći tipovi kancera koji se sreću u svetskoj populaciji su kancer dojke i pluća (Sung i sar. 2021). U ženskoj populaciji, kancer dojke čini jednu četvrtinu ukupnih slučajeva, a po zastupljenosti ga slede kolorektalni kancer, kancer pluća i cerviksa. Najzastupljeniji tip kancera u muškoj populaciji su kancer pluća i prostate, koji zajedno čine trećinu ukupnih registrovanih slučajeva (Sung i sar. 2021).

1.4.2 Karcinomi pluća

Karcinom pluća je oboljenje koje formiraju malignotransformisane ćelije respiratornog epitela, a kao glavni uzročnik bolesti smatra se duvanski dim (Travis i sar. 2015). Na osnovu karakteristika, kanceri pluća se dele na sitnoćelijski (eng. *small cell lung cancer*, SCLC) i nesitnoćelijski (eng. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) karcinom. SCLC je visoko maligno oboljenje sa neuroendokrinim osobinama i zastupljen je kod svega 15% pacijenata, dok NSCLC predstavlja 85% registrovanih slučajeva (Dela Cruz i sar. 2011; Sechler i sar. 2013). U okviru NSCLC, na osnovu histopatoloških karakteristika, definisana su tri podtipa: adenokarcinomi (eng. *adenocarcinoma*, ADC), skvamozni karcinomi (eng. *squamous cell carcinoma*, SCC) i karcinomi velikih ćelija (eng. *large cell carcinoma*, LCC) (Rodriguez i sar. 2016). Adenokarcinomi obuhvataju 38.5% slučajeva obolelih od NSCLC. Nastaju najčešće na periferiji pluća od maligno transformisanog epitela mukoze. Po morfologiji, sastoji se od žlezdanog epitela različitog stepena diferenciranosti i stope proliferacije. SCC se registruju kod 20% pacijenata i lokalizovani su

centralno, unutar glavnih ili lobarnih bronhija. Ovaj podtip se formira u vidu slojeva, odnosno ovalnih grupacija skvamoznog epitela sa sličnim pleomorfizmom i stopom proliferacije. Karcinomi velikih ćelija se javljaju u centralnom delu pluća i na periferiji, a sreću se u svega 2.9% slučajeva. Po histopatološkim osobinama ne pokazuju diferenciranu strukturu poput one koja se sreće kod adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma, zbog čega se svrstavaju u nediferencirane NSCLC karcinomi (Zheng 2016).

Genetičke mutacije koje se dovode u vezu sa nastankom kancera pluća su mutacije u protoonkogenima i tumor-supresorskim genima, koji uzrokuju nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju. Najčešće genetičke alteracije su pronađene u genima *EGFR* (eng. *epidermal growth factor receptor*), *KRAS* (eng. *Kirsten rat sarcoma virus*), *ALK* (eng. *Anaplastic lymphoma kinase*), *TP53* (eng. *tumor protein p53*), *BRAF* (eng. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), *HER2* (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*) (Galli i Rossi 2021). Podtipovi kancera pluća se međusobno razlikuju po tipu mutacija koje nose, pa je određivanje prisustva mutacija neophodno kako u dijagnostičke svrhe, tako i u cilju određivanja terapije (Aramini i sar. 2020; Chevallier i sar. 2021).

Terapija kancera pluća zavisi od dijagnostifikovanog podtipa. Otkrivanje bolesti u ranom stadijumu i početak terapije su od ključnog značaja za preživljavanje pacijenata. Kod pacijenata sa početnim IA stadijumom, kombinovanje hirurškog odstranjivanja i hemioterapije se pokazao kao efikasniji pristup u odnosu na operativno odstranjivanje tumora bez hemioterapije (Kujtan i sar. 2018). Kod I/II stadijuma samostalna primena hemoterapije ili radioterapije nema značajnog efekta na preživljavanje. U slučaju uznapredovalog stadijuma IV pokazalo se da operacija zajedno sa hemioterapijom/radioterapijom može značajno povećati preživljavanje (Xiaochuan i sar. 2020).

1.4.3 Karcinomi dojke

Neoplastičnom transformacijom epitelnih ćelija dojke nastaju karcinomi koji pripadaju klasi adenokarcinoma. Na osnovu histopatoloških osobina, tipa i broja ćelija, vrste i mesta sekrecije, imunohistohemijskog profila i građe tumora, razlikujemo duktalne i lobularne tumore dojke (Makki 2015; Benacka i sar. 2022). Oko 50-80% tumora pripadaju invazivnim duktalnim

karcinomima (IDC), dok se ostali tumori svrstavaju u invazivne lobularne karcinome (ILC). IDC se klasifikuju kao nespecifični tumori jer ne poseduju specifične karakteristike na ćelijskom i molekulskom nivou na osnovu kojih bi se svrstale u određeni histotip. Čelije su plejomorfne, sa istaknutim nukleolusima i visokom stopom deobe. Delovi tkiva zahvaćeni nekrozom i kalcifikacijom su prisutni u više od polovine slučajeva kod kojih je konstatovan ovaj tip karcinoma (Nascimento i Otoni 2020).

Klasifikacija tumora dojke u osnovne podtipove se vrši pomoću sledećih dijagnostičkih markera: estrogenog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR) i receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER-2) (Benacka i sar. 2022). Za analizu stope proliferacije tumora koristi se Ki67 protein, marker ćelijske proliferacije. Analiza ekspresije ovih markera je neophodan korak za određivanje terapije i prognoze bolesti (Orrantia-Borunda i sar. 2022). Nezavisno od histoloških podtipova, karcinomi dojke se mogu klasifikovati na osnovu prisustva molekulskih markera koji daju specifičan fenotip. Prema tome, kanceri dojke se mogu svrstati u luminalne (tip A i B), HER-2 prekomerno ekspimirajuće i bazalne karcinome (Al-thoubaity 2019). Navedeni podtipovi se međusobno razlikuju po ekspresiji ER, PR, HER, i Ki67 proteina. Luminalni umori tipa A pored ER, ekspimiraju u značajnoj meri PR, negativni su na HER2 i sadrže nizak nivo Ki67 proteina. Luminalni tip A po svojim karakteristikama spada u sporo proliferišuće tumore i ima dobre prognoze. Sa druge strane, najagresivniji je bazalni tip koji karakteriše odsustvo ER, PR i HER2 proteina, zbog čega se naziva još i trostruko negativni kancer dojke. Ovaj tip kancera ima najlošije prognoze (Łukasiewicz i sar. 2021).

Mutacije koje nose visok rizik za razvoj kancera dojke se sreću u *BRCA1* i *BRCA2* genima (Shiovitz i Korde 2015). Proteinski produkti ovih gena imaju važnu ulogu u procesu popravke oštećenja na DNK i kontroli ćelijskog ciklusa. Mutacije u *BRCA1* nose 45-87% rizika za razvoj kancera dojke, a u slučaju *BRCA2* 50-85% (Łukasiewicz i sar. 2021). Izmene u sekvenci *TP53*, *CDH1* (eng. *Cadherin 1*) *PTEN* (eng. *Phosphatase and tensin homolog*) i *STK11* (eng. *Serine/threonine kinase 11*) gena takođe mogu dovesti do razvoja kancera dojke, ali i drugih tipova maligniteta poput ovarijalnog kancera. Pored navedenih, mutacije u genima koji kodiraju za proteine uključene u signalne puteve zajedno sa *BRCA1* i *BRCA2* takođe predstavljaju faktor

rizika. U ovu grupu spadaju proteini koji učestvuju u procesu DNK reparacije i kontrole ćelijskog ciklusa (Rousset-Jablonski i Gompel 2017).

Terapija kancera dojke zavisi od podtipa i stadijuma bolesti. Pacijentkinje sa stadijumom I-IIIa se upućuju na hirurško odstranjivanje tumora (lumpektomija ili mastektomija), nakon čega slede ciklusi terapije zračenjem, kako bi se uništile preostale maligne ćelije. Kod hormon-zavisnih tumora se prepisuje i endokrina terapija koja ciljano deluje na ER i HER2 i blokira efekat estrogena, čime se sprečava nekontrolisana proliferacija ćelija (Moo i sar. 2018; Łukasiewicz i sar. 2021). Međutim, nedostatak ovog pristupa je razvoj rezistencije na terapiju koja se razvija kod približno 50% pacijentkinja. Kod pacijentkinja sa kancerom dojke u početnoj fazi hormonska terapija u kombinaciji sa hemioterapijom smanjuje stopu mortaliteta, dok se bolest u uznapređovaloj fazi obično tretira kombinacijom radioterapije i hemioterapije (Łukasiewicz i sar. 2021).

2. CILJEVI

Savremeni pristup u terapiji kancera podrazumeva primenu zračenja koja imaju veću efikasnost u eliminaciji tumorskog tkiva u odnosu na konvencionalno zračenje. To su hadroni (protoni i joni ugljenika) koji u poređenju sa X ili γ – zračenjem efikasnije ubijaju ćelije tumora. *In vitro* studije omogućavaju procenu ćelijske radioosetljivosti i njenu promenu u funkciji različitih vrsta zračenja, kao i analizu odgovora na nastala DNK oštećenja (DDR odgovor). Ove analize su neophodne za precizno planiranje i prilagođavanje terapije pacijentima. Aktuelna istraživanja ukazuju na važnost ispitivanja ćelijskih procesa koji se nalaze u osnovi DDR, s obzirom da su upravo ovi mehanizmi odgovorni za uspešnost terapije.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na veći doprinos direktnih efekata zračenja nakon primene hadrona u eliminaciji ćelija kancera u odnosu na fotone. Međutim, ne postoji dovoljno literaturnih podataka o efikasnosti hadronske terapije i mehanizmu njenog delovanja. Stoga postoji potreba kako za novim podacima, tako i za dopunjavanjem postojećih baza podataka o odgovoru maligno transformisanih ćelija na direktna oštećenja izazvana zračenjem. Međutim, odgovor ćelija na zračenja različitog kvaliteta je još uvek nedovoljno ispitan.

U okviru ove doktorske disertacije praćeni su direktni efekti nisko i visoko jonizujućeg zračenja u ćelijama kancera čoveka, u uslovima *in vitro*. Kao model sistem poslužile su MCF-7 ćelije adenokarcinoma dojke i HTB177 ćelije nesitnoćelijskog karcinoma pluća, koje su odabrane zbog visoke učestalosti ovih tipova maligniteta i potrebe za unapređenjem terapijskih pristupa. Ispitivani su efekti referentnog, nisko jonizujućeg γ -zračenja, kao i efekti visoko jonizujućeg zračenja protonima i jonima ugljenika. Sakupljači slobodnih radikala, DMSO i glicerol, su poslužili kako bi se smanjio udeo indirektnih efekata zračenja.

U istraživanjima su postavljeni sledeći ciljevi:

1. Određivanje nivoa radioosetljivosti MCF-7 i HTB177 ćelija nakon izlaganja zračenju konvencionalnim γ -zracima kao i posle ozračivanja terapijskim protonima i jonima ugljenika u prisustvu ili odsustvu sakupljača slobodnih radikala. Radiobiološki parametri, dobijeni na osnovu ćelijskog preživljavanja treba da omoguće procenu efikasnosti ispitivanih tipova zračenja u eliminaciji malignih ćelija.

2. Kvantitativna i kvalitativna analiza dvolančanih oštećenja na DNK nastalih nakon ozračivanja γ -zracima, protonima i jonima ugljenika, u prisustvu ili odsustvu sakupljača slobodnih radikala.
3. Praćenje uticaja različitih tipova zračenja na propagaciju ćelija kroz ćelijski ciklus u prisustvu ili odsustvu sakupljača slobodnih radikala, kao i analiza promene ekspresije proteina koji su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa i ćelijsku smrt po tipu apoptoze.
4. Analiza ekspresije proteina koji učestvuju u ćelijskom mehanizmu DDR nakon ozračivanja γ -zracima, protonima i jonima ugljenika u prisustvu ili odsustvu sakupljača slobodnih radikala.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imaju za cilj da doprinesu proširenju postojeće baze podataka koja se odnosi na odgovor maligno transformisanih ćelija na različite tipove zračenja, posebno terapijske protone i jone ugljenika. Takođe, deo dobijenih bioloških rezultata treba da posluži za poređenje sa rezultatima Monte Carlo simulacija DNK oštećenja dobijenih korišćenjem softverskog paketa Geant4, čiji je cilj predikcija ćelijskog odgovora kod primene hadronske terapije.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Hemikalije

Sve hemikalije koje su korišćene za *in vitro* održavanje ćelija, uključujući hranljivi medijum RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute medium*), fetalni teleći serum (eng. *foetal calf serum*, FCS), i mešavinu antibiotika penicilina (5000U) i streptomicina (5 mg/ml u 0.9% natrijum hloridu), kupljene su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka.

Od istog proizvođača (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka) su takođe nabavljeni: tris baza, diamidino-2-fenilindol hidrohlorid (DAPI), Mowiol[®] 4-88, etilen diamino tetra sirćetna kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), etilen glikol tetrasirćetna kiselina (eng. *ethylene glycol tetraacetic acid*, EGTA), albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumine*, BSA), natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), natrijum-deoksiholat, natrijum ortovanadat (Na₃VO₄), akrilamid, bisakrilamid, glicin, β-merkaptioetanol, brom fenol plavo, glicerol, Tween 20, propidijum jodid (PI), kristal violet (CV), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid (MTT), dimetilsulfoksid (DMSO), Triton-X.

Ribonukleaza A (RNase A), amonijum persulfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED), Na-fluorid (NaF), paraformaldehid (PFA) su proizvodi SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka.

Metanol, etanol i glicerol su nabavljeni od firme Zorka Pharma, a.d., Šabac, Srbija.

Za detekciju proteina korišćen je ECL (eng. *enhanced chemiluminescence*) supstrat koji čini luminol i p-kumarična kiselina, a koji je kupljen od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka.

3.1.2. Pufferi

- PBS puffer (eng. phosphate buffer saline, PBS), pH 7.4: 0.137 M NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 16.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl.

- RIPA pufer za liziranje: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% SDS, 0.5% Na-deoksiholat, 1mM EDTA, 1mM EGTA i 1mM (Na₃VO₄)
- Pufer za nalivanje uzoraka na gel elektroforezu: 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerola, 0.4% β-mercaptoetanol, 1% bromofenol plavo
- SDS pufer za elektroforezu: 25 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, 192 mM glicin
- Pufer za transfer proteina na membranu: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol
- TBS pufer: 1.5 M NaCl, 0.2 M Tris, pH 7.4
- Pufer za skidanje proteina sa membrana: 100 mM β-merkaptoetanol, 2% SDS i 62.5 mM Tris pH 6.7

Svi puferi korišćeni u ovom radu su pripremani po procedurama navedenim u knjizi Molecular Cloning – A Laboratory Manual (Sambrook i sar. 1989).

3.1.3. Antitela

Antitela na DNA-PK, ATR i Rad51 nabavljena su od Santa Cruz biotechnology Inc. Zečija poliklonska antitela na p21, Ciklin D1, PARP1, Bax, Bcl-2, sekundarno mišje anti-zečje IgG i kozje anti-mišje IgG antitela obeležena peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) su proizvod Cell Signaling Technology Inc. Danvers, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države. Zečje poliklonsko antitelo na β-aktin je proizvod Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, dok je mišje antitelo na γ-H2AX (Ser139) obeleženo sa Alexa Fluor[®]488, proizvod BioLegend Inc. San Diego, California, Sjedinjene Američke Države.

3.1.4. Čelije

U eksperimentima koji su obuhvaćeni ovim radom korišćene su dve humane kancerske ćelijske linije: ćelije adenokarcinoma dojke MCF-7 i nesitnoćelijskog karcinoma pluća HTB177.

MCF-7 ćelijska linija izolovana je od strane H. Soule i saradnika iz pleuralne efuzije pacijentkinje sa metastatskim adenokarcinomom dojke (Soule i sar. 1973). Na osnovu morfoloških karakteristika svrstava se u epitelne ćelije, koje rastu kao adherentne ćelijske kulture formirajući monosloj. U konfluentnom monosloju ćelije mogu nadrastiti donji sloj u vidu „kupole“, što je jedna od odlika epitelnih ćelija tkiva dojke (Soule i sar. 1973). Zahvaljujući očuvanim osobinama tkiva

dojke (morfologiji epitela i osjetljivosti na hormone estrogen i progesteron) MCF-7 ćelije predstavljaju važan model-sistem za istraživanje kancera dojke (Soule i sar. 1973, Levenson i Jordan 1997, Burdali i sar. 2003). Ćelijska linija vodi poreklo iz Američke kolekcije kulture sojeva (*eng.* American Type Culture Collection, ATCC) (Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države), a dobijena je ljubaznošću dr Danijele Maksimović-Ivanić i dr Sanje Mijatović (Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu).

HTB177 ćelijska linija je izolovana iz pleuralne tečnosti pacijenta sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća od strane A.F. Gazdar i saradnika (Carney i sar. 1985). Prema morfološkim karakteristikama spada u epitelne ćelije koje rastu kao adhezivne monoslojne ćelijske kulture. U poređenju sa ostalim ćelijskim linijama koje pripadaju vrsti nestinoćelijskog karcinoma pluća, HTB177 su jedne od najčešće korišćenih u *in vitro* istraživanjima (Mulshine i sar. 2019). Ćelijska linija HTB177 nabavljena je iz ATCC kolekcije ćelija (ATCC, Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države).

3.2. METODI

3.2.1. Gajenje ćelija u kulturi

Komercijalno dostupne ćelijske linije su uzgajane i održavane u kontrolisanim uslovima (Freshney 2006; Segeritz i Vallier 2017), u skladu sa preporukama navedenim od strane proizvođača (ATCC). Ćelije su rasle u sterilnim plastičnim sudovima (flaskovima) površine 25 cm² (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nemačka), u hranljivom medijumu RPMI 1640 u koje su dodati L-glutamin, 10% fetalni teleći serum i 1% penicilin/streptomycin. U toku rada sa ćelijskim kulturama korišćene su tehnike aseptičnog rada, kako bi se izbegla neželjena kontaminacija patogenima (Segeritz i Vallier 2017). Ćelije su rasle u vlažnoj sredini, pri konstantnoj temperaturi od 37° C u prisustvu 5% CO₂ u inkubatoru (Heraeus, Hanau, Nemačka).

Nakon formiranja monosloja sa približno 80% konfluencije, ćelije su pasažirane tako što je hranjivi medijum odliven, ćelije isprane sterilnim rastvorom PBS i inkubirane tokom 2 minuta na 37° C u rastvoru 0.25% tripsina 0.53 mM EDTA u PBS. Rastvor tripsina dovodi do raskidanja međućelijskih veza i odvajanje ćelija od podloge na kojoj rastu. Ćelije su potom sakupljene u

kompletnom hranljivom medijumu i rasejane u odgovarajućem razblaženju. Tokom pasažiranja, ćelije su po potrebi zamrzavane. Suspenzija sa ćelijama u eksponencijalnoj fazi rasta je centrifugirana na 2000 rpm tokom 2 minuta, nakon čega je ćelijski talog resuspendovan u 10% DMSO u FBS, prebačen u kriotube i odložen na -80 °C. Sledećeg dana ćelije su odložene u kanister sa tečnim azotom radi dugotrajnog čuvanja.

3.2.3. Sinhronizacija ćelija

Za postizanje ujednačenih eksperimentalnih uslova, rast ćelijskih populacija je sinhronizovan metodom izgladnjivanja u odsustvu seruma (eng. *serum starvation*). Ovaj metod je zasnovan na osobini ćelija da u odsustvu hranljivih komponenti iz seruma privremeno zaustave sintezu proteina i proces deobe. Na taj način se ćelije zaustavljaju u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa i privremeno ulaze u stanje mirovanja. Nakon stimulacije rasta hranljivim medijumom koja sadrži serum, prethodno sinhronizovana ćelijska populacija nastavlja propagaciju kroz ćelijski ciklus (Langan i Chou 2011; Chen i sar. 2012). Kako bi se sinhronizovao rast ćelijske populacije, MCF-7 i HTB177 ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta su izgladnjivane tokom 18 h u vlažnoj sredini na 5% CO₂.

3.2.4. Bojenje tripan plavim

Metoda bojenja tripan plavim služi za određivanje ukupnog broja ćelija u suspenziji. Zasnovana je na osobini boje da prodre u ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane, zbog čega citoplazmu mrtvih ćelija boji u plavo. Ćelije sa intaktnom membranom ostaju neobojene i one se smatraju živim (Stober 2015).

Ćelijska suspenzija je pomešana sa 0.1% rastvorom tripan plavog u PBS, u odnosu 1:1 i potom prebrojana pomoću hemocitometra (Bright-Line™ Hemacytometer, Buffalo, NY, Sjedinjene Američke Države). Ćelije su brojane u okviru četiri spoljna kvadrata komore za brojanje, pod invertnim svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Nemačka). Neobojene (žive) ćelije su uzete u obzir, dok su plavo obojene (mrtve) ćelije izostavljene. Preračunavanje broja ćelija u 1 ml suspenzije se vrši prema sledećoj formuli:

$$\text{br. ćelija/ml suspenzije} = \text{br. ćelija/br. polja} \times \text{faktor razblaženja} \times 10^4$$

Određivanje ukupnog broja ćelija je poslužilo za pravljenje razblaženja ćelijske suspenzije određenih gustina.

3.2.5. Tretmani sakupljačima slobodnih radikala

Efekat sakupljača slobodnih radikala je analiziran u prisustvu rastućih koncentracija DMSO i glicerola, odabranih na osnovu podataka iz literature (Millar i sar. 1981; Leloup i sar. 2004, Hirayama i sar. 2009). Ćelije su tretirane rastvorima DMSO ili glicerola u potpunom hranljivom medijumu, tokom jednog sata na 37 °C u vlažnoj atmosferi na 5% CO₂. Citotoksičnost je analizirana u prisustvu DMSO koncentracija 1 do 1000 mM, kao i u opsegu od 2 do 1000 mM glicerola. Po isteku tretmana, ćelijama je zamenjen hranjivi medijum i inkubirane su narednih 96 h, nakon čega je izmerena vijabilnost. U eksperimentima u kojima su praćeni efekti zraćenja, ćelije su 1 h pre zraćenja tretirane u koncentracijama DMSO od 1 do 500 mM, a glicerola od 2 do 200 mM. Ćelije su potom ozraćene i inkubirane u svežoj hranljivoj podlozi tokom vremenskog intervala koji je definisan u eksperimentu.

3.2.6. Testovi vijabiliteta

3.2.6.1. MTT test

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid) test poslužio je za određivanje stepena vijabilnosti kontrolnih i tretiranih ćelija. Metoda je zasnovana na reakciji redukcije tetrazolijumove soli u formazan, tokom koje se menja boja rastvora i prelazi iz žute u ljubičastu. Ova reakcija se dešava u metabolički aktivnim ćelijama posredstvom mitohondrijskih reduktaza, a intenzitet ljubičaste boje je direktno srazmeran broju živih ćelija u analiziranom uzorku (Mosman 1983).

Ćelije gustine 1×10^3 su zasejane u mikrotitarske ploče sa 96 bunara (Sarstedt AG. & Co, Nümbrecht, Nemačka) i tretirane rastvorom DMSO (finalna koncentracija 1, 100, 500 i 1000 mM) ili glicerola (finalna koncentracija 2, 200, 500 i 1000 mM) tokom 1 h na 37 °C i 5% CO₂ u vlažnoj

sredini. Nakon toga, ćelije su rasle tokom 96 h u svežoj hranljivoj podlozi u inkubatoru. Po isteku inkubacionog perioda, hranljivi medijum je odličen, a ćelije su isprane PBS i inkubirane u prisustvu 50 µl MTT u potpunom hranljivom medijumu (finalna koncentracija 0.5 mg/ml) u trajanju do 2 h na 37 °C. Nakon pojave ljubičaste boje, supernatant je odličen, a kristali formazana su rastvoreni u 100 µl DMSO po bunaru. Apsorbanca je očitana na ELISA fotometrijskom čitaču (Wallac, Victor2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finska), na talasnoj dužini od 550 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Rezultati su prikazani kao procenat vrednosti apsorbance u odnosu na kontrolne ćelije koje nisu tretirane sakupljačima slobodnih radikala.

3.2.6.2. Kristal violet test

Bojenje baznom bojom kristal violet (CV) je zasnovano na njenom vezivanju za negativno naelektrisane polisaharide, proteine i nukleinske kiseline u ćelijama. Količina vezane boje odgovara broju ćelija u uzorku, što služi za procenu vijabilnosti (Flick i Grofford, 1984).

Ćelije su gajene u mikrotitarskim pločama od 96 bunara i tretirane rastvorom DMSO (finalna koncentracija 1, 100, 500 i 1000 mM), ili glicerola (finalna koncentracija 2, 200, 500 i 1000 mM) u kompletnoj hranljivoj podlozi u trajanju od 1 h na 37 °C, vlažnoj sredini i 5% CO₂. Supernatant je potom odličen i ćelijama je dodat svež hranljivi medijum u kojem su inkubirane narednih 96 h. Ćelije su zatim isprane u PBS, fiksirane 4% rastvorom paraformaldehida u PBS i obojene 1% rastvorom kristal violet u PBS. Ploče su ispirane pod mlazom vode kako bi se uklonio višak boje, a zatim je vezana boja rastvorena u 100 µL 33% sirćetne kiseline. Apsorbanca je očitana na ELISA fotometrijskom čitaču (Wallac, Victor2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finland), na talasnoj dužini od 550 nm. Rezultati su prikazani kao procenat od vrednosti apsorbance netretirane kontrole.

3.2.7 Uslovi zračenja

3.2.7.1. Nisko jonizujuće zračenje – γ -zračenje

Kao izvor γ -zraka korišćen je radioaktivni kobalt ^{60}Co (CIRUS-Cis Biointernational, Gif-sur-Yvette, Francuska). Ozračivanje uzoraka obavljano je u Laboratoriji za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Tokom ozračivanja, posude sa ćelijama su postavljene u specijalno napravljen nosač tako da ćelijski monosloj bude pod pravim uglom u odnosu na pravac snopa γ -zraka. Ćelije su ozračene dozama u opsegu od 0.5 Gy do 8 Gy, u vazduhu na sobnoj temperaturi, a brzina doze je iznosila ~ 1 Gy/min. U slučaju kada su analizirana oštećenja na DNK, ćelijski monosloj je ozračivan na $\sim 4^\circ\text{C}$, kako bi se tokom zračenja zaustavili reparacioni procesi.

3.2.7.2. Visoko jonizujuće zračenje – protoni i joni ugljenika

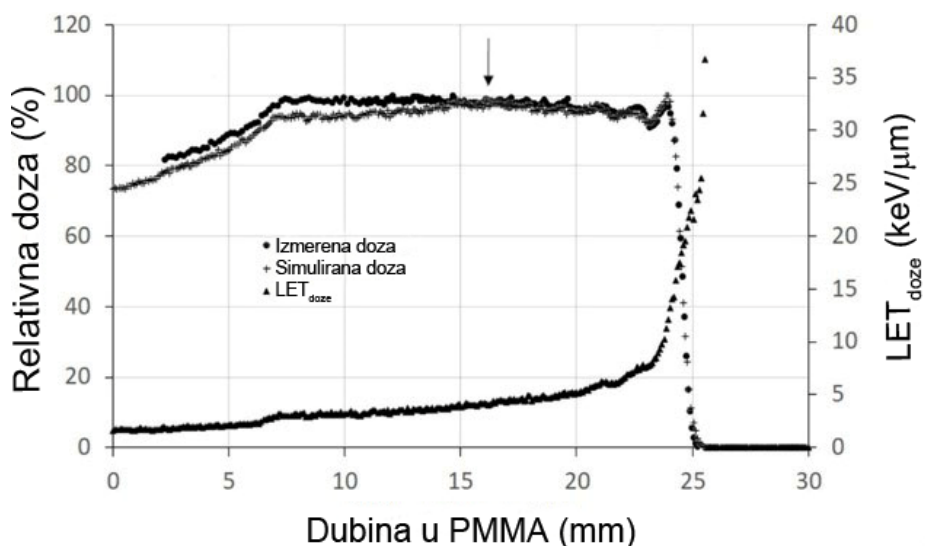
Snop čestica visoko jonizujućeg zračenja – protona i jona ugljenika, dobijen je pomoću superprovodnog ciklotrona, koji se nalazi u Južnoj Laboratoriji Nacionalnog Instituta za nuklearnu fiziku (*Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali del Sud –INFN-LNS*), u Kataniji, Italija (Cirrone i sar. 2011).

Zračenje terapijskim protonima

Zračenje protonima je obavljeno u Centru za protonsku terapiju CATANA (*Centro di Adro Terapia e Applicazioni Nucleari Avanzate*), koji se nalazi u okviru INFN-LNS u Kataniji, Italija. U okviru ovog centra se uspešno sprovodi terapija melanoma oka, kao i istraživačke aktivnosti iz oblasti radijacione biologije (Cirrone i sar. 2017).

Ćelije su ozračene snopom terapijskih protona energije 62 MeV, u sredini proširenog Bragovog pika (Slika 7). Na mestu zračenja relativna doza je bila $100.0\% \pm 1.6\%$ a odgovarajuća vrednost LET su iznosile 4.7 ± 0.2 keV/ μm . Vrednost LET je izračunata pomoću Monte Carlo

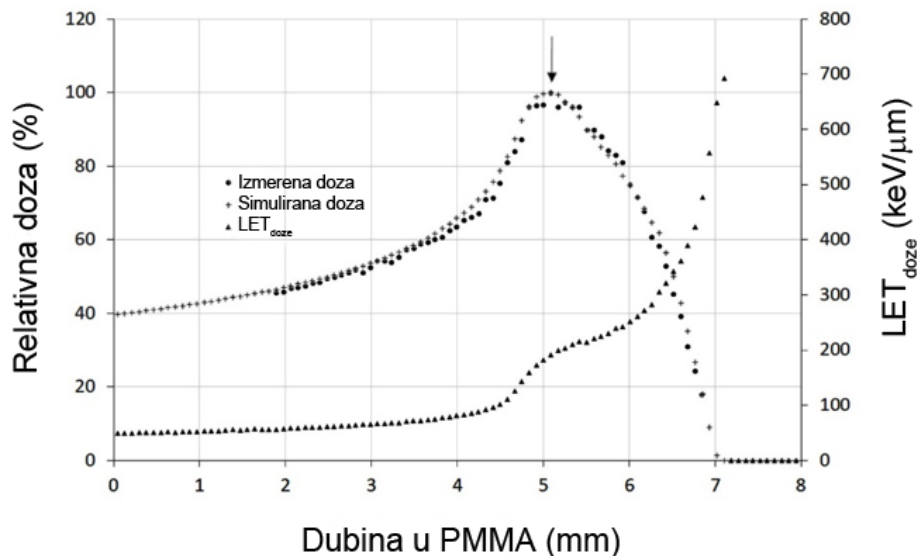
simulacija, koristeći Geant4 računarski program (Romano i sar. 2014). Ova pozicija zračenja je dobijena tako što su ploče od polimetil-metakrilata – Perspex® (eng. *polymethyl methacrylate*, PMMA), debljine 16.3 mm, postavljena između finalnog kolimatora i ćelijskog monosloja. Referantna dozimetrija je urađena pomoću Markusove jonizacione komore (Advanced Markus® Chamber, Type 34045, Physikalisch Technische Werkstätten – PTW, Freiberg, Nemačka). Jonizaciona komora je kalibrisana po preporukama Međunarodne agencije za atomsku energiju (eng. *International Atomic Energy Agency*, IAEA) (IAEA 2000). Kako bi se utvrdila preciznost pozicioniranja uzoraka u okviru snopa, vršena je provera ozračivanjem Gafchromic® filma (ISP Technologies, Wayne, Sjedinjene Američke Države). Posude sa ćelijama su postavljene u posebno napravljen nosač za zračenje i pozicionirane su pod uglom od 90° u odnosu na osu snopa protona. Ozračivanje se vršilo jednokratno, dozama od 0.5 Gy do 8 Gy, pri brzini doze od ~12 Gy/min, u vazduhu, na sobnoj temperaturi. U slučaju kada je bilo potrebno tokom ozračivanja privremeno zaustaviti proces DNK reparacije u ćelijama, uzorci su održavani na ~4 °C.



Slika 7. Uslovi zračenja terapijskim protonima energije 62 MeV, sa izmerenim i simuliranim vrednostima relativne doze i LET_{doze} u PMMA. Uzorci su ozračivani na sredini SOBP, na poziciji označenom strelicom. Vrednosti na levoj ordinati se odnose na distribuciju izmerene i simulirane doze, dok ordinata na desnoj strani odgovara dozi prosečnog LET.

Zračenje jonima ugljenika

Ćelije su ozračivane snopom jona ugljenika energije 62 MeV/u, na “0 degree” (0°) eksperimentalnoj transportnoj liniji u INFN-LNS, Katanija, Italija. S obzirom na to da da joni ugljenika na kraju svoje putanje formiraju veoma uzak Bragov pika, potrebno je precizno postaviti uzorke (ćelijski monosloj) koji će biti ozračeni. Kako bi se omogućilo lakše pozicioniranje ćelija i obezbedila tačnost eksperimentalnih uslova u ponovljenim kampanjama zračenja, Bragov pik je blago proširen pomoću dva posebno dizajnirana filtera (eng. *ripple filter*) koji su postavljeni u snop. Pozicija zračenja se nalazila na početku uzlaznog dela proširene Bragove krive (Slika 8). Ozračivanje se vršilo pri vrednosti LET od ~ 200 keV/μm, kada joni ugljenika postižu najveću relativnu biološku efektivnost, tj. maksimalan RBE (Weyrather i sar. 1999; Belli i sar. 2008). Vrednost LET je određena pomoću numeričkih simulacija korišćenjem Geant4 programa i iznosila je ~210 keV/μm (Romano i sar. 2014). Pozicija zračenja je dobijena postavljanjem ploča od Perspex (PMMA) različitih debljina između poslednjeg kolimatora i posuda u kojima su gajene ćelije (Romano et al. 2014). Referentna dozimetrija je urađena pomoću Napredne Markus[®] jonizacione komore, na isti način kao i u slučaju protonskog terapijskog snopa. Posude sa ćelijama su postavljene u specijalno dizajnirani nosač vertikalno, tako da ćelijski monosloj bude pod pravim uglom u odnosu na osu snopa jona ugljenika. Preciznost pozicioniranja ćelija i homogenost snopa je proveravana pre svakog zračenja pomoću Gafchromic[®] filma (ISP Technologies, Wayne, New Jersey, Sjedinjene Američke Države). U zavisnosti od ćelijske linije i analize koja je rađena, ćelije su ozračivane pojedinačnim dozama u opsegu od 0.5 do 5 Gy, pri prosečnoj brzini doze ~12 Gy/min. Zračenje su obavljena u vazduhu na sobnoj temperaturi, ili na ~4° C kada su eksperimentalni uslovi zahtevali inhibiciju reparacionih procesa tokom ozračivanja.



Sika 8. Uslovi zračenja jonima ugljenika energije 62 MeV, sa izmerenim i simuliranim vrednostima relativne doze i LET_{doze} u PMMA. Uzorci su ozračivani u uzlaznom delu neznatno proširene Bragove krive, na poziciji označenom strelicom. Vrednosti na levoj ordinati se odnose na distribuciju izmerene i simulirane doze, dok ordinata na desnoj strani odgovara dozi prosečnog LET.

3.2.8. Test klonogenosti

U radijacionoj biologiji, test klonogenosti se smatra „zlatnim standardom“ za analizu ćelijskog preživljavanja nakon zračenja, ali je našao svoju primenu i u ispitivanju citotoksičnosti hemijskih agenasa (Franken i sar. 2006). Klonogeni esej prati sposobnost pojedinačnih ćelija da se nakon izlaganja dejstvu ispitivanog agensa dele i formiraju kolonije u uslovima *in vitro*. Vijabilnim ćelijama se smatraju one koje su nakon tretmana, u vremenskom periodu koji obuhvata najmanje 6 ćelijskih deoba, formirale kolonije koje broje 50 ili više pojedinačnih ćelija. Radi jasne vizuelizacije i kvantifikacije, ćelije se fiksiraju i boje rastvorom kristal violet (Feoktistova i sar. 2018).

Prema proceduri, određeni broj ćelija je zasejavan u standardne posude za ćelijsku kulturu i inkubiraju u vlažnoj atmosferi na 37 °C i 5% CO₂. Jedan sat pre zračenja, ćelije su tretirane DMSO i/ili glicerolom i potom su ozračene u čvrsto zatvorenim posudama za gajenje. Ćelijama je

zatim vraćen svež hranljivi medijum, nakon čega su ostavljene u inkubatoru da rastu i formiraju kolonije. Posle najmanje sedam dana inkubacije, kada su ćelije formirale jasno vidljive kolonije, pristupilo se bojenju. Hranljivi medijum je odliven i ćelije su, isprane u PBS, fiksirane u metanolu tokom 15 min na sobnoj temperaturi i obojene rastvorom 1% kristal violet. Višak boje je pažljivo ispran pod mlazom vode, nakon čega su kolonije prebrojane na invertnom svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

Sposobnost adherentnih ćelija zasejanih u maloj gustini da se zakače za podlogu i obrazuju koloniju se definiše kao efikasnost zasejavanja (eng. *plating efficiency*, PE), a predstavlja odnos broja izraslih kolonija i broja zasejanih ćelija (Feoktistova i sar. 2018). Vrednost PE se razlikuje između ćelijskih linija i predstavlja važan parametar za određivanje ćelijskog preživljavanja (Franken i sar. 2006). Frakcija preživaljavanja ćelija (eng. *surviving fraction*, SF) predstavlja odnos vrednosti PE tretiranih (ozračenih) ćelija i netretirane kontrole. Rezultati dozno zavisnog klonogenog preživljavanja su fitovani korišćenjem linearno kvadratne jednačine:

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

gde je S frakcija preživelih ćelija, D doza zračenja. dok su α i β parametri fitovanja. Parametar α definiše početni nagib, „rame“ krive preživljavanja, a parametar β odgovara opadajućem delu krive, tj. „repu“ krive (Choi i Kang 2012). Radioosetljivost ćelijske linije se određuje na osnovu vrednosti SF pri dozi od 2 Gy (SF2). Radiobiološki parametri su utvrđeni sa najbolje fitovanih krivi preživljavanja, dobijenih pomoću TableCurve 2Dv 5.00 kompjuterskog programa.

3.2.9. Preračunavanje stepena zaštite

Parametar koji je označen kao stepen zaštite (eng. *degree of protection*, DP) pokazuje u kojoj meri pretretman određenim hemijskim agensom štiti ćelije od oštećenja izazvanih zračenjem (Hirayama i sar. 2013). U ovoj studiji su korišćeni DMSO i glicerol, koji interaguju sa slobodnim radikalima i umanjuju indirektno zračenje. Zahvaljujući ovoj osobini, DP u prisustvu DMSO i glicerola može poslužiti za analizu direktnih efekata zračenja (Shinohara i sar. 1996, Hirayama i sar. 2013). Vrednost DP se izražava kao povećanje frakcije preživljavanja u prisustvu

DMSO ili glicerola, u odnosu na vrednosti frakcija preživljavanja netretiranih kontrola (Hirayama i sar. 2013), a preračunava se prema formuli:

$$DP = \frac{\ln SF_0 - \ln SF_x}{\ln SF_0}$$

gde su SF_0 and SF_x frakcije preživljavanja na 0 i xM koncentracije DMSO ili glicerola.

3.2.10. Preračunavanje direktnih efekata zračenja

Metod preračunavanja protektivne frakcije pomoću DMSO je poslužio za preračunavanje maksimalne DP, odnosno vrednosti koja omogućava maksimalnu zaštitu od ćelijskog ubijanja. Ova vrednost se postiže pri besonačno velikoj vrednosti DMSO koja se određuje pomoću linearne regresije. Ekstrapolacijom prave, koja prikazuje promenu recipročnih vrednosti DP ($1/DP$) u zavisnosti od koncentracije DMSO ($1/M$), dobija se maksimalna DP ($1/DP_{max}$) vrednost pri tački u kojoj koncentracija DMSO teži beskonačnosti ($1/DMSO=0$) (Shinohara i sar. 1996; Hirayama i sar. 2013). Ova vrednost odgovara tački preseka regresione prave gde koncentracija DMSO ($1/DMSO=0$) teži beskonačnosti. Vrednosti su preračunate prema formulama za linearnu regresiju:

$$1/DP = k \times (1/x) + y_\infty$$

$$y_\infty = 1/DP, (x \rightarrow \infty, 1/x = 0)$$

gde je y_∞ jednak recipročnoj vrednosti DP za koncentraciju DMSO ekstrapoliranu do beskonačnosti, a k nagib regresione prave. Takođe, recipročna vrednost y_∞ predstavlja udeo indirektnih efekata zračenja:

$$IA(\%) = 1/y_\infty \times 100$$

gde IA predstavlja doprinos indirektnih efekata u inaktivaciji ćelija. Udeo direktnih efekata se dobija kada se od ukupnih letalnih efekata zračenja, koji iznose 100%, oduzme procenat indirektnih efekata i računa se prema formuli:

$$DA(\%) = 100\% - IA(\%)$$

3.2.11. Imunocitohemijsko obeležavanje proteina

Imunocitohemijski metod se primenjuje za obeležavanje proteina *in situ* i njihovu analizu pod mikroskopom. Tehnika obeležavanja se bazira na reakciji antigen-antitelo, gde antitelo specifično prepoznaje i vezuje protein od interesa. Prisustvo proteina se potvrđuje na osnovu kolorimetrijske reakcije u slučaju da je antitelo konjugovano sa enzimom, ili pomoću fluorescentnog signala kada je antitelo konjugovano sa fluoroforom (Oliver i Jamur 2010).

Za analizu DSB oštećenja korišćena je metoda obeležavanja fosforilisane forme H2AX histona (γ H2AX). Nastanak γ H2AX praćen je nakon zračenja dozom od 1 Gy, zbog toga što je pokazano da više doze zračenja mogu prouzrokovati preklapanje fluorescentnog signala (Boker i Iliakis 2006). Sinhronizovane ćelije su zasejane na pokrovna stakalca dimenzija 22 x 22 cm u sterilnim pločama od 6 bunara (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nemačka). Broj zasejanih ćelija iznosio je 40 000 po uzorku. Nakon pretretmana različitim koncentracijama DMSO (1, 100, 500 mM), ili glicerola (2, 200 mM), ćelije su zračene γ -zracima, protonima ili jonima ugljenika i potom inkubirane tokom 0.5 h i 24 h u prisustvu 5%CO₂, na 37 °C. Ćelije su zatim isprane rastvorom PBS, fiksirane u 4% PFA-PBS 15 minuta na sobnoj temperaturi, permeabilizovane rastvorom 0.2% TritonX-PBS 10 minuta na 4°C i ponovo isprane u PBS. Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, ćelije su blokirane u 5% BSA-TBST tokom jednog sata na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom inkubirani sa rastvorom fluorescentno obeleženog primarnog anti- γ H2AX antitela koje je prethodno razblaženo u odnosu 1:500 u 2.5% BSA-TBST, preko noći na 4°C. Da bi se sačuvao intenzitet fluorescentnog signala, ćelije su inkubirane u vlažnoj sredini i u mraku. Ispiranje u TBST je poslužilo za uklanjanje viška antitela. Uzorci su dehidratirani u rastućim koncentracijama etanola (70%, 90%, 96%) i zatim osušeni na vazduhu. Za montiranje uzoraka

korišćen je medijum za montiranje sa propidijum jodidom Vectashield® (Vector Laboratories, Sjedinjene Američke Države). Mikrografije su napravljene pomoću laserskog konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP5 II (Leica Microsystem CMS GmbH; Wetzlar, Germany) koristeći LAS AF Lite softver (Leica Microsystem CMS GmbH). Za kvantifikaciju γ H2AX fokusa korišćen je ImageJ softverski program.

3.2.12. Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija, odnosno fluorescencijom aktivirano sortiranje ćelija (eng. *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) je metoda za odvajanje pojedinačnih ćelija i njihovu karakterizaciju na osnovu veličine, složenosti i emitovane fluorescencije. Prilikom prolaska kroz laserski snop, ćelije se razvrstavaju na subpopulacije na osnovu svetlosnog rasejanja pod malim uglom i fluorescentne boje (Loken i Herzenberg 1975). Metoda protočne citofluorimetrije je u ovoj studiji korišćena za analizu ćelijskog ciklusa. Za bojenje se koristi propidijum jodid koji se ugrađuje u DNK, a pri prolasku kroz laser fluorescira crveno. Na taj način, intenzitet fluorescentnog signala odgovara količini DNK u ćelijama. Ovo bojenje omogućava sortiranje vijabilnih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (G1, S i G2/M), dok se procenat mrtvih (apoptotičnih) ćelija u uzorku procenjuje na osnovu fragmentovanog DNK sadržaja u subG1 fazi (Pozarowski i Darzynkiewicz 2004).

Za analizu ćelijskog ciklusa zasejano je 1×10^5 ćelija/mL ćelija u posude za gajenje. Nakon čega su ćelije pretretirane rastvorima DMSO (100 i 500 mM) i ozračenje γ -zracima, protonima ili jonima ugljenika pri dozi od 3 Gy. Ćelije su inkubirane na 37 °C i 5% CO₂ u svežoj hranljivoj podlozi 24 i 48 h nakon zračenja. Uzorci su zatim isprani u PBS, centrifugirani 3 minuta na 2000 rpm i fiksirani u vodenom rastvoru 70% etanola, prethodno ohlađenog na -20°C. Fiksiranje se vršilo postepeno, kap po kap na mehaničkoj mešalici (vorteksu), kako bi se izbeglo slepljivanje ćelija. Do trenutka bojenja, uzorci su čuvani na 4°C. Ćelije su potom inkubirane u rastvoru RNase A u PBS (1 mg/ml) tokom 20 minuta na 37° C. Ćelijska DNK obojena je rastvorom PI u PBS (50 μ g/ml) tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su u ovom koraku zaštićeni od svetla kako bi se sačuvalo intenzitet fluorescence. Ćelijski ciklus je analiziran na 10 000 ćelija po uzorku na CyFlow® citometru (Partec, GmbH, Münster, Nemačka) koristeći FloMax® softverski program.

3.2.13. Western blot

Relativna ekspresija proteina uključenih u procese reparacije oštećenja DNK, propagacije kroz ćelijski ciklus i ćelijske smrti je analizirana Western blot metodom. Ćelije gustine 5×10^5 su zasejane u posude za gajenje, a zatim su pretretirani rastvorima DMSO (100 i 500 mM) i jednokratno ozračeni dozom od 3 Gy γ -zracima, protonima ili jonima ugljenika. Ćelije su posle zračenja inkubirane 0.5, 6, 24 i 48 h kako bi se ispratila dinamika ćelijskog odgovora na zračenje. Nakon perioda inkubacije, ćelije su tripsinizovane, centrifugirane tokom 3 min na 2000 rpm i isprane u hladnom rastvoru PBS. Uzorci su potom lizirani u RIPA puferu na ledu narednih 30 minuta. Lizati su centrifugirani na 12000 rpm tokom 20 minuta na 4° C, nakon čega je supernatant sa ćelijskim proteinima izdvojen i zamrznut na -20° C.

3.2.13.1 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana po Lorijevoj metodi (Lowry i sar. 1951), koja se bazira na sposobnosti jona bakra da vezuju proteine u alkalnoj sredini. Kompleks bakra i proteina reaguje sa Folin-Ciocalteu reagensom (rastvorom fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) i kao rezultat reakcije nastaje plavo obojen rastvor.

Ćelijski lizati zapremine 20 μ l su 10 puta razblaženi u dH₂O i pomešani je sa 300 μ l rastvora 2% Na₂CO₃ u 0.1 M NaOH, 1% CuSO₄ × 5 H₂O i 2% K-Na-tartarata u dH₂O, napravljenog u razmeri 98:1:1. Posle inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodato 60 μ l Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u dH₂O. Narednih 30 minuta, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi do razvijanja boje. Intenzitet boje je određen merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 670 nm na ELISA čitaču (Walac, Victor2, Turku, Finska). Za određivanje koncentracije proteina korišćena je standardna kriva rastućih koncentracija rastvora BSA u dH₂O, u rasponu od 0.1 mg/ml do 1 mg/ml. Koncentracija proteina u uzorcima je izražena u μ g/ml.

3.2.13.2 Elektroforeza

Pre nanošenja na poliakrilamidne gelove, uzorci koji sadrže 30 µg/ml proteina su pomešani sa standardnim puferom za elektroforezu (u razmeri 1:1) i potom skuvani na 100° C, kako bi se proteini denaturisali i ratzdvojili na pojedinačne polipeptide (Laemli 1970).

Za elektroforezu je korišćen Na⁺-dodecil sulfat-poliakrilamidni gel (eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) i sistem za elektroforezu Mini/PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Sjedinjene Američke Države). Uzorci su nanošeni na poliakrilamidne gelove, čiji je gornji sloj bio 5% gel, dok je koncentracija donjeg gela, gde dolazi do razdvajanja proteina, bila 8 ili 12%. Na gel su pored uzoraka nanošeni i proteinski markeri, koji su poslužili kao indikatori ravnomernog razdvajanje proteina po molekulskim masama (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvanija). Elektroforeza se odvijala pri konstantnoj voltaži od 100 mV tokom 120 minuta u puferu za elektroforezu.

3.2.13.3 Transfer proteina sa gela na membranu

Nakon elektroforeze, proteini su sa gela prebačeni na Imobilon-P PVDF membranu (Millipore, Bedford, Sjedinjene Američke Države). Gelovi su izvađeni iz sistema za elektroforezu, potopljeni u dH₂O i zatim prebačeni u pufer za transfer. Za to vreme, membrana je aktivirana u dH₂O i metanolu tokom 1.5 minuta. Korišćen je Trans Blott Cell (Bio-Rad Inc., Hercules, Sjedinjene Američke Države) sistem za mokri transfer. Kod proteina molekulske mase do 120 kDa, transfer je trajao 90 minuta na sobnoj temperaturi i korišćen je standardni pufer za transfer. Kod proteina veće molekulske mase, transfer je trajao preko noći u hladnom puferu koji je sadržao 0.05% SDS. Radi provere uspešnosti transfera proteina, membrane su bojene rastvorom 5% Ponceau S u sirćetnoj kiselini, koji boji proteinske trake u svetlo crveno. Membrane su isprane od viška boje u TBST i inkubirane sa rastvorima antitela na način na koji je dalje opisan.

3.2.13.4 Inkubacija sa antitelima i detekcija proteina

Mesta nespecifičnog vezivanja antitela na membrani blokirana su rastvorom 5% BSA-TBST, odnosno 5% mlekom u prahu rastvorenim u TBST, tokom jednog sata na sobnoj temperaturi. Zatim su membrane inkubirane sa primarnim antitelima rastvorenim u 2.5% BSA-TBST, tj. mleku u TBST, preko noći na 4° C. Posle inkubacije, višak primarnog antitela uklonjen je ispiranjem u TBST. Membrane su potom inkubirane rastvorom sekundarnih antitela u razmeri 1:5000, u 2.5% BSA ili mleku u TBST, na sobnoj temperaturi tokom dva sata. Sekundarna antitela konjugovana sa HRP su, u zavisnosti od tipa primarnog antitela, odabrana tako da se specifično vezuju za IgG miša ili zeca. Višak sekundarnog antitela je uklonjen ispiranjem u TBST, najmanje tri puta tokom 30 minuta.

Proteini na membrani su detektovani pomoću ECL supstrata za hemiluminiscenciju (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Nanošenjem rastvora na membranu, supstrat reaguje sa HRP u prisustvu vodonik peroksida, usled čega nastaje hemiluminiscentni signal koji ostavlja otisak na autoradiografskom filmu (AGFA, Medical X-ray film, Belgija). Intenzitet proteinskih traka sa filmova je određen denziometrijom u ImageJ softverskom program. Dobijene vrednosti su prvo normalizovane u odnosu na odgovarajući β -aktin, a zatim i u odnosu na netretirani kontrolni uzorak.

3.2.14 Statistička analiza podataka

Rezultati su prikupljeni iz tri nezavisna eksperimenta i predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SEM (eng. *standard error of the mean*, SEM). Studentov t-test je korišćen za određivanje značajnosti između eksperimentalnih grupa, gde je vrednost $p < 0.05$ smatrana statistički značajnom. Za računanje statističke značajnosti korišćen je program OriginPro (OriginLab, Northampton, Sjedinjene Američke Države).

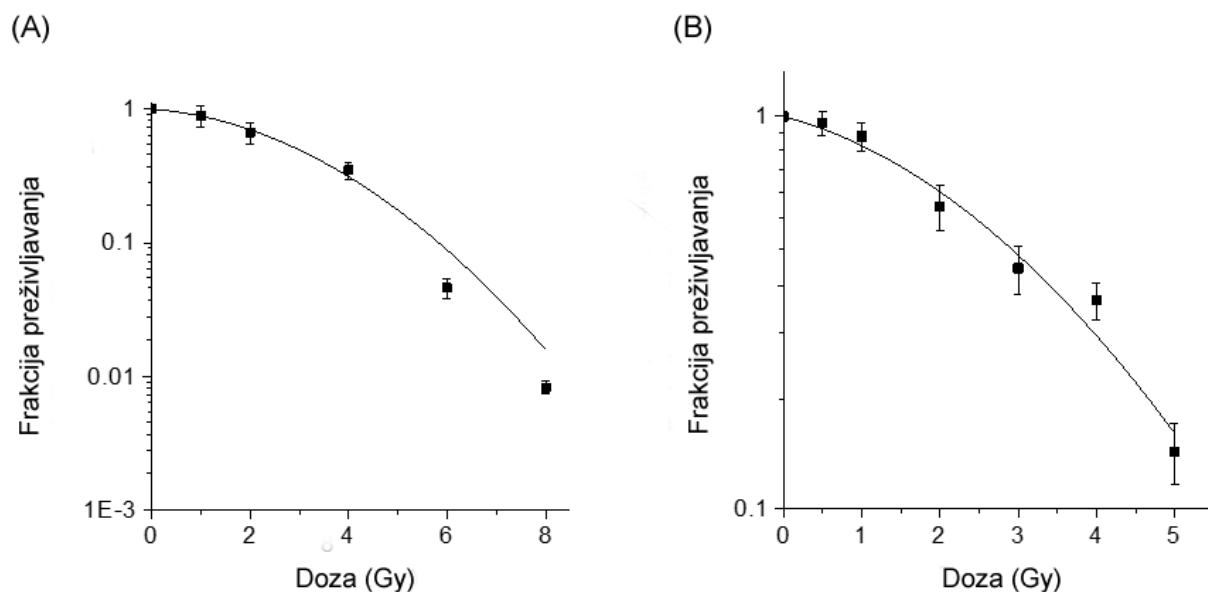
4. REZULTATI

4.2. Efekti nisko jonizujućeg zračenja: ^{60}Co γ -zraci

4.2.1. Radioosetljivost MCF-7 i HTB177 ćelija nakon γ -zračenja

Analiza kolonogenog preživljavanja nakon ozračivanja MCF-7 i HTB177 ćelija γ -zracima kao referentnim zračenjem, poslužila je za određivanje nivoa njihove radioosetljivosti. Ćelijska radioosetljivost je praćena preko SF2 parametra, koji predstavlja frakciju preživelih ćelija pri dozi zraćenja od 2 Gy. Pored SF2, definisana je vrednost D_{10} , odnosno doza zraćenja koja smanjuje ćelijsko preživljavanje na 10%.

Najbolje fitovane krive preživljavanja prikazane su na Slici 9, dok su odgovarajući radiobiološki podaci i parametri fitovanja dati u Tabeli 1. Rezultati merenja pokazuju da MCF-7 i HTB177 ćelije imaju visok nivo preživljavanja pri dozama do 2 Gy, dok se smanjenje klonogenog potencijala uoćava nakon zraćenja dozama većim od 3 Gy (Slike 9A i B). Vrednosti SF2 su kod MCF-7 ćelija bile 0.67 ± 0.12 , a kod HTB177 ćelija 0.64 ± 0.09 (Tabela 1), što ukazuje na radiorezistentost ispitivanih ćelijskih linija. Sličan nivo radioosetljivostii se uoćava kada se uporede D_{10} vrednosti. Tako je kod MCF-7 ćelija D_{10} bila 5.82 ± 0.02 Gy, a kod HTB177 ćelija 5.66 ± 0.03 Gy. Parametar fitovanja α , koji definiše linearni deo krive preživljavanja i odgovor ćelija na niže doze, kod MCF-7 ćelija je bio 0.064 ± 0.176 , a kod HTB177 ćelija 0.120 ± 0.048 . Vrednosti β parametra, kojim je definisan kvadratni deo krive, bio je približno jednak u ispitivanim ćelijama. Tako je kod MCF-7 ćelija β parametar iznosio 0.057 ± 0.081 , a kod HTB177 ćelija 0.050 ± 0.016 . Male razlike u parametrima fitovanja između MCF-7 i HTB177 ćelija pokazuju da su ove ćelije podjednako osetljive na γ -zraćenje (Tabela 1). Preciznost fitovanja krivih preživljavanja definisana je kao koeficijent determinacije r^2 i iznosila je 0.995 ± 0.033 kod MCF-7 i 0.984 ± 0.048 kod HTB177 ćelija. Visoke vrednosti r^2 pokazuju da je visoka preciznost fitovanja postignuta podjednako za obe ćelijske linije (Slika 9).



Slika 9. Krive preživljavanja MCF-7 (A) i HTB177 ćelija (B) nakon γ -zračenja. Ćelije su ozračene dozama od 0.5 do 8 Gy i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

Tabela 1. Vrednosti SF2, D_{10} i parametara fitovanja (α i β) sa koeficijentom determinacije (r^2) nakon zračenja γ -zracima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

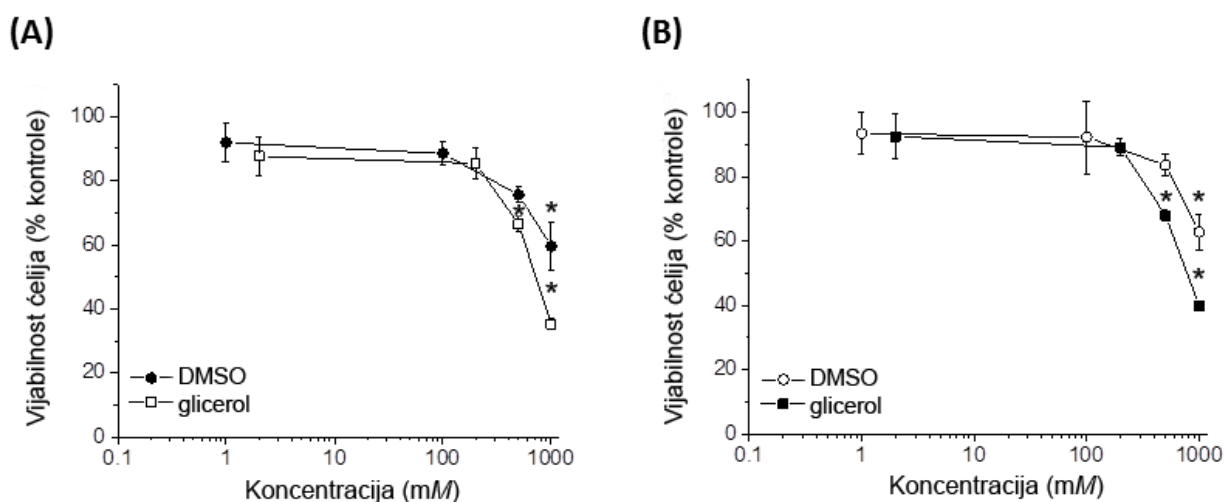
Ćelijska linija	SF2	D_{10}	$\alpha(\text{Gy}^{-1})$	$\beta(\text{Gy}^{-2})$	r^2
MCF-7	0.67 ± 0.12	5.82 ± 0.02	0.064 ± 0.176	0.057 ± 0.081	0.995 ± 0.033
HTB177	0.64 ± 0.09	5.66 ± 0.03	0.120 ± 0.048	0.050 ± 0.016	0.984 ± 0.048

4.2.2 Određivanje koncentracija DMSO i glicerola za pretretman MCF-7 i HTB177 ćelija

Testiranje uticaja DMSO i glicerola na ćelijsku vijabilnost poslužilo je za određivanje koncentracija koje će se primeniti u eksperimentima sa zračenjem. Ćelijska vijabilnost je analizirana pomoću MTT i CV esaja, u prisustvu rastućih koncentracija DMSO i glicerola od 1 do

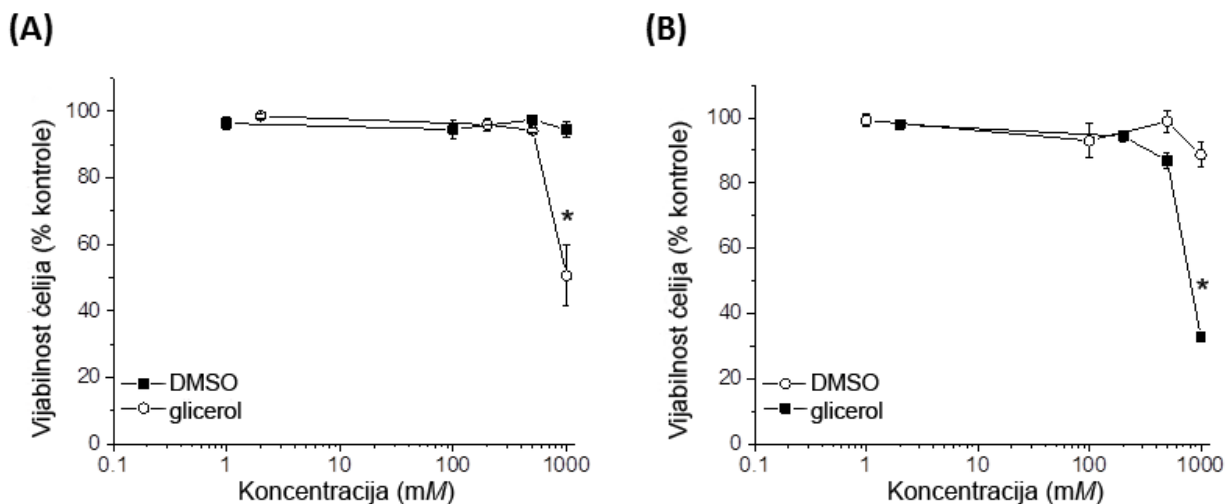
1000 mM. Rezultati dobijeni za MCF-7 ćelije su prikazani na slici 10, dok su vrednosti merenja u HTB177 ćelijama date na slici 11.

Rezultati analize vijabilnosti su pokazali dobro slaganje između MTT i CV testova, kako u MCF-7 (Slika 10A i B), tako i u HTB177 ćelijama (Slika 11A i B). Takođe, uočen je sličan odgovor MCF-7 i HTB177 ćelija na tretman DMSO i glicerolom (Slike 10 i 11). Naime, koncentracije od 1 mM do 500 mM DMSO nisu bile citotoksične u ispitivanim ćelijama, odnosno nisu smanjile vijabilnost u poređenju sa kontrolom. Značajan pad vijabilnosti u MCF-7 ćelijama je zabeležen nakon tretmana 1000 mM DMSO, gde je procenat preživelih ćelija bio oko 60% u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) (Slika 10A i 7B). Glicerol od 2 mM do 200 mM nije delovao citotoksično u MCF-7 i HTB177 ćelijama. Međutim, pri koncentracijama od 500 i 1000 mM je došlo do smanjenja preživaljavanja MCF-7 ćelija na približno 66% i 40% u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) (Slika 10A i 7B). Takođe, u HTB177 ćelijama je 1000 mM glicerol prouzrokovao pad vijabilnosti na približno 40% u odnosu na nivo preživaljavanja u netretiranoj kontroli ($p < 0.05$) (Slika 11A i B). Na osnovu rezultata prikupljenih za obe ćelijske linije, uočava se da tretman 1, 100 i 500 mM DMSO, kao i 2 i 200 mM glicerolom nije ispoljio citotoksično dejstvo. Iz tog razloga, navedene koncentracije su korišćene za pretretman ćelija u eksperimentima sa zračenjem.



Slika 10. Vijabilnost MCF-7 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama DMSO (1, 100, 500, 1000 mM) i glicerola (2, 200, 500, 1000 mM) u trajanju od 1 h, određena pomoću MTT (A) i CV (B) testa. Vijabilnost je određena 96 h nakon tretmana, a dobijene vrednosti su izražene kao

procenat od kontrole. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednosti \pm SEM (standardna greška).
 * $0.01 < p < 0.05$, * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.



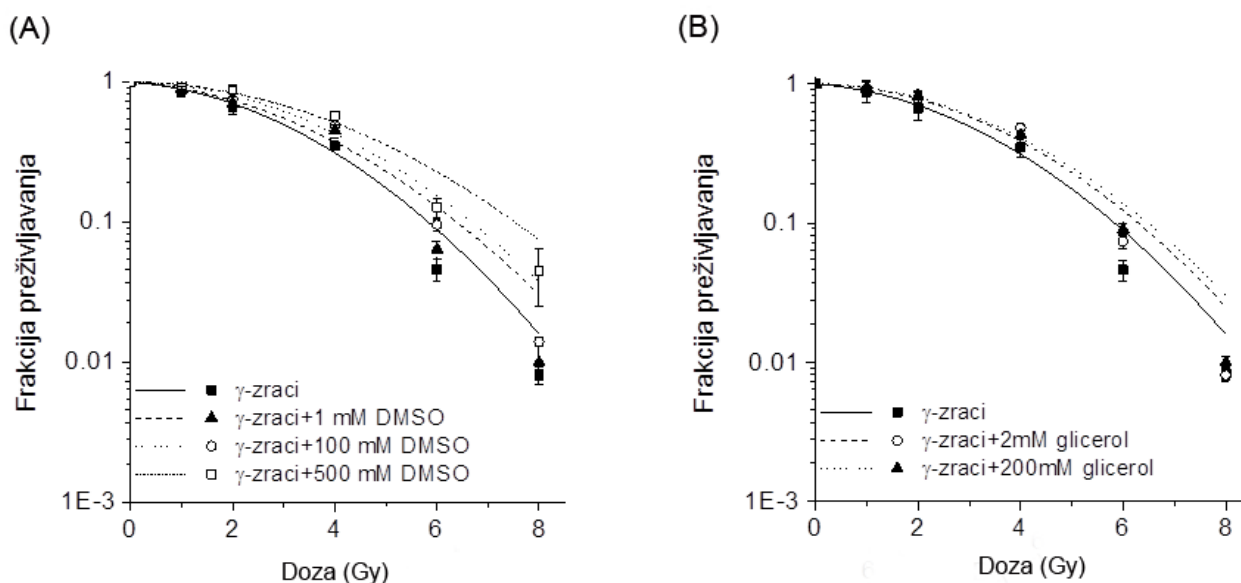
Slika 11. Vijabilnost MCF-7 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama DMSO (1, 100, 500, 1000 mM) i glicerola (2, 200, 500, 1000 mM) u trajanju od 1 h, određena pomoću MTT (A) i CV (B) testa. Vijabilnost je određena 96 h nakon tretmana, a dobijene vrednosti su izražene kao procenat od kontrole. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednosti \pm SEM (standardna greška).
 * $0.01 < p < 0.05$, * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

4.2.1. Efekat pretretmana DMSO i glicerolom na preživljavanje MCF-7 i HTB177 ćelija ozračenih γ -zracima

Nakon analize ćelijske radioosetljivosti, praćeni su efekti γ -zračenja u prisustvu DMSO i glicerola kao sakupljača slobodnih radikala. Odgovor ćelija na kombinovani tretman sakupljačima slobodnih radikala analiziran je pomoću klonogenog preživljavanja. Promene radioosetljivosti ćelija pretretiranih DMSO i glicerolom praćene su pomoću SF2 i D₁₀ parametara.

Krive preživljavanja MCF-7 i HTB177 ćelija pretretiranih DMSO ili glicerolom predstavljene su na slikama 12 i 13, dok su odgovarajući radiobiološki podaci dati u tabelama 2 i

3. Uticaj sakupljača slobodnih radikala na ćelijsko preživljavanje je prikazan u odnosu na efekte samog γ -zračenja. Pretretman DMSO, odnosno glicerolom je kod obe ćelijske linije doveo do povećanja preživljavanja, a samim tim i do porasta radiobioloških parametara SF2 i D_{10} (Slike 12 i 13) (Tabele 2 i 3). U MCF-7 ćelijama, SF2 vrednosti su značajno povećane u prisustvu 100 mM DMSO (0.75 ± 0.07) i 500 mM DMSO (0.84 ± 0.03) u poređenju sa uzorcima koji nisu pretretirani ni jednim od dva sakupljača slobodnih radikala (0.67 ± 0.12) ($p < 0.05$). Porast SF2 u odnosu na samo zračenje (0.67 ± 0.12) zabeležen je u ćelijama tretiranim 2 mM (0.78 ± 0.09) i 200 mM glicerolom (0.82 ± 0.08) ($p < 0.05$) (Tabela 2). Takođe, pretretman rastvorima DMSO i glicerola je doveo do porasta D_{10} parametra u MCF-7 ćelijama. Izmerene D_{10} vrednosti nakon tretmana 100 mM DMSO (6.67 ± 0.03 Gy), 500 mM DMSO (7.5 ± 0.08) i 200 mM glicerolom (6.47 ± 0.04 Gy) su bile značajno veće u odnosu na vrednosti nakon samog zračenja (5.82 ± 0.02 Gy) ($p < 0.01$). Pretretman 1 mM DMSO i 2 mM glicerolom je neznatno podigao vrednosti radiobioloških parametara u poređenju sa samim zračenjem (Tabela 2).



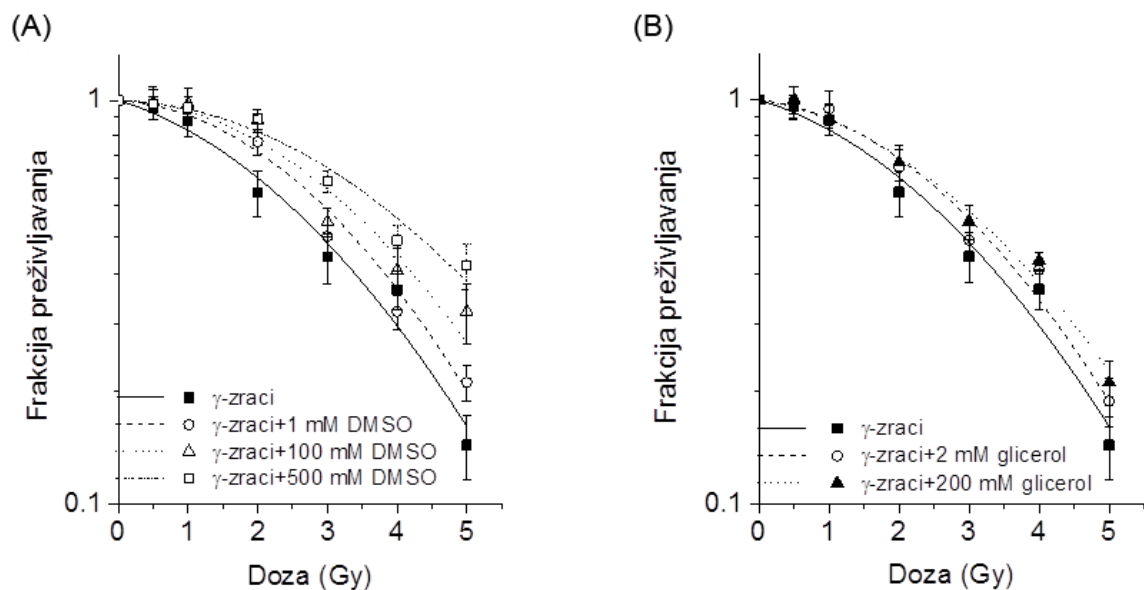
Slika 12. Krive preživljavanja MCF-7 ćelija nakon γ -zračenja i pretretmana 1, 100 i 500 mM DMSO (A), odnosno 2 i 200 mM glicerolom (B). Ćelije su zračene dozama od 1, 2, 4, 6 i 8 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

Tabela 2. Radiobiološki parametri (SF2 i D₁₀) MCF-7 ćelija nakon zračenja γ -zracima, sa ili bez pretretmana DMSO i glicerolom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

MCF-7	γ -zraci	γ -zraci +1 mM DMSO	γ -zraci+100 mM DMSO	γ -zraci+500 mM DMSO	γ -zraci+2 mM glicerol	γ -zraci+200 mM glicerol
SF2	0.67 \pm 0.12	0.70 \pm 0.08	0.75 \pm 0.07*	0.84 \pm 0.03*	0.78 \pm 0.09*	0.82 \pm 0.08*
D ₁₀ (Gy)	5.82 \pm 0.02	6.39 \pm 0.04	6.67 \pm 0.03**	7.5 \pm 0.08**	6.28 \pm 0.05	6.47 \pm 0.04**

* 0.01 < p < 0.05; ** 0.001 < p < 0.01. * – statistička značajnost između efekata kombinovanog tretmana u odnosu na efekat samog zračenja.

HTB177 ćelije su odgovorile na kombinovani tretman sakupljačima slobodnih radikala slično kao MCF-7 ćelije (Slika 13, Tabela 3). Vrednosti SF2 u HTB177 ćelijama nakon pretretmana 100 mM (0.79 \pm 0.15) i 500 mM DMSO (0.87 \pm 0.04) su bile povećane u poređenju sa ćelijama koje su samo ozračene (0.64 \pm 0.09) (p<0.05). Kada se posmatra D₁₀ parametar, uočava se da kombinovani tretman 100 mM DMSO (6.48 \pm 0.02), odnosno 500 mM DMSO (7.43 \pm 0.09) dovodi do statistički značajnog porasta njegovih vrednosti u odnosu na zračenje (5.66 \pm 0.03 Gy) (p<0.05). Pretretman glicerolom je izazvao povećanje SF2 vrednosti u HTB177 ćelijama u odnosu na samo zračenje, ali ova promena nije bila statistički značajna. Porast D₁₀ parametra u HTB177 ćelijama je uočena nakon pretretmana 200 mM (6.23 \pm 0.07) glicerolom u odnosu na samo zračenje (5.66 \pm 0.03 Gy) (p<0.05) (Slika 13, Tabela 3). Povećanje radiobioloških parametara ukazuje na porast radiorezistentnosti ćelija u prisustvu sakupljača slobodnih radikala.



Slika 13. Krive preživljavanja HTB177 ćelija nakon γ -zračenja i pretretmana 1, 100 i 500 mM DMSO (A), odnosno 2 i 200 mM glicerolom (B). Ćelije su zračene dozama od 0.5, 1, 2, 3, 4 i 5 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

Tabela 3. Radiobiološki parametri (SF2 i D₁₀) HTB177 ćelija nakon zračenja γ -zracima, sa ili bez pretretmana DMSO i glicerolom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

HTB177	γ -zraci	γ -zraci+1 mM DMSO	γ -zraci+100 mM DMSO	γ -zraci+500 mM DMSO	γ -zraci+2 mM glicerol	γ -zraci+200 mM glicerol
SF2	0.64 \pm 0.09	0.74 \pm 0.12	0.79 \pm 0.15*	0.87 \pm 0.04*	0.71 \pm 0.09	0.72 \pm 0.06
D ₁₀ (Gy)	5.66 \pm 0.03	5.92 \pm 0.04	6.48 \pm 0.02*	7.43 \pm 0.09*	5.83 \pm 0.08	6.23 \pm 0.07*

* 0.01 < p < 0.05; * – statistička značajnost između efekata kombinovanog tretmana u odnosu na efekat samog zračenja.

4.2.2. Stepen zaštite ostvaren primenom DMSO i glicerola u MCF-7 i HTB177 ćelijama

Kako bi se ispitala efikasnost sakupljača slobodnih radikala u ćelijama nakon zračenja, određen je stepen zaštite DMSO i glicerola (eng. *degree of protection*, DP). Stepen zaštite je preračunat na osnovu frakcije ćelijskog preživljavanja na dozi od 2 Gy, u prisustvu/odsustvu DMSO ili glicerola.

Rezultati su pokazali da DMSO i glicerol dovode do povećanja DP, kao što je prikazano u Tabeli 3. Sa porastom koncentracija sakupljača slobodnih radikala dolazi do postepenog povećanja DP vrednosti. Tako je u MCF-7 ćelijama pretretman DMSO imao najveću DP pri koncentraciji od 500 mM (0.52 ± 0.09) u poređenju sa 100 mM (0.28 ± 0.01) i 1 mM (0.11 ± 0.01) DMSO. Sličan trend je primećen u HTB177 ćelijama, gde je najviša vrednost DP izmerena u prisustvu 500 mM DMSO (0.65 ± 0.06), dok su niže vrednosti dobijene za 100 mM (0.47 ± 0.02) i 1 mM (0.32 ± 0.01) DMSO. Pretretman glicerolom je u MCF-7 ćelijama doveo do porasta DP vrednosti, pri čemu je koncentracija od 200 mM (0.50 ± 0.05) efikasnije zaštitila ćelije u poređenju sa 2 mM (0.38 ± 0.04). Za razliku od MCF-7 ćelija, u HTB177 ćelijama nije uočeno dozno-zavisno povećanje DP, pa su slične vrednosti dobijene za 2 mM (0.23 ± 0.04) i 200 mM (0.26 ± 0.04) glicerol (Tabela 3).

Tabela 4. Stepen zaštite (DP) kod MCF-7 i HTB177 ćelija pretretiranih sa DMSO (1, 100 i 500 mM) i glicerolom (2, 200 mM) ozračenih γ -zracima sa referentnom dozom od 2 Gy.

Ćelijske linije	DP (DMSO)			DP (glicerol)	
	1 mM	100 mM	500 mM	2 mM	200 mM
MCF-7	0.11 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.52 ± 0.09	0.38 ± 0.04	0.50 ± 0.05
HTB177	0.32 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.65 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.26 ± 0.04

4.2.3. Određivanje udela direktnih efekata γ -zračenja

Na osnovu rezultata analize DP u ispitivanim ćelijskim linijama, uočava se da DMSO pokazuje bolji protektivni efekat u poređenju sa glicerolom. Iz tog razloga je DMSO odabran kao sakupljač slobodnih radikala za procenu udela direktnih efekata zračenja u MCF-7 i HTB177 ćelijama. Za određivanje udela direktnih efekata, korišćen je proračun koji je definisan u literaturi (Shinohara i sar. 1996; Hirayama i sar. 2009; Ito i sar. 2006).

Za preračunavanje udela direktnih efekata zračenja uzete su u obzir vrednosti dobijene nakon zračenja dozama od 1-4 Gy. Preračunavanje vrednosti $1/DP_{max}$ poslužilo je za određivanje udela direktnih i indirektnih efekata γ -zračenja kod MCF-7 i HTB177 ćelija, prikazane u Tabeli 4. Na osnovu rezultata se vidi da je udeo direktnih efekata γ -zračenja, od 35-37%, skoro podjednako zastupljen dvema ćelijskim linijama. Udeo indirektnih efekata je bio znatno viši i iznosio je od 63-65% u obe ćelijske linije (Tabela 4).

Tabela 5. Vrednosti $1/DP_{max}$, udela direktnih efekata i indirektnih efekata zračenja u MCF-7 i HTB177 ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

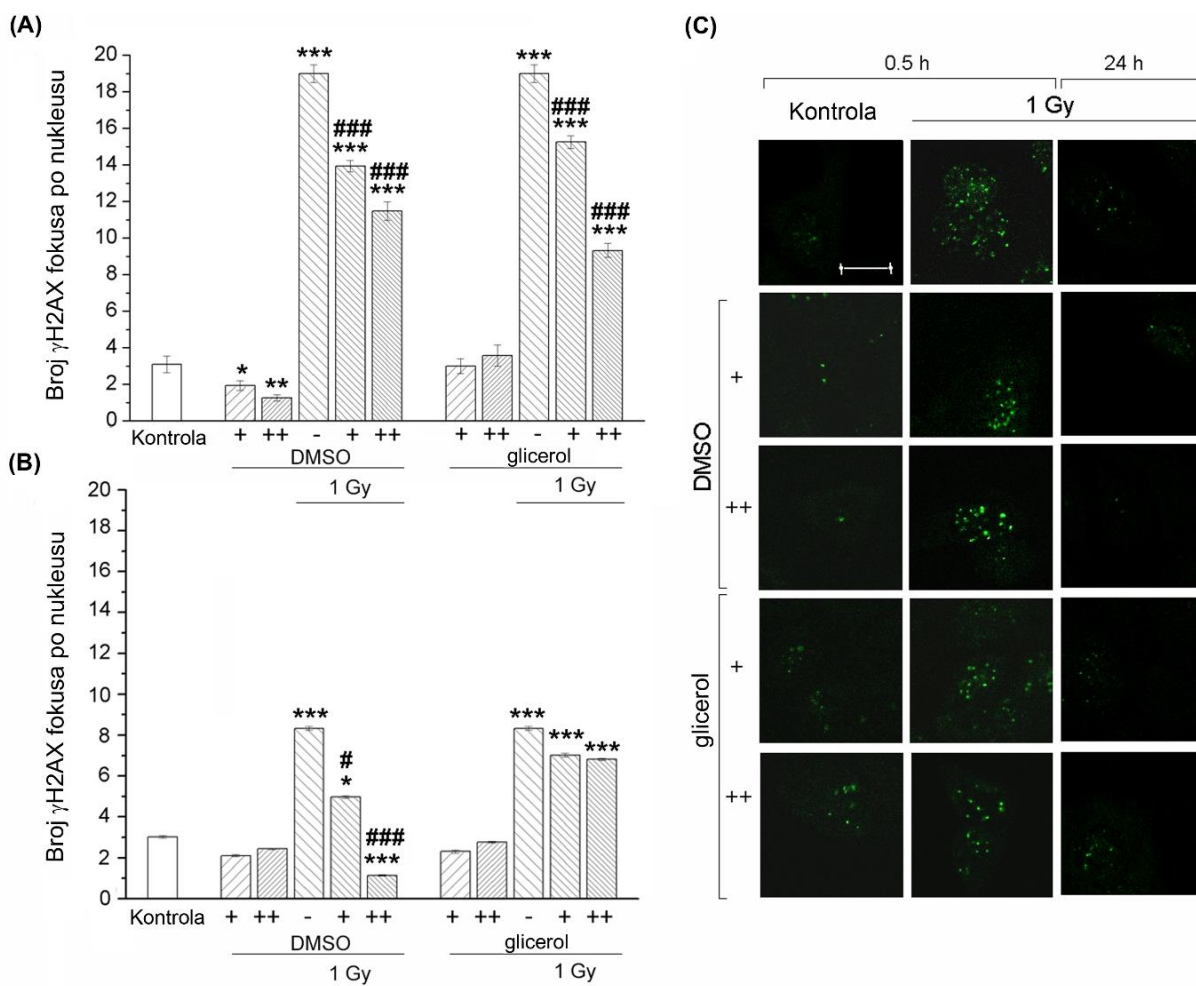
γ -zračenje	$1/DP_{max}$	Direktni efekti (%)	Indirektni efekti (%)
MCF-7	1.58 ± 0.15	37 ± 6	63 ± 6
HTB177	1.53 ± 0.17	35 ± 7	65 ± 7

4.2.4. Analiza dvolančanih DNK oštećenja nakon γ -zračenja

Uticaj γ -zračenja na formiranje dvolančanih DNK prekida praćen je putem γ H2AX eseja. Nastanak DNK oštećenja, kao i njihovo uklanjanje u procesu DNK reparacije posmatrano je 0.5 h i 24 h nakon zračenja dozom od 1 Gy. U cilju poređenja efekata sakupljača slobodnih radikala, ćelije su pretretirane 1 i 100 mM DMSO, kao i 2 i 200 mM glicerolom. Promene broja γ H2AX

fokusa u odsustvu/prisustvu DMSO ili glicerola u MCF-7 ćelijama su dati na Slici 14, dok su rezultati merenja u HTB177 ćelijama prikazani na Slici 15.

Zračenje je u MCF-7 ćelijama dovelo do značajnog porasta γ H2AX fokusa u poređenju sa neozračenom kontrolom već nakon 0.5 h ($p < 0.001$). U istoj vremenskoj tački, pretretman DMSO ili glicerolom je smanjio broj γ H2AX u odnosu na samo zračenje ($p < 0.001$) (Slika 14A). Visok nivo γ H2AX se zadržao nakon 24 h od ozračivanja u poređenju sa referentnom kontrolom ($p < 0.001$). Sakupljači slobodnih radikala su delovali protektivno, posebno u ćelijama pretretiranim 1mM DMSO ($p < 0.05$) i 100 mM DMSO ($p < 0.001$) u poređenju sa ćelijama koje su samo ozračene (Slika 14B).

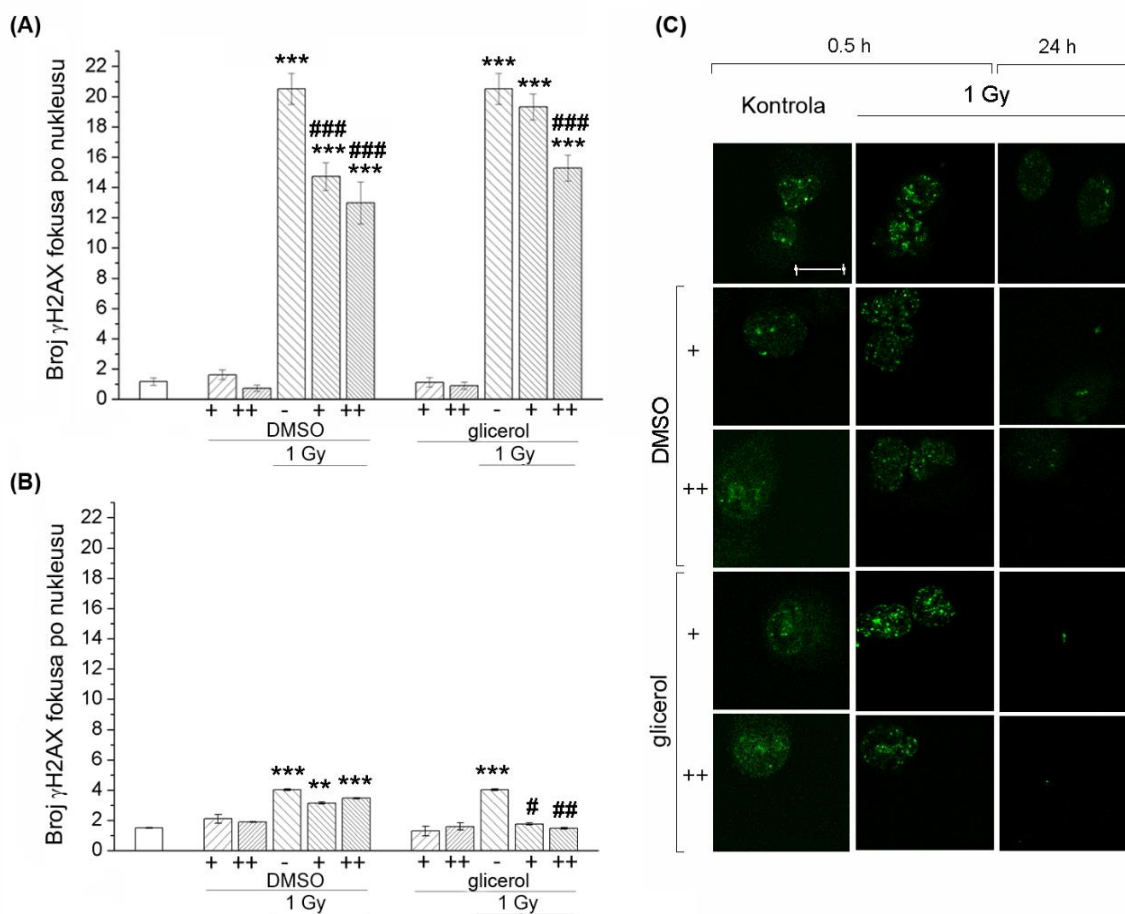


Slika 14. Imunocitohemijska analiza γ H2AX fokusa u MCF-7 ćelijama ozračenim γ -zracima. Formiranje fluorescentnog signala je praćeno 0.5 h (A) i 24 h (B) nakon zračenja dozom od 1 Gy. Pretretman 1 mM (+), 100 mM (++) DMSO ili 2 mM (+), 200 mM (++) glicerolom je obavljen 1

h pre zračenja. Reprezentativne mikrografije (C) su dobijene pomoću laserskog konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP5 II. Uveličanje: 63x. Bar: 20 μ m. Rezutat je prikazan kao prosečan boj fokusa \pm SEM. *, # 0.01 < p < 0.05; **, ## 0.001 < p < 0.01; ***, ### p < 0.001. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost u odnosu na samo zračenje.

Slično kao u MCF-7 ćelijama, γ -zračenje je u HTB177 ćelijama povećalo broj γ H2AX posle 0.5 h u poređenju sa neozračenom kontrolom (p<0.001). Pretretman DMSO ili glicerolom je delovao protektivno tako što je smanjio broj fokusa u odnosu na samo zračenje (p<0.001) (Slika 15A). Nakon inkubacionog perioda od 24 h, vrednosti γ H2AX su bile značajno više u ćelijama koje su ozračene u odnosu na kontrolu (p<0.001) (Slika 15B). U ovoj vremenskoj tački, u poređenju sa ćelijama koje su samo ozračene, zapaža se smanjenje broja fokusa nakon primene 2 mM glicerol-a (p < 0.05) i 200 mM glicerol-a (p < 0.001) (Slika 15B).

Po morfologiji, γ H2AX fokusi su nakon primenjenih tretmana bili relativno sitni i pojedinačni u MCF-7 i HTB177 ćelijama. Vreme inkubacije, kao i pretretman rastvorima DMSO i glicerola nisu uticali na promenu morfologije fokusa u ćelijama, već samo na njihovu brojčanu zastupljenost (Slike 14 i 15).

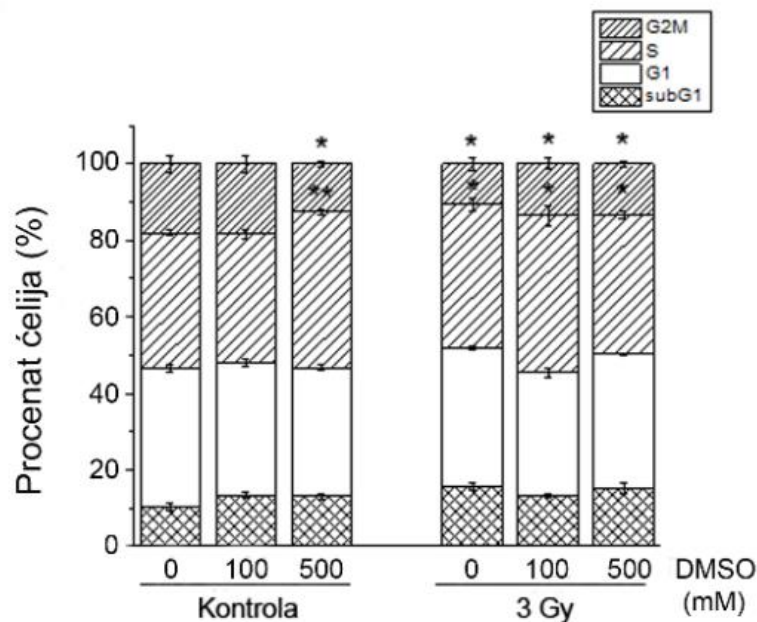


Slika 15. Imunocitohemijska analiza γ H2AX fokusa u HTB177 ćelijama ozračenim γ -zracima. Formiranje fluorescentnog signala je praćeno 0.5 h (A) i 24 h (B) nakon zračenja dozom od 1 Gy. Pretretman 1 mM (+), 100 mM (++) DMSO ili 2 mM (+), 200 mM (++) glicerolom je obavljen 1 h pre zračenja. Reprezentativne mikrografije (C) su dobijene pomoću laserskog konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP5 II. Uveličanje: 63x. Bar: 20 μ m. Rezultat je prikazan kao prosečan broj fokusa \pm SEM. *, # 0.01 < p < 0.05; **, ## 0.001 < p < 0.01; ***, ### p < 0.001. * – značajnost u odnosu na kontrolu; # – značajnost u odnosu na samo zračenje.

4.2.5. Uticaj γ -zračenja na ćelijski ciklus i ekspresiju proteina uključenih u njegovu regulaciju

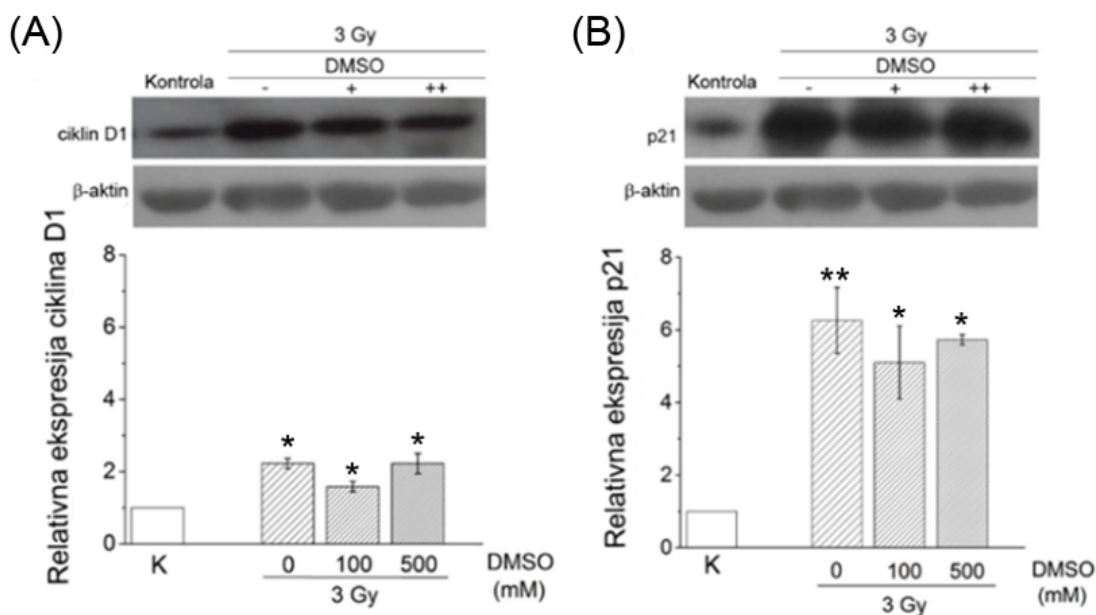
Analiza ćelijskog ciklusa poslužila je za praćenje promena izazvanih prethodno definisanim tretmanima. Uzorci su analizirani 48 h nakon zračenja dozom od 3 Gy, koja je odabrana na osnovu rezultata ćelijskog preživljavanja. Naime, doza zračenja od 3 Gy je smanjila ćelijsku populaciju na približno polovinu od ukupne, pa je frakcija preživljavanja iznosila oko 0.48 u MCF-7 ćelijama i oko 0.44 u HTB177 ćelijama (Slike 10 i 11). Radiobiološki podaci (Tabele 3 i 4) i analiza dvolančanih DNK oštećenja (Slike 14 i 15) su pokazali da DMSO ispoljava povoljnije osobine sakupljač slobodnih radikala u odnosu na glicerol. Na osnovu ovih rezultata i zbog specifičnosti metode, u daljim analizama korišćen je 100 i 500 mM DMSO u kombinaciji sa zračenjem. Pored analize ćelijskog ciklusa praćena je ekspresija p21 i ciklina D1, proteina koji učestvuju u njegovoj regulaciji. Odgovor MCF-7 ćelija na γ -zračenje u prisustvu/odsustvu DMSO je dat na Slikama 16 i 17, dok su efekti zračenja i kombinovanih tretmana u HTB177 ćelijama prikazani na Slikama 18 i 19.

Kako je predstavljeno na slici 16, tretman DMSO dovodi do promena u ćelijskom ciklusu MCF-7 ćelija. U odnosu na netretiranu kontrolu, u prisustvu 100 mM DMSO zabeležen je blagi porast G2/M faze, dok 500 mM DMSO dovodi do povećanja S faze ($p < 0.01$) i smanjenja G2/M faze ($p < 0.05$). Zračenje je izazvalo akumulaciju ćelija u S fazi ($p < 0.05$) i smanjenje G2/M faze ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu, dok kombinovani tretman DMSO nije imao značajnog efekta u poređenju sa zračenjem. Takođe, navedeni tretmani nisu značajno uticali na procentualnu zastupljenost subG1 faze u odnosu na kontrolu (Slika 16).



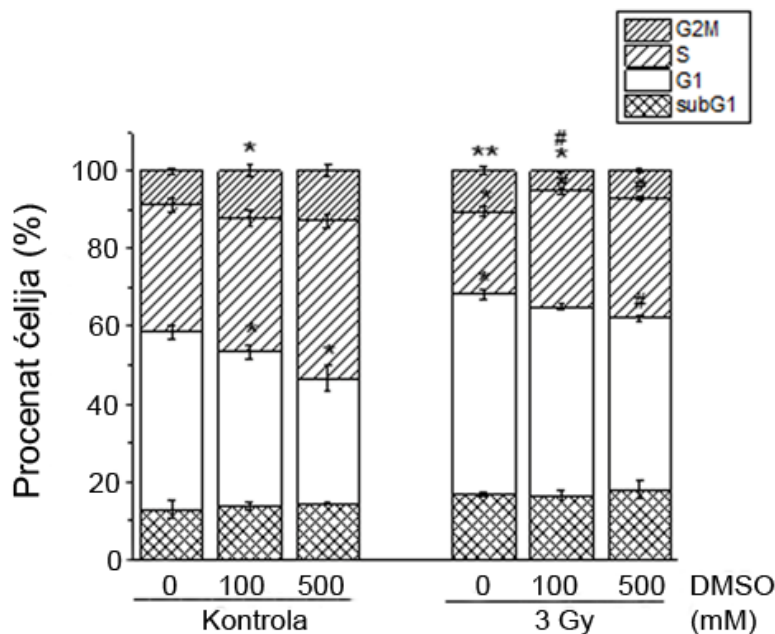
Slika 16. Analiza ćelijskog ciklusa u MCF-7 ćelijama u odsustvu/prisustvu DMSO 48 h nakon zračenja. Ćelije su zračene dozom od 3 Gy, dok su koncentracije DMSO bile 100 mM i 500 mM. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$. * – statistička značajnost u odnosu na netretiranu kontrolu.

Analiza relativne ekspresije ciklina D1 i p21 proteina pokazala je da zračenje dovodi do akumulacije ovih proteina u MCF-7 ćelijama nakon 48 h (Slika 17). Nivo ciklina D1 je bio povećan u svim ispitivanim uzorcima u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$) (Slika 17A). Takođe, porast p21 proteina zabeležen je kako u uzorcima koji su samo ozračeni ($p < 0.01$), tako i nakon kombinovanog tretmana DMSO ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu (Slika 17B).



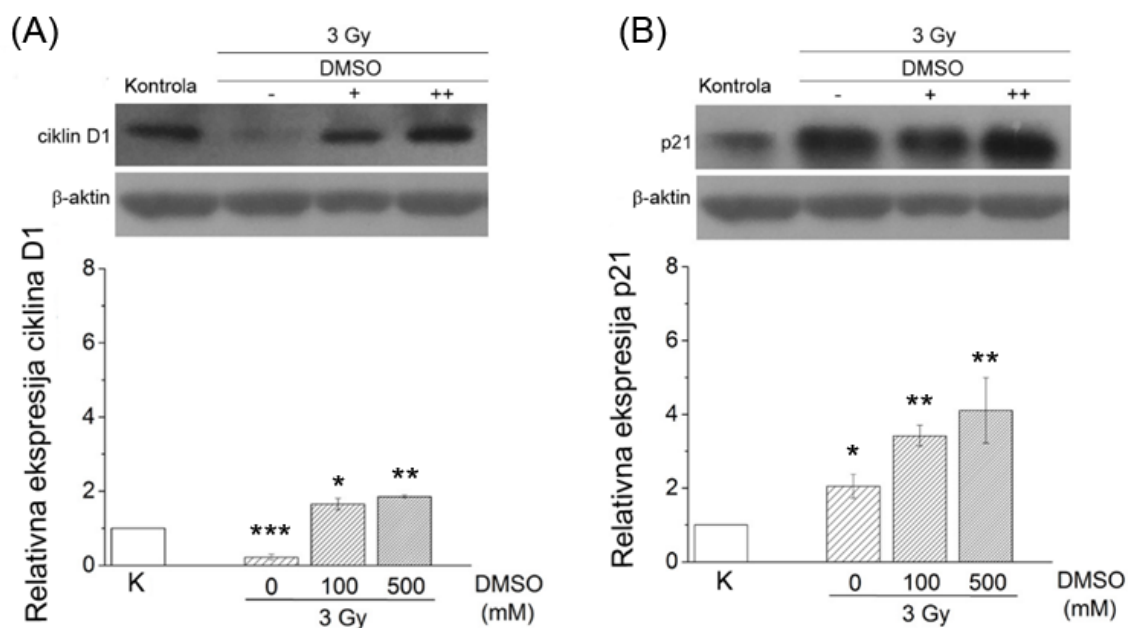
Slika 17. Ekspresije ciklina D1 (A) i p21 (B) proteina u MCF-7 ćelijama 48 h nakon zračenja γ -zracima. Ćelije su ozraĉene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu 100 i 500 mM DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$. * – statistiĉka znaĉajnost u odnosu na kontrolu.

Kod HTB177 ćelija, DMSO je izmenio dinamiku prolaska ćelija kroz ćelijski ciklus u odnosu na netretirane ćelije. U prisustvu 100 mM DMSO, smanjenje broja ćelija u G1 je praćeno njihovom akumulacijom u G2/M fazi ($p < 0.05$), dok 500 mM DMSO dovodi do smanjenja G1 i porasta S faze ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu. U uzorcima koji su ozraĉenim γ -zracima uoĉava se G1 zastoj ($p < 0.05$), pad broja ćelija u S fazi ($p < 0.05$) i njihova akumulacija u G2/M fazi ($p < 0.01$). Kombinovani tretman 100 mM DMSO je doveo do povećanja S i smanjenja G2/M faze ($p < 0.05$), dok je 500 mM DMSO uticao na smanjenje G1 i porast S faze ($p < 0.05$) u odnosu na samo zraĉenje. Nivo subG1 faze se u ispitivanim uzorcima nije znaĉajno menjao u odnosu na kontrolu (Slika 18).



Slika 18. Analiza ćelijskog ciklusa u HTB177 ćelijama u odsustvu/prisustvu DMSO 48 h nakon zračenja. Ćelije su zračene dozom od 3 Gy, dok su koncentracije DMSO bile 100 mM i 500 mM. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. *, # $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost između ozračenih i DMSO-pretretiranih ćelija.

Nakon inkubacionog perioda od 48 h, pad nivoa ciklina D1 ispod kontrolnih vrednosti je uočen u HTB177 ćelijama koje su samo ozračene ($p < 0.001$). Međutim, kombinovani tretman DMSO je značajno podigao nivo ciklina D1 u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) (Slika 19A). Kada se posmatra efekat datih tretmana na ekspresiju p21 proteina, akumulacija proteina u ćelijama se uočava nakon samog zračenja ($p < 0.05$), ali i nakon pretretmana DMSO ($p < 0.01$) u poređenju sa kontrolom (Slika 19B).



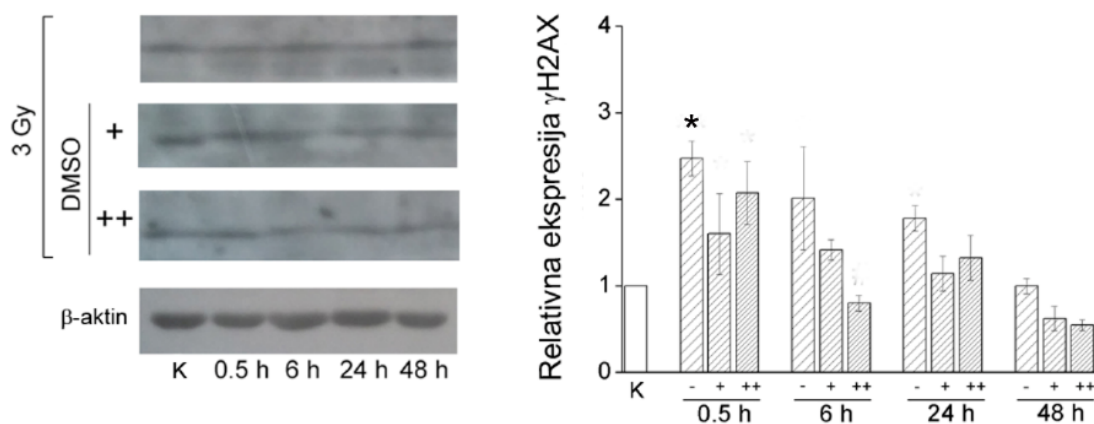
Slika 19. Ekspresije ciklina D1 (A) i p21 (B) proteina u HTB177 ćelijama 48 h nakon zračenja γ -zracima. Ćelije su ozraĉene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu 100 i 500 mM DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$; *** $p < 0.001$. * – statistiĉka znaĉajnost u odnosu na kontrolu.

4.2.6. Analiza ekspresije proteina ukljuĉenih u DNK reparaciju i apoptozu nakon γ -zraĉenja

Kako bi se ispitao uticaj primenjenih tretmana na efikasnost DNK reparacije, pristupilo se analizi relativne ekspresije proteina koji uĉestvuju u odgovoru na DNK oštećenja. Proteini γ H2AX, PARP1 i Rad51 su korišćeni kao markeri DNK prekida i njihove reparacije, dok su za praćenje apoptoze posluĉili pro- i anti-apoptotski proteini Bax i Bcl-2. Ćelije su zraĉene dozom od 3 Gy u prisustvu ili odsustvu 100 mM i 500 mM DMSO. Proteinska ekspresija je posmatrana u vremenskim intervalima od 0.5 h do 48 h nakon zraĉenja.

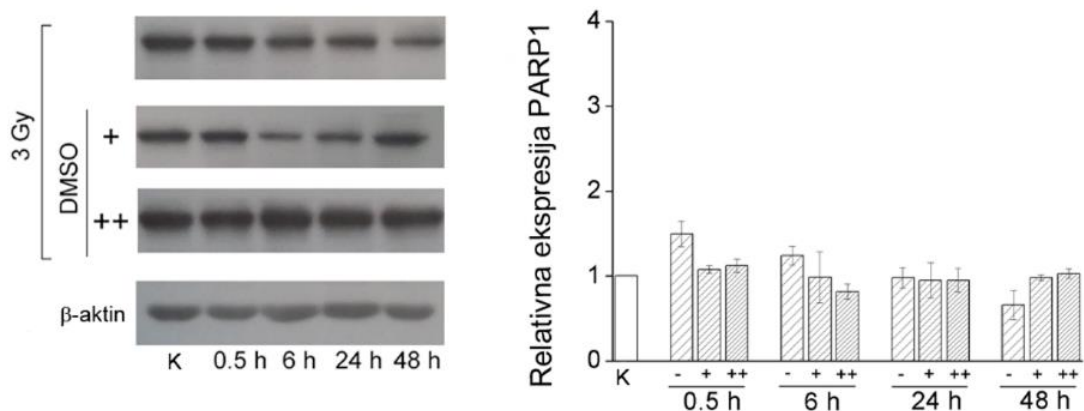
Promena relativne ekspresije γ H2AX proteina u MCF-7 ćelijama prikazana je na Slici 20. Zraĉenje je nakon 0.5 h izazvalo nagli porast nivoa γ H2AX proteina u odnosu na kontrolu

($p < 0.05$). Na dužim vremenskim tačkama ekspresija γ H2AX je bila blago povišena u odnosu na kontrolu, da bi nakon se 48 h vratila na referentne kontrolne vrednosti. Kombinovani tretman DMSO je doveo do sniženja nivoa γ H2AX u odnosu na samo zračenje, ali bez statističke značajnosti (Slika 20).



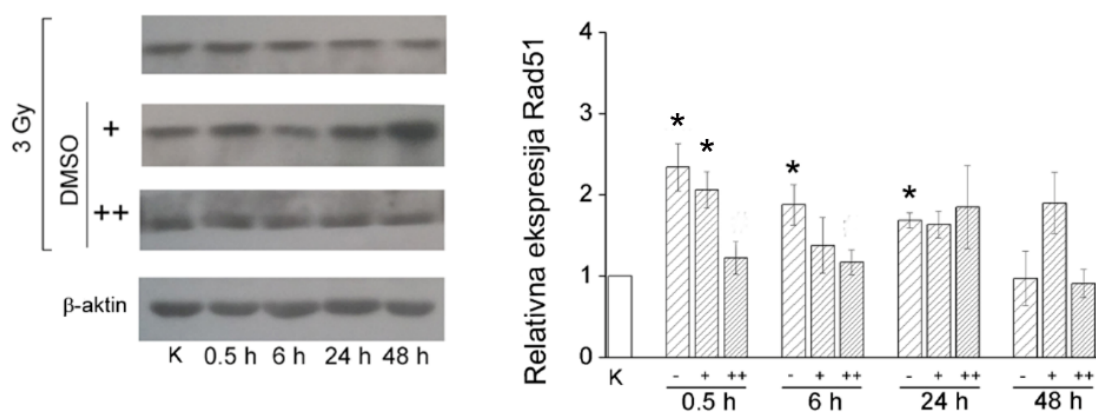
Slika 20. Relativna ekspresija γ H2AX proteina u MCF-7 ćelijama nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. * $0.01 < p < 0.05$; * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

Zračenje nije izazvalo značajne promene nivoa PARP1 proteina u poređenju sa kontrolom. Izuzev blago povećane proteinske ekspresije 0.5 h nakon zračenja, nivo PARP1 se zadržao blizu kontrolnih vrednosti kako u ozračenim, tako i u ćelijama pretretiranim DMSO (Slika 21).



Slika 21. Relativna ekspresija PARP1 proteina u MCF-7 ćelijama nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola.

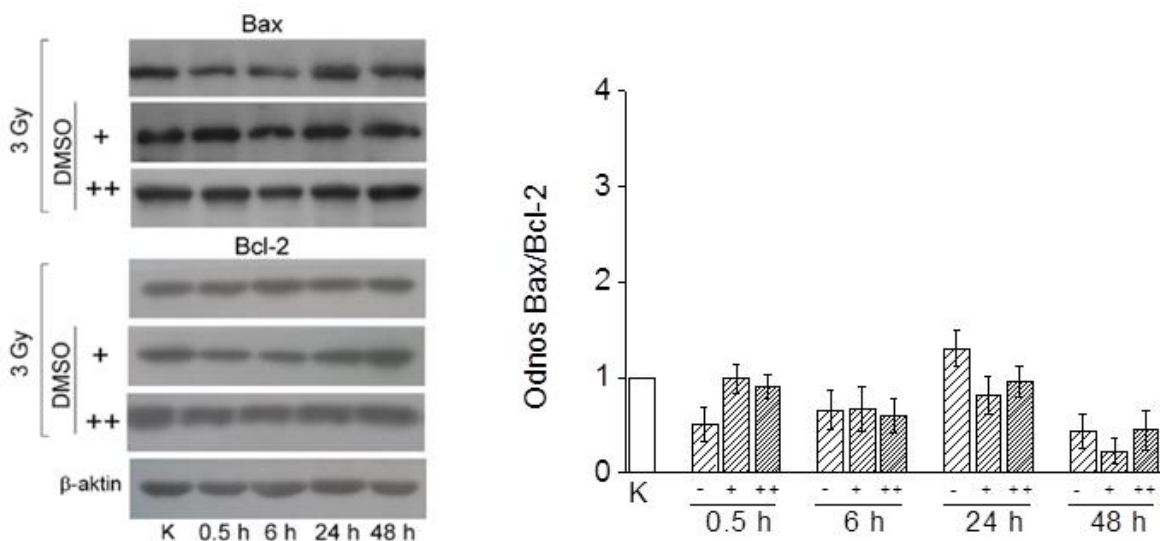
Relativna ekspresija Rad51 proteina u MCF-7 ćelijama bila je povećana 0.5 h, 6 h i 24 h posle zračenja u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Nakon inkubacionog perioda od 48 h, nivo proteina vratio na vrednosti bliske kontoli. Pokazano je da pretretman DMSO smanjio nivo Rad51 proteina u odnosu na zračenje nakon 0.5 h i 6 h, međutim ove promene nisu bile statistički značajne (Slika 22).



Slika 22. Relativna ekspresija Rad51 proteina u MCF-7 nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost

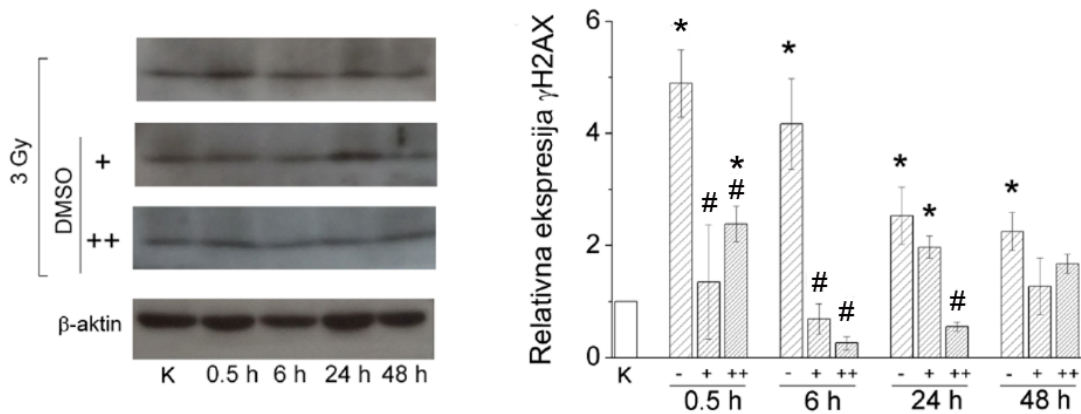
± SEM. β-aktin – interna kontrola. K – kontrola. * 0.01 < p < 0.05; * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

Analiza ekspresije pro- i anti-apoptotskih markera Bax i Bcl-2 pokazala je da γ-zračenje ne pokreće apoptozu u MCF-7 ćelijama. Izuzev blago povišenog nivoa proteina 24 h nakon zračenja, odnos Bax/Bcl-2 se zadržao blizu kontrolnih vrednosti (Slika 23).



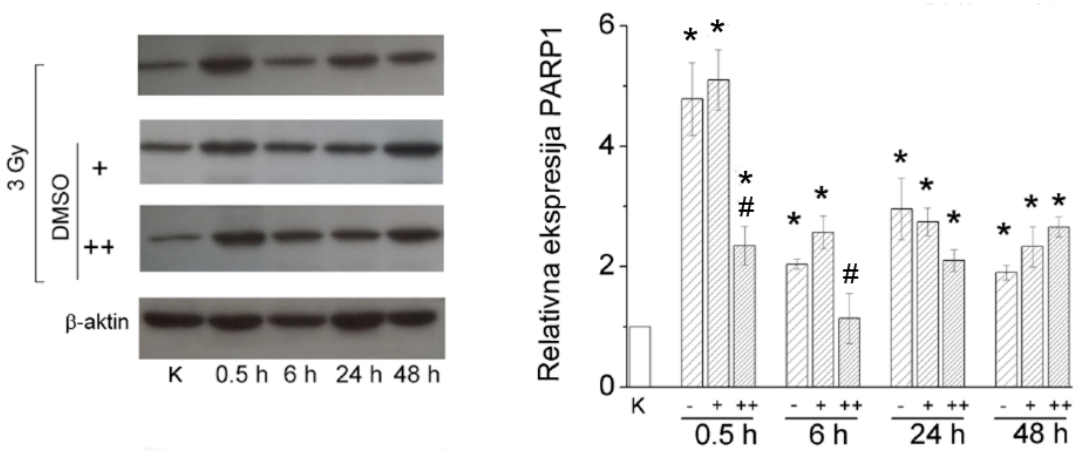
Slika 23. Odnos Bax/Bcl-2 proteina u MCF-7 ćelijama nakon γ-zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. β-aktin – interna kontrola. K – kontrola.

U HTB177 ćelijama, najviši nivo γH2AX proteina je zabeležen 0.5 h nakon zračenja (p<0.05). Na dužim vremenskim tačkama nivo γH2AX se posepeno smanjivao, zadržavajući se tom prilikom iznad kontrolnih vrednosti (p<0.05). Kombinovani tretman DMSO je doveo do sniženja ekspresije γH2AX u odnosu na samo zračenje u vremenskim tačkama od 0.5, 6 i 24 h (p<0.05) (Slika 24).



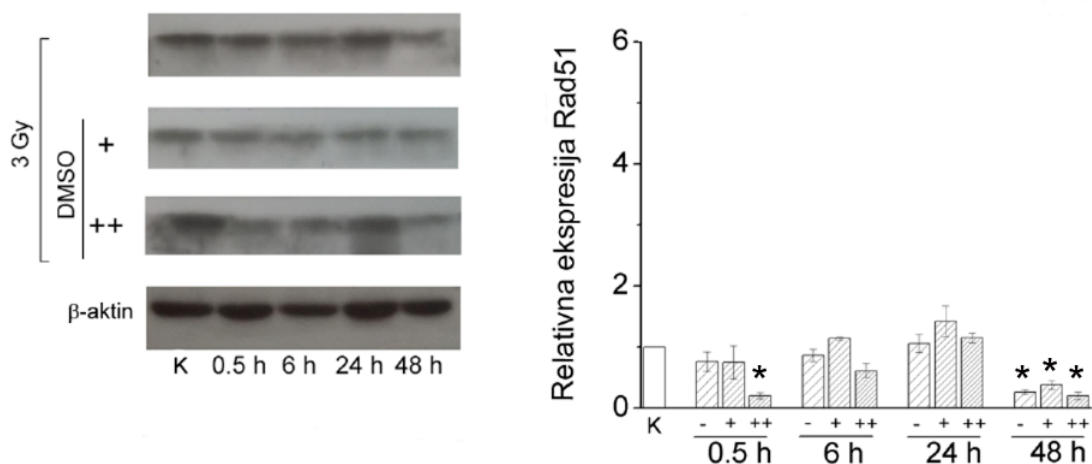
Slika 24. Relativna ekspresija γ H2AX proteina u HTB177 ćelijama nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, # $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu. # – statistička značajnost između zračenja i kombinovanog tretmana DMSO.

Zračenje je kod HTB177 ćelija izazvalo povišenu ekspresiju PARP1 proteina. Najviši nivo PARP1 je izmeren 0.5 h nakon zračenja, dok se povišen nivo proteina zadržao u svim ispitivanim vremenskim tačkama u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Efekat sakupljača slobodnih radikala je bio izražen u prisustvu 500 mM DMSO, koji je nakon 0.5 h i 6 h značajno smanjio ekspresiju PARP1 u odnosu na samo zračenje ($p < 0.05$) (Slika 25).



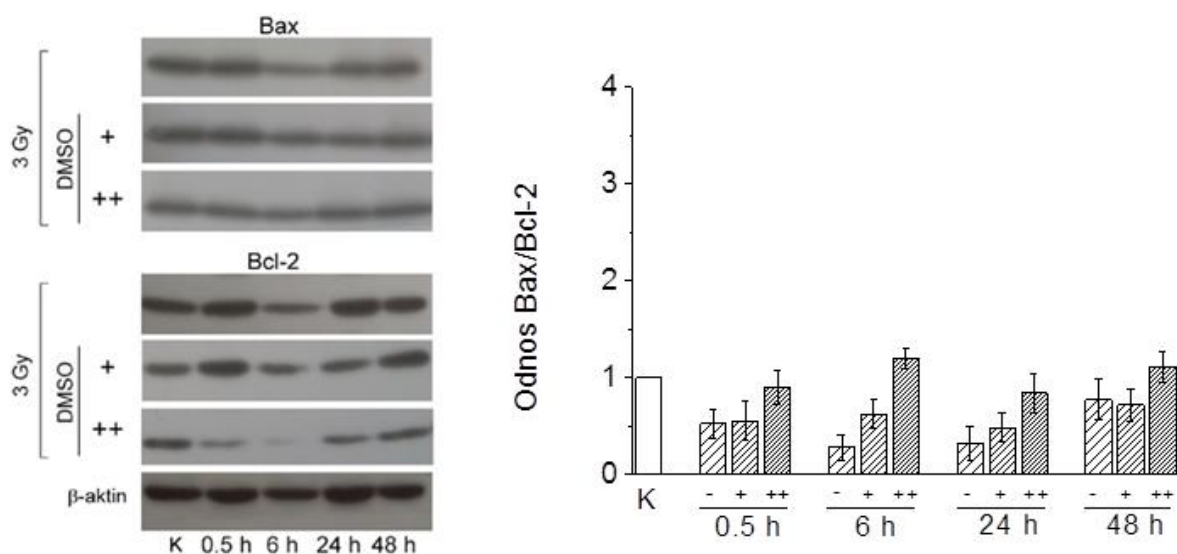
Slika 25. Relativna ekspresija PARP1 proteina u HTB177 ćelijama nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, # 0.01 < p < 0.05. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu. # – statistička značajnost između zračenja i kombinovanog tretmana DMSO.

Ekspresija Rad51 proteina u HTB177 ćelijama se nakon zračenja kretala blizu kontrolnih vrednosti. Smanjenje nivoa Rad51 u odnosu na kontrolu uočeno je nakon inkubacionog perioda od 48 h, kako u uzorcima izloženim zračenju, tako i nakon kombinovanog tretmana DMSO (p<0.05) (Slika 26).



Slika 26. Relativna ekspresija Rad51 proteina u HTB177 ćelijama nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, 0.01 < p < 0.05. * – statistička značajnost između zračenja i pretretirana DMSO.

Analiza ekspresije Bax i Bcl-2 pokazala je da γ -zračenje nije prouzrokovalo povećanje nivoa proteina u poređenju sa kontrolom. Ovakav odgovor HTB177 ćelija je pokazao da zračenje efekta na ćelijsku smrt po tipu apoptoze (Slika 27).



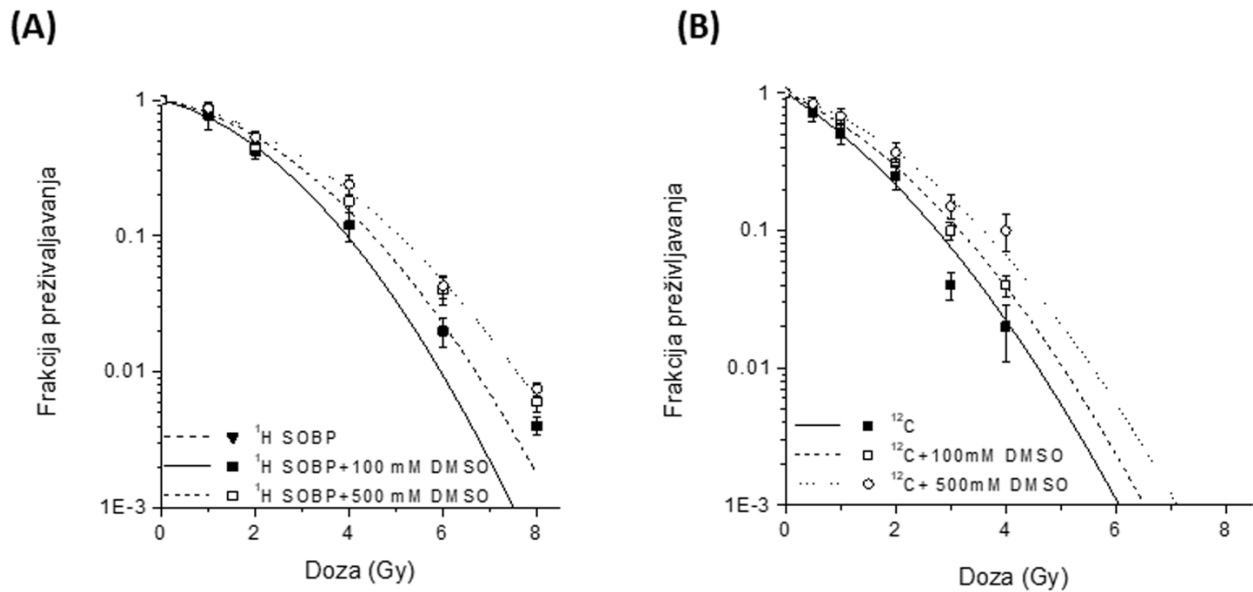
Slika 27. Odnos Bax/Bcl-2 proteina u HTB177 nakon γ -zračenja dozom od 3 Gy. Čelije su pretretirane 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola.

4.3. Efekti visoko jonizujućeg zračenja: protoni i joni ugljenika

4.3.1 Radioosetljivost MCF-7 i HTB177 ćelija nakon zračenja protonima i jonima ugljenika

Analiza klonogenog preživljavanja nakon γ -zračenja pokazala je da MCF-7 i HTB177 ćelije imaju isti nivo radioosetljivosti (Tabela 1). Kako bi se ispitali efekti zračenja protonima i jonima ugljenika, analizirani su rezultati ćelijskog preživljavanja i radiobiološki parametri SF2 i D₁₀. Najbolje fitovane krive preživljavanja su prikazane na Slikama 28 i 29, dok su odgovarajući radiobiološki parametri navedeni u Tabelama 4 i 5. Relativna biološka efektivnost (RBE) je preračunata za SF2 i D₁₀ i poslužila je za procenu efikasnosti zračenja protonima i jonima ugljenika. Takođe, analiziran je uticaj kombinovanog tretmana DMSO i zračenjem sa ciljem praćenja direktnih efekata ovih vrsta zračenja.

U MCF-7 ćelijama, zračenje jonima ugljenika je izazvalo snažniji odgovor u odnosu na protone, što se može videti na osnovu rezultata klonogenog preživljavanja (Slika 28A i B) i odgovarajućih radiobioloških parametara (Tabela 4). Naime, vrednosti SF2 su nakon protonskog zračenja iznosile 0.45 ± 0.05 , dok su znatno niže SF2 vrednosti od 0.21 ± 0.05 dobijene posle zračenja jonima ugljenika ($p < 0.01$). Sličan efekat zračenja je uočen i nakon analize D_{10} parametara, gde su ustanovljene više vrednosti D_{10} dobijene nakon zračenja protonima (3.96 ± 0.2 Gy) u odnosu na jone ugljenika (2.73 ± 0.31 Gy) ($p < 0.05$) (Tabela 4). Analiza RBE_{SF2} i RBE_{D10} je pokazala da su značajno više vrednosti ovih parametara dobijene nakon zračenja jonima ugljenika u poređenju sa protonima ($p < 0.05$). Ovo ukazuje na to da su MCF-7 ćelije senzitivnije na zračenje jonima ugljenika u odnosu na protone (Tabela 4).



Slika 28. Krive preživljavanja MCF-7 ćelija nakon zračenja protonima (A) i jonima ugljenika (B) sa ili bez pretretmana 100 mM i 500 mM DMSO. Ćelije su zračene dozama od 0.5 do 8 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

Pretretman DMSO je doveo do povećanja preživljavanja MCF-7 ćelija nakon zračenja protonima i jonima ugljenika, a time i do smanjenja njihove radioosetljivosti. U uzorcima ozračenim protonima, koncentracije 100 mM i 500 mM DMSO su podjednako efikasno podigle

SF2 i smanjile RBE_{SF2} vrednosti u poređenju sa zračenjem ($p < 0.05$). Takođe, kombinovani tretman DMSO je doveo do porasta D_{10} i smanjenja RBE_{D10} vrednosti u odnosu na samo zračenje ($p < 0.05$). U ćelijama ozračenim jonima ugljenika, snažniji protektivni efekat je ispoljio 500 mM DMSO u odnosu na 100 mM DMSO. Tako je pretretman 500 mM DMSO doveo do povećanja SF2 i smanjenja RBE_{SF2} vrednosti u odnosu na 100 mM DMSO ($p < 0.05$), kao i u odnosu na samo zračenje ($p < 0.01$). Isti trend je uočen kod D_{10} i RBE_{D10} parametara, gde je 500 mM DMSO efikasnije zaštitio ćelije u poređenju sa 100 mM DMSO ($p < 0.05$) i samim zračenjem ($p < 0.01$) (Tabela 4).

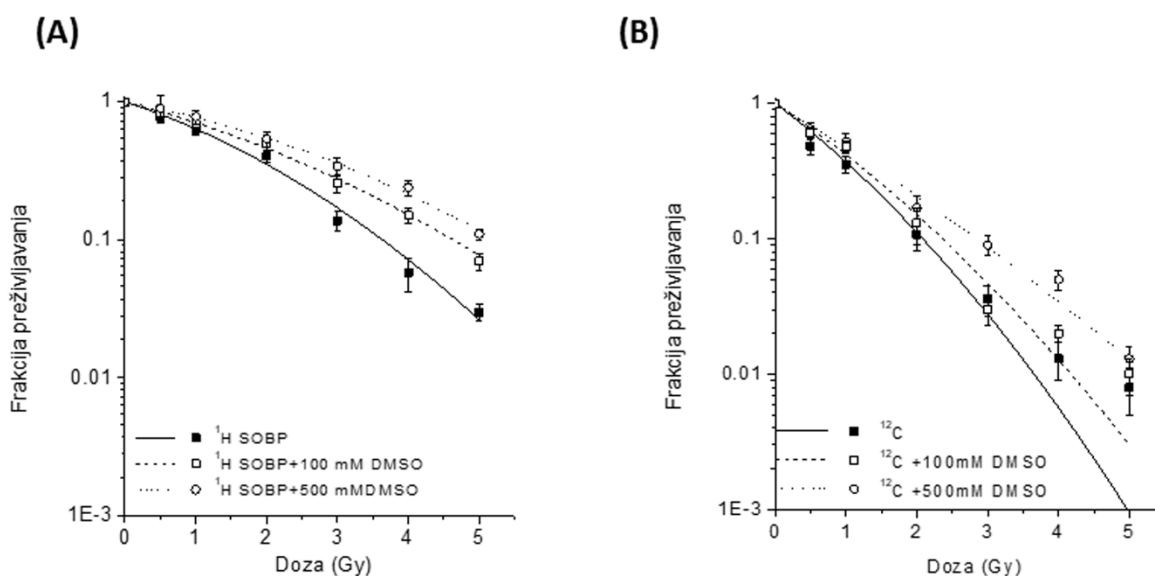
Tabela 4. Radiobiološki parametri (SF2, RBE_{SF2} , D_{10} , RBE_{D10}) MCF-7 ćelija nakon zračenja protonima i jonima ugljenika, sa ili bez pretretmana DMSO. RBE_{SF2} i RBE_{D10} su izračunate na osnovu SF2 i D_{10} vrednosti referentnog γ -zračenja.

MCF-7 ćelije	SF2	RBE_{SF2}	D_{10} (Gy)	RBE_{D10}
^1H SOBP	0.45 ± 0.05	1.70 ± 0.13	3.96 ± 0.2	1.47 ± 0.02
^1H SOBP+100 mM DMSO	0.54 ± 0.08	$1.36 \pm 0.11^*$	$4.50 \pm 0.26^*$	$1.29 \pm 0.01^*$
^1H SOBP+500 mM DMSO	$0.57 \pm 0.06^*$	$1.26 \pm 0.09^*$	$4.97 \pm 0.3^{*\$}$	$1.23 \pm 0.02^{*\$}$
^{12}C	$0.21 \pm 0.05^{##}$	$3.28 \pm 0.35^\#$	$2.73 \pm 0.31^\#$	$2.13 \pm 0.16^\#$
^{12}C + 100 mM DMSO	$0.29 \pm 0.06^*$	$2.56 \pm 0.18^*$	$3.16 \pm 0.33^*$	$1.84 \pm 0.1^*$
^{12}C + 500 mM DMSO	$0.37 \pm 0.04^{**\$}$	$1.74 \pm 0.25^{**\$}$	$3.67 \pm 0.29^{**\$}$	$1.64 \pm 0.05^{**\$}$

*, #, \$ $0.01 < p < 0.05$; **, \$\$, ## $0.001 < p < 0.01$. * - statistička značajnost efekata kombinovanog tretmana u odnosu na efekte samog zračenja; \$ – statistička značajnost efekata više koncentracije u odnosu na nižu koncentraciju DMSO; # – statistička značajnost efekata jona ugljenika u odnosu na protone.

Kod HTB177 ćelija, dolazi do snažnije inhibicije klonogenog preživljavanja nakon delovanja jona ugljenika u poređenju sa protonima (Slika 29A i B). U uzorcima ozračenim protonima SF2 vrednosti su iznosile 0.34 ± 0.04 , dok su nakon zračenja jonima ugljenika dobijene značajno niže vrednosti od 0.1 ± 0.03 ($p < 0.01$). Sličan efekat zračenja je uočen nakon analize D_{10} parametra. Tako su vrednost D_{10} kod protonskog zračenja bile 3.61 ± 0.21 Gy, a posle ozračivanja

jonima ugljenika 2.06 ± 0.18 Gy ($p < 0.01$) (Tabela 5). Kada se posmatraju vrednosti RBE_{SF2} i RBE_{D10} , uočava se da joni ugljenika značajno povećavaju RBE_{SF2} i smanjuju RBE_{D10} u poređenju sa protonima ($p < 0.05$), što ukazuje na veću osetljivost HTB177 ćelija na zračenje jonima ugljenika u odnosu na protone. Kada se uporede ovi rezultati sa odgovorom MCF-7 ćelija, uočava se da joni ugljenika ostvaruju snažniji efekat u poređenju sa protonima u obe ćelijske linije. Takođe, vrednosti radiobioloških parametara ukazuju na nešto veću osetljivost HTB177 ćelija u odnosu na MCF-7 ćelije na ispitivana zračenja (Tabela 4 i 5).



Slika 29. Krive preživljavanja HTB177 ćelija nakon zračenja protonima (A) i jonima ugljenika (B) sa ili bez pretretmana 100 mM i 500 mM DMSO. Ćelije su zračene dozama od 0.5 do 5 Gy. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

Kombinovani tretman DMSO i zračenjem je povećao preživljavanje HTB177 ćelija i smanjio njihovu radioosetljivost na sličan način kao kod MCF-7 ćelija. Nakon protonskog zračenja, 100 mM i 500 mM DMSO su u približno jednakoj meri doveli do povećanja $SF2$ i D_{10} , kao i smanjenja RBE_{SF2} i RBE_{D10} u odnosu na samo zračenje ($p < 0.05$). U uzorcima ozračenim jonima ugljenika, značajno više vrednosti $SF2$ i D_{10} su dobijene u prisusvu 500 mM DMSO u

odnosu na 100 mM DMSO ($p < 0.05$). Takođe, 500 mM DMSO je smanjio RBE_{SF2} i RBE_{D10} u poređenju sa 100 mM DMSO ($p < 0.05$) i samim zračenjem ($p < 0.01$). Ovi rezultati pokazuju da 500 mM DMSO ispoljava bolji protektivni efekat u poređenju sa 100 mM DMSO u prisustvu jona ugljenika (Slika 29, Tabela 5).

Tabela 5. Radiobiološki parametri ($SF2$, RBE_{SF2} , D_{10} , RBE_{D10}) HTB177 ćelija nakon zračenja protonima i jonima ugljenika, sa ili bez pretretmana DMSO. RBE_{SF2} i RBE_{D10} su izračunate na osnovu $SF2$ i D_{10} vrednosti referentnog γ -zračenja.

HTB177 ćelije	SF2	RBE_{SF2}	D_{10} (Gy)	RBE_{D10}
1H SOBP	0.34 ± 0.04	1.98 ± 0.13	3.61 ± 0.21	1.57 ± 0.07
1H SOBP+100 mM DMSO	$0.45 \pm 0.06^*$	$1.65 \pm 0.18^*$	$4.60 \pm 0.25^{**}$	$1.23 \pm 0.03^*$
1H SOBP+500 mM DMSO	$0.55 \pm 0.07^*$	$1.27 \pm 0.21^{*\$}$	$5.01 \pm 0.31^*$	$1.09 \pm 0.04^*$
^{12}C	$0.10 \pm 0.03^{##}$	$4.18 \pm 0.35^\#$	$2.06 \pm 0.18^{##}$	$2.75 \pm 0.25^\#$
^{12}C +100 mM DMSO	0.15 ± 0.04	3.85 ± 0.20	$2.36 \pm 0.22^{**}$	$2.40 \pm 0.16^*$
^{12}C +500 mM DMSO	$0.2 \pm 0.02^{**\$}$	$3.22 \pm 0.06^{*\$}$	$2.84 \pm 0.20^{***\$}$	$1.99 \pm 0.08^{*\$}$

*, #, \$ $0.01 < p < 0.05$; **, \$\$, ## $0.001 < p < 0.01$. * – statistička značajnost efekata kombinovanog tretmana u odnosu na efekte samog zračenja; \$ – statistička značajnost efekata više koncentracije u odnosu na nižu koncentraciju DMSO-a; # – statistička značajnost efekata jona ugljenika u odnosu na protone.

4.3.2. Stepen zaštite DMSO u MCF-7 i HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika

Efikasnost DMSO u uklanjanju slobodnih radikala posle ozračivanja ćelija protonima i jonima ugljenika ispitana je pomoću stepena zaštite – DP. Za preračunavanje DP poslužile su $SF2$ vrednosti dobijene nakon kombinovanog tretmana DMSO i zračenjem. Rezultati za MCF-7 ćelije su prikazani u Tabeli 6, dok su vrednosti za HTB177 ćelije date u tabeli 7.

Pretretman DMSO je podjednako efikasno povećao DP u MCF-7 i HTB177 ćelijama (Tabela 6). U MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima su dobijene približno jednake vrednosti DP za 100 mM (0.23 ± 0.05) i 500 mM (0.26 ± 0.03) DMSO. Slične vrednosti DP su preračunate za HTB177 ćelije nakon pretretmana 100 mM (0.26 ± 0.08) i 500 mM (0.29 ± 0.06) DMSO. Kada se posmatra efekat DMSO u ćelijama ozračenim jonima ugljenika, uočava se da DMSO ostvaruje bolji protektivni efekat pri višim koncentracijama. Tako je kod MCF-7 ćelija viša vrednost DP dobijena nakon pretretmana 500 mM (0.33 ± 0.04) u odnosu na 100 mM (0.20 ± 0.11) DMSO. Sličan efekat je DMSO imao i u HTB177 ćelijama, u kojima je 500 mM DMSO (0.31 ± 0.05) efikasnije podigao DP u odnosu na 100 mM DMSO (0.18 ± 0.12) (Tabele 6 i 7).

Tabela 6. Stepen zaštite (DP) kod MCF-7 ćelija pretretiranih sa 100 i 500 mM DMSO, ozračenih protonima i jonima ugljenika sa referentnom dozom od 2 Gy.

MCF-7	Stepen zaštite (DP)	
	100 mM DMSO	500 mM DMSO
^1H SOBP	0.23 ± 0.05	0.26 ± 0.03
^{12}C	0.20 ± 0.11	0.33 ± 0.04

Tabela 7. Stepen zaštite (DP) kod HTB177 ćelija pretretiranih sa 100 i 500 mM DMSO, ozračenih protonima i jonima ugljenika sa referentnom dozom od 2 Gy.

HTB177	Stepen zaštite (DP)	
	100 mM DMSO	500 mM DMSO
^1H SOBP	0.26 ± 0.08	0.29 ± 0.06
^{12}C	0.18 ± 0.12	0.31 ± 0.05

4.3.3 Udeo direktnih i indirektnih efekata protona i jona ugljenika u MCF-7 i HTB177 ćelijama

Doprinos direktnih i indirektnih efekata zračenja protonima i jonima ugljenika u MCF-7 i HTB177 ćelijama je procenjen na način kako je prethodno opisano (Shinohara i sar. 1996; Hirayama i sar. 2009; Ito i sar. 2006). Vrednosti dobijene nakon zračenja dozama od 0.5-4 Gy su poslužile za procenu DP_{max} za svaku ćelijsku liniju, nakon čega je izračunat udeo direktnih i indirektnih efekata zračenja.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je procenat direktnih efekata bio donekle veći nakon zračenja jonima ugljenika u odnosu na protone, ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Kod MCF-7 ćelija, udeo direktnih efekata u prisustvu jona ugljenika je iznosio 48%, dok je nakon protonskog zračenja bio 44% (Tabela 8). U HTB177 ćelijama je primećen isti trend, pa je udeo direktnih efekata od 49% dobijen nakon zračenja jonima ugljenika, dok je kod protona iznosio 45% (Tabela 9). Približno isti procenat indirektnih efekata je dobijen u MCF-7 i HTB177 ćelijama. U obe ćelijske linije, udeo indirektnih efekata nakon zračenja protonima je bio 55-56%, a nakon zračenja jonima ugljenika 51-52% (Tabela 8 i 9).

Tabela 8. Vrednosti $1/DP_{max}$, udela direktnih efekata i indirektnih efekata zračenja u MCF-7 ćelijama. Vrednosti su preračunate za zračenje protonima i jonima ugljenika. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

MCF-7 ćelije	$1/DP_{max}$	Direktni efekti (%)	Indirektni efekti (%)
^1H SOBP	1.81 ± 0.19	44 ± 6	56 ± 6
^{12}C	1.91 ± 0.10	48 ± 2	52 ± 2

Tabela 9. Vrednosti $1/DP_{max}$, udela direktnih efekata i indirektnih efekata zračenja u HTB177 ćelijama. Vrednosti su preračunate za zračenje protonima i jonima ugljenika. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

HTB177 ćelije	$1/DP_{max}$	Direktni efekti (%)	Indirektni efekti (%)
^1H SOBP	1.83 ± 0.05	45 ± 1	55 ± 1
^{12}C	2.03 ± 0.23	49 ± 5	51 ± 5

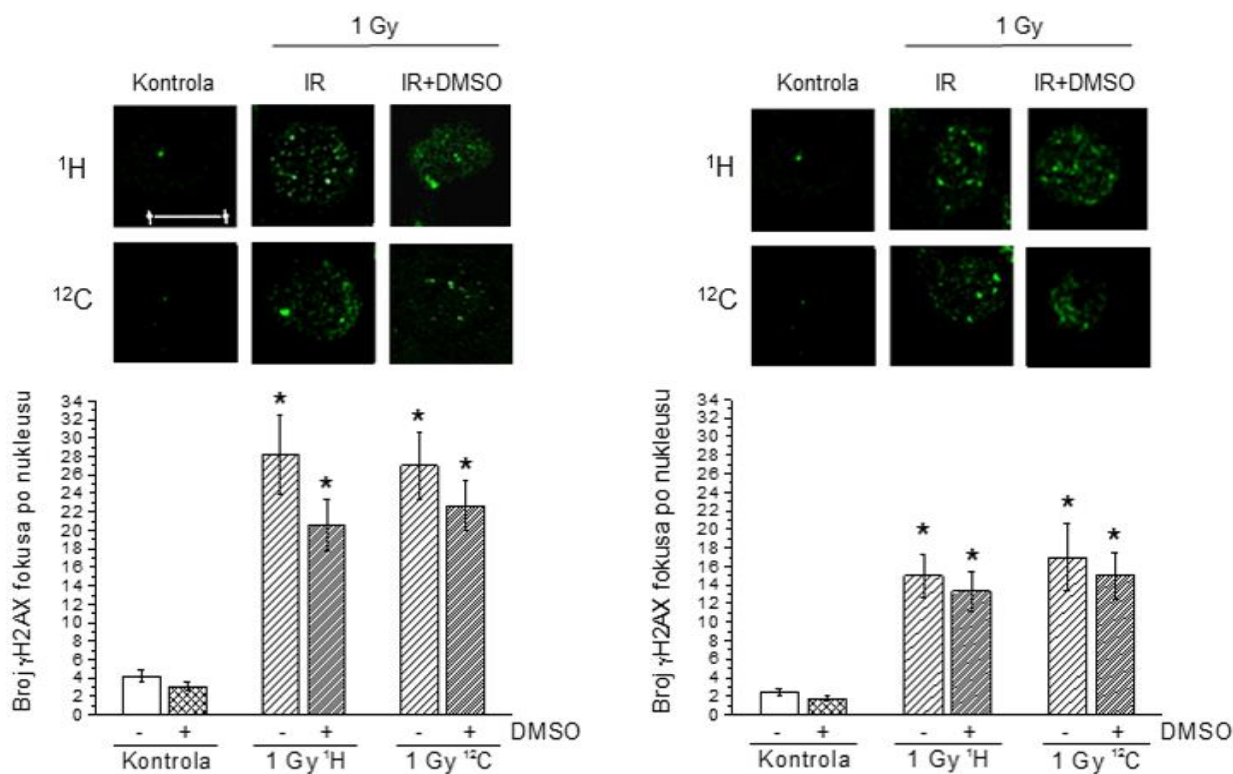
4.3.2. Analiza dvolančanih DNK prekida nakon zračenja protonima i jonima ugljenika

Nakon ispitivanja radiobioloških parametara MCF-7 i HTB177 ćelija ozračenih protonima i jonima ugljenika, pristupilo se analizi DSB pomoću γH2AX eseja. Ćelije su ozračene dozom od 1 Gy, a proces formiranja DSB je praćen 0.5 h posle zračenja. Broj zaostalih (rezidualnih) oštećenja analiziran je nakon 24 h. Pored efekata samog zračenja, broj DSB je analiziran u prisustvu 100 mM DMSO kako bi se posmatrao uticaj direktnih efekata zračenja na formiranje DNK oštećenja. Doza zračenja i koncentracija DMSO su odabrane kako bi bile uporedive sa uslovima γ -zračenja. Rezultati analize γH2AX fokusa u MCF-7 ćelijama su prikazani na Slici 30, dok su vrednosti za HTB177 ćelije date na Slici 31.

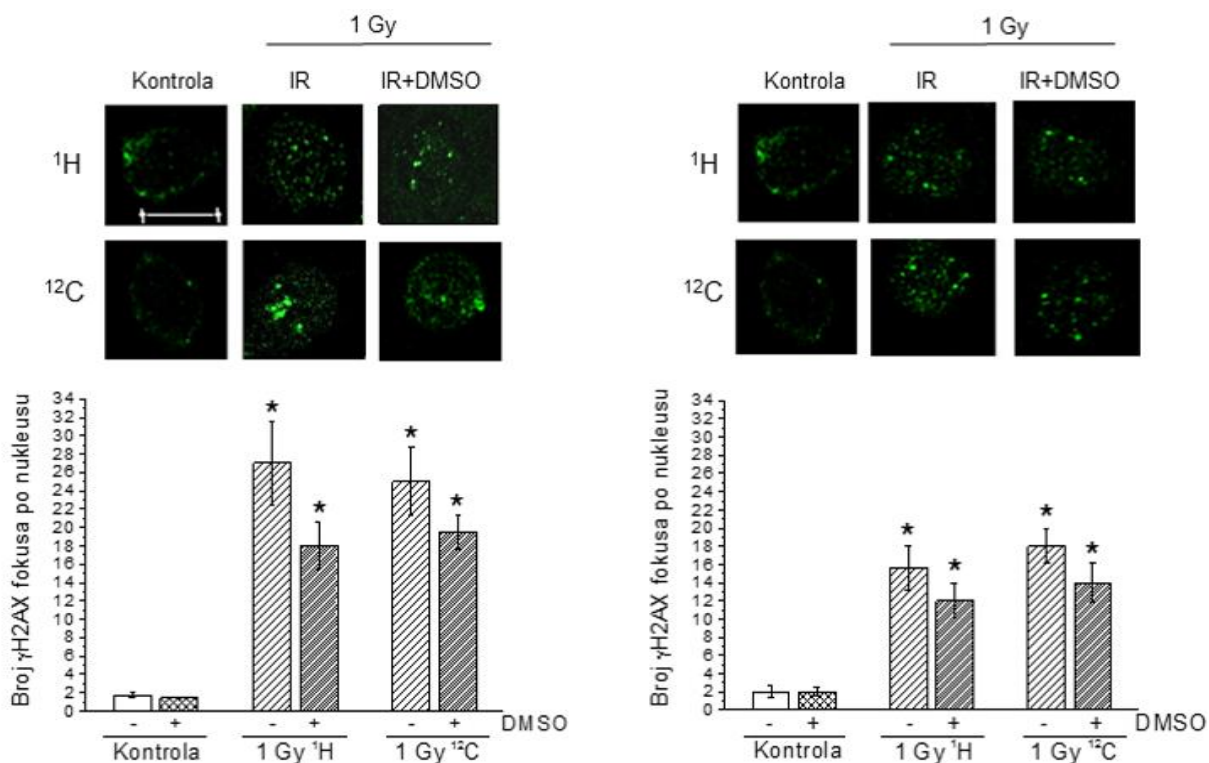
Rezultati su pokazali da protoni i joni ugljenika u podjednako meri dovode do povećanja broja γH2AX fokusa u MCF-7 i HTB177 ćelijama (Slike 30 i 31). Visok broj γH2AX fokusa je prisutan u obe ćelijske linije 0.5h posle zračenja protonima i jonima ugljenika u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$) (Slika 31A i 32A). Nivo γH2AX fokusa je nakon 24 h bio značajno povećan u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$), što ukazuje na prisustvo rezidualnih DSB u obe ćelijske linije (Slike 31B i 32B). Pretretman 100 mM DMSO je u svim ispitivanim uzorcima smanjio broj fokusa u odnosu na zračenje, ali ova promena nije bila statistički značajna (Slike 30 i 31).

Kada se uporede rezultati analize γH2AX u MCF-7 i HTB177 ćelijama, uočava se da je zračenje protonima i jonima ugljenika izazvalo približno isti broj DSB, nezavisno od tipa ćelija

koje su posmatrane (Slike 31 i 32). Međutim, određene razlike u izgledu γ H2AX fokusa se primećuju nakon zračenja. Tako su u ćelijama ozračenim jonima ugljenika fokusi bili krupniji i nepravilnog oblika (Slike 31 i 32), dok su posle zračenja γ -zracima i protonima fokusi bili ujednačenog oblika i veličine (Slike 14 i 15).



Slika 30. Imunocitohemijska analiza γ H2AX fokusa u MCF-7 ćelijama. Fokusi su analizirani 0.5 h (A) i 24 h (B) nakon zračenja sa protonima i jonima ugljenika dozom od 1 Gy. Ćelije su pretretirane 100 mM DMSO jedan sat pre zračenja. Reprezentativne mikrofografije su dobijene laserskim konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 II. Uveličanje: 63 x. Bar: 20 μm . Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. * $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.



Slika 31. Imunocitohemijska analiza γ H2AX fokusa u HTB177 ćelijama. Fokusi su analizirani 0.5 h (A) i 24 h (B) nakon zračenja sa protonima i jonima ugljenika dozom od 1 Gy. Ćelije su pretretirane sa 100 i 500 mM DMSO jedan sat pre zračenja. Reprezentativne mikrografije su dobijene laserskim konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 II. Uveličanje: 63 x. Bar: 20 μ m. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. * 0.01 < p < 0.05. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

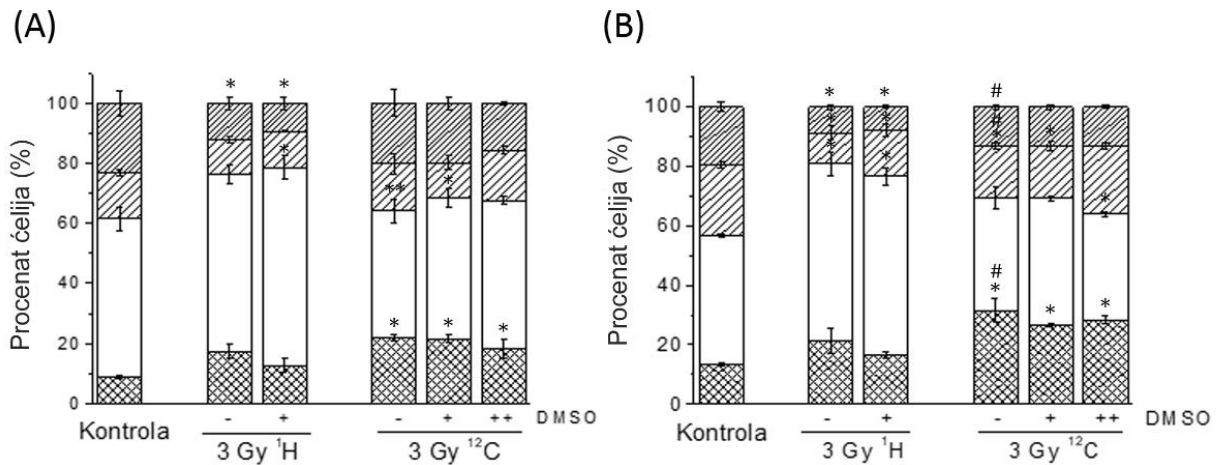
4.3.4. Uticaj zračenja protonima i jonima ugljenika na ćelijski ciklus i ekspresiju proteina uključenih u njegovu regulaciju

Rezultati analize DSB nakon zračenja ukazuju na prisustvo povećanog broja rezidualnih i potencijalno letalnih oštećenja u MCF-7 i HTB177 ćelijama. Kako bi se detaljnije ispitaio uticaj primenjenih tretmana, pristupilo se analizi ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti po tipu apoptoze. Promene na ćelijskom ciklusu su posmatrane 24 i 48 h nakon zračenja dozom od 3 Gy, u prisustvu ili odsustvu DMSO. Za pretretman je poslužio 100 mM DMSO, dok je kod uzoraka ozračenih

jonima ugljenika uvedena dodatna koncentracija od 500 mM zbog snažnog letalnog efekata ovih jona (Tabele 4 i 5). Kako bi se upotpunili rezultati, ispitana je ekspresija proteina koji regulišu prolazak ćelija kroz G1 fazu ćelijskog ciklusa – p21 i ciklin D1, dok je odnos Bax/Bcl-2 proteina je poslužio kao pokazatelj apoptoze.

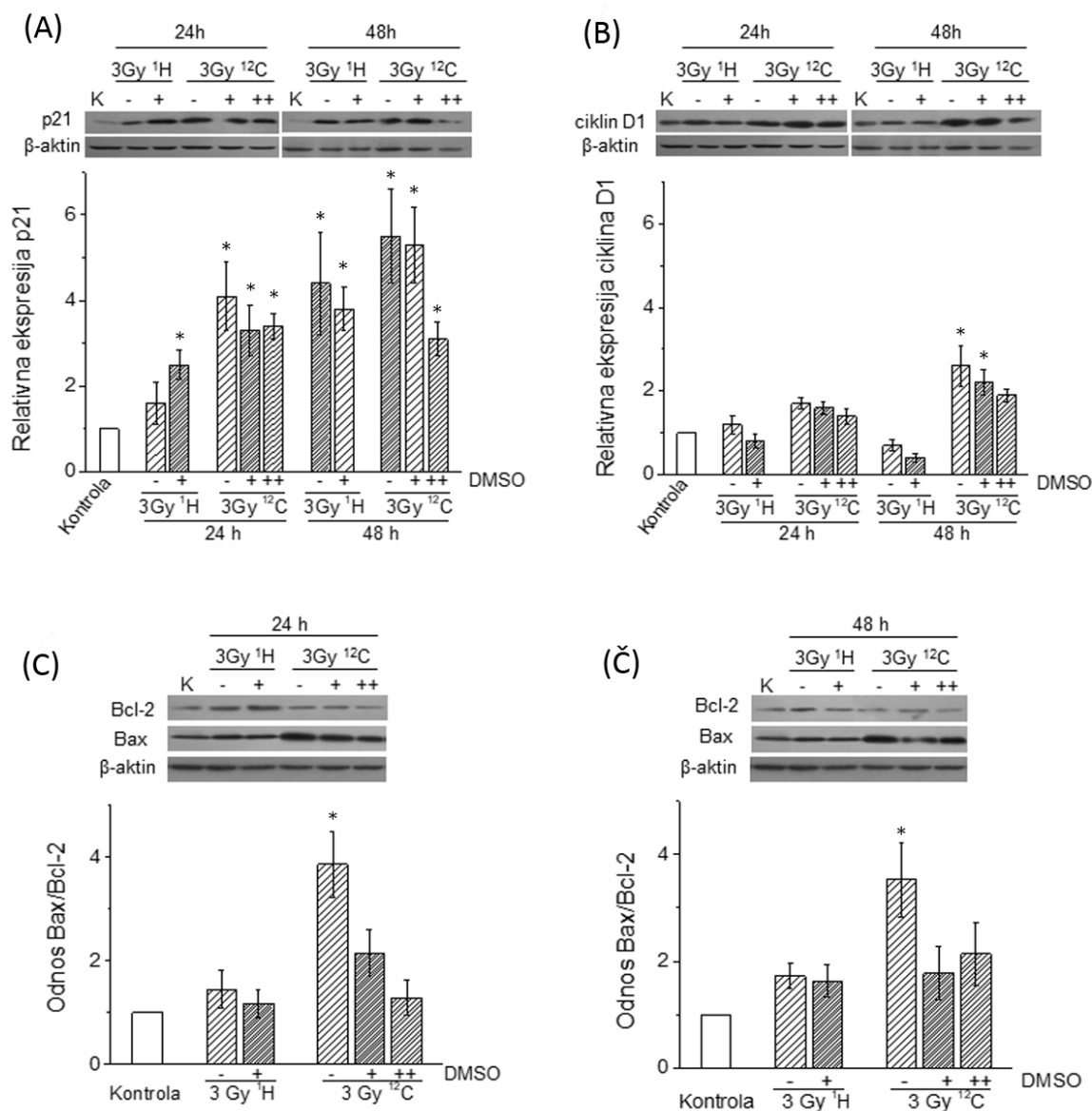
Analiza ćelijskog ciklusa MCF-7 ćelija nakon 24 h je pokazala da protonsko zračenje dovodi do blagog povećanja G1 faze i značajnog smanjenja G2/M faze u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Kombinovani tretman DMSO je doveo do akumulacije ćelija u G1 fazi, koji je praćen smanjenjem G2/M faze ($p < 0.05$). Broj ćelija u subG1 fazi se povećao pod uticajem protonskog zračenja u odnosu na kontrolu, ali ova promena nije bila statistički značajna. U uzorcima ozračenim jonima ugljenika se uočava značajno povećanje subG1 faze u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Takođe, zračenje jonima ugljenika je dovelo do smanjenja G1 faze kako u ozračenim ćelijama ($p < 0.01$), tako i u ćelijama pretretiranim 100 mM DMSO ($p < 0.05$) (Slika 32A).

Nakon inkubacionog perioda od 48 h, profil ćelijskog ciklusa je bio sličan profilu dobijenom 24h posle zračenja. Protonsko zračenje je dovelo do G1 zastoja ($p < 0.05$) i smanjenja S i G2/M faze ($p < 0.05$), dok se nivo subG1 faze nije značajno menjao u odnosu na kontrolu. Povećanje broja ćelija u G1 fazi može ukazati na aktivaciju reparacionih procesa, koji se pokreću u odgovoru na nastala DNK oštećenja. Zračenje jonima ugljenika u odsustvu/prisustvu 100 mM DMSO je dovelo do porasta broja hipodiploidnih ćelija u subG1 fazi ($p < 0.05$), kao i do smanjenja S faze u poređenju sa netretiranom kontrolom ($p < 0.05$). Nakon kombinovanog tretmana 500 mM DMSO i zračenjem došlo je do značajnog povećanja subG1 ($p < 0.05$) i smanjenja G1 faze u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Značajnih razlika između zračenja i pretretmana DMSO nije bilo. Ovi rezultati pokazuju da u MCF-7 ćelijama DMSO ostvaruje slabiji protektivni efekat nakon zračenja jonima ugljenika u poređenju sa protonima (Slika 32B).



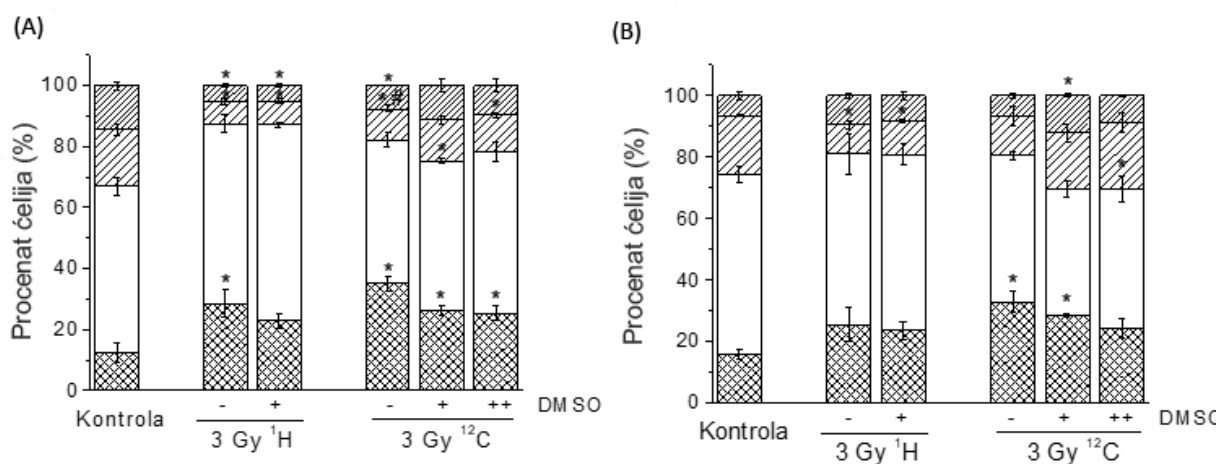
Slika 32. Analiza ćelijskog ciklusa MCF-7 ćelija 24 h (A) i 48 h (B) nakon zračenja dozom od 3 Gy sa protonima i jonima ugljenika, u prisustvu/odsustvu 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. *, # 0.01 < p < 0.05; **, ## 0.001 < p < 0.01. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost efekata zračenja jonima ugljenika u odnosu na protone.

Analiza proteinske ekspresije u MCF-7 ćelijama je pokazala da protoni i joni ugljenika dovode do povećanja nivoa p21 proteina u svim ispitivanim vremenskim tačkama u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) (Slika 33A). Protonsko zračenje nije izmenilo ekspresiju ciklina D1 posle 24 h, dok je nakon 48 h zabeležen pad ciklina D1 ispod kontrolnih vrednosti (slika 33B). Nizak nivo ciklina D1 i povećane vrednosti p21 proteina ukazuju na G1 zastoje, koji je detektovan na ćelijskom ciklusu (Slika 32B). Zračenje jonima ugljenika je povećalo ekspresiju ciklina D1 48 h nakon zračenja ($p < 0.05$) (Slika 33B). Pretretman DMSO nije doveo do značajnog sniženja proteinske ekspresije u odnosu na zračenje u ispitivanim uzorcima (Slika 33A i B). Analiza ekspresije Bax i Bcl-2 proteina je pokazala da protoni nisu značajno izmenili odnos Bax/Bcl-2 u odnosu na kontrolu. Međutim, povećanje nivoa Bax/Bcl-2 je zabeleženo 24 i 48 h nakon zračenja jonima ugljenika ($p < 0.05$). U prisustvu DMSO nivo proteina je bio smanjen u odnosu na zračenje, ali bez statističke značajnosti (Slika 33C i Ć).



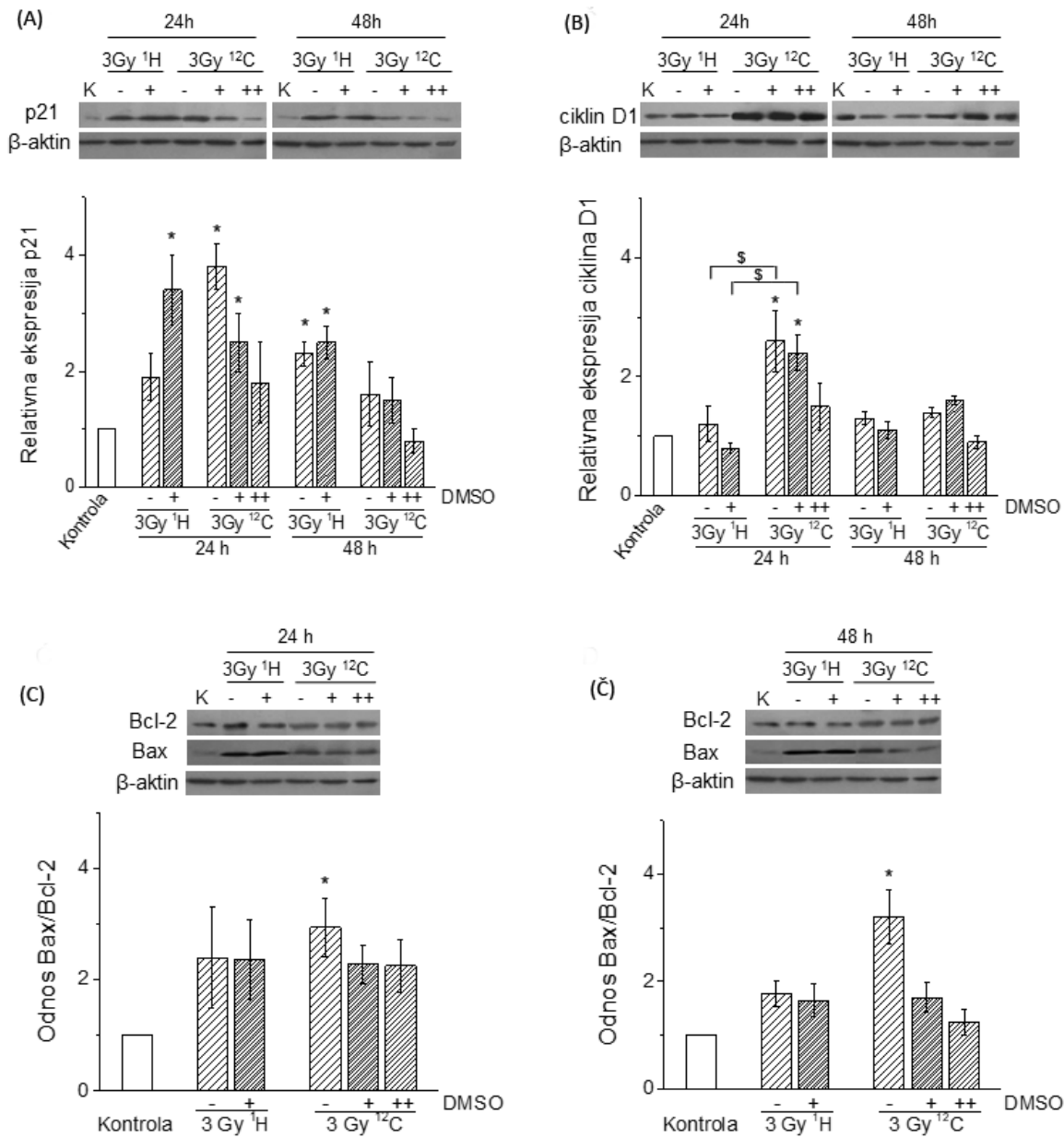
Slika 33. Analiza ekspresije p21 (A) i ciklina D1 (B) u MCF-7 ćelijama 24 h i 48 nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u prisustvu/odsustvu 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Odnos Bax/Bcl-2 na 24 h (C) i 48 h (Č) nakon zračenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin—interna kontrola. K – kontrola. * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

Propagacija HTB177 ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa predstavljena je na Slici 34. U periodu do 24 h, protonsko zračenje je dovelo do značajnog porasta subG1 faze u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). U ovim uzorcima, kao i u uzorcima pretretiranim DMSO dolazi do smanjenja S i G2/M faze u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$), što ukazuje na umanjenu replikativnu aktivnost i deobu ćelija. Zračenje jonima ugljenika je dovelo do povećanja subG1 faze i smanjenja procenta ćelija u G1 fazi ($p < 0.05$) (Slika 34A). Nakon inkubacionog perioda od 48 h zapaža se nešto drugačiji odgovor HTB177 ćelija (Slika 34B). U ovoj vremenskoj tački, zračenje protonima je dovelo do smanjenja S faze ($p < 0.05$) i povećanja subG1 faze, koje nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu. Kada se posmatra efekat zračenja jonima ugljenika, uočava se povećanje subG1 faze kako u uzorcima koji su samo ozračeni, tako i u uzorcima pretretiranim 100 mM DMSO ($p < 0.05$). Značajne razlike između efekata jona ugljenika i pretretmana DMSO nisu uočene, izuzev blagog smanjenja subG1 faze u ćelijama pretretiranim DMSO. Takođe, značajnih promena između ćelija zračenih protonima i jonima ugljenika nije bilo (Slika 34).



Slika 34. Analiza ćelijskog ciklusa HTB177 ćelija 24 (A) i 48 h (B) nakon zračenja dozom od 3 Gy sa protonima i jonima ugljenika, u prisustvu/odsustvu 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. *, # 0.01 < $p < 0.05$; **, ## 0.001 < $p < 0.01$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost efekata zračenja jonima ugljenika u odnosu na protone.

Zračenje protonima i jonima ugljenika je dovelo do povećanja ekspresije p21 proteina u HTB177 ćelijama nakon 24 h ($p < 0.05$). Vrednosti p21 su ostale povišene 48 h nakon protonskog zračenja u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) (Slika 35A). Ekspresija ciklina D1 se nije značajno menjala u odnosu na kontrolne vrednosti u ispitivanim vremenskim tačkama nakon zračenja protonima. Međutim, joni ugljenika su izazvali povećanje nivoa ciklina D1 u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$), kao i u odnosu na protone u vremenskoj tački od 24 h ($p < 0.05$) (Slika 35B). Oba tipa zračenja su dovela do povećanja Bax/Bcl-2 vrednosti u HTB177 ćelijama, naročito nakon zračenja jonima ugljenika ($p < 0.05$). Slično kao kod MCF-7 ćelija, pretretman DMSO je snizio ekspresiju ispitivanih proteina u odnosu na samo zračenje, ali bez statističke značajnosti (Slika 35C i Č).

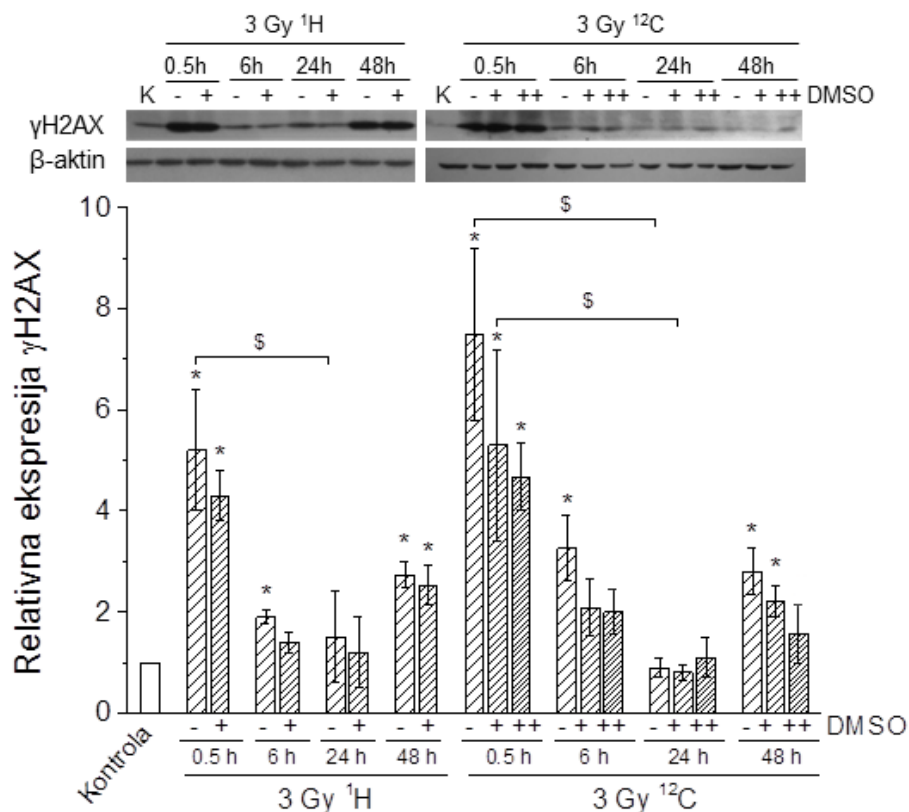


Slika 35. Analiza ekspresije p21 (A) i ciklina D1 (B) u HTB177 ćelijama 24 h i 48 nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u prisustvu/odsustvu 100 mM (+) i 500 mM (++) DMSO. Odnos Bax/Bcl-2 na 24 h (C) i 48 h (Č) nakon zračenja dozom od 3 Gy. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, \$ $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$. * – statistička značajnost efekata zračenja jonima ugljenika u odnosu na protone.

4.3.5. Ekspresija proteina uključenih u odgovor na DNK oštećenja nakon zračenja protonima i jonima ugljenika

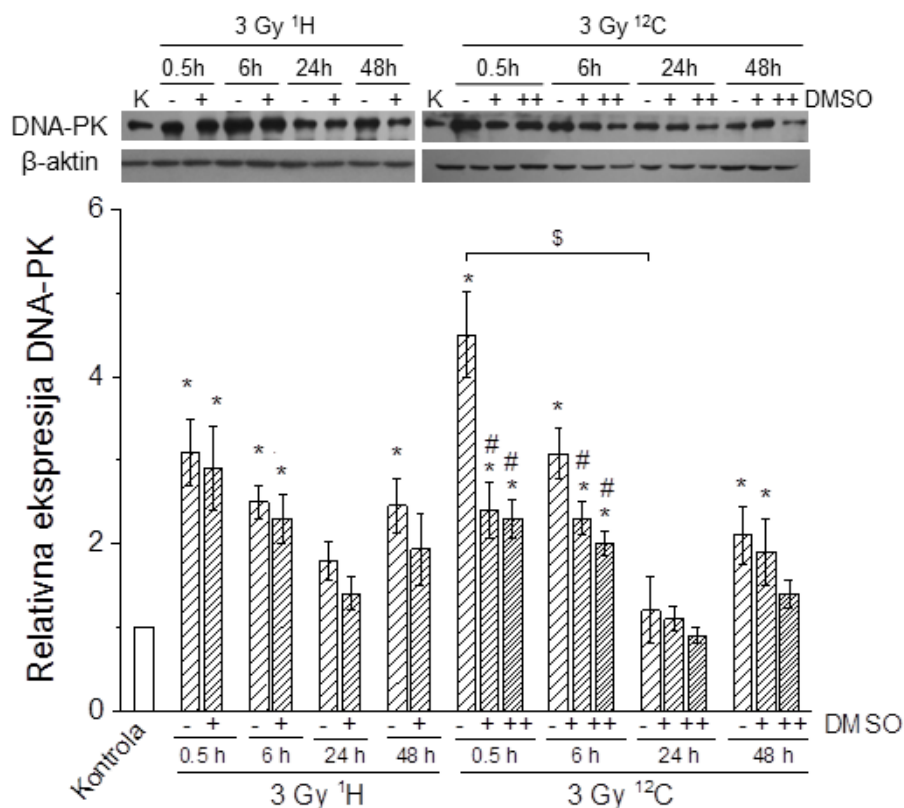
Kako bi se upotpunili dobijeni rezultati, analizirana je promena relativne ekspresije proteina koji učestvuju u odgovoru na DNK oštećenja nakon zračenja. Zahvaljujući ulozi u procesu reparacije DNK, kao proteinski markeri upotrebljeni su γ H2AX, DNA-PK, ATR, Rad51, PARP1. Za potvrdu apoptoze poslužio je c-PARP1 protein. Čelije su ozračene dozom od 3 Gy, u prisustvu ili odsustvu DMSO, a efekti tretmana su praćeni u vremenskim tačkama 0.5 h, 6 h, 24 h i 48 h.

Analiza relativne ekspresije γ H2AX proteina u MCF-7 ćelijama prikazana je na Slici 36. Rezultati su pokazali da protoni i joni ugljenika dovode do porasta vrednosti γ H2AX 0.5 h nakon zračenja u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Povišen nivo γ H2AX proteina detektovan 6 h posle zračenja protonima i jonima ugljenika ukazuje na visok nivo DSB oštećenja u ozračenim ćelijama u poređenju sa kontrolnim uzorcima ($p < 0.05$). Nakon inkubacionog perioda od 48 h uočen je novi porast γ H2AX u ćelijama ozračenim protonima i jonima ugljenika ($p < 0.05$), što ukazuje na prisustvo rezidualnih DSB. U ćelijama pretretiranim DMSO uočava se smanjenje nivoa γ H2AX u odnosu na samo zračenje, ali ove promene nisu bile statistički značajne (Slika 36).



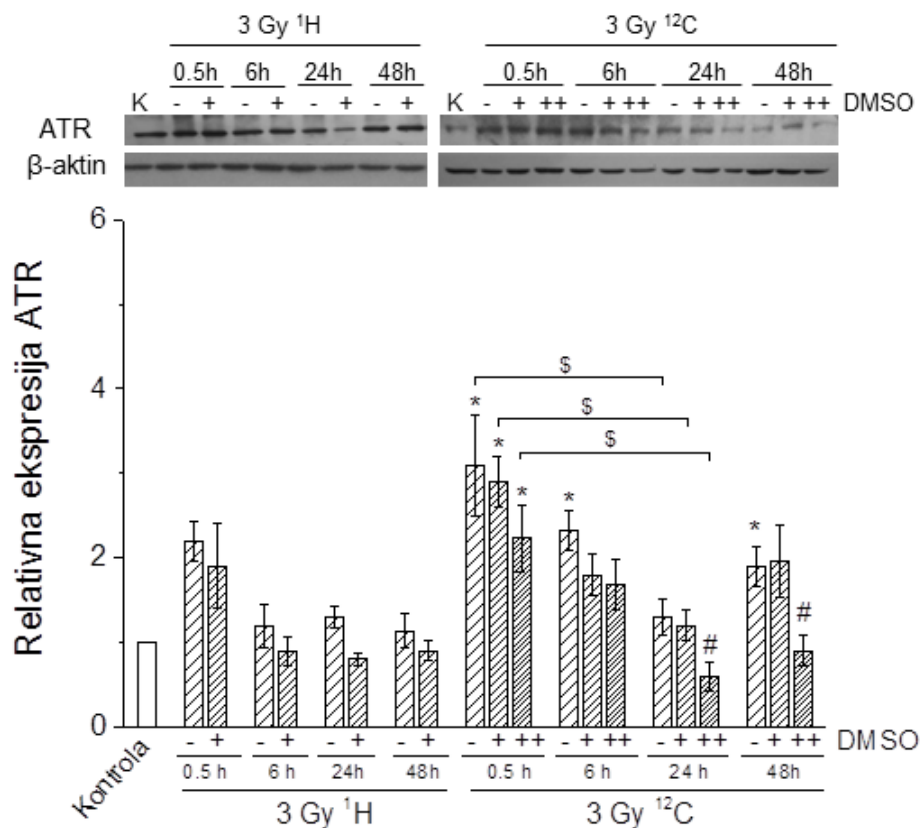
Slika36. Relativna ekspresija γ H2AX u MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *,\$ $0.01 < p < 0.05$. * – sttistička značajnost u odnosu na kontrolu; \$ – statistička značajnost u odnosu na vremensku tačku od 0.5 h.

Nivo DNA-PK proteina u MCF-7 ćelijama prikazan je na Slici 37. Na osnovu analiziranih rezultata uočava se da protoni i joni ugljenika povećavaju ekspresiju DNA-PK nakon 0.5 h, 6 h i 48 h u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Pretretman DMSO je delovao protektivno i doveo je do sniženja nivoa DNA-PK proteina u odnosu na samo zračenje, što se može uočiti 0.5 h i 6 h nakon ozračivanja jonima ugljenika ($p < 0.05$) (Slika 37).



Slika 37 Relativna ekspresija DNA-PK u MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *,\$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja; \$ – statistička značajnost u odnosu na vremensku tačku od 0.5 h.

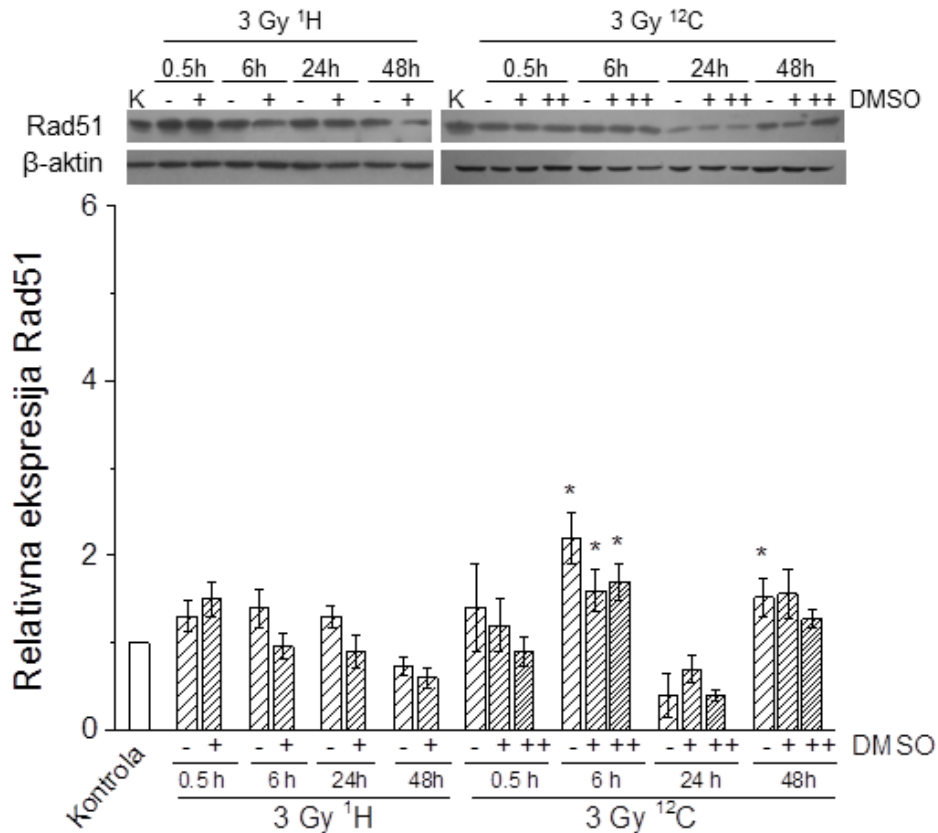
Rezultati analize ATR proteina su pokazali da protonsko zračenje dovodi porasta proteinske ekspresije nakon 0.5 h, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. U ostalim vremenskim tačkama nivo proteina se kretao blizu kontrolnih vrednosti. Zračenje jonima ugljenika je imalo snažniji efekat u odnosu na protone i prouzrokovalo je povećanje ekspresije ATR u vremenskim tačkama 0.5 h, 6 h i 48 h ($p < 0.05$). Pretretman DMSO je doveo do sniženja nivoa ATR proteina 24 i 48 h nakon zračenja jonima ugljenika ($p < 0.05$) (Slika 38).



Slika 38. Relativna ekspresija ATR u MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, \$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja; \$ – statistička značajnost u odnosu na vremensku tačku od 0.5 h.

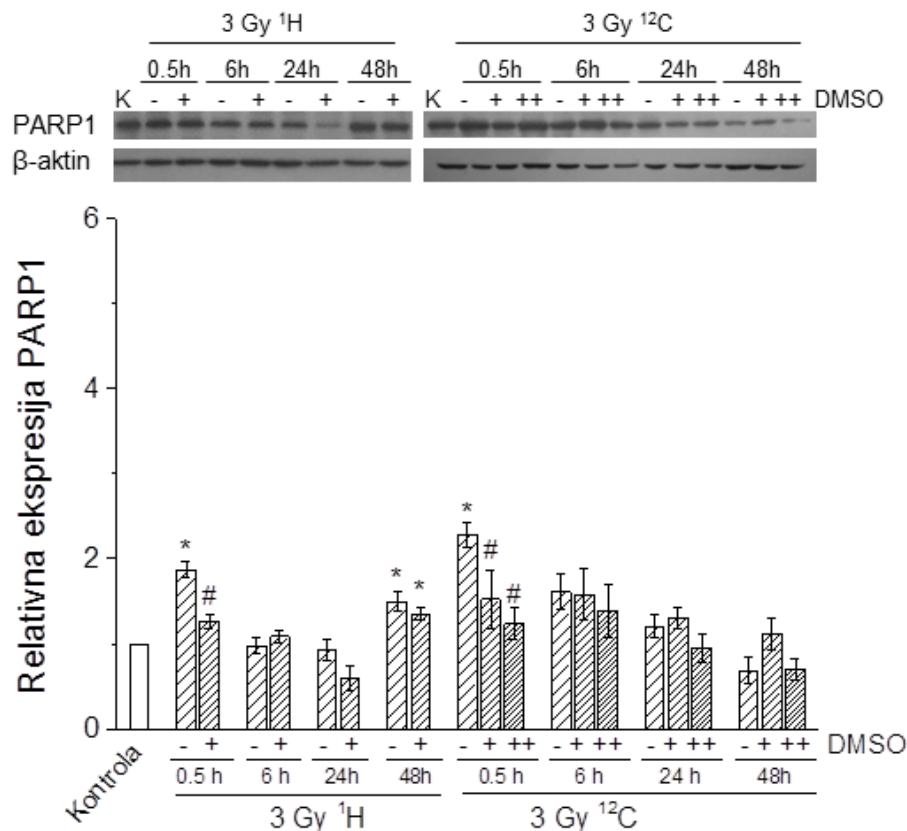
Relativna ekspresija Rad51 proteina prikazana je na Slici 39. Rezultati merenja su pokazali da se nivo Rad51 nije značajno razlikovao od kontrolnih vrednosti u ćelijama ozračenim protonima. Povećanje nivoa Rad51 proteina detektovano je 6 h i 48 h nakon zračenja jonima ugljenika ($p < 0.05$), što ukazuje na aktiviran proces homologe rekombinacije. Nakon inkubacionog perioda od 24 h zabeleženo je smanjenje ekspresije Rad51 proteina u odnosu na kontrolu, ali ova

promena nije bila statistički značajna. Pretretman DMSO nije doveo do značajnih promena u ekspresiji Rad51 proteina u poređenju sa zračenjem protonima i jonima ugljenika (Slika 39).



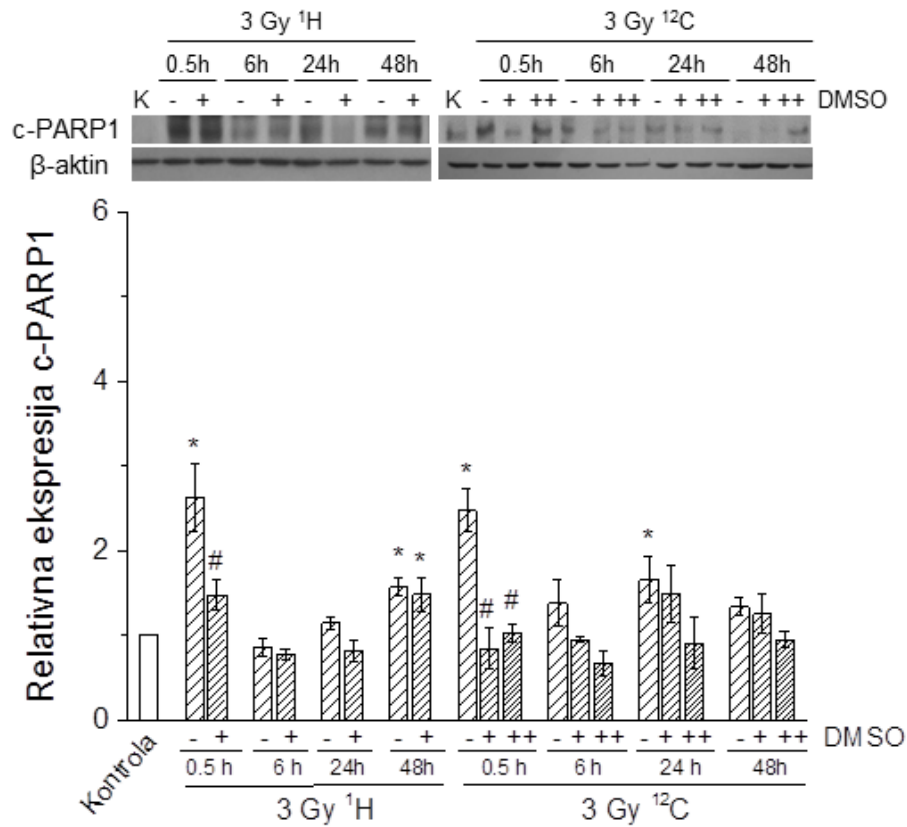
Slika 39. Relativna ekspresija Rad51 u MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *,\$ 0.01 < p < 0.05. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

Promene nivoa PARP1 proteina nakon primenjenih tretmana prikazane su na Slici 40. Protoni i joni ugljenika su izazvali povećanje nivoa PARP1 nakon 0.5 h u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). U ovoj vremenskoj tački, pretretman DMSO je delovao protektivno i smanjio je ekspresiju proteina u odnosu na zračenje protonima i jonima ugljenika ($p < 0.05$). Novi porast PARP1 je detektovan posle 48 h u uzorcima ozračenim protonima ($p < 0.05$), dok je u svim ostalim uzorcima nivo proteina bio blizu kontrolnih vrednosti (Slika 40).



Slika 40. Relativna ekspresija PARP1 u MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *,\$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja.

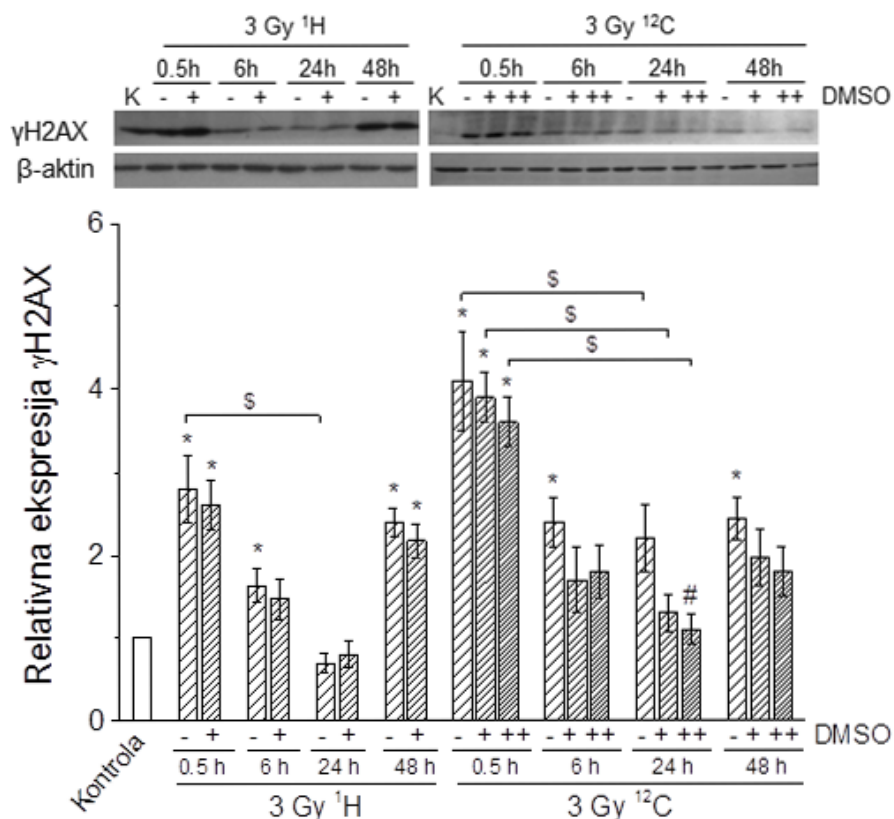
Nivo ekspresije c-PARP1 proteina je bio značajno povećan 0.5 h nakon zračenja protonima i jonima ugljenika u poređenju sa neozračenom kontrolom ($p < 0.05$). U ovoj vremenskoj tački, pretretman DMSO je delovao protektivno i doveo je do sniženja nivoa c-PARP1 proteina u odnosu na zračenje ($p < 0.05$). Porast ekspresije c-PARP1 proteina, koji je pokazatelj apoptoze, je izmeren 24 h nakon zračenja jonima ugljenika i 48 h posle zračenja protonima ($p < 0.05$). Nivo proteina u ostalim uzorcima je bio blizu kontrolnih vrednosti (Slika 41).



Slika 41. Relativna ekspresija c-PARP1 u MCF-7 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, \$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – satatistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja.

Analiza ekspresije γ H2AX proteina u HTB177 ćelijama je prikazana na Slici 42. Na osnovu rezultata uočava se da je zračenje protonima i jonima ugljenika dovelo do povećanja nivoa γ H2AX nakon 0.5 h i 6 h u poređenju sa neozračenom kontrolom ($p < 0.05$). Novi porast ekspresije γ H2AX je detektovan posle inkubacionog perioda od 48 h ($p < 0.05$) što ukazuje na postojanje

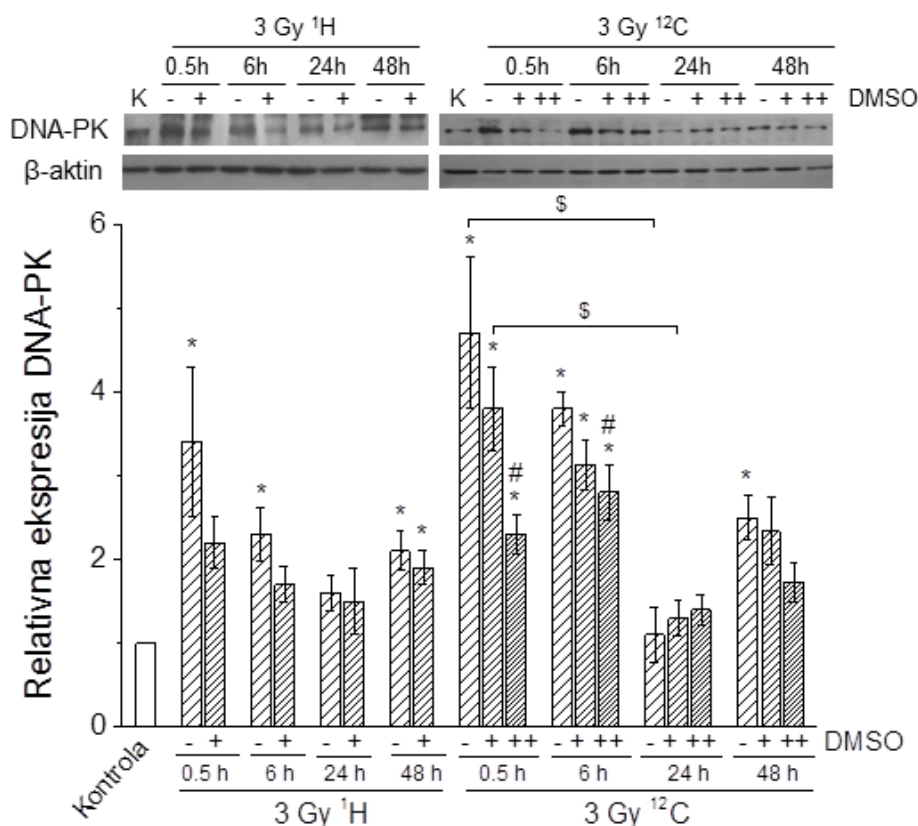
rezidualnih DSB. U prisustvu DMSO je došlo do sniženja ekspresije γ H2AX u poređenju sa zračenjem. Ovaj efekat je bio najizraženiji 24 h posle zračenja jonima ugljenika u uzorcima pretretiranim 500 mM DMSO ($p < 0.05$) (Slika 42).



Slika 42. Relativna ekspresija γ H2AX proteina u HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, \$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – satatistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja; \$ – statistička značajnost u odnosu na vremensku tačku od 0.5 h.

Protoni i joni ugljenika su na sličan način uticali na ekspresiju DNA-PK proteina u HTB177 ćelijama. Oba tipa zračenja su dovela do porasta ekspresije DNA-PK nakon 0.5 h i 6 h u poređenju sa neozračenom kontrolom ($p < 0.05$). Nivo DNA-PK u vremenskoj tački od 24 h se

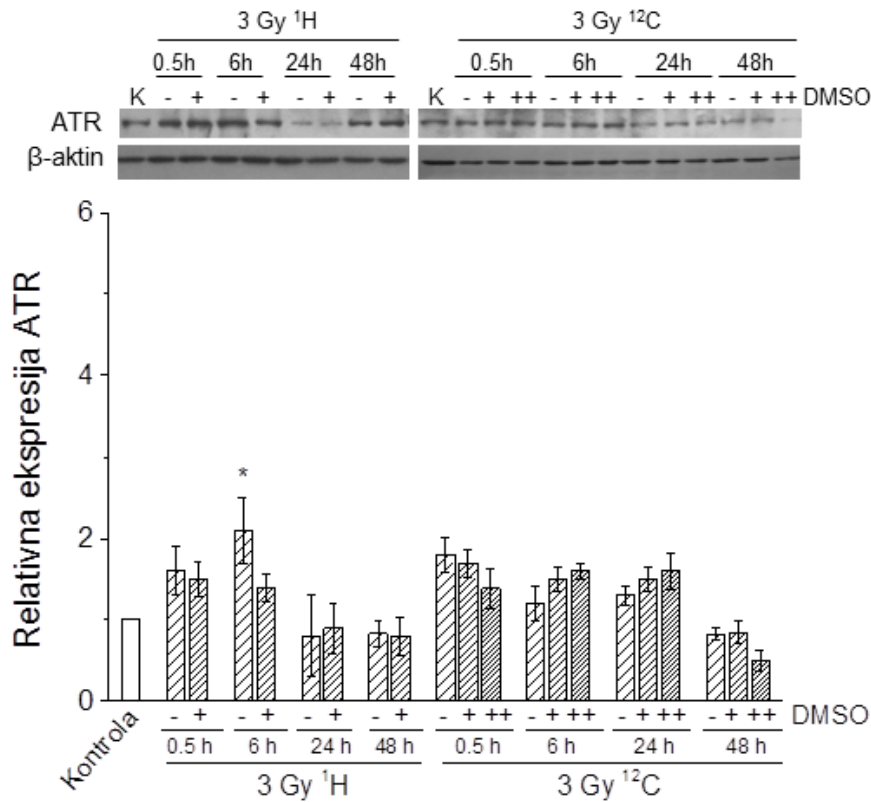
kretao blizu kontrolnih vrednosti, dok je novi porast ekspresije proteina usledio 48 h nakon zračenja ($p < 0.05$). U uzorcima pretretiranim DMSO zabeleženo je značajno smanjenje nivoa DNA-PK proteina 0.5 h i 6 h posle ozračivanja jonima ugljenika ($p < 0.05$) (Slika 43).



Slika 43. Relativna ekspresija DNA-PK u HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, #, \$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – satatistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja; \$ – statistička značajnost u odnosu na vremensku tačku od 0.5 h.

Analiza relativne proteinske ekspresije ATR je prikazana na Slici 44. Dobijeni rezultati su pokazali da protoni dovode do povećanja nivoa ATR 6 h nakon zračenja u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). U ovoj vremenskoj tački, pretretman DMSO je smanjio nivo ATR proteina u odnosu na

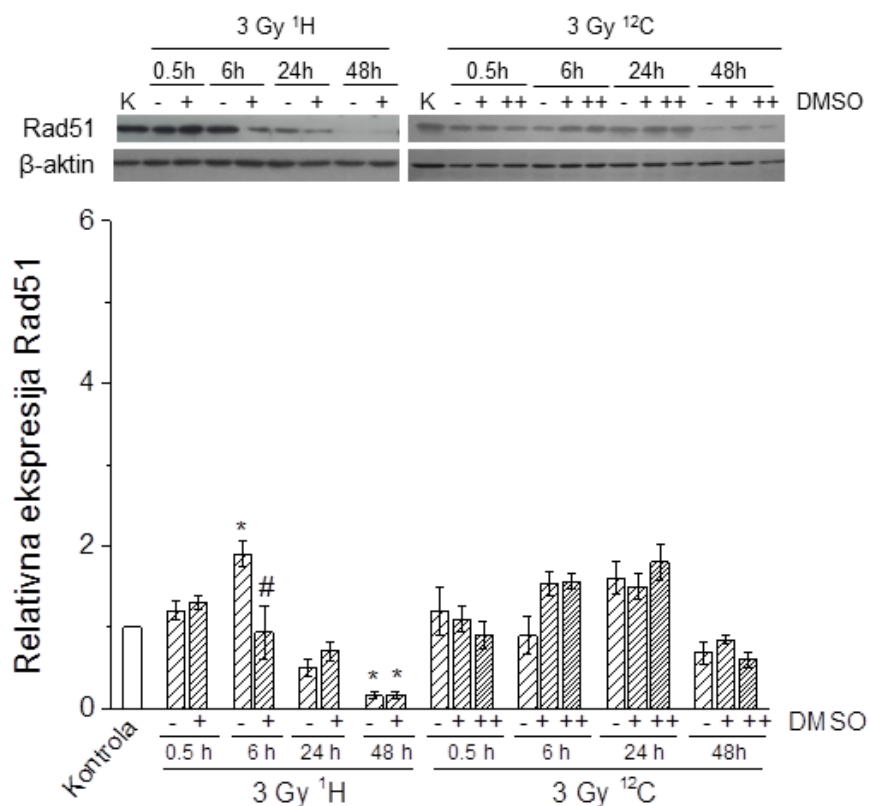
zračenje, ali bez statističke značajnosti. Nakon zračenja jonima ugljenika, uočava se blagi porast nivoa ATR, ali ova promena nije bila značajna u poređenju sa kontrolom (Slika 44).



Slika 44. Relativna ekspresija ATR u HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu.

Promena nivoa Rad51 proteina u HTB177 ćelijama je prikazana na Slici 45. Protonsko zračenje je nakon 6 h izazvalo porast ekspresije Rad51 proteina u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). U ovoj vremenskoj tački, DMSO je doveo do značajnog sniženja nivoa Rad51 u odnosu na samo zračenje ($p < 0.05$). Nakon inkubacionog perioda od 48 uočen je pad proteinske ekspresije u ozračenim ćelijama u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). U uzorcima ozračenim jonima ugljenika,

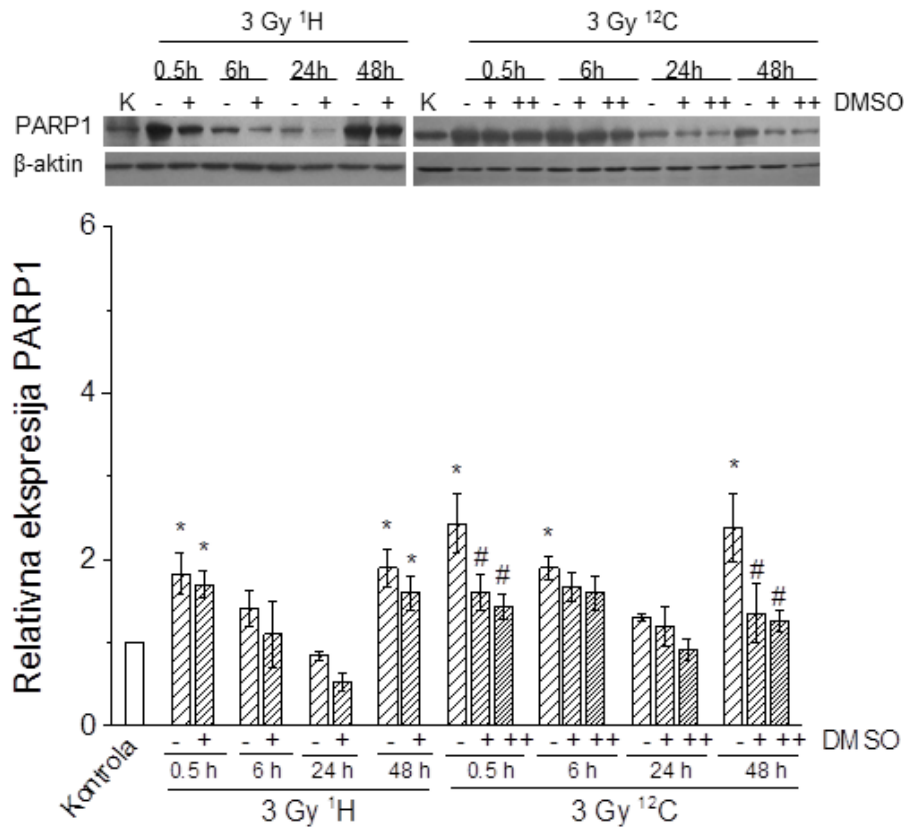
izuzev blagog povećanja nakon 24 h, nisu uočene značajne promene ekspresije Rad51 proteina (Slika 45).



Slika 45. Relativna ekspresija Rad51 u HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *,\$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja.

Porast PARP1 proteina je detektovan 0.5 h 48 h nakon zračenja protonima i jonima ugljenika u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Takođe, u uzorcima ozračenim jonima ugljenika, povećane vrednosti PARP1 proteina se uočavaju u 6 h nakon zračenja ($p < 0.05$). U ostalim uzorcima, nivo PARP1 proteina se kretao blizu kontrolnih vrednosti. Pretretman DMSO je smanjio

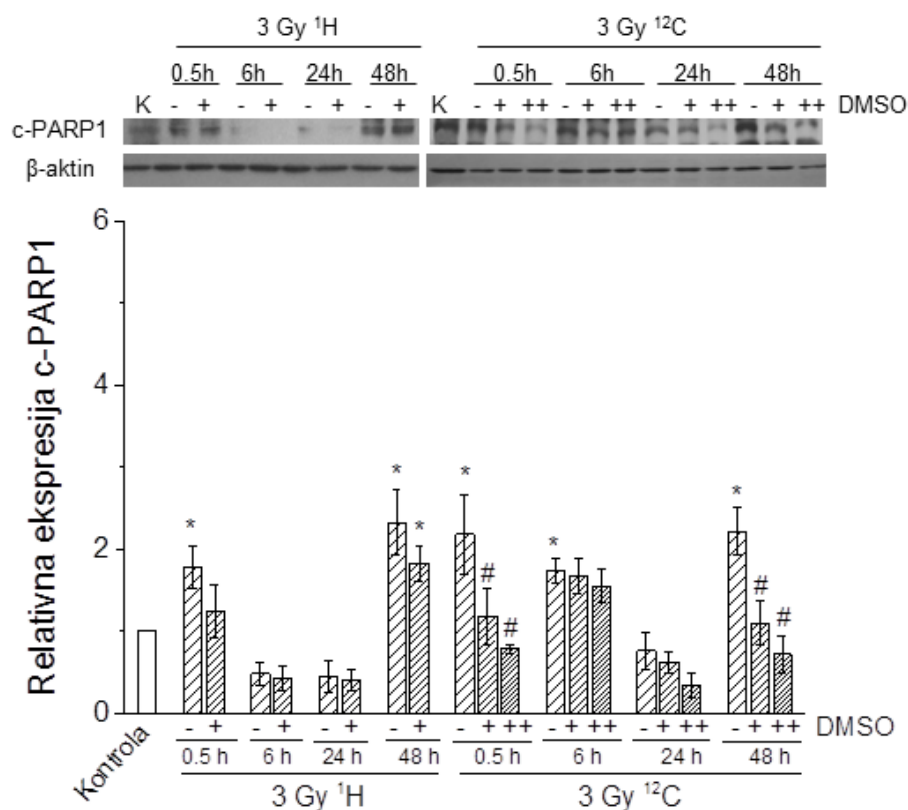
nivo proteina u odnosu na zračenje jonima ugljenika u vremenskoj tački od 0.5 h i 48 h ($p < 0.05$) (Slika 46).



Slika 46. Relativna ekspresija PARP1 u HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β -aktin – interna kontrola. K – kontrola. *, \$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost kombinovanog tretmana u odnosu na efekte zračenja.

Zračenje protonima je u HTB177 ćelijama povećalo ekspresiju c-PARP 0.5 h i 48 h nakon zračenja u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Snažniji odgovor ćelija je uočen u prisustvu jona ugljenika, gde je nivo c-PARP1 proteina povećan nakon 0.5 h, 6 h i 48 h u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Ovo ukazuje na prisustvo signala za apoptozu u HTB177 ćelijama posle ozračivanja

jonima ugljenika. U prisustvu DMSO zapaženo je smanjenje nivoa proteina u odnosu na samo zračenje, što je posebno izraženo 0.5 h i 48 h posle zračenja jonima ugljenika ($p < 0.05$) (Slika 47).



Slika 47. Relativna ekspresija c-PARP1 u HTB177 ćelijama nakon zračenja protonima i jonima ugljenika. Ćelije su ozračene dozom od 3 Gy u odsustvu/prisustvu DMSO, a proteinska ekspresija je analizirana nakon 0.5, 6, 24 i 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. β-aktin – interna kontrola. K – kontrola. *,\$ $0.01 < p < 0.05$. * – statistička značajnost u odnosu na kontrolu; # – statistička značajnost između zračenja i pretretirana sa DMSO.

5. DISKUSIJA

Radiobiologija igra ključnu ulogu u dijagnostici i terapiji kancera, kao i zaštiti od zračenja. Osnovna saznanja iz radiobiologije su takođe korisna kod procene rizika od kancerogeneze usled izloženosti zračenju kod različitih profesionalnih aktivnosti, uključujući svemirska putovanja (Meylan i sar. 2017). S obzirom na to da je glavni cilj radioterapije kontrola rasta tumora sa minimalnim uticajem na zdrava tkiva, da bi se postigla ova ravnoteža, fundamentalni odgovor na zračenje u normalnim i tumorskim ćelijama moraju biti temeljno istraženi (Chailapakul i Kato 2022). Zračenje težim česticama, koje predstavlja inovacioni pristup u radioterapiji jer nudi mogućnost da se sa većom preciznošću deluje na tumor, zasniva se na principima koja su predmet izučavanja radiobiologije. Takođe, radiobiološki podaci se koriste i prilikom Monte Karlo simulacija uticaja zračenja na ćelije i tkiva, doprinoseći na taj način preciznom planiranju terapije (Sakata i sar. 2020).

U ovom radu postavljeno je nekoliko ciljeva. S obzirom na sve veću učestalost karcinoma pluća i karcinoma dojke u populaciji i neophodnost novih strategija u lečenju ove bolesti, prvi cilj je bio ispitivanje efikasnosti hadronskog zračenja, tj. protona i jona ugljenika, na ove tipove kancera *in vitro*. Kao model sistem, na osnovu podataka iz literature, izabrane su ćelijske linije sa visokim malignim potencijalom (Park i sar. 2010; Howell i sar. 2014). Drugi cilj ovog istraživanja odnosi se na postavljanje eksperimentalnih uslova za validaciju Monte Karlo simulacija i njihovo potencijalno unapređenje. U tom smislu, da bi se indirektni efekti delovanja zračenja sveli na minimum i tako utvrdila tačnost simuliranih događaja nastalih kao posledica direktnih oštećenja na DNK, ispitivan je efekat sakupljača slobodnih radikala koji su prema podacima iz literature imali najveći radioprotektivni potencijal. Za treći cilj postavljeno je ispitivanje bioloških efekata primene pomenutih tipova zračenja kao i implikacije istovremene primene zračenja i radioprotektora, pre svega na nivou regulacije ćelijskog ciklusa, apoptoze i ekspresije ostalih proteina uključenih u DDR. Očekuje se da rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj tezi doprinesu fundamentalnim saznanjima iz oblasti odgovora humanih malignih ćelija na zračenje, kao i da dopune postojeće baze podataka neophodne za povezivanje ranih oštećenja DNK i kasnih efekta zračenja, a koja čine osnovu za unapređenje postojećih radioterapijskih protokola.

Primena protona u radioterapiji smanjuje rizik od oštećenja okolnih, zdravih tkiva što je čini pogodnom za lečenje tumora koji se nalaze u blizini kritičnih struktura kao što su kičmena moždina, srce, mozak, kao i kod pedijatrijskih tumora gde postoji rizik od sekundarnih maligniteta. Iako su rezultati protonske radioterapije kod pacijenata obolelih od kancera pluća i dojke prilično obećavajući, a imajući u vidu i njenu visoku cenu, neophodne su dodatne prekliničke i kliničke studije da bi se ona uvrstila u standardnu terapijsku praksu (Vyfhius i sar. 2018; Paganetti i sar. 2019; Mutter i sar. 2021). Joni ugljenika, koje karakteriše veći LET u odnosu na protone, su takođe potencijalno korisni u terapiji kancera dojke i pluća. Međutim, terapija jonima ugljenika je tehnicki veoma zahtevna, pa je njihova šira primena u lečenju ovih tipova kancera još uvek u fazi razvoja (Malouff i sar. 2020; Zhang i sar 2020).

Rezultati ispitivanja osetljivosti ćelija na γ -zračenje, kao i na zračenje protonima i jonima ugljenika koji su opisani u poglavlju 4.2.1. i 4.3.1, sugerišu visoku otpornost testiranih ćelijskih linija na primenjene tipove zračenja. Naime, prema kriterijuma za određivanje stepena ćelijske radioosetljivosti, gde se kao referentno zračenje koristilo fotonsko zračenje, ćelije sa vrednostima $SF_2 > 0.4$ svrstavaju se u radiorezistentne, dok se ćelije sa $SF_2 < 0.4$ smatraju radioosetljivim (Björk-Erickson i sar. 2000). Dobijene vrednosti SF_2 od ~ 0.67 i ~ 0.64 za MCF-7 i HTB177 ćelije, respektivno, ukazuju na sličan stepen radioosetljivosti na γ -zračenje čime se iste mogu svrstati u radiorezistentnu grupu ćelijskih linija. Uzimajući u obzir da se rezultati dobijeni u ovoj studiji nalaze u opsegu SF_2 vrednosti već publikovanih za ove ćelijske linije, može se zaključiti da je potvrđena njihova pozicija na skali radioosetljivosti (Sak i sar. 2005; Liu i sar. 2015; Matthews i sar. 2011).

Na osnovu podataka dobijenih istraživanjima *in vitro* moguće je zaključiti da ćelije kancera dojke različito reaguju na ozračivanje protonima. Tako je u studiji gde je testirano 14 ćelijskih linija kancera dojke, utvrđeno da SF_2 vrednosti nakon primene protona variraju u opsegu od 0.28 do 0.68 (Chio i sar. 2019). Vrednosti SF_2 ustanovljene za MCF-7 ćelije korišćene u ovoj studiji iznosile su 0.45 i bliske su vrednostima koje su zabeležene kod drugih tipova kancera dojke (Bravata i sar. 2019). Što se tiče ćelija kancera pluća, HTB 177 ćelije su bile nešto osetljivije na zračenje protonima od MCF-7 ćelija ($SF_2=0.35$). U eksperimentalnim uslovima primenjenim u ovoj studiji, izračunate vrednosti RBE_{D10} ukazuju na veću efikasnost jona ugljenika kod obe ćelijske linije u odnosu na protone, gde su RBE_{D10} vrednosti iznosile 2.13 i 1.47 kod MCF-7 ćelija,

odnosno 2.75 i 1.57 kod HTB177 ćelija (Tabele 4 i 5), za jone ugljenika i protone, respektivno. Druge ćelijske linije kancera pluća, kao što su CRL5876 i A549, u sličnim eksperimentalnim uslovima pokazale su veću otpornost na zračenje protonima ali su bile nešto osjetljivije od HTB177 ćelija na tretman jonima ugljenika (Ghosh i sar. 2011; Keta i sar. 2017; Dordevic i sar. 2023).

Rezultati klonogenog preživljavanja MCF-7 i HTB177 ćelija mogu se dovesti u vezu sa dinamikom reparacije γ H2AX fokusa nakon zračenja. Naime, rezidualni fokusi, koji se detektuju nakon 24 h ukazuju na prisustvo oštećenja koja prevazilaze kapacitet reparacionih mehanizama ćelije i mogu se uzeti kao indikator gubitka sposobnosti ćelije da formira koloniju (Dikomey i sar. 1998; Rogakou i sar. 1998; Banáth i sar. 2004). Prema dobijenim rezultatima, nešto jači odgovor na oba tipa zračenja imale su HTB177 ćelije u poređenju sa MCF-7 ćelijama (Slike 28 i 29), što je u korelaciji sa rezultatima klonogenog preživljavanja i odgovarajućim radiobiološkim parametrima (SF2 i RBE_{D10}) dobijenih sa krive preživljavanja (Slike 28 i 29; Tabele 4 i 5). Radiobiološki parametri izvedeni iz klonogenog preživljavanja pokazuju značajno veći efekat jona ugljenika u poređenju sa protonima, što nije ustanovljeno na osnovu broja rezidualnih γ H2AX fokusa. Iako su razlike u broju ovih fokusa nakon primene protona i jona ugljenika prilično male i mogu delovati neočekivano, pokazano je da se broj DSB ne povećava uvek sa povećanjem LET. Naime, zračenje visokog LET često povećava složenost DSB, kroz proizvodnju kompleksnih lezija u okviru kratke razdaljine na DNK (tzv. klaster DNK oštećenja) sačinjenih od SSB, DSB i oštećenja baza (Mavragani i sar. 2017; Nikitaki i sar. 2016). Ovaj efekat može da utiče na interpretaciju rezultata kod ćelija koje su ozračene težim česticama visokog LET, jer blisko postavljani fokusi mogu dovesti do preklapanja fluorescentnog signala, a shodno tome i detekcije manjeg broja dvolančanih lezija (Kazmireck et al. 2015). Međutim, kao što se može videti na priloženim mikrografijama, izgled i veličina fokusa formiranih nakon zračenja jonima ugljenika se razlikuje od onih nastalih nakon zračenja protonima (Slike 30 i 31). Ovi fokusi su često krupniji, nepravilnog oblika i sa nejasno definisanim granicama (Costes i sar. 2006; Jakob i sar. 2009). S obzirom na opisani fenomen, jedan od načina kojim bi se steklo više uvida u proces DDR i odgovor ćelija na zračenje visokog LET mogao bi da bude analiza kolokalizacije proteinskih markera uključenih u ove procese metodom fluorescentne mikroskopije (Nikitaki i sar. 2016). Takođe, složenost lezija izazvanih zračenjem visokog LET bi trebalo uzeti u obzir prilikom poređenja rezultata sa numeričkim simulacijama. Kada su u pitanju protoni, očekuje se bolje slaganje između

dobijenih eksperimentalnih rezultata i numeričkih simulacija, zbog toga što potiču iz jednostavnije raspodele tragova.

In vitro eksperimenti sa ozračivanjem ćelija kancera i zdravih ćelija snopovima fotona i težih čestica, u poslednjih nekoliko decenija praćeni su intenzivnim razvojem Monte Carlo simulacija kako bi se modelovali efekti koje zračenje ima na ćelije i na DNK. Kako bi se rezultati simulacija poredili sa rezultatima bioloških merenja, u fokusu su posebno određivanje klonogenog preživljavanja i prebrojavanje γ H2AX fokusa. Programski paketi KURBUC (Nikjoo i sar. 2016) i PARTRAC (Friedland 2011) najpre su modelirali hromosome, a onda i humane ćelije fibroblasta. Zatim su razvijeni napredniji softverski alati za modelovanje geometrija ćelija i DNK molekula, kao što su paketi Geant4 i Geant4-DNA. Ovi paketi su otvorenog pristupa i dostupni su široj naučnoj, kao i stručnoj zajednici. Počevši od aplikacije „Hadrontherapy“ za simulaciju linije snopa protona na instalaciji CATANA u INFN-LNS, Katanija, Italija (Cirrone i sar. 2011), a onda i snopa težih čestica, jona ugljenika, jona helijuma, kao i kiseonika (Petringa i sar. 2018). U prošloj deceniji došlo je do razvoja niza aplikacija za simulaciju uticaja zračenja na nivou ćelija i DNK molekula. Poslednja od tih aplikacija, „molecularDNA“, javno je dostupna od decembra 2022, kao deo Geant4 alata (Chatzipapas i sar. 2023). Ova aplikacija pruža mogućnost izgradnje verodostojnih geometrija DNK lanaca počev od fraktala kao jediničnih elemenata (Lampe i sar. 2018). Takođe, ista aplikacija može da simulira fizičku (direktnu), kao i hemijsku (indirektnu) fazu ozračivanja DNK do konačnih ishoda koji su raspodele jednostrukih i dvostrukih prekida, fragmenata DNK nakon ozračivanja i raspodele popravke DNK molekula u vremenu (Dordevic i sar. 2023).

Aplikacija „molecularDNA“ u svojoj sekvenci započinje najpre fizičkom fazom, odnosno direktnim efektima. U toj direktnoj fazi dominiraju elektromagnetski procesi interakcija čestica sa molekulima DNK. Ova faza praćena je hemijskom, tj. radiolitičkom fazom, koja traje znatno duže od prethodne, fizičke faze ozračivanja. Te dve faze na kraju dovode do biološkog efekta – prekida u DNK molekulu. Stoga je neophodno njihovo precizno modelovanje radi potpunijeg razumevanja efekata koji se dešavaju na tim veoma malim skalama. Fizička faza, kao inicijalna, ključna je za predviđanje, tj. za modelovanje ovih procesa. Zaustavljanje indirektnih efekata u samom eksperimentu, u određenoj ili u potpunoj meri, omogućila bi testiranje i validaciju fizičke faze zračenja upotrebom aplikacije „molecularDNA“. To je bio i jedan od najužih ciljeva ove

disertacije zato što je navedena aplikacija jedna od najnovijih, do sada najpreciznijih programskih paketa za potpunu simulaciju geometrija i ozračivanja DNK.

Studije su pokazale da se nekoliko tipova jedinjenja mogu koristiti u svrhu eliminacije indirektnih efekata zračenja. Na osnovu literaturnih podataka, u ovom radu su, kao potencijalni radioprotektivni agensi, izdvojeni DMSO i glicerol (Millar i sar. 1981; Limoli i sar. 2000; Hirayama i sar. 2009; Petković i sar. 2019). Iako su oba agensa pokazala solidan efekat u neutralizaciji slobodnih radikala nastalih prilikom ozračivanja γ -zracima, za dalje eksperimente korišćen je DMSO, zbog toga što se glicerol pri višim koncentracijama pokazao toksičnim po ćelije (Slika 10 i 11). Za određivanje stepena zaštite nakon primene DMSO, kao i udela direktnih, odnosno indirektnih efekata sva tri tipa zračenja, korišćen je metod opisan u literaturi (Hirayama i sar. 2009). Protektivni efekat DMSO izražen kroz DP vrednosti, je u ovoj studiji relativno visok i sličan je onom utvrđenom od strane drugih autora. Naime, DP vrednost nakon primene 500 mM DMSO na V79 i AA8 ćelije kineskog hrčka kao i na HeLa ćelije ozračenim X zracima, iznosila je ~ 0.6 , što je blisko vrednostima dobijenim za MCF-7 i HTB177 ćelije (Shinohara i sar. 1996; Ito i sar. 2006, Hirayama i sar. 2009). Uzevši u obzir rezultate dobijene u eksperimentima sa fotonima, može se zaključiti da DMSO, kao radioprotektivni agens pokazuje sličan stepen zaštite na različitim tipovima ćelijskih linija što ga čini pogodnim za korišćenje u kombinaciji sa protonima i jonima ugljenika u svrhu određivanja direktnih i indirektnih efekata zračenja.

Na osnovu dobijenih rezultata, nakon ozračivanja MCF-7 i HTB177 ćelija γ -zracima, značajno veći doprinos ostvarili su indirektni efekti koji su iznosili 63-65% od ukupnih efekata zračenja. Ovaj rezultat je bio očekivan na osnovu literaturnih podataka (Roots i Okada, 1972; Chapman i sar. 1979; Shinohara i sar. 1996). Što se tiče procentualne zastupljenosti direktnih i indirektnih efekata nakon zračenja protonima i jonima ugljenika, udeo direktnih i indirektnih efekata je bio približno isti za oba tipa zračenja, kako kod MCF-7, tako i kod HTB177 ćelija (Tabela 8 i 9). Prema podacima iz literature, nešto veći udeo indirektnih efekata nakon zračenja karbonskim jonima dobijen je za V79 ćelije (65%), što se može objasniti nižim LET primenjenim u ovoj studiji. Međutim, kada su iste ćelije ozračene jonima gvoždja sa vrednostima LET od 200 keV/ μm , a koje su primenjene i na MCF-7 i HTB177 ćelije, udeo indirektnih efekata je bio sličan i iznosio je $\sim 50\%$ (Hirayama i sar. 2009). Pokazano je takodje, da je za vrednosti LET-a od oko 200 keV/ μm , kod primene drugih jona kao što je silicijum, udeo direktnih efekata zračenja nešto

viši (~65%) u odnosu na vrednosti dobijenim za MCF-7 i HTB177. Razlike u dobijenim vrednostima se mogu objasniti različitim eksperimentalnim uslovima, kao i razlikama u prirodnoj radioosetljivosti ćelija korišćenih u ovoj studiji (Ito i sar. 2009).

Iako se pri maksimalnim, netoksičnim koncentracijama DMSO, ne mogu u potpunosti eliminisati indirektni efekti zračenja s obzirom na to da njegova primena dovodi i do značajnog smanjenja broja γ -H2AX fokusa nakon γ -zračenja kod obe ćelijske linije (Slika 14 i 15), može se zaključiti da on poseduje dobre sposobnosti za uklanjanje slobodnih radikala i da se zato može koristiti za smanjenje indirektnih efekti zračenja.

Biološki odgovor testiranih ćelijskih linija na primenjene tretmane je dalje posmatran kroz varijacije u ćelijskom ciklusu i proteinskoj ekspresiji relevantnih proteina. Prvo je analiziran odgovor ćelija na referentno, γ -zračenje.

Što se tiče MCF-7 ćelija, γ -zračenje je dovelo samo do blagog porasta broja ćelija u S fazi, dok se broj ćelija u G1 fazi nije značajno promenio u odnosu na kontrolu (Slika 16). Kako bi se dodatno ispitali efekti γ -zračenja na ćelijski ciklus, praćena je relativna ekspresija ciklina D1 i p21 proteina, zbog toga što od promene u nivou ekspresije ovih proteina pod uticajem DNK oštećenja zavisi i dinamika prolaska kroz ćelijski ciklus (Alao 2007). Naime, u prisustvu genotoksičnog stresa, ciklin D1 se degraduje, dok nivo p21 proteina raste, što za posledicu ima zastoje u G1 fazi (Agami i Bernardis 2000; Alao 2007). S obzirom na to da se u uzorcima MCF-7 ćelija koje su bile izložene γ -zračenju detektovalo povećanje ciklina D1 i p21 (Slika 17), kao i da analizom ćelijskog ciklusa nije uočen G1 blok (Slika 16), može se zaključiti da MCF-7 ćelije nastavljaju sa deobom 48h nakon zračenja. Da bi se stekao bolji uvid u ovakav odgovor ćelija, analizirana je i relativna ekspresija γ H2AX, Rad51 i PARP1 proteina, koji se smatraju odgovornim za ključne procese u DDR signalnim putevima. PARP1, koji prepoznaje i vezuje se SSB, poslužio je kao pokazatelj reparacije SSB (Lord i Ashworth 2012), dok Rad51 igra značajnu ulogu u ranoj fazi HR i može da posluži kao marker ovog tipa DNK reparacije (Srivastava i Raghavan 2015). U MCF-7 ćelijama, nivo PARP1 proteina se nije značajno promenio nakon ozračivanja γ -zracima, dok je ekspresija Rad51 porasla, što ukazuje na to da je stimulisan HR put i da on igra važnu ulogu u DDR procesu u ovim ćelijama (Slike 21 i 22). Takođe, postepen pad γ H2AX tokom 48 h nakon zračenja ukazuje na to da ćelije uspešno popravljaju većinu DSB oštećenja (Slika 20).

Odgovor HTB 177 ćelija na γ -zračenje je bio drugačiji u odnosu na MCF-7 ćelije. Naime, za razliku od MCF-7 ćelija, HTB177 ćelije su se zaustavile u G1 fazi ćelijskog ciklusa nakon γ -zračenja (Slika 18). Ovo je potvrđeno analizom proteinske ekspresije koja je pokazala da je γ -zračenje u HTB177 ćelijama izazvalo degradaciju ciklina D1 i povećanje nivoa p21 proteina (Slika 19). Analiza ključnih proteina koji učestvuju u popravci DNK oštećenja, takođe je pokazala da HTB177 ćelije imaju drugačiji odgovor u poređenju sa MCF-7 ćelijama. Naime, γ -zračenje je dovelo do porasta nivoa PARP1, dok se nivo Rad51 proteina nije značajno promenio što ukazuje na to da HR nije aktivirana u prisustvu DSB kod HTB177 ćelija (Slike 25 i 26). Pored uloge u reparaciji SSB, pokazano je da PARP1 učestvuje i u popravci DSB tako što aktivira proteine NHEJ ili HR signalnog puta (Chaudhuri i Nussenzweig 2017; Ronson i sar. 2018). Koji će mehanizam za popravku DSB biti odabran, zavisi od faze ćelijskog ciklusa i dostupnosti ključnih proteina NHEJ, odnosno HR signalnog puta (Chaudhuri i Nussenzweig 2017). Uzevši u obzir rezultate ćelijskog ciklusa, gde se uočava G1 zastoj (Slika 18), kao i analizu nivoa Rad51 proteina, koji je bio u nivou kontrole (Slika 26), može se pretpostaviti da je u HTB177 ćelijama za popravku DSB bio aktiviran NHEJ signalni put. Kada se uzmu u obzir različiti profili proteinske ekspresije, kao i profili ćelijskog ciklusa, može se zaključiti da γ -zračenje pokreće različite mehanizme popravke DNK u testiranim ćelijama.

Da bi se odredilo u kojoj meri apoptoza doprinosi zapaženoj inaktivaciji ćelija nakon primene γ -zračenja, analiziran je odnos pro-apoptotskog proteina Bax i anti-apoptotskog proteina Bcl-2 (Reed 1994). Na osnovu rezultata koji je pokazao da se kod obe ćelijske linije odnos Bax/Bcl-2 ne menja značajno u odnosu na kontrolu (Slike 23 i 27), može se zaključiti da apoptoza nije dominantan oblik ćelijske smrti kod ovih ćelija, a da su zapaženi efekti zračenja verovatno posledica aktivacije drugih tipovi ćelijske smrti na dužim vremenskim tačkama, kao što su mitotska katastrofa, senescencija i autofagija (Jiao i sar. 2022).

Što se tiče efekata primene DMSO, pretretman ovim agensom je smanjio broj ćelija u G1 fazi kod HTB177, ali ne i kod MCF-7 ćelija (Slike 16 i 18). Međutim, s obzirom na to da se u prisustvu DMSO i kod MCF-7 i HTB177 ćelija beleži visok nivo ciklina D1 i p21 proteina (Slika 17 i 19), kao i da smanjen broj DSB (Slike 20 i 24), može se zaključiti da je pretretman DMSO ostvario radioprotektivan efekat u obe ćelijske linije.

Nakon analize odgovora na γ -zračenje, praćen je efekat zračenja težim česticama na obe ćelijske linije. Analiza ćelijskog ciklusa MCF-7 ćelija pokazala je da protoni dovode do akumulacije ćelija u G1 fazi, dok su joni ugljenika su ostvarili efekat kroz porast subG1 faze i aktivacije apoptoze (Slika 32A i B). Ovi rezultati su dodatno podržani rezultatima relativne ekspresije ciklina D1, p21 i odnos Bax/Bcl-2 proteina (Slika 33A i B; Slika 33C i Č). U odnosu na MCF-7 ćelije, HTB177 ćelije su snažnije odgovorile na oba tipa zračenja sa značajnom akumulacijom ćelija u subG1 fazi praćenom porastom Bax/Bcl-2 (Slika 34; Slika 35C i Č). Za razliku od jona ugljenika, protonsko zračenje je dovelo do neznatnog porasta nivoa Bax/Bcl-2 odnosu na kontrolu (Slika 35C i Č) pa se povećanje subG1 faze u ovom slučaju može objasniti pokretanjem drugih tipova ćelijske smrti.

Kako bi se stekao bolji uvid u odgovor testiranih ćelija na zračenje protonima i jonima ugljenika, dodatno je analizirana relativna ekspresija još nekoliko proteina uključenih u popravku DSB: DNA-PK, ATR, i c-PARP1 proteina. Pokazano je da u odgovoru na DSB, DNA-PK dovodi do aktivacije γ H2AX i usmerava popravku DSB ka NHEJ signalnom putu (Sharma i sar. 2012), dok je nivo ATR povišen tokom HR (Sivastava i Raghvan 2015). U prisustvu snažnog genotoksičnog stresa, PARP1 protein, koji ima ulogu u popravci SSB i DSB, može podleći proteolitičkoj razgradnji od strane kaspaza 3 i 7 (Chaitanya i sar. 2010). U ovom procesu nastaju dve forme isečenog PARP1 proteina različitih molekulskih masa (*eng.* cleaved PARP1, cPARP1), od kojih se cPARP1 od 24 kD vezuje za DNK i zaustavlja popravku oštećenja, dok cPARP1 od 89 kDa pokreće proces apoptoze u citoplazmi (Mashimo i sar. 2021). Zahvaljujući svojoj ulozi, cPARP1 protein se može koristiti kao pokazatelj apoptoze (Qvarnström i sar 2009; Mashimo i sar. 2021). Rezultati analize relativne proteinske ekspresije pokazali su da zračenje protonima i jonima ugljenika dovodi do povećanja nivoa γ H2AX i DNA-PK proteina kod obe ćelijske linije, što ukazuje na pokrenut NHEJ put popravke DSB (Slika 36 i 37; Slika 42 i 43). Porast c-PARP1 proteina ukazuje na formiranje određenog broja letalnih oštećenja neposredno nakon zračenja protonima i jonima ugljenika, kao i aktivacije apoptoze u prisustvu rezidualnih DSB (Slika 41).

Rezultati ćelijskog ciklusa i proteinske ekspresije su pokazali da je protektivna uloga DMSO bila manje izražena kada je on bio primenjen sa protonima i jonima ugljenika nego sa γ -zračenjem. Ovo se može objasniti većim udelom direktnih oštećenja nastalih pod uticajem zračenjem težim česticama u odnosu na fotone (Tabela 5, 8 i 9).

Kliničke studije su pokazale da zračenje protonima i jonima ugljenika ostvaruje bolje efekte u odnosu na terapiju fotonima i da je pogodno da bude primenjeno u terapiji kancera pluća, dok je zračenje protonima i jonima ugljenika za tretman kancera dojke još uvek u fazi kliničkih ispitivanja (Vyfhuis i sar. 2018; Zhang i sar. 2020; Malouff i sar. 2021). Osnovna istraživanja na modelu kancera dojke i pluća imaju za cilj da se stekne uvid u mehanizme odgovorne za radioosetljivost ovih ćelija, s obzirom da su mehanizmi putem kojih se realizuje biološki odgovor nakon ozračivanja teškim jonima još uvek nedovoljno poznati. Proučavanje efekata zračenja ogleda se u ispitivanju efikasnosti, tj. benefitima koje teže čestice pružaju u odnosu na konvencionalno zračenje, posebno u smislu smanjenja rizika od neželjenih efekata (Tinganelli i Durante 2020).

Eksperimentalni metodi i tehnike koje su opisane, razmatrane i demonstrirane u ovoj disertaciji, mogu se, posebno u svetlu novih Monte Carlo kodova kao što je aplikacija "molecularDNA" kao deo Geant4 alata, iskoristiti za validaciju određenih aspekata simulacije. Konkretno, jedinjenja kao što je DMSO, koji u određenoj meri smanjuju indirektnu, radiolitičku fazu simulacije, mogu doprineti unapređenom modelovanju fizičke faze ozračivanja. To bi dovelo do preciznijeg modelovanja fundamentalnih procesa uticaja zračenja na ćelije i na DNK, što je neophodna osnova za dalju primenu u izvođenju i unapređenju terapije zračenjem. Takođe, aplikacija "molecularDNA" ima mogućnost za modelovanje reparacije DNK i to numeričkim rešavanjem diferencijalnih jednačina (Belov i sar. 2015). Mehanizam popravke DNK oštećenja može se razlikovati između ćelijskih linija i podrazumeva aktivaciju složenog DDR puta. Istraživanja u domenu DDR su značajna zbog toga što od mehanizama popravke i strategije koju ćelija primenjuje nakon oštećenja zračenjem niskog i visokog LET zavisi efikasnost terapije. Saznanja o tome koji je signalni put za popravku oštećenja aktivan u određenom tipu kancera će omogućiti primenu specifičnih inhibitora NHEJ ili HR puta, čime će se povećati efikasnost radijacione terapije (Tinganelli i Durante 2020). Kako bi postojeći model bio što verodostojniji, u njega je potrebno uvrstiti podatke o različitim ćelijskim linijama, promenama na nivou ćelijskog ciklusa i mehanizmima popravke DNK (Shin i sar. 2022). Unapređenje modela kroz validaciju sa novim eksperimentalnim rezultatima će omogućiti efikasno planiranje radioterapije i predviđanje rizika od neželjenih efekata zračenja (Meylan i sar. 2017). Posebno, novoobjavljena aplikacija "molecularDNA" može biti testirana u smislu provere verodostojnosti simulacije fizičke faze ozračivanja ćelija, direktnim poređenjem sa rezultatima koji se dobijaju primenom DMSO, a koji

inhibiraju, u datoj meri, indirektne efekte. Pored toga, eksperimentalni podaci predstavljeni u ovoj tezi predstavljaju dobru osnovu i mogu se upotrebiti za unapređenje modelovanja mehanizma reparacije DNK, posebno pomoću aplikacije „molecularDNA“ koja te procese može da simulira.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima u ovoj doktorskoj disertaciji, na osnovu navedenih rezultata, zaključeno je da:

- Zračenje protonima i jonima ugljenika je povećalo radioosetljivost ćelija MCF-7 i HTB177, koje prema radiobiološkim parametrima pripadaju radiorezistentnim ćelijskim linijama. Veću radiobiološku efikasnost su ispoljili joni ugljenika u odnosu na protone, što govori u prilog njihovoj upotrebi u tretmanu adenokarcinoma dojke i nesitnoćelijskog karcinoma pluća.
- Veća efikasnost jona ugljenika u poređenju sa protonima, koja je pokazana kroz analizu ćelijskog preživljavanja, ćelijskog ciklusa i ekspresiju ključnih regulatornih proteina DDR signalnog puta, može se dovesti u vezu sa nastankom složenih oštećenja na DNK.
- Kombinovani tretman DMSO kao sakupljačem slobodnih radikala i zračenjem težim česticama, pokazao je da DMSO ostvaruje radioprotektivni efekat kroz povećanje ćelijskog preživljavanja i smanjenje broja DSB. Na ovaj način su postignuti uslovi za praćenje direktnih efekata zračenja. Slabiji protektivni efekat DMSO nakon zračenja protonima i jonima ugljenika u odnosu na γ -zračenje se može dovesti u vezu sa većim procentualnim udelom direktnih efekata, prisutnim kod visokojonizujućeg zračenja.
- Postavljeni eksperimentalni uslovi daju mogućnost za poređenje biološkog odgovora kancerskih ćelija sa numeričkim simulacijama, koje su neophodne radi unapređenja postojećih terapijskih protokola i povećanja efikasnosti radioterapije. Imajući u vidu najnoviji i od nedavno javno dostupan softverski paket „molecularDNA“ u okviru Geant4 alata, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji postaju još više aktuelni, posebno kad se radi o validaciji direktnih efekata zračenja i razumevanja procesa koji leže u osnovi ćelijskog odgovora na zračenje.

Literatura

[IAEA] International atomic energy agency. 2000. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy. IAEA Technical Report Series. Vienna:IAEA.

[IAEA] International atomic energy agency. 2010. Radiation biology: a handbook for teachers and students. Viena: IAEA.

Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Canc.*, 9(6): 400-414.

Adams JM, Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26(9):1324-1337.

Agami R, Bernards R. 2000. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell*. 102(1):55–66.

Alao JP. 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*. 6:24.

Allison RR, Patel RM, McLawhorn RA. 2014. Radiation oncology: Physics advances that minimize morbidity. *Futur Oncol*. 10(15):2329–2344.

Al-thoubaity FK. 2020. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Ann Med Surg*. 49:44–48.

Amaldi U, Kraft G. 2005. Radiotherapy with beams of carbon ions. *Reports Prog Phys*. 68(8):1861–1882.

Aramini B, Banchelli F, Bettelli S, Manfredini S, D'Amico R, Masciale V, Pinelli M, Moretti M, Stefani A, Bertolini F, et al. 2020. Overall survival in patients with lung adenocarcinoma harboring "niche" mutations: an observational study. *Oncotarget*. 11(5), 550–559.

Banáth JP, Klovov D, Macphail SH, Banuelos CA, Olive PL. 2010. Residual γ H2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *10(4)*:1-12.

Banáth JP, MacPhail SH, Olive PL. 2004. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res*. 64:7144–7149.

Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh K-W. 2014. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci*. 1:1–9.

Belli M, Bettega D, Calzolari P, Cherubini R, Cuttone G, Durante M, Esposito G, Furusawa Y, Gerardi S, Gialanella G, et al. Effectiveness of monoenergetic and spread-out Bragg peak carbon-ions for inactivation of various normal and tumour human cell lines. *J Radiat Res* 2008; 49:597-607.

- Belov O V., Krasavin EA, Lyashko MS, Batmunkh M, Sweilam NH. 2015. A quantitative model of the major pathways for radiation-induced DNA double-strand break repair. *J Theor Biol.* 366:115–130.
- Beňačka R, Szabóová D, Guľašová Z, Hertelyová Z, Radoňák J. 2022. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 14(21):5444.
- Bernhard EJ, Maity a, Muschel RJ, McKenna WG. 1995. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. A review. *Radiat Env Biophys.* 34:79–83.
- Bertoli C, Skotheim JM, De Bruin RAM. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(8):518–528.
- Björk-Eriksson T, West C, Karlsson E, Mercke C. 2000. Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 46(1):13–19.
- Blackford AN, Jackson SP. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol Cell.* 66(6):801–817.
- Böcker W, Iliakis G. 2006. Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat Res.* 165(1):113–124.
- Boulefour W, Rowinski E, Louati S, Sotton S, Wozny AS, Moreno-Acosta P, Mery B, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. 2021. A review of the role of hypoxia in radioresistance in cancer therapy. *Med Sci Monit.* 27:1–7.
- Bourland JD. 2015. Radiation Oncology Physics. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical radiation oncology.* 4th ed. [place unknown]: Elsevier Inc; 93-147.e3.
- Brandsma I, Gent DC. 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.*3(1):9.
- Bravata V, Cammarata FP, Minafra L, Pisciotta P, Scazzone C, Manti L, Savoca G, Petringa G, Cirrone GAP, Cuttone G, et al. 2019. Proton-irradiated breast cells: molecular points of view. *J Radiat Res.* 60:451–465.
- Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res.* 5(2):89-95.
- Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD. 1985. Establishment and Identification of Small Cell Lung Cancer Cell Lines Having Classic and Variant Features. *Cancer Res.* 45(6):2913–2923.
- Chailapakul P, Kato TA. 2022. From basic radiobiology to translational radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 23:15902.
- Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. 2010. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 8:31.

- Chapman JD, Doern SD, Reuvers AP, Gillespie CJ, Chatterjee A, Blakely EA, Smith KC, Tobias CA. 1979. Radioprotection by DMSO of mammalian cells exposed to X-rays and to heavy charged-particle beams. *Radiat Environ Biophys.* 16;29-41.
- Chatzipapas KP, Tran NH, Dordevic M, Zivkovic S, Zein S, Shin WG, Sakata D, Lampe N, Brown JMC, Ristic-Fira A, et al. 2023. Simulation of DNA damage using Geant4-DNA: an overview of the “molecularDNA” example application. *Precis Radiat Oncol.* 7:4–14.
- Chaudhary P, Marshall TI, Perozziello FM, Manti L, Currell FJ, Hanton F, McMahon SJ, Kavanagh JN, Cirrone GAP, Romano F, et al. 2014. Relative biological effectiveness variation along monoenergetic and modulated Bragg peaks of a 62-MeV therapeutic proton beam: A preclinical assessment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 90(1):27–35.
- Chaudhuri AR, Nussenzweig A. 2017. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18:610-621.
- Chen M, Huang J, Yang X, Liu B, Zhang W, Huang L, Deng F, Ma J, Bai Y, Lu R, et al. 2012. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS One.* 7(4):e28203
- Chen Q, Kang J, Fu C. 2018. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct Target Ther.* 3(1).
- Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A. 2012. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol.* 12(4):217-237.
- Choi J, Kang JO. 2012. Basics of particle therapy II: Relative biological effectiveness. *Radiat Oncol J.* 30(1):1–13.
- Cirrone GAP, Cuttone G, Mazzaglia SE, Romano F, Sardina D, Agodi C, Attili A, Blancato AA, Napoli MDE, Rosa FDI, et al. 2011. Hadrontherapy : a Geant4-based tool for proton / ion-therapy studies. 2:207–212.
- Cirrone GAP, Cuttone G, Raffaele L, Salamone V, Avitabile T, Privitera G, Spatola C, Margarone D, Patti V, Petringa G, et al. 2017. Clinical and research activities at the CATANA facility of INFN-LNS: From the conventional hadrontherapy to the laser-driven approach. *Front Oncol.* 7:1–13.
- Costes S V., Boissière A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH. 2006. Imaging Features that Discriminate between Foci Induced by High- and Low-LET Radiation in Human Fibroblasts. *Radiat Res.* 165:505–515.
- Davis AJ, Chen DJ. 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res.* 2(3):130–143.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. 2011. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med,* 32(4): 605-644.

- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B. 1998. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol.* 73:269–278.
- Dordevic M, Fattori S, Petringa G, Fira AR, Petrovic I, Cuttone G, Cirrone GAP. 2023. Computational approaches in the estimation of radiobiological damage for human-malignant cells irradiated with clinical proton and carbon beams. *Phys Med.* 117:103189.
- Durand RE. 1983. Radioprotection by WR-2721 in vitro at low oxygen tensions: Implications for its mechanisms of action. *Br J Cancer.* 47(3):387–392.
- Durante M, Loeffler JS. 2010. Charged particles in radiation oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 7:37–43.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495-516.
- Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. 2016. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016(4):pdb.prot087379.
- Flick DA, Gifford GE. 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods.* 68(1-2):167–75.
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 1(5):2315–2319.
- Friedland W, Dingfelder M, Kundrát P, Jacob P. 2011. Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code PARTRAC. *Mutat Res.* 711:28-40.
- Georgakilas AG, O’Neill P, Stewart RD. 2013. Induction and repair of clustered DNA lesions: What do we know so far? *Radiat Res.* 180(1):100–109.
- Ghosh S, Narang H, Sarma A, Krishna M. 2011. DNA damage response signaling in lung adenocarcinoma A549 cells following gamma and carbon beam irradiation. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 716:10–9.
- Good JS, Harrington KJ. 2013. The hallmarks of cancer and the radiation oncologist: Updating the 5Rs of radiobiology. *Clin Oncol.* 25(10):569–577.
- Goodhead DT. 1994. Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing-Radiations - Clustered Damage in Dna. *Int J Radiat Biol.* 65(1):7–17.
- Groelly FJ, Fawkes M, Dagg RA, Blackford AN, Tarsounas M. 2023. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 23(2):78-94.
- Haettner E, Iwase H, Krämer M, Kraft G, Schardt D. 2013. Experimental study of nuclear fragmentation of 200 and 400 MeV/u (12)C ions in water for applications in particle therapy. *Phys Med Biol.* 58(23):8265-79.
- Hall EJ, Giacca AJ. 2012. *Radiobiology for Radiologist.* 7th edi. New York (NY): Lippincott Williams & Wilkins.

- Hirayama R, Ito A, Noguchi M, Matsumoto Y, Uzawa A, Kobashi G, Okayasu R, Furusawa Y. 2013. OH radicals from the indirect actions of X-rays induce cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect. *Radiat Res.* 180(5):514–523.
- Hirayama R, Ito A, Tomita M, Tsukada T, Yatagai F, Noguchi M, Matsumoto Y, Kase Y, Ando K, Okayasu R, Furusawa Y. 2009. Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High-LET Radiations. *Radiat Res.* 171(2):212–218.
- Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Evans DG, Garcia-Closas M, Gescher AJ, Key TJ, Saxton JM, Harvie MN. 2014. Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 16(5):446.
- Huang RX, Zhou PK. 2020. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 5(1):60.
- Iliakis GE, Okayasu R. 1990. Radiosensitivity throughout the cell cycle and repair of potentially lethal damage and DNA double-strand breaks in an X-ray-sensitive CHO mutant. *Int J Radiat Biol.* 57(6):1195-1211.
- Ito A, Nakano H, Kusano Y, Hirayama R, Furusawa Y, Murayama C, Mori T, Katsumura Y, Shinohara K. 2006. Contribution of Indirect Action to Radiation-Induced Mammalian Cell Inactivation: Dependence on Photon Energy and Heavy-Ion LET. *Radiat Res.* 165(6):703–712.
- Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. 2012. Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett.* 327(1-2):123-133.
- Jakel O. 2009. Medical physics aspects of particle therapy. *Radiat Prot Dosimetry.* 137(1–2):156–166.
- Jakob B, Splinter J, Taucher-Scholz G. 2009. Positional Stability of Damaged Chromatin Domains along Radiation Tracks in Mammalian Cells. *Radiat Res.* 171:405.
- Jan R, Chaudhry GE. 2019. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 9(2):205-218.
- Jiao Y, Cao F, Liu H. 2022. Radiation-induced Cell Death and Its Mechanisms. *Health Phys.* 123:376–386.
- Kakarougkas A, Jeggo PA. 2014. DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol.* 87(1035).
- Keta OD, Todorović D V., Bulat TM, Cirrone PGA, Romano F, Cuttone G, Petrović IM, Ristić Fira AM. 2017. Comparison of human lung cancer cell radiosensitivity after irradiations with therapeutic protons and carbon ions. *Exp Biol Med.* 242:1015–1024.
- Komaki R, Chang J, Liao Z, Cox J D, Milas L. 2011. Radioprotectors and Chemoprotectors in the Management of Lung Cancer. In: Jeremic B, editor. *Advances in Radiation Oncology in Lung Cancer*. 2nd ed. Berlin: Springer; 123-132.

- Kujtan L, Muthukumar V, Kennedy KF, Davis JR, Masood A, Subramanian J. 2018. The Role of Systemic Therapy in the Management of Stage I Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol.* 13(5):707-714.
- Lampe N, Karamitros M, Breton V, Brown JMC, Sakata D, Sarramia D, Incerti S. 2018. Mechanistic DNA damage simulations in Geant4-DNA Part 2: Electron and proton damage in a bacterial cell. *Phys Medica.* 146–155.
- Langan TJ, Chou RC. Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol Biol.* 2011;761:75-83.
- Leloup C, Garty G, Assaf G, Cristovão A, Breskin A, Chechik R, Shchemelinin S, Paz-Elizur T, Livneh Z, Schulte RW, et al. 2005. Evaluation of lesion clustering in irradiated plasmid DNA. *Int J Radiat Biol.* 81(1):41–54.
- Levenson AS, Jordan VC. 1997. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 57(15):3071–3078.
- Levin WP, DeLaney TF. 2015. Charged Particle Radiotherapy. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical radiation oncology.* 4th ed. [place unknown]: Elsevier Inc; 358-372.e2.
- Limoli CL, Kaplan MI, Giedzinski E, Morgan WF. 2001. Attenuation of radiation-induced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation. *Free Radic Biol Med.* 1:10-19.
- Liu J Sen, Chiang TH, Wang JS, Lin LJ, Chao WC, Inbaraj BS, Lu JF, Chen BH. 2015. Induction of p53-independent growth inhibition in lung carcinoma cell A549 by gypenosides. *J Cell Mol Med.* 19(7):1697–1709.
- Löbrich M, Jeggo PA. 2007. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer.* 7(11):861–869.
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA, Löbrich M, Shibata A, Beucher A, et al. 2010. γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. 9(14):662-669.
- Loken MR, Herzenberg LA. 1975. Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann N Y Acad Sci.* 254(1):163–171.
- Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. 2013. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clin Oncol.* 25(10):578–585.
- Lord CJ, Ashworth A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 481(7381):287–294.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275.

- Lukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanislawek A. 2021. Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-an updated review. *Cancers (Basel)*. 13(17):4287.
- Makki J. 2015. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 8(1):23–31.
- Malouff TD, Mahajan A, Krishnan S, Beltran C, Seneviratne DS, Trifiletti DM. 2020. Carbon Ion Therapy: A Modern Review of an Emerging Technology. *Front Oncol*. 10:1–13.
- Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, Yamada S, Negi S, Bu X, Kato J, et al. 2021. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 296:100046.
- Matsumoto Y, Fukumitsu N, Ishikawa H, Nakai K, Sakurai H. 2021. A Critical review of radiation therapy: from particle beam therapy (proton, carbon, and BNCT) to beyond. *J Pers Med*. 11(8):825.
- Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23(1):74–88.
- Matthews Q, Jirasek A, Lum JJ, Brolo AG. 2011. Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy. *Phys Med Biol*. 56:6839–6855.
- Mavragani IV, Nikitaki Z, Souli MP, Aziz A, Nowsheen S, Aziz K, Rogakou E, Georgakilas AG. 2017. Complex DNA damage: A route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 9:1–21.
- Meylan S, Incerti S, Karamitros M, Tang N, Bueno M, Clairand I, Villagrasa C. 2017. Simulation of early DNA damage after the irradiation of a fibroblast cell nucleus using Geant4-DNA. *Sci Rep*. 7:1–15.
- Millar BC, Sabora O, Fielden EM, Loverock PS. 1981. The application of rapid-lysis techniques in radiobiology. IV. The effect of glycerol and DMSO on Chinese hamster cell survival and DNA single-strand break production. *RadiatRes*. 86(86):506–514.
- Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. 2013. DNA Double-Strand Break Repair as Determinant of Cellular Radiosensitivity to Killing and Target in Radiation Therapy. *Front Oncol*. 3:113.
- Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. 2018. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin*. 13(3):339-354.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2):55-63.
- Moynahan ME, Jasin M. 2010. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(3):196-207.
- Mulshine JL, Ujhazy P, Antman M, Burgess CM, Kuzmin I, Bunn PA Jr, Johnson BE, Roth JA, Pass HI, Ross SM, Aldige CR, Wistuba II, Minna JD. 2019. From clinical specimens to human

cancer preclinical models-a journey the NCI-cell line database-25 years later. *J Cell Biochem.* 121(8-9):3986-3999.

Mutter RW, Choi JI, Jimenez RB, Kirova YM, Fagundes M, Haffty BG, Amos RA, Bradley JA, Chen PY, Ding X, et al. 2021. Proton Therapy for Breast Cancer: A Consensus Statement From the Particle Therapy Cooperative Group Breast Cancer Subcommittee. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 111:337–359.

Nascimento RG do, Otoni KM. 2020. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology.* 30:1–8.

Neophytou CM, Trougakos IP, Erin N, Papageorgis P. 2021. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers (Basel).* 13(17):4363.

Nikitaki Z, Nikolov V, Mavragani I V., Mladenov E, Mangelis A, Laskaratou DA, Fragkoulis GI, Hellweg CE, Martin OA, Emfietzoglou D, et al. 2016. Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET). *Free Radic Res.* 50:S64–S78.

Nikjoo H, Emfietzoglou D, Liamsuwan T, Taleei R, Liljequist D, Uehara S. 2016. Radiation track, DNA damage and response-a review. *Rep Prog Phys.* 79(11):116601.

Noubissi FK, McBride AA, Leppert HG, Millet LJ, Wang X, Davern SM. 2021. Detection and quantification of γ -H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. *Sci Rep.* 11(1):8945.

Oliver C, Jamur MC. 2010. Overview of antibodies for immunochemistry. *Methods Mol Biol.* 588:3–9.

Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Francisco Octavio Gómez-Valles, Claudia Adriana Ramírez-Valdespino. Subtypes of Breast Cancer. 2022. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer.* Brisbane (AU): Exon Publications; 31-42.

Paganetti H, Blakely E, Carabe-Fernandez A, Carlson DJ, Das JJ, Dong L, Grosshans D, Held KD, Mohan R, Moiseenko V, et al. 2019. Report of the AAPM TG-256 on the relative biological effectiveness of proton beams in radiation therapy. *Med Phys.* 46:e53–e78.

Paganetti H. 2019. Proton relative biological effectiveness-uncertainties and opportunities. *Int J Part Ther.* 5(1):2–14.

Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. 2010. 4 R's of Radiobiology. *Stem Cells.* 28(4):639–648.

Park S-Y, Kim YM, Pyo H. 2010. Gefitinib radiosensitizes non-small cell lung cancer cells through inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *Mol Cancer.* 9:222.

Pawlik TM, Keyomarsi K. 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59(4):928–942.

- Petković VD, Keta OD, Vidosavljević MZ, Incerti S, Ristić Fira AM, Petrović IM. 2018. Biological outcomes of γ -radiation induced DNA damages in breast and lung cancer cells pretreated with free radical scavengers. *Int J Radiat Biol.* 95:274–285.
- Pilić PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. 2019. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 16(2):81–104.
- Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. 2004. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 281:301–311.
- Purdy JA. 2007. From new frontiers to new standards of practice: Advances in radiotherapy planning and delivery. *Front Radiat Ther Oncol.* 40:18–39.
- Qvarnström OF, Simonsson M, Eriksson V, Turesson I, Carlsson J. 2009. γ H2AX and cleaved PARP-1 as apoptotic markers in irradiated breast cancer BT474 cellular spheroids. *Int J Oncol.* 35:41–47.
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 124:1–6.
- Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdul CM. 2014. Effects of ionizing radiation on biological molecules - mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants Redox Signal.* 21(2):260–292.
- Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. 2016. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res.* 170:25-46.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 273:5858–5868.
- Romano F, Cirrone GAP, Cuttone G, Rosa F Di, Mazzaglia SE, Petrovic I, Fira AR, Varisano A. 2014. A Monte Carlo study for the calculation of the average linear energy transfer (LET) distributions for a clinical proton beam line and a radiobiological carbon ion beam line. *Phys Med Biol.* 59(12):2863–2882.
- Ronson GE, Piberger AL, Higgs MR, Olsen AL, Stewart GS, McHugh PJ, Petermann E, Lakin ND. 2018. PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nat Commun.* 9:746.
- Roots R, Okada S. 1972. Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int J Radiat Biol.* 21(4):329–342.
- Rossi S. 2022. Hadron therapy achievements and challenges: the CNAO experience. *Physics.* 4(1):229-257.
- 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 USA.* 100(9):5057-5062.

- Rousset-Jablonski C, Gompel A. 2017. Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. *Maturitas*. 105:69-77.
- Sadeghi M, Enferadi M, Shirazi A. 2010. External and internal radiation therapy: past and future directions. *J Cancer Res Ther*.6(3):239-48.
- Sak A, Stueben G, Groneberg M, Böcker W, Stuschke M. 2005. Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: implications for the radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *Br J Cancer*. 92:1089–1097.
- Sakata D, Kyriakou I, Tran HN, Bordage M-C, Rosenfeld A, Ivanchenko V, Incerti S, Emfietzoglou D, Guatelli S. 2019. Electron track structure simulations in a gold nanoparticle using Geant4-DNA. *Phys Medica*. 63:98–104.
- Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardaro A, Carbonara R, Petruzzelli MF, Turi B, Moschetta M, Scardapane A, Stabile Ianora AA. 2019. Proton therapy in the most common pediatric non-central nervous system malignancies: An overview of clinical and dosimetric outcomes. *Ital J Pediatr*. 45(1).
- Schmid TE, Dollinger G, Beisker W, Hable V, Greubel C, Auer S, Mittag A, Tarnok A, Friedl AA, Molls M, Röper B. 2010. Differences in the kinetics of γ -H2AX fluorescence decay after exposure to low and high LET radiation. *Int J Radiat Biol*. 86(8):682–691.
- Schulz-Ertner D, Jäkel O, Schlegel W. 2006. Radiation therapy with charged particles. *Semin Radiat Oncol*. 16(4):249–259.
- Sechler M, Cizmiciu AD, Avasarala S, Van Scoyk M, Brzezinski C, Kelley N, Bikkavilli RK, Winn RA. 2013. Non-small-cell lung cancer: molecular targeted therapy and personalized medicine - drug resistance, mechanisms, and strategies. *Pharmgenomics Pers Med*, 6: 25-36.
- Seigeritz CP, Vallier L. *Cell culture: growing cells as model systems in vitro*. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017:151–72.
- Shin WG, Sakata D, Lampe N, Belov O, Tran NH, Petrovic I, Ristic-fira A, Dordevic M, Bernal MA, Bordage MC, et al. 2021. A geant4-DNA evaluation of radiation-induced DNA damage on a human fibroblast. *Cancers (Basel)*. 13:1–16.
- Shinohara K, Nakano H, Ohara H. 1996. Detection of Auger Enhancement Induced in HeLa Cells Labeled with Iododeoxyuridine and Irradiated with 150 Kv X-Rays: Effects of Cysteamine and Dimethylsulfoxide. *Acta Oncol (Madr)*. 35:869–875.
- Shiovitz S, Korde LA. 2015. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*. 26(7):1291-1299.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*.18(1):134-147.

- Singh R, Letai A, Sarosiek K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(3):175–193.
- Smith TA, Kirkpatrick DR, Smith S, Smith TK, Pearson T, Kailasam A, Herrmann KZ, Schubert J, Agrawal DK. 2017. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *J Transl Med.* 15(1):1–18.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51(5):1409–1416.
- Speit G, Hartmann A. 1999. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 113:203-212.
- Sprick MR, Walczak H. 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2-3):125-132.
- Srivastava M, Raghavan SC. 2015. DNA double-strand break repair inhibitors as cancer therapeutics. *Chem Biol.* 22(1):17–29.
- Strober W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 111:A3.B.1-A3.B.3.
- Suit H, DeLaney T, Goldberg S, Paganetti H, Clasie B, Gerweck L, Niemierko A, Hall E, Flanz J, Hallman J, Trofimov A. 2010. Proton vs carbon ion beams in the definitive radiation treatment of cancer patients. *Radiother Oncol.* 95(1):3–22.
- Sulli G, Di Micco R, di Fagagna F d’Adda. 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer.* 12(10):709-720.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71(3):209-249.
- Suski JM, Braun M, Strmiska V, Sicinski P. 2021. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell.* 14;39(6):759-778.
- Tait SW, Green DR. 2013. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(9):a008706.
- Tinganelli W, Durante M. 2020. Carbon Ion Radiobiology. *Cancers (Basel).* 12:3022.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, et al. 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 10(9):1243-1260.
- Uhl M, Herfarth K, Debus J. 2014. Comparing the Use of Protons and Carbon Ions for Treatment. *20(6):433–439.*

- Vignard J, Mirey G, Salles B. 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol.* 108(3):362-369.
- Vitti ET, Parsons JL. 2019. The radiobiological effects of proton beam therapy: Impact on DNA damage and repair. *Cancers (Basel).* 11(7):1–15.
- Vyfhuis MAL, Onyeuku N, Diwanji T, Mossahebi S, Amin NP, Badiyan SN, Mohindra P, Simone CB. 2018. Advances in proton therapy in lung cancer. *Ther Adv Respir Dis.* 12:1–16.
- Wallace SS. 1998. Enzymatic Processing of Radiation-Induced Free Radical Damage in DNA1. *Radiat Res.* 150:60–79.
- Ward JF. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 35:95–125.
- Weyrather WK, Ritter S, Scholz M, Kraft G. 1999. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *Int J Radiat Biol.* 75(11):1357-64.
- Willers H, Allen A, Grosshans D, McMahon SJ, von Neubeck C, Wiese C, Vikram B. 2018. Toward A variable RBE for proton beam therapy. *Radiother Oncol.* 128(1):68–75.
- Wright WD, Shah SS, Heyer WD. 2018. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 293(27):10524-10535.
- Xiaochuan L, Jiangyong Y, Ping Z, Xiaonan W, Lin L. 2020. Clinical characteristics and prognosis of pulmonary large cell carcinoma: A population-based retrospective study using SEER data. *Thorac Cancer.* 11(6):1522–1532.
- Xu J, Patel NH, Saleh T, Cudjoe EK, Alotaibi M, Wu Y, Lima S, Hawkrigde AM, Gewirtz DA. 2018. Differential radiation sensitivity in p53 wild-type and p53-deficient tumor cells associated with senescence but not apoptosis or (aonprotective) autophagy. *Radiat Res.* 190(5):538–557.
- Yokoya A, Shikazono N, Fujii K, Urushibara A, Akamatsu K, Watanabe R. 2008. DNA damage induced by the direct effect of radiation. *Radiat Phys Chem.* 77: 1280-1285.
- Yuan S, Akey CW. 2013. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure.* 21(4):501-515.
- Yuan TZ, Zhan ZJ, Qian CN. 2019. New frontiers in proton therapy: Applications in cancers. *Cancer Commun.* 39(1):1–7.
- Zeman EM. 2015. The Biological Basis of Radiation Oncology. Radiation Oncology Physics. In: Gunderson LL, Tepper JE, editors. *Clinical radiation oncology.* 4th ed. [place unknown]: Elsevier Inc; 3-42.
- Zhang Q, Kong Y, Yang Z, Liu Y, Liu R, Geng Y, Luo H, Zhang H, Li H, Feng S, Wang X. 2020. Preliminary study on radiosensitivity to carbon ions in human breast cancer. *J Radiat Res.* 61:399–409.

Zheng M. 2016. Classification and pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 25(3):447-468.

Zhivotovsky B, Orrenius S. 2010. Cell cycle and cell death in disease: Past, present and future. *J Intern Med.* 268(5):395–409.

Zwicker F, Hauswald H, Debus J, Huber PE, Weber KJ. 2019. Impact of dimethyl sulfoxide on irradiation-related DNA double-strand-break induction, -repair and cell survival. *Radiat Environ Biophys.* 58(3):417–424.

Biografija autora

Vladana D. Petković, rođena 05.08.1989. godine u Beogradu, završila je Desetu beogradsku gimnaziju „Mihajlo Pupin“ opšteg smera 2008. godine. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, završila je 2012. godine i stekla zvanje diplomirani biolog. Master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2013. godine odbranivši master rad pod nazivom „Efekat ishrane obogaćene saharozom na transdiferencijaciju acinusnih u endokrine ćelije pankreasa pacova“ na modulu Biologija ćelija i tkiva pod rukovodstvom dr Mirele Ukropine.

Doktorske studije upisala je školske 2014/2015 godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, modul Molekularna onkologija. Od 01. jula 2014. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u okviru koje se bavila istraživačkim radom i izradom doktorske disertacije. Na sednici Naučnog veća Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ održanoj 26. aprila 2018. godine izabrana je u zvanje Istraživač saradnik, a u zvanje Stručni savetnik izabrala se 26. aprila 2022. godine. Kao član istraživačkog tima, Vladana Petković je radila na međunarodnim projektima ENSAR2 i Grande Rilevanze, u sklopu saradnje Inistuta za nuklearne nauke „Vinča“ i INFN-LNS iz Katanije (Italija), iz kojih je proistekao značajan deo eksperimentalnog rada, koji je bio predmet njene doktorske disertacije.

Autor je jednog i koautor osam radova u časopisima od međunarodnog značaja, devet saopštenja na međunarodnim i tri na domaćim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Владана Д. Петковић

број индекса Б3046/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Директни ефекти ниско и високо јонизујућег зрачења на одабране хумане малигне ћелијске линије: биолошки одговор и утицај на терапијску примену“

- 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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Владана Д. Петковић

Број индекса: Б3046/2014

Студијски програм: Молекуларна онкологија

Наслов рада: „Директни ефекти ниско и високо јонизујућег зрачења на одабране хумане малигне ћелијске линије: биолошки одговор и утицај на терапијску примену“

Ментори: др Отилија Кета и проф. др Александра Кораћ

Потписани/а: Владана Д. Петковић

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Директни ефекти ниско и високо јонизујућег зрачења на одабране хумане малигне ћелијске линије: биолошки одговор и утицај на терапијску примену“

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, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.