

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dušica M. Kočović

**UPOTREBA RAMANSKE SPEKTROSKOPIJE
ZA PRAĆENJE DEJSTVA TIOLNIH
RADIOPROTEKTORA NA MOLEKULARNE
PROMENE U MOZGU PACOVA IZLAGANOG
GAMA ZRAČENJU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dušica M. Kočović

THE USE OF RAMAN SPECTROSCOPY TO
MONITOR THE EFFECT OF THIOL
RADIOPROTECTORS ON MOLECULAR
CHANGES IN THE RAT BRAIN EXPOSED TO
GAMMA RADIATION

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2021.

Mentor:

Dr Pavle R. Andjus, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Marko Daković, vanredni profesor Fakultet za fizičku hemiju Univerzitet u Beogradu

Dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je uradjen u Centru za lasersku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, EPR i Laboratoriji za molekulska spektroskopiju Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za molekulska spektroskopiju na Poljoprivrednom fakultetu Univerzitetu u Beogradu, i na ALBA sinhrotronu u Barseloni, Španija.

Zahvaljujem se:

Prof. dr Pavlu R. Andjusu, pod čijim sam mentorstvom uradila doktorsku disertaciju, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici za stručno usavršavanje, za svestranu podršku, korisne savete i uloženi trud i vreme oko planiranja eksperimenata i pomoći prilikom pisanja radova i izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Gertu Lubeku, Univerziteta u Beču u Austriji, koji je donirao radioprotektor - aminotiolno jedinjenje GL2011.

Kolegama iz Laboratorije za molekulska spektroskopiju Fakulteta za fizičku hemiju, prof. dr Marku Dakoviću na zalaganju, izuzetnoj pomoći u izvodjenju i analiziranju rezultata dobijenih na Ramanskom mikrospektrometru, dr Danici Bajuk-Bogdanović na korisnim savetima koje mi je pružila tokom realizacije istraživanja. Takodje, dr Ilinki Pećinar, docentu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, za prijatnu saradnju tokom dela eksperimenata na Ramanskom mikrospektrometru.

Prof. dr Biljani Božić Nedeljković na izuzetnoj podršci u realizaciji dela disertacije vezane za ispitivanje citokina. Dr Irini Maslovarić na dragocenim sugestijama prilikom tumačenja dela rezultata. Dr Tanji Dučić na pomoći oko izvodjenja eksperimenata na Sinhrotronskoj FTIR mikrospektroskopiji, kao i dr Andreju Koreniću na pomoći oko analize rezultata. Takodje, dr vet. med. Milošu Jovanoviću, Milošu Čučku i Miodragu Milovanoviću za izvanrednu asistenciju u eksperimentima sa životinjama, kao i dr Borisu Šakiću na pomoći oko statističke obrade rezultata.

Kolegama iz Centra za lasersku mikroskopiju na njihovom entuzijazmu, svakodnevnom zalaganju i spremnosti da pomognu.

Nemerljivu zahvalnost dugujem mojoj porodici, roditeljima Eli i Miodragu, i sestri Mariji na ljubavi, velikoj podršci i veri u moj uspeh.

Upotreba Ramanske spektroskopije za praćenje dejstva tiolnih radioprotektora na molekularne promene u mozgu pacova izlaganog gama zračenju

Sažetak:

Radioprotektori su supstancije koje se koriste za zaštitu organizma od štetnih efekata jonizujućeg zračenja. Tiolno jedinjenje amifostin je jedini lek koji je odobren za kliničku upotrebu. Međutim, ovaj radioprotektor je efikasan samo ako se primeni pre zračenja i izaziva neke neželjene efekte, pa potraga za efikasnim i netoksičnim radioprotektorom još uvek traje. U ovom istraživanju ispitivan je efekat novog potencijalnog prirodnog radioprotektora na bazi aminotiola - GL2011. Radi komparacije ispitivan je efekat anizomicina koji je takodje jedan od novih potencijalnih radioprotektora. U svrhu utvrđivanja molekularnih i ćelijskih promena koje jonizujuće zračenje u prisustvu i odsustvu radioprotektora izaziva na moždanom tkivu upotrebljena je tehnika Ramanske mikrospektroskopije, Sinhrotron FTIR mikrospektroskopija, imunohistohemija, kao i Elisa test za praćenje nivoa inflamatornih molekulskih medijatora – citokina u krvnoj plazmi eksperimentalnih životinja. Mužjaci Albino Wistar pacova starosti 2 meseca bili su izloženi gama zračenju iz radioaktivnog izvora ⁶⁰Co dozom od 6.7 Gy. Pokazano je da aminotiol GL2011 povećava preživljavanje ozračenih životinja na 75% u poredjenju sa 37.5% preživljavanja ozračenih jedinki bez apliciranog GL2011. Ramanski spektri su ukazali na smanjanje intenziteta traka od nukleinskih kiselina kod preživelih ozračenih životinja nakon 30 dana od tretmana, dok je primena aminotiola GL2011 pokazala efekat oporavka. Slike dobijene konfokalnom mikroskopijom imunofluorescentno obeleženih glijalnih ćelija ukazale su na pozitivan efekat GL2011 na održavanje morfologije astrocita i mikroglije, što je praćeno i smanjenjem ekspresije mikroglijalnog markera Iba-1, dok je procena nivoa citokina u plazmi ukazala na imunomodulatorni efekat aminotiola GL2011. Sa druge strane, pokazano je da primena anizomicina značajno smanjuje procenat piksela mikroglijalnog markera Iba-1 u mozgu ozračenih pacova. Takodje, detektovan je povećan intenzitet Ramanovih spektralnih traka od nukleinskih kiselina nakon primene anizomicina kao radioprotektora, kao i povećan nivo citokina sa primenom anizomicina posle zračenja. Anizomicin je pokazao sposobnost da deluje inhibitory na inflamaciju izazvanu zračenjem smanjenjem mikroglijalnih ćelija. Dodatno, anizomicin je ispoljio sposobnost indukovanja stabilizacije genetskog materijala kroz povećan nivo nukleinskih kiselina. Zajedno sa visokom stopom preživljavanja životinja (75% sa anizomicinom primenjenim 30 minuta pre zračenja, i 100% za primenu posle zračenja), ovi nalazi ukazuju na očigledan radioprotektivni mehanizam ovog inhibitora sinteze proteina. Rezultati FTIR spektara su u skladu sa Ramanskim spektrima. Oni pokazuju da bi oba radioprotektora mogla imati stabilizirajući efekat na genetski materijal kao i na sadržaj proteina u tkivu produžene moždine ozračenih pacova.

Ključne reči: Radioprotektori, aminotiol GL2011, Anizomicin, Ramanska spektroskopija, Sinhrotron FTIR mikrospektroskopija, Gljalne ćelije, Citokini.

Nučna oblast: Neuronauka

Uža naučna oblast: Radijaciona biologija

The use of Raman spectroscopy to monitor the effect of thiol radioprotectors on molecular changes in the rat brain exposed to gamma radiation

Abstract:

Radioprotectors are substances used to protect the body from the harmful effects of ionizing radiation. The thiol compound amifostine is the only drug approved for clinical use. However, this radioprotector is effective only if applied before radiation and causes some side effects, so the search for an effective and non-toxic radioprotector is still ongoing. In this study, the effect of a new potential natural radioprotector based on aminothiols - GL2011 was investigated. For comparison, the effect of anisomycin, which is also one of the new potential radioprotectors, was investigated. In order to determine the molecular and cellular changes that ionizing radiation causes in the presence and absence of radioprotectors on brain tissue, the technique of Raman microspectroscopy, Synchrotron FTIR microspectroscopy, immunohistochemistry, as well as the Elisa test for monitoring the levels of inflammatory molecular mediators - cytokines in the blood plasma of experimental animals were used. Male Albino Wistar 2-month-old rats were exposed to gamma radiation from a ^{60}Co radioactive source at a dose of 6.7 Gy. The aminothiol GL2011 was shown to increase the survival of irradiated animals to 75% compared to 37.5% of the survival of irradiated animals without GL2011 administered. Raman spectra indicated a decrease in the intensity of nucleic acid bands in surviving irradiated animals after 30 days of treatment, while the application of the aminothiol GL2011 showed a recovery effect. Images obtained by confocal microscopy of immunofluorescently labeled glial cells indicated a positive effect of GL2011 on the maintenance of astrocyte and microglia morphology, which was accompanied by a decrease in the expression of the microglial marker Iba-1, while the assessment of plasma cytokine levels indicated an immunomodulatory effect of the aminothiol GL2011. On the other hand, the use of anisomycin has been shown to significantly reduce the percentage of pixels of the microglial marker Iba-1 in the brains of irradiated rats. Also, an increased intensity of Raman spectral bands of nucleic acids was detected after the application of anisomycin as a radioprotector, as well as an increased cytokine level with the application of anisomycin after irradiation. Anisomycin has been shown to have an inhibitory effect on radiation-induced inflammation by reducing microglial cells. In addition, anisomycin exhibited the ability to induce stabilization of genetic material through increased levels of nucleic acids. Together with the high survival rate of the animal (75% with anisomycin administered 30 minutes before irradiation, and 100% for post-irradiation administration), these findings pointed to an apparent radioprotective mechanism of this protein synthesis inhibitor. The results of the FTIR spectra are in accordance with the Raman spectra. They show that both radioprotectors have a stabilizing effect on genetic material as well as on the protein content in the brainstem tissue of gamma irradiated rats.

Key words: Radioprotectors, aminothiol GL2011, Anisomycin, Raman microspectroscopy, Synchrotron FTIR microspectroscopy, Glial cells, Cytokines.

General subject area: Neuroscience

Narrow scientific field: Radiation biology

LISTA SKRAĆENICA

- LET - linearni transfer energije (engl. linear energy transfer)
- SRV - slobodno-radikalske vrste
- RBE - relativna biološka efikasnost
- Sv - sivert (jedinica za ekvivalentnu dozu zračenja)
- Gy - grej (merna jedinica za apsorbovanu dozu)
- LD - smrtonosna doza zračenja (engl. lethal dose)
- DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
- RNK - ribonukleinska kiselina
- JZ - jonizujuće zračenje
- CNS - centralni nervni system
- SNS - simpatički nervni sistem
- HPA - hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežna osa
- NA - noradrenalin
- LC - *locus coeruleus*
- IL - interleukin
- TNF- α - faktor nekroze tumora alfa
- ICAM-1 - unutarćelijski adhezivni molekul 1
- LPS - lipopolisaharid
- INF γ - interferon gama
- NO - azot monoksida
- MHC - molekuli glavnog kompleksa tkivne podudarnosti
- GABA - gama amino buterična kiselina
- GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. glial fibrillary acidic protein)
- NK - urodjenoubilačke ćelije
- EDTA - etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina
- WR-2721 - tiolno jedinjenje amifostin (od engl. Walter Reed Army Medical Center)
- FDA - Uprava za hranu i lekove (engl. Food and drug administration)
- JNK - c-JUN N- terminalne kinaze
- IE geni – engl. immediate-early genes
- MCT - detektor žive-kadmijum-telurida (engl. mercury cadmium telluride)

FTIR - infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

SR - sinhrotronsko zračenje

CTRL - kontrolna grupa životinja bez zračenja i radioprotektora

Irr – grupa životinja koja je primila jednu dozu gama zračenja (LD_{50/30})

GL- grupa životinja koja je primila samo jednu dozu radioprotektora GL2011

AN – grupa životinja koja je primila samo jednu dozu antibiotika anizomicina

GLIr-30 - grupa životinja gde je GL2011 apliciran 0.5 h pre zračenja

GLIr180 - grupa životinja gde je GL2011 apliciran 3 h posle zračenja

GLIr360 - grupa životinja gde je GL2011 apliciran 6 h posle zračenja

ANIr-30 - grupa životinja gde je anizomicin apliciran 0.5 h pre zračenja

ANIr180 - grupa životinja gde je anizomicin apliciran 3 h posle zračenja

ANIr360 - grupa životinja gde je anizomicin apliciran 6 h posle zračenja

⁶⁰Co – gama zračenje kobalta-60

PBS - fiziološki rastvor fosfatnog pufera

PFA - paraformaldehid

BSA - govedji serum albumin (engl. bovine serum albumin)

Iba -1 - jonizovani molekul adaptera za vezivanje kalcijuma 1 (engl. ionized calcium binding adaptor molecule 1)

ELISA - Imuno-enzimski test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

TMB - tetrametil benzidin (engl. tetramethylbenzidine)

HRP - (engl. horse radish peroxidase)

Trp - triptofan

Tir - tirozin

T, A, G - timin, adenin, guanine

PCA - multivarijantna analiza glavnih komponenata (engl. Principal Component Analysis)

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Jonizujuće zračenje | 2 |
| 1.2. Interakcija jonizujućeg zračenja sa materijom | 3 |
| | 3 |
| 1.2.1. Interakcija jonizujućeg zračenja sa biološkim sistemima..... | 6 |
| 1.2.2. Interakcija sa biološki aktivnim molekulima..... | 7 |
| 1.3. Osetljivost tkiva na jonizujuće zračenje..... | 10 |
| 1.4. Odgovor organizma na jonizujuće zračenje | 11 |
| 1.5. Radijaciono indukovana neuroinflamacija..... | 12 |
| 1.5.1. Mikroglija | 13 |
| 1.5.2. Astrociti | 15 |
| 1.5.3. Inflamatorni molekularni medijatori | 16 |
| 1.6. Radioprotektori..... | 16 |
| 1.7. Tiolni radioprotektori | 18 |
| 1.7.1. Amifostin | 18 |
| 1.7.2. GL2011 | 19 |
| 1.8. Anizomicin..... | 20 |
| 1.9. Molekularna spektroskopija..... | 21 |
| 1.9.1. Ramanska i mikroramanska spektroskopija | 22 |
| 1.9.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom | 24 |
| 1.9.3. Sinhrotronska FTIR mikrospektroskopija | 26 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 28 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 30 |
| 3.1. Eksperimentalne životinje..... | 30 |
| 3.2. Eksperimentalni dizajn – osnovna postavka | 30 |
| 3.3. Tretman životinja gama zračenjem i radioprotektorima | 31 |
| 3.4. Preživljavanje | 31 |
| 3.5. Priprema tkiva i tkivnih preseka za Ramansku mikrospektroskopiju – snimanje, obrada i analiza Ramanskih spektara..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.6. Priprema tkiva i tkivnih preseka za imunohistohemiju – imunofluorescentno obeležavanje moždanih preseka i njihova analiza | 33 |
| 3.7. Priprema uzoraka za praćenje citokina, metodologija – enzimsko imunološki test (ELISA).. | 34 |
| 3.8. Priprema tkivnih preseka za sinhrotronsku FTIR mikrospektroskopiju, snimanje uzoraka i analiza spektara | 36 |
| 3. 9. Statistika..... | 36 |
| 4. REZULTATI..... | 37 |
| 4.1. Preživljavanje ozračenih mužjaka albino Wistar pacova i pacova sa apliciranim radioprotektorima GL2011 i anizomicinom pre ili posle zračenja | 37 |
| 4.2. Ramanski spektri moždanih tkivnih preseka ozračenih Wistar pacova i pacova sa primenjenim radioprotektorom GL2011 i anizomicinom..... | 38 |
| 4.2.1. Radioprotekcija sa GL2011 | 38 |
| 4.2.2. Radioprotekcija sa anizomicinom | 42 |
| 4.3. Sinhrotronski FTIR spektri moždanih tkivnih preseka ozračenih Wistar pacova i pacova sa primenjenim radioprotektorima GL2011 i anizomicinom | 46 |
| 4.4. Procena radioprotektivnog potencijala radioprotektora GL2011 analizom promena na glijalnim ćelijama | 54 |
| 4.4.1. Mikroglijalne ćelije..... | 54 |
| 4.4.2. Astrociti | 54 |
| 4.5. Procena radioprotektivnog potencijala anizomicina analizom promena na glijalnim ćelijama | 56 |
| 4.6. Procena radioprotektivnog potencijala GL2011 analizom nivoa citokina u plazmi | 58 |
| 4.7. Procena radioprotektivnog potencijala anizomicina analizom nivoa citokina u plazmi..... | 59 |
| 5. DISKUSIJA | 62 |
| 5.1. Molekularne promene u produženoj moždini pacova ozračenih i tretiranih sa lekom GL2011 ili anizomicinom kao radioprotektorom | 62 |
| 5.2. Promene u glijalnim ćelijama mozga ozračenih pacova i tretiranih radioprotektorom GL2011 ili anizomicinom..... | 65 |
| 5.3. Promene u pro-inflamatornim i anti-inflamatornim citokinima plazme Wistar pacova nakon izlaganja gama zračenju i radioprotekciji sa GL2011 ili anizomicinom..... | 66 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 70 |
| 7. LITERATURA | 71 |

1. UVOD

Radioprotektori su jedinjenja koja su dizajnirana da smanje smrtnost i štetne efekte izlaganja jonizujućem zračenju. Radi zaštite organizma od jonizujućeg zračenja usled nezgoda poput nuklearnih havarija i katastrofa, od posebnog je značaja procena oštećenja moždanog tkiva usled ozračivanja celog tela i utvrđivanje efikasnih sredstava za radioprotekciju. Na molekularnom nivou jonizujuće zračenje pokreće kaskadu direktnih i indirektnih efekata što vodi oštećenjima biomakromolekula, i posledično neuroinflamaciji na ćelijskom nivou (Reisz et al. 2014; Balentova and Adamkov 2015). Istraživanja u oblasti radijacione biologije pokazala su da aminotiol, koji prvenstveno deluju kao “hvatači” slobodnih radikala, imaju snažno zaštitno dejstvo kod životinja koje su izložene jonizujućem zračenju. Međutim, postoji samo jedan tiolni agens – amifostin (2-[(3-aminopropil) amino] etanetiol dihidrogen fosfat) koji je Uprava za hranu i lekove (FDA) odobrila za smanjenje negativnih posledica radioterapije (Facorro et al. 2004; Kouvaris et al.). Zbog negativnih dejstava koje izaziva (Vardy et al. 2002), kao i zbog toga što nije pogodan za primenu nakon zračenja (Singh and Seed 2019), potraga za novim netoksičnim radioprotektorom koji bi bio adekvatan naročito za upotrebu nakon izlaganja zračenju još uvek traje. Pokazano je da prirodno aminotiolno jedinjenje pod nazivom GL2011 ima radioprotektivna svojstva i kao takvo predmet je ispitivanja poslednjih godina. Aminotiol GL2011 je netoksičan i ima značajan efekat na regeneraciju crevnih epitelnih mikrovila, kao i ćelija koštane srži ozračenih životinja (Okić-Djordjević et al. 2014; Ganesan et al. 2014).

Cilj ove studije je bio da se ispituju molekularne promene analizom Ramanskih spektara dobijenih na moždanom tkivu albino Wistar pacova izlaganih gama zračenju ^{60}Co sa ili bez primene aminotiola GL2011. Radi komparativnog pristupa u ispitivanju ovog aminotiolnog jedinjenja, praćeno je i radioprotektivno dejstvo anizomicina, koji ima sposobnost da deluje neuroprotektivno inhibirajući sintezu proteina i indukujući apoptozu (Kharlamov et al. 2002; Cohen et al. 2006).

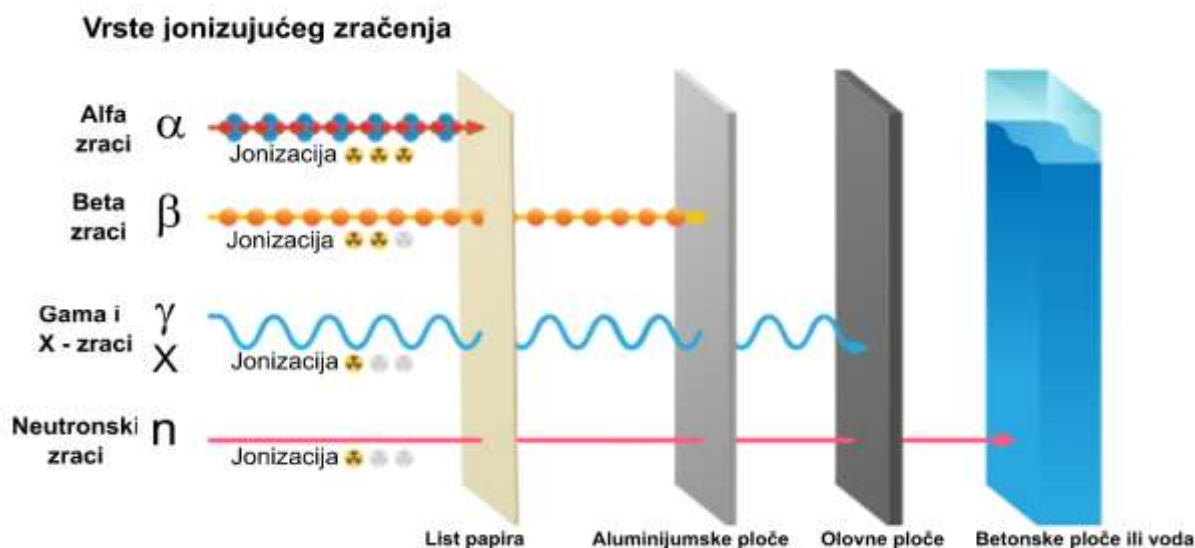
Vibracione spektroskopske tehnike su od velikog značaja za karakterizaciju biološkog materijala, odn. za dobijanje informacija u vezi sa sadržajem i biohemijskim promenama ispitivanog uzorka (Krafft et al. 2017; Carter et al. 2009). Kao komplementarna tehnika Ramanskoj mikrospektroskopiji upotrebljena je infracrvena mikrospektroskopija sa Furijevom transformacijom (Papadopoulos 2008). Upotreba sinhrotronskog izvora svetlosti omogućila je visok odnos signal/šum i bolju prostornu rezoluciju od običnog FTIR mikrospektrometra. Metodim imunohistohemije i upotrebom konfokalne mikroskopije na imunofluorescentno obeleženim presecima praćen je stepen aktivacije mikroglije i astrocita, kao i morfološke promene ovih ćelija u moždanom tkivu pacova usled ozračivanja i primene radioprotektora. Zbog bidirekciono komunikacije koja postoji između mozga i perifernog imunog sistema (Dantzer 2018), ispitivan je i sveobuhvatan efekat radioprotektora na neuroinflamatornost praćenjem nivoa pro-inflamatornih citokina, interleukina 6 (IL-6) i tumor nekroznog faktora alfa (TNF- α) i anti-inflamatornog citokina IL-10 u perifernoj cirkulaciji gama ozračenih pacova i pacova sa apliciranim aminotiolom GL2011 ili anizomicinom.

1.1. JONIZUJUĆE ZRAČENJE

Jonizujuće zračenje je tok subatomske čestice koji uzrokuje jonizaciju atoma sredine kroz koju prolazi. Proces jonizacije se dešava kada jedna čestica ili foton iz snopa jonizujućeg zračenja preda dovoljno energije materiji, tako da dolazi do izbacivanja jednog ili više elektrona (e^-) iz atoma tj. molekula (Kharisov and Kharissova 2013). Izbačen elektron poseduje određenu kinetičku energiju i može da nastavi da jonizuje sredinu kroz koju prolazi. U živim sistemima jonizujuće zračenje menja hemijsku strukturu ćelijskih biomakromolekula (Reisz et al. 2014), a u zavisnosti od vrste zračenja, doze, vremena izloženosti, kao i osetljivosti tkiva, jonizujuće zračenje dovodi do reverzibilnih ili ireverzibilnih oštećenja u organizmu (Jafarzadeh et al. 2018).

Jonizujuće zračenje može biti različite prirode. Korpuskularno zračenje se sastoji od visokoenergetskih naelektrisanih čestica, koje direktno jonizuju atome materijala sa kojim intereaguju. Takve čestice su visokoenergetska jezgra helijuma - ${}^4\text{He}^2$ (α – alfa zraci) i visokoenergetski elektroni (β – beta zraci). Zbog svoje velike mase alfa čestice emitovane iz radioaktivnog jezgra imaju mali domet i veoma brzo se sudaraju sa nekim od atoma zbog čega gube energiju i imaju izrazito jonizujuće delovanje. Beta zračenje čine brzi elektroni emitovani iz jezgra radioaktivnih elemenata, koji pri prolazu kroz neku sredinu vrše jonizaciju, ali imaju znatno slabije jonizujuće dejstvo od alfa čestica. S druge strane, visokoenergetski fotoni (ultraljubičasto, X-rendgensko i gama zračenje) predstavljaju elektromagnetno zračenje. Oni za razliku od alfa i beta čestica, imaju znatno slabije jonizujuće delovanje koje se dešava indirektnim putem. Gama zraci su poreklom iz jezgra radioaktivnih elemenata, kreću se brzinom svetlosti i mogu proći kroz mnoge materijale kao i kroz ljudsko telo, dok X (rendgenski) zraci nastaju veštačkim putem iz elektronskog omotača.

Neutrone kao zračenje srećemo u nuklearnim reaktorima. Brzi neutroni u sudarima sa lakim molekulima predaju celokupnu kinetičku energiju, pri čemu dolazi do preraspodele energije unutar molekula i kidanja hemijskih veza i nastanka protona visokih energija, koji dalje jonizuju sredinu kroz koju prolaze. U interakciji sa sporim neutronima nastaju novi izotopi koji mogu biti stabilni ili radioaktivni.



Slika 1. Vrste jonizujućeg zračenja i njihova prodorna moć. Preuzeto i modifikovano iz (American Nuclear Society 2021).

Izvori jonizujućeg zračenja mogu biti prirodni i veštački. Prirodno zračenje potiče iz kosmosa, a jedan deo dolazi od prirodnih radioaktivnih materijala u zemlji, stenama, vodi, vazduhu i građevinskim materijalima. Nuklearni reaktori i akceleratori čestica predstavljaju mesta gde se veštačkim putem dobijaju radioaktivni izotopi željenih karakteristika, koji se potom koriste u naučne, medicinske ili vojne svrhe. Glavni vid ozračivanja ljudi iz veštačkih izvora zračenja je primena X-zraka u dijagnostici, za rendgensko snimanje, kao i upotreba gama zračenje u radioterapiji različitih oblika kancera. Kao najčešći izvori gama zračenja koriste se radioizotopi: ^{60}Co sa dva gama kvanta energije 1.17 MeV i 1.33 MeV, kao ^{137}Cs sa jednim gama kvantom energije 0.662 MeV.

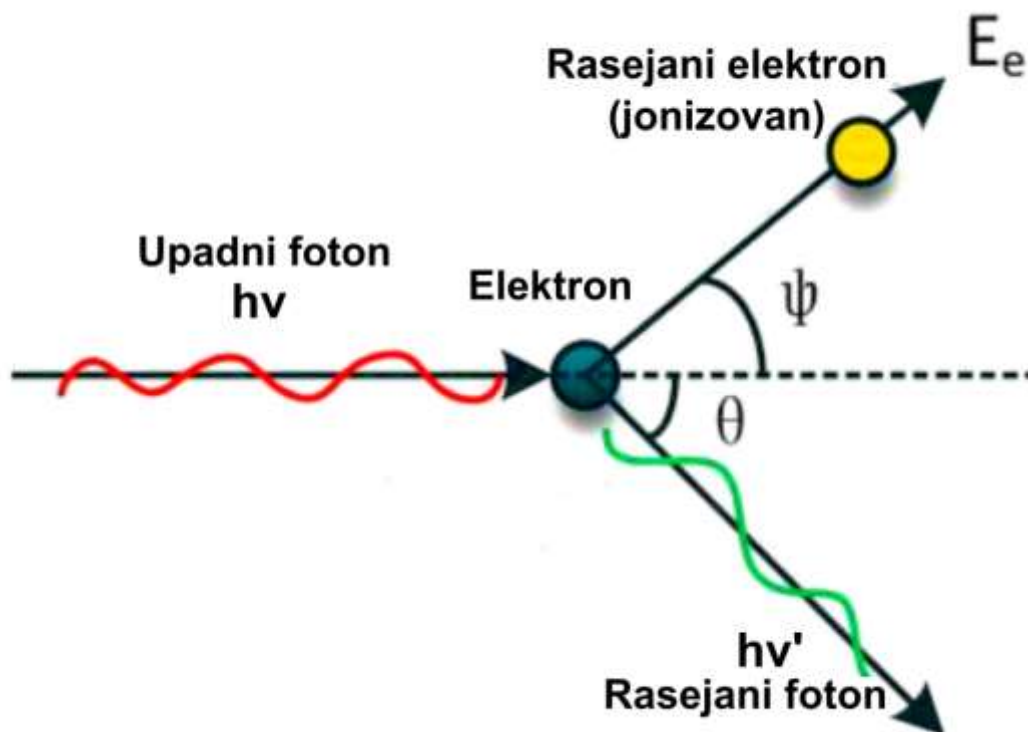
Svaki vid primene zračenja u medicini, zahteva i specifična rešenja u zaštiti od nepotrebnog ozračivanja osoblja, pacijenata i ljudi, koji žive i rade u blizini medicinske ustanove, pa je ispitivanje radioprotektivnih supstanci od izuzetnog značaja za čovečanstvo.

1.2. INTERAKCIJA JONIZUJUĆEG ZRAČENJA SA MATERIJOM

Prilikom prolaska zračenja kroz materiju dolazi do dejstva zračenja na materiju kroz efekte jonizacije i ekscitacije atoma sredine, ali i dejstva materije na snop zračenja u smislu slabljenja i menjanja karakteristika snopa zračenja (Stankovic 1997). Za proces predaje energije materiji vezuju se dva fenomena: linearni transfer energije (LET) i specifična jonizacija. U zavisnosti od vrste jonizujućeg zračenja kao i sredine kroz koju prolazi, raspored i udaljenost jonizovanih i ekscitovanih molekula i atoma će biti različita, pa će samim tim i linearni energetske transfer, koji predstavlja predaju energije upadnog zračenja po dužini predjenog puta ($-\Delta E/\Delta x$), biti različit (Danzker et al. 1959). Takodje, u zavisnosti od vrste i energije jonizujućeg zračenja zavisi i specifična jonizacija, odn. ukupan broj jona koje jonizujuće zračenje proizvede u nekoj sredini po jedinici predjenog puta.

Prilikom interakcije alfa i beta čestica sa nekom materijom može doći do elastičnih sudara sa atomima ili jezgrima, što doprinosi skretanju upadnih čestica sa neznatnim gubitkom energije (Turner 2005). Prilikom neelastičnih sudara, naelektrisana čestica prenosi deo kinetičke energije na omotač sredine kroz koju prolazi, pri čemu dolazi do kidanja veza elektrona u atomima ili molekulima odn. *jonizacije* ili prevodjenja elektrona na viši energetske nivo odn. *ekscitacije*. Specifična jonizacija sredine za alfa čestice je oko 10 puta veća nego za beta čestice.

Kod visokoenergetskog fotonskog zračenja, X- i gama zraka, interakcija sa materijom se zasniva na procesu fotoelektričnog efekta, Komptonovog efekta i efekta stvaranja parova pozitron-elektron (Turner 2005). Kod fotoelektričnog efekta dolazi do interakcije fotona niže energije i materije, pri čemu se energija upadnog fotona u potpunosti predaje elektronu iz omotača atoma, tako da foton nestaje, a elektron napušta atom. U fotoelektričnoj interakciji dolazi do potpune apsorpcije energije, pa to predstavlja najveću opasnost za pacijente u dijagnostičkoj radiografiji. Sa porastom energije fotona verovatnoća za fotoelektrični efekat opada, a istovremeno raste verovatnoća za Komptonov efekat. Komptonovo rasejanje predstavlja proces u kome upadni foton intereaguje sa elektronom iz gornjih slojeva omotača, pri čemu ne dolazi do potpune predaje energije primarnog fotona elektronu. Kao rezultat takve interakcije nastaje foton niže energije i slobodan elektron određene kinetičke enrgije (Slika 2).

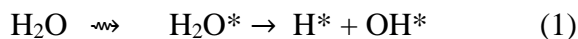


Slika 2. Šematski prikaz Komptonovog efekta. Preuzeto i modifikovano iz (Qiao et al. 2021).

U slučaju da je upadni foton visoke energije (preko 1 MeV) dolazi do takve interakcije da primarni foton nestaje, a nastaju elektron i pozitron koji se kreću u suprotnim smerovima, normalno na pravac upadnog fotona. Ovaj tip interakcije je manje relevantan za dijagnostičku radiografiju jer oprema koja se koristi za proizvodnju rendgenskih zraka ne može da proizvede fotone ove energije, ali je zato od posebne važnosti u terapiji zračenjem.

S obzirom da voda čini veliki deo okruženja živih sistema, najveći deo prenosa energije sa procesima ekscitacije i jonizacije odvija se pomoću ovog molekula. Početne reakcije radiolize vode nakon ozračivanja prikazane su sledećim hemijskim reakcijama:

ekscitacija

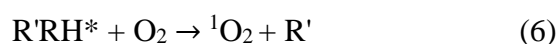
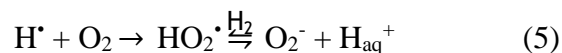


jonizacija



Kao primarni produkti interakcije zračenja i ćelijske vode nastaju ekscitovani (H_2O^*) i jonizovani molekuli vode (H_2O^+), čijom daljom disocijacijom nastaju hidroksilni radikal (OH^*), vodonični radikal (H^*), i hidratizirani elektron e_{aq}^- (Riley 1994; Pimblott et al. 2005; Le Caër 2011). Kroz dalju međusobnu interakciju i interakciju sa molekulima vode nastaju novi slobodni radikali i jedinjenja, kao što su superoksid radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksid (H_2O_2). Najreaktivniji a samim tim i potencijalno najopasniji je hidroksil radikal OH^* (Gligorovski et al. 2015), dok su superoksid radikal $\text{O}_2^{\cdot-}$ i vodonik peroksid H_2O_2 stabilniji, a njihov značaj sa stanovišta oštećenja ćelija je

najviše povezan sa njihovim potencijalom da dovedu do nastanka novih slobodnih radikala (Phaniendra et al. 2015). U Fentonovoj reakciji, kroz interakciju sa jonima Fe^{2+} , vodonik peroksid dovodi do nastanka novih hidroksilnih radikala (Lyngsie et al. 2018), dok povećana koncentracija kiseonika O_2 u biološkim sistemima, pojačava dejstvo jonizujućeg zračenja na biomakromolekule (Quintiliani 1979; Liu et al. 2015), što je pokazano sledećim reakcijama:



Kao posledica delovanja zračenja dolazi i do interakcije superoksid radikala $\text{O}_2^{\cdot -}$ sa azotnim monoksidom $\text{NO} \cdot$ (Mikkelsen and Wardman 2003), pri čemu nastaje peroksi nitrit anjon (ONOO^-), koji zajedno sa peroksinitričnom kiselinom (ONOOH), azot dioksidom ($\text{NO}_2 \cdot$) i dinitrogen trioksidom (N_2O_3), predstavlja reaktivne vrste azota. Neravnoteža između nastanka i eliminacije slobodnih radikala pomoću prirodnih mehanizama odbrane od reaktivnih vrsta (npr. dejstvo superoksid dismutaza), dovodi do stanja oksidativnog stresa što može indukovati oštećenja i uticati na funkciju ključnih biomakromolekula (Lyras et al. 2002; Cadet et al. 2010).

U procesu radiolize vode, jonizujuće zračenje dovodi do nastanka slobodnoradikalnih vrsta (SRV) kiseonika i azota, koji oštećuju biomakromolekule i dovode do nastanka sekundarnih slobodnih radikala, vodeći ćeliju u smrt (Le Caër 2011).

Količina zračenja predstavlja dozu zračenja, odn. ukupan broj čestica ili fotona koji je prošao kroz datu tačku u prostoru.

Apsorbovana doza (D) predstavlja količinu energije (ΔE) koju zračenje predaje određenoj masi materijala (Δm) što je prikazano sledećom jednačinom:

$$D = \Delta E / \Delta m \quad (7)$$

Jedinica za apsorbovanu dozu (J/kg) se naziva Grej (Gy).

Biološka efikasnost nekog zračenja se određuje u odnosu na biološki efekat rendgenskog zračenja energije od 250 keV koje proizvodi oko 100 parova jona/mm u vodi tj. mekom tkivu (Stankovic 1997). Relativna biološka efikasnost (RBE) je odnos efikasnosti rendgenskog zračenja i primenjenog zračenja. Smatra se da X- i gama zračenje imaju istu biološku efikasnost, jer je u oba slučaja specifična jonizacija oko 100 pari jona/mm, odn. $\text{RBE}=1$. Čestično zračenje (alfa i beta zruci) ima veću specifičnu jonizaciju, kao i veću relativnu biološku efikasnost (oko 20 puta veća nego za X- i gama zrake).

Ekvivalentna doza uzima u obzir vrstu zračenja. Može se definisati na osnovu apsorbovane doze i relativne biološke efikasnosti, što je prikazano na sledećoj jednačini:

$$H = D \cdot \text{RBE} \quad (8)$$

Jedinica za ekvivalentnu dozu je SIVERT (1 Sv= 1 Gy za RBE = 1).

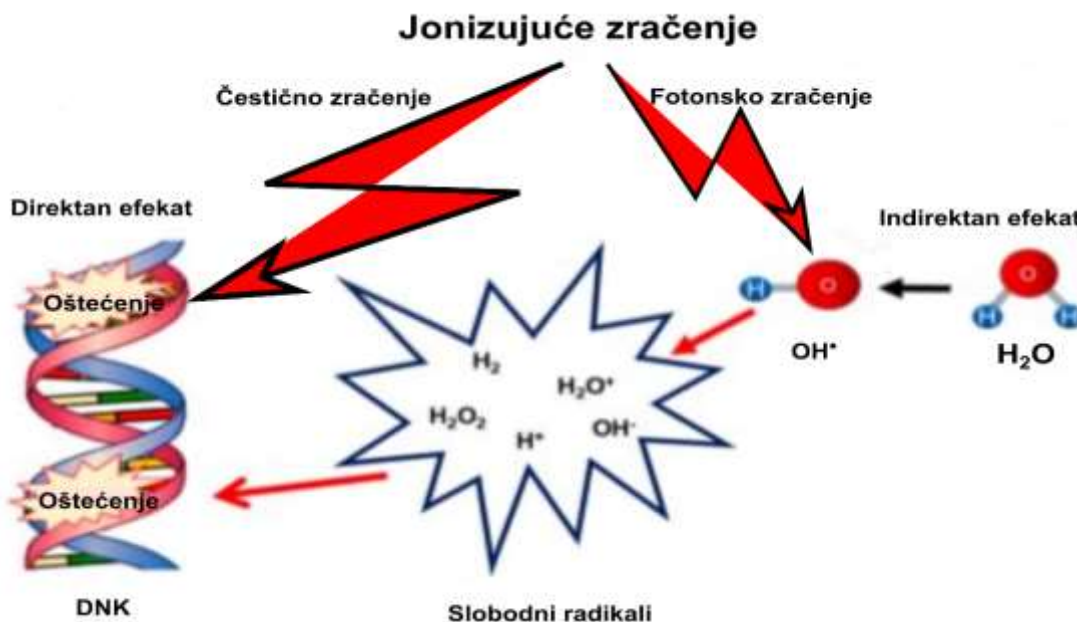
Efektivna doza (E) je dozimetrijska veličina koja opisuje efekat jonizujućeg zračenja na ceo organizam. Ona predstavlja sumu proizvoda tkivnih težinskih faktora (W_T) i ekvivalentne doze (H).

$$E = \sum W_T \cdot H \quad (9)$$

Smrtonosna doza zračenja (engl. lethal dose - LD) označava onu dozu koja izaziva smrt određenog procenta ispitivane vrste životinja. Npr. LD50/30 označava onu dozu zračenja od koje uginu 50 % životinja nakon 30 dana od tretmana.

1.2.1. INTERAKCIJA JONIZUJUĆEG ZRAČENJA SA BIOLOŠKIM SISTEMIMA

Biološki efekti jonizujućeg zračenja mogu biti *direktni*, u vidu ciljanog oštećenja makromolekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina i *indirektni* preko radiolize molekula vode (Desouky et al. 2015). Usled direktnog dejstva jonizujućeg zračenja na organske molekule dolazi do nastanka slobodnih radikala koji mogu reagovati međusobno ili sa okolnim molekulima, što vodi promeni u hemijskom sastavu sredine, odn. do kidanja postojećih ili stvaranja novih veza medju molekulima. Indirektan efekat jonizujućeg zračenja na biološki aktivne molekule se odvija kroz dejstvo primarnih i sekundarnih produkata radiolize vode i molekula koji nisu pretrpeli oštećenja u toku direktne interakcije. Na slici 3. prikazan je direktan i indirektan uticaj jonizujućeg zračenja na dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK molekul).



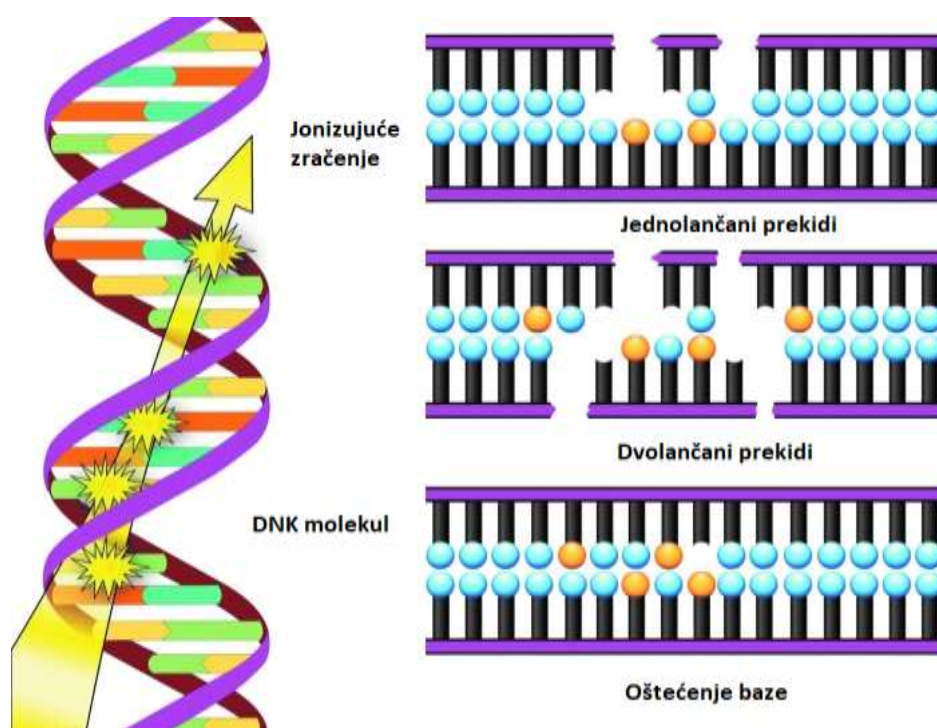
Slika 3. Direktan i indirektan uticaj zračenja na molekul DNK. U direktnom efektu snop zračenja direktno kida molekul DNK, dok u indirektnom efektu intereaguje sa molekulom vode, pri čemu nastaju slobodni radikali koji dovode do oštećenja DNK molekula. Preuzeto i modifikovano (Mun et al. 2018).

1.2.2. INTERAKCIJA SA BIOLOŠKI AKTIVNIM MOLEKULIMA

Jonizujuće zračenje deluje na DNK molekul, izazivajući mutacije, oštećenje baza, jednolančane ili dvolančane prekide, što vodi karcinogenezi ili ćelijskoj smrti (Close et al. 2013). Osim oštećenja DNK molekula, jonizujuće zračenje može uzrokovati povećanu permeabilnost fosfolipidnih membrana usled lipidne peroksidacije (Kiang et al. 2012), kao i promene u ekspresiji, funkciji i sekundarnoj strukturi proteina (Antebi et al. 2016).

Nukleinske kiseline

Zbog svoje ključne uloge u očuvanju integriteta ćelije, dvostruka spirala DNK je primarna meta za jonizujuće zračenje. Zračenje može indukovati širok spektar lezija u DNK, uključujući oštećenje azotnih baza i šećera, jednolančane i dvolančane prekide (Slika 4), kao i formiranje unakrsnih veza i klastera unutar molekula DNK (Duncan Lyngdoh and Schaefer 2009). Usled oštećenja DNK može doći do mutacija gena i hromozomskih aberacija, što dalje može dovesti do morfoloških promena ćelija, karcinogeneze, ili ćelijske smrti (Borges et al. 2009; Surova and Zhivotovsky 2013). Raspoloživa literature pokazuje da oštećenja na bazama igraju manju ulogu u mutacijama gena (Hagen 1986). Takodje, jednolančani prekidi na pojedinim mestima u DNK nisu od presudnog značaja za nastanak genskih lezija, jer se većina takvih prekida može popraviti efikasnim ćelijskim mehanizmima opravke DNK (Abbotts and Wilson 2017). Sa druge strane, dvolančani prekidi izazvani jonizujućim zračenjem smatraju se lezijama koje vode hromozomskim aberacijama, karcinogenezi i ćelijskoj smrti (Olive 1998).



Slika 4. Efekati jonizujućeg zračenja na molekul DNK; jednolančani prekidi, dvolančani prekidi i oštećenje baze. Preuzeto i modifikovano iz (Holley et al. 2014).

Nakon oštećenja DNK, aktiviraju se mehanizmi za oporavak ćelije, a ćelijski ciklus se zaustavlja kako bi se popravilo oštećenje DNK (Scully et al. 2020). U zavisnosti od tipa oštećenja, kao i faze ćelijskog ciklusa, reparacioni mehanizmi dvostrukog prekida lanca DNK se odvijaju najviše putem homolognih i nehomolognih rekombinacija (Langerak and Russell 2011). Homologne rekombinacije se odvijaju u kasnoj S/G2 fazi ćelijskog ciklusa, tako što oštećena DNK koristi neoštećenu sestrinsku hromatidu ili homologni hromozom kao obrazac za popravku, dok se nehomologne rekombinacije javljaju tokom G₀, G₁ i rane S faze. Ovaj tip reparacije podrazumeva prepoznavanje DNK oštećenja od strane heterodimera KU70 i KU80 proteina, njihovo vezivanje za DNK i zaštitu od dalje razgradnje (Fell and Schild-Poulter 2012), aktivaciju DNK zavisnih kinaza proteina - DNK-PKcs (Davis et al. 2014) i DNK-ligaze IV, koji formiraju filamente i most sa prekinutim delovima DNK, dovodeći do stabilizacije molekula (Hammel et al. 2010; Ochi 2014). Pokazano je da ozračivanje dozom od 1 Gy ubija samo oko 30 % ćelija sisara zbog efikasnosti reparacionih mehanizama DNK, naročito u slučaju ako lezije nisu u vidu dvostrukih prekida (Belloni et al 2008).

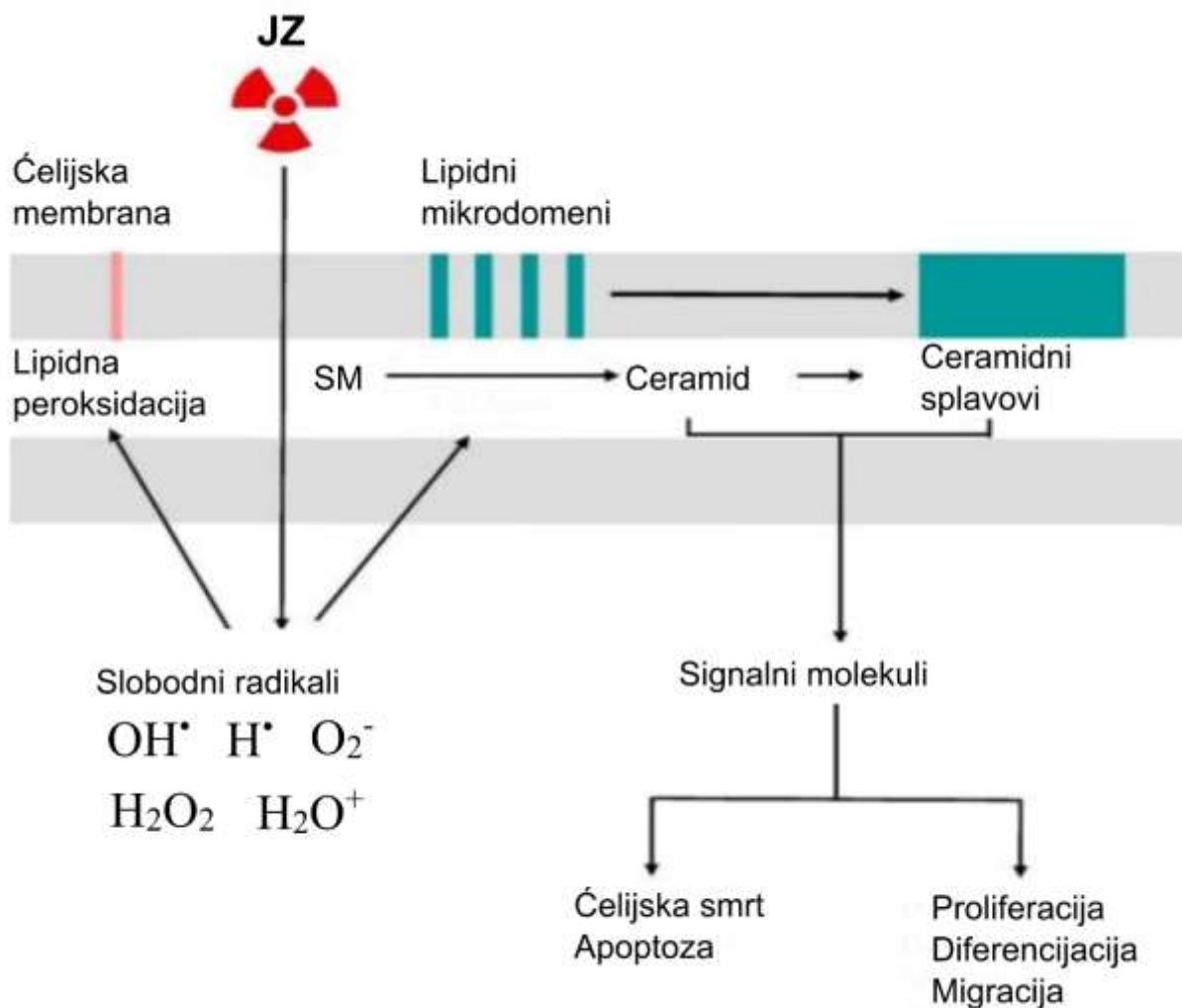
Proteini

Usled brojnosti i osetljivosti na dejstvo slobodnih radikala, proteini su posebno podložni oksidacijskim promenama izazvanim jonizujućim zračenjem. Oksidacija proteina dovodi do strukturnih promena, i posledično delimičnog ili potpunog gubitka funkcije proteina. Poznato je više od 35 vrsta oksidativnih modifikacija proteina, uključujući direktnu oksidaciju aminokiselina, oksidativno cepanje proteinske okosnice i/ili bočnih lanaca aminokiselina, karboksilaciju, kao i adiciju produkata oksidacije lipida (Cabiscol et al. 2014). Aromatične aminokiseline poput tirozina i triptofana su najpodložnije reakciji sa slobodnim radikalima, a dominantni reakcioni put je adicija OH[•] radikala na aromatični prsten (Davies 2005), nakon čega dolazi do formiranja hidroksilnih i nitroksilnih derivata ovih aminokiselina (Ferdinandy and Schulz 2001; Yamakura and Ikeda 2006). Oksidativni stres može izazvati reverzibilne i ireverzibilne promene proteina. Do reverzibilnih promena dolazi oksidacijom aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su metionin, cistein i cistin. Mnoge studije sugerišu na ulogu oksidacije kao regulatornog mehanizma za redoks zaštitu i modulaciju funkcije proteina (Poole and Nelson 2008; Herrero et al. 2008; Luo and Levine 2009). Usled uticaja slobodnih radikala, ćelija aktivira mehanizme postranslacione modifikacije koji dovode do nastanka karboksilnih derivata i gubitka proteinske funkcije (Madian and Regnier 2010). Bočni lanci aminokiselina, posebno histidina, arginina, lizina, prolina i treonina podležu direktnom ili indirektnom (kroz interakciju sa oksidovanim ugljenim hidratima i lipidima) dejstvu slobodnih radikala pa dolazi do porasta broja karboksilnih grupa na proteinima, što predstavlja nepovratni proces karboksilacije (Nyström 2005; Maisonneuve et al. 2009; Pena et al. 2012).

Lipidi

Zračenje može direktno oštetiti lipide, ali utvrđeno je da opštoj modifikaciji lipida najviše doprinosi oštećenje indukovano slobodnim radikalima proizvedenim pri radiolizi vode (Benderitter et al. 2003). Jonizujuće zračenje može indukovati lipidnu peroksidaciju i fragmentaciju, što su glavne modifikacije lipida nakon ozračivanja; učestanost ovih modifikacija raste sa porastom doze primenjenog zračenja. Naročito je izražena peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina, što za posledicu može imati fragmentaciju plazma membrane, i posledično povećanje propustljivosti, poremećaje u elektrohemijskim gradijentima jona i drugim transmembranskim procesima (Wong-ekkabut et al. 2007; Corre et al. 2010). Sfingolipidi su jedna

od četiri klase membranskih lipida i uključeni su u glavne signalne puteve koji se aktiviraju nakon zračenja. Sfingomijelin je najzastupljeniji sfingolipid u životinjskim ćelijskim membranama, posebno u membranama mijelinskog omotača koji okružuje aksone nekih nervnih ćelija. Sfingomijelin se sastoji od hidrofobnog dela ceramida i hidrofilne fosforilhlorske grupe. Usled dejstva oksidativnog stresa, dolazi do lipidne peroksidacije i aktivacije enzima kisele sfingomijelinaze, što dovodi do oslobađanja ceramida i promene biofizičkih svojstava membrane (Corre et al. 2010). Posledično dolazi do nastanka mikrodomena bogatih ceramidima i ceramidnih splavova (engl. *rafts*), što dalje vodi prostornom reorganizovanju receptora, intracelularnih signalnih molekula i mogućoj ćelijskoj smrti (Slika 5).



Slika 5. Efekti zračenja na ćelijskoj membrane: peroksidacija lipida, cepanje sfingomijelina, stvaranje lipidnih mikrodomena bogatih ceramidima i ceramidnih platformi, reorganizacija signalnih molekula, ćelijska smrt. Preuzeto i modifikovano iz (Corre et al. 2010).

Šećeri

Jonizujuće zračenje može indukovati promene u strukturi šećera, a u zavisnosti od primenjene doze može doći do promene ukusa, teksture i boje. U rastvorima šećera najreaktivniji je hidroksilni radikal nastao usled radiolize vode, koji dovodi do prekida veze između ugljenika i vodonika. Druga moguća reakcija je hidroliza na glikozidnoj vezi (Podadera and Sabato 2007). Usled radiolize saharoze nastaju glukoza i fruktoza, kao i radiolitički proizvodi 2-furaldehid, 2(5H)-furanon, oksalna kiselina i mravlja kiselina. Razgradnja saharoze se može objasniti cepanjem glikozidne veze, kao i selektivnom apsorpcijom vodonika na C5 prsenu furanoze pomoću hidroksilnog radikala (Ramírez-Cahero and Valdivia-López 2018). Nakon ozračivanja glukoze (npr. 3mg/ml sa 1kGy) nastaju 2-furaldehid, furfural alkohol, 2-furoična kiselina, 2 (5H) furanon, hidroksimetil furoična kiselina, glukonska, glukuronska, levulinska i glicerinska kiselina. S druge strane, pored ovih jedinjenja, zračenjem rastvora fruktoze (3 mg/ml) nastaje još i 2-acetilfuran, glikolaldehid, mravlja, jantarna, oksalna i sirćetna kiselina (Ramírez-Cahero and Valdivia-López 2018).

1.3. OSETLJIVOST TKIVA NA JONIZUJUĆE ZRAČENJE

Kako bismo u potpunosti mogli sagledati efekte zračenja, neophodno je imati u vidu i različitu osetljivost pojedinih ćelija i tkiva na zračenje. Osetljivost pojedinih tkiva i organa na dejstvo jonizujućeg zračenja je različita. U zavisnosti od tipa ćelija i tkiva, zračenje kroz navedene molekularne promene može izazvati gubitak određene funkcije i ćelijsku smrt. Najosetljivija su ona tkiva koja se sastoje od proliferirajućih ćelija, kao što su matične ćelije u hematopoetskom sistemu, čije oštećenje je primarni uzrok smrti nakon slučajnog ili namernog izlaganja umerenoj ili visokoj dozi jonizujućeg zračenja (Shao et al. 2014). Takođe, na jonizujuće zračenje su izuzetno osetljive i ćelije crevnog epitela (Lu et al. 2019), kao i ćelije reproduktivnih organa (Ogilvy-Stuart' and Shalet 1993), dok su diferencirane ćelije kao što su nervne i mišićne ćelije znatno otpornije na zračenje (Jurdana 2008; Kudo et al. 2014). Radijaciona osetljivost varira i u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa, pa su ćelije najotpornije u S-fazi zbog povećane ekspresije enzima za reparaciju DNK, dok su najosetljivije u M fazi ćelijskog ciklusa kada je sadržaj DNK u jedru najveći (Hubenak et al. 2015).

Smatra se da odgovori bioloških sistema na jonizujuće zračenje u velikoj meri slede linearni obrazac doza-odgovor (Reisz et al. 2014). Međutim, zbog visokog sadržaja lipida i velike potrošnje kiseonika, ali i relativno skromnog antioksidativnog odbrambenog mehanizma koji se ogleda u niskom sadržaju katalaza, glutation peroksidaze, i vitamina E, moždano tkivo je podložnije dejstvu slobodnih radikala i oksidativnom stresu od drugih tkiva (Friedman 2011). Istraživanja koja se bave ovom problematikom su uglavnom fokusirana na moguće negativne posledice radioterapije primarnih i metastatičkih moždanih tumora, a od posebnog značaja su studije koje se bave neuroprotekcijom. Smatra se da oksidativni stres izazvan zračenjem u normalnom moždanom tkivu doprinosi opadanju kognitivnih sposobnosti na duže staze (Greene-Schloesser et al. 2012; Collett et al. 2020).

Oštećenja na mozgu usled zračenja se mogu podeliti na akutna, rana i kasna (Tofilon and Fike 2000). Akutna oštećenja su reverzibilna i javljaju se u prvim nedeljama nakon zračenja, uglavnom nakon primene jedne veće doze zračenja (preko 3 Gy), a manifestuju se u vidu glavobolje, pospanosti i mučnine. Rana oštećenja se javljaju u periodu od mesec ili nekoliko

meseci nakon zračenja i karakterišu ih prolazni simptomi kao što su gubitak pamćenja, poremećaj koncentracije i prolazna demijelinizacija. Za razliku od ovih simptoma koji su reverzibilni, kasna oštećenja mozga su nepovratna i progresivna. Nastaju u periodu od šest ili više meseci nakon zračenja, a karakterišu ih vaskularne promene tj. progresivno smanjenje kapilarne mreže u mozgu (Brown et al.), posledično smanjenje broja endotelnih ćelija (Lyubimova and Hopewell 2004), smanjenje broja oligodendrocita (Kurita et al. 2001), demijelinizacija, gliozna, nekroza bele mase i kognitivna oštećenja (Greene-Schloesser et al. 2012).

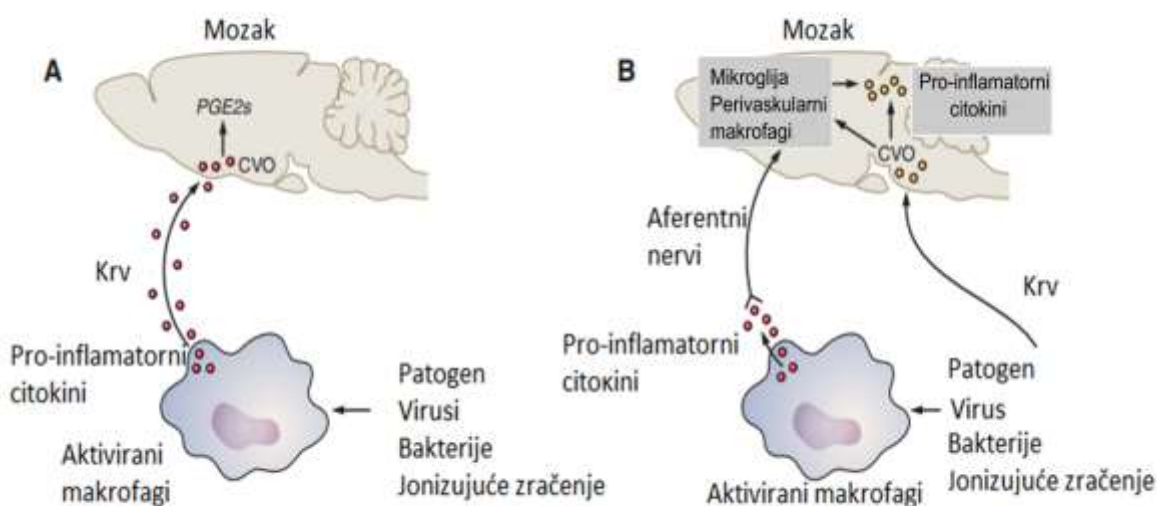
Starost jedinke je takodje važan faktor koji treba imati u vidu prilikom ispitivanja radijacionih oštećenja na mozgu. Pokazano je da stariji pacovi imaju manju smrtnost neurona od mlađjih, ali i da imaju izraženiji inflamatorni odgovor i veću zastupljenost aktivirane mikroglije što bitno utiče na kasniji nastanak kognitivnih oštećenja (Schindler et al. 2008).

1.4. ODGOVOR ORGANIZMA NA JONIZUJUĆE ZRAČENJE

Izlaganje organizma stranim telima, bakterijama, virusima ili jonizujućem zračenju, podstiče aktivaciju ćelija imunskog sistema. Leukociti prodiru na mesto povrede napadajući patogene i razarajući mutirane ćelije. Mozak je organ sa veoma slabom regenerativnom sposobnošću, a interakcija izmedju centralnog nervnog sistema (CNS) i imunskog sistema je u nekoliko aspekata drugačija od interakcije sa ostalim organima. Mozak poseduje krvno moždanu i krvno-cerebrospinalnu barijeru koje kontrolišu prodor ćelija imunskog sistema u parenhim mozga.

Smatralo se da je mozak zaštićen od ove imunske reakcije zbog nedostatka limfne drenaže u moždanom parenhimu, ali danas je poznato da su mozak i imunski sistem povezani na različitim nivoima organizacije. Postoji mreža limfnih sudova u moždanim ovojnicama (*meningama*) – membranama koje okružuju mozak i kičmenu moždinu i koji imunske ćelije preusmeravaju iz cerebrospinalne tečnosti do grupe limfnih čvorova, povezujući mozak direktno sa imunskim sistemom van mozga (Louveau et al. 2015, Louveau et al. 2018). Smatra se da povreda centralnog nervnog sistema rezultira snažnom aktivacijom T-ćelija u cervikalnim limfnim čvorovima, kao i da promene u njima mogu uticati na napredovanje bolesti kod onih neuroloških poremećaja sa istaknutom imunskom komponentom, poput multiple skleroze, Alzhajmerove bolesti i autizma (Louveau et al. 2016). Tokom imuskog odgovora mozak i imunski sistem “razgovaraju jedan sa drugim” i ovaj proces je od suštinskog značaja za održavanje homeostaze. Linije komunikacije izmedju imunskog, nervnog i endokrinog sistema čine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda osa (HPA osa) i simpatički nervni sistem (SNS) (Dantzer 2018). U uslovima stresa, povrede ili opasnosti, HPA osa se aktivira i dolazi do oslobadjanja kortizola i kortikosterona (Kumar et al. 2013). Takodje, dolazi i do pojačanog oslobadjanja noradrenalina (NA) u jezgrima ponsa, kao što je *locus coeruleus* (LC) (Borodovitsyna et al. 2018). Noradrenalin deluje snažno na druge delove mozga kao neurotransmiter i neuromodulator, i pojačano se izlučuje u završecima simpatičkih nerava u primarnim i sekundarnim limfoidnim organima, ostvarujući na taj način noradrenergičku inervaciju imunskih organa i ćelija (Bellinger et al. 2006). Lokalno oslobođeni noradrenalin, zajedno sa cirkulišućim kateholaminima, utiče na aktivnost različitih limfoidnih ćelija, modulirajući proizvodnju citokina, što dovodi do narušavanja homeostaze i poremećaja u funkcionisanju kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sistema (povećava se brzina otkucaja srca i krvni pritisak, pokreće se oslobadjanje glukoze iz zaliha energije, smanjuje protok krvi u gastrointestinalnom sistemu i inhibira pražnjenje mokraćne bešike).

Imunsko-moždana signalizacija se može odvijati preko krvno-moždane barijere odn. kroz propusne regije u krvno-moždanoj barijeri, kao što su cirkumventrikularni organi, pri čemu periferni cirkulišući citokini prolaze kroz njih i ulaze u moždani parenhim (Dronjak and Gavrilovic 2006; Quan 2008). Na taj način, proinflammatory citokini iz periferne cirkulacije indukuju oslobađanje lipofilnog prostaglandina E2 koji deluje kao sekundarni glasnik na neurone (Slika. 6A). Pored toga, tokom inflamacije na periferiji dolazi do povećane ekspresije adhezivnih molekula, selektina i integrina, koji olakšavaju prodor leukocita kroz endotel u mozak. Ovaj vid komunikacije predstavlja humoralni put. Drugi vid komunikacije između imunskog i nervnog sistema odvija se preko nervnog puta, odn. aktivacijom receptora za citokine na aferentnim nervnim vlaknima (Slika. 6B). Treći vid komunikacije podrazumeva aktivaciju imunskih ćelija mozga – mikroglialnih ćelija (ćelijski put). Periferna inflamacija dovodi do aktivacije mikroglije i perivaskularnih makrofaga (Slika. 6B), što dovodi do stvaranja mnoštva pro-inflamatornih faktora koji mogu dodatno privući periferne imunske ćelije (monocite i T-ćelije) u moždane ovojnice i moždani parenhim.

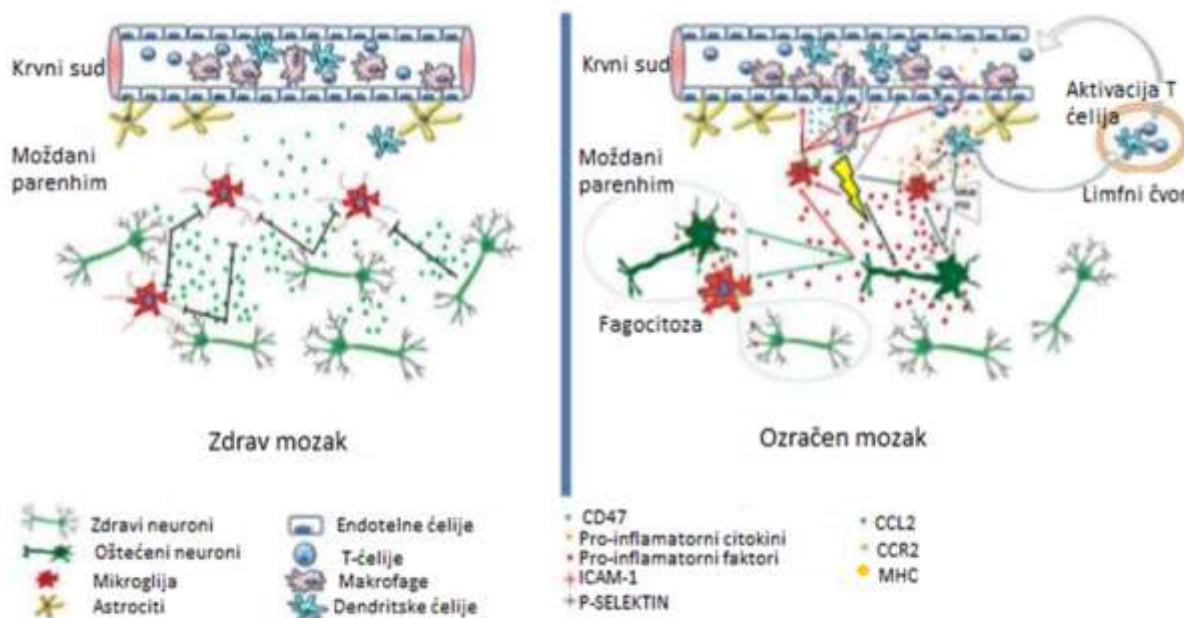


Slika 6. Imunsko-moždana signalizacija. Aktivacija makrofaga u krvi pacova usled dejstva patogena, virusa, bakterije ili jonizujućeg zračenja. A) Humoralni put komunikacije nervnog i imunskog sistema - oslobađanje pro-inflamatornih citokina u perifernoj cirkulaciji i njihov efekat na cirkumventrikularne organe. B) Nervni put komunikacije nervnog i imunskog sistema – preko aferentnih nervnih vlakana; aktivacija mikroglialnih ćelija i perivaskularnih makrofaga. Preuzeto i modifikovano iz (Dantzer 2018).

1.5. RADIJACIONO INDUKOVANA NEUROINFLAMACIJA

Jonizujuće zračenje je snažan ćelijski stresor, koji indukuje slične signalne puteve kao i drugi stresori. U mozgu, jonizujuće zračenje indukuje inflamaciju uglavnom putem mikroglije i endotelnih ćelija (Slika. 7). Aktivirana mikroglija proliferiše, okružuje neurone, oslobađajući pro-inflamatorne faktore, TNF- α , IL-1 β , IL-6, hemokin CCL2 i slobodne radikale, dobijajući ameboidni oblik ćelijskog tela sa redukovanim ćelijskim produžecima (Kim and de Vellis 2005; Betlazar et al. 2016). Hemokinski receptori kao što su CCL7, CCL8, CCL12, CXCL4, CCR1 i

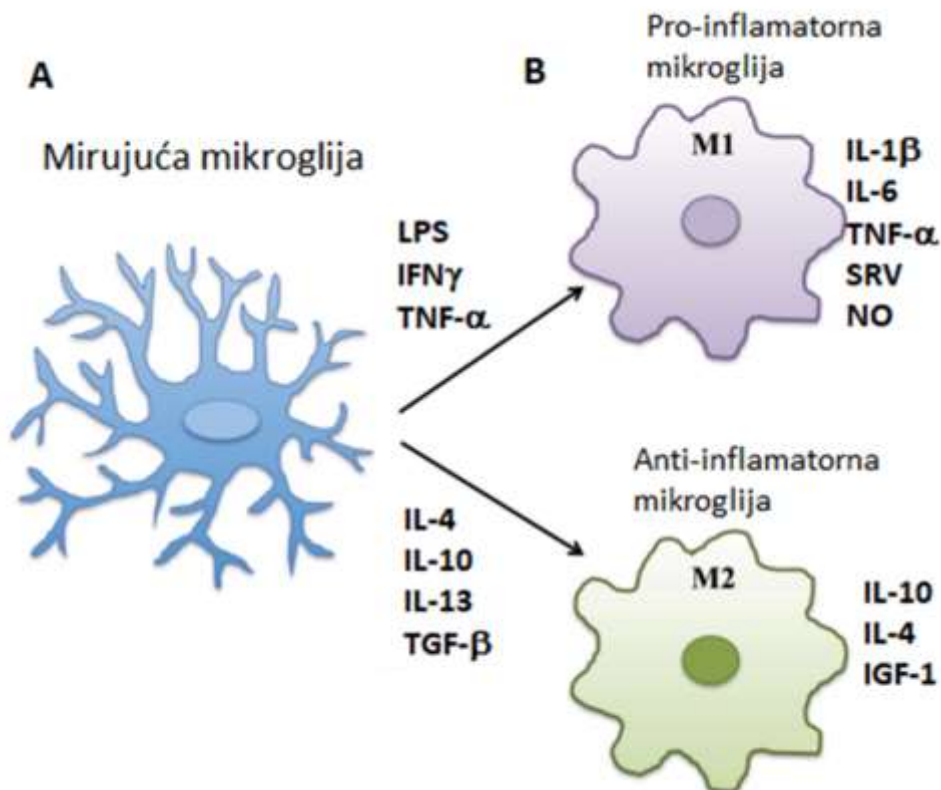
CCR2 se također pojačano ekspimiraju usled zračenja mozga. Također, smatra se da jonizujuće zračenje indukuje pojačanu infiltraciju CCR2 pozitivnih makrofaga u mozak, koje zatim ispoljavaju fenotip nalik mikrogliji (Belarbi et al. 2013; Morganti et al. 2014). Jonizujuće zračenje dovodi do povećane ekspresije unutarćelijskog adhezivnog molekula 1 (engl. Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) i P-selektina na endotelnim ćelijama, kao i do redistribucije CD47 na ćelijskoj površini, što pojačava inflamatorne signale u mozgu (Sharp et al. 2003; Martinelli et al. 2014).



Slika 7. Moždani parenhim i imunski odgovor u zdravom i ozračenom mozgu. Preuzeto i modifikovano iz (Lumniczky 2017).

1.5.1. MIKROGLIJA

Glijalne ćelije su osetljivije na zračenje od neurona (Kudo et al. 2014), pa su samim tim pogodan marker za ispitivanje efikasnosti radioprektora. *Mikroglialne ćelije* su mezodermalnog porekla i predstavljaju glavne ćelijske komponente uključene u urođeni imunski odgovor centralnog nervnog sistema. One čine oko 12% ukupnih ćelija mozga (Gebicke-Haerter 2001). Analogno ulozi makrofaga i limfocita u perifernoj imunskoj odbrani organizma, uloga mikroglije je da prilikom povrede ili bolesti deluje kao imunska odbrana mozga (Yang et al. 2010). U stanju mirovanja, mikroglija je neaktivna i pokazuje jako razgranatu morfologiju (Slika. 8A).



Slika 8. Izgled mikroglije u normalnim uslovima i tokom neuroinflamacije. A) mirujuća mikroglia, B) aktivacija mikroglije: pro-inflamatorna mikroglia (M1 fenotip) nastaje pod dejstvom lipopolisaharida (LPS) ili pro-inflamatornih citokina i oslobadja pro-inflamatorne citokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α), reaktivne oblike kiseonika i NO; anti-inflamatorna mikroglia (M2 fenotip) – nastaje pod dejstvom anti-inflamatornih citokina (IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- β) i inhibira dejstvo pro-inflamatorne mikroglije dejstvom anti-inflamatornih faktora kao što su IL-10, IL-4 i IGF-1. Preuzeto i modifikovano iz (Salvi et al. 2017).

Dugačkim i tankim ćelijskim nastavcima koji se protežu od ćelijskog tela do okolnog miljea, mikroglia neprestano istražuje okolinu, održavajući na taj način homeostazu i identifikujući signale koji zahtevaju odgovor. Kada reaguje na vanćelijske signale kao što su povrede, prisustvo patogena, mrtvih ili umirućih ćelija, prisustvo pro-inflamatornih citokina (poput INF- γ i TNF- α) ili lipopolisaharida (LPS), mikroglia prolazi kroz morfološke promene dobijajući ameboidni oblik sa kratkim ili nepostojećim ćelijskim nastavcima (Thameem Dheen et al. 2007). Ovu morfološku promenu prati i promena u signalizaciji i ekspresiji gena, koja može rezultirati promenama u ekspresiji površinskih receptora, i oslobadjanju pro- (IL-1 β , IL-6, TNF- α) ili anti-inflamatornih faktora (IL-10, IL-4, IGF-1), reaktivnih oblika kiseonika i azot monoksida (NO) (Salvi et al. 2017). Kumulativni efekat ovih promena u morfologiji i fenotipu je prelazak iz stanja mirovanja u stanje aktivirane mikroglije. Klasično aktivirana mikroglia (M1 tip mikroglije) u centralnom nervnom sistemu oslobadjanjem citotoksičnih, proinflamatornih faktora uklanja prisutne patogene i oštećene ili promenjene ćelije i na taj način omogućava sledstveno delovanje alternativno aktivirane mikroglije (M2 tip mikroglije) koja oslobadja anti-inflamatorne molekule čime

doprinosi opstanku okolnih neurona i reparaciji nastalih oštećenja (Slika. 8B). Ekspresija površinskih molekula, kao što su molekuli glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC), također je regulisana aktivacijom mikroglije (Jurga et al. 2020). Ovi molekuli omogućavaju mikrogliji da deluju kao antigen prezentujuće ćelije, i na taj način doprinose prezentovanju antigena T-ćelijama u mozgu i njihovoj posledičnoj aktivaciji. Mikroglija također vrši i fagocitozu oštećenih, izumrlih ćelija i stranih materija u vanćelijskom prostoru, ali se smatra i da njihova duža aktivacija može doprineti hroničnom inflamatornom stanju mozga i neurodegenerativnim promenama (Galloway et al. 2019).

1.5.2. ASTROCITI

Astroцитi su ćelije ektodermalnog porekla i predstavljaju najbrojnije glijalne ćelije u centralnom nervnom sistemu. Prema svojoj morfologiji mogu se podeliti na vlaknaste (sa brojnim dugim produžecima nalik vlaknima i mnogobrojnim filamentima u citoplazmi, prisutnih uglavnom u beloj masi) i protoplazmatske (grmolikog izgleda, prisutnih u sivoj masi mozga). Pored toga, u mozgu odraslih postoje i druge vrste astrocita, poput radijalnih glijalnih ćelija, Milerovih i Bergmanovih glijalnih ćelija, koje se morfološki mogu razlikovati u različitim regijama mozga (Oberheim et al. 2012).

Astroцитi su povezani sa različitim aspektima fizioloških funkcija. Igraju važnu ulogu u regulisanju homeostaze, izlučivanju hranljivih materija i metabolizmu neurotransmitera, kao što su glutamatna i gama amino buterična kiselina (GABA) (Gee and Keller 2005; Schousboe et al. 2014). Astroцитi okružuju endotelne ćelije i pericite, pa su samim tim odgovorni i za integritet krvno-moždane barijere. Pored toga, astrociti mogu pružiti strukturnu i metaboličku podršku neuronima. Preko svojih produžetaka oni posreduju i deluju kao most između neurona i krvnih sudova. Astroцитi štite endotelne ćelije i neurone od oksidativnog stresa (Wilson 1997). Takođe, utiču na povećanje sinaptičke plastičnosti, jer imaju ključnu ulogu u stvaranju i održavanju sinapsi. Drugim rečima, astrociti su ključni za održavanje normalne funkcije mozga (Verkhatsky and Nedergaard 2018). Istovremeno, astrociti učestvuju u regulaciji urođenog imunskog odgovora ekskrecijom inflamatornih faktora, poput citokina, hemokina, proteina komplemenata i slobodno radikalskih vrsta kiseonika i azota. Postoji veliki broj studija koje ukazuju da reaktivni astrociti imaju ključnu ulogu u napredovanju neurodegenerativnih bolesti (Phatnani and Maniatis 2015; Liddel and Barres 2017). Reaktivni astrociti se karakterišu hipertrofijom ćelijskog tela ili jezgra. Utvrđeno je da reaktivni astrociti gube potpurnu ulogu i doprinose progresiji neurodegenerativnih bolesti (Li et al. 2019). Dakle, astrociti su potrebni za preživljavanje neurona, a gubitak normalne funkcije astrocita može doprineti neurodegeneraciji. U zavisnosti od stepena povrede i doze zračenja, može doći do proliferacije astrocita i pojačane ekspresije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) (Hwang et al. 2006; Sofroniew and Vinters 2010). Takođe, reaktivni astrociti izlučujući mnoštvo pro-inflamatornih faktora, kao što su ciklo-oksigenaza, unutarćelijski molekuli adhezije, citokini, hemokini i slobodni radikali, što može doprineti propadanju krvno-moždane barijere i infiltraciji leukocita u mozak (Giovannoni 2020; Wilson et al. 2009). Ozračivanje mozga pacova i miša povećava nivo ekspresije proteina GFAP, kako akutno (24 sata nakon zračenja), tako i hronično (4-5 meseci) (Chiang et al. 1993; Hong et al. 1995). Pokazano je i da kondicionirani medijum iz ozračenih mikroglialnih ćelija izaziva astrogliozu i nastanak edema (Hwang et al. 2006).

1.5.3. INFLAMATORNI MOLEKULSKI MEDIJATORI

Citokini su signalni proteini i hormonalni glasnici koje primarno luče ćelije imunskog sistema, uključujući neutrofile, monocite, makrofage, limfocite (B i T ćelije) i urodjenoubilačke ćelije (engl. natural killer cells, NK ćelije) (Kany et al. 2019). B i T ćelije na ćelijskoj membrani ispoljavaju antigen specifične receptore, koji im omogućavaju specifično prepoznavanje bakterija, virusa i patogena. CD4⁺ T-limfociti (engl. T helper, pomoćničke T-ćelije) se smatraju najznačajnijim proizvođačima citokina. Prema vrsti efekorskog odgovora, odn. citokina koje proizvode CD4⁺ T-limfociti, razlikuje se Th1 i Th2 tip CD4⁺ T-limfocita. Citokini Th1 tipa spadaju u pro-inflamatorne, odn. citokine koji dovode do inflamatornog odgovora. S druge strane, citokini tipa Th2 su anti-inflamatorni i oni se suprotstavljaju delovanju pro-inflamatornih citokina u organizmu. Prekomerna proizvodnja pro-inflamatornih citokina može dovesti do nekontrolisanog oštećenja tkiva, pa je ravnoteža između pro-inflamatornih i anti-inflamatornih citokina od presudnog značaja za očuvanje homeostaze u organizmu (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). U centralnom nervnom sistemu, citokini igraju važnu ulogu u regulaciji sna, razvoju neurona, starenju i raznim neuroendokrinim funkcijama (Galic et al. 2012). Ipak, najveća pažnja usmerena je ka razumevanju citokina kao posrednika tokom inflamatornih stanja bilo mozga ili periferije. Nivoi citokina u krvi su obično niski, ali se mogu znatno povećati kao odgovor na patogene, upale ili povrede.

Faktor nekroze tumora - alfa (TNF- α) i interleukin-6 (IL-6) su ključni pro-inflamatorni citokini iz krvi koji dovode do aktivacije HPA ose i simpatičkog nervnog sistema (Dunn 2006). TNF- α je jedan od najvažnijih plejotropnih citokina i uključen je u kontrolu urođenog imunskog odgovora. Kada dodje do inflamacije u organizmu, TNF- α je među prvim citokinima koji se oslobadja i indukuje proizvodnju drugih pro-inflamatornih citokina (Turner et al. 2014). IL-6 je takodje pretežno pro-inflamatorni citokin sa širokim spektrom bioloških aktivnosti u imunskoj regulaciji, hematopoezi, a presudan je i u sazrevanju i diferencijaciji B-ćelija, kao i u aktivaciji T-ćelija (Kishimoto 2010). S druge strane, IL-10 je jedan od najvažnijih anti-inflamatornih citokina koji inhibira sintezu pro-inflamatornih citokina i uključen je u kontrolu urođenog i stečenog imunskog odgovora, te stoga igra bitnu ulogu u održavanju homeostaze.

1.6. RADIOPROTEKTORI

U cilju efikasne radiološke zaštite ljudi u uslovima izlaganja jonizujućem zračenju iz različitih izvora, dizajnirane su supstancije čija je uloga da smanje štetne efekte izlaganja zračenju i smanje rizik od fatalnog ishoda koje se nazivaju *radioprotektorima*. Potraga za efikasnim radioprotektivnim supstancijama traje više od šest decenija; prve hemikalije koje ublažavaju štetne efekte jonizujućeg zračenja na telo sisara otkrivene su pre više od pola veka (Gudkov et al. 2015). Pored sulfhidrilnih sintetičkih jedinjenja, poznatih i kao WR grupa radioprotektora (većina od njih je sintetisana u instituciji Walter Reed Army Medical Center, USA – otud skraćenica WR u nazivu jedinjenja), ispitivane su i brojne supstancije biljnog i životinjskog porekla (Kuntić et al. 2013), koje uz ispoljavanje minimalne toksičnosti povećavaju otpornost organizma na zračenje aktiviranjem antioksidativnog ili nekog drugog zaštitnog sistema. U slučaju da je došlo do unošenja radioaktivnih supstancija u organizam, kao radioprotektivne supstancije mogu poslužiti različiti helatori (kao što je npr. EDTA) i adsorbenti, koji štite organizam vezivanjem radionuklida

i njihovom ekskrecijom iz organizma preko digestivnog trakta (Kuntić et al. 2013; Mun et al. 2018).

Razvoj novog leka za kliničku i nekliničku primenu zahteva dugotrajno istraživanje, koje uključuje procenu detaljnog mehanizma njegovog *in vivo* delovanja, povezane farmakokinetike i mogućih nuspojava. U slučaju testiranja potencijalnih radioprotektora prati se preživljavanje životinja ozračenih letalnom dozom zračenja ($LD_{50/30}$). Pored toga, neophodno je pratiti i brojne druge parametre, poput oštećenja DNK, lipida i proteina, i morfologije tkiva. Takođe, idealan radioprotektor treba da obezbedi značajnu zaštitu od zračenja za većinu organa, da ima prihvatljivu toksičnost i stabilnost u organizmu, da ima prihvatljiv način davanja za ljude (oralno ili alternativno intramuskularno), kao i da bude kompatibilan sa drugim lekovima koji će biti dostupni pacijentu ili osoblju koje radi sa zračenjem (Hosseinimehr 2007).

Radioprotektivni agensi mogu delovati putem različitih mehanizama. Neki od njih indukuju prirodnu proizvodnju radioprotektora poput superoksid dismutaze, glutationa i katalaze, dok drugi deluju tako što suzbijaju nastanak i/ili uklanjaju slobodne radikale (Varanda and Tavares 1998). Drugi doprinose reparaciji i stabilizaciji oštećenih molekula, dok neki mogu da modifikuju signalne puteve i da deluju kao imunomodulatori (Nair et al. 2000). Pojedini imaju sposobnost da smanje postradijacioni inflamatorni odgovor ili čak da odlože ćelijsku deobu, omogućavajući da se ćelija oporavi ili indukuju apoptozu (Citrin et al. 2010; Smith et al. 2017). Mogu se primeniti pre zračenja, kako bi se sprečio nastanak slobodnih radikala i njihovo štetno dejstvo na okolne biomolekule, ali takodje se mogu primeniti i u toku ili nakon zračenja u vidu terapije sa ciljem redukcije negativnih efekata radijacije na ćelije i tkiva i potpomaganja reparacije radijacijom nastalih oštećenja na biomolekulima. U tabeli 1. predstavljene su različite vrste radioprotektora i njihovi mehanizmi delovanja.

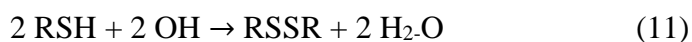
Tabela 1. Različite vrste radioprotektora i njihovi mehanizmi delovanja

| Radioprotektor | Mehanizam delovanja | Reference |
|--|--|---|
| Sulfhidrilne supstance Tioli, Aminotiol (WR supstance) - Amifostin | “Hvatanje” slobodnih radikala, donacija elektrona, stabilizacija oštećenih molekula, indukcija hipoksije | (Grđina et al. 2000; Vasin 2014) |
| Nitroksidi – Tempol, Tempol H, troxyl | “Hvatanje” slobodnih radikala | (Marciniak et al. 2015) |
| Bis-benzimidazol Hoechst 33342 | Donacija electrona i stabilizacija DNK, “hvatanje” slobodnih radikala | (Kaur et al. 2012; Chamberlin et al. 2019) |
| Helatori Dietilentriaminpentaacetat (DTPA) | Ublažavanje efekata pomoću transuranijumovih radionuklida (Pu, Am, Cm) | (Kuntić et al. 2013) |
| Superoksid dismutaza (SOD) enzim i njegovi metalokompleksi (Cu, Zn, Mg) | Ublažavanje efekata zračenja hvatanjem superoksid radikala O_2^- | (Johnke et al. 2014; Huang et al.) |
| ACE inhibitori (Enalapril, Ramipril) ACE receptorski antagonisti (penicilamin, pentoksifilin) | Inhibicija produkcije angiotenzina II, Supresija proliferacije i hroničnog oksidativnog stresa | (van der Veen et al. 2015) |
| Ca-antagonisti | Inhibicija ulaska Ca u ćeliju | (Floersheim 1993) |
| Imunomodulatori i steroidi, γ -interferon. | Povećanje produkcije citokina, imunska stimulacija. Pojačanje cirkulacije neutrofila | (Kalechman et al. 1990; Kimura et al. 1994) |
| Lipopolisaharidi i prostaglandini | Sinteza prostaglandina, popravke DNK molekula | (Riehl et al. 2000) |
| Antioksidanti (vitamin A, C i E) α -tokoferol monoglukoze, melatonin, biljni ekstrakti | “Hvatanje” slobodnih radikala, inhibicija hromozomskih aberacija | (Maurya et al. 2006; Khan et al. 2015) |

1.7. TIOLNI RADIOPROTEKTORI

Početa *in vivo* istraživanja na potencijalnim radioprotektorima koji sadrže sulfhidrilne supstance pokazala su da amino kiselina *cistein* ima snažno zaštitno dejstvo kod laboratorijskih životinja izloženih jonizujućem zračenju (Patt et al. 1949) i da tiolna (-SH) grupa deluje kao "hvatač" slobodnih radikala. Međutim za ostvarivanje neophodnog nivoa radioprotekcije, neophodno je unošenje velike količine cisteina, što za posledicu ima značajne neželjene efekte. Ovo otkriće inspirisalo je mnoge istraživače na polju radiobiologije, pa je od tada u daljim istraživanjima ispitano preko 4,400 potencijalnih sintetičkih radioprotektora sa aminotiolnom grupom (NH₂-SH) u svom sastavu.

Jedan od glavnih mehanizama delovanja brojnih sintetičkih tiolnih radioprotektora je eliminacija ("hvatanje") slobodnih radikala, čime se mogu preduprediti oštećenja izazvana jonizujućim zračenjem. Takodje, radioprotektori mogu reagovati sa slobodno radikalskim vrstama kiseonika ili organskim radikalima (R[•]), tako što doniraju atom vodonika pa dolazi do eliminacije nastalih radikalskih vrsta, što je prikazano sledećim reakcijama:



Eliminacija kiseonika putem reakcije



može dovesti do hipoksije u ćelijama i tkivima i posledično do smanjivanja neželjenih efekata po tkivo.

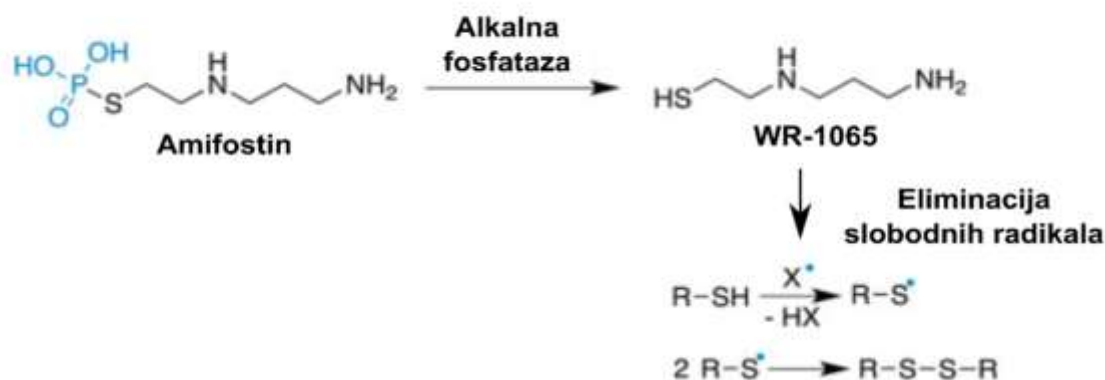
Radioprotektivna sposobnost većeg broja tiolnih jedinjenja (RSH, R'SH) je takodje povezana sa stvaranjem disulfida (RSSR'). Neki aminotiolni radioprotektori poput cisteamina i glutation disulfida mogu da se vezuju direktno za DNK formirajući disulfide, pa na taj način stabilizacijom molekula sprečavaju njihova oštećenja (Vasin 2014).

1.7.1. AMIFOSTIN

Većina sintetički napravljenih radioprotektora se pokazala toksična za čoveka, dok se mnoge prirodne supstance nisu pokazale u potpunosti efikasne (Nair et al. 2000). Tiolno jedinjenje WR-2721, koje je u Rusiji poznato kao gamafos, a u Sjedinjenim Američkim Državama kao amifostin, jedno je od prvih jedinjenja koje je uspešno korišćeno za zaštitu od zračenja. Amifostin predstavlja i jedini lek koji je Uprava za hranu i lekove (FDA) odobrila za smanjenje negativnih posledica radioterapije (Kouvaris et al. 2007; Facorro et al. 2004).

Amifostin je tiolni radioprotektor koji dejstvom alkalne fosfataze prelazi u aktivni metabolit aminotiola WR1065. Ovo jedinjenje deluje kao nespecifični citoprotektor i smanjuje toksičnost izazvanu jonizujućim zračenjem mehanizmom eliminacije slobodnih radikala (Slika 9). Zahvaljujući svojoj strukturi sa sulfhidrilnom grupom, na molekularnom nivou amifostin štiti DNK od štetnih efekata jonizujućeg zračenja, utiče na ekspresiju gena, stabilnost hromatina i

enzimsku aktivnost, dok na ćelijskom nivou, ima važne efekte na rast i napredovanje ćelijskog ciklusa (Grđina et al. 2000).



Slika 9. Mehanizam delovanja amifostina. Preuzeto i modifikovano iz (Avendano C. and Menendez JC, 2015)

Medjutim, amifostin je efikasan samo kada se primeni neposredno pre izlaganja jonizujućem zračenju, jer je poluživot leka u krvnoj plazmi kraći od 10 minuta, pa je njegova primena ograničena i nije pogodna za nekliničku upotrebu i radijacione nesreće poput eksplozija i nuklearnih havarija (Singh and Seed 2019). Takođe, utvrđeno je da amifostin ima i neželjene efekte kao što su mučnina, hipotenzija, hipokalcemija i alergijske reakcije (Vardy et al. 2002), pa je potraga za netoksičnim i efikasnim radioprotektorom i dalje aktuelna.

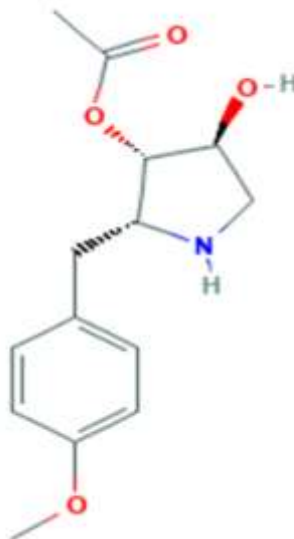
1.7.2. GL2011

Prirodno aminotiolno jedinjenje pod nazivom GL2011 pokazuje radioprotektivna svojstva i kao takvo je bilo predmet istraživanja poslednjih godina. U tim ispitivanjima pokazano je odsustvo toksičkih efekata na Albino Wistar pacovima (Okić-Djordjević et al. 2014; Ganesan et al. 2014). Apliciran intraperitonealno u tri identične doze (100mg/kg) i tri vremenske tačke (30 min pre zračenja, 3 h i 6 h nakon zračenja) smanjio je smrtnost ozračenih životinja za 87% u poredjenju sa 30% preživelih ozračenih životinja (Okić-Djordjević et al. 2014). Pokazano je da GL2011 ima značajan efekat na regeneraciju mikrovila crevnog epitela ozračenih životinja (Ganesan et al. 2014), kao i da sprečava negativan efekat zračenja na ćelije koštane srži (Okić-Djordjević et al. 2014).

Testovi ponašanja na pacovima pokazali su da GL2011 značajno povećava prosečnu brzinu kretanja pacova, dužinu predjenog puta, procenat velikih pokreta, učestalost spontanih pokreta, kao i da smanjuje vreme odmora u poredjenju sa ozračenim životinjama (Ganesan et al. 2014). Pokazano je i da GL2011 indukuje pojačanu ekspresiju proteina i antioksidativnih enzima, uključujući vimentin, septin 5, voltažno zavisni anjonski selektivni protein 1, kao i superoksid dismutazu 2 (Mn) i mitohondrijalni peroksiredoksin-5. S druge strane, GL2011 utiče na smanjenu ekspresiju proteina aminoacidat aminotrasferaze (takođe povećanih zračenjem), ali i na njegovu povećanu ekspresiju u poredjenju sa neozračenim životinjama (Ganesan et al. 2014).

1.8. ANIZOMICIN

Antibiotik anizomicin (flagecidin), molekulske formule $C_{14}H_{19}O_4N$, izolovan je iz bakterijske vrste *Streptomyces griseus*. Zbog njegovog višestrukog dejstva veliki broj studija se bavi njegovom potencijalnom primenom, a novija istraživanja ukazuju i na moguću radioprotektivnu ulogu (Jovanovic et al. 2016).



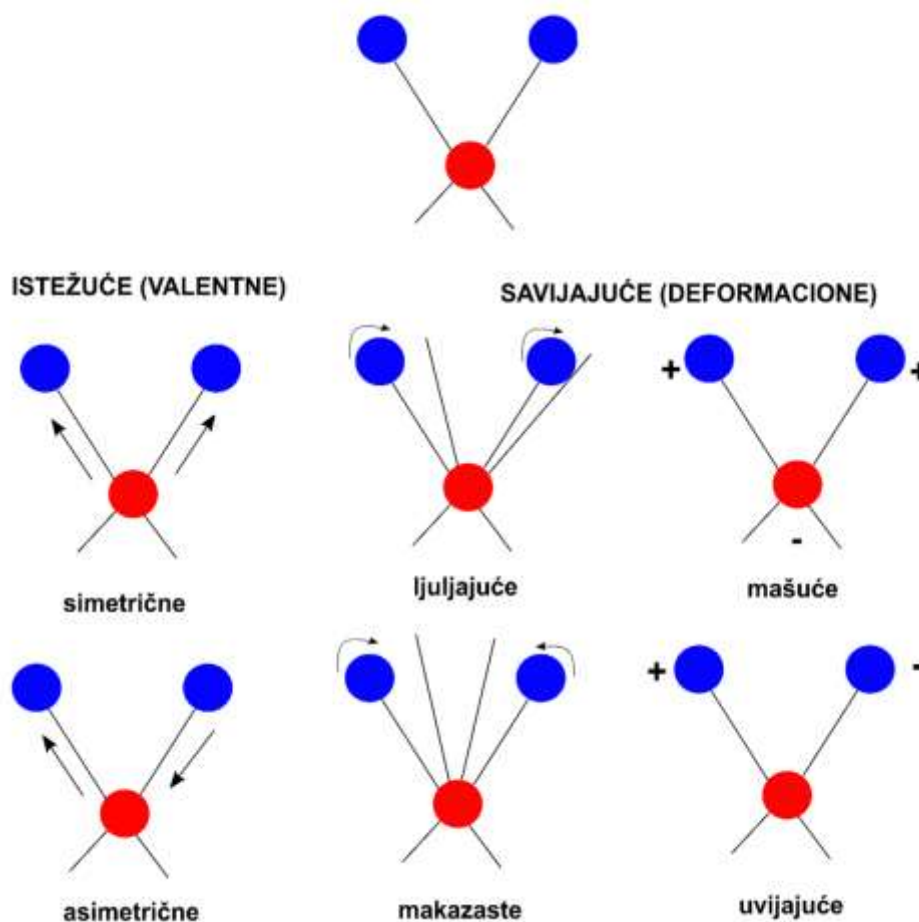
Slika 10. Struktura anizomicina

Jedan od mehanizama njegovog delovanja u organizmu je inhibicija sinteze proteina vezivanjem za 60 S ribozomalnu podjedinicu eukariotskih ćelija, čime blokira formiranje peptidnih veza (Grollman 1967; Barbacid and Vazquez 1974). Anizomicin deluje i kao aktivator kinaza stresa, c-JUN N-terminalne kinaze (JNK), p38 MAPK kinaze, kao i p70/85 S6 kinaze, pa na taj način kroz intracelularni signalni put aktivira tzv. *immediate-early* (IE) gene (c-fos, fosB, c-jun, JunB i JunD) i indukuje apoptozu u ćelijama sisara (Hazzalin et al. 1998; Rudy 2006). Pokazano je da p38 mitogen aktivirane proteinske kinaze imaju neuroprotektivnu ulogu u mozgu (Zheng and Zuo 2004), ali i da anizomicin ima značajnu ulogu u zaštiti kortikalnih neurona u kulturi izloženoj produženoj hipoksiji (Hong et al. 2007). Anizomicin deluju i u zaštiti drugih ćelija izloženih stresu (Kharlamov et al. 2002; Cohen et al. 2006). Manja koncentracija anizomicina (20 μ M) indukuje apoptozu makrofaga u aterosklerotskim plakovima zeca, što ukazuje da anizomicin pri niskim koncentracijama može biti i imunosupresor (Croons et al. 2009). Takođe, anizomicin izrazito inhibira proliferaciju ćelija indukujući apoptozu malignih ćelija, što govori i o njegovom potencijalu za lečenje kancera (You et al. 2013).

1.9. MOLEKULSKA SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopske tehnike su moćne analitičke tehnike za proučavanje bioloških sistema, a njihova primena u biologiji i medicini nam daje informacije o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu uzorka, kao i strukturnim svojstvima hemijskih konstituenata uzorka. Za primenu spektroskopije u biologiji, najvažnija su elektromagnetna zračenja iz oblasti ultraljubičastog, vidljivog i infracrvenog dela spektra. Spektroskopske metode se zasnivaju na pojavama emisije, apsorpcije, fluorescencije ili rasejanja elektromagnetnog zračenja (Skoog et al. 2006).

Svaki molekul ima određene karakteristične vrednosti energija ili energetske nivoe, koje zavise od njegove strukture i sastava, a ukupna energija molekula odgovara zbiru elektronske, rotacione i vibracione energije molekula. Razlikujemo osnovno i pobudjeno elektronsko stanje molekula sa nizom vibracionih i rotacionih prelaza, nastalih usled apsorbovanja ili rasejanja svetlosti sa uzorka (Campbell and Dwek 1984). Ta razlika u odnosu na početni energetske nivo daje karakterističan spektar molekula i uzorka koji se ispituje. Postoji više vrsta molekulskih vibracija od kojih su najjednostavnije istežuće koje odgovaraju promeni rastojanja između međusobno povezanih atoma u molekulu (Slika 11). Deformacione vibracije su povezane sa promenama različitih uglova između hemijskih veza u molekulu (ljuljajuće, makazaste, mašuće i uvijajuće).



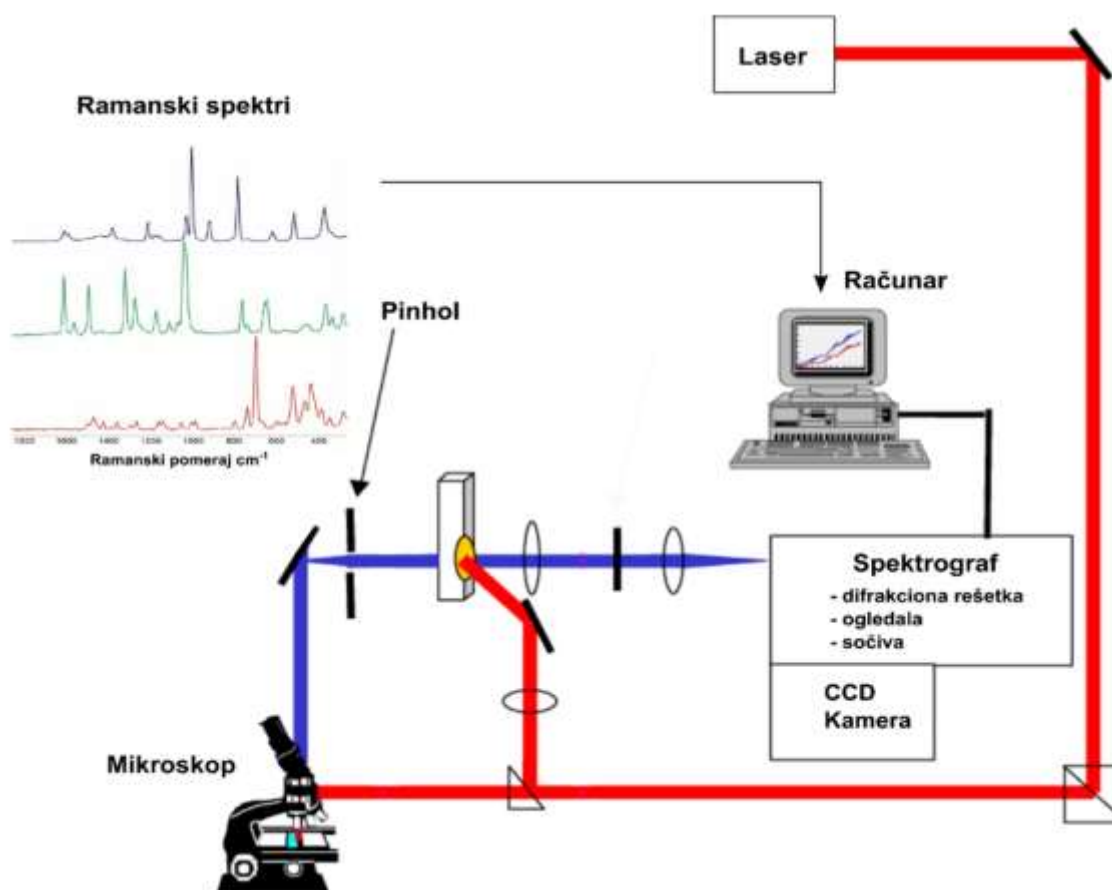
Slika 11. Tipovi molekulskih vibracija.

1.9.1. RAMANSKA I MIKRORAMANSKA SPEKTROKOPIJA

Ramanska spektroskopija se zasniva na fenomenu rasejanja, a ramanski spektar nastaje usled razlike između frekvencija upadnog i rasejanog zračenja sa uzorka (Hammes 2005).

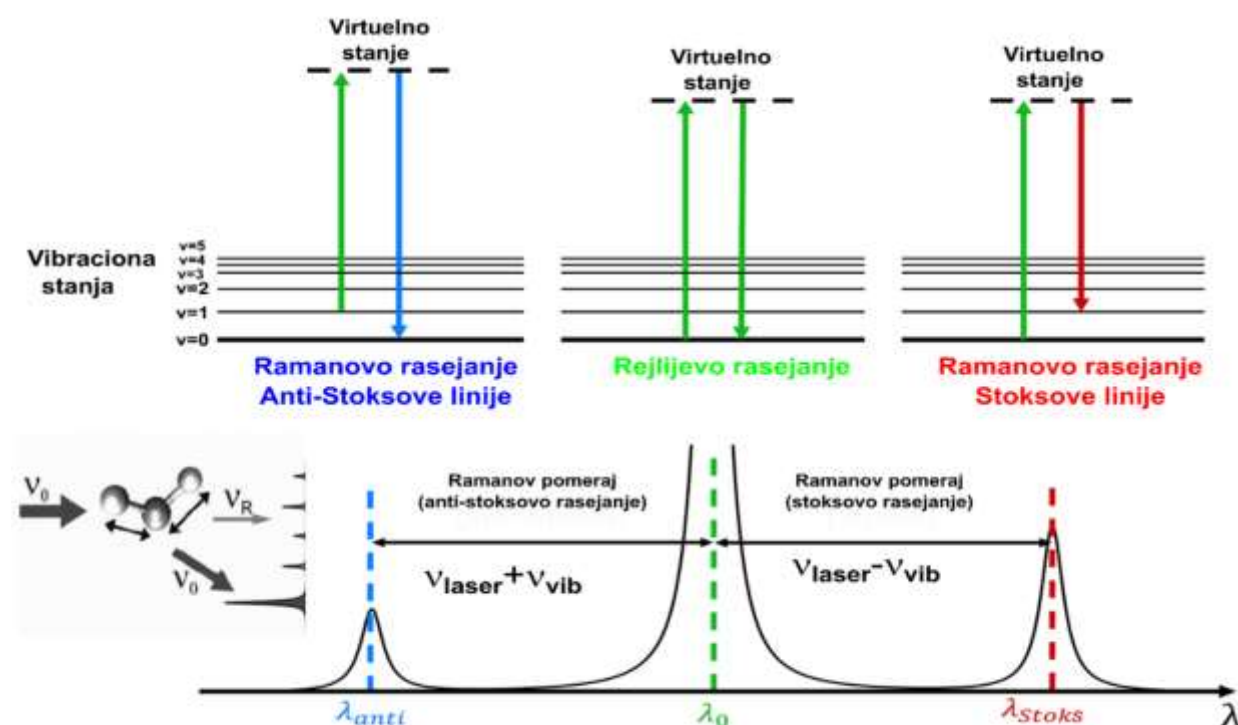
Rastojanja između vibracionih nivoa su specifična za svaki molekul, pa to određuje koliko će frekvencija rasejanja biti manja odnosno veća u odnosu na upadnu svetlost, što dovodi do toga da je Ramanski spektar (kao i spektar infracrvene spektroskopije) specifičan za svaki molekul. U Ramanskoj spektroskopiji elektromagnetno zračenje indukuje promenu polarizibilnosti molekula, što predstavlja karakterističnu distribuciju elektrona kao odgovor na vibracije jezgara i formiranje kratkotrajnog "virtuelnog stanja". *Simetrične istežuće vibracije* uzrokuju najveću promenu polarizibilnosti, pa samim tim daju i najintenzivnije Ramansko rasejanje (Smith and Dent 2005).

Ramanska spektroskopija je dobila ime prema svom pronalazaču Č. Venkati Ramanu, koji je zajedno sa svojim studentom K. Srinivasa Krishnan objavio prvi rad o ovoj tehnici (Krishnan and Shankar 1981). Ova tehnika se može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. Kvalitativna analiza uzorka se može izvršiti merenjem učestalosti rasejanog zračenja, dok se kvantitativna analiza može izvršiti merenjem intenziteta rasejanog zračenja.



Slika 12. Šematski prikaz Ramanskog mikrospektrometra i osnovnih sastavnih delova.

Ramanska spektroskopija se zasniva na korišćenju monohromatskog izvora svetla (lasera) koji osvetljava ispitivani uzorak, analizatoru rasejane svetlosti – spektrometru ili spektrografu, uređaju za pretvaranje fotona u električne signale - detektoru, i upravljačke jedinice za prikupljanje podataka – računaru (Slika 12). U slučaju Ramanskog mikrospektrometra, mikroskop i Raman spektrometar su integrisani u jedan instrument koji može da vrši spektroskopiju i digitalno snimanje mikroskopskih uzoraka. Rasejana svetlost sa uzorka se skuplja pod uglom od 90° , nakon čega prolazi kroz sistem ogledala u mikroskopu, i dolazi do Notch filtera, gde se elastično rasejani fotoni apsorbiraju, dok neelastično rasejani fotoni odlaze u spektrograf, koji služi kao disperzivni element jer sadrži difrakcionu rešetku koja razdvaja rasejane fotone različitih frekvencija (Friedrich and Hildebrandt 2008). Nakon toga razdvojena svetlost se fokusira na CCD detektor, gde se intenzitet svake frekvencije meri pojedinačnim pikselima. Ti podaci se zatim očitavaju na računaru, a rezultat je spektar koji prikazuje intenzitet neelastično rasejane svetlosti, tj. Raman pomeraj (engl. Raman shift) u odnosu na ekscitatornu - lasersku svetlost (Slika 12). U interakciji monohromatskog zračenja i molekula uzorka, fotoni se najvećim procentom elastično rasejavaju i imaju istu frekvenciju kao i upadna svetlost. To se zove Rejljevo rasejanje i ono ne daje informacije o uzorku. Princip rada Ramanske mikrospektroskopije bazira se na Ramanovom efektu odn. na neelastičnom rasejanju, koje predstavlja samo mali deo rasejane svetlosti (1 od milion fotona) i različite je frekvencije od upadnog - monohromatskog zračenja laserskog snopa koje osvetljava uzorak (Smith and Dent 2005). Energija rasejanog fotona se razlikuje od energije upadnog fotona, a u zavisnosti od toga da li je rasejani foton pomeren ka crvenom ili plavom delu spektra, tj. da li je frekvencija rasejanog fotona manja ili veća od upadne svetlosti lasera, govorimo o Stoksovom i anti-Stoksovom rasejanju (Slika 13).



Slika 13. Dijagram Rejljevog i Ramanskog rasejanja. U slučaju prenosa energije sa upadnog fotona na molekul, molekul prelazi na veći energetska nivo i onda dolazi do Stoksovog rasejanja, dok pri prelasku energije sa molekula na rasejani foton, molekul prelazi na niži energetska nivo i dolazi do anti-Stoksovog rasejanja. Preuzeto i modifikovano iz (Ember et al. 2017).

U Stoksovom rasejanju frekvencija upadnog zračenja je veća od frekvencije rasejanog zračenja, dok je u anti-Stoksovom rasejanju frekvencija upadnog zračenja niža od frekvencije rasejanog zračenja. Stoksovo Ramanovo rasejanje uključuje prelaze sa nižeg na viši energetski vibracioni nivo, pa su Stoksove linije intenzivnije od anti-Stoksovih, i mere se standardnom Ramanskom spektroskopijom (Bumrah and Sharma 2016).

U Ramanskoj mikrospektroskopiji kao svetlosni izvor koristi se širok spektar laserskih linija, koje potiču od argonskog (488 i 514.5 nm) i kriptonkog jonskog lasera (530.9 i 647.1), diodnog lasera (532 nm), helijum-neonskog lasera (632.8 nm), blisko infracrvenog diodnog lasera (785 i 830 nm) i neodim-itrijum orto-vanadatnog lasera (1064 nm). Laseri koji daju kratke talasne dužine mogu proizvesti značajnu fluorescenciju što može biti prepreka u dobijanju spektara bioloških uzoraka, pa je za njihovu akviziciju poželjno koristiti lasere dugih talasnih dužina, odn. diodne lasere (Bumrah and Sharma 2016). Umesto frekvencije u Hz (hercima) često se upotrebljava recipročna vrednost talasne dužine $1/\lambda$, tzv. talasni broj $\tilde{\nu}$ (m^{-1} ili cm^{-1}). Ramanovi spektri pokrivaju spektralnu oblast od 400 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} (Hammes 2005).

1.9.2. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEOVOM TRANSFORMACIJOM

Infracrvena spektroskopija nam daje informacije o hemijskim vezama i funkcionalnim grupama prisutnim u molekulima ispitivanog uzorka. Količina infracrvene energije koju jedinjenje apsorbuje proporcionalna je njegovoj koncentraciji, pa je ova tehnika pogodna i za kvantitativnu analizu.

Kada se uzorak ozrači snopom svetlosti, on apsorbuje energiju na frekvencijama karakterističnim za frekvenciju vibracija hemijskih veza prisutnih u molekulu, a apsorbovana energija rezultira infracrvenim spektrom (Hammes 2005). S obzirom da različiti molekuli sa svojim različitim strukturama proizvode različite spektre, spektri se mogu koristiti za identifikaciju i razlikovanje medju molekulima jer su jedinstveni poput "otiska prsta".

Spektralni opseg u srednje infracrvenoj spektroskopiji koji se koristi za vibracionu spektroskopiju pokriva opseg od 4000 do 200 cm^{-1} .

Da bi došlo do apsorpcije svetlosti, vibracije molekula moraju prouzrokovati promenu električnog dipolnog momenta, koji predstavlja meru ravnoteže naelektrisanja odn. kvantitativnu meru polarnosti molekula (Friedrich and Hildebrandt 2008). Dipolni moment se može prikazati sledećom jednačinom:

$$\mu = q \cdot l \quad (13)$$

gde je μ - dipolni momenat [Cm – jedinica Kulon – metar], q – količina naelektrisanja [$q \approx 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$], l – rastojanje izmedju centara parcijalno pozitivnog i negativnog naelektrisanja ("dužina dipola" u metrima, m). Što je intenzitet dipolnog momenta u molekulu veći to su i veze u molekulu polarnije, odn. veće je naelektrisanje na atomima. *Asimetrične istežuće vibracije* molekula uzrokuju promenu dipolnog momenta i intenzivnu apsorpciju svetlosti, pa se detektuju sa infracrvenom spektroskopijom (Smith and Dent 2005).

Kod infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom osnovni deo instrumenta čini Mišelsonov interferometar (Slika 14) koji se sastoji od dva ravna ogledala (mirujućeg i pokretnog) i razdelnika snopa koji prenosi 50% ulaznog zračenja na jedno od ogledala, a takodje odbija 50%

na drugo ogledalo (Freifelder and Hildebrandt 2008). Kao izvor svetlosti najčešće se koristi helijum-neonski laser (632.8 nm).



Slika 14. Mišelsonov interferometar. Preuzeto i modifikovano iz (Friedrich and Hildebrandt 2008).

Zraci odbijeni od dva ogledala se rekombinuju preko razdelnika snopa, pri čemu se kombinovani snop usmerava na izlaz. Usled interferencije zračenja nastaje interferogram, koji predstavlja poseban oblik signala sa informacijama o čitavom infracrvenom području. Nakon prolaska takvog signala kroz uzorak, detektor meri količinu apsorbovanog zračenja. Da bi se dobili spektralni podaci, interferogram mora da se razloži na svoje frekvencijske komponente. To razlaganje odgovara matematičkoj operaciji “Furijeovoj transformaciji”, što predstavlja jedan od načina za analizu signala (Stuart 2004). Interferogram je analogni signal na detektoru koji se mora digitalizovati da bi se mogla izvršiti Furijerova transformacija u konvencionalni spektar.

Postoje termički i fotonski detektori u FTIR spektroskopiji. Piroelektrični detektori, kao što je deuterirani detektor triglicin sulfata, rade na sobnoj temperaturi sa donekle ograničenom brzinom skeniranja. Princip rada se zasniva na piroelektričnom efektu, koji izaziva promene u gustini površinskog naelektrisanja kada se temperatura promeni prilikom apsorpcije zračenja. S druge strane, fotonski detektori, kao što je najčešće korišćeni detektor žive kadmijuma telurid (engl. mercury cadmium telluride – MCT), su poluprovodnički detektori koji rade na temperaturi tečnog azota, i odlikuju se visokom osetljivošću i velikom brzinom skeniranja (Friedrich and Hildebrandt 2008, Stuart 2004).

Kod FTIR mikrospektroskopije, svetlosni mikroskop je integrisan sa infracrvenom spektroskopijom, pa je moguće lokalizovati tačno određenu površinu ispitivanog uzorka. Njenom upotrebom moguće je napraviti hemijske mape uzorka, snimajući taču po tačku željeni deo uzorka. Računari ugrađeni u spektroskopski sklop omogućili su precizno pozicioniranje uzorka i brzu obradu podataka (Levin and Bhargava 2005).

Merenjem apsorpcije infracrvene svetlosti mogu se detektovati i dodeliti karakteristične energije i intenziteti opsega apsorpcije ćelijskih makromolekula (Movasaghi et al. 2008). Za ispitivanje bioloških uzoraka, najinformativniji je deo spektra "otiska prsta" ($600-1800\text{ cm}^{-1}$) sa proteinima, estrima ($1480-1800\text{ cm}^{-1}$) i nukleinskim kiselinama ($980-1350\text{ cm}^{-1}$), kao i deo sa vezama od lipida ($2800-3100\text{ cm}^{-1}$).

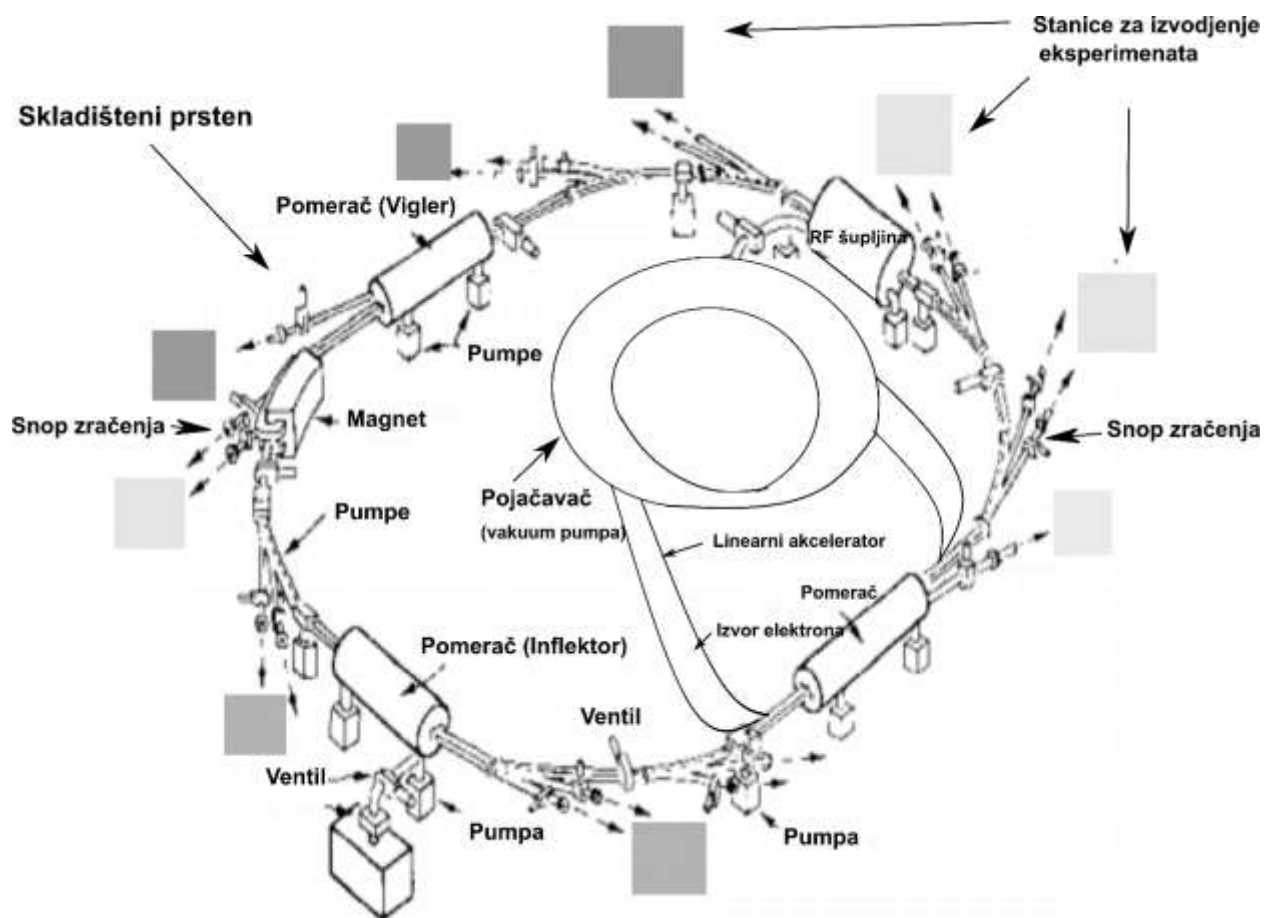
1.9.3. SINHROTRONSKA FTIR MIKROSPEKTROSKOPIJA

U osnovi sinhrotronskog postrojenja je akcelerator čestica koji ubrzava naelektrisane čestice (obično elektrone) u kružnoj putanji, gde su magnetno polje (za okretanje čestica kako bi kružile) i električno polje (za ubrzanje čestica) sinhronizovani sa zrakom putujućih čestica, tako da se čestice kreću brzinom svetlosti i emituju elektromagnetno zračenje.

Sinhrotronsko zračenje je svetlost koju stvara sinhrotron i prostire se na delu elektromagnetnog spektra koji obuhvata radio talase, infracrvenu svetlost, vidljivu svetlost, ultraljubičastu svetlost, X zrake i gama zrake. Odlikuje ga velika osvetljenost (intenzitet tj. gustina fluksa), impulsna priroda (trajanje impulsa manje od jedne nanosekunde ili milijarditi deo sekunde), polarizacija i širokopolasni spektar.

Furijeova infracrvena mikrospektroskopija sa izvorom zasnovanim na sinhrotronskom zračenju (SR) je izuzeto moćna tehnika. Intenzitet FTIR zraka proizvedenog na ovaj način je i do 1000 puta veći od intenziteta dobijenog pomoću uobičajenog srednje infracrvenog izvora, što omogućava visok odnos signal/šum, kraće vreme snimanja, kao i bolju prostornu rezoluciju u poredjenju sa konvencionalnom FTIR mikrospektroskopijom (Miller and Dumas 2006). Znatno veći intenzitet sinhrotronskog zračenja nije posledica toga što sinhrotron proizvodi više snage, već toga što je efektivna veličina izvora mala i svetlost se emituje u uskom opsegu uglova. Sinhrotronski zrak je fokusiran na veoma malu površinu uzorka prečnika oko $10\text{ }\mu\text{m}$, što je manje od veličine tipične ćelije sisara, pa daje informacije o količini nekog jedinjenja, sastavu, strukturi i distribuciji hemijskih sastojaka i funkcionalnih grupa ispitivanog uzorka. Takođe je moguće pratiti i biohemijske procese u pojedinačnim živim ćelijama (Holman et al. 2003). Mala veličina izvora propušta više od 80% sinhrotronskog infracrvenog svetla, u poredjenju sa vrlo malo propuštene svetlosti kroz otvor iste veličine običnih infracrvenih izvora. Povećanje veličine otvora kroz koji prolazi sinhrotronsko zračenje (npr. sa 10 na $70\text{ }\mu\text{m}$) ne utiče na povećanje kvaliteta dobijenih rezultata (Miller and Dumas 2006).

Sinhrotronski izvor svetlosti se sastoji od izvora elektrona, lineranog akceleratora koji služi za inicijalno ubrzanje elektrona i kružnog skladištenog prstena - akceleratora sa pomoćnim prstenom za skladištenje elektrona u izuzetno visokom vakuumu. Kada se visokoenergetski snop elektrona generiše, on se usmerava u kružni akcelerator sa pomoćnim komponentama, magnetima i pomeračima, gde se usled jakog magnetnog polja elektroni pretvaraju u fotone i u vidu snopa zračenja odlaze u stanice za izvođenje eksperimenata (Slika 15).



Slika 15. Šematski prikaz sinhrotronskog izvora svetlosti. Preuzeto i modifikovano iz (Winick and Bienenstock 1978).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom na značaj primene jonizujućeg zračenja u dijagnostici i radioterapiji, kao i zbog potrebe zaštite ljudi kod slučajnih događaja izlaganja zračenju iz prirodnih ili veštačkih izvora (u industriji, vojsci, nauci..), pronalazak potpuno efikasnog i netoksičnog radioprotektora bi doprineo smanjenju smtnosti i štetnih efekata zračenja. Iako je testiran veliki broj prirodnih i sintetičkih radioprotektora, u kliničkoj upotrebi je samo amifostin. Međutim, amifostin ima neželjena dejstva i efikasan je samo ako se primeni neposredno pre zračenja, pa je njegova upotreba ograničena i neprikladna za slučajne događaje izlaganja zračenju. S druge strane, njegov uticaj na centralni nervni sistem je diskutabilan. Takođe, mali broj studija se bavi ispitivanjem uticaja radioprotektora na centralni nervni sistem, pa su na osnovu toga definisani sledeći ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije:

Naučni ciljevi disertacije su:

- Uporediti tiolne radioprotektore čiji su predstavnici GL2011 i amifostin sa ne-tiolnim agensom anizomicinom.
- Ispitati molekularne promene na moždanom tkivu mužjaka albino Wistar pacova izlaganim gama-zračenjem iz ^{60}Co sa ili bez primene tiolnog jedinjenja GL2011 ili anizomicina, upotrebom inovativnog pristupa Ramanske mikrospektroskopije.
- Ispitati stepen aktivacije i proliferacije mikroglije i astrocita, kao i morfološke promene ovih ćelija u moždanom tkivu pacova usled ozračivanja i primene potencijalnih radioprotektora.
- Ispitati promene pro-inflamatornih (IL-6 i TNF- α) i anti-inflamatornih citokina (IL-10) u perifernoj cirkulaciji ozračenih pacova i pacova sa apliciranim tiolnim jedinjenjem GL2011 ili anizomicinom u različitim vremenskim periodima pre i nakon zračenja.
- Kao komplementarnu tehniku Ramanskoj spektroskopiji, upotrebiti Sinhrotron FTIR mikrospektroskopiju na moždanim tkivnim presecima ozračenih i životinja sa radioprotekcijom radi dobijanja dodatnih podataka o molekularnim mehanizmima delovanja radioprotektora.

- Proceniti efikasnost radioprotekcije ispitivanih supstanci, kao i efikasnost njihove primene u različitim vremenskim periodima pre i nakon ozračivanja pacova (komparacija dva radioprotektora).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

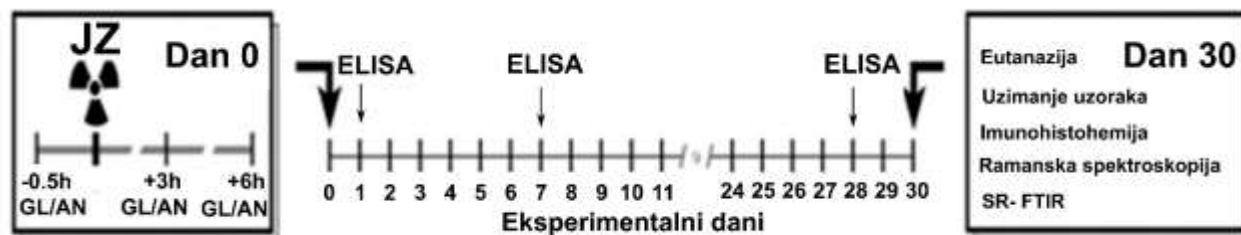
Svi eksperimenti su radjeni na mužjacima Albino Wistar pacova, starosti dva meseca i težine približno 200 g. Da bi se izbegla moguća varijabilnost zbog estrusnog ciklusa i da bi se broj životinja sveo na minimum (u skladu sa 3Rs principom), eksperimenti nisu radjeni na ženkama pacova. Životinje su čuvane u standardnim laboratorijskim uslovima (sobna temperatura $21\pm 1^\circ\text{C}$, vlažnost vazduha 30%, u ciklusu dan/noć 12/12 h), sa pristupom hrani i vodi *ad libitum*. Protokoli za eksperimente sa životinjama su bili u skladu sa nacionalnom i Evropskom direktivom (Directive 2010/63/EU) o zaštiti životinja u naučnim ispitivanjima. Etička dozvola za ovaj eksperiment (broj dozvole: 04/2012, 27.05.2012) odobrena je od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, a potvrđena od Etičke komisije Biološkog fakulteta (rešenje br: EK-BF-2016/08).

3.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN – OSNOVNA POSTAVKA

U eksperimentu je bilo 10 eksperimentalnih grupa životinja. Kontrolnu grupu (CTRL) su činile životinje bez tretmana zračenjem i radioprotektorom. Ozračene životinje (Irr) su primile samo jednu dozu gama zračenja bez primene radioprotektora, dok su kontrolne radioprotektorske grupe činile životinje koje su primile samo jednu dozu radioprotektora GL2011 (GL), odnosno antibiotika anizomicina (AN) bez zračenja. Da bi se procenio radioprotektivni potencijal GL2011 i anizomicina u različim vremenima pre i posle zračenja formirano je šest dodatnih grupa:

- GL2011 apliciran 0.5 h pre zračenja (GLIr-30)
- GL2011 apliciran 3 h posle zračenja (GLIr180)
- GL2011 apliciran 6 h posle zračenja (GLIr360)
- Anizomicin apliciran 0.5 h pre zračenja (ANIr-30)
- Anizomicin apliciran 3 h posle zračenja (ANIr180)
- Anizomicin apliciran 6 h posle zračenja (ANIr360).

Dizajn eksperimenta za proučavanje radioprotektivnog potencijala GL2011 i anizomicina je prikazan na slici 16.



Slika 16. Hronologija eksperimenata za ispitivanje radioprotektivnog potencijala GL2011 i anizomicina. Ozračivanje životinja i tretman radioprotektorima radjen je istog dana (Dan 0). Tačno vreme jednokratne intraperitonealne primene GL2011 i subkutane primene anizomicina zavisilo je od eksperimentalne grupe (0.5 h pre zračenja, ili 3 h ili 6 h posle zračenja). Uzorci krvi za ELISA test prikupljeni su prvog, sedmog i 28. dana nakon tretmana. Eutanazija dekapitacijom i sakupljanje uzoraka za Ramansku spektroskopiju, imunohistohemiju i Sinhrotron FTIR mikrospektroskopiju radjena je 30. dana.

3.3. TRETMAN ŽIVOTINJA GAMA ZRAČENJEM I RADIOPROTEKTORIMA

Za ozračivanje je upotrebljeno gama-zračenje kobalta-60 (^{60}Co). Neanestezirane i imobilisane životinje postavljene su u pojedinačne žičane kaveze u krugu oko izvora zračenja (6 pacova po sesiji). Udaljenost od izvora zračenja bila je 25 cm (Logie et al. 1960). Da bi se obezbedilo uniformno ozračivanje celog tela, na pola tretmana zračenjem kavezi sa pacovima su okrenuti za 180° . Životinje su ozračene sa 6.7 Gy (0.41 Gy/min), što na osnovu literaturnih podataka odgovara dozi $\text{LD}_{50/30}$ (Basile et al. 2012; Doan et al. 2013). U skladu sa dizajnom prethodnog eksperimenta, u kome je utvrđena doza leka GL2011 (100 mg/kg t. m. u fiziološkom rastvoru), radioprotektor je apliciran *intraperitonealno* (Ganesan et al. 2014), ali samo jednom pre ili posle zračenja. Za razliku od GL2011, anizomicin (proizvodjača Sigma-Aldrich) je apliciran *subkutano* u jednoj dozi od 150 mg/kg t.m. (pH 7.4), što je standardna doza u farmakološkim studijama sa ovim lekom (Wanisich and Wotjak 2008, Jovanovic et al. 2016). Životinje koje nisu preživele 30. dana, nisu obuhvaćene daljim analizama.

3.4. PREŽIVLJAVANJE

Preživljavanje životinja praćeno je tokom eksperimenta (30 dana) na životinjama pripremljenim za imunohistohemiju i enzimsko-imunološki test (ELISA). Svaka od eksperimentalnih grupa sastojala se od 4 životinje (ukupno $n=40$ životinja), osim ozračene grupe gde je broj dupliran ($n=8$), kako bi se zbog predviđene veće smrtnosti imao dovoljan broj životinja za dalju analizu. Verovatnoće preživljavanja u svim eksperimentalnim grupama predstavljene su u vidu Kaplan-Meier krivih.

3.5. PRIPREMA TKIVA I TKIVNIH PRESEKA ZA RAMANSKU MIKROSPEKTROSKOPIJU – SNIMANJE, OBRADA I ANALIZA RAMANSKIH SPEKTARA

Izolovani deo mozga za Ramansku mikrospektroskopiju je bez dodatne fiksacije zamrznut na -80°C do dalje upotrebe. Dan pre snimanja Ramanskih spektara, moždano tkivo se seče na koronalne preseke debljine $20\ \mu\text{m}$ upotrebom uređaja - kriotoma (Leica Microsystems, Germany). Preseci su preneseni na specijalne pločice, napravljene od kalcijum fluorida (CaF_2), dimenzija $76\times 26\times 1\text{mm}$ (Crystran, Poole, UK). Ove pločice su najčešća podloga za Ramansku i FTIR mikrospektroskopiju, jer omogućavaju visok optički prenos vidljive i bliskocrvene svetlosti, a za razliku od kvarcnih i običnih pločica daju znatno niži pozadinski signal. Sve vreme korišćenja pločice moraju biti bez otisaka prstiju i nalepnica, da bi se izbegla pojava fluorescencije. Ramanska mikrospektroskopija je radjena na tkivnim presecima produžene moždine koordinate udaljenosti 10.35 od Bregme, kao i na koronalnim presecima mozga koja su obuhvatala somatosenzorni korteks i corpus callosum, koordinate udaljenosti 2.45 od Bregme. Koordinate su preuzete iz atlasa moždanih mapa i strukture mozga pacova (Swanson, 1998). Moždani preseci se na ovim pločicama čuvaju na -20°C do trenutka snimanja. Ramanski spektri tkivnih moždanih preseka napravljeni su pomoću DXR^{TM3} Raman Mikrospektrometra (Thermo Fisher Scientific, United States). Radi provere X-ose instrumenta odn. položaja dobijenih Ramanskih traka, neposredno pre snimanja, radjena je kalibracija instrumenta na polistirenu (standardnoj supstanci za kalibraciju sa tačno poznatim položajima traka u spektrima). Kako bi se eliminisala pojava fluorescencije, ekscitacija uzorka je radjena standardnim laserom za snimanje bioloških uzoraka ekscitacione linije $785\ \text{nm}$. Snaga lasera je bila $14\ \text{mW}$. Emisiona svetlost je sakupljena putem Olimpus mikroskopa, sa objektivom uveličanja $50\times$ i pinholom veličine $25\ \mu\text{m}$. Rejljevo rasejanje je apsorbovano putem Notch filtera, a propušteno Ramansko rasejanje je fokusirano na difrakcionu rešetku sa 1800 proreza po $1\ \text{mm}$ dužine rešetke. Rezolucija dobijenih spektara je bila $2\ \text{cm}^{-1}$. Kako bi se povećao intenzitet Ramanskog rasejanja, vreme snimanja jednog spektra bilo je 20 minuta; $60\ \text{s} \times 20$ skenova. Korekcija na postojeću autofluorescenciju je radjena automatski na samom uređaju. Spektralni opseg je bio od 600 do $1800\ \text{cm}^{-1}$. Za kolekciju spektara upotrebljen je Thermo Scientific OMNIC softver. Uklanjanje artefakta od kosmičkih zraka je uradjeno u spektroskopskom softveru Spectragryph, verzija 1.2. Normalizacija spektara prema minimalnoj (0) i maksimalnoj vrednosti intenziteta signala (1) radjena je pomoću alata "Raman procesing" (Reisner et al. 2011) u Matlab 2010a softverskom paketu. Dalja obrada rezultata podrazumevala je pravljenje usrednjenih spektara grupa i diferencijalnih spektara izmedju svakog tretmana u odnosu na kontrolnu (CTRL) i ozračenu (Irr) grupu, kao i asignaciju odn. detektovanje pojedinačnih traka i utvrđivanje razlike izmedju grupa i njihove statističke značajnosti. Za testiranje radioprotektivnog potencijala GL2011 na produženoj moždini putem Ramanske mikrospektroskopije upotrebljeno je 6 neperfundovanih životinja po eksperimentalnoj grupi (ukupno $n=36$), dok je za ispitivanje radioprotektivnog potencijala anizomicina na produženoj moždini, somatosenzornom korteksu i corpus callosumu upotrebljeno 3 životinje po eksperimentalnoj grupi (ukupno $n=18$). Na tkivnom preseku snimljeno je po 5 spektara za GL2011 i po 4 za anizomicin. Za statističku analizu korišćene su normalizovane vrednosti intenziteta signala.

3.6. PRIPREMA TKIVA I TKIVNIH PRESEKA ZA IMUNOHISTOHEMIJU – IMUNOFLUORESCENTNO OBELEŽAVANJE MOŽDANIH PRESEKA I NJIHOVA ANALIZA

Životinje koje su preživele 30 dana anestezirane su jednom dozom injekcije mešavine 10% ketamina (Richter pharma AG, Wels, Austria) i 2% ksilazina (Bioveta a.s., Ivanovice na Hane, Czech Republic), koncentracije 0.1 ml/100 g t. m. Nakon gubitka refleksa povlačenja zadnjih ekstremiteta (marker za duboku anesteziju), životinja je fiksirana u ležećem položaju na leđjima, kako bi joj se uradila transkardijalna perfuzija koja je neophodna radi fiksacije tkiva i sprečavanja razvoja bakterija, ali i eliminacije krvi iz tkiva radi sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela. Za perfuziju je korišćen 0.01 M soni rastvor fosfatnog pufera (PBS), koji sadrži 8.61 g NaCl i 0.2 M PB, dvadeset puta razblaženog u ddH₂O, pH 7.4 (6.24 g/l NaH₂PO₄ i 22.72 g/l Na₂HPO), i 4% rastvor paraformaldehida (PFA) u dva puta razblaženom 0.2 M PB, pH 7.4. Nakon pažljivog otvaranja grudnog koša, sistem za perfuziju sa iglom je prikačen na levu komoru srca, dok je desna pretkomora presečena, kako bi krv sa perfuzionim rastvorima mogla slobodno da izadje iz krvotoka. Oko 200 ml PBS je potrebno da se pročisti ceo cirkulatorni sistem pacova, nakon čega se po malo pušta 4% rastvor PFA, koga je potrebno oko 150-200 ml (u zavisnosti od veličine životinje) kako bi tkiva bila u potpunosti fiksirana. Nakon transkardijalne perfuzije i dekapitacije životinja, deo moždanog tkiva namenjen za imunohistohemijska ispitivanja fiksiran je naredna 24 h u 4% PFA. Nakon toga uradjena je dehidratacija tkiva u 30% rastvoru saharoze (0.1 M PB, pH 7,4), kako bi se sprečio nastanak kristala leda tokom zamrzavanja tkiva. Tkivo je bilo u rastvoru saharoze do trenutka pripreme moždanih preseka, a prema potrebi saharoza je zamenjena svežim rastvorom. Dan pre sečenja mozgovu su zamrznuti na -80° C, nakon čega su upotrebom kriotoma (Leica, Microsystems, Germany) podešenog na temperaturu od -25° C, isečeni na koronalne preseke debljine 30 µm. Preseci su nalepljeni na Superfrost mikroskopske pločice (Manzel-Glasser, Germany) i čuvani na temperaturi od +4°C do trenutka početka imunohistohemijskog bojenja.

Kako bi se pratila ekspresija određenih proteina-antigena, odn. markera aktivacije mikroglije i astrocita u ovoj studiji, radjena je metoda indirektno imunohistohemije, koja se zasniva na korišćenju primarnog i sekundarnog antitela. Primarno antitelo je specifično za određeni antigen, a sekundarno antitelo sa fluorescentnom bojom se primenjuje kako bi se ostvarila vizualizacija tog kompleksa pod mikroskopom, nakon ekscitacije fluorescentne boje laserom odgovarajuće talasne dužine i primene odgovarajućih vrsta filtera.

Imunofluorescentno obeležavanje je radjeno na fiksiranim i dehidratisanim presecima produžene moždine, somatosenzornog korteksa i corpus callosa istih koordinata kao i za Ramansku mikrospektroskopiju, ali suprotne hemisfere mozga. Na samom početku metode imunofluorescentnog obeležavanja, pločice sa presecima su temperirane 20 minuta na sobnoj temperaturi. Prvi korak je podrazumevao rehidrataciju preseka, odn. tri ispiranja od 10 minuta u rastvoru fosfatnog pufera (0.01 M PBS, pH 7.4). Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, preseci su inkubirani 1 h (na sobnoj temperaturi) u rastvoru za blokiranje, koji je sadržao 10 % govedjeg seruma albumina (engl. bovine serum albumin – BSA) i 0.2 % Triton X-100 u 0.01 M PBS-u. Nakon toga preseci su inkubirani preko noći u vlažnoj atmosferi, na +4°C sa primarnim antitelima razblaženim u 0.01 M PBS-u, i sa 2 % govedjeg seruma. Od primarnih antitela korišćen je marker aktivacije mikroglijalnih ćelija, kozje poliklonalno antitelo na jonizovani adaptorski molekul 1 koji vezuje kalcijum (engl. Ionized calcium binding adaptor molecule 1 – Iba-1, 1:250, Abcam, United States) i marker aktivacije astrocita, zečje poliklonalno antitelo na glijalni kiseli fibrilarni protein (engl. Glial fibrillary acidic protein – GFAP; 1:500, Dako, United States). Kako bi se uklonila primarna antitela koja se nisu vezala tokom perioda inkubacije, drugog dana je radjeno ispiranje preseka, 5 puta po 10 minuta u 0.01 M PBS-u. Nakon toga, preseci su inkubirani sa odgovarajućim

sekundarnim antitelima, 2 h na sobnoj temperaturi. Od sekundarnih antitela korišćeno je magareće antitelo na protein kože, Alexa-Fluor 488 (1:500, Invitrogen, United States) i magareće antitelo na proteine zeca, Alexa Fluor 555 (1:500, Invitrogen, United States). Da bi se uklonili ostaci nevezanog sekundarnog antitela, posle 2 h inkubacije radjeno je ispiranje 5 puta po 5 minuta u PBS-u. Na samom kraju, uradjena je 10 - minutna inkubacija preseka sa rastvorenim jedarnom bojom Topro u PBS-u (1:4000, Invitrogen, United States), kao i ispiranje 3 puta po 10 minuta u PBS-u. Na osušene preseke stavljena je po kap medijuma za fiksaciju pokrovnog stakla (Mowiol, Sigma-Aldrich, Germany), koje je pažljivo naneto kako se ne bi pravili vazdušni mehurovi. Za svako bojenje radjena je i negativna kontrola, bez nanošenja primarnih antitela, što je omogućilo da se utvrdi specifičnost vezanih sekundarnih antitela.

Obeleženi preseki mozga snimani su na konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu LSM 510 (Carl Zeiss, GmbH, Germany) uz upotrebu objektiva Plan-Apochromat 40X sa uljanom imerzijom. Za ekscitaciju fluorescentnih boja upotrebljen je argonski laser ekscitacione linije 488 nm, kao i helijum-neonski laser, ekscitacionih linija 543 i 633 nm. Emisiona svetlost je fokusirana na dihroičko ogledalo 488/543/633, a zatim je svetlost zelenog dela spektra razdvojena uskopojasnim BP filterom 505-530, dok je svetlost crvenog dela spektra razdvojena širokopropusnim filterom LP 585 i 650. Analiza slika sa konfokalnog mikroskopa je radjena pomoću ImageJ softvera. Slike za analizu su bile 8-bitne i u lsm formatu. Kako bi se utvrdio stepen aktivacije mikroglije i astrocita, uradjena je kvantitativna analiza distribucije njihovih markera u moždanom tkivu za svaku eksperimentalnu grupu, što je podrazumevalo utvrđivanje procenta pozitivnih piksela za Iba-1 i GFAP. Kanali su razdvojeni tako da se analiza kanala sa mikroglijom radila odvojeno od kanala sa astrocitima. Za oba markera utvrdjena je srednja vrednost intenziteta piksela pozadinskog signala, tako da je na početku analize za svaki kanal podešen prag koji razdvaja pozitivne od negativnih piksela, što je omogućilo da program tačno prepozna strukture koje su bile za kvantifikaciju. U sledećem koraku uradjena je selekcija željene površine, kao i selekcija cele slike, a vrednost površine pod pikselima je očitana u tabeli sa rezultatima. Na osnovu tih vrednosti dobijena je procenatna vrednost površine pod glijalnim markerima. Metodom imunohistohemije testirane su tri životinje po eksperimentalnoj grupi (ukupno n=30). Nakon optimizacije antitela, finalno su obojena dva preseka po životinji, i analiza je uradjena na 4 snimka po preseku.

3.7. PRIPREMA UZORAKA ZA PRAĆENJE CITOKINA, METODOLOGIJA – ENZIMSKO IMUNOLOŠKI TEST (ELISA)

Imuno-enzimski test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) je metoda koja se koristi za detekciju određenih proteina (antigena) u uzorku putem specifičnih monoklonskih antitela. Merenje produkcije citokina je jedan od najznačajnijih aspekata aktivnosti imunskih ćelija, pa je u ovoj studiji praćena produkcija dva pro-inflamatorna citokina, IL-6 i TNF- α , kao i jednog anti-inflamatornog citokina IL-10. Za ELISA test je korišćena plazma, dobijena od periferne krvi uzorkovane iz eksperimentalnih životinja 24 h nakon tretmana zračenjem i/ili radioprotektorima, kao i 7. i 28. dana od tretmana. Plazma je izdvojena iz krvi koja je uzeta iz repne vene eksperimentalne životinje. Krv svake životinje je stavljena u čistu ependorficu, koja je prethodno obložena sa EDTA (10 μ l 0.5 M EDTA na 1 mL krvi). Od svake životinje uzeto je 2 mL krvi, nakon čega je sadržaj promešan nežnim pokretima, a potom inkubiran 30 minuta na ledu. Centrifugiranje uzoraka je trajalo 20 minuta, na +4 ° C, sa brzinom od 4500 obrtaja u minuti (4500 rpm). Gornji sloj (plazma) je prenet u nove ependorfice i zamrznut na -80 ° C do daljeg korišćenja. Od tri planirana vremena za sakupljanje krvi (ELISA dani 1., 7. i 28. dana), uspešno su kompletirana prva dva termina (1. i 7. dan) sa svim

eksperimentalnim grupama životinja. Medjutim poslednjeg 28. dana bilo je n=3 za grupe Irr, GLIr-30, GLIr180, GLIr360 i ANIr-30, dok je n=4 bilo za CTRL, GL, AN, ANIr180 i ANIr360.

Za ovu metodu korišćeni su komercijalni ELISA kitovi sa potrebnim reagensima i spektrofotometar kojim se po završetku reakcije očitava intenzitet boje, čime se dobija informacija o uzorku. Prvi korak je bio nanošenje vezujućeg antitela (engl. capture antibody) na ploču od specijalne plastike sa 96 bunarčića. Antitela su rastvorena u sterilnom PBS (0.01 M) i inkubirana preko noći na + 4°C. Nakon inkubacije, uradjena su 3 ispiranja bunarčića po 10 minuta sa 0.05 % tvinom (engl. tween) u PBS-u. Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, u sledećem koraku u svaki bunarčić dodato je po 300 µl govedjeg serumskog albumina (5% BSA u PBS-u), a inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon tri ispiranja sa 0.05 % tvinom u PBS, naneto je 100 µl uzorka (krvne plazme) na svaki bunarčić, a inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, uradjena su 3 ispiranja i dodato je po 100 µl detektujućeg antitela (engl. detection antibody), a inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. Ponovljeno je ispiranje, i na svaki bunarčić je dodato po 100 µL enzima avidin-HRP (engl. Horse Radish Peroxidase; Invitrogen, United States, 1:500), a vreme inkubacije je bilo 20 minuta na sobnoj temperaturi. Da bi pozadinski signal bio što manji, uradjeno je 5 ispiranja. U poslednjem koraku dodat je supstrat za enzim – tetrametil benzidin TMB (eng. 3,3', 5,5' – Tetramethylbenzidine; HRP substrate, Invitrogen, United States) i praćeno je razvijanje boje. Kada je boja razvijena u dovoljnoj meri (u slučaju ovog enzima to je plava boja), reakcija je prekinuta dodavanjem 50 µl sumporne kiseline (2NH₂SO₄) u svaki bunarčić. Na kraju je na spektrofotometru boja očitana na 450 nm, uz korekciju na 620 nm.

Vezujuća i detektujuća antitela su bila specifična za ispitivani citokin, odn. vezivala su se samo za njega. Koncentracije citokina izračunate su referentnom standardnom krivom napravljenom korišćenjem poznatih koncentracija rekombinantnih citokina.

U eksperimentu su upotrebljena sledeća antitela (R&D Systems):

- Rekombinantni za IL-6 pacova (100 µg/ml, rastvoren u sterilnom PBS-u sa 0.1% BSA).
- Monoklonsko mišje antitelo specifično za IL-6 pacova (0.5 mg/ml, rastvoren u sterilnom PBS).
- Biotinizirano poliklonsko kozje antitelo specifično za IL-6 pacova (0.2 mg/ml, sterilan PBS).
- Rekombinantni TNF-α pacova (10 µg/ml, u sterilnom PBS sa 0.1% govedjim serumskim albumonom - BSA).
- Monoklonsko mišje antitelo specifično za TNF-α pacova (0.5 mg/ml, sterilan PBS).
- Poliklonsko kozje antitelo specifično za TNF-α pacova (0.2 mg/ml, sterilan PBS).
- Rekombinantno IL-10 pacova (50 µg/ml, sterilan PBS sa 0,1 % BSA).

- Monoklonsko mišje antitelo specifično za IL-10 pacova (0.5 mg/ml, sterilan PBS).
- Poliklonsko kozje antitelo specifično za IL-10 pacova (0.2 mg/ml, sterilan PBS).

3.8. PRIPREMA TKIVNIH PRESEKA ZA SINHROTRONSKU FTIR MIKROSPEKTROSKOPIJU, SNIMANJE UZORAKA I ANALIZA SPEKTARA

Kako bi se procenila efikasnost i zaštitni efekat radioprotektora GL2011 i anizomicina na produženoj moždini, uradjena je i SR-FTIR mikrospektroskopija, kao komplementarna tehnika Ramanskoj mikrospektroskopiji. Deo produžene moždine transkardijalno perfundovanih životinja zamrznut na -80°C , namenjen je za ispitivanje ovom tehnikom. Radjene su dve životinje po grupi (ukupno $n=20$). Tkivni preseki debljine $10\ \mu\text{m}$ uzeti su pomoću kriotoma (Leica, Microsystems, Germany) podešenog na temperaturu od -25°C . Preseci su nalepljeni na pločice od kalcijum fluorida (CaF_2), dimenzija $76 \times 26 \times 1\text{mm}$ (Crystran, Poole, UK). Da bi se preseci osušili, pločice sa presecima su čuvane u liofilizatoru u vakuumu, sa izuzetno niskom temperaturom (-196°C), nakon čega su čuvane i transportovane u kutiji sa silika gelom, kako bi se omogućila apsorpcija vlage. Snimanje uzoraka je uradjeno na Hyperion 3000 FTIR mikroskopu (Bruker, Germany), upotrebom MIRAS linijskog snopa na ALBA sinhrotronu (ALBA synchrotron light source, Cerdanyola del Valles, Spain). Izvor svetlosti je sinhrotronsko infracrveno zračenje koje generišu elektroni što putuju unutar zakrivljene putanje kroz konstantno magnetno polje. Mikroskop je opremljen detektorom žive-kadmijum-telurida (MCT), koji je hladjen tečnim azotom korišćenjem rashladjujućeg uređaja (Leica Microsystems Automatic Plunge Freezer, Wetzlar, Germany). Spektri su napravljeni na površini tkivnog preseka veličine $10 \times 10\ \mu\text{m}$, sa 128 skenova po pikselu, a spektralna rezolucija je bila $4\ \text{cm}^{-1}$. Analiziran je jedan tkivni presek po životinji, a snimljeno je 120 spektara po preseku.

Ekstrakcija fajlova i njihova konverzija u text format radjena je u softverskom paketu OPUS 7.5 (Bruker). Normalizacija spektara i korekcija na baznu liniju je radjena u UNSCRAMBLER X softverskom paketu (CAMO Software, Oslo Norway), dok je za PC analizu (engl. Principal component analysis) korišćen Quasars Orange-Spectroscopy Release 0.8.0. softverski program.

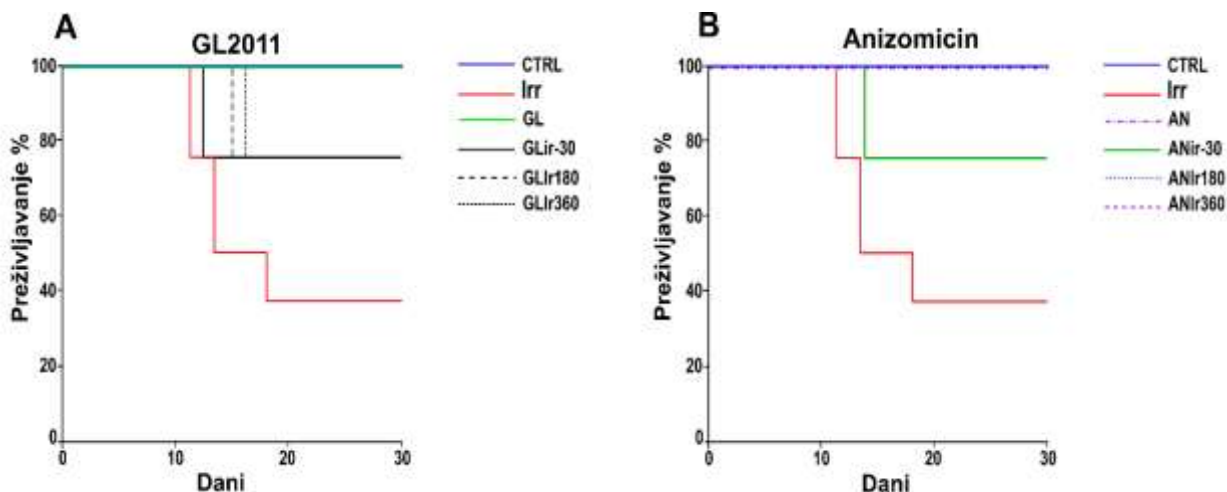
3.9. STATISTIKA

Statistička analiza je uradjena korišćenjem softverskog paketa SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Značajne razlike za krive preživljavanja procenjene su korišćenjem log-rank testa (Mantel-Cox test). Ramanski spektri su analizirani pomoću dvofaktorske analize varijanse (2 Way ANOVA), sa Bonferoni *post hoc* testom na višestruka poredjenja. Ako podaci nisu imali normalnu distribuciju ili nije postignuta homogenost varijanse izmedju grupa, podaci su transformisani i zatim analizirani pomoću odgovarajućeg testa. Podaci imunohistohemije su analizirani pomoću ANOVA sa ponovljenim merenjima, sa Dunnett-ovim ili LSD *post hoc* testom poredjenja, dok je za podatke o citokinima primenjena jednofaktorska ANOVA sa Holm-Sidak *post-hoc* testom poredjenja. Podaci sa Sinhrotronske FTIR mikrospektroskopije nisu imali normalnu distribuciju, pa je radjena Kruskal-Wallis jednofaktorska analiza na rangovima sa Dunn-ovom *post-hoc* metodom poredjenja. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. PREŽIVLJAVANJE OZRAČENIH MUŽJAKA ALBINO WISTAR PACOVA I PACOVA SA APLICIRANIM RADIOPROTEKTORIMA GL2011 I ANIZOMICINOM PRE ILI POSLE ZRAČENJA

Od ukupno 44 eksperimentalne životinje praćene tokom eksperimentalnih dana nakon tretmana zračenjem i radioprotektorima (dani 1-30), 35 životinja je preživelo do 30. dana. U kontrolnoj grupi životinja (CTRL, $n=4/4$), kao i u grupama sa primenjenim radioprotektorima GL2011 ili anizomicinom bez zračenja (GL i AN, $n=4/4$ po grupi), preživljavanje je bilo 100%. Samo 37.5% životinja je preživelo primenjenu dozu od 6.7 Gy gama zračenja (Irr, $n=3/8$). U grupi sa primenjenim radioprotektorom GL2011 30 minuta pre zračenja (GLIr-30), kao i u grupi sa lekom primenjenim 3 h (GLIr180) ili 6 h (GLIr360) posle zračenja, preživljavanje je bilo 75% ($n=3/4$ po grupi). U eksperimentalnoj grupi životinja sa apliciranim anizomicinom 30 minuta pre zračenja (ANIr-30, $n=3/4$), preživljavanje je takodje bilo 75%, dok je u grupama gde je anizomicin apliciran 3 h (ANIr180, $n=4/4$) i 6 h (ANIr360, $n=4/4$) nakon zračenja, preživljavanje bilo 100%. Na slici 17. prikazan je radioprotektivni potencijal GL2011 i anizomicina primenjenih u različitim vremenskim tačkama pre ili posle ozračivanja životinja. Log-rank test je pokazao da su se krive preživljavanja značajno razlikovale izmedju ozračene (Irr) i kontrolne, intaktne (CTRL) eksperimentalne grupe životinja (Slika 17A i B, $P < 0.05$), kao i ozračene životinja i grupa sa primenjenim radioprotektorima GL2011 i anizomicinom bez zračenja (Slika 17 A i B; $P < 0.05$). Takodje, značajna razlika postoji i izmedju ozračene grupe životinja i eksperimentalnih grupa životinja sa anizomicinom primenjenim 3 h i 6 h posle zračenja (Slika 17B, $P < 0.05$).



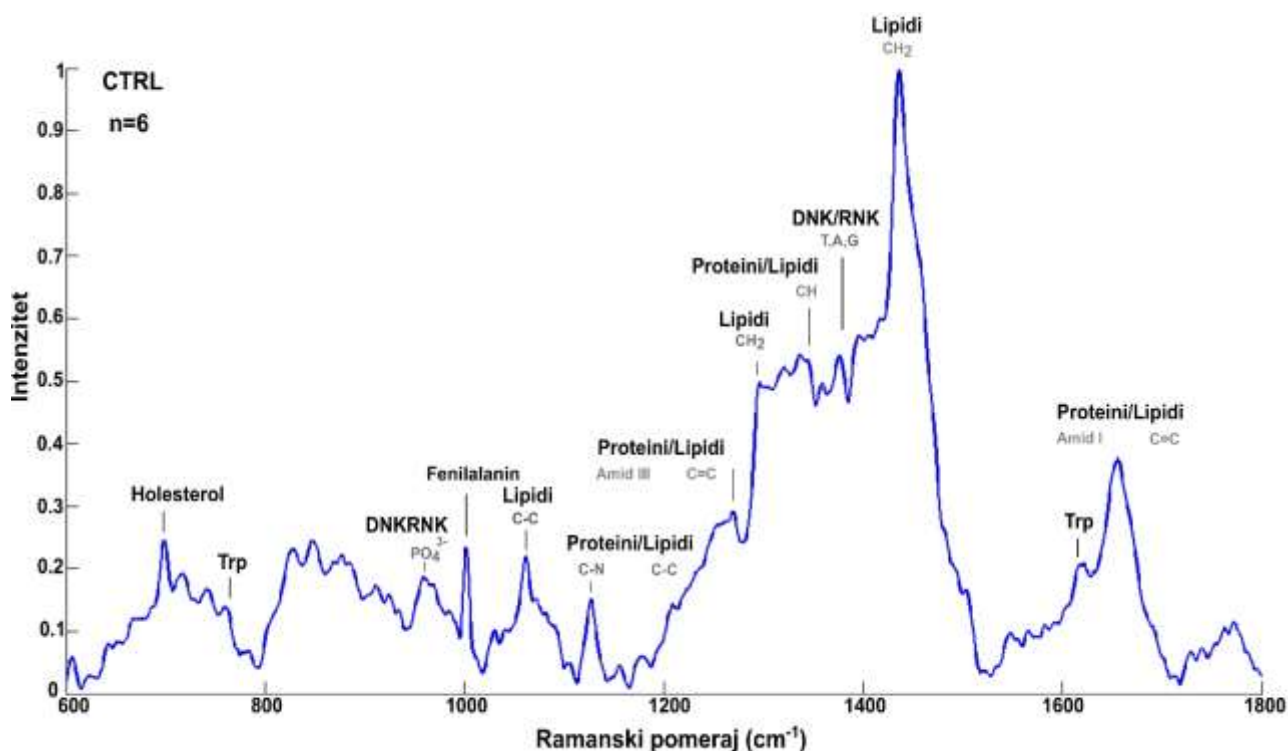
Slika 17. Procentualni prikaz preživljavanja pacova usled zračenja i radioprotekcije sa lekom GL2011 ili anizomicinom tokom 30 dana od tretmana. A) Kaplan-Meier krive preživljavanja za grupe CTRL, Irr, GL, GLIr-30, GLIr180 i GLIr360. B) Kaplan-Meier krive preživljavanja za grupe CTRL, Irr, AN, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360. Log-rank test je pokazao značajnu razliku za preživljavanje izmedju Irr i CTRL eksperimentalne grupe ($P < 0.05$), kao i izmedju Irr eksperimentalne grupe i grupa koje su primile samo GL2011 ili anizomicin ($P < 0.05$), i Irr i eksperimentalnih grupa sa anizomicinom primenjenim posle zračenja ANIr180 i ANIr360 ($P < 0.05$).

4.2. RAMANSKI SPEKTRI MOŽDANIH TKIVNIH PRESEKA OZRAČENIH WISTAR PACOVA I PACOVA SA PRIMENJENIM RADIOPROTEKTOROM GL2011 I ANIZOMICINOM

Ramanski spektar predstavlja molekularni otisak uzorka i pruža kvalitativne i kvantitativne informacije o biohemijskom sastavu tkiva. U ovoj studiji, Ramanska mikrospektroskopija je primenjena kako bi se detektovale biohemijske promene na molekularnom nivou usled zračenja i primene radioprotektora GL2011 i anizomicina, odn. da bi se procenio njihov radioprotektivni potencijal u različitim vremenskim tačkama pre i posle zračenja.

4.2.1. RADIOPROTEKCIJA SA GL2011

Na slici 18. prikazan je usrednjen i normalizovan Ramanski spektar produžene moždine kontrolne grupe, sa označenim osnovnim spektralnim trakama koje su detektovane u eksperimentima sa radioprotektorom GL2011.



Slika 18. Usrednjen Ramanski spektar produžene moždine kontrolne grupe (n=6) sa najistaknutijim spektralnim trakama i talasnim brojevima na kojima se javljaju: Holesterol (702 cm^{-1}), Trp – triptofan (759 cm^{-1} , 1619 cm^{-1}), DNK/RNK (dezoksiribonukleinska/ribonukleinska kiselina) - simetrični fosfat PO_4^{3-} (959 cm^{-1}), Fenilalanin (1003 cm^{-1}), C-C istežuća veza lipida (1064 cm^{-1}), kombinovana traka sa C-N istežućom vezom proteina i C-C vezom u lipidima (1128 cm^{-1}), kombinovana traka proteina sa amidom III i fosfolipidnom C=C grupom (1270 cm^{-1}), CH_2 deformaciona traka lipida (1304 cm^{-1}), C-H deformaciona traka lipida i proteina (1344 cm^{-1}), T, A, G – timin, adenin, guanin (1377 cm^{-1}), CH_2 deformaciona traka lipida (1437 cm^{-1}), kombinovana traka proteina sa amidom I i C=C grupom lipida (1657 cm^{-1}).

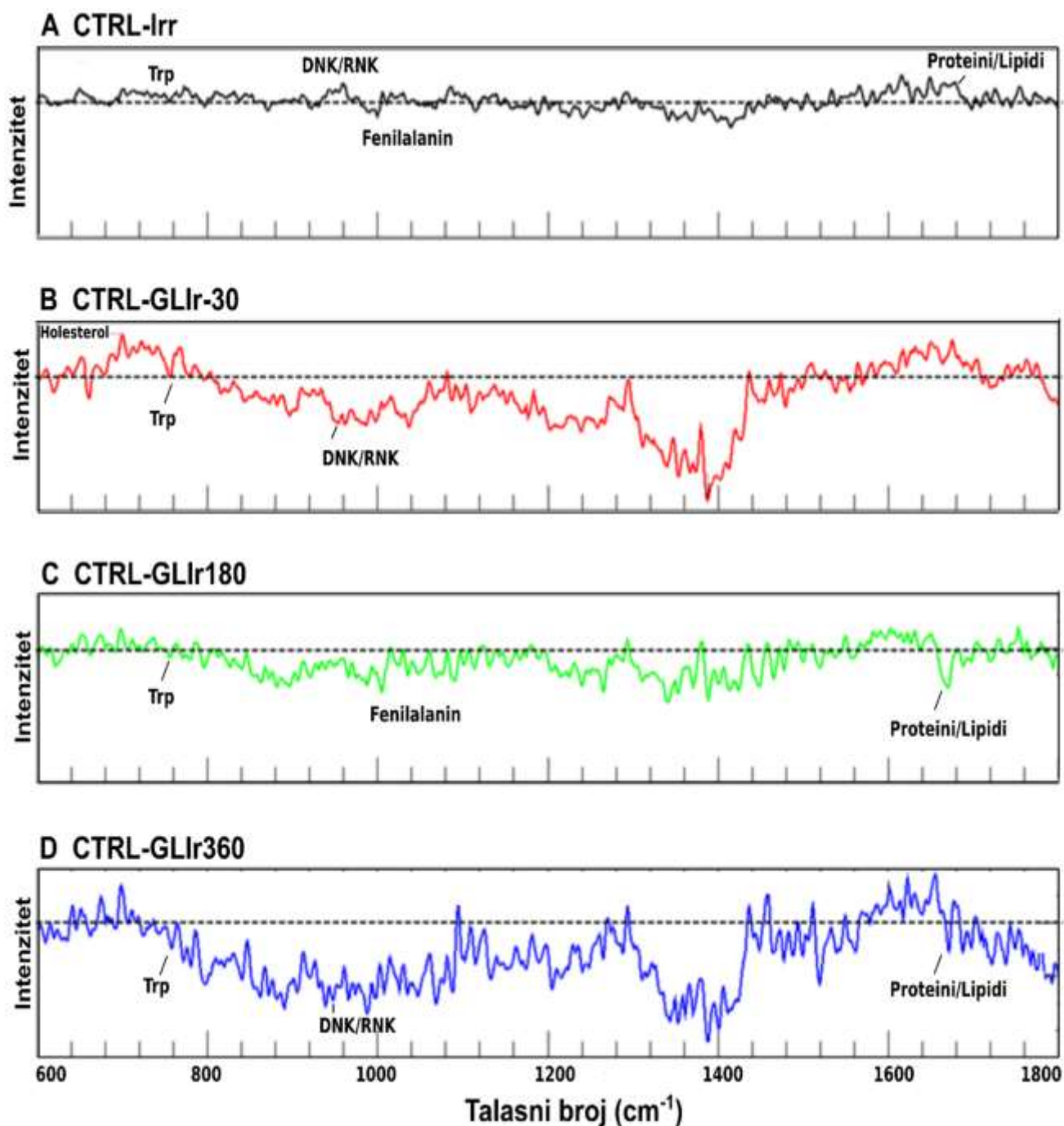
Asignacija Ramanskih spektralnih traka uradjena je prema revijalnom radu (Movasaghi et al.2008). Dominantne trake u Ramanskim spektrima kontrolnog tkiva produžene moždine potiču od lipida ($1064, 1304, 1437 \text{ cm}^{-1}$) i od kombinovanog udela lipida i proteina ($1128, 1270, 1344$ i 1657 cm^{-1}). Manji doprinos se može pripisati holesterolu (702 cm^{-1}), fenilalaninu (1003 cm^{-1}), triptofanu (759 i 1616 cm^{-1}), i nukleinskim kiselinama (959 i 1373 cm^{-1}).

Diferencijalni spektri su ukazali na blagi porast intenziteta fenilalanina (1003 cm^{-1}), kao i na smanjenje intenziteta deformacionih traka proteina i lipida ($1344, 1657 \text{ cm}^{-1}$), triptofana (759 cm^{-1}) i nukleinskih kiselina (959 cm^{-1}) kod ozračenih životinja (Slika 19A). Primena samog GL2011 nije dovela do značajnih promena u poredjenju sa CTRL grupom.

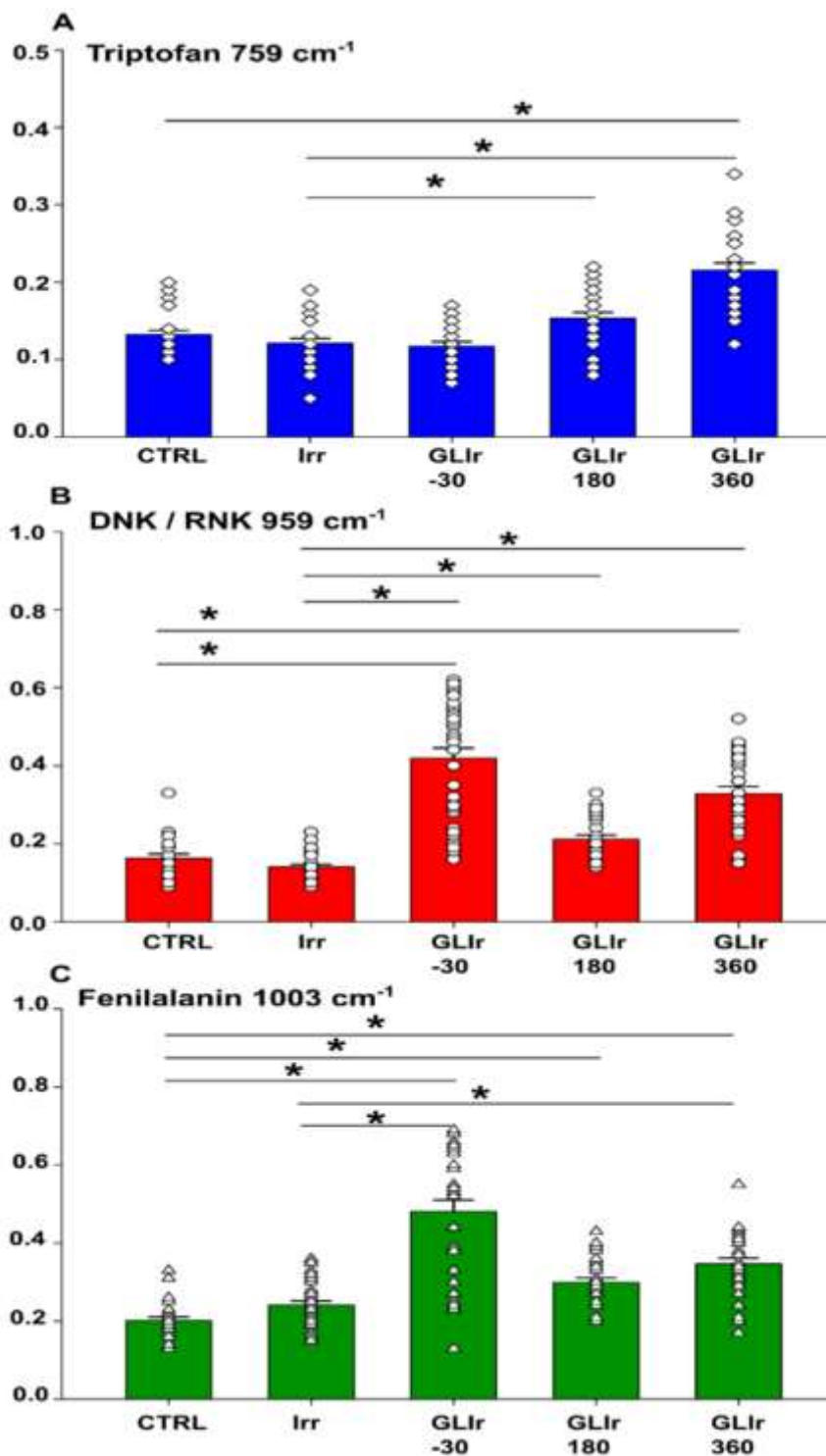
Diferencijalni spektar kontrolne grupe životinja i grupe sa apliciranim GL2011 30 minuta pre zračenja (Slika 19B), pokazao je smanjenje intenziteta spektralne trake holesterola i triptofana, dok su spektralne trake fenilalanina, lipida i nukleinskih kiselina pokazale relativno povećanje intenziteta usled dejstva zračenja i radioprotektora. Slične promene u intenzitetu spektralnih traka kao u GLIr-30, uočene su i u spektrima za GLIr180 i GLIr360, što je prikazano na slici 19C i D.

U poredjenju sa CTRL, intenzitet spektralne trake fenilalanina (1003 cm^{-1}) povećan je u svim eksperimentalnim grupama sa GL2011 primenjenim pre ili posle zračenja. Na diferencijalnim spektrima uočeno je blago smanjenje intenziteta spektralne trake amino kiseline triptofana (759 cm^{-1}) u grupi GLIr-30 (Slika 19B), dok je u grupama sa primenom leka posle zračenja, naročito u grupi gde je GL2011 apliciran 6 h nakon zračenja uočeno povećanje intenziteta ove spektralne trake (Slika 19C i D). Na isti način ponašala se i spektralna traka sa kombinovanim udelom proteina (amid I veza) i lipida (1657 cm^{-1}), što je ukazalo na moguću povezanost sa koncentracijom triptofana. Intenzitet spektralne trake nukleinskih kiselina (959 cm^{-1}) bio je smanjen u Irr grupi, dok je u svim grupama sa GL2011 uočeno njeno povećanje.

Na slici 20. prikazani su histogrami intenziteta spektralnih traka koje su pokazale efekat tretmana radioprotektorom GL2011, odn. statistički značajnu razliku pri aplikaciji leka u različitim vremenskim tačkama pre i posle zračenja u poredjenju sa CTRL i Irr. U poredjenju sa Irr, spektralna traka triptofana (759 cm^{-1}) pokazala je statistički značajno povećanje pri aplikaciji radioprotektora GL2011 na 3 h i 6 h nakon zračenja (Slika 20A). Povećan intenzitet triptofanske trake u grupi sa lekom apliciranim na 6 h uočen je i u poredjenju sa CTRL (Slika 20A). U poredjenju sa Irr, pokazana je i statistički značajna razlika za simetrični fosfat (PO_4^{3-}) nukleinskih kiselina (959 cm^{-1}) u svim grupama sa radioprotektorom GL2011 primenjenim pre ili posle zračenja (Slika 20B). Takođe, za ovu traku je uočena značajna razlika i između CTRL i grupa sa GL2011 primenjenim 30 minuta pre zračenja i 6 h posle zračenja. U poredjenju sa Irr, spektralna traka fenilalanina (1003 cm^{-1}) je takođe pokazala statistički značajno povećanje pri radioprotekciji 30 minuta pre zračenja i 6 h nakon zračenja (Slika 20C), dok je u poredjenju sa CTRL, povećanje ove trake bilo statistički značajno za sve grupe sa GL2011 radioprotekcijom (GLIr-30, GLIr180 i GLIr360; Slika 20C).



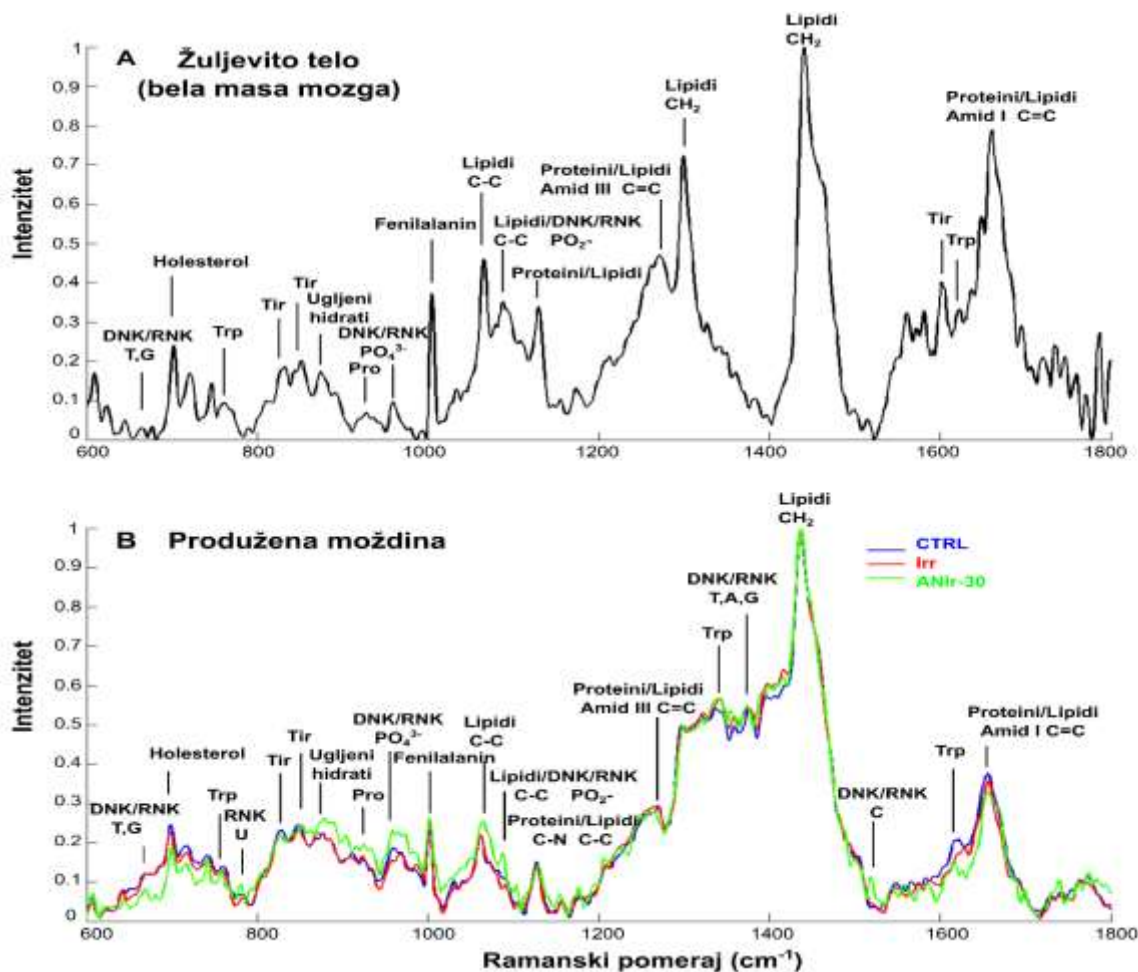
Slika 19. Diferencijalni spektar kontrolne grupe i A) ozračenog tkiva produžene moždine pacova, B) ozračenog tkiva sa primenjenim radioprotektorom GL2011 30 minuta pre zračenja, C) ozračenog tkiva sa radioprotektorom primenjenim 3 h nakon zračenja, D) ozračenog tkiva sa radioprotektorom primenjenim 6h nakon zračenja. Trp - Triptofan (759 cm^{-1}), DNK/RNK - simetrični fosfat PO_4^{3-} (959 cm^{-1}), Fenilalanin (1003 cm^{-1}), Holesterol (702 cm^{-1}), kombinovana traka proteina sa amidom I i C=C grupom lipida (1657 cm^{-1}). Isprekidana horizontalna linija označava nultu vrednost; smer traka na gore predstavlja niže vrednosti nego u kontrolnoj grupi, dok smer na dole predstavlja više vrednosti u poredjenju sa kontrolnom grupom životinja.



Slika 20. Srednja vrednost normalizovanog intenziteta spektralnih traka. A) Tryptofan 759 cm⁻¹, B) nukleinske kiseline (959 cm⁻¹) i fenilalanin (1003 cm⁻¹). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. Statistička analiza je uradjena korišćenjem neparametarskog testa (Kruskal-Wallis ANOVA na rangovima) sa Dunn-ovim *post hoc* testom poredjenja grupa; * $P < 0.05$.

4.2.2. RADIOPROTEKCIJA SA ANIZOMICINOM

Za procenu radioprotektivnog potencijala anizomicina snimani su Ramanski spektri na produženoj moždini, beloju masi (*corpus callosumu*) i somatosenzornom korteksu. Na slici 21A prikazan je usrednjen i normalizovan spektar bele mase kontrolne grupe, dok su na slici 21B prikazani normalizovani spektri produžene moždine kontrolne i ozračene grupe, kao i grupe koja je primila anizomicin 30 min pre zračenja (spektri somatosenzornog korteksa se nisu značajno razlikovali od spektara bele mase, tako da nisu prikazani).



Slika 21. Usrednjeni i normalizovani Ramanski spektri: A) Žuljevito telo (bela masa; engl. corpus callosum) – CTRL, B) produžena moždina (engl. brainstem) – CTRL, Irr i ANIr-30. Holesterol (702 cm⁻¹), Trp - Triptofan (758, 1360, 1616 cm⁻¹), Tir –Tirozin (823, 850 cm⁻¹), Ugljeni hidrati (877 cm⁻¹), Pro – Prolin (925 cm⁻¹), DNK/RNK: T, G – Timin, Guanin (667 cm⁻¹), U- Uracil (780 cm⁻¹), PO₄³⁻ (959 cm⁻¹), A – Adenin (1373 cm⁻¹), Citozin (1515 cm⁻¹); Fenilalanin (1003 cm⁻¹), skeletno C-C istežanje lipida (1066 cm⁻¹), CH₂ deformaciona traka lipida (1304, 1442 cm⁻¹), lipidi i nukleinske kiseline; C-C acilna okosnica lipida i fosfodieterskih veza u nukleinskim kiselinama (1089 cm⁻¹), lipidi i proteini; C-N istežuća veza proteina & C-C acilna okosnica lipida (1128 cm⁻¹), amid III traka proteina (C-N istežanje α -helix) & C=C grupe u nezasićenim masnim kiselinama i fosfolipidima (1270 cm⁻¹), amid I traka proteina i C=C grupa lipida (1657 cm⁻¹).

Statistički značajne razlike između CTRL i grupe kod koje je primenjen anizomicin uočene su jedino na produženoj moždini; detektovane spektralne trake su prikazane u tabeli 2.

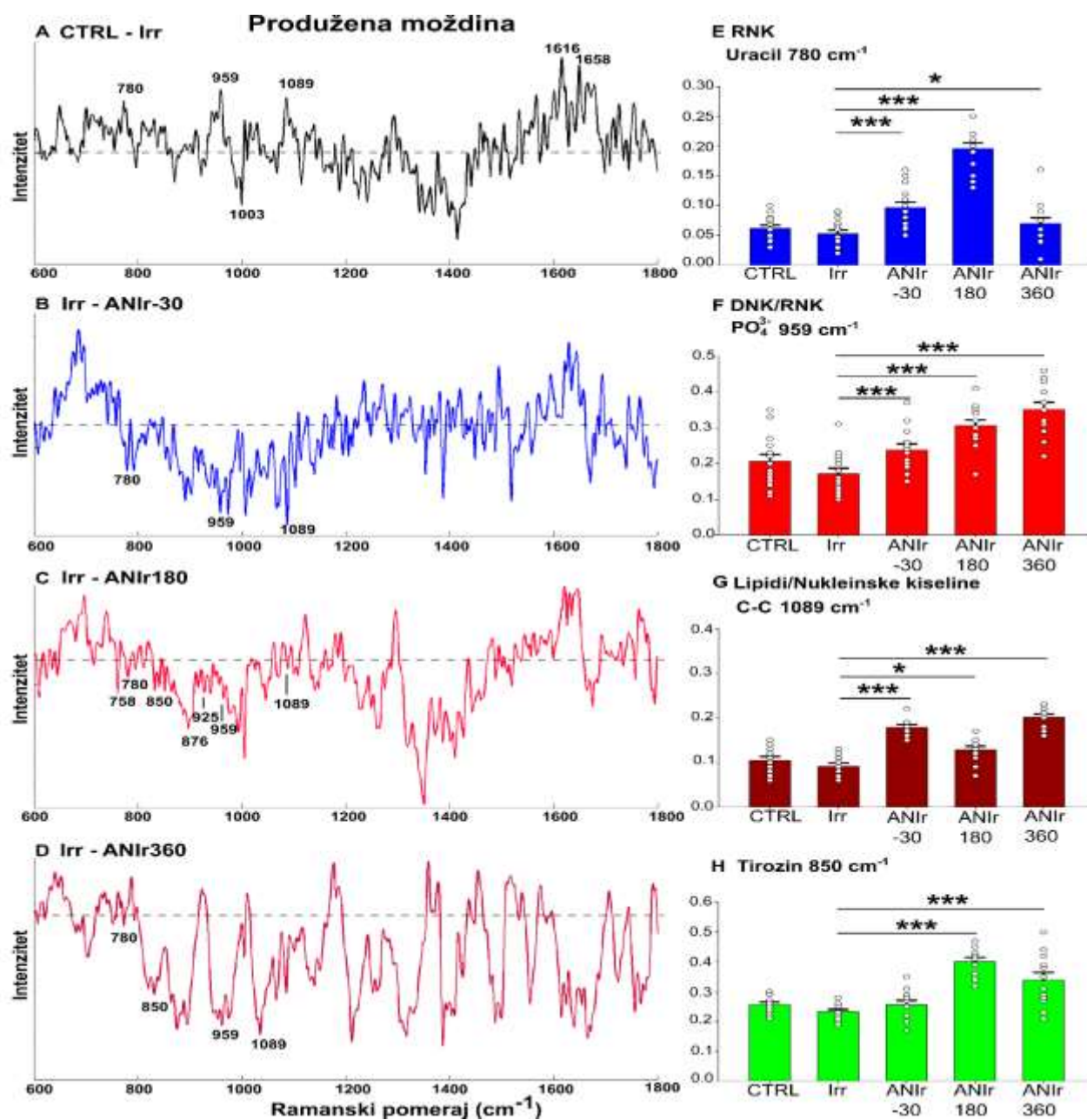
Tabela 2. Detektovane vibracione trake Ramanskih spektara produžene moždine u delu spektra od 600-1800 cm^{-1} . Asignacija spektralnih traka je uradjena prema revijalnom radu Movasaghi et al. (2008).

| Ramanski pomeraj cm^{-1} | Spektralne trake |
|-----------------------------------|--|
| 667 | Timin, Guanin |
| 702 | Holesterol/sfingomijelin |
| 758 | Triptofan |
| 786 | Uracil |
| 823 | Tirozin |
| 850 | Tirozin |
| 877 | Ugljeni hidrati |
| 925 | Prolin |
| 959 | PO_4^{3-} |
| 1003 | Fenilalanin |
| 1066 | Lipidi, C-C istežuća veza lipida |
| 1088 | C-C skeletna veza lipida i fosfodieterska veza nukleinskih kiselina |
| 1128 | C-N istežuća veza proteina i C-C acilna okosnica lipida |
| 1270 | Amid III veza proteina i C=C grupa u nezasićenim masnim kiselinama i fosfolipidima |
| 1304 | CH_2 deformaciona traka lipida |
| 1360 | Triptofan |
| 1373 | Adenin, Guanin, Timin |
| 1442 | CH_2 deformaciona traka lipida |
| 1515 | Citozin |
| 1616 | Triptofan |
| 1657 | Amid I veza proteina i C=C grupa lipida |

Praćene su promene u spektralnim trakama amino kiselina triptofana (758, 1360 i 1616 cm^{-1}), tirozina (823, 850 cm^{-1}), fenilalanina (1003 cm^{-1}) i prolina (925 cm^{-1}). Takodje, praćene su i spektralne trake nukleinskih kiselina DNA/RNA (667, 780, 959, 1373 i 1515 cm^{-1}), ali i holesterola (702 cm^{-1}), ugljenih hidrata (877 cm^{-1}), lipida (1066, 1304, 1442 cm^{-1}), kao i kombinovane trake lipida i proteina (1128, 1270, 1657 cm^{-1}), lipida i nukleinskih kiselina (1089 cm^{-1}). Uočeno je da su intenziteti spektralnih traka lipida kao i trake sa kombinovanim udelom lipida i proteina intenzivnije u beloj masi u poredjenju sa produženom moždinom (Slika 21A i B), što se može objasniti različitom strukturom bele i sive mase mozga pacova.

Diferencijalni spektar CTRL i Irr grupe (Slika 22A) pokazao je blagi porast intenziteta trake koja potiče od fenilalanina (1003 cm^{-1}) usled zračenja, kao i trend smanjenja intenziteta traka triptofana (1616 cm^{-1}), nukleinskih kiselina (780, 959 i 1089 cm^{-1}) kao i trake sa kombinovanim udelom proteina i lipida (1658 cm^{-1}).

U poredjenju sa grupom ozračenih životinja (diferencijalni spektri, Slika 22 B-D), eksperimentalne grupe životinja sa anizomicinom kao radioprotektorom pokazale su povećanje intenziteta traka od nukleinskih kiselina. Naime, intenzitet trake RNK za uracil (780 cm^{-1}) bio je značajno povećan u grupi sa anizomicinom apliciranim pre ili posle zračenja (Slika 22E). Dvofaktorska ANOVA, sa tretmanom kao jednim faktorom i životinjom ($n=3$ po grupi) kao drugim faktorom, pokazala je generalno značajnu razliku između tretmana (*srednji kvadrat* = 6.173, $F = 59.182$, i $P < 0.001$). *Post hoc* Bonferroni test poredjenja grupa dao je značajne razlike za tretman sa anizomicinom 30 minuta pre zračenja ($P < 0.001$), kao i za tretman sa anizomicinom 3 h ($P < 0.001$) i 6 h posle zračenja ($P < 0.05$), ali pokazana je takodje i značajna međusobna interakciju faktora tretmana i životinja unutar grupa (*srednji kvadrat* = 0.568, $F = 5.449$, i $P < 0.001$). S druge strane, intenzitet trake simetričnog fosfata (PO_4^{3-}) u nukleinskim kiselinama (959 cm^{-1}) bio je značajno povećan u svim grupama sa radioprotekcijom. Dvofaktorska ANOVA (tretman vs. životinja) pokazala je generalno značajan efekat tretmana (*srednji kvadrat* = 0.118, $F = 42.767$, $P < 0.001$), a *post hoc* Bonferroni test poredjenja grupa sa Irr grupom je dao značajne razlike za ANIr-30, ANIr180 i ANIr360 ($P < 0.001$, Slika 22F). Intenzitet trake C-C sa kombinovanim udelom lipida i nukleinskih kiselina (1089 cm^{-1}) bio je takodje značajno povećan u sve tri grupe sa anizomicinom kao radioprotektorom (Slika 22G). Dvofaktorska ANOVA (tretman vs. životinja) je pokazala generalno značajan efekat tretmana (*srednji kvadrat* = 0.035, $F = 37.397$, $P < 0.001$), a *post hoc* Bonferroni test poredjenja grupa sa Irr grupom je dao značajne razlike za ANIr-30 ($P < 0.001$), ANIr180 ($P < 0.05$), i za ANIr360 ($P < 0.001$). Ramanski spektri pokazali su i promene u intenzitetu traka amino kiselina triptofana, tirozina, prolina i fenilalanina. Naime, u poredjenju sa ozračenom grupom životinja, ove spektralne trake su bile intenzivnije pri aplikaciji anizomicina posle zračenja (ANIr180 i ANIr360). Statistički značajno povećanje je detektovano za intenzitet spektralne trake tirozina (850 cm^{-1}) za sve grupe sa anizomicinom kao radioprotektorom. Dvofaktorska ANOVA (tretman vs. životinja) je pokazala generalno značajan efekat tretmana (*srednji kvadrat* = 0.778, $F = 35.813$, $P < 0.001$), dok je *post hoc* Bonferroni test poredjenja grupa sa Irr grupom pokazao značajnu razliku za grupe sa anizomicinom apliciranim posle zračenja (ANIr-30 $P = 0.85$, ANIr180 $P < 0.001$, ANIr360 $P < 0.001$; Slika 22H).

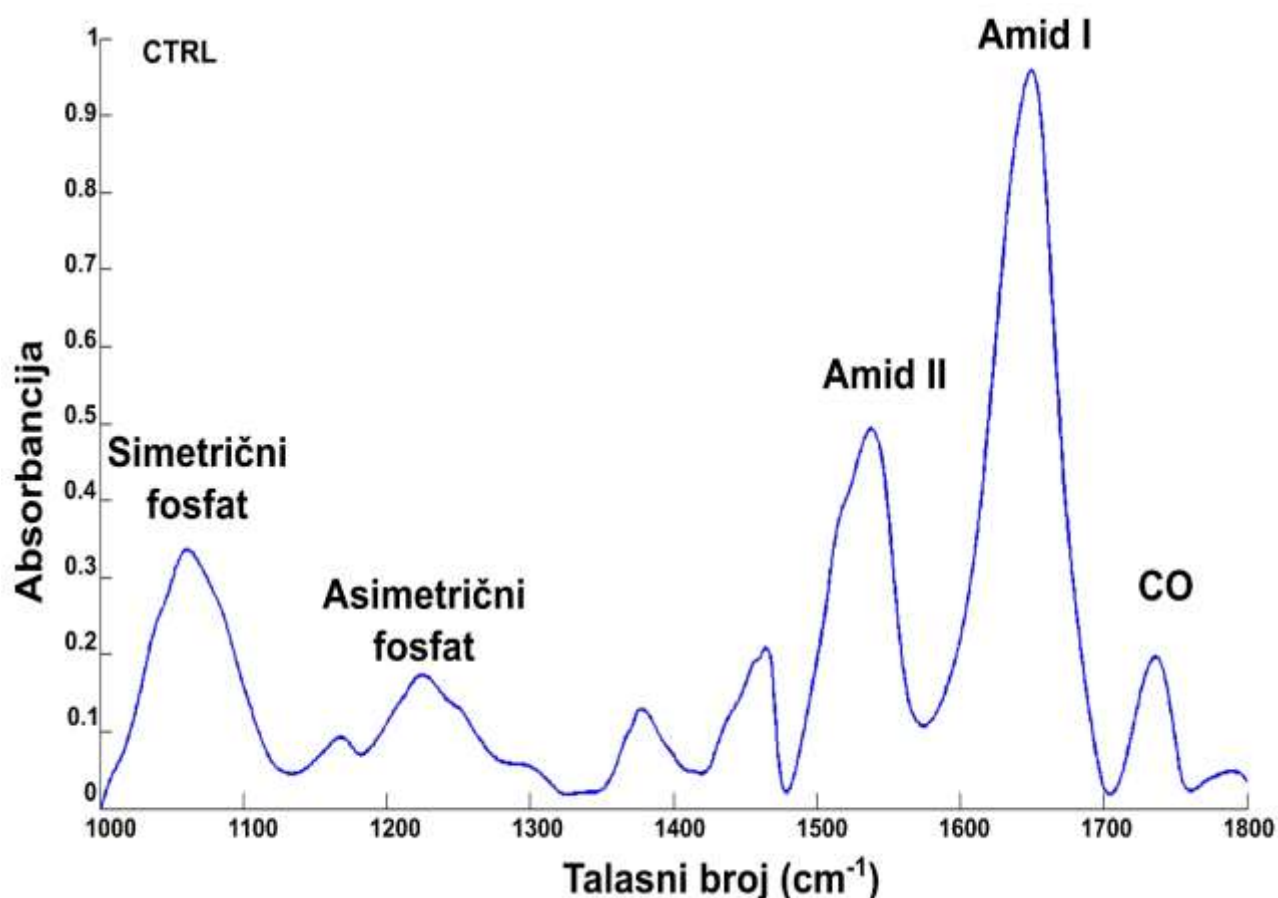


Slika 22. Diferencijalni spektri produžene moždine pacova za grupe: A) kontrolna i ozračena grupa, B) ozračenog tkiva i grupe životinja koja je primila anizomicin 30 minuta pre zračenja, C) ozračenog tkiva i grupe životinja koja je primila anizomicin 3 h posle zračenja, D) ozračenog tkiva i grupe životinja koja je primila anizomicin 6 h posle zračenja. Trp–Triptofan (758, 1616 cm⁻¹), DNK/RNK: Uracil (780 cm⁻¹) & PO₄³⁻ (959 cm⁻¹); C-C veza lipida i fosfodieterska veza nukleinskih kiselina (1089 cm⁻¹), Fenilalanin (1003 cm⁻¹), Tirozin (850 cm⁻¹), Pro – Prolin (925 cm⁻¹). Orijentacija spektralne trake na gore pokazuje da je intenzitet te trake veći u prvoj navedenoj grupi, dok orijentacija spektralne trake na dole ukazuje na veći intenzitet određene trake u drugoj grupi. E-H) grafici prikazuju srednju vrednost normalizovanog intenziteta traka ± standardnu grešku za E) RNK (780 cm⁻¹), F) DNK/RNK (959 cm⁻¹), G) C-C veza lipida i fosfodieterska veza DNK/RNK (1089 cm⁻¹), i H) Tirozin (850 cm⁻¹). Radjena je dvofaktorska ANOVA sa *post hoc* Bonferroni testom poredjenja. * *P* < 0.05, *** *P* < 0.001.

4.3. SINHROTRONSKI FTIR SPEKTRI MOŽDANIH TKIVNIH PRESEKA OZRAČENIH WISTAR PACOVA I PACOVA SA PRIMENJENIM RADIOPROTEKTORIMA GL2011 I ANIZOMICINOM

Da bi se dobila kompletnija slika o molekularnim mehanizmima delovanja radioprotektora GL2011 i anizomicina, kao komplementarna tehnika Ramanskoj mikrospektroskopiji, upotrebljena je sinhrotronska infracrvena mikrospektroskopija sa Furijeovom transformacijom. U ovom eksperimentu, merenja su radjena na uzorcima produžene moždine Wistar pacova (dve životinje po grupi), a analiza spektara je radjena multivarijantnom analizom glavnih komponenata (PC analiza).

Na slici 23. prikazan je SR-FTIR spektar kontrolne grupe životinja, sa delom spektra od 1000 do 1800 cm^{-1} . Determinacija spektralnih traka je radjena prema studijama na mozgu sa FTIR mikrospektroskopijom (Kneipp et al. 2000; Krafft et al. 2004).



Slika 23. Sinhrotronski FTIR spektar produžene moždine pacova sa osnovnim detektovanim spektralnim trakama (1000-1800 cm^{-1}).

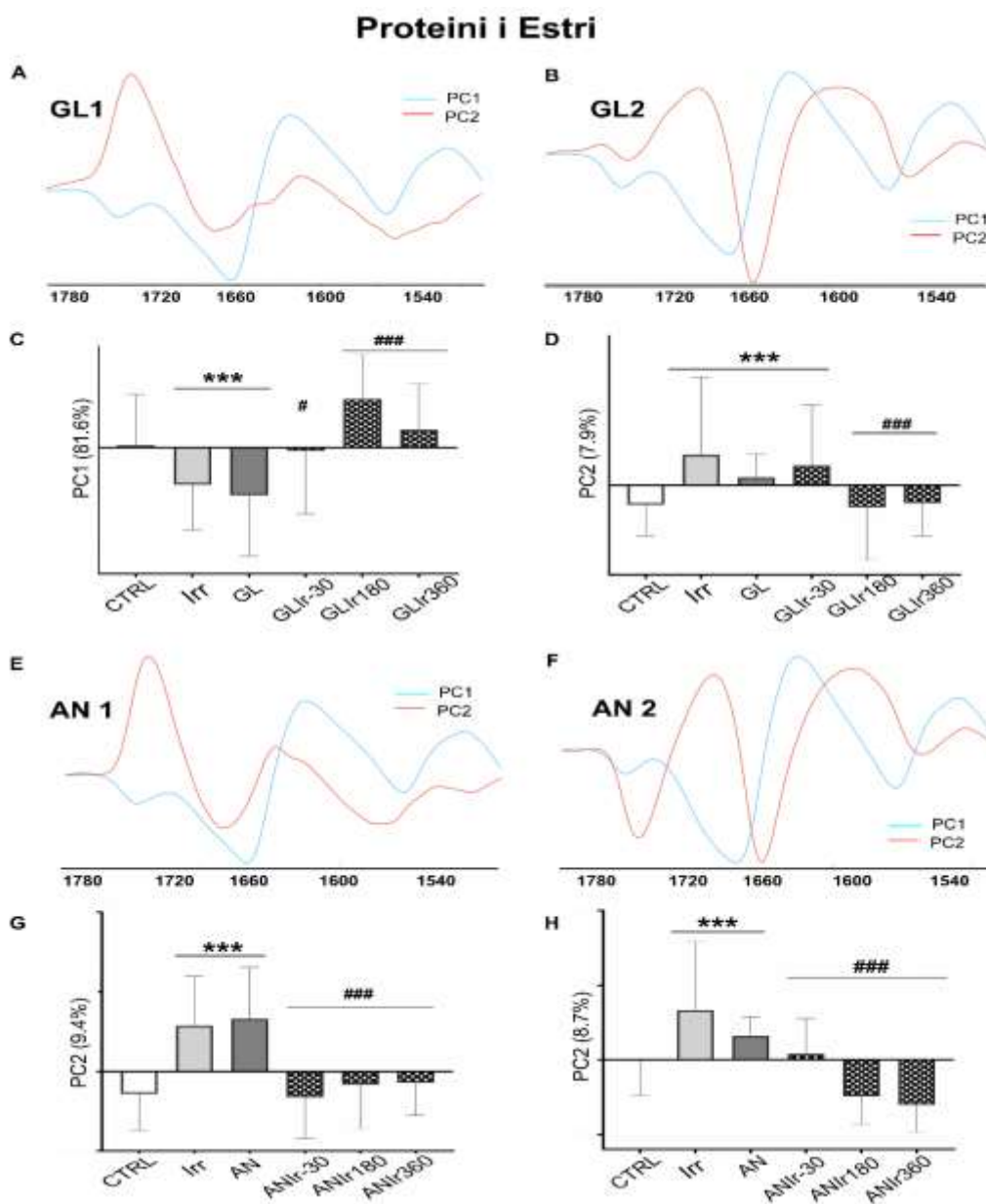
Osnovni kriterijumi u PC analizi su podrazumevali:

- da je rezultat podudaran kod obe kontrolne životinje
- da je zračenje dovelo do značajne promene određene spektralne trake u odnosu na neozračenu grupu životinja.

Dominantne detektovane apsorpcione trake u FTIR spektrima produžene moždine potiču od lipida (asimetričnih i simetričnih C-H istežućih vibracija metilnih grupa CH_2 i CH_3 od 2800 do 3050 cm^{-1} i CH_2 vibracione trake na 1464 cm^{-1}), proteina i estara (uključujući N-H i C-N istežuće vibracije amida II u oblasti od 1490 do 1570 cm^{-1} , C=O istežuće trake amida I u oblasti od 1600 do 1700 cm^{-1} i C=O spektralne istežuće trake estera karbonila na 1738 cm^{-1}), i fosfata (simetričnog fosfata od 980 do 1160 cm^{-1} i asimetričnog istezanja fosfodieterskih grupa u nukleinskim kiselinama u oblasti od 1160 do 1360 cm^{-1}).

Analiza proteina i estara (1480 - 1800 cm^{-1}) pokazala je značajan efekat za oba radioprotektora, naročito za primenu nakon zračenja (Slika 24). Prema "krivama opterećenja" (engl. loading curves) za oba seta životinja, kako grupa sa aminotiolnim radioprotektorom GL2011 (Slika 24 A i B), tako i grupa sa anizomicinom (Slika 24 E i F), uočeno je da su najveće promene u oblasti amida II (sa pikom na 1545 cm^{-1}), amida I (sa pikom na 1655 cm^{-1}) i estara (1700 - 1760 cm^{-1}). U poredjenju sa CTRL grupom, PC analiza (engl. principal component analysis), PC1 (prva osnovna komponenta) sa 81.6% (prvi set životinja) i PC2 (druga osnovna komponenta) sa 7.9% (drugi set životinja) spektralnog udela varijanse (Slika 24C i D), pokazala je značajnu razliku od ozračene grupe i grupe koja je primila samo lek GL2011 ($P < 0.001$), dok su u poredjenju sa Irr grupom, grupe gde je GL2011 primenjen 3 h i 6 h posle zračenja u oba seta životinja imale drastičnu razliku ($P < 0.001$). PC1 u prvom setu životinja ukazala je na razliku Irr od grupe sa GL2011 apliciranim 30 minuta pre zračenja, ali je ta razlika bila nešto manja nego u grupama gde je lek primenjen kasnije ($P < 0.05$). Kod upotrebe anizomicina kao radioprotektora, uočeno je da PC2 sa 9.4% spektralnog udela varijanse u prvom setu (Slika 24G) i 8.7% u drugom setu (Slika 24H) dovodi do razlike CTRL od ozračene grupe, kao i CTRL od grupe koja je primila samo anizomicin ($P < 0.001$). Takodje, značajna razlika je uočena i između ozračene grupe i svih grupa sa anizomicinom kao radioprotektorom primenjenim pre ili posle zračenja (Slika 24G i H, $P < 0.001$).

Za razliku od Ramanske mikrospektroskopije, najznačajnije su promene detektovane u amidima II (1480 - 1580 cm^{-1}), koje nije moguće detektovati na Ramanskim spektrima, kao i asimetrične istežuće vibracije nukleinskih kiselina (1215 - 1265 cm^{-1}). Amid II i asimetrični fosfat (PO_3^-) su ujedno zadovoljili i osnovne kriterijume u PC analizi da je rezultat podudaran kod obe kontrolne životinje i da je zračenje dovelo do značajne promene određene spektralne trake u odnosu na neozračenu grupu životinja. Takodje, ove kriterijume je zadovoljila i C=O istežuća veza u estrima (1700 - 1760 cm^{-1}).



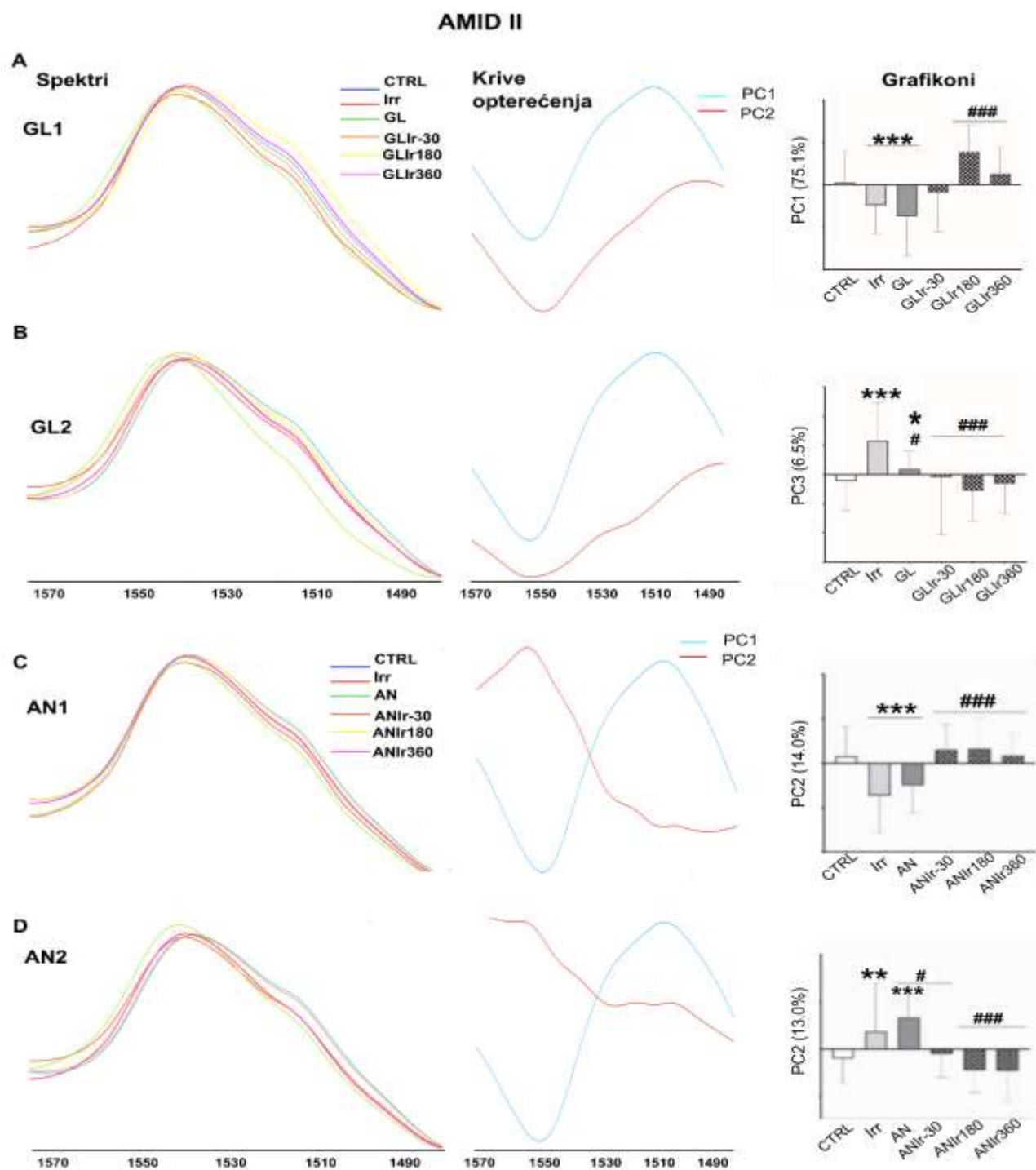
Slika 24. Proteini i estri. Krive opterećenja i grafikoni koji prikazuju vrednosti za glavne komponente PC analize za obe životinje u svim eksperimentalnim grupama. A) Krive opterećenja za prvi set životinja, B) Krive opterećenja za drugi set životinja, C) prvi set životinja - grafički prikaz PC1 komponente sa 81.6% spektralnog udela varijanse, D) drugi set životinja - grafički prikaz PC2 komponente sa 7.9% spektralnog udela varijanse. CTRL, Irr, AN - grupa životinja koja je primila samo anizomicin, ANIr-30 - anizomicin apliciran 30 min pre zračenja, ANIr180 - anizomicin apliciran 3 h posle zračenja i ANIr360 - anizomicin apliciran 6 h posle zračenja: E) Krive opterećenja za prvi set životinja, F) Krive opterećenja za drugi set životinja, G) prvi set životinja - grafički prikaz PC2 komponente sa 9.4% spektralnog udela varijanse, H) drugi set životinja - grafički prikaz PC2 komponente sa 8.7% spektralnog udela varijanse. Statistički značajne razlike su prikazane u odnosu na CTRL (*) i Irr (#). Radjena je Kruskal-Wallis ANOVA na rangovima sa Dunn-ovim *post-hoc* testom poredjenja. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Na slici 25. prikazan je deo spektra od 1490 do 1570 cm^{-1} sa doprinosom N-H i C-N istežuće vibracije amida II nakon ozračivanja i/ili tretmana radioprotektorima. Takodje, prikazane su i odgovarajuće krive opterećenja i grafikoni. U okviru amida II, radioprotektivni efekat je najviše izražen u delu spektra na 1520 cm^{-1} , delu koji se najviše odnosi na istežuću C=C vezu prstena amino kiseline tirozin (Tyrosine), kao i na deo spektra od 1540 do 1580 cm^{-1} . U poredjenju sa CTRL grupom, uočeno je smanjenje intenziteta spektralne trake Amida II kod obe ozračene životinje (Slika 25A i B; $P < 0.001$). S druge strane, sve životinje sa radioprotektorom GL2011 apliciranim pre ili posle zračenja imale su povećanje intenziteta ove spektralne trake u poredjenju sa ozračenim životinjama (Slika 25A i B). Naime, u prvom setu životinja (Slika 25A), PC1 sa 75% spektralnog udela varijanse pokazala je statistički značajno povećanje za grupe životinja sa radioprotektorom apliciranim 3 h i 6 h posle zračenja (Slika 25A; $P < 0.001$), dok je u drugom setu životinja, PC3 sa 6.5% spektralnog udela varijanse pokazala za sve životinje sa radioprotektorom apliciranim pre ili posle zračenja statistički značajno povećanje u poredjenju sa ozračenom grupom (Slika 25B; $P < 0.001$).

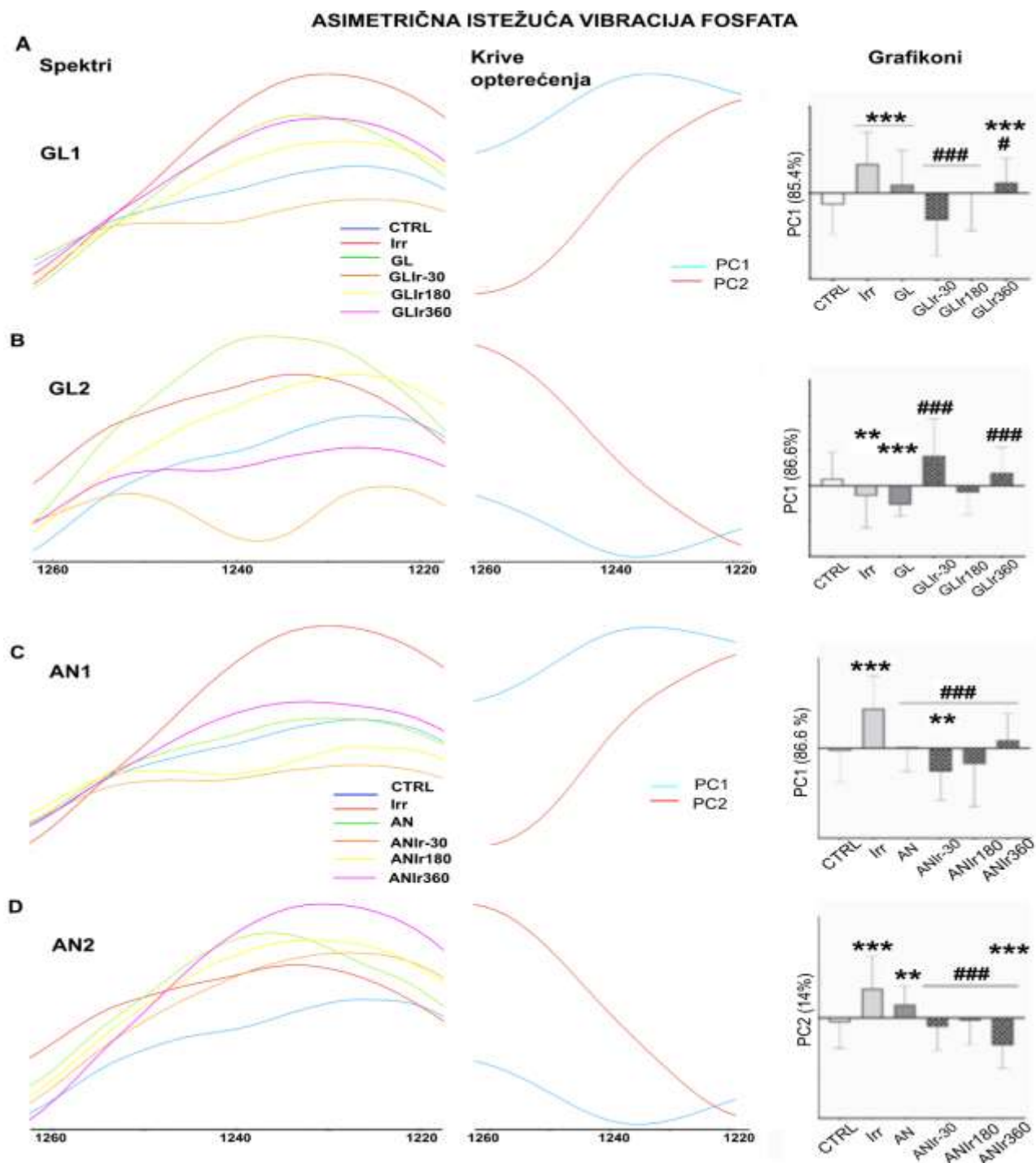
Može se uočiti da je povećanje intenziteta spektralne trake amida II bilo naročito izraženo ako je GL2011 apliciran 3 h i 6 h posle zračenja, kao i da je grupa sa GL2011 apliciranim 30 minuta pre zračenja imala manje izraženu razliku u odnosu na ozračenu grupu, što je ukazalo na to da je radioprotektor efikasniji ako se primeni posle zračenja.

Sličan obrazac ponašanja je uočen i pri aplikaciji anizomicina kao radioprotektora (Slika 25C i D). U prvom setu životinja, primena anizomicina pre ili posle zračenja je dovela do porasta amida II u odnosu na ozračenu grupu (Slika 25C; $P < 0.001$), što je pokazala PC2 sa 14% spektralnog udela varijanse, dok je u drugom setu životinja PC2 sa 13% spektralnog udela varijanse pokazala povećanje intenziteta pri aplikaciji posle zračenja (Slika 25D; $P < 0.001$). Interesantno je da aplikacija samog leka GL2011 ili anizomicina bez zračenja u nekim delovima spektra ima sličan efekat kao i samo zračenje, što se takodje pokazalo i kod amida II sa značajnom statističkom razlikom u odnosu na CTRL (u prvom setu životinja GL, $P < 0.001$; u drugom setu životinja GL, $P < 0.05$; u prvom i drugom setu životinja AN, $P < 0.001$). Kod jedne životinje sa anizomicinom bez zračenja uočen je pomeraj vrha u spektru sa 1540 na 1550 cm^{-1} .

U delu spektra sa fosfatima (980-1350 cm^{-1}), radioprotektivni efekat je uočen u delu spektra sa asimetričnim istežućim vibracijama fosfata nukleinskih kiselina (1220-1260 cm^{-1}) sa pikom na 1232 cm^{-1} koji potiče od DNK (1238 cm^{-1}) i delom spektra između 1240 do 1260 cm^{-1} sa mogućim udelom CO istežuće veze karboksilnih kiselina i amida III (1260-1350 cm^{-1}). Analiza glavnih komponenata, PC1 sa oko 86% spektralnog udela varijanse kod oba seta životinja za poredjenje sa radioprotektorom GL2011, ukazala je na razliku dela spektra za asimetrični fosfat ozračenih životinja od CTRL životinja, ali i ozračenih životinja od onih koje su bile zaštićene sa GL2011 pre ili posle zračenja (Slika 26 A i B). U poredjenju sa CTRL grupom, uočeno je povećanje intenziteta spektralne trake na 1238 cm^{-1} kod ozračenih životinja (prvi set životinja $P < 0.001$, drugi set životinja $P < 0.01$), kao i u grupi životinja sa primenjenim radioprotektorom bez zračenja ($P < 0.001$ za obe životinje), što je ukazalo na to da je primena samog leka imala sličan efekat kao i radijacija. Međutim, eksperimentalne grupe koje su bile izložene radijaciji i radioprotekciji sa GL2011 održale su sličan intenzitet spektralnih traka kao i CTRL grupa, što je ukazalo na očuvanost genetičkog materijala. U poredjenju sa ozračenom grupom životinja, u prvom setu životinja, aplikacija leka 30 minuta pre zračenja i 3h posle zračenja je dala veću značajnost od aplikaciji leka 6h nakon zračenja (Slika 26A, $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.05$), dok je u drugom setu životinja pokazan statistički značajan efekat za aplikaciju leka 30 minuta pre zračenja i 6h posle zračenja ($P < 0.001$).



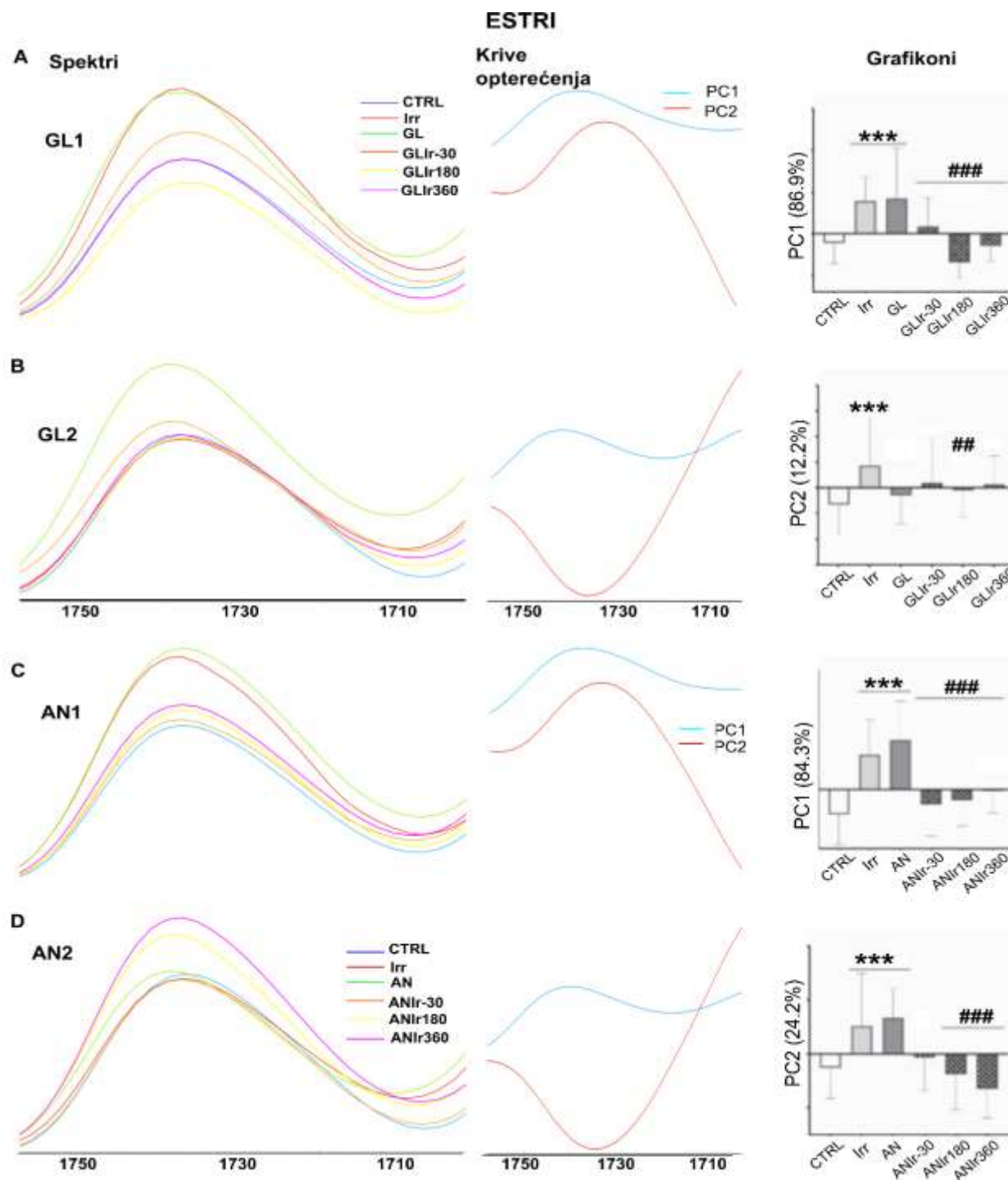
Slika 25. Deo usrednjenog i normalizovanog sinhrotronskog FTIR spektra iz oblasti amida II ($1490\text{--}1570\text{ cm}^{-1}$) nakon ozračivanja i/ili tretmana sa GL2011 ili anizomicinom. Uz spektre su prikazane i odgovarajuće krive opterećenja i grafikoni dobijeni analizom osnovnih komponenata (PC1, PC2 ili PC3). CTRL, Irr, GL, GLIr-30, GLIr180 i GLIr360: A) prvi set životinja; B) drugi set životinja. CTRL, Irr, AN, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360: C) prvi set životinja; D) drugi set životinja. Statistički značajne razlike su prikazane u odnosu na CTRL (*) i Irr (#). Radjena je Kruskal-Wallis ANOVA na rangovima sa Dunn-ovim *post-hoc* testom poredjenja. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



Slika 26. Deo usrednjenog i normalizovanog sinhrotronskog FTIR spektra iz oblasti asimetrične istežuće vibracije fosfata ($1220-1260\text{ cm}^{-1}$) nakon ozračivanja i/ili tretmana sa GL2011 ili anizomicinom. Uz spektre su prikazani i odgovarajuće krive opterećenja i grafikoni dobijeni analizom osnovnih komponenta (PC1 ili PC2). CTRL, Irr, GL, GLIr-30, GLIr180 i GLIr360: A) prvi set životinja; B) drugi set životinja. CTRL, Irr, AN, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360: C) prvi set životinja; D) drugi set životinja. Statistički značajne razlike su prikazane u odnosu na CTRL (*) i Irr (#). Radjena je Kruskal-Wallis ANOVA na rangovima sa Dunn-ovim *post-hoc* testom poredjenja. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Kod primene anizomicina kao radioprotektora, u prvom i drugom setu životinja (Slika 26C i D), PC1 sa 86.6% i PC2 sa 14% spektralnog udela varijanse pokazale su značajnu razliku za sva vremena aplikacije anizomicina u poredjenju sa ozračenim životinjama ($P < 0.001$). Takođe, životinja koja je primila samo anizomicin u prvom setu nije pokazala značajnu razliku od kontrolne grupe (Slika 26C), dok je druga životinja imala sličan trend kao ozračena grupa sa statistički značajnom razlikom u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 26D, $P < 0.001$).

Analiza osnovnih komponenata pokazala je značajan efekat i za vibracionu traku estara ($1700-1760\text{ cm}^{-1}$) kod primene oba radioprotektora (Slika 27). Tačnije, krive opterećenja su pokazale da se radioprotektivni efekat odnosi na deo spektra sa CO vezom u lipidima i fosfolipidima ($1730-1740\text{ cm}^{-1}$), kao i na deo sa CO vezom u bazama nukleinskih kiselina ($1690-1705\text{ cm}^{-1}$). Naime, u prvom setu životinja sa GL2011 (Slika 27A), PC1 sa 86.9% spektralnog udela varijanse razlikovala je sve grupe sa radioprotektorom pimenjenim pre ili posle zračenja ($P < 0.001$), dok je u drugom setu životinja PC2 (12.2%) pokazala efekat samo za grupu gde je GL2011 primenjen 3 h nakon zračenja ($P < 0.01$; Slika 27B). Kod primene anizomicina, efekat radioprotekcije je uočljiv u svim grupama za oba seta životinja ($P < 0.001$; Slika 27C i D). Takođe, sama radijacija je imala značajan efekat u poredjenju sa kontrolnom grupom ($P < 0.001$), dok je primena GL2011 imala sličan efekat kao i radijacija u prvom setu životinja ($P < 0.001$; Slika 27A). Primena samog anizomicina je ponovo imala sličan efekat kao izlaganje jonizujućem zračenju, što je bilo uočljivo u oba seta životinja i značajno se razlikovalo od vrednosti za kontrolnu grupu životinja ($P < 0.001$; Slika 27C i D).



Slika 27. Deo usrednjenog i normalizovanog sinhrotronskog FTIR spektra iz oblasti estara ($1700\text{--}1760\text{ cm}^{-1}$) nakon ozračivanja i/ili tretmana sa GL2011 ili anizomicinom. Uz spektre su prikazani i odgovarajuće krive opterećenja i grafikoni dobijeni analizom osnovnih komponenta (PC1 ili PC2). CTRL, Irr, GL, GLIr-30, GLIr180 i GLIr360: A) prvi set životinja; B) drugi set životinja. CTRL, Irr, AN, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360: C) prvi set životinja; D) drugi set životinja. Statistički značajne razlike su prikazane u odnosu na CTRL (*) i Irr (#). Radjena je Kruskal-Wallis ANOVA na rangovima sa Dunn-ovim *post-hoc* testom poredjenja. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.4. PROCENA RADIOPROTEKTIVNOG POTENCIJALA RADIOPROTEKTORA GL2011 ANALIZOM PROMENA NA GLIJALNIM ĆELIJAMA

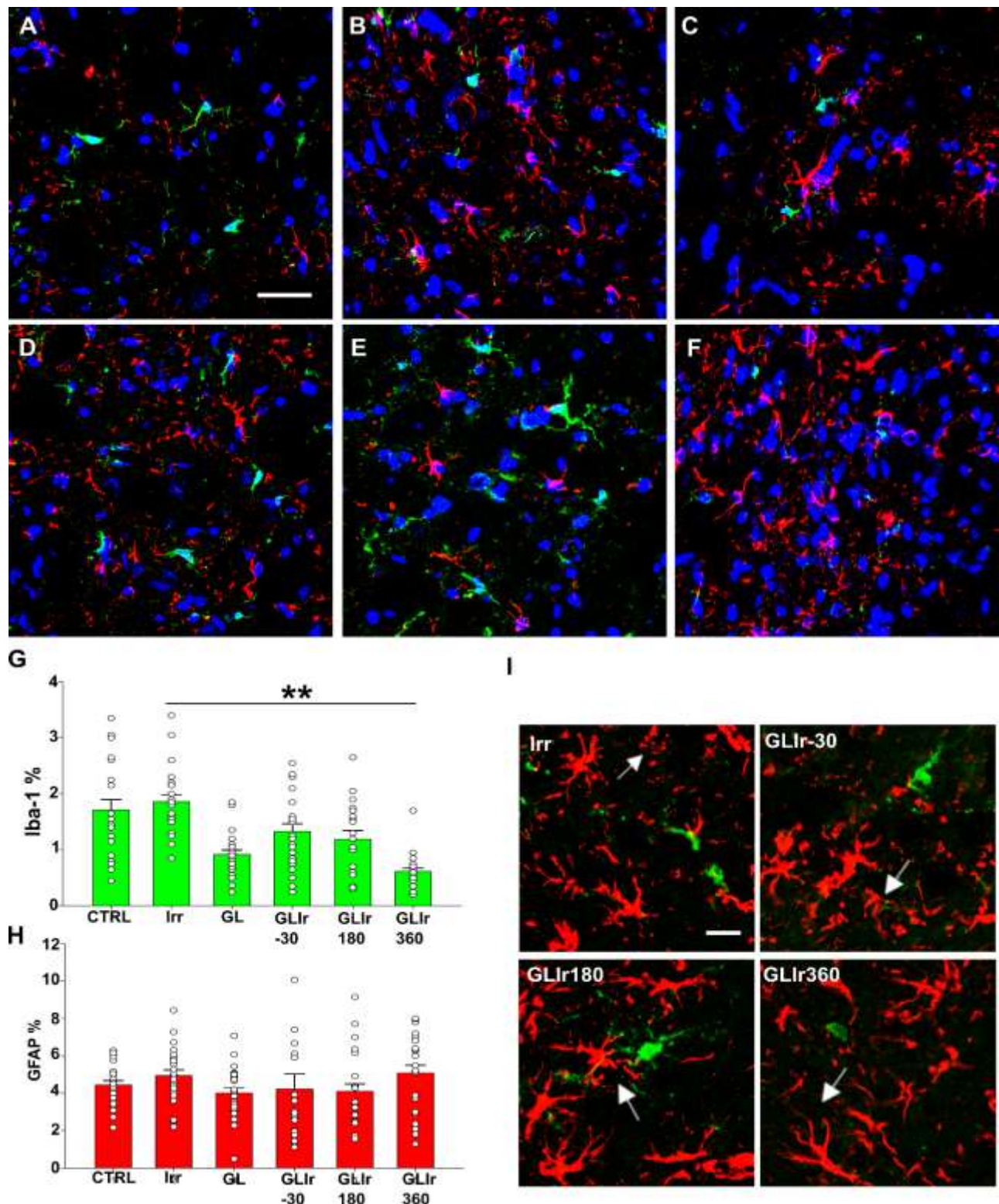
Da bi se utvrdio stepen aktivacije glijalnih ćelija, odn. da bi se procenio radioprotektivni potencijal GL2011, tkivni moždani preseki produžene moždine pacova su imunohistohemijski obojeni na markere glijalnih ćelija, Iba-1 i GFAP, a potom su snimani na konfokalnom mikroskopu.

4.4.1. MIKROGLIJALNE ĆELIJE

U grupi ozračenih životinja (Irr, Slika 28B), uočeno je povlačenje ćelijskih produžetaka, što je karakteristično za proces inflamacije, kao i blago, ali ne i statistički značajno povećanje procenta pozitivnih piksela za Iba-1 u poredjenju sa kontrolnom grupom (CTRL, Slika 28A). U zavisnosti od vremena primene leka, odn. od toga da li je lek GL2011 apliciran 30 minuta pre zračenja, 3 h ili 6 h posle zračenja, uočene su različite promene u morfologiji mikroglije. Naime, životinje koje su primile lek 30 minuta pre zračenja (GLIr-30) pokazale su znakove inflamacije u vidu povlačenja ćelijskih produžetaka (Slika 28D). Eksperimentalna grupa životinja sa primenom leka 3 h nakon zračenja (GLIr180) pokazala je trend ka povećanju volumena ćelijskog tela nekih mikroglijalnih ćelija (Slika 28E), dok je grupa sa primenjenim lekom 6 h posle zračenja (GLIr360) dovela do pojave relativno manjih volumena ćelijskog tela (Slika 28F). Takodje, jedino je grupa sa radioprotektorom GL2011 apliciranim 6 h posle zračenja pokazala statistički značajno smanjenje procenta pozitivnih piksela za Iba-1 ($P < 0.01$) u poredjenju sa ozračenom grupom životinja (Slika 28G). Primena samog radioprotektora GL2011 nije pokazala promene u morfologiji mikroglije (Slika 28C), ukazujući na to da lek nema neželjena dejstva. U grupi sa radioprotektorom apliciranim bez zračenja (GL), detektovano je smanjenje procenta pozitivnih piksela za Iba-1, ali ono nije bilo statistički značajno u porednjju sa kontrolnom grupom (Slika 28G).

4.4.2. ASTROCITI

Astrociti su najrasprostranjenije glijalne ćelije u mozgu, i imaju važnu strukturnu i potpurnu ulogu u centralnom nervnom sistemu (CNS), kao i bitnu ulogu u održavanju homeostaze i sekreciji različitih citokina (Montgomery 1994). Iako kvantitativna analiza imunohistohemijskog bojenja za marker astrocita GFAP (Slika 28H) nije pokazala statistički značajnu razliku između grupa, uočene su promene u morfologiji astrocita usled zračenja. Naime, primećena je fragmentacija nastavaka astrocita kod životinja koje su bile izložene samo radijaciji (Slika 28B). Takodje, slične promene fragmentacije u nastavcima astrocita uočene su i u grupi životinja sa apliciranim radioprotektorom 30 minuta pre zračenja (Slika 28D i I). Kada se uporedi morfologija astrocita u Irr i GLIr-30 grupama sa morfologijom astrocita u grupama gde je radioprotektor apliciran 3h i 6h posle zračenja, evidentno je da radioprotektor primenjen posle zračenja održava kompaktniju strukturu astrocita ozračenih životinja (Slika 28 E, F i I), što je ukazalo na to da radioprotektor ima značajnu ulogu u zaštiti astrocita od zračenja ukoliko se primeni posle zračenja. Primena samog leka nije pokazala dejstvo na astrocitima, što potvrđuje da lek nema neželjena dejstva na glijalnim ćelijama.



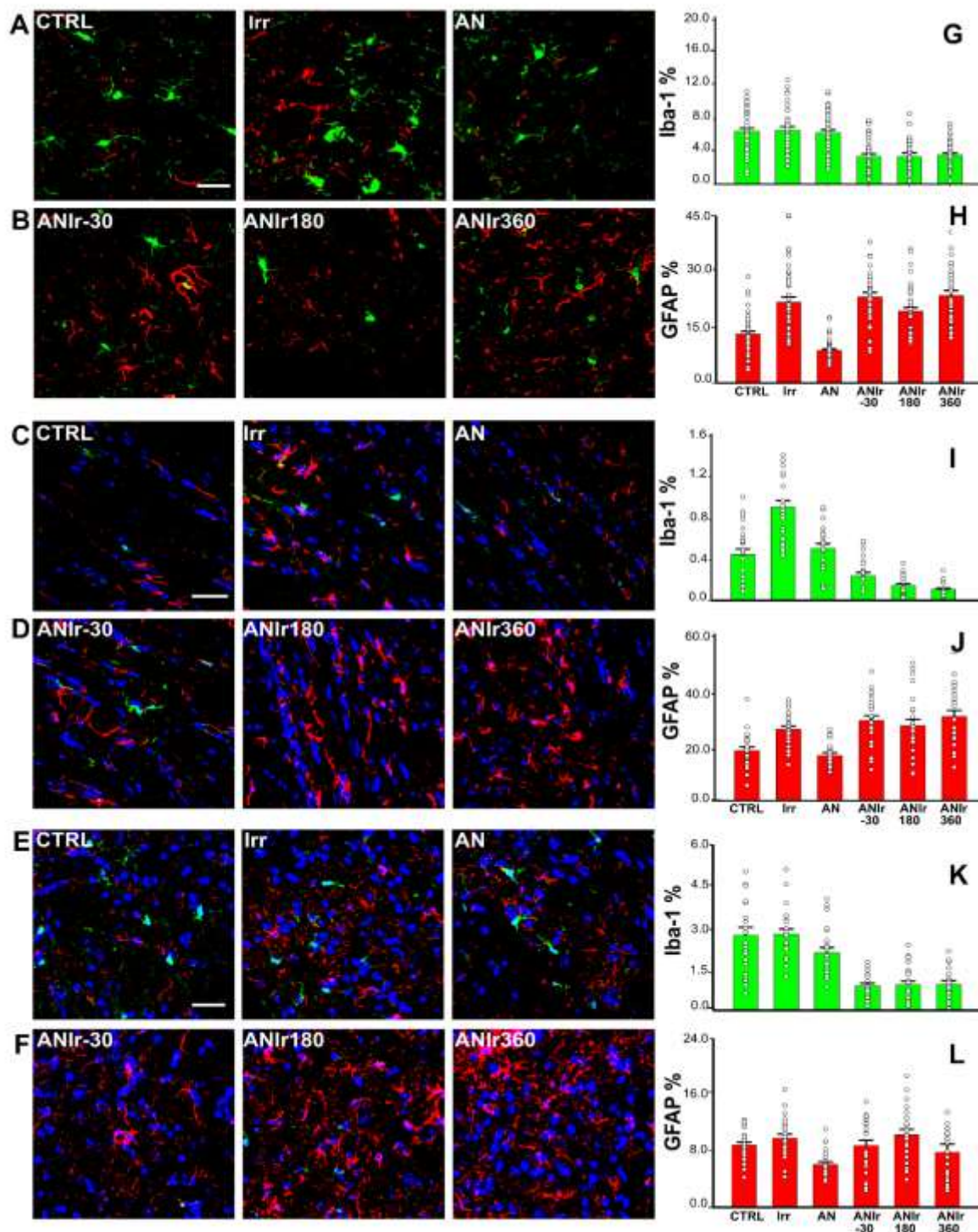
Slika 28. Slike dobijene konfokalnim mikroskopom imunohistohemijski obojenih tkivnih preseka produžene moždine u jedru Gigantocellular reticular nucleus (GRN) na Iba-1 kao marker mikroglije (zelen signal), GFAP kao marker astrocita (crven signal) i Topro – marker jedara (plavi signal). A) kontrolna grupa (CTRL). B) grupa ozračenih životinja (Irr). C) grupa sa samim radioprotektorom

(GL). D) grupa životinja sa radioprotektorom GL2011 apliciranim 30 min pre zračenja (GLIr-30). E) grupa životinja sa radioprotektorom apliciranim 180 min posle zračenja (GLIr180). F) Grupa životinja sa radioprotektorom apliciranim 360 min posle zračenja (GLIr360). Skala za slike 28 A-F iznosi 40 μm ; grafici pokazuju kvantitativno poredjenje imunohistohemijskog bojenja produžene moždine eksperimentalnih grupa – CTRL, Irr, GL, GLIr-30, GLIr180 i GLIr360; G) procenat pozitivnih piksela za Iba-1 i H) za GFAP. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. I) reprezentativne konfokalne slike imunohistohemijskog bojenja Irr, GLIr-30, GLIr180, GLIr360, skala za sliku 28 I je 20 μm (strelica ukazuje na distrofične astrocite u Irr i GLIr-30, i oporavljene astrocite u GLIr180 i GLIr360). Jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjima, sa LSD *post hoc* testom poredjenja grupa. ** $P < 0.01$.

4.5. PROCENA RADIOPROTEKTIVNOG POTENCIJALA ANIZOMICINA ANALIZOM PROMENA NA GLIJALNIM ČELIJAMA

Kako bi se ispitao radioprotektivni potencijal anizomicina na mozgu pacova, praćene su promene u mikrogliji i astrocitima na različitim moždanim regijama, uključujući somatosenzorni korteks, corpus callosum i produženu moždinu. Koronalni tkivni moždani preseki su imunohistohemijski obeleženi na markere mikroglije i astrocita (Iba-1 i GFAP), nakon čega su snimani na konfokalnom mikroskopu.

Imunohistohemija je pokazala značajno smanjenje bojenja na Iba-1 u sve tri ispitivane moždane regije, za sva tri tretmana sa anizomicinom kao radioprotektorom, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360 (Slika 29, redovi B, D i F) u poredjenju sa ozračenom grupom životinja - Irr (Slika 29, redovi A, C i E; jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima i Dunnettov "post hoc" test poredjenja grupa; *srednji kvadrat* = 4.916, $F = 5.344$ i $P = 0.026$). Drugim rečima, anizomicin je značajno smanjio ekspresiju mikroglijalnog markera Iba - 1 nezavisno od moždane regije i vremena aplikacije sa zračenjem (Slika 29 G, I i K). Promene u morfologiji mikroglije između grupa uočene su jedino u somatosenzornom korteksu (Slika 29, redovi A i B). Naime, kod ozračenih životinja bez anizomicina (Slika 29, Irr panel u redu A), mikroglijalne ćelije su imale veći volumen ćelijskog tela u poredjenju sa kontrolnom netretiranom grupom (Slika 29, CTRL panel u redu A), dok su u grupama koje su primile anizomicin kao radioprotektor (ANIr-30, ANIr180 i ANIr360), mikroglijalne ćelije bile manje veličine i često sa neprimetnim ćelijskim nastavcima (Slika 29, paneli u redu B). S druge strane, osim blago povećanog trenda bojenja na GFAP kod ozračenih životinja u poredjenju sa CTRL grupom (Slika 29 H, J i L), izrazita gliozna nije uočena ni u jednoj od praćenih moždanih regija. Takođe, u poredjenju sa ozračenom grupom životinja, nijedan tretman anizomicinom i zračenjem nije indukovao značajne promene u bojenju na GFAP.



Slika 29. Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa imunohistohemijski obojenih tkivnih preseka različitih moždanih struktura na Iba-1 kao marker mikroglije (zeleno), GFAP kao marker astrocita (crveno) i Topro kao marker nukleusa (plavo). Somatosenzorni korteks - redovi A i B, corpus callosum – redovi C i D, produžena moždina (brainstem) – redovi E i F. CTRL - kontrolna (netretirana) grupa, Irr - grupa ozračenih životinja, AN - grupa životinja sa primenjenim anizomicinom bez zračenja, ANIr-30 - grupa životinja sa primenjenim anizomicinom 30 min pre

zračenja, ANIr180 - grupa životinja sa anizomicinom primenjenim 3 h posle zračenja, ANIr360 - grupa životinja sa anizomicinom primenjenim 6 h posle zračenja. Skala za slike 29 A-F iznosi 40 μm . Grafici pokazuju kvantitativno poredjenje imunohistohemijskog bojenja eksperimentalnih grupa (CTRL, Irr, AN, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360) za mikrogliju, tj. procenat pozitivnih piksela za Iba-1 (zelene prečke: G – somatosenzorni korteks, I – corpus callosum i K – produžena moždina), i za astrocite, tj. za procenat pozitivnih piksela na GFAP (crvene prečke: H – somatosenzorni korteks, J – corpus callosum i L – produžena moždina). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška sa pojedinačnim merenjima. Finalno su upotrebljene 3 životinje po grupi (ukupno $n=18$), 48 merenja po grupi za somatosenzorni korteks, i 24 merenja po grupi za corpus callosum i produženu moždinu. * $P < 0.05$ (jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Dunnettov *post hoc* test poredjenja grupa).

4.6. PROCENA RADIOPROTEKTIVNOG POTENCIJALA GL2011 ANALIZOM NIVOA CITOKINA U PLAZMI

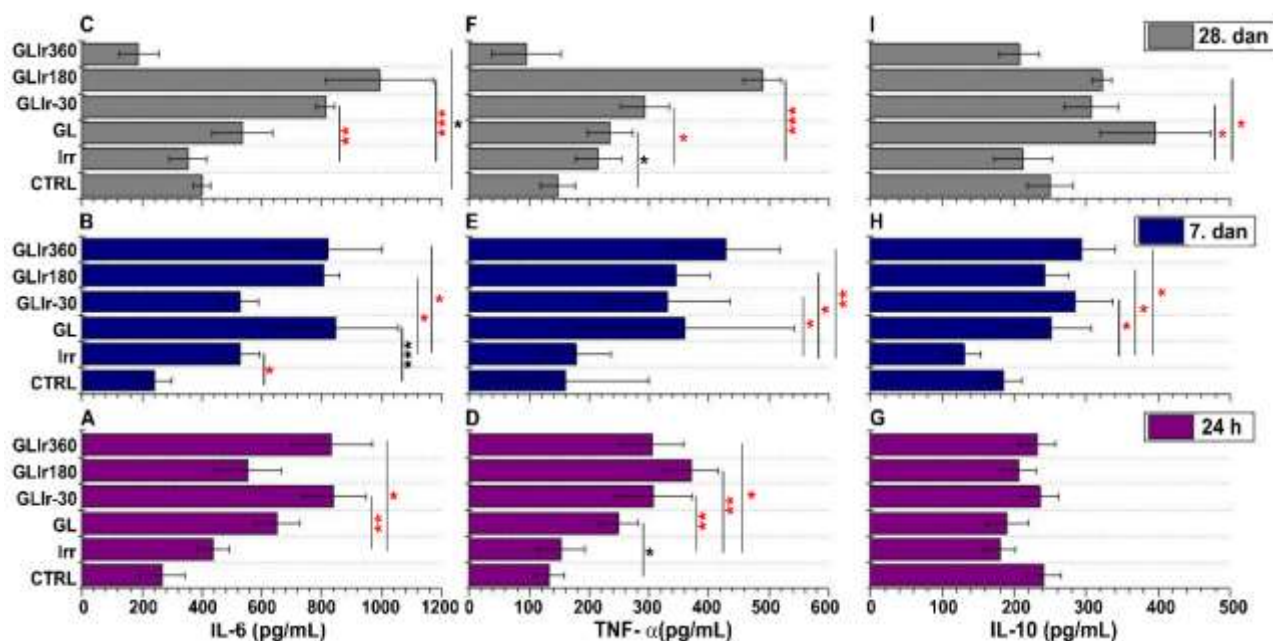
Kako bi se dodatno ispitalo dejstvo primene radioprotektora GL2011, životinjama je od početka do kraja eksperimenta uzimana krv iz repne vene (24 h, 7. i 28. dana od tretmana). Iz krvi je izolovana plazma u kojoj je određivano prisustvo dva pro-inflamatorna (IL-6 i TNF- α) i jednog anti-inflamatornog citokina (IL-10). Praćenje nivoa citokina u perifernoj cirkulaciji dalo je dodatne informacije o ukupnom efektu radioprotektora na neuroinflamaciju i oporavak centralnog nervnog sistema nakon zračenja.

U grupi životinja koje su bile ozračene a kod kojih nije primenjen radioprotektor GL2011 (Irr grupa), uočeno je povećanje nivoa IL-6 prvog i 7. dana nakon zračenja, a statistički značajno povećanje bilo je detektovano samo 7. dana (Slika 30B). U poredjenju sa grupom ozračenih životinja bez tretmana, primena radioprotektora GL2011 30 minuta pre zračenja pokazala je povećanje nivoa IL-6, koje je bilo statistički značajno 1. i 28. dana od tretmana (Slika 30A i C). Takodje, povećan nivo IL-6 primećen je i u grupi ozračenih životinja kod kojih je radioprotektor primenjen 3 h nakon zračenja, mada je statistički značajno povećanje bilo detektovano samo u kasnijim vremenskim tačkama, 7. i 28. dana (Slika 30B i C). Slično tome, u poredjenju sa Irr grupom, radioprotekcija 6 h nakon zračenja je izazvala značajno povećanje nivoa IL-6 prvog i 7. dana (Slika 30. A i B), dok je 28. dana uočeno statistički značajno smanjenje nivoa IL-6 u plazmi u poredjenju sa CTRL grupom (Slika 30C). Radioprotektor GL2011 primenjen kod životinja koje nisu ozračene je indukovao povećanje nivoa IL-6, ali je u poredjenju sa CTRL grupom to povećanje bilo statistički značajno samo 7. dana (Slika 30B).

U poredjenju sa CTRL grupom, radijacija nije izazvala značajne promene u koncentraciji TNF- α ni u jednom od praćenih termina. Međutim, u poredjenju sa grupom ozračenih životinja, 1. i 7. dana od tretmana zabeležen je značajan porast nivoa TNF- α u svim grupama ozračenih životinja kod kojih je primenjen radioprotektor GL2011 (Slika 30D i E). Poslednjeg, 28. dana od tretmana, ovo povećanje je bilo značajno u GLIr-30 i GLIr180 grupi (Slika 30F). Primena samog radioprotektora GL2011 bez zračenja takodje je indukovala povećanje nivoa TNF- α u svim praćenim vremenskim tačkama, sa statistički značajnim povećanjem u odnosu na CTRL grupu 1. i 28. dana (Slika 30D i F).

Koncentracija anti-inflamatornog citokina IL-10 se nije bitno menjala neposredno nakon tretmana (24 h nakon tretmana) ni u jednoj od tretiranih grupa sa zračenjem i/ili radioprotektorom (Slika 30G). Statistički značajno povećanje u poredjenju sa Irr grupom uočeno je tek 7. dana za sve

grupe životinja koje su bile zaštićene radioprotektorom GL2011 pre ili posle zračenja (GLIr-30, GLIr180 i GLIr360), dok je poslednjeg 28. dana, koncentracija IL-10 i dalje ostala značajno povećana u grupi GLIr-30 i GLIr180 (Slika 30I).



Slika 30. Efekat zračenja i radioprotektora GL2011 na nivo citokina u plazmi. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SEM). IL-6 = interleukin 6; TNF-α = faktor nekroze tumora α; IL-10 = interleukin 10. A) nivo IL-6 24 h nakon tretmana, B) nivo IL-6 7. dana od tretmana, C) nivo IL-6 28. dana od tretmana, D) nivo TNF-α 24 h nakon tretmana, E) nivo TNF-α 7. dana nakon tretmana, F) nivo TNF-α 28. dana nakon tretmana, G) nivo IL-10 24 h nakon tretmana, H) nivo IL-10 7. dana nakon tretmana, I) nivo IL-10 28. dana nakon tretmana. CTRL - kontrolna grupa životinja; Irr - ozračena grupa životinja; GL- životinje koje su primile samo radioprotektor GL2011; GLIr-30 = životinje tretirane radioprotektorom 30 minuta pre zračenja; GLIr180 = životinje tretirane radioprotektorom 180 minuta posle zračenja; GLIr360 = životinje tretirane radioprotektorom 360 minuta posle zračenja. Uradjena je jednofaktorska ANOVA sa Holm-Sidak *post hoc* testom poredjenja grupa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (crvena zvezdica označava poredjenje sa Irr grupom, a crna sa CTRL grupom životinja).

4.7. PROCENA RADIOPROTEKTIVNOG POTENCIJALA ANIZOMICINA ANALIZOM NIVOA CITOKINA U PLAZMI

Za dodatno ispitivanje radioprotektivnog potencijala anizomicina, eksperimentalnim životinjama (grupe CTRL, Irr, AN, ANIr-30, ANIr180 i ANIr360) je vadjena krv iz repne vene 24 h, 7. i 28. dana od tretmana, a potom je izolovana plazma u kojoj je ELISA testom detektovano prisustvo dva pro-inflamatorna (IL-6 i TNF-α) i jednog anti-inflamatornog citokina (IL-10). U tabeli 3. prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama za svaki citokin po grupi, kao i statistički značajne razlike u poredjenju sa kontrolnom i grupom samo ozračenih životinja.

Radijacija je već prvog dana izazvala povećanje nivoa IL-6, ali je povećanje bilo statistički značajno tek 7. dana, što je bilo u skladu sa prethodnim rezultatima sa radioprotektorom GL2011 (Kocovic et al. 2021). Takodje, u poredjenju sa CTRL grupom, nije bilo statistički značajnih promena u koncentraciji TNF- α i IL-10. Primećen je samo blagi porast nivoa TNF- α 7. i 28. dana, kao i nivoa IL-10 prvog i 28. dana od tretmana.

U poredjenju sa CTRL grupom, primena samog anizomicina (AN) izazvala je povećanje sva tri citokina u svim praćenim vremenskim tačkama. Statistički značajno povećanje uočeno je za TNF- α prvog i 28. dana, dok je IL-6 bio značajno povećan 7. i 28. dana. Poslednjeg 28. dana, detektovano je i statistički značajno povećanje novoa IL-10.

Iako je pokazano da anizomicin u većini protokola povećava nivo IL-6, u grupi životinja gde je anizomicin primenjen kao radioprotektor 30 minuta pre zračenja nije uočena značajna promena ovog citokina. Koncentracija IL-6 je bila slična kao i u CTRL grupi, sa blagim smanjenjem koncentracije u poredjenju sa ozračenim životinjama. Medjutim, poslednjeg 28. dana, uočen je trend povećanja nivoa IL-6 u poredjenju sa grupom ozračenih životinja. Ovaj tretman nije doveo ni do značajnih promena u ostala dva praćena citokina.

Takodje, u poredjenju sa ozračenim životinjama, aplikacija anizomicina 3 h nakon zračenja nije dovela do značajnih promena u koncentraciji pro-inflamatornih citokina (IL-6 i TNF- α). Tek 7. i 28. dana uočen je trend povećanja nivoa IL-6, ukazujući na to da se efekat anizomicina ispoljava kasnije nakon tretmana. IL-10 je takodje bio povećan kasnije nakon tretmana, a statistički značajno povećanje u poredjenju sa ozračenom grupom životinja bilo je uočeno samo 28. dana.

Tretman anizomicinom 6 h nakon zračenja indukovao je najveće povećanje koncentracije citokina. Medjutim, u poredjenju sa grupom ozračenih životinja, statistički značajno povećanje uočeno je samo 7. dana za IL-10.

Tabela 3. Efekat radijacije i tretmana sa anizomicinom na citokine u plazmi.

| Grupe | IL-6 (pg/ml) | | | TNF- α (pg/ml) | | | IL-10 (pg/ml) | | |
|---------|---------------------|----------------|---------------|-----------------------|--------------|---------------|---------------------|--------------|---------------|
| | Dani posle tretmana | | | Dani posle tretmana | | | Dani posle tretmana | | |
| | 1 | 7 | 28 | 1 | 7 | 28 | 1 | 7 | 28 |
| CTRL | 294 \pm 77 | 286 \pm 57 | 399 \pm 29 | 107 \pm 23 | 162 \pm 63 | 94 \pm 29 | 224 \pm 26 | 171 \pm 25 | 214 \pm 35 |
| Irr | 390 \pm 56 | 527 \pm 66* | 307 \pm 63 | 165 \pm 37 | 178 \pm 29 | 181 \pm 39 | 169 \pm 24 | 130 \pm 23 | 183 \pm 34 |
| AN | 729 \pm 125 | 757 \pm 211* | 910 \pm 61* | 230 \pm 13* | 319 \pm 62 | 326 \pm 35* | 183 \pm 71 | 312 \pm 65 | 375 \pm 31* |
| ANir-30 | 299 \pm 156 | 285 \pm 61 | 469 \pm 101 | 242 \pm 89 | 145 \pm 39 | 233 \pm 65 | 155 \pm 36 | 197 \pm 10 | 268 \pm 30 |
| ANir180 | 375 \pm 52 | 662 \pm 144 | 493 \pm 120 | 181 \pm 30 | 275 \pm 49 | 197 \pm 59 | 191 \pm 11 | 264 \pm 63 | 305 \pm 13# |
| ANir360 | 578 \pm 96 | 479 \pm 90 | 635 \pm 132 | 317 \pm 39* | 245 \pm 96 | 337 \pm 36* | 230 \pm 61 | 256 \pm 6# | 355 \pm 70 |

Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. IL-6 - interleukin 6; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-10 - interleukin 10. CTRL - kontrolna grupa životinja, Irr - grupa ozračenih životinja, AN - životinje koje su primile samo anizomicin, ANir-30 - životinje tretirane anizomicinom 30 minuta pre zračenja, ANir180 - životinje tretirane anizomicinom 3 h posle zračenja, ANir360 - životinje tretirane anizomicinom 6

h posle zračenja. Uradjena je jednofaktorska ANOVA sa Holm-Sidak *post hoc* testom poredjenja. Statistički značajne vrednosti su prikazane u poredjenju sa CTRL (*) ili sa Irr (#) grupom, * $P < 0.05$.

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji testiran je radioprotektivni potencijal dva leka, prirodnog aminotiolnog jedinjenja GL2011 i anizomicina izolovanog iz bakterije *Streptomyces griseolus*. Mužjaci albino Wistar pacova starosti 2 meseca ozračivani su LD₅₀ dozom (6.7 Gy) gama zračenjem iz izvora ⁶⁰Co. Pored 30-dnevnog preživljavanja ozračenih životinja i životinja koje su primile radioprotektor GL2011 ili anizomicin 30 minuta pre zračenja, odnosno 3 h ili 6 h posle zračenja, praćene su molekularne i ćelijske promene na mozgu preživelih pacova, kao i markeri inflamacije iz krvi. Upotrebom Ramanske mikrospektroskopije i sinhrotronske FTIR mikrospektroskopije detektovane su promene u nukleinskim kiselinama (DNK/RNK), amino kiselinama (triptofan, fenilalanin i tirozin), proteinima i lipidima. Efekti GL2011 na moždano tkivo - praćena je i na imunofluorescentno obeleženim preseccima produžene moždine preko promena u glijalnim ćelijama (mikrogliji i astrocitima), dok je za procenu efikasnosti anizomicina kao radioprotektora, praćenje glijalnih markera radjeno na produženoj moždini, kao i u oblasti somatosenzornog korteksa i corpus callosum-a. Promene na nivou celog organizma praćene su detektovanjem dva pro-inflamatorna citokina (IL-6 i TNF- α), kao i jednog anti-inflamatornog citokina (IL-10) u plazmi izolovanoj iz repne vene eksperimentalnih životinja 24h, kao i 7. i 28. dana od tretmana.

5.1. MOLEKULARNE PROMENE U PRODUŽENOJ MOŽDINI PACOVA OZRAČENIH I TRETIRANIH SA LEKOM GL2011 ILI ANIZOMICINOM KAO RADIOPROTEKTOROM

Izlaganje zračenju može direktno ili indirektno dovesti do oštećenja mozga kroz nastanak slobodno radikalskih vrsta i oksidativno oštećenje. Na taj način nastaju oštećenja biomolekula, kao i mutacije u nukleinskim kiselinama koje mogu dovesti do karcinogeneze i/ili ćelijske smrti (Hall and Giaccia 2012). U ovoj studiji ispitivan je zaštitni efekat novog prirodnog aminotiolnog radioprotektora GL2011 na Wistar pacovima. Praćene su molekularne i ćelijske promene na produženoj moždini nakon ozračivanja i/ili primene radioprotektora. U prethodnoj studiji pokazano je da primena GL2011 u tri identične doze i u tri vremenske tačke povećava preživljavanje ozračenih pacova (Ganesan et al. 2014). U ovoj studiji je pokazano povećano preživljavanje ozračenih pacova čak i sa jednom dozom leka GL2011. Interesantno je da nije bilo razlike u preživljavanju onih jedinki koje su dobile lek u različitim vremenskim tačkama, što je ukazalo na to da lek GL2011 aktivira radioprotektive mehanizme u mozgu bilo da se primeni pre ili posle zračenja.

Ramanska mikrospektroskopija je pokazala značajne promene u biomakromolekulima produžene moždine eksperimentalnih životinja koje su bile pod radioprotekcijom (Kočović et al. 2021; Kočović et al. 2021). Najizražajnije promene su uočene u intenzitetu spektralnih traka amino kiselina, triptofana i fenilalanina, kao i nukleinskih kiselina, proteina, i kombinovanih traka proteina i lipida.

Spektar moždanog tkiva ozračenih životinja je pokazao blage promene u poredjenju sa kontrolnom grupom, što je bilo u skladu sa rezultatima studije gde su praćene promene u ozračenom mozgu miša upotrebom Ramanske spektroskopije (Verma 1986). U toj studiji je takodje pokazano blago povećanje spektralne trake fenilalanina na 1004 cm⁻¹ usled zračenja. Sa druge strane, Lakshmi et al. (2002) su pokazali izražajnije promene pojedinih spektralnih traka usled ozračivanja miševa, što može biti posledica primenjene veće doze gama zračenja (10 Gy), kao i vremena praćenja

promena u mozgu miša. Za ispitivanje radioprotektora u ovoj studiji, upotrebljena je niža doza od 6.7 Gy, kako bi se produžilo vreme života nakon ozračivanja i da bi se omogućilo praćenje molekularnih promena u mozgu preživelih ozračenih i zaštićenih životinja nakon 30 dana.

Lipidi imaju ključnu ulogu u strukturnoj i funkcionalnoj organizaciji nervnog sistema, kao i najveću zastupljenost u mozgu sisara, naročito u beloj masi (Krafft et al. 2005, O'Brien and Sampson 1965). Pored proteina, lipidi su osnovne gradivne komponente ćelijskih membrana, a izlaganje jonizujućem zračenju dovodi do stvaranja slobodnih radikala, koji mogu da oštete molekule lipida, uzrokujući njihovu peroksidaciju i narušavanje strukture ćelijskih membrana. Proučavajući efekte jonizujućeg zračenja na modelu membrana upotrebom Ramanske spektroskopije, Verma (1986) je primetio da zračenje dovodi do smanjenja intenziteta spektralnih istežućih traka lipida, uključujući CH ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), C-C ($1000-1150\text{ cm}^{-1}$), C=C ($1600-1680\text{ cm}^{-1}$), ali ne i deformacionih traka lipida. Osim smanjenja intenziteta spektralne trake sa udelom lipida na 1657 cm^{-1} u ozračenoj grupi, odn. povećanja u grupama sa aplikacijom radioprotektora GL2011 posle zračenja (GLIr180 i GLIr360), druge promene na lipidima produžene moždine nisu uočene upotrebom Ramanske mikrospektroskopije. Ovaj rezultat ukazao je ujedno i na smanjenje proteinske trake (Amid I) u ozračenoj grupi, što je u skladu sa tim da jonizujuće zračenje putem slobodnih radikala dovodi do fragmentacije i inaktivacije proteina, a samim tim i do njihovog smanjenja (Symons and Taiwo 1992; Reisz et al. 2014). Takodje, nedavna studija na Wistar pacovima koji su bili izloženi dozi od 5 Gy jonizujućeg zračenja (^{60}Co), pokazala je smanjenje intenziteta proteinskih traka (Lima and Campos 2016). Ovakve promene uočene su i u grupi sa primenom radioprotektora GL2011 30 minuta pre zračenja, kako sa Ramanskom mikrospektroskopijom (Kocovic et al. 2021) tako i sa FTIR mikrospektroskopijom na sinhrotronu, ukazujući na to da se efekat zračenja na proteine nije u potpunosti smanjio sa primenom leka pre zračenja. S druge strane, primena radioprotektora 3 h ili 6 h posle zračenja dovela je do povećanja proteinskih traka, što je detektovano sa obe spektroskopske tehnike. Porast intenziteta spektralne proteinske trake u Ramanskom spektru Ramana detektovane na 1657 cm^{-1} (amide I) mogao bi se delimično objasniti aktivacijom transkripcionih faktora izazvanih zračenjem, koji kontrolišu ekspresiju gena pro-inflamatornih citokina, kao što su TNF- α , IL-1, IL-6, i anti-inflamatornih faktora poput IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- β (Di Maggio et al. 2015; Lumniczky 2017) koji takodje mogu biti pojačano ekspimirani i usled dejstva radioprotektora (Mun et al. 2018). Ovo se slaže sa nalazom povećane ekspresije dva pro-inflamatorna citokina (IL-6 i TNF-alfa), kao i jednog anti-inflamatornog citokina (IL-10) usled radioprotekcije ozračenih pacova sa GL2011 (Kočović et al. 2021), što takodje ukazuje na pretpostavku o njihovom mogućem uticaju na povećanje intenziteta proteinskih traka.

Ramanska mikrospektroskopija je pokazala i blago smanjenje spektralne trake simetričnog fosfata PO_4^{3-} (959 cm^{-1}), što je ukazalo na promenu u sadržaju nukleinskih kiselina usled izlaganja jonizujućem zračenju (Scholes et al. 1960). S druge strane, povećanje intenziteta spektralne trake simetričnog fosfata u grupama sa GL2011 radioprotekcijom, ukazalo je na povećanu sintezu nukleinskih kiselina i moguću stabilizaciju genetičkog materijala. S obzirom da se u grupama sa radioprotekcijom mogu uočiti i pretežno povećani intenziteti proteinskih traka, naročito posle zračenja, povećanje u oblasti nukleinskih kiselina bi moglo biti povezano sa povećanom sintezom RNK.

Kod radioprotekcije sa anizomicinom, uočeno je povećanje intenziteta spektralne trake simetričnog fosfata PO_4^{3-} kao i drugih spektralnih traka povezanih sa nukleinskim kiselinama, što je ukazalo na to da primena anizomicina deluje na povećanu sintezu nukleinskih kiselina i/ili stabilizaciju genetičkog materijala i povećanu sintezu nukleinskih kiselina. Koshiha et al. (1995) je pokazao da anizomicin indukuje transkripcionu aktivaciju i stabilizaciju iRNK, što je u skladu sa rezultatima ove

studije (Kočović et al. 2021). Prema tome, stabilizacija RNK, bi mogla biti mehanizam kojim anizomicin vrši svoju radioprotektivnu aktivnost u mozgu.

Povećan nivo fenilalanina u ozračenju kao i u grupama sa radioprotekcijom, mogao bi biti posledica metabolizma amino kiselina. Pokazano je da neki od pro-inflamatornih citokina, naročito IL-6 (koji je i u ovoj studiji bio povećan) smanjuju dostupnost enzima koji dovode do konverzije fenilalanina u tirozin u metabolizmu sinteze dopamina (Felger and Miller 2012), i da na taj način dolazi do povećanja nivoa fenilalanina i u mozgu.

Prema Ramanskim spektrima povećanje nivoa nukleinskih kiselina i proteina u grupama sa radioprotekcijom je praćeno povećanjem spektralne trake triptofana, naročito u grupi sa radioprotektorom GL2011 apliciranim 6 h posle zračenja. Blago smanjenje nivoa triptofana koje se može uočiti kod ozračenih životinja i činjenica da je povećan nivo pro-inflamatornih citokina poput IL-6 (koji je značajno povećan u grupi ozračenih životinja 7. dana nakon tretmana) ukazuje da dolazi do degradacije triptofana. Postoje studije koje ukazuju na postojanje veze između pro-inflamatornih citokina, poput IL-6 i metabolizma triptofana (Grohmann et al. 2001; Hol et al. 2014).

Neke studije su pokazale da anizomicin indukuje povećanje koncentracije aminokiselina, kao što su triptofan, tirozin, fenilalanin i prolin u mozgu miša (Rainbow et al. 1980; Schweri and Carr 1982), što je i ovde potvrđeno u Ramanskim spektrima produžene moždine pacova sa anizomicinom apliciranim posle zračenja.

Sinhrotronski FTIR spektri moždanih tkivnih preseka pokazali su efekat zračenja i radioprotekcije na proteinima i estrima, kao i na asimetričnom fosfatu. Značajan marker za oba radioprotektora bila je amid II traka, a radioprotektivni efekat je bio naročito izražen sa upotrebom leka nakon zračenja, što je u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima na Ramanskom mikrospektrometru (Kočović et al. 2021; Kočović et al. 2021). Skup podataka za amid I nije prošao postavljene kriterijume, odn. da kontrolna merenja u životinjskim parovima budu podudarna i/ili da postoji značajna razlika između kontrolne netretirane i ozračene životinje u oba ispitivana seta životinja.

Neke promene u spektrima nisu se odnosile na intenzitet posmatranih traka, već na „sedlaste tačke” između njih, što ukazuje na pomeranje vrha i/ili promene širine vrha. Na primer, takav je slučaj sa upotrebom samog radioprotektora GL2011 i anizomicina bez zračenja, gde je uočen pomeraj maksimuma spektra povezanog sa savijajućom N-H vezom i istežućom C-N vezom amida II na 1550 cm^{-1} (Balan et al. 2019). Takođe, oba radioprotektora su indukovala pojavu ulegnuća odn. „sedlaste tačke” na delu spektra oko 1580 cm^{-1} (mesto gde se graniče amid I i amid II između 1580 i 1625 cm^{-1}), što se može povezati sa C-C istežućom vezom ostataka tirozina, fenilalanina i nukleotida, kao i C=C istežućom vezom kinoidnog prstena (Malek et al. 2014; Talari et al. 2017; Balan et al. 2019). Smatra se da nije bilo promena u sekundarnoj strukturi proteina, kao što je α -helix, jer nije bilo značajnih promena u intenzitetu tih spektralnih traka.

Sinhrotronski FTIR spektri su pokazali da efekat primene radioprotektora postoji u delu spektra sa asimetričnim istežućim vibracijama veza PO_3^- , C-C, C-O i P-O okosnice fosfodiestera nukleinskih kiselina i fosfolipida (1080 - 1235 cm^{-1}), naročito za GL2011. Ovo je u skladu sa rezultatima Ramanske mikrospektroskopije i može se objasniti porastom nivoa RNK, što je u vezi sa pojačanom ekspresijom proteina, pro-inflamatornih i anti-inflamatornih citokina (Kočović et al. 2021).

Ionizujuće zračenje prouzrokuje peroksidaciju i degradaciju lipida, posebno u moždanom tkivu sa većim sadržajem lipida, kao što su mijelinski omotač i bela masa (Cakmak et al. 2012). Sinhrotronski FTIR spektri su pokazali efekat za GL2011 i anizomicin i u lipidnom i fosfolipidnom delu spektra. Naime, razlike su bile uočljive za C=O traku lipida i fosfolipida (estri), kao i za C=O traku u bazama nukleinskih kiselina (Malek et al. 2014; Talari et al. 2017; Balan et al. 2019). Uočeno

je i da primena samog anizomicina i GL2011 često ima sličan efekat kao i samo izlaganje jonizujućem zračenju, ali i da se taj efekat gubi kada se lek primeni pre ili posle zračenja.

5.2. PROMENE U GLIJALNIM ĆELIJAMA MOZGA OZRAČENIH PACOVA I TRETIRANIH RADIOPROTEKTOROM GL2011 ILI ANIZOMICINOM

Da bi se pratio ćelijski odgovor na zračenje i radioprotekciju, tkivni preseki mozga su imunohistohemijski obojeni na markere mikroglije i astrocita. Mikroglijalne ćelije su imunske ćelije mozga neophodne za njegovo funkcionisanje. To su glavne ćelijske komponente uključene u urodjenu imunološku odbranu centralnog nervnog sistema (Bachiller et al. 2018). Usled dejstva određenih stimulusa, kao što su zračenje, bakterije ili oksidativni stres, mikroglijalne ćelije postaju aktivirane i dolazi do oslobadjanja pro-inflamatornih citokina i slobodno radikalskih vrsta (Babior 2000; Lull and Block 2010). Morfološke odlike aktivirane mikroglije u mnogim patološkim stanjima su ameboidni oblik tela i povlačenje ćelijskih nastavaka (Lull and Block 2010). Medjutim, protokol zračenja korišćen u ovoj studiji pokazao je da su 30 dana nakon zračenja mikroglijalne ćelije u produženoj moždini pretrpele skromne promene u morfologiji. Uočeno je povlačenje ćelijskih produžetaka, ali bez značajne promene u procentu površine pod mikroglijalnim markerom Iba-1. Pokazano je i da sam radioprotektor GL2011 može smanjiti ekspresiju mikroglijalnog markera Iba-1, što je takodje uočeno prilikom primene GL2011 6 h nakon zračenja, ukazujući na inhibitoran efekat radioprotektora na proliferaciju mikroglije. S druge strane, primena samog GL2011 nije imala efekat na morfologiju mikroglijalnih ćelija, ukazujući na to da radioprotektor nema toksično dejstvo na mikrogliju. Mali volumen ćelijskog tela mikroglije bez ćelijskih produžetaka u grupi životinja sa primenom radioprotektora 6 h nakon zračenja može ukazati na sinergističko delovanje radioprotektora i zračenja.

Kvantitativna analiza imunohistohemijski oslikanih tkivnih preseka je pokazala da aplikacija anizomicina pre ili posle zračenja dovodi do smanjenja procenta Iba-1 pozitivnih piksela za mikrogliju u sve tri praćene moždane regije (somatosenzornom korteksu, Corpus callosumu i produženoj moždini), što ukazuje na pozitivan inhibitorni efekat anizomicina na ćelijsku neuroinflamaciju. U skladu sa ovim rezultatom, Croons et al. (2009) je pokazao da anizomicin smanjuje sadržaj makrofaga u aterosklerotičnim plakovima zečeva aktivacijom p38 MAP kinaze. Strukturne promene bile su uočljive jedino u somatosenzornom korteksu, ali ne i u produženoj moždini i u beloj masi. Različit obrazac ponašanja mikroglije bi mogao biti posledica primenjene doze zračenje, ali i razlike u fenotipu mikroglije u različitim moždanim regijama (Xuan et al. 2019), što dovodi do specifičnog odgovora ovih ćelija na zračenje. Pored toga, neke studije su pokazale da zračenje aktivira mikrogliju pri dozama većim od 10 Gy (Tofilon and Fike 2000; Greene-Schloesser et al. 2012), dok manje doze zračenja mogu dovesti do akutnih (kratkotrajnih), ili ozbiljnih strukturnih promena praćenih demijelinizacijom, vaskularnim poremećajima, gliozom, nekrozom bele mase i kognitivnim oštećenjima tek u kasnijem vremenskom periodu nekoliko meseci do godinu dana od tretmana zračenjem (Ramanan et al. 2008). Takodje, određeni faktori kao što je starost životinje mogu uticati na to kakav će efekat imati zračenje. Alya et al. (2015) je ukazao na to da su Wistar pacovi različite životne dobi različito osetljivi na jonizujuće zračenje. Naime, mlađi pacovi (8-10 nedelja stari) su bili otporniji od starijih (12-14 nedelja stari) na zračenje dozom od 9 Gy. Za ispitivanje radioprotektivnog potencijala anizomicina upotrebljena je doza od 6 Gy kako bi se životni vek eksperimentalnih životinja produžio radi veće dostupnosti uzoraka za analizu.

Astroцити су најбројније глијалне ћелије у централном nervnom sistemu, i imaju važnu ulogu u regulaciji homeostaze, izlučivanju hranljivih materija, metabolizmu neurotransmitera i aminokiselina (Allaman et al. 2011; Schousboe et al. 2014). Zahvaljujući visokom sadržaju antioksidanata, astroцити imaju značajnu ulogu u zaštiti neurona od oksidativnog stresa (Wilson 1997; Bylicky et al. 2018). Produkcijom jedinjenja poput prostaglandina i transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β), astroцити inhibiraju aktivaciju mikroglije i na taj način štite mozak od inflamacije (Park et al. 2012; Vincent and Tilders). Takodje, poznato je da astroцити stvaraju jedinjenja koja indukuju ekspresiju antioksidativnih enzima kao što je hem-oksigenaza 1 koja na taj način inhibira aktivaciju mikroglije (Min 2006).

U ovoj studiji pokazano je da zračenje indukuje povećanje GFAP pozitivnih piksela u svim ispitivanim regijama mozga (somatosenzorni korteks, corpus callosum i produžena moždina), što međutim nije bilo statistički značajno. Takodje, rezultati imunohistohemije nisu pokazali značajan efekat za grupe koje su tretirane zračenjem i radioprotektorima. Neke studije ukazuju da doze iznad 10 Gy indukuju povećanje broja GFAP pozitivnih astroцита, dok niže doze (naročito ispod 8 Gy) ne izazivaju promene u koncentraciji GFAP-a čak ni 30 dana nakon zračenja (Mildenberger et al. 1990; Chiang et al. 1993), što je u skladu sa kvantitativnom analizom imunohistohemijskih snimaka (Kočović et al. 2021; Kočović et al. 2021). U slučaju da životinja preživi zračenje, gliozna se najšće javlja nekoliko meseci ili godinu dana od ozračivanja i kao takva spada u kasne efekte zračenja (Tofilon and Fike 2000; Greene-Schloesser et al. 2012). Primenjeni protokol zračenja celog tela a ne samo predela glave je takodje mogao biti jedan od razloga za ne tako izrazite promene u koncentraciji GFAP-a. Međutim, u pogledu morfoloških promena astroцита, u ozraченоj grupi i u grupi životinja sa radioprotektorom GL2011 apliciranim 30 minuta pre zračenja, uočena je fragmentacija što ukazuje da je ipak došlo do oštećenja astroцита i astroglioze kao uobičajenog odgovora na povredu centralnog nervnog sistema (Li et al. 2019). Nasuprot tome, primena GL2011 radioprotektora 3 h i 6 h posle zračenja nije dovela do takvih promena na astroцитима, što je ukazalo na to da je radioprotektor efikasniji u zaštiti astroцита ako se primeni posle zračenja.

Takodje, nijedan tretaman anizomicinom kao radioprotektorom nije značajno uticao na marker astroцита - GFAP, mada je primećen mali trend smanjenja procenta pozitivnih piksela za GFAP kod eksperimentalne grupe životinja koja je primila samo anizomicin.

S obzirom da sami radioprotektori GL2011 i anizomicin nisu uzrokovali značajne promene mikroglije i astroцита, kao ni u bojenju na gliјалne markere, može se zaključiti da ovi radioprotektori nemaju negativno dejstvo na gliјалne ћелије mozga pacova i da deluju na njihovo očuvanje kod ozračenih životinja.

5.3. PROMENE U PRO-INFLAMATORNIM I ANTI-INFLAMATORNIM CITOKINIMA PLAZME WISTAR PACOVA NAKON IZLAGANJA GAMA ZRAČENJU I RADIOPROTEKCIJI SA GL2011 ILI ANIZOMICINOM

Citokini predstavljaju grupu proteina male molekulske mase 6-70 kDa. Oni nastaju kao produkt različitih imunskih ćelija (leukocita, monocita, makrofaga, fibroblasta) i neophodni su za normalno funkcionisanje imunskog odgovora. To su važni signalni molekuli koji deluju preko receptora u ćeliji ili na ćelijskoj membrani. Transportuju se kroz čitav organizam utičući na funkciju drugih ćelija i organa. Oni posreduju u interakciji između mezenhimskih, epitelnih i imunskih ćelija, što je od značaja za radijaciona ispitivanja (Schau et al. 2012), a samim tim i za ispitivanje dejstva radioprotektivnih supstanci. Mozak i imunski sistem su u dvosmernoj interakciji, što je neophodno

za održavanje homeostaze (Dantzer 2018). Mozak vrši modulaciju imunskog sistema putem autonomnih i neuroendokrinih puteva (Kenney and Ganta 2014). Neurotransmiteri i hormoni oslobođeni ovim nervnim putevima stupaju u interakciju sa imunskim ćelijama menjajući globalno imunsku funkciju, uključujući proizvodnju citokina (Thyaga and Priyanka 2012).

Pro-inflamatorni citokini se brzo oslobađaju nakon zračenja i dovode do nastanka slobodnih radikala kiseonika i azota. Ova pro-inflamatorna faza se održava dugo nakon izlaganja zračenju. Nakon toga dolazi do aktivacije produkcije i anti-inflamatornih citokina koji potom blokiraju funkciju makrofaga i dendritskih ćelija, kao i proliferaciju T-limfocita, menjajući homeostatsku ravnotežu između preživljavanja i ćelijske smrti (Di Maggio et al. 2015). Balansiranje između pro i anti-inflamatornog odgovora može dugo oscilirati nakon zračenja i smatra se kritičnim u određivanju pozitivnog ili negativnog ishoda (Sun et al. 2013). Povećan nivo TNF-a uočeno je nakon zračenja različitih ćelija sisra i čoveka, uključujući alveolarne makrofage kao i ćelije tumora, dok je prekomerna proizvodnja IL-6 i IL-8 opisana u keratinocitima, fibroblastima i ćelijama glioma nakon izlaganja X i UV zracima (Müller and Meineke 2007).

Rezultati ove studije pokazali su kontinuirani porast pro-inflamatornih citokina (IL-6 i TNF- α) u skoro svim grupama koje su bile ozračene i koje su tretirane radioprotektorom GL2011 u različitim režimima pre ili posle zračenja. Važno je istaći da je i primena samog radioprotektora GL2011 indukovala porast IL-6 i TNF- α u skoro svim praćenim vremenskim tačkama. Iako je radioprotektor GL2011 aminotiolno jedinjenje koje primarno deluje kao 'hvatač' slobodnih radikala, stimulatorno dejstvo radioprotektora GL2011 na pro-inflamatorne citokine se može uporediti sa jednom drugom vrstom radioprotektora tzv. imunomodulatorima, među kojima je AS101 (amonijum-trihloro dioksietilen O-O') koji indukuju oslobađanje pro-inflamatornih citokina IL-6, TNF- α i IL-1 i na taj način deluje radioprotektivno (Kalechman et al. 1990). Dakle, pored prethodno objavljenih aminotiolnih mehanizama radijacione zaštite (Okić-Djordjević et al. 2014; Ganesan et al. 2014), u ovoj studiji smo pokazali još jedan mehanizam delovanja GL2011 radioprotektora, pa možemo zaključiti da aminotiolni također mogu delovati i kao modulatori signalnih puteva citokina.

Interleukin 6 (IL-6) je multifunkcionalan citokin sa brojnim funkcijama. On reguliše imunski odgovor, inflamatorne reakcije i hematopoezu (Hirano 1998). Takođe, poznato je da su neki pro-inflamatorni citokini, a među njima IL-6 i TNF-a, visoko zastupljeni u kondicioniranom medijumu ozračene ćelijske linije glioblastoma (Desai et al. 2013).

Primena same radijacije indukovala je povećanje pro-inflamatornog citokina IL-6 prvog i sedmog dana, ali je statistički značajno povećanje bilo detektovano samo 7. dana, što je u skladu sa studijom koja je pratila efekte različitih doza zračenja u kulturi ćelija tokom 7 dana (Meeren et al. 1997). U toj studiji pokazano je da povećanje IL-6 postaje izraženije sa povećanjem doze zračenja, ali i da se maksimum povećanja primećuje tek kasnije nakon zračenja. Naime, sa dozom od 2 Gy plato je dostignut 24 h nakon tretmana, sa dozom od 5 Gy nakon 4 dana, dok je sa 10 Gy maksimum povećanja dostignut 6. dana.

Blago povećanje TNF- α u plazmi ozračenih životinja je detektovano što je u skladu sa tim da zračenje indukuje porast ovog citokina (Cachaço et al. 2010), dok je anti-inflamatorni citokin IL-10 imao trend smanjenja u poredjenju sa kontrolnom CTRL grupom, što bi se moglo uporediti sa studijom na ćelijskoj liniji pneumocita gde je uočeno da radijacija smanjuje koncentraciju IL-10 (Haase et al. 2007).

U poredjenju sa ozračenom grupom životinja, značajan porast nivoa IL-6 i TNF-a istovremeno sa IL-10 zabeležen je u grupi sa radioprotektorom GL2011 primenjenim 3 h nakon zračenja, kao i u grupi gde je GL2011 apliciran 30 minuta pre zračenja ali sa nešto manje izraženim kontinuitetom povećanja ekspresije. Za razliku od prva dva tretmana sa GL2011, radioprotekcija 6 h nakon zračenja pokazala je nešto drugačiji obrazac ponašanja citokina. Naime, IL-6 i TNF-a su bili značajno

povećani prvog i 7. dana u poredjenju sa ozračenom grupom, dok je 28. dana uočen pad IL-6 u poredjenju sa kontrolnom grupom. Porast pro-inflamatornih citokina prvog dana u svim ozračenim grupama kod kojih je primenjen radioprotektor GL2011, kao i prateći porast anti-inflamatornog citokina IL-10 sedmog dana, može ukazati na uspostavljanje balansa između pro-inflamatornog i anti-inflamatornog odgovora, što ukazuje na lekovit efekat GL2011 u svakom vremenu primene nakon zračenja. Vredno je napomenuti da IL-6 može delovati sa IL-10 na translacionom nivou, inhibirajući ekspresiju TNF-a od strane astrocita (Benveniste et al. 1995), što ukazuje da ovi humoralni faktori deluju kao važni regulatori drugih citokina čije delovanje može biti štetno za mozak. Međutim, porast nivoa citokina u uslovima bolesti ili posle zračenja ne mora nužno ukazivati i na medjusobnu inetrakciju citokina, kao i da li je neki citokin uključen u zapaljensko oštećenje nekog tkiva (Schau et al. 2012).

Pro-inflamatorni citokini IL-6 i TNF-a i anti-inflamatorni citokin IL-10 su takodje praćeni u plazmi pacova tretiranih anizomicinom pre ili posle zračenja. Anizomicin je inhibitor sinteze proteina u eukariotskim organizmima, i deluje tako što vezuje i inhibira aktivnost peptidil transferaze 60S ribozomske podjedinice. Zanimljivo je da anizomicin u ćelijama sisara aktivira mitogen-aktivirane proteinske kinaze (MAPK), uključujući JNK, p38 i ERK1/2, a takodje može da modulira i druge signalne puteve (Cano et al. 1994; Hazzalin et al. 1998). Regulacija ekspresije gena je još jedan intrigantan efekat anizomicina s obzirom na to da je u stanju da indukuje degradaciju nekih proteina. Takodje, utiče i na pro- i anti-apoptotičke mehanizme. Činjenica da anizomicin aktivira p38 kinazu koja kontroliše produkciju TNF- α , može objasniti povećanje koncentracije ovog pro-inflamatornog citokina u eksperimentalnoj grupi životinja koja je primila samo anizomicin bez zračenja. MAP kinaze su važni unutarćelijski posrednici prenosa signala koji reaguju na širok spektar stimulusa kao što su hipokasija, osmotski stres, oksidacija, antibiotici i zračenje (Cargnello and Roux 2011). U jednoj studiji na mužjacima pacova pokazano je da anestetik izofluran deluje neuroprotektivno ako se primeni pre ishemije mozga, ali i da nema neuroprotekcije ako se primeni inhibitor p38 kinaza (Zheng and Zuo 2004), što nam može ukazati na to da anizomicin koji aktivira MAP kinaze deluje neuroprotektivno u uslovima stresa i inflamacije putem MAP kinaza. Poznato je i da TNF- α dovodi do pojačane ekspresije IL-6 (Cesaris et al.), pa se tako može objasniti značajno povećanje IL-6 u kasnijim praćenim vremenskim periodima (7. i 28. dana). Pored povećanog nivoa TNF-a i IL-6, IL-10 je takodje bio značajno povećan poslednjeg 28. dana, što je ukazalo na to da se razvio i anti-inflamatorni odgovor kako bi se uspostavio balans sa pro-inflamatornim odgovorom. Tandem IL-6 i IL-10 deluje sinergistički u inhibiciji TNF-a (Benveniste et al. 1995), ali je medjutim TNF-a još uvek bio povećan 28. dana.

Multifunkcionalne karakteristike anizomicina su razlog za veliki broj biohemijskih istraživanja koja se bave ispitivanjem anizomicina. Poznata je i potencijalna terapijska uloga anizomicina, jer on može indukovati apoptozu indukujući povećanu osetljivost malignih ćelija (Slipicevic et al. 2013). Anizomicin je primenjen i u proučavanju pamćenja kod životinja i pokazalo se da inhibira konsolidaciju novih sećanja i izaziva amneziju (Qi and Gold 2009). U ovoj studiji, efekat anizomicina kao potencijalnog radioprotektora postao je očigledan tek sa primenom posle zračenja, naročito u grupi sa radioprotekcijom 6 h nakon zračenja, gde je detektovano povećanje TNF- α koje je bilo značajno prvog i poslednjeg dana praćenja. Slično kao i u grupi sa primenom samog anizomicina, uočeno je povećanje IL-6 i IL-10, što govori o prisustvu anti-inflamatornog odgovora. Isti princip delovanja se može primetiti i kod grupe sa anizomicinom apliciranim 3 h nakon zračenja, ali sa nešto manjim povećanjem pro-inflamatornih citokina i statistički značajnim povećanjem anti-inflamatornog citokina IL-10 poslednjeg dana. S obzirom da je preživljavanje u grupama sa anizomicinom primenjenim posle zračenja bilo 100%, može se zaključiti da anizomicin kao pretpostavljeni aktivator MAP kinaza nije nužno štetan za mozak. Interesantno je, medjutim, da je

preživljavanje u grupi životinja kojima je anizomicin apliciran 30 minuta pre zračenja bilo 75 %, a da nije došlo do značajnih promena u nivou citokina. Ovo ukazuje na moguću interakciju zračenja i primenjenog anizomicina, ali da bi se ova hipoteza potvrdila potrebne su dodatne studije na većem broju životinja.

Aminotiolli su jedinjenja koja mehanizmom eliminacije slobodnih radikala redukuju štetne efekte zračenja. Aminotiolno jedinjenje - amifostin (WR2721) predstavlja jedini lek odobren od Uprave za hranu i lekove (FDA) za primenu u radioterapiji. Međutim, ovo jedinjenje još uvek nije postiglo široku kliničku upotrebu (King et al. 2020), a jedan od razloga za to je da se maksimalna zaštita amifostinom postiže ako se lek primeni u obliku 15-minutne infuzije pre zračenja (Bukowski 1996). Usled polu-života raspodele leka od 0.88 minuta, oko 90 % leka se vrlo brzo eliminiše iz plazme. Studije na miševima ukazale su da je maksimalna koncentracija aktivnog metabolita amifostina (WR1065) u tkivima 10 do 30 minuta nakon intraperitonealne injekcije, što zajedno sa brzom eliminacijom iz organizma, ukazuje da se amifostin mora davati neposredno pre zračenja (Pamujula et al. 2005; Singh and Seed 2019). Pored toga, amifostin je efikasan ako se aplicira u većim koncentracijama, 300-500 mg/kg (Pamujula et al. 2005; Trajković et al. 2007), ali poznato je i da zbog toga izaziva izvesne neželjene efekte kao što su hipotenzija, mučnina i alergijske reakcije (Vardy et al. 2002). U poredjenju sa amifostinom, pokazano je da intraperitonealna aplikacija jedne doze aminotiolnog jedinjenja GL2011 (100mg/kg) ima efekat radioprotekcije ne samo u primeni pre zračenja, već i u primeni na 3 h i 6 h nakon zračenja (Kočović et al. 2021), što ga čini potencijalno dobrim kandidatom za radioterapiju, ali i za primenu u radijacionim nesrećama. Takođe, pokazano je da aminotiol GL2011 nema toksično dejstvo na pacovima čak i ako se primeni u tri doze od 100 mg/kg (Okić-Djordjević et al. 2014; Ganesan et al. 2014).

Radi komparacije sa aminotiolima, u ovoj studiji praćen je i radioprotektivan efekat antibiotika anizomicina. Poslednjih godina potvrđeno je da antibiotici takođe mogu redukovati štetne efekte zračenja (Alok and Chaudhury 2016; Obrador et al. 2020), pa tako tetraciklini i fluorokinoloni eliminišu slobodne radikale i smanjuju dvostruke prekide DNK, povećavajući preživljavanje ozračenih miševa za 87.5 % sa primenom pre zračenja i za 35% sa primenom posle zračenja (Kim et al. 2009). Za razliku od aminotiola i tetraciklina, anizomicin je poznat kao inhibitor sinteze proteina, koji blokira sintezu novih transkripcionih faktora, ali međutim ne blokira ranu transkripciju i RNK sintezu (Fenteany and Morse 1993). U ovoj studiji je pokazano da anizomicin primenjen u jednoj dozi (150 mg/kg) ima sličano dejstvo na preživljavanje ozračenih životinja kao i aminotiol GL2011 (Kočović et al. 2021; Kočović et al. 2021). S druge strane, drastične promene u molekularnim markerima nakon primene samog anizomicina, kao i sa njegovom primenom posle zračenja, ukazale su na to da neželjeni efekti za potencijalno radioprotektivne doze mogu predstavljati ograničavajući faktor za njegovu efikasnost.

6. ZAKLJUČCI

Analizom rezultata prikazanih u ovoj studiji mogu se izvesti sledeći najvažniji zaključci:

1. U pogledu preživljavanja životinja, aminotiolni radioprotektor GL2011 je imao isti efekat kada se primeni pre ili posle zračenja, za razliku od anizomicina koji se pokazao efikasniji u primeni posle zračenja.
2. Ramanska mikrospektroskopija primenjena na tkivnim presecima produžene moždine pacova pokazala je na molekularnom nivou, da oba radioprotektora deluju tako što povećavaju sintezu nukleinskih kiselina nezavisno od vremena aplikacije, što je ukazalo na to da bi mehanizam kojim vrše svoju radioprotektivnu aktivnost mogao biti stabilizacija genetičkog materijala. Takođe, radioprotektori GL2011 i anizomicin su indukovala porast intenziteta spektralnih traka amino kiselina i proteina naročito sa primenom posle zračenja.
3. Analiza FTIR spektara, dobijenih sa sinhrotronskog izvora infracrvenog zračenja, tkivnih preseka produžene moždine pacova je pokazala značajan efekat za oba radioprotektora u oblasti proteina i estara, amida II i asimetričnog fosfata. Primena anizomicina u oba ispitivana seta životinja dovela je do promena u intenzitetima traka za sve naznačene spektralne opsege i sva tri vremena primene, dok je primena GL2011 najveći efekat na trake pokazala pri primeni 3 h nakon zračenja, mada intenzitet trake značajno varira i sa primenom ovog jedinjenja i pre zračenja.
4. Pokazano je da radioprotektori GL2011 i anizomicin ne ispoljavaju negativno dejstvo na glijalne ćelije mozga pacova i deluju na njihovo očuvanje kod ozračenih životinja. GL2011 je uticao na smanjenu infiltraciju mikroglijalnih ćelija produžene moždine naročito ako je primenjen posle zračenja, dok je anizomicin indukovao smanjenje bojenja na mikroglijalni marker Iba-1 u svim ispitivanim moždanim regijama (produžena moždina, somatosenzorni korteks i corpus callosum) nezavisno od vremena primene sa zračenjem.
5. Pokazano je da radioprotektor GL2011 deluje i kao modulator signalnih puteva citokina, što je verovatno i jedan od mehanizama kojim ostvaruje svoju radioprotektivnu ulogu. Balans pro-inflamatornog i anti-inflamatornog odgovora ukazuje na pozitivan efekat radioprotektora GL2011 primenjenog bilo pre ili posle zračenja.
6. Analiza citokina je pokazala da anizomicin ispoljava svoje radioprotektivno dejstvo tek u kasnijim vremenima primene povećanjem nivoa citokina (3 h i 6 h nakon zračenja). U grupi životinja kod kojih je anizomicin primenjen pre zračenja nije došlo do značajnih promena u nivou citokina u plazmi što je ukazalo na moguću desenzibilizaciju indukovanu primenom anizomicina pre zračenja.
7. Primena samog anizomicina indukuje složene promene u pro-inflamatornim citokinima, što zahteva dalja ispitivanja dejstva samog leka na većoj grupi životinja.

7. LITERATURA

- Abbotts R, Wilson DM (2017) Coordination of DNA single strand break repair. *Free Radic Biol Med* 107:228–244.
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2011) Astrocyte–neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34:76–87.
- Alok A, Chaudhury NK (2016) Tetracycline hydrochloride: A potential clinical drug for radioprotection. *Chem Biol Interact* 245:90–99.
- Alya G, Ekhtiar A, Saour G (2015) Effects of lethal dose of γ -radiation and partial body hyperthermia on Wistar rats. *Int J Hyperthermia* 31:460–463.
- American Nuclear Society. (2021)"Types of radiation". [Online]. Available: <https://www.ans.org/nuclear/radiation/>.
- Antebi U, Mathor MB, Ferreira da Silva A, et al (2016) Effects of ionizing radiation on proteins in lyophilized or frozen demineralized human bone. *Rev Bras Ortop* 51:224-30.
- Avendano C, Menendez JC (2015) *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (2nd ed), Elsevier Science.
- Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109:33–44.
- Balan V, Mihai C-T, Cojocaru F-D, et al (2019) Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials* 12:2884.
- Balentova S, Adamkov M (2015) Molecular, Cellular and Functional Effects of Radiation-Induced Brain Injury: A Review. *Int J Mol Sci* 16:27796–27815.
- Barbacid M, Vazquez D (1974) [3H]anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. *J Mol Biol* 84:603–623.
- Basile LA, Ellefson D, Gluzman-Poltorak Z, et al (2012) HemaMaxTM, a Recombinant Human Interleukin-12, Is a Potent Mitigator of Acute Radiation Injury in Mice and Non-Human Primates. *PLoS ONE* 7:e30434.
- Belarbi K, Jopson T, Arellano C, et al (2013) CCR2 Deficiency Prevents Neuronal Dysfunction and Cognitive Impairments Induced by Cranial Irradiation. *Cancer Res* 73:1201–1210.

- Bellinger DL, Millar BA, Perez S, et al (2006) Innervation of lymphoid organs: Clinical implications. *Clin Neurosci Res* 6:3–33.
- Benderitter M, Vincent-Genod L, Pouget JP, Voisin P (2003) The Cell Membrane as a Biosensor of Oxidative Stress Induced by Radiation Exposure: A Multiparameter Investigation. *Radiat Res* 159:471–483.
- Benveniste E-IN, Tang LP, Law RM (1995) Differential regulation of astrocytes TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 AND IL-10. *Int J Devl Neurosci* 13:341-9.
- Betlazar C, Middleton RJ, Banati RB, Liu G-J (2016) The impact of high and low dose ionising radiation on the central nervous system. *Redox Biol* 9:144–156.
- Borges HL, Linden R, Wang JY (2009) DNA damage-induced cell death. *Cell Res* 18:17-26.
- Borodovitsyna O, Joshi N, Chandler D (2018) Persistent Stress-Induced Neuroplastic Changes in the Locus Coeruleus/Norepinephrine System. *Neural Plast* 2018:1–14.
- Brown WR, Thore CR, Moody DM, et al (2005) Vascular Damage after Fractionated Whole-Brain Irradiation in Rats. *Radiat Res* 164:662-668.
- Bukowski RM (1996) Amifostine (Ethyol®): Dosing, administration and patient management guidelines. *Eur J Cancer* 32:S46–S49.
- Bumbrah GS, Sharma RM (2016) Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egypt J Forensic Sci* 6:209–215.
- Bylicky MA, Mueller GP, Day RM (2018) Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2018:1–16.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2014) Protein carbonylation: Proteomics, specificity and relevance to aging: PROTEIN CARBOXYLATION IN AGING. *Mass Spectrom Rev* 33:21–48.
- Cachaço AS, Carvalho T, Santos AC, et al (2010) TNF- α Regulates the Effects of Irradiation in the Mouse Bone Marrow Microenvironment. *PLoS ONE* 5:e8980.
- Cadet J, Douki T, Ravanat J-L (2010) Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med* 49:9–21.
- Cakmak G, Miller LM, Zorlu F, Severcan F (2012) Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: An FTIR microspectroscopic imaging study. *Arch Biochem Biophys* 520:67–73.

- Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC (1994) Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* 14:7352–7362.
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:50–83.
- Carter EA, Tam KK, Armstrong RS, Lay PA (2009) Vibrational spectroscopic mapping and imaging of tissues and cells. *Biophys Rev* 1:95–103.
- Cesaris PD, Starace D, Riccioli A, et al (1998) Tumor necrosis factor - α induces interleukin-6 production and integrin ligand expression by distinct transduction pathways. *J Biol Chem* 273:7566-71.
- Chamberlin J, Story S, Ranjan N, et al (2019) Gram-negative synergy and mechanism of action of alkynyl bisbenzimidazoles. *Sci Rep* 9:14171.
- Chiang CS, McBride WH, Withers HR (1993) Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiother Oncol* 29:60–68.
- Citrin D, Cotrim AP, Hyodo F, et al (2010) Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *The Oncologist* 15:360–371.
- Close DM, Nelson WH, Bernhard WA (2013) DNA Damage by the Direct Effect of Ionizing Radiation: Products Produced by Two Sequential One-Electron Oxidations. *J Phys Chem A* 117:12608–12615.
- Cohen H, Kaplan Z, Matar MA, et al (2006) Anisomycin, a Protein Synthesis Inhibitor, Disrupts Traumatic Memory Consolidation and Attenuates Posttraumatic Stress Response in Rats. *Biol Psychiatry* 60:767–776.
- Collett G, Craenen K, Young W, et al (2020) The psychological consequences of (perceived) ionizing radiation exposure: a review on its role in radiation-induced cognitive dysfunction. *Int J Radiat Biol* 96:1104–1118.
- Corre I, Niaudet C, Paris F (2010) Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat Res Mutat Res* 704:61–67.
- Croons V, Martinet W, Herman AG, et al (2009) The Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin Induces Macrophage Apoptosis in Rabbit Atherosclerotic Plaques through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 329:856–864.

- Dantzer R (2018) Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev* 98:477–504.
- Danzker M, Kessariss ND, Laughlin JS (1959) Absorbed Dose and Linear Energy Transfer in Radiation Experiments. *Radiology* 72:51–61.
- Davies MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 1703:93–109.
- Davis AJ, Chen BPC, Chen DJ (2014) DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair* 17:21–29.
- Desai S, Kumar A, Laskar S, Pandey BN (2013) Cytokine profile of conditioned medium from human tumor cell lines after acute and fractionated doses of gamma radiation and its effect on survival of bystander tumor cells. *Cytokine* 61:54–62.
- Desouky O, Ding N, Zhou G (2015) Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci* 8:247–254.
- Di Maggio F, Minafra L, Forte G, et al (2015) Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm* 12:14.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance. 47.
- Doan PL, Himburg HA, Helms K, et al (2013) Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration after radiation injury. *Nat Med* 19:295–304.
- Dronjak S, Gavrilovic L (2006) Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats. *Braz J Med Biol Res* 39:785–790.
- Duncan Lyngdoh RH, Schaefer HF (2009) Elementary Lesions in DNA Subunits: Electron, Hydrogen Atom, Proton, and Hydride Transfers. *Acc Chem Res* 42:563–572.
- Dunn AJ (2006) Cytokine Activation of the HPA Axis. *Ann N Y Acad Sci* 917:608–617.
- Ember KJI, Hoeve MA, McAughtrie SL, et al. (2017) Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *Npj Regen Med* 2:12.
- Facorro G, Sarrasague MM, Torti H, et al (2004) Oxidative study of patients with total body irradiation: effects of amifostine treatment. *Bone Marrow Transplant* 33:793–798.
- Felger JC, Miller AH (2012) Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: The subcortical source of inflammatory malaise. *Front Neuroendocrinol* 33:315–327.

- Fell VL, Schild-Poulter C (2012) Ku Regulates Signaling to DNA Damage Response Pathways through the Ku70 von Willebrand A Domain. *Mol Cell Biol* 32:12.
- Fenteany G, Morse DE (1993) Specific Inhibitors of Protein Synthesis Do Not Block RNA Synthesis or Settlement in Larvae of a Marine Gastropod Mollusk (*Haliothis rufescens*). *Biol Bull* 184:6–14.
- Ferdinandy P, Schulz R (2001) Inhibition of Peroxynitrite-Induced Dityrosine Formation with Oxidized and Reduced Thiols, Nitric Oxide Donors, and Purine Derivatives. *Antioxid redox Signal* 3:165-71.
- Floersheim GL (1993) Radioprotective Effects of Calcium Antagonists Used Alone or with Other Types of Radioprotectors. *Radiat Res* 133:80–87
- Friedman J (2010) Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? Oxidative stress and free radical damage in neurology, 19-27.
- Friedrich S, Hildebrandt P (2008) Vibrational spectroscopy in life science. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Weinheim.
- Galic MA, Riazi K, Pittman QJ (2012) Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol* 33:116–125.
- Galloway DA, Phillips AEM, Owen DRJ, Moore CS (2019) Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front Immunol* 10:790.
- Ganesan MK, Jovanovic M, Secerov B, et al (2014) Radiation protection from whole-body gamma irradiation (6.7 Gy): behavioural effects and brain protein-level changes by an aminothiol compound GL2011 in the Wistar rat. *Amino Acids* 46:1681–1696.
- Gebicke-Haerter PJ (2001) Microglia in neurodegeneration: Molecular aspects. *Microsc Res Tech* 54:47–58.
- Gee JR, Keller JN (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1145–1150.
- Giovannoni F, Quintana FJ (2020) The role of astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol* 41:805-819.
- Gligorovski S, Strekowski R, Barbati S, Vione D (2015) Environmental Implications of Hydroxyl Radicals ($\cdot\text{OH}$). *Chem Rev* 115:13051–13092.
- Grdina DJ, Kataoka Y, Murley JS (2000) Amifostine: Mechanisms of Action Underlying Cytoprotection and Chemoprevention. *Drug Metabol Drug Interact* 16:4.

- Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, et al (2012) Radiation-induced brain injury: A review. *Front Oncol* 2:73.
- Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, et al (2001) IL-6 Inhibits the Tolerogenic Function of CD8 α ⁺ Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Immunol* 167:708–714.
- Grollman AP (1967) Inhibitors of protein biosynthesis: II. Mode of action of anisomycin. *J Biol Chem* 242:3226-33.
- Gudkov SV, Popova NR, Bruskov VI (2015) Radioprotective substances: History, trends and prospects. *Biophysics* 60:659–667.
- Haase MG, Klawitter A, Geyer P, Baretton GB (2007) Expression of the Immunomodulator IL-10 in Type I Pneumocytes of the Rat: Alterations of IL-10 Expression in Radiation-induced Lung Damage. *J Histochem Cytochem* 55:1167–1172.
- Hall EJ, Giaccia AJ (2012) *Radiobiology for the radiologist*, 7th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hammel M, Yu Y, Fang S, et al (2010) XLF Regulates Filament Architecture of the XRCC4·Ligase IV Complex. *Structure* 18:1431–1442.
- Hammes GG (2005) *Spectroscopy for the biological sciences*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Hazzalin CA, Le Panse R, Cano E, Mahadevan LC (1998) Anisomycin Selectively Desensitizes Signalling Components Involved in Stress Kinase Activation and fos and jun Induction. *Mol Cell Biol* 18:1844–1854.
- Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1780:1217–1235.
- Hirano T (1998) Interleukin 6 and its Receptor: Ten Years Later. *Int Rev Immunol* 16:249–284.
- Hol JW, Stolker RJ, Klimek M, et al (2014) The tryptophan kynurenine pathway, neopterin and IL-6 during vulvectomy and abdominal hysterectomy. *J Biomed Sci* 21:102.
- Holley AK, Miao L, St. Clair DK, St. Clair WH (2014) Redox-Modulated Phenomena and Radiation Therapy: The Central Role of Superoxide Dismutases. *Antioxid Redox Signal* 20:1567–1589.
- Holman H-YN, Martin MC, McKinney WR (2003) Synchrotron-Based FTIR Spectromicroscopy: Cytotoxicity and Heating Considerations. *J Biol Phys* 29:275–286.

- Hong J-H, Chiang C-S, Campbell IL, et al (1995) Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol* 33:619–626.
- Hong S-S, Qian H, Zhao P, et al (2007) Anisomycin protects cortical neurons from prolonged hypoxia with differential regulation of p38 and ERK. *Brain Res* 1149:76–86.
- Hosseinimehr SJ (2007) Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 12:794–805.
- Huang X, Song C, Zhong C, Wang F (2012) Research progress in the radioprotective effect of superoxide dismutase. *Drug Discov Ther* 6:169-77.
- Hubenak JR, Zhang Q, Branch CD et al (2014) Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg* 133:49e-56e.
- Hwang S-Y, Jung J-S, Kim T-H, et al (2006) Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiol Dis* 21:457-67.
- Jafarzadeh N, Mani-Varnosfaderani A, Gilany K, et al (2018) The molecular cues for the biological effects of ionizing radiation dose and post-irradiation time on human breast cancer SKBR3 cell line: A Raman spectroscopy study. *J Photochem Photobiol B* 180:1–8.
- Johnke RM, Sattler JA, Allison RR (2014) Radioprotective agents for radiation therapy: future trends. *Future Oncol* 10:2345–2357.
- Jovanović M, Sećerov B, Bačić G. The potential of in vivo EPR in evaluating free radical reactions in irradiated rats and mechanisms of radioprotection. In: Čupić Ž, Anić S (eds). *Physical Chemistry 2016 (Proceedings)*. Belgrade: Society of Physical Chemists, 2016, 491–4.
- Jurdana M (2008) Radiation effects on skeletal muscle. *Radiol Oncol* 42:15-22.
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ (2020) Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 14:198.
- Kalechman Y, Albeck M, Oron M, et al (1990) Radioprotective effects of the immunomodulator AS101. *J Immunol* 145:1512-7.
- Kany S, Vollrath JT, Relja B (2019) Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* 20:6008.
- Kaur N, Ranjan A, Tiwari V, et al (2012) DMA, a Bisbenzimidazole, Offers Radioprotection by Promoting NFκB Transactivation through NIK/IKK in Human Glioma Cells. *PLoS ONE* 7:17.

- Kenney MJ, Ganta CK (2014) Autonomic Nervous System and Immune System Interactions. In: Terjung R Comprehensive Physiology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 1177–1200.
- Khan S, Adhikari JS, Rizvi MA, Chaudhury NK (2015) Radioprotective potential of melatonin against ^{60}Co γ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci* 22:61.
- Kharisov BI, Kharissova OV (2013) 1 Main Ionizing Radiation Types and Their Interaction with Matter. *Radiat Synth Mater Compd* 26.
- Kharlamov E, Cagnoli CM, Atabay C, et al (2002) Opposite Effect of Protein Synthesis Inhibitors on Potassium Deficiency-Induced Apoptotic Cell Death in Immature and Mature Neuronal Cultures. *J Neurochem* 65:1395–1398.
- Kiang JG, Fukumoto R, Gorbunov NV (2012) Lipid Peroxidation After Ionizing Irradiation Leads to Apoptosis and Autophagy. *Lipid Peroxidation*, 262-278.
- Kim K, Pollard JM, Norris AJ, et al (2009) High-Throughput Screening Identifies Two Classes of Antibiotics as Radioprotectors: Tetracyclines and Fluoroquinolones. *Clin Cancer Res* 15:7238–7245.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
- Kimura H, Ikebuchi M, Nyaruba MM, et al (1994) Effects of combination of immunomodulators and an adrenochrome derivative on survival of irradiated mice. *Int J Radiat Oncol* 29:627–630.
- King M, Joseph S, Albert A, et al (2020) Use of Amifostine for Cytoprotection during Radiation Therapy: A Review. *Oncology* 98:61–80.
- Kishimoto T (2010) IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 22:347–352.
- Kneipp J, Lasch P, Baldauf E, et al (2000) Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1501:189–199.
- Kočović D, Bajuk-Bogdanović D, Maslovarić I, et al (2021) Raman spectral analysis of the brainstem and responses of neuroglia and cytokines in whole-body gamma-irradiated rats after administration of aminothioliol-based radioprotector GL2011. *Arch Biol Sci*, *in press*.
- Kočović DM, Bajuk-Bogdanović D, Pećinar I, et al (2021) Assessment of cellular and molecular changes in the rat brain after gamma radiation and radioprotection by anisomycin. *J Radiat Res*, *in press*.

- Koshiha T, Ballas N, Wong L-M, Theologis A (1995) Transcriptional Regulation of PS-IAA4/5 and PS-IAA6 Early Gene Expression by Indoleacetic Acid and Protein Synthesis Inhibitors in Pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* 253:396–413.
- Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ (2007) Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector 12:738-47.
- Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R (2005) Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 61:1529–1535.
- Krafft C, Schmitt M, Schie IW, et al (2017) Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angew Chem Int Ed* 56:4392–4430.
- Krafft C, Sobottka SB, Schackert G, Salzer R (2004) Analysis of human brain tissue, brain tumors and tumor cells by infrared spectroscopic mapping. *The Analyst* 129:921.
- Krafft C, Steiner G, Beleites C, Salzer R (2009) Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *J Biophotonics* 2:13–28.
- Krishnan RS, Shankar RK (1981) Raman effect: History of the discovery. *J Raman Spec.* 10: 1-8.
- Kudo S, Suzuki Y, Noda S-E, et al (2014) Comparison of the radiosensitivities of neurons and glial cells derived from the same rat brain. *Exp Ther Med* 8:754–758.
- Kumar A, Rinwa P, Kaur G, Machawal L (2013) Stress: Neurobiology, consequences and management. *J Pharm Bioallied Sci* 5:91.
- Kuntiće VS, Stanković MB, Vujić ZB, et al (2013) Radioprotectors - the Evergreen Topic. *Chem Biodivers* 10:1791–1803.
- Kurita H, Kawahara N, Asai A, et al (2001) Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain. *Neurol Res* 23:869–874.
- Lakshmi RJ, Kartha VB, Krishna CM, et al (2002) Tissue Raman Spectroscopy for the Study of Radiation Damage: Brain Irradiation of Mice. *Radiat Res* 157:175–182.
- Langerak P, Russell P (2011) Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:3562–3571.
- Le Caër S (2011) Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* 3:235–253.

- Levin IW, Bhargava R (2005) FOURIER TRANSFORM INFRARED VIBRATIONAL SPECTROSCOPIC IMAGING: Integrating Microscopy and Molecular Recognition. *Annu Rev Phys Chem* 56:429–474.
- Li K, Li J, Zheng J, Qin S (2019) Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis* 10:664.
- Liddel SA, Barres BA (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46:957–967.
- Lima CV, Campos TPR (2016) Kinetics of the expressions of radiation-induced plasma proteins of the cardiac territory in electrophoresis. *J Bras Patol E Med Lab* 52:3.
- Liu C, Lin Q, Yun Z (2015) Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Oxygen-Dependent Radiosensitivity. *Radiat Res* 183:487-96.
- Logie LC, Harris MD, Tatsch RE, van Hooser EN (1960) An Analysis of the LD 50(30) as Related to Radiation Intensity. *Radiat Res* 12:349.
- Louveau A, Da Mesquita S, Kipnis J (2016) Lymphatics in Neurological Disorders: A Neuro-Lympho-Vascular Component of Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease? *Neuron* 91:957–973.
- Louveau A, Herz J, Alme MN, et al (2018) CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nat Neurosci* 21:1380–1391.
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523:337–341.
- Lu L, Li W, Chen L, et al (2019) Radiation-induced intestinal damage: latest molecular and clinical developments. *Future Oncol* 15:35.
- Lull ME, Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7:354–365.
- Lumniczky K, Szatmári T, Sáfrány G (2017) Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front Immunol* 8:517.
- Luo S, Levine RL (2009) Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* 23:464–472.
- Lyngsie G, Krumina L, Tunlid A, Persson P (2018) Generation of hydroxyl radicals from reactions between a dimethoxyhydroquinone and iron oxide nanoparticles. *Sci Rep* 8:10834.

- Lyras L, Perry RH, Perry EK, et al (2002) Oxidative Damage to Proteins, Lipids, and DNA in Cortical Brain Regions from Patients with Dementia with Lewy Bodies. *J Neurochem* 71:302–312.
- Lyubimova N, Hopewell JW (2004) Experimental evidence to support the hypothesis that damage to vascular endothelium plays the primary role in the development of late radiation-induced CNS injury. *Br J Radiol* 77:488–492.
- Madian AG, Regnier FE (2010) Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *J Proteome Res.* 9:3766-3780.
- Maisonneuve E, Ducret A, Khoueiry P, et al (2009) Rules Governing Selective Protein Carbonylation. *PLoS ONE* 4:e7269.
- Malek K, Wood BR, Bambery KR (2014) FTIR Imaging of Tissues: Techniques and Methods of Analysis. In: Baranska M, *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 419–473.
- Marciniak A, Walczyna B, Rajtar G (2015) Tempol, a Membrane-Permeable Radical Scavenger, Exhibits Anti-Inflammatory and Cardioprotective Effects in the Cerulein-Induced Pancreatitis Rat Model. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 4139851.
- Martinelli R, Newton G, Carman CV, et al (2013) Novel role of CD47 in rat microvascular endothelium: signaling and regulation of T cell transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11:2566-76.
- Maurya DK, Devasagayam TPA, Nair CKK (2006) Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effect of natural products. *Indian J Exp Biol* 44:93-114.
- Meeren AVD, Bertho J-M, Vandamme M, Gaugler M-H (1997) Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators Inflamm* 6:185–193.
- Mikkelsen RB, Wardman P (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22:5734-54.
- Mildenberger M, Beach TG, McGeer EG, Ludgate CM (1990) An animal model of prophylactic cranial irradiation: Histologic effects at acute, early and delayed stages. *Int J Radiat Oncol* 18:1051–1060.
- Miller LM, Dumas P (2006) Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1758:846–857.
- Min K-J (2006) Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation. *J Neurosci* 26:1880–1887.

- Montgomery DL (1994) Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Vet Pathol* 31:145–167.
- Morganti JM, Jopson TD, Liu S, et al (2014) Cranial Irradiation Alters the Brain's Microenvironment and Permits CCR2+ Macrophage Infiltration. *PLoS ONE* 9:e93650.
- Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DrI (2008) Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev* 43:134–179.
- Müller K, Meineke V (2007) Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol* 35:96–104.
- Mun G-I, Kim S, Choi E, et al (2018) Pharmacology of natural radioprotectors. *Arch Pharm Res* 41:1033–1050.
- Nair CKK, Parida DK, Nomura T (2001) Radioprotectors in Radiotherapy. *J Radiat Res* 42:21-37.
- Nyström T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24:1311–1317.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. *Methods Mol Biol* 814:23–45.
- Obrador E, Salvador R, Villaescusa JI, et al (2020) Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice. *Biomedicines* 8:461.
- O'Brien JS and Sampson EL (1965) Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res.* 6:537-44.
- Ochi T, Wu Q, Blundell TL (2014) The spatial organization of non-homologous end joining: From bridging to end joining. *DNA Repair (Amst)* 17:98-109.
- Ogilvy-Stuart' AL, Shalet SM (1993) Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 2:109-16.
- Okić-Djordjević I, Trivanović D, Jovanović M, et al (2014) Increased survival after irradiation followed by regeneration of bone marrow stromal cells with a novel thiol-based radioprotector. *Croat Med J* 55:45–49.
- Olive PL (1998) The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. *Radiat Res* 150:S42.
- Pamujula S, Kishore V, Rider B, et al (2005) Radioprotection in mice following oral delivery of amifostine nanoparticles. *Int J Radiat Biol* 81:251–257.

- Papadopoulos P (2008) Friedrich Siebert and Peter Hildebrandt, vibrational spectroscopy in life science: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 978-3-527-40506-0. Colloid Polym Sci 286:487-487.
- Park SJ, Lee JH, Kim HY, et al (2012) Astrocytes, but Not Microglia, Rapidly Sense H₂O₂ via STAT6 Phosphorylation, Resulting in Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin Release. J Immunol 188:5132-5141.
- Pena LB, Azpilicueta CE, Benavides MP, Gallego SM (2012) Protein Oxidative Modifications. In: Gupta DK, Sandalio LM (eds) Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 207-225.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian J Clin Biochem 30:11-26.
- Phatnani H, Maniatis T (2015) Astrocytes in Neurodegenerative Disease: Table 1. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a020628.
- Pimblott SM, Milosavljevic BH, LaVerne JA (2005) Radiolysis of Aqueous Solutions of 1,1- and 1,2-Dichloroethane. J Phys Chem A 109:10294-10301.
- Podadera P, Sabato SF (2007) Radiation effect on sucrose content of inverted sugar. Int Nucl Atl Conf - INAC, Brasil.
- Poole LB, Nelson KJ (2008) Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. Curr Opin Chem Biol 12:18-24.
- Qi Z, Gold PE (2009) Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: Contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. Learn Mem 16:308-314.
- Qiao C-K, Wei J-W, Chen L (2021) An Overview of the Compton Scattering Calculation. Crystals 11:525.
- Quan N (2008) Immune-To-Brain Signaling: How Important are the Blood-Brain Barrier-independent Pathways? Mol Neurobiol 37:142-152.
- Quintiliani M (1979) Modification of radiation sensitivity: The oxygen effect. Int J Radiat Oncol 5:1069-1076.
- Rainbow TC, Hoffman PL, Flexner LB (1980) Studies of memory: A reevaluation in mice of the effects of inhibitors on the rate of synthesis of cerebral proteins as related to amnesia. Pharmacol Biochem Behav 12:79-84.

- Ramanan S, Kooshki M, Zhao W, et al (2008) PPAR α ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF- κ B and AP-1 pathways. *Free Radic Biol Med* 45:1695–1704.
- Ramírez-Cahero HF, Valdivia-López MaA (2018) Effect of gamma radiation on sugars and vitamin C: Radiolytic pathways. *Food Chem* 245:1131–1140.
- Reisner LA, Cao A, Pandya AK (2011) An integrated software system for processing, analyzing, and classifying Raman spectra. *Chemom Intell Lab Syst* 105:83–90.
- Reisz JA, Bansal N, Qian J, et al (2014) Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal* 21:260–292.
- Riehl T, Cohn S, Tessner T, et al (2000) Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. *Gastroenterology* 118:1106–1116.
- Riley PA (1994) Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *Int J Radiat Biol* 65:27–33.
- Rudy JW (2006) Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. *Learn Mem* 13:1–3.
- Salvi V, Sozio F, Sozzani S, Del Prete A (2017) Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Front Aging Neurosci* 9:148.
- Schaue D, Kachikwu EL, McBride WH (2012) Cytokines in Radiobiological Responses: A Review. *Radiat Res* 178:505–523.
- Schindler MK, Forbes ME, Robbins ME, Riddle DR (2008) Aging-Dependent Changes in the Radiation Response of the Adult Rat Brain. *Int J Radiat Oncol* 70:826–834.
- Scholes G, Ward JF, Weiss J (1960) Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids. *J Mol Biol* 2:379–391.
- Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, et al (2014) Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. In: Parpura V, Schousboe A, Verkhratsky A (eds) *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain*. Springer International Publishing, Cham, pp 13–30.
- Schweri MM, Carr LA (1982) Effects of amino acid alterations caused by protein synthesis inhibitors on brain monoamine formation. *Neuropharmacology* 21:839–845.
- Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA (2020) DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:698–714.

- Shao L, Luo Y, Zhou D (2014) Hematopoietic Stem Cell Injury Induced by Ionizing Radiation. *Antioxid Redox Signal* 20:1447–1462.
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233:6425–6440.
- Sharp CD, Jawahar A, Warren AC, et al (2003) Gamma Knife Irradiation Increases Cerebral Endothelial Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 and E-selectin. *Neurosurgery* 53:154–161.
- Singh VK, Seed TM (2019) The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome. *Expert Opin Drug Saf* 18:1077–1090.
- Slipicevic A, Øy GF, Rosnes AKR, et al (2013) Low-dose anisomycin sensitizes melanoma cells to TRAIL induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* 14:146–154.
- Smith TA, Kirkpatrick DR, Smith S, et al (2017) Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *J Transl Med* 15:232.
- Smith E, Dent G (2005) *Modern Raman Spectroscopy - A practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd, England.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 119:7–35.
- Stanković J (1997) *Osnovi radiološke fizike u radioterapiji*, Fakultet za Fizičku hemiju, Beograd.
- Stuart BH (2004) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*: Stuart/Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Sun Y, Cheng M-K, Griffiths TRL, et al (2013) Inhibition of STAT Signalling in Bladder Cancer by Diindolylmethane - Relevance to Cell Adhesion, Migration and Proliferation. *13:57-68*.
- Surova O, Zhivotovsky B (2013) Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32:3789–3797.
- Symons MCR, Taiwo FA (1992) Radiation damage to proteins: an electron paramagnetic resonance study. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 1413.
- Swanson LW (1998) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, 2nd edn. Amsterdam: Elsevier Science, pp, 45–191.
- Talari ACS, Martinez MAG, Movasaghi Z, et al (2017) Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev* 52:456–506.

- Thameem Dheen S, Kaur C, Ling E-A (2007) Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Curr Med Chem* 14:1189–1197.
- Thyaga SR, Priyanka HP (2012) Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: relevance to health and diseases. *Ann Neurosci* 19:40-6.
- Tofilon PJ, Fike JR (2000) The Radioresponse of the Central Nervous System: A Dynamic Process. *Radiat Res* 153:357–370.
- Trajković S, Dobrić S, Jačević V, et al (2007) Tissue-protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58:39–43.
- Turner JE (2005) Interaction of ionizing radiation with matter. *Health Phys* 88:520-44.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1843:2563–2582.
- Van der Veen SJ, Ghobadi G, de Boer RA, et al (2015) ACE inhibition attenuates radiation-induced cardiopulmonary damage. *Radiother Oncol* 114:96–103.
- Varanda EA, Tavares DC (1998) Radioprotection: Mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *J Venom Anim Toxins* 4:5–21.
- Vardy J, Wong E, Izard M, et al (2002) Life-threatening anaphylactoid reaction to amifostine used with concurrent chemoradiotherapy for nasopharyngeal cancer in a patient with dermatomyositis: a case report with literature review. *Anticancer Drugs* 13:327–330.
- Vasin MV (2014) Comments on the mechanisms of action of radiation protective agents: basis components and their polyvalence. *SpringerPlus* 3:414.
- Verkhatsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98:151.
- Verma SP (1986) Low Levels of Irradiation Modify Lipid Domains in Model Membranes: A Laser Raman Study. *Radiat Res* 107:183.
- Vincent VA, Tilders FJH, Van Dam AM (1997) Inhibition of Endotoxin-Induced Nitric Oxide Synthase Production in Microglial Cells by the Presence of Astroglial Cells: A Role for Transforming Growth Factor b. *Glia* 19:190-8.
- Wanisch K, Wotjak CT (2008) Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem* 90:485–494.
- Ward JF (1998) Nature of Lesions Formed by Ionizing Radiation. DNA damage and repair pp 65-84.

- Wilson CM, Gaber MW, Sabek OM, et al (2009) Radiation-Induced Astrogliosis and Blood-Brain Barrier Damage Can Be Abrogated Using Anti-TNF Treatment. *Int J Radiat Oncol* 74:934–941.
- Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1149-63.
- Winick H, Bienenstock A (1980) Synchrotron Radiation Research. *Annual Rev Nucl and Particle Sci* 28:33-113.
- Wong-ekkabut J, Xu Z, Triampo W, et al (2007) Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophys J* 93:4225–4236.
- Xuan F-L, Chithanathan K, Lilleväli K, et al (2019) Differences of Microglia in the Brain and the Spinal Cord. *Front Cell Neurosci* 13:504.
- Yamakura F, Ikeda K (2006) Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* 14:152–161.
- Yang I, Han SJ, Kaur G, et al (2010) The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 17:6–10.
- You P, Xing F, Huo J, et al (2013) In vitro and in vivo evaluation of anisomycin against Ehrlich ascites carcinoma. *Oncol Rep* 29:2227–2236.
- Zheng S, Zuo Z (2004) Isoflurane Preconditioning Induces Neuroprotection against Ischemia via Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol Pharmacol* 65:1172–1180.

Biografija

Dušica Kočović je rođena 16. septembra 1987. godine u Užicu. Osnovnu školu „Dušan Jerković” završila je 2002. godine. Nakon toga pohađala je „Užičku Gimnaziju“ koju 2006. godine završava sa odličnim uspehom. Na Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se školske 2006/07. godine. Osnovne akademske studije, program Opšta biologija završila je u februaru 2012. godine. Diplomski rad pod naslovom „Embriionalno razviće čoveka” uradila je na Katedri za dinamiku razvića životinja Instituta za zoologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i odbranila ga sa ocenom 10. Školske 2013/14. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, modul Neurobiologija – Neurofiziologija od ćelije do ponašanja. Od januara 2014. godine zaposlena je na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao istraživač-pripravnik na projektu MPNTR Republike Srbije br. III41005: „Biomarkeri u neurodegenerativnim i malignim procesima“. U januaru 2017. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik na Institutu za fiziologiju i biohemiju „Ivan Djaja”, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je i na projektu „Horizon2020”, kao i na „Koneksin projektu” sa Uconn Health univerzitetskom klinikom u SAD. Autor je četiri rada, jednog rada kategorije M14, zatim M21, kao i jednog rada kategorije M22 i M23. Autor je i 4 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i 2 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64).

Rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radovima:

1. Kočović DM, Bajuk-Bogdanović D, Maslovarić I, Božić Nedeljković B, Andjus PR, Daković M (2021) Raman spectral analysis of the brainstem and responses of neuroglia and cytokines in whole-body gamma-irradiated rats after administration of aminothiol-based radioprotector GL2011. *Arch Biol Sci. In press.* <https://doi.org/10.2298/ABS210129011K>
2. Kočović DM, Bajuk-Bogdanović D, Pećinar I, Božić Nedeljković B, Daković M, Andjus PR (2021) Assessment of cellular and molecular changes in the rat brain after gamma radiation and radioprotection by anisomycin. *J. Radiat. Res. In press.* <https://doi.org/10.1093/jrr/rrab045>

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Душица М. Кочовић**

број индекса **Б3030/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Употреба Раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу”.

- 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 **Душица М. Кочовић**

Број индекса **Б3030/2013**

Студијски програм **Биологија – Неурофизиологија од ћелије до понашања**

Наслов рада **“Употреба Раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу”**.

Ментор **Проф. др. Павле Р. Анђус**

Потписани/а **Душица М. Кочовић**

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 доктор 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:

“Употреба Раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу”.

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.