



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**RADIOBIOLOŠKI EFEKTI NISKIH PRE-  
IRADIJACIONIH DOZA JONIZUJUĆEG ZRAČENJA  
NA HUMANE ĆELIJSKE LINIJE HT29 I MRC5**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori: Prof. dr Marko Erak

Kandidat: Igor Đan

Dr Gordana Bogdanović

Novi Sad, 2016.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Igor Đan
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Marko Erak, redovni profesor Dr Gordana Bogdanović, viši naučni saradnik
Naslov rada: NR	Radiobiološki efekti niskih pre-iradijacionih doza jonizujućeg zračenja na humane ćelijske linije HT29 i MRC5
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Srbija, 21000 Novi Sad, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9/ stranica 104/ slika 33/ referenci 206/ priloga 0)
Naučna oblast: NO	medicina

Naučna disciplina: ND	onkologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Radiobiologija; Radioterapija; Neoplazme; Doziranje radioterapije; Efekti radioterapije; Čelijska linija; Tumorska čelijska linija; Apoptoza; Preživljavanje ćelija; Ishod terapije
UDK	615.849.06:577.34
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Radioterapija (RT) je jedan od najvažnijih modaliteta lečenja solidnih malignih tumora i koristi je više od 50% pacijenata (52,3%) sa malignim tumorima. Nauka koja proučava efekte elektromagnetnog zračenja na biološke sisteme naziva se radiobiologija. Radiobiologija se fokusira na odgovor ćelija, tkiva i organizma kao celine na jonizujuće zračenje i proučava mehanizme radiobiološkog odgovora. Izlaganje ćelija niskim dozama JZ koje su nakon određenog vremenskog intervala praćene uobičajenim radioterapijskim dozama naziva se radioadaptivno zračenje. Adaptivni odgovor u sebi može da sadrži nekoliko fenomena: hiperradiosenzitivaciju/radiorezistenciju, "bystander" efekat i radioadaptivni efekat u užem smislu. O molekularnim mehanizmima koji stoje iza navedenih efekata ne zna se dovoljno. U ovom radu ispitivan je odgovor malignih i zdravih ćelija na različite modalitete jonizujućeg zračenja u cilju boljeg poznavanja puteva ćelijske smrti i preživljavanja. Potpuno razumevanje molekularnih puteva koji vode u apoptozu ili u preživljavanje ćelija nakon izlaganja jonizujućem zračenju moglo bi koristiti u iznalaženju novih i efikasnijih strategija i modaliteta lečenja malignih tumora u cilju njihove potpune eradikacije. U istraživanju su korištene dve humane ćelijske linije ćelijska linija humanog kolorektalnog karcinoma HT-29 i ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća MRC-5. Čelije su zračene u dva režima različitim pre-iradijacionim dozama (0,03; 0,05 i 0,07Gy) i istom kurativnom dozom (2Gy) tokom 4 dana.</p>

	<p>Višekratna primena niskih doza JZ nije značajno smanjila vijabilnost HT-29 ćelija, dok su dve radioadaptivne doze (0,05+2Gy i 0,07+2Gy), adekvatne doze JZ za radioterapijski postulat poštede zdravih ćelija i bolji antitumorski efekat u odnosu na neradioadaptivno zračenje od 2Gy u toku 4 dana. Pokazana je mogućnost modulisanja ćelijskog odgovora na JZ uz pomoć niskih doza JZ koje su praćene dozom od 2Gy (radioadaptivni tip zračenja) u oba dizajnirana režima zračenja. Stepenn oštećenja hromozoma za većinu isporučenih doza pokazao dozno zavisni trend. Dozno-zavisno oštećenje naslednog materijala izazvano radioadaptivnim zračenjem potvrđuje hipotezu da je stepenn oštećenja zdravih, MRC-5, ćelija manji nego u ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma. Fragmentacija DNK je zabeležena za pojedine doze JZ u obe ćelijske linije, a uočena je i razlika u odgovoru zdrave i tumorske ćelijske linije. Detekcijom mutacija primarne sekvence fragmenta p53 gena pokazano je da se broj mutacija povećava sa povećanjem doze JZ. Oba režima radioadaptivnog zračenja, u obe ćelijske linije izazivaju viši nivo ekspresije p53. Ekspresija p38 MAPK proteina u HT-29 ćelijama bila je niža za sve isporučene doze JZ u odnosu na nezračene ćelije. U MRC-5 ćelijama, povišena ekspresija p38 MAPK utvrđena je samo u uzorcima koji su jednokratno primili samo niske doze JZ i dozu od 2Gy dnevno tokom 4 dana, u odnosu na nezračenu kontrolu. Razlike u ekspresiji ispitivanih proteina dobijene nakon primene dva režima radioadaptivnog zračenja posledica su delovanja niskih pre-iradijacionih doza JZ na modulisanje radiobiološkog odgovora obe ćelijske linije. Nivo ekspresije Bcl-2 i Bax proteina i njihov međusobni odnos, u obe ćelijske linije, su odraz različitog radiobiološkog odgovora ispitivanih ćelija koji zavisi od primenjenog režima zračenja.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	15.09.2014.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član:</p>
---	--

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
MEDICAL FACULTY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Igor Đan
Mentor: MN	Prof. dr Marko Erak Dr Gordana Bogdanoović
Title: TI	Radiobiological effects of low-dose pre-irradiation on human cell lines HT29 and
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Publication place: PP	Novi Sad
Physical description: PD	(number of chapters 9/ pages 104/ figures 33/ references 206/ appendix 0)
Scientific field SF	medicine
Scientific discipline SD	oncology
Subject, Key words SKW	Radiobiology; Radiotherapy; Neoplasms; Radiation Dosage; Radiation Effects; Cell Line; Cell Line, Tumor; Apoptosis; Cell Survival; Treatment Outcome

UC	615.849.06:577.34
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note:	
Abstract: AB	<p>Radiotherapy (RT) is one of the most important treatment modality for solid malignant tumors and it is applied in more than 50% of the patients (52.3%). Radiobiology is scientific discipline which studies the effects of electromagnetic irradiation on biological systems. Radiobiology focuses on the response of the cells, tissues and the organism as a whole to ionizing radiation and studying the mechanisms of radiobiological response. Exposure of cells to low-dose irradiation (priming dose) followed by challenging doses is called radioadaptive radiation. Adaptive response is described as several phenomena: hyperradiosensitivity / radiorezistence, "bystander" effect and radioadaptive effect in sensu stricto. Molecular mechanisms underlying the above effects are not sufficiently known. In this study, the response of malignant and healthy cells on various modalities of ionizing radiation is explored in order to improve knowledge of pathways of cell death and survival. Fully understanding the molecular pathways leading to apoptosis or cell survival after exposure to ionizing radiation may be used in finding new and more effective strategies and modalities for the treatment of malignant tumors. The study used two human cell lines: human colorectal cancer HT-29 cell line and the human fetal lung fibroblast MRC-5. The cells were irradiated in two modalities using different pre-irradiation doses (0.03, 0.05 and 0.07Gy) and the same challenging dose (2Gy) for 4 days. Everyday use of low-dose did not significantly reduce the viability of HT-29 cells, while two radioadaptive doses (0.05 + 2Gy and 0.07+2Gy), are adequate doses for sparing healthy cells with better anti-tumor effects. The possibility of modulating the cellular response to the ionizing radiation was shown using low-doses followed by 2Gy (radioadaptive</p>

	<p>radiation) in both designed regimes of radiation. The level of chromosomal damage showed a dose-dependent trend. Dose-dependent damage to the genetic material caused by radiation confirms the hypothesis that the degree of damage to MRC-5 cells is smaller than the HT29 cells. DNA fragmentation differed between HT29 and MRC-5 cells. Detection of mutations in p53 gene fragment sequence increased with increasing doses. Both irradiation modalities, in both cell lines induce a higher level of p53 expression. Expression of p38 MAPK protein in the HT-29 cells was lower for all delivered doses compared to nonirradiated. In MRC-5 cells, increased expression of the p38 MAPK was found only in the samples that had only received on first day low-doses compared to the control nonirradiated cells. Differences in the expression of the tested proteins reflect different molecular mechanisms activated in normal and tumor cells. The level of Bcl.2 and Bax expression also reflected different radiobiological responses between normal and tumor cells, which depended on the applied irradiation regime.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>15.09.2014</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>



*Zahvaljujem se mojoj mentorki dr Gordani Bogdanović za sveobuhvatnu pomoć tokom rada na doktorskoj disertaciji. Hvala za energiju, pažnju, savete i podršku koju mi je pružila u toku izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se mom mentoru prof. dr Marku Eraku na pažnji, savetima i korisnim sugestijama u toku izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se članovima Komisije na posvećenom vremenu i pažnji.*

*Zahvaljujem se Slavici, Vesni, Višnji i Dimčetu na nesebičnoj pomoći u toku eksperimentalnog dela istraživanja, i svim kolegama koji su mi pomogli u fazi zračenja ćelija.*

*Zahvaljujem se doc. dr Borislavi Petrović na savetima u vezi planiranja i dizajniranja eksperimenata.*

*Zahvaljujem se mojoj profesionalnoj kući, Institutu za onkologiju Vojvodine, na potpunoj moralnoj i logističkoj podršci u izradi doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svim članovima moje porodice, za poverenje, podršku i pomoć.*

*Posebnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima koji su verovali u mene.*

*Mojoj Mimi, bez koje ne bih mogao da završim doktorsku disertaciju, zahvaljujem na pomoći oko eksperimentalnog dela istraživanja, savetima u toku pisanja i kritičkom osvrtu koji je doprineo da ova disertacija bude potpuna.*

*Mojoj deci, Nikoli i Anđeli, posvećujem ovaj rad.*

*Igor Đan*

# SADRŽAJ

1. UVOD	12
2. PREGLED LITERATURE	15
2.1. Radiobiološki odgovor na niske doze zračenja	15
2.1.1. Radioadaptivno zračenje	15
2.1.2. Hiperradiosenzitivnost i povećana radiorezistencija	17
2.2. Molekularni mehanizmi radioadaptivnog odgovora pri niskim dozama zračenja	18
2.2.1. p53 signalni put	19
2.2.2. Apoptotski signalni put	20
2.2.3. PARP signalni put	26
2.2.4. p38 MAPK signalni put	27
3. CILJ RADA	30
4. RADNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	31
5. MATERIJAL I METODE RADA	32
5.1. Čelijske linije	32
5.2. Metode rada	32
5.2.1. Tretman čelijskih linija	32
5.2.2. MTT test	35
5.2.3. Test mikronukleusa	36
5.2.4. Fragmentacija DNK	37
5.2.5. Određivanje sekvenci p53 gena	38
5.2.6. Western Blot	39
5.3. Statistička obrada podataka	41
6. REZULTATI	42
6.1. Uticaj različitih režima zračenja na preživljavanje ćelija	42
6.2. Uticaj različitih režima zračenja na oštećenje hromozoma	50
6.3. Uticaj različitih režima zračenja na integritet DNK	56
6.4. Uticaj različitih režima zračenja na p53 gen	58
6.5. Uticaj različitih režima zračenja na ekspresiju proteina	59
6.5.1. Uticaj različitih režima zračenja na ekspresiju proteina kod HT-29 čelijske linije	61

6.5.2. Uticaj različitih režima zračenja na ekspresiju proteina kod MRC-5 ćelijske linije	68
7. DISKUSIJA	75
8. ZAKLJUČAK	87
9. LITERATURA	91

# 1. UVOD

Maligni tumori spadaju u vodeće uzroke smrti ljudi u industrijski razvijenim zemljama. Prema podacima Internacionalne agencije za istraživanje raka (IARC) u 2011. godini je od 12,7 miliona obolelih od malignih tumora umrlo oko 7,6 miliona [1,2].

Radioterapija (RT) je jedan od najvažnijih modaliteta lečenja solidnih malignih tumora i koristi je više od 50% pacijenata (52,3%) sa malignim tumorima [3]. Primarni cilj radioterapijskog tretmana je izbalansiran odnos delovanja jonizujućeg zračenja (JZ) na tumorsko tkivo uz minimalno oštećenje zdravog tkiva [4,5]. Ovaj cilj radioterapije postiže se primenom različitih radioterapijskih tehnika i režima frakcionisanja.

U poslednjih nekoliko decenija razvoj novih tehnologija doveo je do značajnog napretka i u tehnikama radioterapije što je omogućilo da se zračenje isporučuje s većom preciznošću. Devedesetih godina prošlog veka 2D radioterapijsku tehniku zamenila je 3D konformalna tehnika. Početkom i sredinom prve dekade 2000-tih pojavljuje se intenzitet-modulisana radioterapija (IMRT), a dalji napredak vodio je ka imidžing vođenoj RT (IGRT) gde su margine ciljnih volumena manje, a isporuka jonizujućeg zračenja je još preciznija. Stereotaktična radioterapija omogućava da se sa visokom preciznošću isporučuje nekoliko frakcija sa dozama i do 20Gy po frakciji [6,7,8,9,10].

U toku radioterapije planirana doza jonizujućeg zračenja se isporučuje u frakcionisanim režimima. Primenom frakcionisanih režima pojačava se već postojeća prednost zdravog tkiva u odnosu na tumor u pogledu preživljavanja. Proliferativna aktivnost zdravih ćelija je sporija od proliferativne aktivnosti tumorskog tkiva i ta činjenica, uz podeljenu ukupnu dozu zračenja na više frakcija, omogućava popravljavanje oštećenja pre replikacije ćelije [6]. Nauka koja proučava efekte elektromagnetnog zračenja na biološke sisteme naziva se radiobiologija. Radiobiologija se fokusira na odgovor ćelija, tkiva i organizma kao celine na jonizujuće zračenje i proučava mehanizme radiobiološkog odgovora.

Jonizujuće zračenje, kao deo elektromagnetnog spektra zračenja, deluje na biološke sisteme na direktan i indirektan način. Glavna meta interakcije jonizujućeg

zračenja i ćelije je DNK i stoga je glavno oštećenje ćelije nakon interakcije sa JZ oštećenje DNK [11]. Indirektno dejstvo JZ ispoljava se kada se JZ apsorbuje u medijumu kroz koji prolazi. U toku prolaska kroz tkivo i ćelije predaje energiju i proizvodi brze elektrone izazivajući Komptonov fotoelektrični efekat kao i efekat produkcije para pozitron – elektron [12]. Indirektno delovanje JZ izaziva jonizaciju atoma što dovodi do razbijanja hemijskih veza i konsektivno do oštećenja važnih biomolekula. Jonizujuće zračenje može da dovede do oštećenja DNK, tačkastih mutacija, hromozomskih aberacija, promene ekspresije proteina, poremećaja u ćelijskom ciklusu, proliferaciji ćelija, ubijanju ćelija itd. Ćelijska oštećenja nastala putem indirektnog delovanja jonizujućeg zračenja veća su nego u slučaju direktnog delovanja JZ. Radiobiologija pomaže boljem razumevanju odgovora zdravih i tumorskih ćelija i tkiva na jonizujuće zračenje [5,13]. Istraživanje radiobiološkog odgovora može pomoći da shvatimo koji su signalni putevi uključeni nakon isporuke JZ na ćelije, odnosno da li postoji ekspresija pojedinih gena i proteina. Takođe je moguće otkriti i promene u strukturi gena [14].

Radioterapijski odgovor može se pojačati pomoću hemioterapeutika i drugih supstanci koje imaju radiosenzitivni efekat. Zdravo tkivo se može dodatno zaštititi korišćenjem radioprotektora. Međutim, i pored naprednih radioterapijskih tehnika i korišćenja radiosenzitivnih i radioprotektivnih supstanci i dalje, u velikom broju slučajeva, zdravo tkivo koje okružuje tumor dobija veliku dozu zračenja. Ovaj problem bi se, potencijalno, mogao prevazići upotrebom niskih doza JZ koje imaju sposobnost modulisanja odgovora na radioterapiju i zdravog i tumorskog tkiva

Radiobiološki efekti zavise od doze jonizujućeg zračenja [15]. Izlaganje ćelija niskim dozama JZ koje su nakon određenog vremenskog intervala praćene uobičajenim radioterapijskim dozama naziva se radioadaptivno zračenje. Adaptivna doza može da se isporuči na ciljni volumen pre jednokratne doze JZ ili doze podeljene u više dnevnih frakcija. Adaptivni odgovor u sebi može da sadrži nekoliko fenomena: hiperradiosenzitaciju/radiorezistenciju, “bystander” efekat i radioadaptivni efekat u užem smislu [16]. O molekularnim mehanizmima koji stoje iza navedenih efekata ne zna se dovoljno. Unazad oko deset godina rađene su studije koje su imale za cilj da prošire znanje o fenomenu radioadaptivnog odgovora [17-38]. Dosadašnje studije su pokazale da niske doze jonizujućeg zračenja imaju značajan uticaj na modulisanje odgovora ćelija i tkiva nakon delovanja JZ [39-41].

Istraživanja koja mogu da rasvetle mehanizme delovanja niskih doza JZ (radioadaptivni odgovor, hiperradiosenzitivacija /radiorezistencija) na tumorske i zdrave ćelije i tkiva su u žiži naučne javnosti u poslednjih nekoliko godina. Naučni doprinos u pravcu otkrivanja preciznih mehanizama radiobiološkog odgovora na niske doze JZ može biti od velike koristi u lečenju karcinoma. Mogućnosti su velike i mogu se grubo podeliti na korist od potencijalne radiosenzitivacije ili hemosenzitivacije. Ključnu ulogu u oba procesa igraju niske doze JZ. Ispitivanja na ćelijskim linijama su veoma bitna jer na osnovu dobijenih rezultata mogu da se dizajniraju istraživanja na animalnom modelu kao i kliničke studije. Svaki napredak u smislu boljeg razumevanja radiobiološkog odgovora tumorskih i zdravih ćelija i tkiva može biti značajan u lečenju karcinoma.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Radiobiološki odgovor na niske doze zračenja

#### 2.1.1. Radioadaptivno zračenje

Radioadaptivni fenomen je prvi opisao Olivieri 1984. godine [42] u eksperimentima na limfocitima iz periferne krvi koji su primili nisku pre-iradijacionu adaptivnu dozu radioaktivnog timidina u dozi od 3,7kBq/ml nakon čega je sledila doza od 1,5Gy. Oliveiri je nakon pre-iradijacione doze detektovao niži nivo hromozomskih aberacija za 50% u poređenju sa isporučenom dozom od 1,5Gy. Poznato je da odgovor limfocita u pogledu indukcije adaptivnog odgovora može biti različit [43]. Sawant i sar. [44] su pokazali da niske doze gama zračenja izazivaju adaptivni odgovor kod ćelijske linije fibroblasta miša. Radioadaptivni odgovor zavisi od ćelijske linije i dizajna eksperimenta [36,45-49].

Poznato je da oštećenje DNK može da nastane nakon direktnog i indirektnog deleovanja JZ [5]. Indirektno delovanje JZ temelji se na stvaranju različitih reaktivnih produkata, slobodnih radikala, uključujući i reaktivne vrste kiseonika (ROS) koji nastaju radiolizom vode. Slobodni radikali mogu delovati na važne biomolekule kao što su DNK, proteini i lipidi. U interakciji sa biomolekulima mogu nastati novi biološki posrednici koji takođe mogu reagovati sa DNK i dodatno je oštetiti [50].

U *in vitro* istraživanjima testirani su mnogi biološki efekti niskih doza JZ. Kim i sar. [51] navode da niske doze JZ utiču na različite ćelijske funkcije, a prvenstveno na proliferaciju ćelija. Na odgovor ćelije nakon izlaganja niskim dozama JZ utiču i doza zračenja i brzina isporuke doze (*engl.* dose rate) [26,52]. Adaptivni odgovor dobijen nakon zračenja niskim dozama delimično je uslovljen delovanjem kiseoničnih reaktivnih vrsta (ROS) koji u ćeliji podstiču proizvodnju antioksidanata i/ili poboljšavaju sisteme za popravku DNK. Takođe, ROS mogu indukovati višestruke lezije u DNK koje mogu rezultirati multiplim lokalizovanim promenama: oštećenjima azotnih baza, jednolančanim i dvolančanim prekidima

DNK, ukrštenim vezama DNK-DNK i DNK-protein [50,53-56]. Mitchel i sar. [57] su pokazali da nivo doze potreban da se izazove adaptivni odgovor zavisi od tipa tumora, a da prag doze za radioadaptivni odgovor zavisi od tipa tkiva [57]. Podaci iz literature, dobijeni na humanom i animalnom modelu, pokazuju da se radioadaptivni odgovor javlja i nakon doza koje su niže od 0,01Gy. Važno je napomenuti da se radioadaptivni odgovor može javiti i nakon ekspozicije niskim dozama zračenja u profesionalnim uslovima [58]. Takođe, ovaj fenomen se može javiti i kod pacijenata koji su tretirani sa  $J^{131}$  [59]. Ito i sar. [60] u studiji na C57Bl/6 miševima navode da adaptivni odgovor nastao nakon niske pre-iradijacije (*engl.* priming) doze od 0,05Gy može da traje i do 7 dana nakon čega se beleži nestanak ovog fenomena.

Radioadaptivni fenomen se najčešće ispituje korišćenjem više različitih testova: testova za procenu vijabilnosti i proliferacije ćelija (MTT test), testova genotoksičnosti (test mikronukleusa i hromozomskih aberacija), fragmentacije DNK, analizom ekspresije gena i proteina, promenama u primarnoj sekvenci DNK (SNPs) itd. [14]. U *in vitro* i *in vivo* eksperimentima je pokazano da je nivo apoptoze niži nakon niske pre-iradijacije doze praćene terapijskim dozama u poređenju sa tretmanom visokim terapijskim dozama [61,62]. Joiner i sar. [16] sugerišu postojanje radioprotektivnih mehanizama koji se pojačavaju kao odgovor nakon izlaganja niskim dozama jonizujućeg zračenja ili drugim agensima koji oštećuju DNK. Autori pretpostavljaju da mehanizam zaštite deluje u okviru dva moguća scenarija. Prvi je, da doza  $< 0,3\text{Gy}$  ima protektivno dejstvo protiv jače doze jonizujućeg zračenja koje sledi; drugi fenomen se javlja ukoliko je izlaganje samo niskim dozama koje može izazvati hiperradiosenzitivaciju ili indukovanu radiorezistenciju. Navedeni fenomeni su poslednjih godina delimično rasvetljeni, ali se još uvek malo zna o preciznim mehanizmima adaptivnog odgovora nakon jonizujućeg zračenja [39]. Postoje dokazi da različita stresogena stanja mogu da aktiviraju slične odbrambene mehanizme u biološkim sistemima [16,63,64]. Pretpostavlja se da adaptivni odgovor uključuje transkripciju velikog broja gena i aktivaciju brojnih signalnih puteva koji su odgovorni za odbranu ćelije u smislu: efikasnije borbe protiv slobodnih radikala, aktiviranja sistema za reparaciju DNK, indukcije novosinteisanih proteina u ćelijama koje su primile pre-iradijacionu (*engl.* priming) dozu kao i produkcije antioksidanata [17,18,22,33,36-38,65-74].



Mogućnost modulisanja terapijske doze jonizujućeg zračenja primenom pre-iradijacionih doza pokazana je u *in vitro* uslovima [39-41,75-77].

### 2.1.2. Hiperradiosenzitivnost i povećana radiorezistencija

U protekle dve decenije ćelijske linije se koriste kao veoma dobar model za izučavanje delovanja JZ u dozi  $< 0,5\text{Gy}$ , pri čemu se koriste isti testovi kao kod ispitivanja radioadaptivnog odgovora. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da je smanjenje vijabilnosti tumorskih ćelija veće nego što se to može predvideti koristeći linearno kvadratni (LQ) model. U nekim slučajevima, kao u istraživanju Castillo i sar. [78] na dve vrste bakterija, pokazano je da i doze koje su u nivou jonizujućeg zračenja u prirodi i niže od toga mogu da dovedu do inhibicije rasta i do odgovora na stres suprotno predviđanju matematičkih modela. Istraživanja na ćelijskim linijama pokazala su da doze  $< 0,5\text{Gy}$ , a prema nekim autorima i do  $0,3\text{Gy}$ , izazivaju hiperradiosenzitivnost, a doze  $> 0,5\text{Gy}$  izazivaju povećanu radiorezistenciju. Tačan molekularni mehanizam ovog fenomena nije dovoljno istražen. Enns i sar. [79] su utvrdili vezu između hiperradiosenzitivnog zračenja, p53 gena i apoptoze. Kao što je već navedeno, ovaj fenomen deli slične mehanizme sa radioadaptivnim zračenjem i "bystander" efektom. Hiperradiosenzitivnost je takođe usko povezana i sa uticajima na mehanizme/sisteme za reparaciju DNK. Istraživanje fenomena hiperradiosenzitivnosti i povišene radiorezistencije i dalje je u žiži interesovanja mnogih autora [80-87]. Fenomen hiperradiosenzitivnosti dovodi do smrti ćelije zbog povećanje osetljivosti ćelija na niske doze JZ  $< 0,5\text{Gy}$ . Takođe, kod istih ćelija, doze iznad  $0,5\text{Gy}$ , mogu izazvati komplementarni fenomen - povišenu radiorezistenciju [88-92]. Pretpostavlja se da niske doze nisu dovoljne da izazovu aktivaciju reparacije DNK kao pri velikim kurativnim dozama. To znači da ćelije mogu pokazati hiperradiosenzitivnost na JZ u slučaju da su doze JZ insuficijentne da aktiviraju reparatorni proces [93-95]. Neki od modela, koji pokušavaju da razjasne ovaj fenomen, sugerišu da je uzrok hiperradiosenzitivnosti nemogućnost ozračene ćelije da zaustavi ćelijski ciklus u kontrolnoj tački G2 faze ćelijskog ciklusa pri dozi od  $0,4\text{Gy}$  [96-98]. Skorašnje studije ukazuju da ove ćelije umiru u procesu apoptoze [79,99,100]. Pojedini autori su mišljenja da se radiorezistencija, koja može nastati

nakon konvencionalnih radioterapijskih doza, može prevazići višestrukom primenom vrlo malih doza JZ [90,101].

Postojanje hiperradiosenzitivnosti kod zdravih ćelija može da dovede do većih neželjenih efekata prilikom primene ultrafrakcionacije. Istraživanja o hiperradiosenzitivnosti zdravih ćelija su malobrojna pa se stoga zna manje nego o hiperradiosenzitivnosti tumorskih ćelija. Postoje podaci o ćelijama plućnog epitela, kao i kod dve linije fibroblasta [102]. Krueger i sar. [99] su zaključili da doze manje od 0,2Gy ne aktiviraju ranu G2 kontrolnu tačku. To znači da ukoliko ne dođe do zastoja u ranoj G2 fazi reparatorni mehanizmi ne mogu da poprave oštećenja pre mitoze, pa će ćelija ući u apoptozu. Joiner i sar. [91] sugerišu da veoma male doze imaju veću efektivnost po isporučenoj dozi nego što to predviđa LQ model. Enns i sar. [79] i Krueger i sar. [99] su utvrdili povezanost apoptoze i hiperradiosenzitivnosti. Posmatrano na molekularnom nivou, apoptoza izazvana hiperradiosenzitivnim zračenjem najverovatnije se dešava posredovanjem p53 i kaspaze 3 [79,99]. Hiperradiosenzitivnost takođe zavisi i od brzine isporuke doze. Sporija isporuke doze efikasnije ubija ćelije [80,103,104].

## **2.2. Molekularni mehanizmi radioadaptivnog odgovora pri niskim dozama zračenja**

Molekularni mehanizmi koji stoje iza radioadaptivnog odgovora tumorskih i zdravih ćelija nisu dovoljno istraženi pa su i dalje u u žiži naučne javnosti. Izlaganje tumorskih ćelija jonizujućem zračenju aktivira brojne signalne puteve i izaziva oštećenje DNK. Aktivacija signalnih puteva zavisi od doze zračenja, a u različitim ćelijama se aktiviraju različiti signalni putevi. Brojni činioci utiču na aktivaciju signalnih puteva zračenjem (stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i azota (RNS), oštećenja u DNK, promena u ekspresiji različitih receptora za faktore rasta i njihovih liganada i mutacije u genima ključnim za određene signalne puteve). Npr. aktivacija intracelularnih puteva može povećati sintezu i proapoptotskih i antiapoptotskih proteina u zavisnosti od balansa između aktiviranih signalnih puteva. Zračenjem se mogu aktivirati signalni putevi koji dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, apoptoze ili preživljavanja ćelija.

### 2.2.1. p53 signalni put

Fosfoprotein p53 je produkt homolognog tumor supresornog gena TP53. Više od 50% humanih malignih tumora sadrži mutirani oblik ovog gena što ukazuje na njegovu važnu ulogu u prevenciji kancerogeneze. Proteini koje kodira ovaj gen vezuju se za DNK i regulišu ekspresiju drugih gena u cilju sprečavanja mutacija u genomu i doprinose stabilnosti genoma. Oštećenje DNK izazvano zračenjem, pored niza drugih stresnih stanja/procesa, može aktivirati p53 protein. Aktivirani p53 može da deluje putem nekoliko mehanizama: aktiviranja proteina koji popravljaju oštećenu DNK, zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1/S fazi i omogućavanja ćeliji da popravi oštećenje pre ulaska u narednu fazu ćelijskog ciklusa, te iniciranja apoptoze kojom se uklanjaju nepovratno oštećene ćelije.

Radioadaptivni odgovor ćelija na zračenje može se značajno modulirati primenom niskih doza jonizujućeg zračenja. Niske doze zračenja mogu da zaštite ćelije od oštećenja izazvanih JZ indukcijom signalnih puteva za preživljavanje. U različitim ćelijama ista doza zračenja može aktivirati različite signalne puteve.

Oštećenja DNK nastala nakon zračenja dovode do povećane ekspresije p53. Radioadaptivno zračenje od 0,01Gy u ćelijskoj liniji slezine povećava ekspresiju p53 proteina [62,106]. Radioadaptivni odgovor posredstvom p53 se može razviti i nakon isporuke JZ u dozi od 0,02Gy [62,105-107]. Sakamoto-Hojo i sar. [108] su pokazali da u limfocitima radnika koji su izloženi jonizujućem zračenju dolazi do ekspresije gena čije su funkcije povezane sa putevima u kojima učestvuje p53: uticaj na ćelijski ciklus, DNK reparacija, indukcija apoptoze i genetska nestabilnost. Okazaki i sar. [62] su u eksperimentu sa splenocitima miša utvrdili da je uloga p53 u radioadaptivnom odgovoru veoma značajna: p53 može da zaštiti ćelije aktivacijom reparatornih intraćelijskih mehanizama. Tumor supresor gen TP53 je jedan od glavnih regulatora ćelijskog odgovora na zračenje [109,110]. Jonizujuće zračenje aktivira odgovor DNK na oštećenje koje uslovljava povećanje nivoa p53 u ćeliji koje je rezultat pojačane translacije kao i inhibicije degradacije proteina [109,111]. Aktivacijom p53 signalnog puta može se zaustaviti ćelijski ciklus i popraviti oštećenje u DNK što omogućava preživljavanje ćelija dok indukcijom unutrašnjeg puta apoptoze i/ili ćelijskog starenja može doći do ćelijske smrti.

U zavisnosti od tipa ćelija, p53 može da izazove ili premitotičku apoptozu ili da indukuje gene koji, između ostalog, preko p21 mogu da kontrolišu ćelijski ciklus. U zdravim ćelijama epitela gastrointestinalnog trakta povećanje p53 može dovesti do apoptoze preko ekspresije Bax proteina i mitohondrijalnog puta apoptoze ili do ćelijskog preživljavanja povećanjem ekspresije p21[109]. Signalni put p53 ima važnu ulogu u regulisanju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa [113,114]. Zadržavanje ćelija u kontrolnim tačkama dozvoljava pristup reparatornim enzimima i pruža im mogućnost da poprave oštećenja u DNK pre replikacije i mitoze. Nije potpuno jasno kako signal generisan nakon oštećenja DNK u nukleusu dolazi u citoplazmu i moduliše ćelijski rast ili apoptozu. Ćelija može da popravi mala do srednja oštećenja DNK i tako preživi oštećenje dok veća oštećenja vode ka ćelijskoj smrti i apoptozi u zavisnosti od tipa ćelije i nivoa mutacije p53 u tumorskim ćelijama [114,115].

Nakon DNK oštećenja, od momenta povećanja p53 do razvoja apoptoze prođe nekoliko sati. Protein p53 se u zdravim ćelijama stalno stvara i razgrađuje. U njegovoj degradaciji učestvuje E3 ubikvitin protein ligaza, MDM2, koju negativnom povratnom spregom indukuje p53. Tumor supresorni protein p53 je uključen u indukovanje kaspaze 3 i apoptoze nakon jonizujućeg zračenja i ima bitnu ulogu u odgovoru na niske doze jonizujućeg zračenja [79].

U cilju postizanja apoptoze, p53 može direktno da aktivira transkripciju nekoliko gena, članova Bcl-2 porodice. Proteini ove porodice su odgovorni za regulaciju mitohondrijalne permeabilnosti [116]. U smislu izazivanja apoptoze najvažniji ciljni proteini su proapoptotski Bax, Noxa i PUMA [117-119]. U ćelijama sisara p53 može da aktivira transkripciju Fas gena nakon DNK oštećenja. Potrebno je naglasiti da ekspresija Fas koja ide preko liganada nije posredovana sa p53 [120-122]. Ovakvi podaci ukazuju da se signali nastali nakon oštećenja DNK mogu preneti u ćeliju preko receptora na površini ćelije. Ovaj mehanizam pretpostavlja da je ćelija sa DNK oštećenjem podložnija apoptozi izazvanoj Fas ligandom i uništenju posredovanom T limfocitima [123].

### **2.2.2. Apoptotski signalni put**

Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti 2011. godine je redefinisao tipove ćelijske smrti uzimajući u obzir nova saznanja iz biohemije i genetike ćelijske smrti.

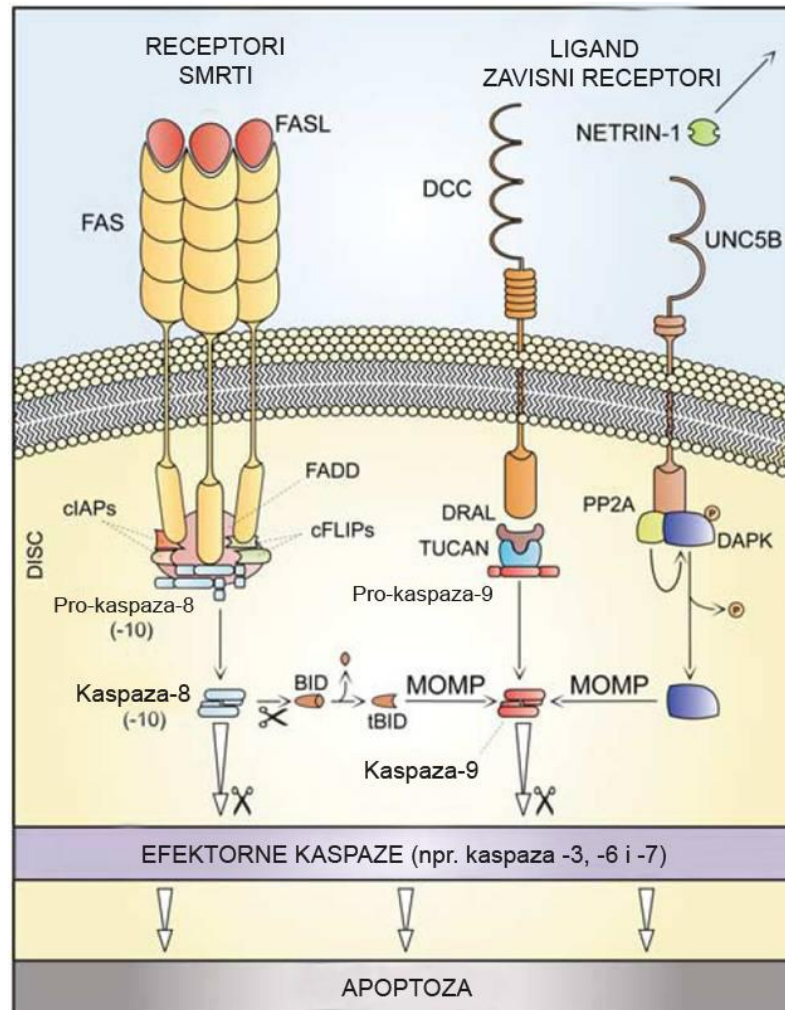
Ova nova, funkcionalna klasifikacija ćelijske smrti uključuje: spoljnu (extrinsic) apoptozu; unutrašnju (intrinsic) apoptozu koja može biti zavisna ili nezavisna od kaspaza; regulisanu nekrozu; autofagnu ćelijsku smrt i mitotsku katastrofu [124,125].

Apoptoza je najizrazitiji i najbolje proučen oblik programirane ćelijske smrti i ima važnu ulogu u normalnom razvoju organizma, homeostazi tkiva i u patogenezi [126]. Ćelije koje umiru apoptozom imaju specifične morfološke osobine po kojima se bitno razlikuju od ćelija koje umiru nekrozom.

Apoptoza i autofagija su najvažniji mehanizmi u nastanku ćelijske smrti nakon zračenja, ali ćelija posle zračenja može da doživi smrt i usled mitotske katastrofe, starenja ili nekroze [125,127-129].

Apoptoza je mehanizam programirane ćelijske smrti koju karakteriše aktivacija kaspaza, kondenzacija hromatina, fragmentacija jedra i “pupljenje” ćelijske membrane. Ovaj oblik ćelijske smrti odvija se u okviru dva puta (spoljašnjeg i unutrašnjeg puta) koji se razlikuju po načinu aktivacije i sledstvenim signalnim putevima uključujući inicijatorne kaspaze. Oba puta će se “susresti” na nivou izvršnih kaspaza (kaspaza-3, -6 i -7) koje nakon aktivacije iniciraju niz biohemijjskih događaja koji će kulminirati smrću ćelije [128,130].

Spoljašnji put apoptoze mogu aktivirati spoljašnji stresogeni stimuli preko specifičnih transmembranskih receptora, najčešće preko nekoliko receptora superfamilije faktora nekroze (TNFR) tzv. receptora smrti (FAS-CD95, TNF-receptor 1 (TNFR1) i TRAILR1-2). Ovaj put se može aktivirati i preko drugih receptora (npr. nektrin receptori UNC5a i DCC) samo ukoliko je koncentracija njihovog specifičnog liganda (nektrin 1) ispod kritičnog nivoa (praga) (Slika 1).



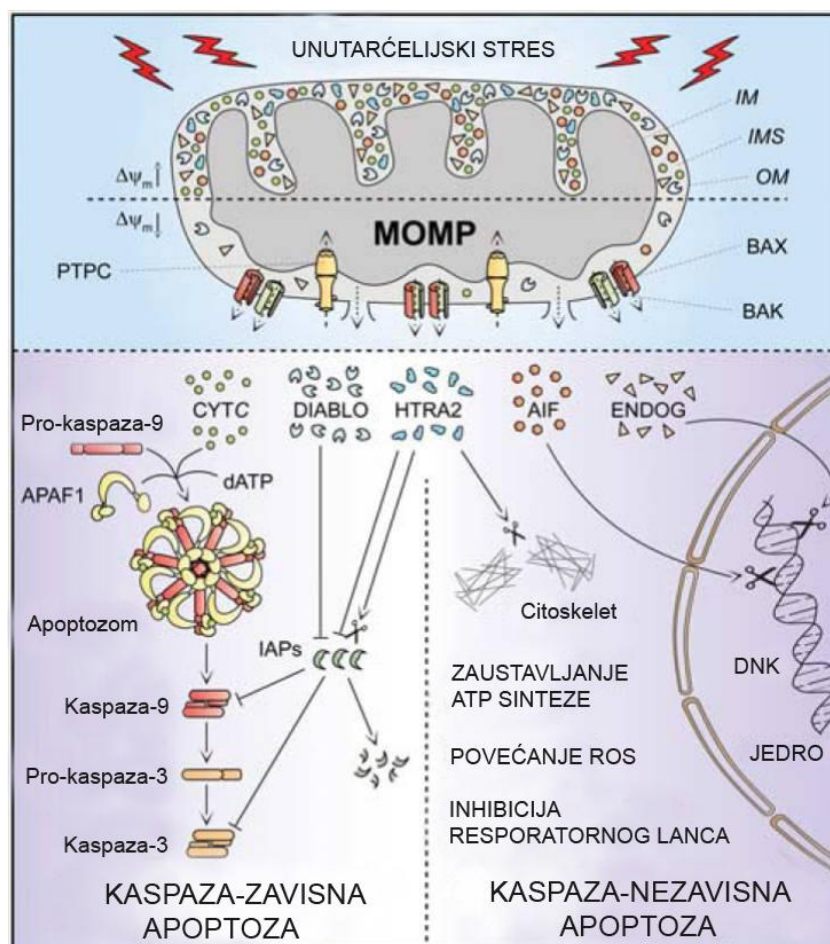
Slika 1. Spoljašnji mitohondrijalni put apoptoze (preuzeto i modifikovano iz Galluzzi i sar. [131]).

Spoljašnji put apoptoze započinje aktivacijom receptora smrti vezivanjem liganda za specifični receptor (npr. FASL/FAS). Citoplazmatski delovi aktiviranog receptora formiraju trimer i privlače razne proteine (FADD, cIAP, cFLIP i prokaspazu-8) stvarajući supramolekularnu platformu (DISC) koja kontroliše aktivaciju kaspaze-8 (ili -10). Nakon aktivacije kaspaze-8 (-10) započinje kaskadna aktivacija efektivnih kaspaza -3, -6 i -7 što će rezultirati fragmentacijom DNK i apoptozom [128,130]. Spoljašnji put apoptoze ne uključuje aktivaciju proteina Bcl2 familije, ali u nekim ćelijama (npr. hepatocitima) spoljašnji i unutrašnji put apoptoze se preklapaju pa se tako kaspaza-8 cepa i aktivira Bid, proapoptotski član Bcl2 familije, i stimuliše propustljivost spoljašnje mitohondrijalne membrane (MOMP) čime započinje unutrašnji put apoptoze. Aktivacija spoljašnjeg puta apoptoze

posredstvom nektrin receptora može se odvijati direktnom aktivacijom izvršnih kaspaza posredstvom kaspaze-9 (DCC receptor) i/ili favorizovati MOMP. U specifičnim okolnostima nekoliko drugih transmembranskih proteina (CD2, CD4, CD30, CD40, CD45, CXCR4 i klasa I/II MHC molekula) nakon vezivanja odgovarajućeg liganda može aktivirati spoljašnji put apoptoze. Spoljašnji put apoptoze je kaspaza-zavisan pa se može suprimirati hemijski (pan-kaspaznim inhibitorima) ili genetski (povećanom ekspresijom inhibitora kaspaza).

Unutrašnji put apoptoze mogu inicirati razna stresna stanja unutar ćelije kao što su oštećenja DNK, oksidativni stres, nedostatak faktora rasta, povećanje  $Ca^{2+}$  u citosolu itd. Uzroci koji okidaju kaskadu događaja koja uslovljava pokretanje unutrašnjeg apoptotskog puta su veoma različiti, ali su svi u suštini povezani sa mitohondrijama kao centralnim kontrolnim mehanizmom. Unutrašnji put apoptoze reguliše familija Bcl2 proteina. Pro-apoptotski i anti-apoptotski signali se paralelno aktiviraju i oba konvergiraju ka membrani mitohondrija koja će, u slučaju da preovladaju pro-apoptotski signali, postati propustljiva i to je ključni događaj u unutrašnjem putu apoptoze. Propustljivost započinje na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani (MOMP) zahvaljujući aktivnosti pro-apoptotskih proteina Bak i Bax a može nastati i kao posledica otvaranja PTPC (*engl.* permeability transition pore complex) na unutrašnjoj membrani mitohondrija što je poznato kao MPT fenomen (*engl.* mitochondrial permeability transition). Oštećenje mitohondrija ima nekoliko letalnih posledica: rasipanje transmembranskog mitohondrijalnog potencijala sa prestankom sinteze ATP i transportnih aktivnosti koje zavise od transmembranskog mitohondrijalnog potencijala; oslobađanje proteina iz mitohondrijalnog intermembranskog prostora u citosol (citohrom C, AIF, endonukleaza G, DIABLO, HTRA2 itd.) i inhibicija respiratornog lanca koja rezultuje povećanim stvaranjem ROS što dodatno pojačava apoptotski signal. Nakon nastanka MOMP, oslobođeni citosolni protein citohrom C sa AIF1 i dATP stvara multiproteinski kompleks, apoptozom, koji aktivira kaskadu kaspaza počev od kaspaze -9, a aktivacijom kaspaze -3 nastaju morfološke i biohemijske promene karakteristične za apoptozu. Opisani put se naziva i kaspaza-zavisan put. Nasuprot tome, drugi oslobođeni proteini, AIF i ENDOG, odlaze u jedro i nezavisno od kaspaza cepaju DNK u velike fragmente. Među proteinima oslobođenim iz intermembranskog prostora mitohondrija nalaze se i oni koji indirektno doprinose procesu apoptoze. Tako

SMAC/DIABLO i HTRA2 inhibiraju anti-apoptotsku funkciju nekoliko proteina iz familije inhibitora apoptoze (IAP familija). HTRA2, kao serin proteaza, dodatno ispoljava svoju pro-apoptotsku i kaspaza-nezavisnu aktivnost (Slika 2). Ispitivanja apoptoze na različitim modelima ukazuju da relativni doprinos procesa opisanih u unutrašnjem putu apoptoze zavisi od fizioloških, patoloških i eksperimenatlnih uslova [130,132]. Unutrašnji put apoptoze je rezultat udruženog delovanja nekoliko izvršnih mehanizama uz snažno opadanje bioenergetske i metaboličke aktivnosti mitohondrija. On počinje stvaranjem MOMP i uvek je udružen sa: opštim i nepovratnim rasipanjem transmembranskog mitohondrijalnog potencijala, oslobađanjem proteina iz mitohondrijalnog intermembranskog prostora u citosol uz moguću relokalizaciju u druge kompartmane (jedro) ćelije i inhibiciju respiratornog lanca.



Slika 2. Unutrašnji mitohondrijalni put apoptoze (preuzeto i modifikovano iz Galluzzi i sar. [131]).



Daish i sar [133] sugerišu da treba razlikovati kaspaza-zavisni od kaspaza-nezavisnog unutrašnjeg apoptotskog puta. Razlika između kaspaza-zavisnog i kaspaza-nezavisnog puta apoptoze temelji se na stepenu/obimu farmakološke ili genetske inhibicije kaspaza što je pokazano u nekim *in vivo* studijama [131] u kojima je inhibicija kaspaza obezbedila stabilnu zaštitu ćelija tokom razvića. U *in vitro* studijama dužeg trajanja, prevladavaju kaspaza-nezavisni mehanizmi (bilo da su posledica aktivnosti AIF i ENDOG ili posledica depleticije ATP) koji ćelije odvođe u smrt i u situacijama kada bi u unutrašnjem putu kaspaza-zavisni put bio normalno aktivan. Smatra se da se doprinos jednog od ovih procesa u *in vitro* uslovima može proceniti nakon kratkotrajne (24h-48h) zaštite ćelija upotrebom inhibitora kaspaza [130,131].

Ključni proteini unutrašnjeg puta apoptoze pripadaju proteinima Bcl2 porodice. Neki od njih su pro-apoptotski dok su drugi anti-apoptotski i od njihovog međusobnog odnosa/ravnoteže zavisi sudbina ćelije. U pro-apoptotske proteine se ubrajaju Bax, Bak, Bok i drugi. Anti-apoptotski proteini Bcl2 porodice su Bcl-2, Bcl-x , Bcl-w, Mcl-1 i A1. Pro-apoptotski proteini se nalaze u citosolu i deluju kao senzori ćelijskog oštećenja ili stresa. U međumembranskom prostoru mitohondrija prevashodno se nalaze anti-apoptotski proteini. Međusobni odnos pro- i anti-apoptotskih proteina može da odredi odgovor na terapiju i kod zdravog i kod tumorskog tkiva. Bcl-2 proteini svoju anti-apoptotsku ulogu ostvaruju vezivanjem za Bax stvarajući heterodimer čime se sprečava stvaranje Bax homodimera i Bak/Bax heterodimera koji mogu indukovati MOMP [134-137]. Pro-apoptotski proteini kao homo- ili heterodimeri mogu direktno indukovati MOMP (Bak, Bax i Bok) dok tzv. „BH3 only” proteini (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma i drugi) indukuju MOMP na dva načina: (a) neutralizacijom inhibitornog delovanja Bcl-2 na multimerizaciju Bak/Bax ili (b) direktnom aktivacijom Bak i Bax. Proteini Bcl2 familije regulišu broj i tip jonskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu Bad i Bax dovode do stvaranja većih jonskih kanala kroz koje izlaze proapoptotski molekuli.

Pri izlaganju ćelija humane mijeloblastne leukemije dozama JZ od 0,02Gy do 0,5Gy pokazano je da ekspresija Bax proteina postiže maksimalni nivo 2-3 sata nakon izlaganja zračenju, dok nivo Bcl-2 proteina ubrzano opada na nivo baznih vrednosti [136-138]. Različiti autori su za drugačije doze i različite ćelijske linije dobijali

smanjenu ekspresiju Bax gena i proteina zavisno od dužine tretmana (24-72 h) [139]. Pojedini proteini Bcl2 porodice mogu učestvovati i u drugim oblicima ćelijske smrti npr. autofagiji i nekroptozu. Takođe, neki proteini ove porodice u fiziološkim uslovima učestvuju u metaboličkim funkcijama mitohondrija [128].

Porodica kaspaza spada u grupu proteina koji su glavni medijatori apoptoze. Sintetišu se kao pro-enzimi i postaju aktivni nakon različitih unutrašnjih i spoljašnjih stimulusa. Do sada je identifikovano 10 najvažnijih tipova kaspaza [140]. Kaspaze 2, 8, 9 i 10 predstavljaju inicijatorne kaspaze i poseduju dugi domen. Efektorne kaspaze su kaspaze 3, 6 i 7. Takođe postoje i inflamatorne kaspaze 1, 4 i 5 [141]. Uprošćeno, efektorne kaspaze nakon aktivacije započinju kaskadnu reakciju koja završava ćelijskom smrću [142].

Pored Bcl2 i porodice kaspaza, u unutrašnjem apoptotskom putu i citohrom *c* je jedan od ključnih proteina. Nakon što ćelija detektuje apoptotski stimulus kao npr. DNK oštećenje, metabolički stres itd. unutrašnji apoptotski put je pokrenut i citohrom *c* koji se nalazi u mitohondrijama oslobađaju se u citoplazmu. U citoplazmi citohrom *c* angažuje apoptotski proteaza-aktivirajući faktor-1 (APAF1) i formira apoptozome [143,144]. Dokazano je da su ćelije sa deficijencom citohroma *c* bile rezistentne na razne apoptotske stimulse, što je dovelo do smanjene aktivacije kaspaze 3.

Genetičke studije su potvrdile značaj citohroma *c* uz pomoć “knock-in” pristupa ciljnih gena kod miševa. Važno je napomenuti da je otpuštanje citohroma *c* kao i citohrom *c* posredovana apoptoza pod višekaskadnom kontrolom, a najznačajniju ulogu u toj kontroli imaju članovi Bcl2 porodice. Tako citohrom *c* pojačava signale koji bivaju generisani od strane drugih apoptotskih puteva [145].

### 2.2.3. PARP signalni put

Poli (ADP-riboza) polimeraza (PARP) predstavlja porodicu proteina koja je primarno lokalizovana u nukleusu. PARP je deo važnih celularnih mehanizama, kao što su odgovor DNK na oštećenja (reparacija), a kada je oštećenje veliko učestvuje u ćelijskoj smrti putem apoptoze ili nekroptoze [146]. Enzimi PARP1 i PARP2 imaju ulogu u različitim mehanizmima popravke DNK oštećenja: reparaciji isecanjem baza (BER), homolognoj rekombinaciji (HR) i nehomolognom sparivanju krajeva

(NHEJ). Nakon što se detektuje oštećenje DNK, aktiviran PARP1 okida poli(ADP-ribozil)aciju histona. Poli(ADP-ribozil)acija je jedan od prvih koraka kojim DNK odgovara na oštećenje [147]. PARP1 obezbeđuje regulaciju DNK replikacione viljuške pomoću HR na oštećenoj DNK. PARP1 je primarno uključen u popravku jednolančanih prekida DNK (SSB). Ukoliko se ne poprave, ovi prekidi se u toku DNK replikacije razvijaju u dvolančane prekide (DSB) DNK. PARP1 ima dvostruku ulogu u apoptozi. Inhibicija PARP1 može da izazove apoptozu [100,148-150], ali PARP1 može da dovede i do smanjenja apoptoze [100,151]. Do aktivacije PARP1 može doći nakon izlaganja ćelija jonizujućem zračenju što vodi ka iscrpljivanju izvora energije u ćeliji. Jako oštećenje DNK može da dovede do preterane aktivacije PARP1 što dovodi do iscrpljivanja izvora energije i nekroze i ćelijske smrti [100,146]. U nedostatku ili pri inhibiciji PARP1 proteina njegovu ulogu može da preuzme PARP2, što je pokazano u istraživanju sa PARP1 inhibitorima i niskim dozama zračenja [152,153]. Eksperimenti sa inhibitorima reparacije sugerišu da PARP1 ima ulogu u adaptivnom odgovoru [24,66,154,155] i da može biti povezana sa kontrolom ćelijskog ciklusa ili sa detekcijom oštećenja [96]. Može se pretpostaviti da adaptivni odgovor povećava mehanizme NHEJ i HR. Nakon što JZ izazove DNK prekide, odmah dolazi do aktivacije PARP1 što vodi ka depleciji NAD i ATP unutar ćelije i verovatno nekrozi ćelije. Inhibicijom aktivnosti PARP sprečava se nastanak ćelijske smrti i poboljšava se rast tumora. Ovaj zaključak izveden je na osnovu istrživanja na modelu karcinoma pluća [156]. PARP je takođe povišen u uznapredovalom rezistentnom karcinomu prostate [100].

#### **2.2.4. p38 MAPK signalni put**

U mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) kod sisara ubrajaju se JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalna kinaza), p38bMAPK i ERK (ekstracelularnim signalima regulisana kinaza). Ove serin-treonin protein kinaze regulišu različite aktivnosti u ćeliji: proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu ili preživljavanje, zapaljenje i urođeni imunitet. Poremećaj MAPK signalnog puta prisutan je u različitim oboljenjima uključujući kancer i teška neurodegenerativna oboljenja [157].

p38 MAPK signalni put može da se aktivira kao odgovor ćelije na razne stresogene faktore (oksidativni, genotoksični i osmotski stres, proimflamatorne

citokine TNF- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  [158,159]. Signalni put Ras–Raf–MEK–ERK ima važnu ulogu u razvoju kancera jer podstiče proliferaciju i metastaziranje tumorskih ćelija. p38 MAPK put dovodi se u vezu sa hemiorezistencijom tumora debelog creva i jetre [157].

Postoje najmanje 4 izoformna oblika p38: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  i p38 $\delta$  [160]. Aktivacija p38 MAPK signalnog puta može da vodi u pravcu ćelijske smrti ili u pravcu ćelijskog rasta i preživljavanja [161]. Wang i sar. [162] su pokazali da jonizujuće zračenje aktivira sve 4 izoforme p38, ali da je za zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2 fazi (G2 arest) potrebna p38  $\gamma$ . Druge izoforme p38 mogu biti uključene u druge kontrolne tačke regulatornog mehanizma ćelijskog ciklusa [163]. p38 $\gamma$  MAPK ima važnu ulogu i u ATM Chk2 signalnom putu kao i u unutrašnjem putu apoptoze. Uloga p38 MAPK ogleđa se u ranoj fazi, pre mitohondrijalne disfunkcije i aktivacije kaspaze-3. Prema Choi i sar. [163] inhibicija p38 MAPK ili njena prekomerna ekspresija dovode do smanjenog otpuštanja citohroma *c* i smanjenog aktiviranja kaspaze-3 nakon zračenja. Međutim, p38 MAPK može da bude odgovoran i za radiorezistenciju [159]. Značaj uloge p38 MAPK signalnog puta ogleđa se u činjenici da inhibicija ovog signalnog puta dovodi do preživljavanja maligne ćelije, a poznato je da tumorski rast zavisi od odnosa ćelijske proliferacije i apoptoze [164]. p38 MAPK signalni put ima važnu ulogu u nekoliko karcinoma: karcinom prostate, dojke, mokraćne bešike, jetre, pluća itd. [165-169]. Ovaj signalni put je povezan sa migracijom tumorskih ćelija i sa njihovom invazivnošću. Pored navedenog, p38 MAPK može imati i tumor supresorni efekat preko aktiviranja p53 i apoptoze [170,171]. Signalni put p38 MAPK je drugačiji i komplikovaniji kod tumorskih ćelija nego kod zdravih, a takođe postoje razlike i između različitih tumorskih ćelijskih linija [172]. Efekti JZ kao i niskih pre-iradijacionih doza JZ su ispitivani i na p38 MAPK signalni put. Kim i sar. [51] su dobili povišenu ekspresiju p38 MAPK nakon zračenja niskom dozom od 0,05Gy.

Zračenje je važan modalitet lečenja solidnih tumora. Poznavanje molekularne biologije i principa radiobiologije omogućilo je da se poslednjih godina bolje sagledaju signalni putevi pokrenuti jonizujućim zračenjem - zaustavljanje ćelijskog ciklusa, apoptoza i preživljavanje ćelija.

Odgovor ćelija na zraćenje vezuje se za dva glavna signalna puta: konstitutivni put za preživljavanje, svojstven svim proliferišućim ćelijama, i indukovani put za preživljavanje kao odgovor ćelije na zraćenje. Oba puta predstavljaju otpor ćelija na letalne efekte zraćenja.

U ovom radu ispitivan je odgovor malignih i zdravih ćelija na različite modalitete jonizujućeg zraćenja u cilju boljeg poznavanja puteva ćelijske smrti i preživljavanja. Potpuno razumevanje molekularnih puteva koji vode u apoptozu ili u preživljavanje ćelija nakon izlaganja jonizujućem zraćenju moglo bi koristiti u iznalaženju novih i efikasnijih strategija i modaliteta lećenja malignih tumora u cilju njihove potpune eradikacije.

### 3. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. da se utvrdi optimalni režim isporuke zračne terapije u smislu pre-iradijacione doze nakon koje sledi veća kurativna doza, koja će dovesti do smanjenog preživljavanja i smanjenja deobnog potencijala tumorskih ćelija, a u isto vreme izazvati adaptivni (radiorezistentan) odgovor kod zdravih ćelija;

2. da se detektuje stepen

- preživljavanja tumorskih i zdravih ćelija,
- oštećenja hromozoma (prisustvo mikronukleusa)
- fragmentacije DNK i
- razlike u primarnoj sekvenci p53

nakon primenjenih režima zračenja i različitih pre-iradijacionih niskih doza jonizujućeg zračenja;

3. da se utvrdi promena ekspresije ključnih proteina u signalnom putu apoptoze i njihova veza sa p53 i p38 MAPK signalnim putevima nakon primenjenih režima zračenja;

4. da se na osnovu dobijenih rezultata uporede molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ćelijskog odgovora zdravih i tumorskih ćelija na niske pre-iradijacione doze jonizujućeg zračenja i na dva različita režima radioadaptivnog zračenja.

## **4. RADNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

Pri dizajniranju ovog istraživanja postavljene su sledeće radne hipoteze:

1. Zračenjem tumorskih ćelija niskim dozama JZ nakon kojih sledi visoka kurativna doza (2Gy) očekuje se značajno smanjenje preživljavanja u odnosu na ćelije koje su ozračene samo sa kurativnom dozom bez pre-iradijacije. Nasuprot tome, kod zdravih ćelija uz pre-iradijaciju očekuje se značajna pošteta zdravih ćelija u smislu održanog ili povećanog preživljavanja;
2. U uzorcima ćelijskih linija koje pokazuju radioadaptivni efekat u smislu radiorezistencije utvrdiće se manji broj mikronukleusa i manja fragmentacija DNK, kao i manja promena primarne DNK sekvence p53 gena, dok se suprotan efekat očekuje u osetljivoj tumorskoj ćelijskoj liniji;
3. Očekuje se razlika u ekspresiji ključnih apoptotskih proteina zavisno od režima zračenja kao i različita ekspresija proteina u ćelijama koje su primile radioadaptivni režim zračenja u poređenju sa ćelijama koje su primile samo kurativnu dozu zračenja.

## 5. MATERIJAL I METODE RADA

### 5.1. Ćelijske linije

U istraživanju su korišćene dve ćelijske linije: ćelijska linija humanog kolorektalnog karcinoma HT-29 (American Type Culture Collection, HTB-38) i ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća MRC-5 (American Type Culture Collection, CCL171). Odabirom ove dve ćelijske linije moguće je uporediti odgovor tumorskih i zdravih ćelija na primenjene režime zračenja. Ćelije su gajene u medijumu DMEM sa 4,5% glukoze (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, SERVA), uz dodatak 10% FCS (*Fetal Calf Serum*, SERVA) i antibiotika (100IU/ml penicilina i 100µg/ml streptomicina (Galenika)). Ćelije su presađivane dva puta nedeljno, a suspenzija pojedinačnih ćelija je dobijena korišćenjem 0,25% tripsina u EDTA (*Ethylenedinitrilo-tetraaceticacid*, SERVA). Obe ćelijske linije su kultivisane u sudovima za kulturu (flaskonima) (Costar, 25 cm<sup>2</sup>) na 37°C u atmosferi 100% vlažnosti i 5% CO<sub>2</sub>.

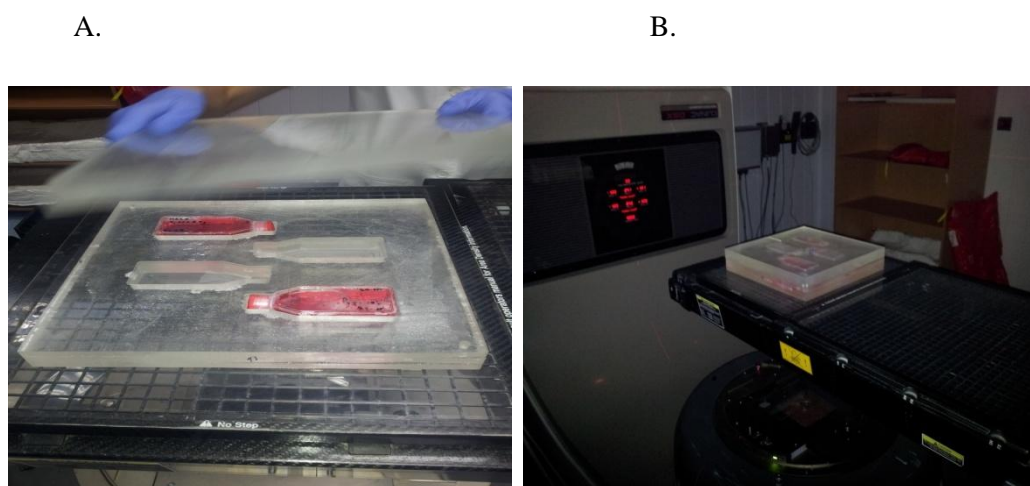
### 5.2. Metode rada

#### 5.2.1. Tretman ćelijskih linija

Ćelijske linije su izložene jonizujućem zračenju koje je isplanirano na osnovu naših preliminarnih istraživanja [76,77] i dostupnih podataka iz literature. Za vreme zračenja ćelije su bile smeštene u flaskone (oko  $2 \times 10^6$  ćelija/flaskonu) koji su bili postavljeni u specijalno dizajnirani fantom od pleksiglasa (Slika 3). Dimenzije fantoma su 30cm x 30cm x 5cm sa 4 mesta za flaskone površine 25cm<sup>2</sup> (Sarstedt). Pleksiglas je korišćen za izradu fantoma zbog toga što je po osobinama propuštanja



jonizujućeg zračenja ekvivalentan tkivu. Uz pomoć fantoma bilo je moguće planirati zračenje ćelija sa velikom preciznošću. Nakon postavljanja flaskona sa ćelijama u fantom načinjeni su CT preseki koji su se importovali u sistem za planiranje Electa XIO, verzija 4.62. Nakon importovanja u sistem za planiranje usledilo je određivanje mete koja će biti izložena planiranim dozama jonizujućeg zračenja. Napravljen je plan sa dva polja sa izodoznom raspodelom u rasponu od 95-107% uz pomoć softvera za planiranje Electa XiO verzija 4.62. Navedena isporuka JZ učinjena je uz pomoć linearnog akceleratora Varian 600DBX, sa 6MV energijom. Za niske doze od 0,03Gy, 0,05Gy i 0,07Gy korišćena je brzina doze (*engl. dose rate*) 80 MU/min, a za dozu od 2Gy, 400 MU/min.

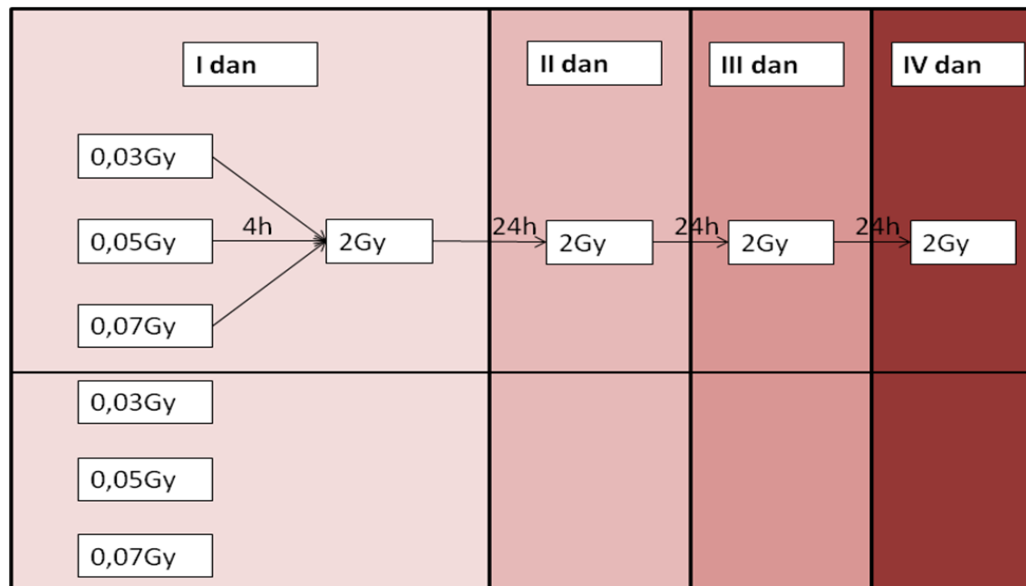


Slika 3. A. Postavljanje flaskona sa ćelijskim linijama u fantom; B. Flaskoni sa ćelijskim linijama postavljeni u fantom - pre zračenja.

Ćelije adenokarcinoma kolona (HT-29) i fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) su bile izložene jednom od dva režima jonizujućeg zračenja (JZ). U oba režima ćelije su zračene različitim pre-iradijacionim dozama i istom kurativnom dozom (2Gy) tokom 4 dana. Pored toga, kontrolu su predstavljale nezračene ćelije, kao i ćelije ozračene dozom od 2Gy u toku 4 dana bez primene niskih preiradijacionih doza. Ozračene ćelije su korišćene u testovima za: procenu vijabilnosti (MTT), testu genotoksičnosti (MN test), fragmentaciji DNK, ekspresiji gena i proteina signalnih puteva važnih za nastanak ćelijske smrti i preživljavanja ćelija.

*Režim zračenja I*

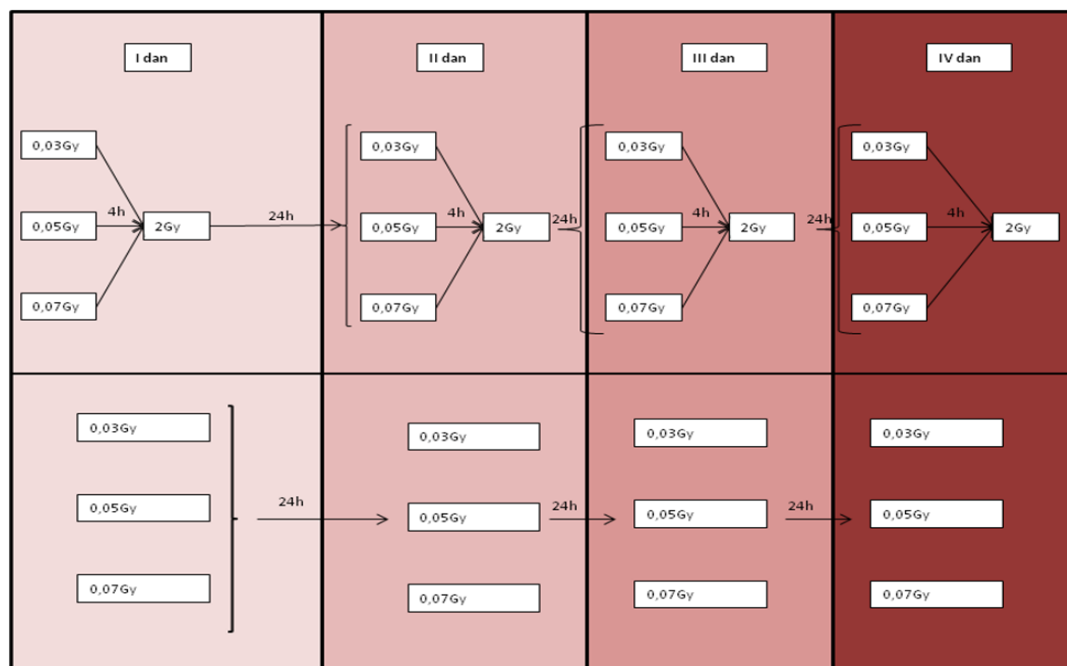
U ovom režimu zračenja (označen u tekstu i grafikonima kao Režim I ili samo I) HT-29 i MRC-5 ćelije su izložene niskim dozama JZ od 0,03Gy, 0,05Gy i 0,07Gy samo prvog dana planiranog četvorodnevnog režima. Nakon primljenih navedenih niskih doza odvojili su se flaskoni sa ćelijama koje su izložene samo niskim dozama JZ, dok su ostali flaskoni sa ćelijama, nakon četiri sata bili dodatno izloženi dozi od 2Gy. Zračenje ćelija dozom od 2Gy nastavljeno je sledeća tri dana (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz dizajna režima zračenja I.

### Režim zračenja II

U režimu zračenja II (označen u tekstu i grafikonima kao Režim II ili samo II) HT-29 i MRC-5 ćelije su tokom četvorodnevno zračenja, svakog dana zračene niskim pre-iradijacionim dozama JZ od 0,03Gy, 0,05Gy i 0,07Gy, a nakon četiri sata primile su i dodatnu terapijsku dozu od 2Gy. I u ovom režimu su izdvojeni uzorci ćelija koji su primili samo pre-iradijacione doze tokom četiri dana zračenja (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz dizajna režima zračenja II.

#### 5.2.2. MTT test

Uticaj različitih režima zračenja na preživljavanje ćelija (vijabilnost) izmeren je kolorimetrijskim MTT testom [173]. Princip testa je redukcija tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, (MTT)] u plavo obojeni proizvod (formazan), posredstvom mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze, a količina nagrađenog formazana direktno je proporcionalna broju vijabilnih ćelija.

Ćelije su 24h nakon tretmana prema režimu I ili II sakupljene, istaložene centrifugiranjem (10 min / 200 x g) i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 90  $\mu$ l

medijuma bilo  $5 \times 10^3$  HT-29 ili MRC-5 ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na  $37^\circ\text{C}$ , sa 5%  $\text{CO}_2$  naredna 72h časa. Po isteku inkubacije u sve otvore na ploči dodat je sveže pripremljen rastvor MTT (5mg/ml; 10  $\mu\text{l}$  /otvoru,) a inkubacija je nastavljena naredna 3h (u termostatu na  $37^\circ\text{C}$ , sa 5%  $\text{CO}_2$ ). Po isteku inkubacije u svaki otvor je dodato po 100  $\mu\text{l}$  0,04 mol/l HCl u izopropanolu u cilju rastvaranja nastalog formazana. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan MCC/340, Labsystems) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

Rezultati su izraženi kao procenat od kontrole (netretirane ćelije) i/ ili kao procenat od uzorka koji je ozračen sa 2Gy prema formuli  $\% K (2\text{Gy}) = (A_Z/A_K) 100$ , pri čemu je  $A_K$  apsorbancija kontrolnih uzoraka, a  $A_Z$  apsorbancija zračenog uzorka.

### 5.2.3. Test mikronukleusa

Test mikronukleusa (CBMN) (*Cytochalasin B Micronucleus Test*) je test genotoksičnosti koji se koristi za kvantifikaciju hromozomskih oštećenja [174]. Mikronukleusi predstavljaju telašca hromatina koja se formiraju u toku anafaze ćelijske deobe i posledica su zaostajanja hromozomskih fragmenata nastalih prilikom prekida hromozoma ili čak celih hromozoma u toku kontrakcije niti deobnog vretena. U cilju markiranja mikronukleusa (MN) koristi se Cytochalasin-B (Cyt-B), koji je inhibitor polimerizacije aktina, te zaustavlja ćelijsku deobu pre citokineze, a nakon kariokineze, što kao rezultat daje ćelije sa dva jedra.

Preparacija ćelijskih kultura za test mikronukleusa započeta je 72h po završetku zračenja ćelija prema režimu I ili II, centrifugiranjem ćelijske suspenzije (5min na 1200 obrtaja/min) i odlivanjem supernatanta. Na istaložene ćelije je dodat hladni hipotonični rastvor ( $4^\circ\text{C}$ ) 0,075M KCl, nakon čega je sledilo centrifugiranje ćelijske suspenzije (8min na 1200 obrtaja/min). Supernatant je odliven, ćelije su fiksirane rastvorom metanol:sirćetna kiselina (3:1) u koji je dodato 1% formaldehida a zatim je sledilo centrifugiranje (8min na 100 obrtaja/min) i ispiranje fiksativom bez formaldehida još dva puta. Preparati su pravljani tako što su se ćelijske suspenzije

nanosile na dobro oprane i suve mikroskopske pločice. Modifikacija metode se sastojala u tome da je bojenje izvršeno 2% gimzom u destilovanoj vodi, uz dodatak jedne kapi  $\text{NH}_4\text{OH}$ , u trajanju od 10 minuta.

Analizirano je najmanje 1000 binuklearnih ćelija po uzorku. Analizirana je incidencija mikronukleusa. Incidencija mikronukleusa je predstavljena brojem mikronukleusa na 1000 analiziranih binuklearnih ćelija.

#### 5.2.4. Fragmentacija DNK

Fragmentacija DNK (*engl.* DNK laddering) predstavlja metod analize stepena fragmentacije DNK. Ovom metodom se kvalitativno određuje prisustvo/odsustvo fragmentacije razdvajanjem fragmenata DNK na nosaču (agaroznom gelu) [175]. DNK fragmenti nastaju u procesu apoptoze kao posledica aktivnosti enzima CAD (kaspaza-zavisna DNaza), što je ključni događaj tokom apoptoze. CAD seče genomsku DNK na fragmente približne veličine 180-185bp. Ovaj test predstavlja pouzdan test za kvalitativno detektovanje apoptoze i/ili razlikovanje apoptoze od nekroze.

Ukupna DNK je izolovana iz suspenzije ćelijskih linija modifikovanom metodom Sambrook i Russel [176]. Odmereno je 1,5ml ćelijske suspenzije i prebačeno u sterilnu kivetu (1,5 ml). U svaku kivetu dodato je 380  $\mu\text{l}$  digestionog pufera (0,1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0), 10  $\mu\text{l}$  rastvora proteinaze K (40 mg/ml) i 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -merkptoetanol. Sadržaj svake kivete je promešan na vorteksu, i zatim su uzorci inkubirani na 65°C 30 min. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 4 minuta na 12000 rpm. Supernatant (oko 400  $\mu\text{l}$ ) je prebačen u sterilnu kivetu (1,5ml) i u svaku kivetu dodata je jedna zapremina fenola; sadržaj je promešan na vorteksu a zatim je sadržaj svake kivete centrifugiran 4 minuta na 12000 rpm. Mikropipetom je pažljivo prebačena gornja vodena faza u novu sterilnu kivetu (1,5ml) bez zadiranja u donju fenolnu fazu. Dodata je jedna zapremina smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1), promešan je sadržaj na vorteksu i centrifugiran 4 minuta na 12000 rpm. Pažljivo je prebačena gornja vodena faza u novu sterilnu kivetu (1,5ml). Ukoliko je uzorak bio nečist, ponovljeni su koraci ispiranja fenolom i smešom hloroform:izoamilalkohol. Zatim je dodato oko 40  $\mu\text{l}$

(~0,1 zapremine) 3M Na-acetata i 2 zapremine (oko 800  $\mu$ l) 95% etanola rashlađenog na  $-20^{\circ}\text{C}$ . DNK je precipitirana 20 minuta na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Precipitat je centrifugiran 20 minuta na 12000 rpm. Etanol je odliven iz kivete i talog je ispiran sa 1 ml 70% rashlađenog etanola. Precipitat je centrifugiran 5 minuta na 12000 rpm. Etanol je ponovo odliven i talog sušen na  $55^{\circ}\text{C}$  dok sav etanol nije ispario. Talog je resuspendovan u 50 $\mu$ l TE pufera (1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA, pH 7,6). Uzorci su inkubirani 1-2 minuta na  $45^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$  da se ubrza rastvaranje taloga.

Nakon postupka ekstrakcije određena je koncentracija izolovane DNK merenjem apsorbanci na 260 nm pomoću BioSpec-nano spektrofotometra (Shimadzu). Kao slepa proba upotrebljavan je isti rastvor TE pufera korišćen za resuspendovanje izolovane DNK. Pored koncentracije, određivana je i čistoća izolovane DNK, merenjem optičkih gustina na 230nm i 280nm, kao i izračunavanjem odnosa 260/280 i 260/230. Uzorak je smatran čistim i korišćen za dalje analize ukoliko su vrednosti odnosa 260/280 bile u opsegu od 1,75 do 2,05; odnosno od 1,95 do 2,25 za odnos 260/230. Uzorci odgovarajuće čistoće su shodno određenoj koncentraciji razblaživani u radne rastvore (50 ng/ $\mu$ l) koji su korišćeni u daljim analizama.

Vizualizacija i određivanje kvaliteta DNK i prisustva DNK fragmenata određeno je na 1% agaroznim gelovima. Za identifikaciju DNK fragmenata uz uzorke je na gel nanošen i DNK marker od 100kb. Za elektroforezu je korišćen 1xTAE puffer pri konstantnom naponu od 100V u trajanju oko 55 minuta. Nakon razdvajanja fragmenata elektroforezom, gelovi su bojeni etidijum-bromidom i dobijeni fragmenti očitani na UV transluminatoru.

### 5.2.5. Određivanje sekvenci p53 gena

Za detekciju prisustva i obima mutacija odabran je fragment p53 gena, koji obuhvata deo egzona 3 i 4, prema [177]. p53 gen predstavlja centralni ključni tumor supresor gen, čijom mutacijom dolazi do gubitka funkcije gena. Gubitak funkcije gena onemogućava normalan ćelijski ciklus i aktivira se mehanizam za popravku DNK oštećenja što može da vodi u dva scenarija: ili dolazi do ćelijske smrti (npr. apoptoze) ili do proliferacije ćelija. Jonizujuće zračenje, pored jednolančanih i dvolančanih prekida DNK može dovesti i do promena u redosledu nukleotida, tipa

mikroinsercija, mikrodelecija ili baznih supstitucija. Sagledavanjem prisustva mutacija u primarnoj sekvenci DNK, može se indirektno sagledati efekat jonizujućeg zračenja na primarnu sekvencu DNK.

DNK izolovana za analizu fragmentacije DNK korišćena je kao matrica za amplifikaciju egzona 3 i 4 p53 gena prema metodi Liu i Bodmer [177] i korišćenjem prajmera istih autora.

Oko 50ng genomske DNK umnožavano je sa 0,4 $\mu$ M svakog od prajmera, 0,2mM dNTP, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Taq pufera i 1U Taq polimeraze u ukupnoj zapremini od 25  $\mu$ L. Amplifikacija je izvršena pomoću Eppendorf Personal Thermocycler mašine. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 94°C u toku 5 minuta, a sledilo je 35 ciklusa sa fazama denaturacije (94°C u toku 60 sekundi), vezivanja primer-a (60 sekundi na 60°C) i sinteze DNK lanca (60 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 10 minuta. Nakon amplifikacije kontrola kvaliteta produkta proverena je na 2% agaroznom gelu. Kod uzoraka kod kojih je amplifikacija bila neuspešna izvršena su tri ponavljanja. Uspešno amplifikovani region p53 gena prečišćen je primenom QIAGEN PCR gel extraction kita prema uputstvu proizvođača. Prečišćeni PCR produkt sekvenciran je pomoću forward prajmera na ABI Genetic Analyzer 3110. Kvalitet dobijene sekvence je proveren analizom hromatograma i ručno su editovane dvosmislene pozicije. Pomoću programskog paketa BioEdit primenom ClustalW algoritma izvršeno je poređenje sekvenci i dužina je ujednačena skraćivanjem sa oba kraja. Međusobno poređenje sekvenci je određeno izračunavanjem indeksa sličnosti u BioEdit programskom paketu.

#### **5.2.6. Western Blot**

Za analizu ekspresije proteina u ovom istraživanju primenjena je Western blot tehnika. Ova tehnika se koristi za detekciju specifičnih proteina u datom uzorku homogenata ili ekstrakta tkiva. Za razdvajanje nativnih (prema 3-D strukturi) ili denaturisanih (prema dužini polipeptidnog lanca) proteina koristi se elektroforeza na gelu poliakrilamida koji se zatim prenose na membranu (nitroceluloza ili PVDF) gde se detektuju korišćenjem specifičnih antitela.

Proteinski uzorci ćelija (HT-29 i MRC-5) su pripremljeni za Western blot analizu nakon izlaganja ćelija jonizujućem zračenju prema režimu I ili režimu II. Ćelije su nakon tretmana sakupljene, istaložene centrifugiranjem, zatim su resuspendovane u destilovanoj vodi, prebrojane i ostavljene 2h na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 1300 obrtaja / 10 minuta, određena je koncentracija proteina metodom po Bradfordu [178].

Za razdvajanje proteina korišćena je elektroforeza na gelu poliakrilamida. Gelovi su pravljani u odgovarajućim kalupima aparature. Separacioni akrilamidni gel (SDS-PAGE) sadržao je 10% akrilamid/bis-akrilamid; 0,375 M TRIS-HCl, pH = 8,8; 0,1% SDS; 0,675% TEMED i 5 $\mu$ l 10% APS u zapremini od 10ml vode. Na separacioni gel izlivan je gel za koncentrovanje ("stacking" gel) (4,5% akrilamid/bis-akrilamid; 0,125 M TRIS-HCl, pH=6,8; 0,1% SDS; 0,1% TEMED i 100 $\mu$ l 10% APS u zapremini sa 10ml vode).

Uzorci i pufer za uzorak (2 puta koncentrovan: 1,0mL 1,25 M TRIS, pH=6,8; 3,0mL 10% SDS; 0,5mL  $\beta$ -mercaptoethanol; 1-2mg brom-fenilplavog; 1,0mL glicerola) pomešani su u odnosu 1:1 i zagrevani na 100°C u toku 5 minuta. Nakon dodavanja uzorka u bunarčice u gelu startovana je elektroforeza na 100 V, 1 sat, uz korišćenje Tris-glicin "running" pufera (10x koncentrovan: 121,1g TRIS-HCl; 576g glicin; 200ml 20%SDS u zapremini 4l). Nakon elektroforeze sledio je transfer uzoraka pomoću transfer pufera (mM Tris; 0,2 M glicin; 20% CH<sub>3</sub>OH, pH=8,5) na membranu od nitroceluloze (na 100 V, 1h ili preko noći na +4 °C). Membrana je zatim bojena sa Poncesau S (0,1% Ponceau S; 1% CH<sub>3</sub>COOH) 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se proverila uspešnost transfera. Nitrocelulozna membrana je potom obezbojavana u obezbojivaču Ponceau S (1% CH<sub>3</sub>COOH). Nespecifična mesta na membrani su blokirana inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje (PBS; 5% bezmasno mleko; 0,1% Tween-20) u toku 1h na sobnoj temperaturi, ili preko noći na 4°C, ili 30 minuta na 37°C. Po završenom blokiranju membrane su isprane 1-2 puta u puferu za ispiranje (TBS/T: 1xPBS; 0,1% Tween-20) 5 minuta na sobnoj temperaturi uz stalno mućkanje, posle čega su membrane inkubirane sa primarnim antitelima za proteine Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2; R&D SYSTEMS), Bax (BCL2-associated X protein; CALBIOCHEM), citohrom C (BD Pharmingen), kaspaza-3 (R&D SYSTEMS), PARP (poly ADP-ribose polymerase; BD Pharmingen), MAPK (Mitogen Activated Kinase-like protein; BD Biosciences), p53



(CALBIOCHEM) i  $\beta$ -aktina (BD Pharmingen) (0,1-1  $\mu\text{g/ml}$ ) u puferu za blokiranje u toku 1h na sobnoj temperaturi, uz mućkanje. Potom su membrane isprane 3-5 puta u puferu za ispiranje i sledila je inkubacija membrane sa sekundarnim antitelima rastvorenim u puferu za blokiranje (1:1000 – 0,2-1 $\mu\text{g/ml}$ , ili 1:2000) na sobnoj temperaturi u toku 1h uz neprestano mućkanje. Potom su membrane isprane 3-5 puta u puferu za ispiranje. Proteini su detektovani pomoću kita za hemiluminescenciju (Pearce, Thermo scientific). Hemiluminiscentni signal je zabeležen na osetljivom filmu (Hyprerfilms, Amersham Biosciences) i fotografisan digitalnom kamerom a ekspimirani proteini su analizirani pomoću kompjuterskog programa ImageJ (NIH Image; <http://imagej.nih.gov>). Ekspresija proteina u eksperimentalnim uzorcima je analizirana denzitometrijom poređenjem sa proteinima kontrolnog uzorka.  $\beta$ -aktin je korišćen kao interna kontrola.

### 5.3. Statistička obrada podataka

Sve parametrijske vrednosti dobijene primenom MTT i testa mikronukleusa obrađene su primenom standardnih statističkih testova koji su deo programskog paketa Statistica ver. 12 (StatSoft®) [179]. Za sve parametrijske vrednosti određeni su parametri deskriptivne statistike: srednja vrednost, standardna devijacija, medijana, mod, maksimalna i minimalna vrednost i varijansa. Za utvrđivanje međusobnih razlika u odgovorima ćelijskih linija i u okviru jedne ćelijske linije u odgovorima na različite režime zračenja primenjena je jednosmerna analiza varijanse (one-way ANOVA) i post-hoc testovi Tukey i Duncan. Nivo značajnosti postavljen je na  $p < 0,05$ . U cilju određivanja veze između rezultata analize preživljavanja ćelija (MTT) i testa mikronukleusa urađena je analiza korelacije, sa izračunavanjem r parametra. Kvalitativni testovi (DNK fragmentacija i ekspresija proteina) opisno su prikazani u rezultatima.

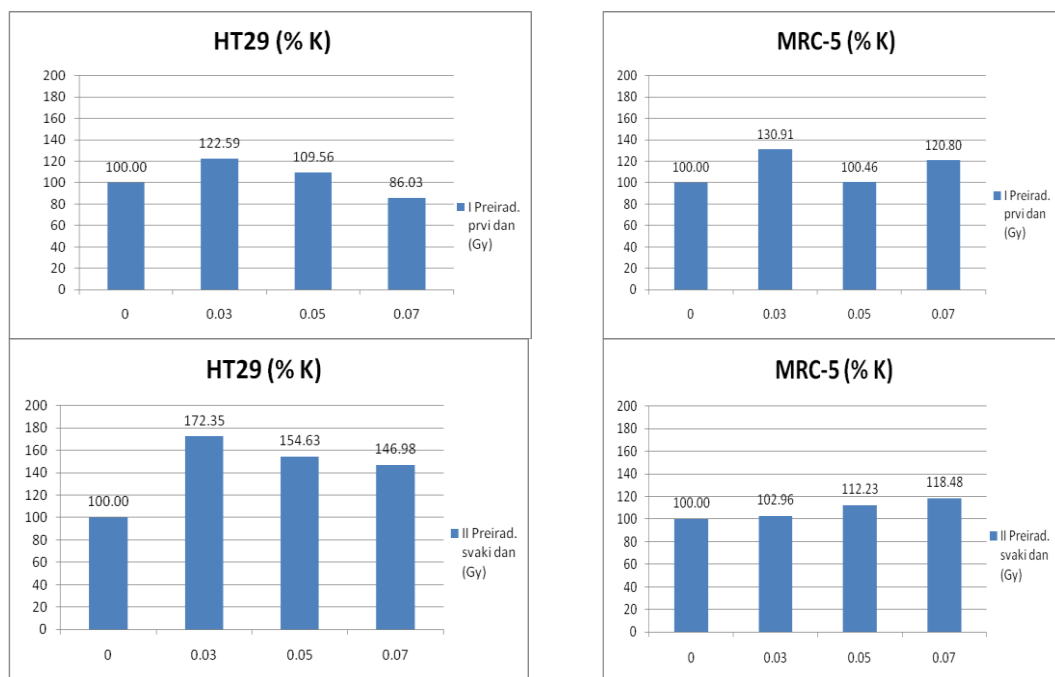
## 6. REZULTATI

### 6.1. Uticaj različitih režima zračenja na preživljavanje ćelija

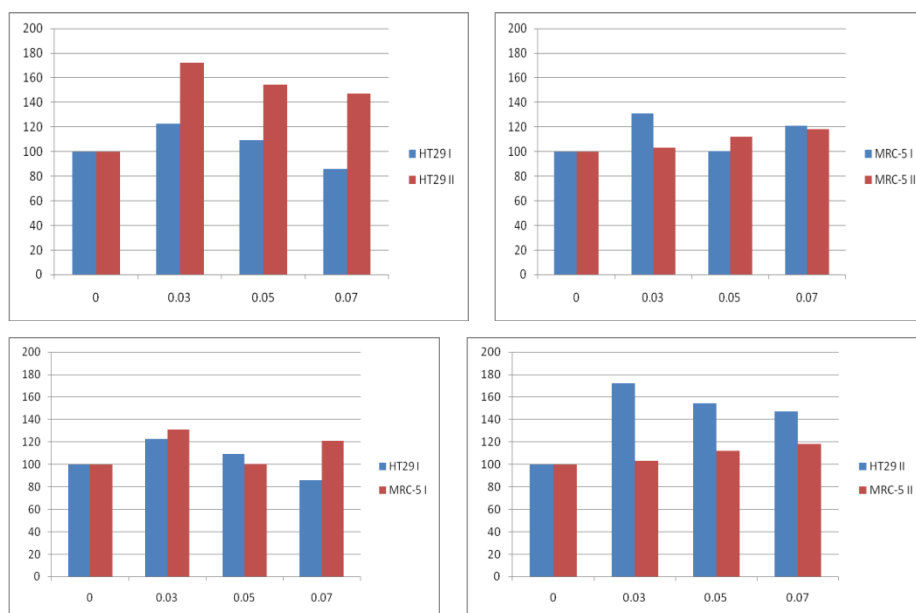
Vijabilnost ćelija zračenih režimima I i II ispitana je primenom MTT testa. Zračene ćelije su testirane 24 sata nakon završetka zračenja, a njihovo preživljavanje je praćeno kontinuirano tokom 72h. Rezultati preživljavanja (vijabilnosti) izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaki primenjeni režim zračenja i za svaku ćelijsku liniju pojedinačno, a grafički su predstavljeni procentom preživelih ćelija u poređenju sa kontrolnim, nezraćenim ćelijama i/ili ćelijama koje su primile terapijsku dozu zračenja od 2Gy.

Posebno su prikazani rezultati preživljavanja ćelija izloženih niskim pre-iradijacionim dozama jonizujućeg zračenja (Slike 6 i 7). Zračenje ćelija prema režimima I i II prikazano je dvojako: kao procenat preživelih ćelija u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak (Slike 8 i 9) i u odnosu na uzorke koji su primili terapijsku dozu od 2Gy (Slike 10 i 11).

I jednokratno i višekratno izlaganje ćelija niskim pre-iradijacionim dozama JZ izazvalo je povećano preživljavanje obe vrste ćelija (Slika 6). Jednokratno izlaganje niskim dozama JZ podjednako je povećalo preživljavanje obe vrste ćelija s tim da je doza od 0,07Gy za oko 14% smanjila preživljavanje HT-29 ćelija u poređenju sa MRC-5 ćelijama. Izlaganje ćelija niskim dozama JZ tokom četiri uzastopna dana izazvalo je značajno povećanje preživljavanja HT-29 ćelija u poređenju sa humanim fibroblastima pluća MRC-5. Najveće preživljavanje u obe ćelijske linije izazvala je jednokratno data doza zračenja od 0,03Gy. Odgovor HT-29 ćelija na jednokratnu i višekratnu primenu niskih doza JZ bio je dozno zavisn - veće doze su izazvale slabije preživljavanje HT-29 ćelija, dok su u istim uslovima MRC-5 odgovorile drugačije i njihov odgovor se nije značajnije menjao bez obzira na dozu i tip zračenja (Slike 6 i 7).

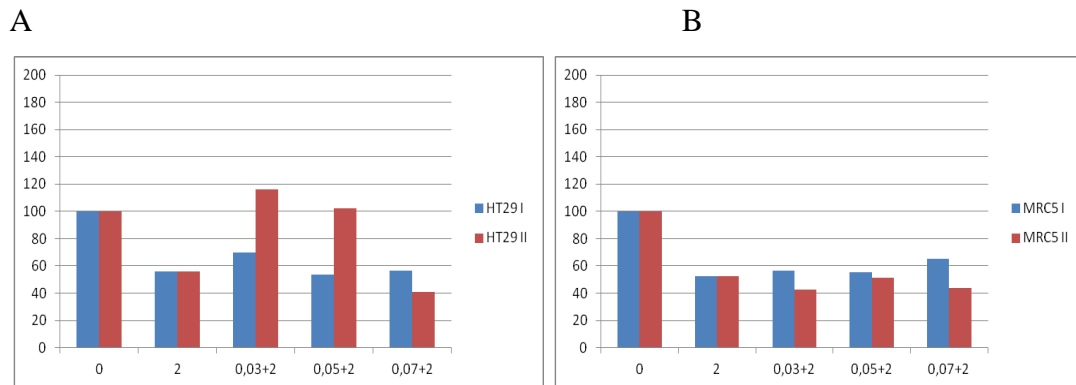


Slika 6. Vijabilnost HT29 i MRC-5 ćelija nakon izlaganja niskim dozama jonizujućeg zračenja. Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja u odnosu na nezračene, kontrolne ćelije.



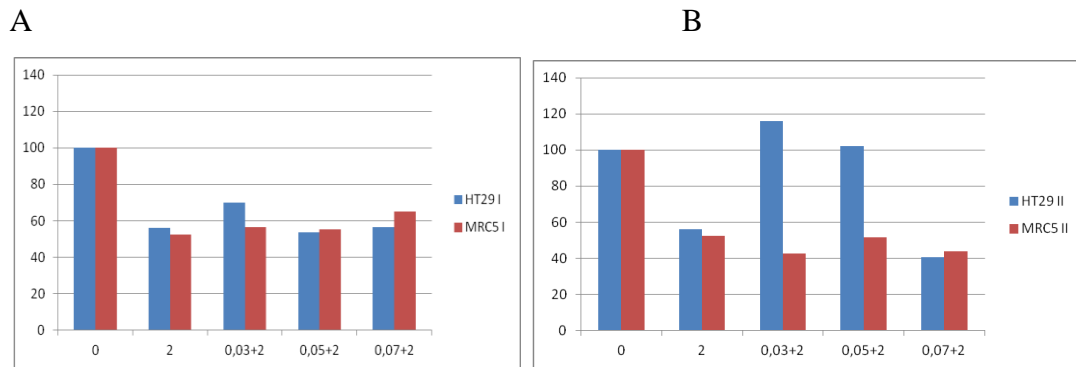
Slika 7. Uporedni prikaz preživljavanja HT-29 i MRC-5 ćelija nakon jednokratnog i višekratnog izlaganja niskim dozama jonizujućeg zračenja. Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja u odnosu na nezračene, kontrolne ćelije.

Preživljavanje ćelija HT-29 i MRC-5 koje su prvo bile izložene niskim pre-iradijacionim dozama JZ, a nakon 4 sata i dozi od 2Gy tokom 4 dana prikazano je na slikama 8 i 9.



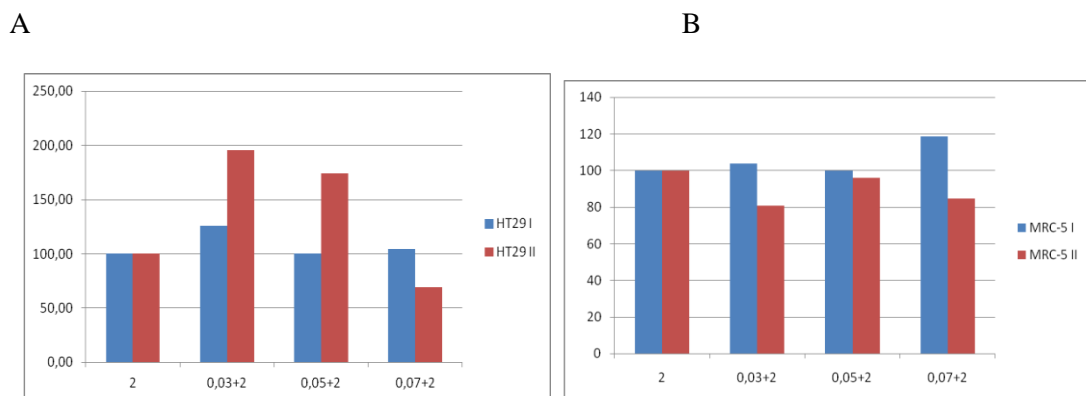
Slika 8. Vijabilnost HT-29 (A) i MRC-5 (B) ćelija nakon izlaganja jonizujućem zračenju prema režimima zračenja I i II. Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja u odnosu na nezračene, kontrolne ćelije.

Vijabilnost HT-29 ćelija nakon zračenja prema režimu I je niža u poređenju sa netretiranim ćelijama; slična je za sve pre-iradijacione doze JZ, a ne razlikuje se značajno ni od odgovora MRC-5 ćelija na isti režim zračenja (Slike 8A, 9A). Međutim, nakon višekratne primene niskih pre-iradijacionih doza JZ (režim zračenja II) preživljavanje HT29 ćelija je značajno veće u poređenju sa odgovorom ćelija na režim zračenja I (prvenstveno za kombinaciju 0,03+2Gy) ali s tendencijom opadanja, tako da je za dozu 0,05+2Gy preživljavanje na nivou netretiranih ćelija, a dozu 0,07+2Gy preživi svega 40% HT29 ćelija (Slika 8A). Odgovor MRC-5 ćelija na oba režima zračenja je ujednačen, ali je preživljavanje niže nakon zračenja u režimu II za sve pre-iradijacione doze tako da je razlika u preživljavanju za dozu zračenja 0,07+2Gy između dva režima oko 20% (Slike 8B, 9).



Slika 9. Uporedni prikaz preživljavanja HT29 i MRC-5 ćelija nakon izlaganja jonizujućem zračenju prema režimu zračenju I (A) i II (B). Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja u odnosu na nezračene, kontrolne ćelije.

Da bi se procenio stvarni doprinos pre-iradijacije u režimima zračenja I i II preživljavanje ćelija je prikazano u odnosu na preživljavanje istih ćelija zračenih samo dozom od 2Gy (Slike 10 i 11).



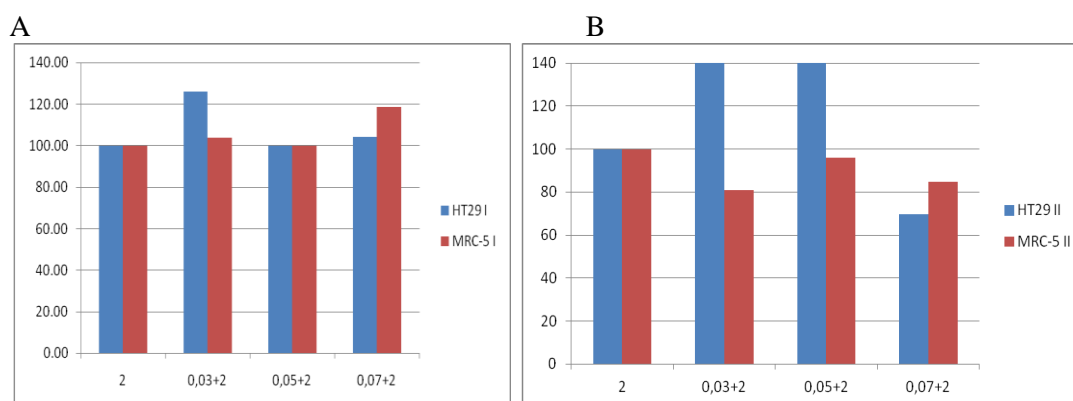
Slika 10. Vijabilnost HT-29 (A) i MRC-5 (B) ćelija nakon izlaganja jonizujućem zračenju prema režimu zračenja I i II. Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja u odnosu na ćelije zračene dozom od 2Gy.

Pre-iradijacija u režimu zračenja I nije izazvala značajnije promene za većinu primenjenih doza u vijabilnosti zračenih ćelija u poređenju sa terapijskom dozom (2Gy). Izuzeci su sledeće pre-iradijacione doze: zračenje HT-29 ćelija dozom od 0,03+2Gy je povećala vijabilnost za 25%, (Slika 10A), dok je doza od 0,07+2Gy povećala vijabilnost MRC-5 ćelija za 18% (Slika 10B).

Odgovor ćelija na zračenje u režimu II je bio dvojak. Kod HT29 ćelija registrovana je značajno povećana vijabilnost nakon doza 0,03+2Gy i 0,05+2Gy

(95% i 75%). Kod MRC-5 ćelija zabeležena je smanjena vijabilnost kad su ozračene režimom II (Slika 10B).

Razlike u osetljivosti ćelija HT-29 i MRC-5 na primenjene režime zračenja prikazane su na Slici 11. Iz slike 11B se vidi da se primenom režima zračenja II indukuje suprotna vijabilnost između HT-29 i MRC-5 ćelija za 0,03+2Gy i 0,05+2Gy. Najveće smanjenje vijabilnosti HT29 ćelija postiglo se primenom pre-iradijacione doze od 0,07+2Gy (za 35% manje preživelih ćelija).



Slika 11. Uporedni prikaz preživljavanja HT29 i MRC-5 ćelija nakon izlaganja jonizujućem zračenju prema režimu zračenju I (A) i II (B). Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja u odnosu na ćelije zračene dozom od 2 Gy.

U Tabeli 1. prikazan je Tukey-ev i Duncan-ov (one way ANOVA) test, sa p vrednostima i odrednicom da li se radi o statistički značajno većoj ili manjoj srednjoj vrednosti rezultata dobijenih MTT testom (apsorbanca) za HT-29 ćelijsku liniju posmatrajući oba režima zračenja međusobno i unutar režima. Tukey test predstavlja postupak višestrukog poređenja srednjih vrednosti parametara u kombinaciji sa ANOVA (Post-hoc analiza) čime se utvrđuje nivo značajnosti razlika. Test vrši međusobna poređenja u okviru standardizovanog opsega veličina slično kao t distribucija u okviru Studentovog t testa. Duncan-ov test je statistički test višestrukog poređenja koji je modifikacija Student-Newman-Keuls testa sa većom moći diskriminacije odnosno pruža veću zaštitu od lažno negativnih grešaka (i u odnosu na Tukey test), ali sa povećanim rizikom od lažno pozitivnih rezultata u smislu utvrđivanja statističke značajnosti. Da bi se mogli uporediti rezultati ova dva testa u Tabeli 1. su uporedo pokazane p vrednosti za oba testa (Tukey/Duncan)

(ispod dijagonale) kao i međusobni odnos srednjih vrednosti merenog parametra (adsorbance) (iznad dijagonale).

U Tabeli 2. prikazan je Tukey-ev i Duncan-ov (one way ANOVA test), sa p vrednostima i odrednicom da li se radi o statistički značajno većoj ili manjoj srednjoj vrednosti rezultata dobijenih MTT testom (apsorbance) za MRC5 ćelijsku liniju posmatrajući oba režima zračenja međusobno i unutar režima. Da bi se mogli uporediti ova dva testa u tabeli su takođe uporedo pokazane p vrednosti za oba testa (Tukey/Duncan).

U cilju lakšeg razmevanja rezultata prikazanih u tabelama 1 i 2. u formi teksta će biti prikazan primer poređenja adsorbance dobijenih MTT testom kod HT-29 ćelija za izlaganje zračenju od 2Gy u poređenju sa 0,03+2Gy u režimu zračenja II (Tabela 1). Očitana vrednost adsorbance nakon primljene doze od 2Gy je 0,23, a nakon primljene doze od 0,03+2Gy je 0,45. Međusobno poređenje reda broj 12 u tabeli (doza 0,03+2Gy, režim II) sa kolonom 8 (2Gy) dovodi do polja u tabeli sa p vrednostima 0,01/0,01. Ovo pokazuje da je p vrednost dobijena Tukey testom 0,01, ista kao p vrednost dobijena primenom Duncan testa 0,01 i oba testa ukazuju na statistički značajnu razliku u srednjoj vrednosti adsorbance, što znači da imamo statistički značajnu razliku u preživljavanju HT-29 ćelija nakon izlaganja ovim dozama. Poređenjem reda 8 u tabeli (2Gy) sa kolonom 12 (0,03+2Gy) dolazimo do polja sa simbolom <, što pokazuje da je vrednost adsorbance nakon primljene doze od 2Gy statistički značajno manja u odnosu na 0,03+2Gy, tj. preživljavanje HT-29 ćelija je značajno manje nakon primljene doze od 2Gy nego nakon primljene doze od 0,03+2Gy u režimu II.

Tabela 1. Rezultati Tukey i Duncan testa u režimima I i II kod HT-29 ćelijske linije.

Režim		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
	<b>1.</b> <b>0Gy</b> <b>(0,42)</b>		<	<	<	<	<	<	>	>	>	>	<	>	>
Režim zračenja I	<b>2.</b> <b>0,03Gy</b> <b>(0,51)</b>	0,83/ 0,08		>	>	<	<	<	>	>	>	>	>	>	>
	<b>3.</b> <b>0,05Gy</b> <b>(0,46)</b>	0,99/ 0,45	0,99/ 0,28		>	<	<	<	>	>	>	>	>	>	>
	<b>4.</b> <b>0,07Gy</b> <b>(0,36)</b>	0,99/ 0,27	0,14/ <b>0,01</b>	0,79/ 0,08		<	<	<	>	>	>	>	>	>	>
Režim zračenja II	<b>5.</b> <b>0,03Gy</b> <b>(0,67)</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,14/ <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>		=	>	>	>	>	>	>	>	>
	<b>6.</b> <b>0,05Gy</b> <b>(0,67)</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,14/ <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	1,00/ 1,00		>	>	>	>	>	>	>	>
	<b>7.</b> <b>0,07Gy</b> <b>(0,60)</b>	0,16/ <b>0,01</b>	0,99/ 0,28	0,64/ <b>0,04</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,79/ 0,05	0,79/ 0,07		>	>	>	>	>	>	>
	<b>8.</b> <b>2Gy</b> <b>(0,23)</b>	<b>0,02/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,40/ 0,02	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>		<	>	<	<	<	>
Režim zračenja I	<b>9.</b> <b>0,03Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,29)</b>	0,40/ <b>0,02</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,07/ <b>0,01</b>	0,98/ 0,18	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,99/ 0,28		>	>	<	<	>
	<b>10.</b> <b>0,05Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,22)</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,29/ 0,02	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	1,00/ 0,85	0,98/ 0,22		<	<	<	>
	<b>11.</b> <b>0,07Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,24)</b>	<b>0,02/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,44/ 0,02	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	1,00/ 0,96	0,99/ 0,27	1,00/ 0,82		<	<	>
Režim zračenja II	<b>12.</b> <b>0,03Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,45)</b>	0,99/ 0,55	0,99/ 0,23	1,00/ 0,85	0,88/ 0,11	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,50/ 0,03	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,11/ 0,01	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>		>	>
	<b>13.</b> <b>0,05Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,39)</b>	1,00/ 0,63	0,51/ <b>0,03</b>	0,99/ 0,25	0,99/ 0,50	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,04/</b> <b>0,01</b>	0,09/ <b>0,01</b>	0,74/ <b>0,01</b>	0,05/ <b>0,01</b>	0,11/ 0,31	0,99/ 0,31		>
	<b>14.</b> <b>0,07Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,16)</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	0,96/ 0,15	0,30/ <b>0,02</b>	0,98/ 0,19	0,94/ 0,15	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	<b>0,01/</b> <b>0,01</b>	

Ispod dijagonale – p vrednosti Tukey/Duncan; iznad dijagonale – međusobni odnos;  
unutar zagrade – srednja vrednost



Tabela 2. Rezultati Tukey i Duncan testa u režimima I i II kod MRC-5 ćelijske linije.

Režim		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
	<b>1.</b> <b>0Gy</b> <b>(0,49)</b>		<	=	<	>	<	<	>	>	>	>	>	>	>
Režim zračenja I	<b>2.</b> <b>0,03Gy</b> <b>(0,64)</b>	0,02/ 0,01		>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>
	<b>3.</b> <b>0,05Gy</b> <b>(0,49)</b>	1,00/ 0,96	0,03/ 0,01		<	>	<	<	>	>	>	>	>	>	>
	<b>4.</b> <b>0,07Gy</b> <b>(0,59)</b>	0,42/ 0,03	0,99/ 0,22	0,46/ 0,03		>	>	>	>	>	>	>	>	>	>
Režim zračenja II	<b>5.</b> <b>0,03Gy</b> <b>(0,51)</b>	1,00/ 0,74	0,06/ 0,01	1,00/ 0,76	0,67/ 0,05		<	<	>	>	>	>	>	>	>
	<b>6.</b> <b>0,05Gy</b> <b>(0,55)</b>	0,97/ 0,18	0,60/ 0,04	0,98/ 0,19	0,99/ 0,34	0,99/ 0,27		<	>	>	>	>	>	>	>
	<b>7.</b> <b>0,07Gy</b> <b>(0,58)</b>	0,62/ 0,04	0,96/ 0,16	0,65/ 0,04	1,00/ 0,78	0,84/ 0,08	0,99/ 0,45		>	>	>	>	>	>	>
	<b>8.</b> <b>2Gy</b> <b>(0,27)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		<	=	<	>	>	>
Režim zračenja I	<b>9.</b> <b>0,03Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,28)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	1,00/ 0,93		>	<	>	>	>
	<b>10.</b> <b>0,05Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,27)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	1,00/ 0,96	1,00/ 0,90		<	>	>	>
	<b>11.</b> <b>0,07Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,32)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,99/ 0,29	0,99/ 0,30	0,99/ 0,29		>	>	>
Režim zračenja II	<b>12.</b> <b>0,03Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,21)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,95/ 0,17	0,93/ 0,15	0,96/ 0,17	0,29/ 0,01		<	<
	<b>13.</b> <b>0,05Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,25)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	1,00/ 0,64	0,99/ 0,59	1,00/ 0,64	0,93/ 0,15	0,90/ 0,32		>
	<b>14.</b> <b>0,07Gy</b> <b>+2Gy</b> <b>(0,22)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,98/ 0,20	0,96/ 0,19	0,98/ 0,20	0,39/ 0,02	1,00/ 0,876	0,99/ 0,36	

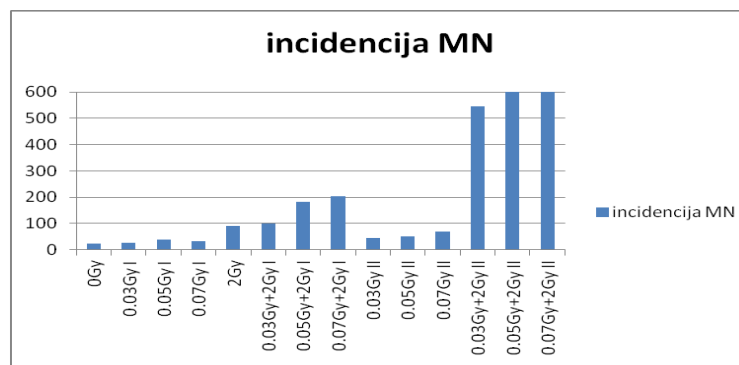
Ispod dijagonale – p vrednosti Tukey/Duncan; iznad dijagonale – međusobni odnos;

unutar zagrade – srednja vrednost

## 6.2. Uticaj različitih režima zračenja na oštećenje hromozoma

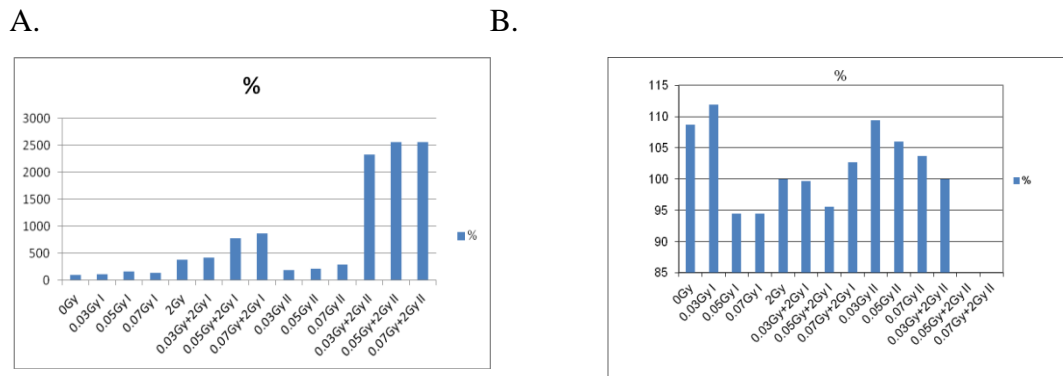
Uticaj različitih režima zračenja na integritet hromozoma i merenje stepena oštećenja hromozoma urađeno je testom mikronukleusa (CBMN), kao jednim od standardnih testova genotoksičnosti koji se koristi za kvantifikaciju hromozomskih oštećenja. Brojčano je stepen oštećenja hromozoma izražen merom incidencije mikronukleusa, koja izražava broj mikronukleusa na 1000 analiziranih binuklearnih ćelija.

Na Slici 12. je predstavljena incidencija mikronukleusa kod HT-29 ćelijske linije. Detektuje se porast incidencije mikronukleusa u odnosu na nezračenu kontrolu kod svih isporučenih pre-iradijacionih doza u režimima zračenja I i II. Kod radioadaptivnog režima zračenja II za dozu od 0,03+2Gy očigledan je veliki skok incidencije MN. Za doze od 0,05+2Gy i 0,07+2Gy u režimu zračenja II nije bilo moguće odrediti incidenciju MN obzirom na veoma veliki broj nekrotičnih i apoptotski izmenjenih ćelija, te smo za navedene doze ustanovili fiktivnu vrednost sa najviše mikronukleusa (~600).



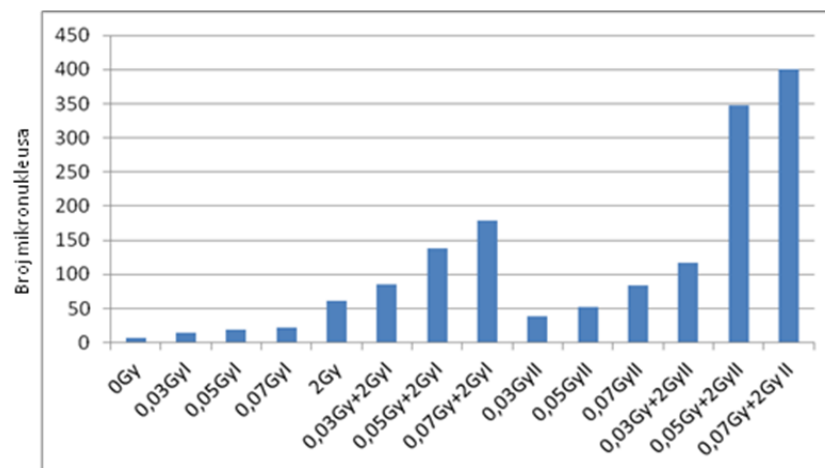
Slika 12. Incidencija mikronukleusa kod HT29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II.

Incidencija MN u ćelijskoj liniji HT-29 prikazana je i kao relativni odnos (u procentima) u odnosu na nezračenu kontrolu (0Gy) i u odnosu na rezultat nakon zračenja sa 2Gy (Slika 13).



Slika 13. Incidencija mikronukleusa prikazana kao procenat od A. nezračene kontrole (0Gy) i B. u odnosu na rezultat nakon 2Gy kod HT-29 ćelijske linije.

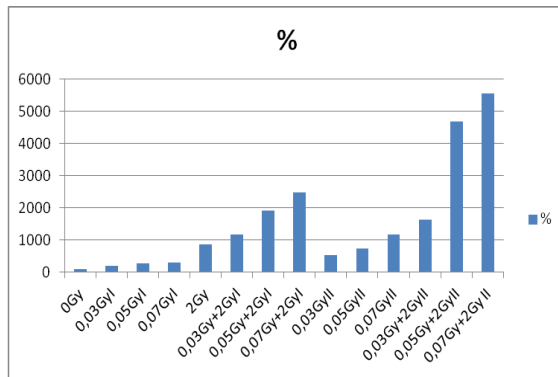
Na Slici 14. predstavljena je incidencija MN kod ćelija MRC-5. Na prikazanom grafiku (Slika 14.) uočavamo razliku u veličini incidencije MN. Incidencija je viša nakon izlaganja niskim dozama u režimu II u poređenju sa izlaganjem niskim dozama u režimu I. Takođe se detektuje visok nivo incidencijae MN poredeći sa dozom 2Gy nakon ekspozicije radioadaptivnom zračenju u oba režima. Nakon isporuke doze od 0,07Gy u režimu zračenja II primećuje se viši nivo incidencije nego pri 2Gy.



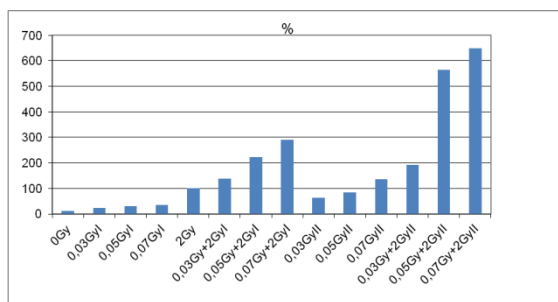
Slika 14. Incidencijaa mikronukleusa kod MRC5 ćelijske linije. u režimima zračenja I i II.

Incidencija mikronukleusa izražena je i u vidu procenta (relativni odnos) u odnosu na nezračenu kontrolu (0Gy) i u odnosu na rezultat nakon zračenja sa 2Gy (Slika 15).

A.



B.



Slika 15. Incidencija mikronukleusa prikazana kao procenat od A. nezračene kontrole (0Gy) i B. u odnosu na rezultat nakon 2Gy kod MRC-5 ćelijske linije.

U Tabeli 3. prikazan je Tukey-ev i Duncan-ov (one way ANOVA) test, sa p vrednostima i odrednicom da li se radi o statistički značajno većoj ili manjoj srednjoj vrednosti rezultata dobijenih testom mikronukleusa (incidencija) za HT-29 ćelijsku liniju posmatrajući oba režima zračenja međusobno i unutar režima. Da bi se mogli uporediti ova dva testa u Tabeli 3. su uporedo pokazane p vrednosti za oba testa (Tukey/Duncan).

Način očitavanja tabele, je istovetan sa tabelama 1 i 2. Na primer, poređenje srednje vrednosti incidencije mikronukleusa kod HT-29 ćelija nakon izlaganja zračenju od 2Gy i 0,03+2Gy u režimu zračenja II (tabela 3.): očitana vrednost incidencije nakon primljene doze od 2Gy je 90,13, a nakon doze od 0,03+2Gy je 546,41. Međusobno poređenje reda broj 12 u tabeli 3. (doza 0,03+2Gy, režim II) sa kolonom 8 (2Gy) dovodi do polja sa p vrednostima 0,01/0,01 (statistička značajnost potvrđena putem oba testa), što znači da postoji statistički značajna razlika u incidenciji mikronukleusa kod HT-29 ćelija nakon izlaganja ovim dozama. Poređenjem reda 8 u tabeli 3. (2Gy) sa kolonom 12 (0,03+2Gy) dolazimo do polja sa simbolom <, što pokazuje da je vrednost incidencije mikronukleusa nakon primljene doze od 2Gy statistički značajno manja u odnosu na 0,03+2Gy, tj. oštećenja hromozoma (DNK) su značajno manja nakon primljene doze od 2Gy nego nakon primljene doze od 0,03+2Gy u režimu II.

Tabela 3. Rezultati Tukey i Duncan testa u režimima I i II kod HT-29 ćelijske linije.

Režim		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
	1. 0Gy (23,48)		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Režim zračenja I	2. 0,03Gy (25,41)	1,00/ 0,84		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	3. 0,05Gy (38,93)	0,94/ 0,16	0,98/ 0,20		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	4. 0,07Gy (31,13)	0,99/ 0,47	0,99/ 0,56	0,99/ 0,43		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Režim zračenja II	5. 0,03Gy (44,68)	0,66/ 0,06	0,77/ 0,08	0,99/ 0,56	0,98/ 0,20		<	<	<	<	<	<	<	<	<
	6. 0,05Gy (51,60)	0,25/ 0,01	0,34/ 0,02	0,99/ 0,23	0,70/ 0,06	0,99/ 0,48		<	<	<	<	<	<	<	<
	7. 0,07Gy (68,11)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,20/ 0,01	0,03/ 0,01	0,51/ 0,03	0,90/ 0,10		<	<	<	<	<	<	<
	8. 2Gy (90,13)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,03/ 0,01	0,60/ 0,03		<	<	<	<	<	<
Režim zračenja I	9. 0,03Gy +2Gy (98,05)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,17/ 0,01	0,99/ 0,42		<	<	<	<	<
	10. 0,05Gy +2Gy (181,51)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		<	<	<	<
	11. 0,07Gy +2Gy (204,79)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,52/ 0,03		<	<	<
Režim zračenja II	12. 0,03Gy +2Gy (546,41)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		<	<
	13. 0,05Gy +2Gy (600)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		<
	14. 0,07Gy +2Gy (600)	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	1,00	

Ispod dijagonale – p vrednosti Tukey/Duncan; iznad dijagonale – međusobni odnos; unutar zagrade – srednja vrednost.

U Tabeli 4. prikazan je Tukey-ev i Duncan-ov (one way ANOVA test), sa p vrednostima i odrednicom da li se radi o statistički značajno većoj ili manjoj srednjoj vrednosti rezultata dobijenih testom mikronukleusa (incidencija) za MRC-5 ćelijsku liniju posmatrajući oba režima zračenja međusobno i unutar režima. Da bi se mogli uporediti ova dva testa u tabeli su uporedo pokazane p vrednosti za oba testa (Tukey/Duncan).

Tabela 4. Rezultati Tukey i Duncan testa u režimima I i II kod MRC5 ćelijske linije.

Režim		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
	<b>1.</b> <b>0Gy</b> <b>(7,22)</b>		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Režim zračenja I	<b>2.</b> <b>0,03Gy</b> <b>(14,37)</b>	0,97/ 0,17		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	<b>3.</b> <b>0,05Gy</b> <b>(18,99)</b>	0,55/ 0,03	0,99/ 0,39		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	<b>4.</b> <b>0,07Gy</b> <b>(22,11)</b>	0,22/ 0,01	0,95/ 0,16	0,90/ 0,54		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	<b>5.</b> <b>0,03Gy</b> <b>(36,62)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,12/ 0,01		<	<	<	<	<	<	<	<	<
Režim zračenja II	<b>6.</b> <b>0,05Gy</b> <b>(52,33)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,32/ 0,01		<	<	<	<	<	<	<	<
	<b>7.</b> <b>0,07Gy</b> <b>(84,20)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		>	<	<	<	<	<	<
	<b>8.</b> <b>2Gy</b> <b>(61,55)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,84/ 0,07	0,01/ 0,01		<	<	<	<	<	<
Režim zračenja I	<b>9.</b> <b>0,03Gy+</b> <b>2Gy</b> <b>(137,46)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	1,00/ 0,86	0,01/ 0,01		<	>	>	<	<
	<b>10.</b> <b>0,05Gy+</b> <b>2Gy</b> <b>(178,80)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		>	>	<	<
	<b>11.</b> <b>0,07Gy+</b> <b>2Gy</b> <b>(85,12)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		<	<	<
Režim zračenja II	<b>12.</b> <b>0,03Gy+</b> <b>2Gy</b> <b>(120,89)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,12/ 0,01	0,01/ 0,01		<	<
	<b>13.</b> <b>0,05Gy+</b> <b>2Gy</b> <b>(346,90)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01		<
	<b>14.</b> <b>0,07Gy+</b> <b>2Gy</b> <b>(400)</b>	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	0,01/ 0,01	

Ispod dijagonale – p vrednosti Tukey/Duncan; iznad dijagonale – međusobni odnos;  
unutar zagrade – srednja vrednost

Testom korelacije utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između MTT testa i testa MN za ćelijsku liniju HT-29. Statistička značajnost je prisutna između dve pomenute grupe generalno, ali ne i u pojedinačnim odnosima ( $r=0,4103$ ;  $p=0,007$ ). Testom korelacije utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između MTT testa i testa MN za ćelijsku liniju MRC-5. Statistička značajnost je prisutna između dve pomenute grupe generalno ( $r=-0,4905$ ;  $p<0,05$ ).

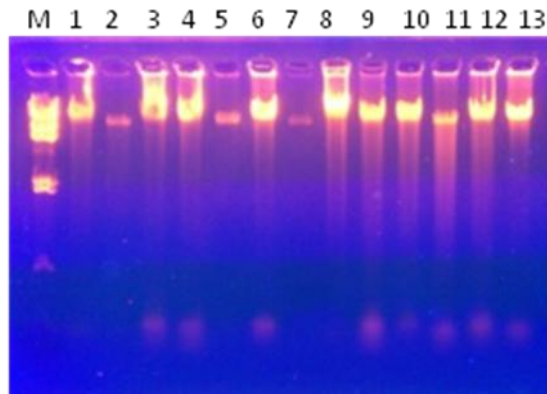
### 6.3. Uticaj različitih režima zračenja na integritet DNK

Primarni ciljni molekul jonizujućeg zračenja u ćeliji je DNK. Jonizujuće zračenje deluje na DNK direktno ili indirektno, preko reakcije radiolize molekula vode. Najvažniji tip lezija koje ono izaziva jesu jednolančani i dvolančani prekidi DNK molekula. Nemogućnost popravke ovih lezija vodi apoptozi. DNK fragmenti veličine oko 180bp nastaju u procesu apoptoze, kao posledica aktivnosti CAD enzima. Pored apoptoze, jonizujuće zračenje može da izazove i nekrozu ćelija, i u tom procesu dešava se DNK fragmentacija, ali su fragmenti nepravilne različite nasumične dužine, što se registruje kao razmaz na agaroznoj gel elektroforezi (*engl. smear*). Test DNK fragmentacije predstavlja pouzdan test za kvalitativno detektovanje apoptoze i/ili razlikovanje apoptoze od nekroze.

Na Slici 16. je prikazana fragmentacija DNK u HT-29 ćelijama za režime zračenja I i II. DNK fragmentacija je detektovana za sledeće doze: 2Gy; režim I 0,07Gy i 0,05Gy+2Gy; zatim u režimu zračenja II doze 0,07Gy, 0,03Gy+2Gy, 0,05Gy+2Gy i 0,07Gy+2Gy.

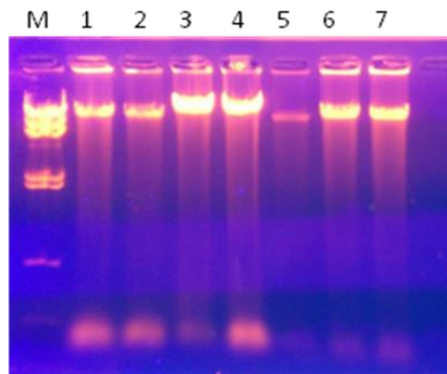
Rezultati fragmentacije su prikazani i za MRC-5 ćelijsku liniju (Slika 17). Za sve prikazane doze u režimu zračenja I i za dozu od 2Gy detektovana je fragmentacija. Za sve doze u režimu zračenja II je pokazano da su dovele do apoptoze osim za dozu od 0,03Gy+2Gy II.



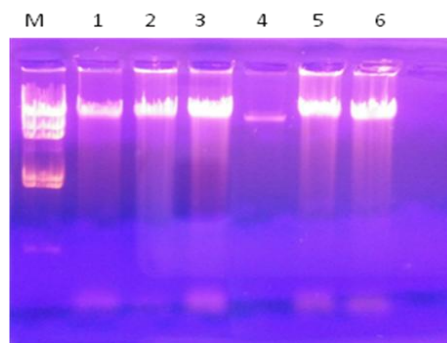


Slika 16. Test DNK fragmentacije kod ćelijske linije HT-29 u režimima zračenja I i II. Brojevi predstavljaju sledeće isporučene doze: 1.0,03Gy I; 2.0,05Gy I; 3.0,07GyI; 4.2Gy; 5.0,03+2Gy I; 6. 0,05+2Gy I; 7.0,07+2Gy I; 8.0,03Gy II; 9. 0,05Gy II; 10.0,07GyII; 11. 0,03+2Gy II; 12. 0,05+2Gy II; 13.0,07+2GyII. M. marker

A.



B.



Slika 17. Test DNK fragmentacije kod ćelijske linije MRC-5 u režimu zračenja I (A) i režimu zračenja II (B). Brojevi predstavljaju sledeće isporučene doze: A. 1. 2Gy; 2. 0,03GyI; 3. 0,05GyI; 4. 0,07GyI; 5. 0,03+2GyI; 6. 0,05+2GyI; 7. 0,07+2GyI; B. M.marker; 1.0,03GyII; 2. 0,05GyII; 3.0,07Gy II; 4.0,03+2GyII; 5.0,05+2GyII;6.0,07+2GyII. M. marker

## 6.4. Uticaj različitih režima zračenja na p53 gen

Gen p53 predstavlja ključni tumor supresor gen, koji ima glavnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa. Za detekciju prisustva i obima mutacija odabran je fragment p53 gena, koji obuhvata deo egzona 3 i 4, prema Liu i Bodmer [177] i željeni region je umnožen lančanom reakcijom polimeraze a dobijeni fragment je sekvenciran da bi sagledali u kojoj meri je došlo do promena na nivou primarne sekvence.

Amplifikacija željenog fragmenta p53 gena nije bila uspešna u svim slučajevima kod oba tipa ćelija. Ukoliko PCR produkt nije dobijen ni nakon tri ponavljanja, najverovatnije je u tim slučajevima došlo do: A) mogućih mutacija u prajmer vezujućem regionu gena ili B) prekida DNK molekula u prajmer vezujućem regionu gena. Amplifikacija i sekvenciranje je vršeno u duplikatu i na osnovu sirovih rezultata pokazano je da nije bilo moguće odrediti jednoznačnu sekvencu što je moguća posledica velikog broja i različitog tipa mutacija. Stoga su kao parametar merenja uticaja zračenja na p53 određene vrednosti sličnosti sekvenci p53 gena nakon pojedinih doza (Tabele 5 i 6).

Tabela 5. Indeks sličnosti sekvenci p53 gena kod ćelijske linije HT-29 nakon zračenja (ispod dijagonale) i redosled od najmanje ka najvećoj sličnosti po intenzitetu boje (iznad dijagonale)

		Režim zračenja I					Režim zračenja II					
		0,03Gy	0,05Gy	0,05+2Gy	0,07+2Gy	2Gy	0,03Gy	0,05Gy	0,07Gy	0,03+2Gy	0,05+2Gy	0,07+2Gy
Režim zračenja I	0,03Gy											
	0,05Gy	0,70										
	0,05+2Gy	0,75	0,70									
	0,07+2Gy	0,72	0,82	0,72								
2Gy		0,78	0,68	0,81	0,68							
Režim zračenja II	0,03Gy	0,78	0,74	0,77	0,75	0,78						
	0,05Gy	0,69	0,71	0,66	0,74	0,66	0,67					
	0,07Gy	0,52	0,55	0,52	0,55	0,52	0,51	0,52				
	0,03+2Gy	0,64	0,65	0,63	0,66	0,64	0,64	0,70	0,47			
	0,05+2Gy	0,72	0,73	0,68	0,75	0,68	0,73	0,77	0,52	0,65		
	0,07+2Gy	0,71	0,68	0,67	0,70	0,68	0,71	0,75	0,52	0,68	0,73	

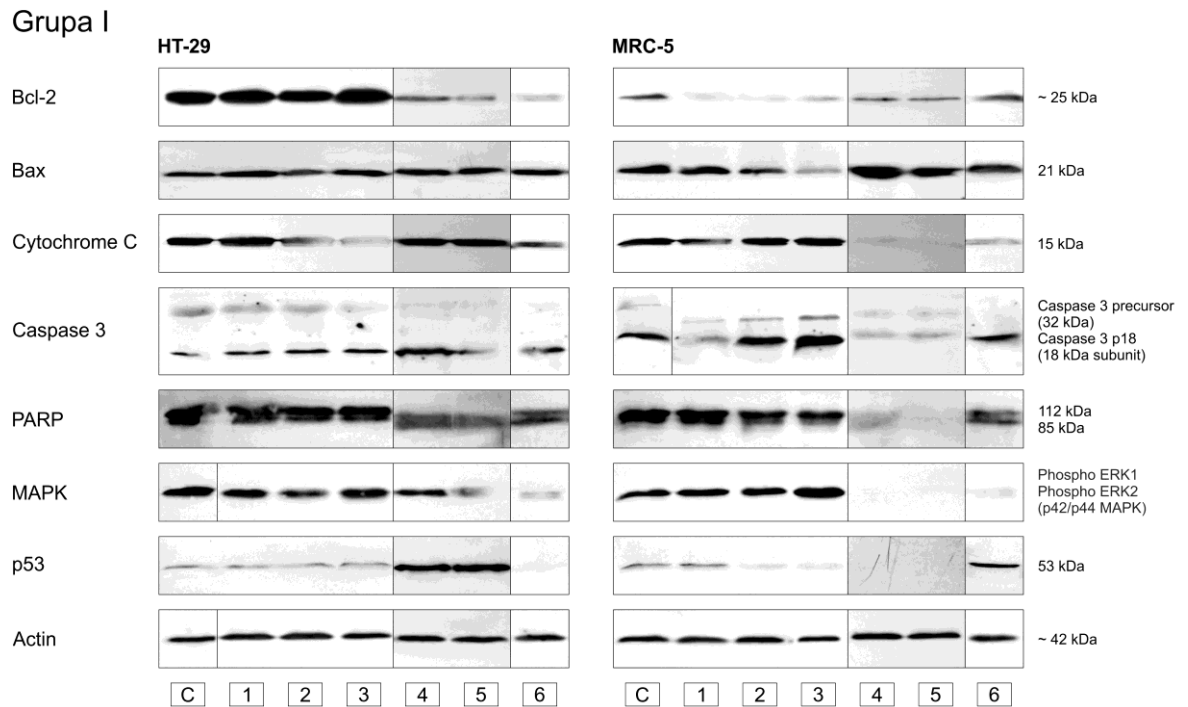
Tabela 6. Indeks sličnosti sekvenci p53 gena kod ćelijske linije MRC-5 nakon zračenja (ispod dijagonale) i redosled od najmanje ka najvećoj sličnosti po intenzitetu boje (iznad dijagonale)

		Režim zračenja I				Režim zračenja II						
		0,05Gy	0,07Gy	0,03+2Gy	0,05+2Gy	2Gy	0,03Gy	0,05Gy	0,07Gy	0,03+2Gy	0,05+2Gy	0,07+2Gy
Režim zračenja I	0,05Gy											
	0,07Gy	0,33										
	0,03+2Gy	0,43	0,33									
	0,05+2Gy	0,43	0,32	0,99								
	2Gy	0,45	0,32	0,59	0,59							
Režim zračenja II	0,03Gy	0,31	0,31	0,29	0,29	0,31						
	0,05Gy	0,43	0,33	0,98	0,97	0,59	0,29					
	0,07Gy	0,40	0,32	0,65	0,65	0,56	0,29	0,65				
	0,03+2Gy	0,45	0,32	0,59	0,59	0,97	0,31	0,59	0,56			
	0,05+2Gy	0,45	0,31	0,67	0,68	0,63	0,32	0,67	0,60	0,63		
	0,07+2Gy	0,55	0,28	0,36	0,36	0,34	0,29	0,36	0,33	0,34	0,33	

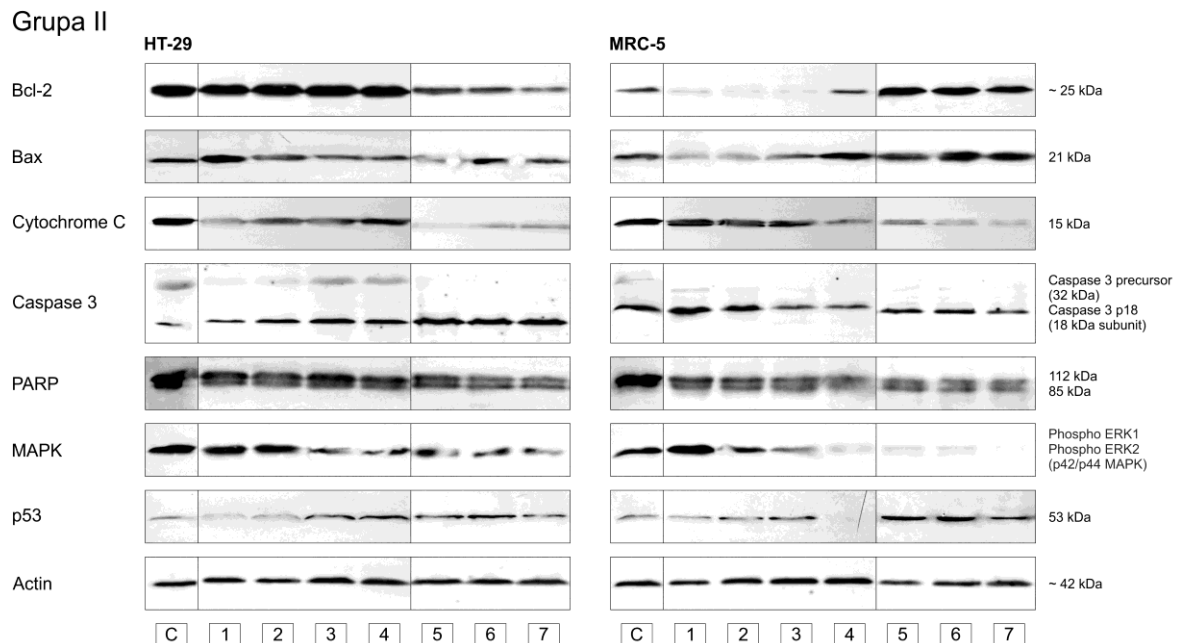
## 6.5. Uticaj različitih režima zračenja na ekspresiju proteina

Western blot metodom analizirani su ključni proteini apoptotskog puta: Bcl-2, Bax, citohrom C i kaspaza 3. Pored apoptotskog puta analizirani su i početni proteini tri takođe važna signalna puta odgovora ćelije na stres (u ovom istraživanju jonizujuće zračenje): p38 MAPK (početni protein signalnog puta), p53 protein (početni protein signalnog puta) kao i PARP (veoma značajan protein koji ukazuje na broj jednolančanih DNK prekida). Kao unutrašnja kontrola analizirana je ekspresija aktina.

Sumarni komparativni prikaz ekspresije ključnih proteina prikazan je na slikama 18 i 19.



Slika 18. Komparativni prikaz ekspresije proteina kod HT-29 i MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola, 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II.



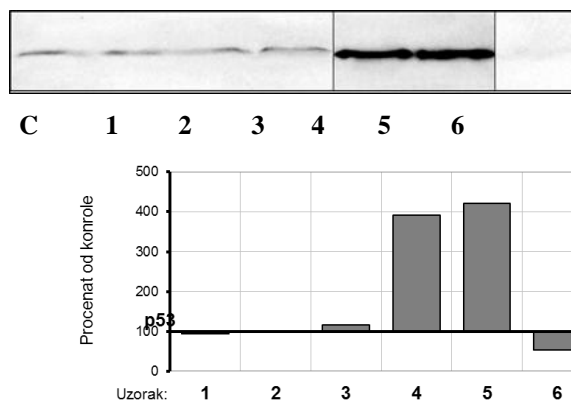
Slika 19. Komparativni prikaz ekspresije proteina kod HT-29 i MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II. U cilju što preglednijeg prikaza analize ekspresije proteina u daljem tekstu dobijeni rezultati su prikazani posebno za svaku za ćelijsku liniju.

### 6.5.1. Uticaj različitih režima zračenja na ekspresiju proteina kod HT-29 ćelijske linije

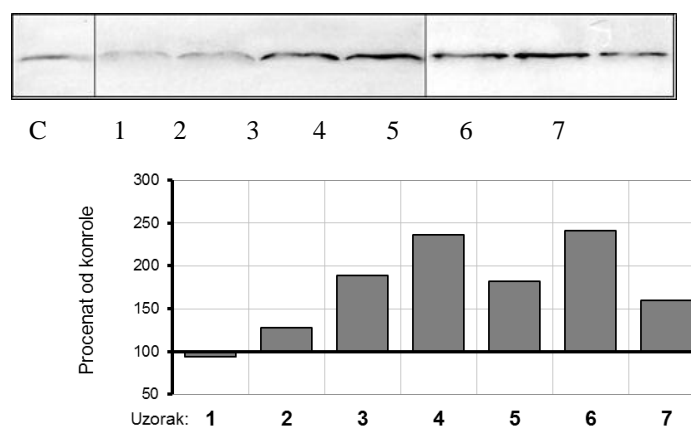
#### *P53- ekspresija proteina*

Analizom ekspresije proteina p53, metodom Western Blot za niske pre-iradijacione doze 0,03Gy, 0,05Gy i 0,07Gy u režimu zračenja I dobijena je niža ekspresija proteina p53 u odnosu na niske doze 0,03Gy i 0,05Gy režimu zračenja II. Za dozu od 0,07Gy u režimu II nivo ekspresije proteina p53 je najniži u poređenju sa svim ostalim dozama u oba režima uključujući i kontrolu koja nije zračena. Nakon radioadaptivnog zračenja u oba režima zračenja beleži se viši nivo ekspresije u odnosu na kontrolu i u odnosu na isporučenu dozu od 2Gy bez pre iradijacije (Slika 20).

A.



B.

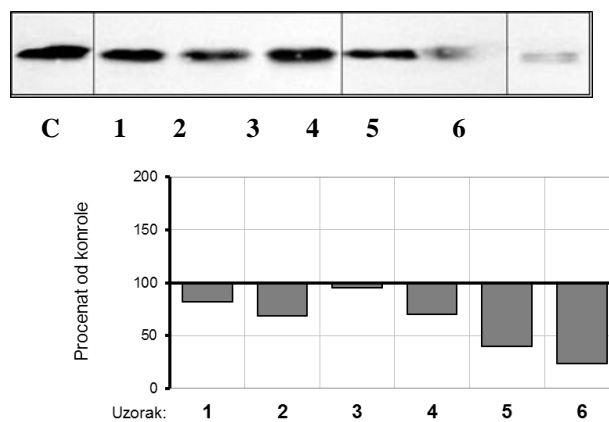


Slika 20. Ekspresija p53 proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

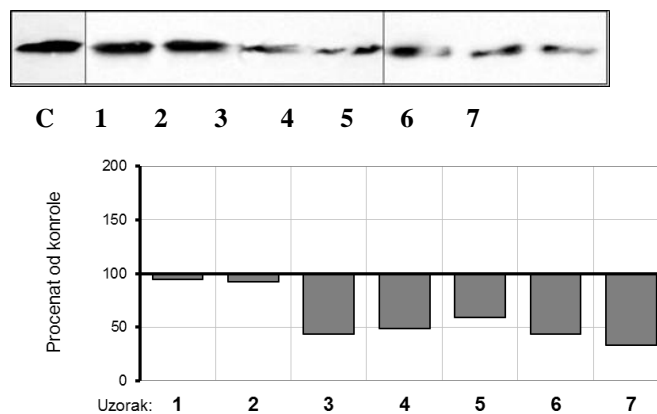
*MAPK p38- ekspresija proteina*

Otkriven je niži nivo ekspresije proteina p38 MAPK u odnosu na kontrolu koja nije zračena. Poredeći doze od 0,07Gy i 0,05Gy u režimu zračenja II sa istim dozama u režimu zračenja I (vizuelno i denzimetrijski) u režimu zračenja II prisutna je niža ekspresija p38 MAPK. Kod HT-29 ćelijske linije dobijena je niža ekspresija proteina p38 MAPK za sve isporučene doze JZ u odnosu na kontrolu koja nije primila JZ. Ekspresija proteina p38 MAPK je za doze 0,07Gy (Slika 21A), 0.03 + 2Gy u režimu zračenja I i 2Gy (Slika 21B), i približna nivou ekspresije kontrole koja nije zračena.

A.



B.

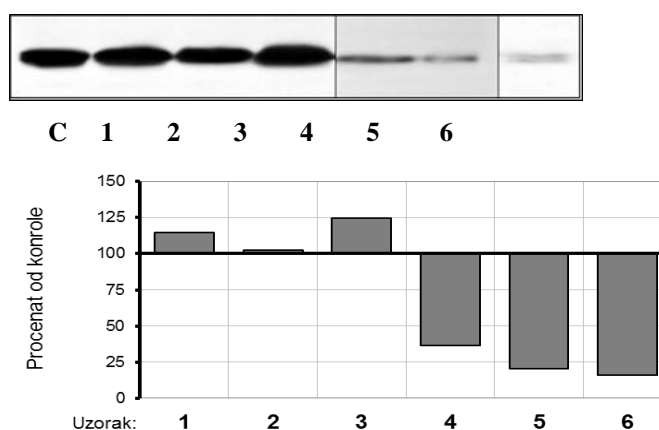


Slika 21. Ekspresija p38 MAPK proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4- 0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

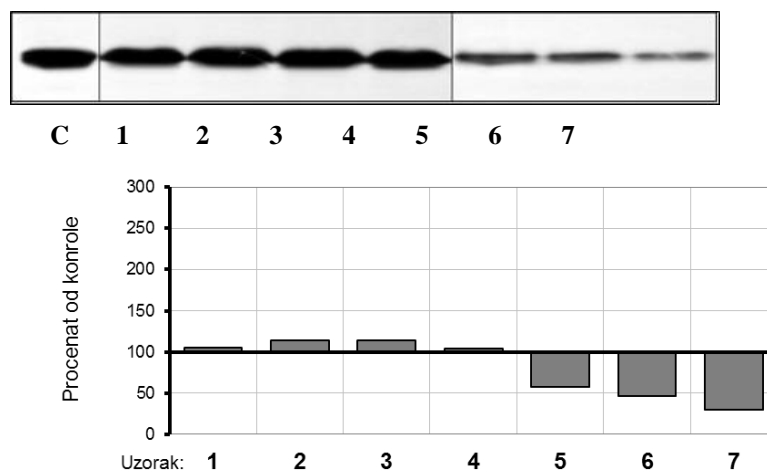
*BCL2- ekspresija proteina*

Kod HT29 ćelijske linije, detektovan je viši nivo ekspresije Bcl-2 proteina za doze 0,03Gy, 0,05Gy i 0,07Gy u režimu zračenja I u poređenju sa istim dozama u režimu zračenja II i nezračenom kontrolom. Kod ćelijske linije HT-29 nakon ekspozicije dozama od 2Gy, 0,03+2Gy, 0,05+2Gy i 0,07+2Gy u režimu zračenja I prisutan viži nivo ekspresije proteina Bcl-2 u poređenju sa istim dozama u režimu zračenja II (Slika 22).

A.



B.

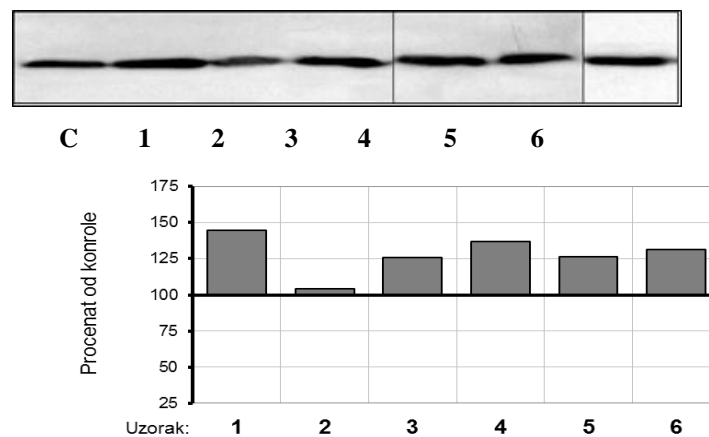


Slika 22. Ekspresija Bcl-2 proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

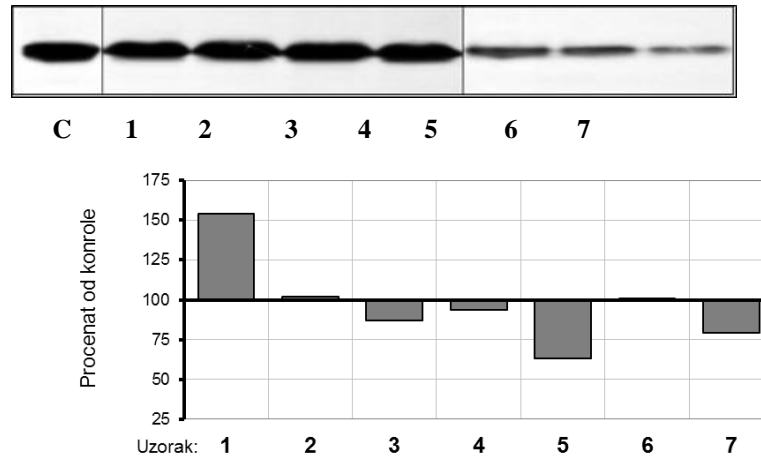
*Bax - ekspresija proteina*

Za sve aplikovane niske doze u oba režima zračenja prisutna viša ekspresija Bax proteina u odnosu na nezračenu kontrolu. Kod ćelijske linije HT-29 za dozu od 2Gy detektuje se ekspresija proteina Bax. Za sve ostale pre iradijacione doze praćene dozom od 2Gy u oba režima nije detektovana ekspresija Bax proteina viša od nivoa kontrole (Slika 23).

A.



B.



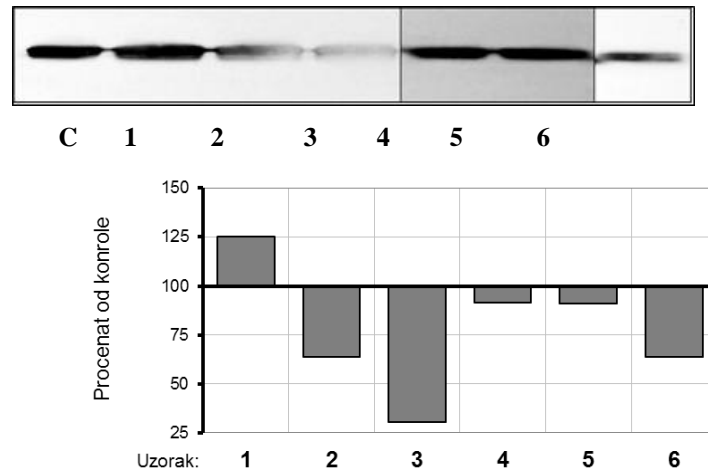
Slika 23. Ekspresija Bax proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.



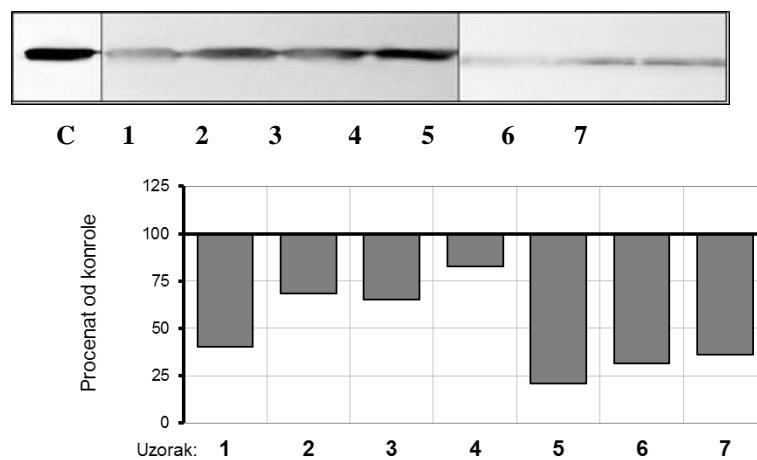
*Citohrom c- ekspresija proteina*

Kod ćelijske linije HT-29 za sve doze osim za 0,03Gy u režimu zračenja I prisutna je niža ekspresija proteina u poređenju sa kontrolom koja nije zračena (Slika 24).

A.



B.

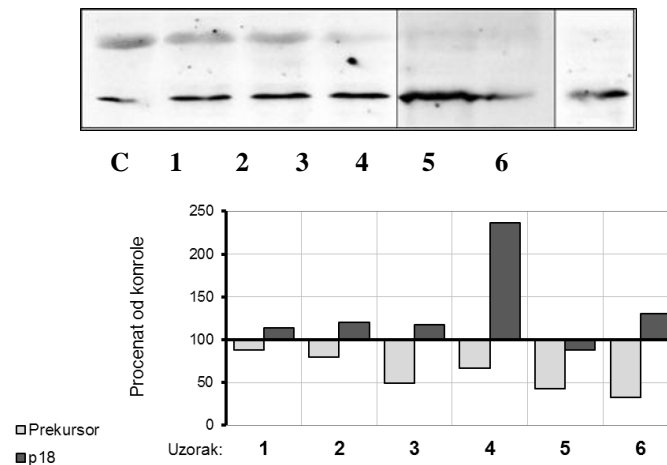


Slika 24. Ekspresija citohrom *c* proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4- 0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

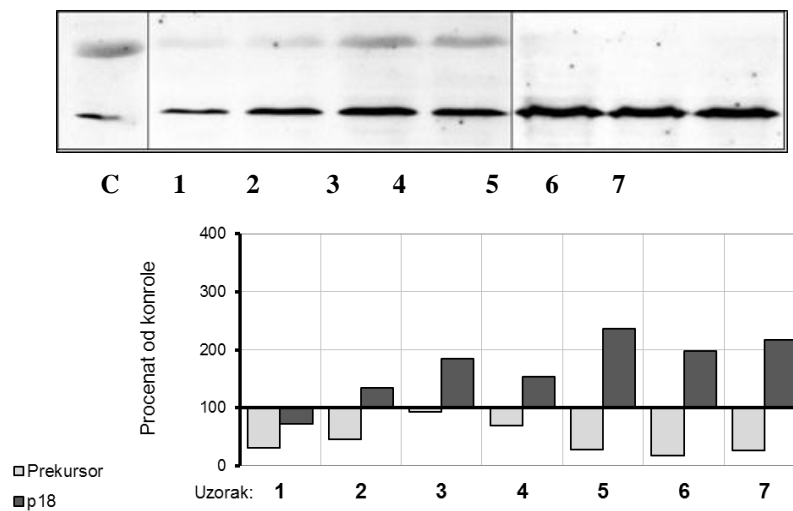
*Kaspaza 3- ekspresija proteina*

Detektovana je ekspresija aktivne forme kaspaze 3 u ćelijskoj liniji HT-29 nakon izlaganja svim opisanim dozama JZ, osim kod doze od 2Gy bez preiraidijacije i doze od 0,05Gy u režimu zračenja II. Prekursor kaspaze 3 je pokazao niži nivo ekspresije u odnosu na nezračenu kontrolu za sve opisane doze (Slika 25).

A.



B.

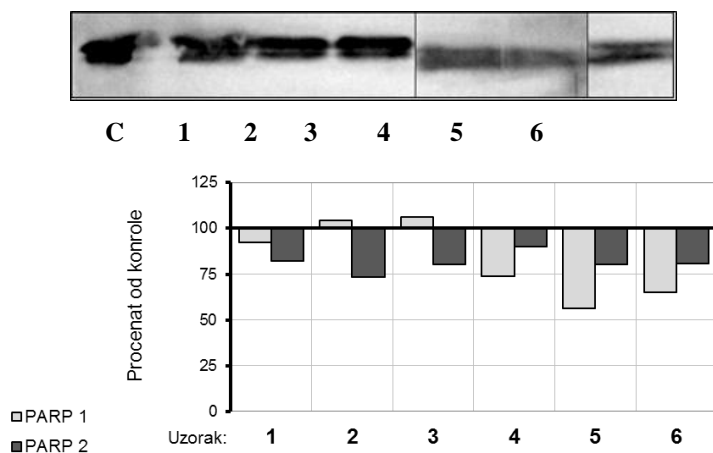


Slika 25. Ekspresija kaspaza 3 proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4- 0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

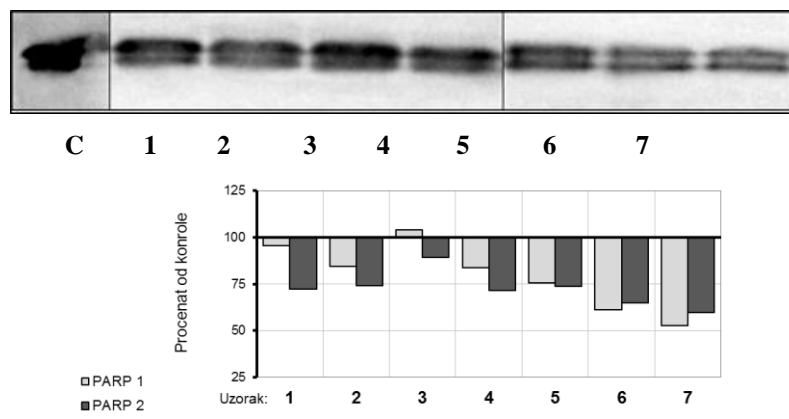
*PARP- ekspresija proteina*

Sniženi nivo ekspresije PARP 1 proteina i PARP 2 proteina kod ćelijske linije HT-29 pokazan je za sve doze u odnosu na nezračenu kontrolu osim kod doza 0,05Gy, 0,07Gy i 0,05 +2Gy u režimu zračenja I za protein PARP 1 gde je pokazana povećana ekspresija proteina u odnosu na nezračenu kontrolu (Slika 26).

A.



B.



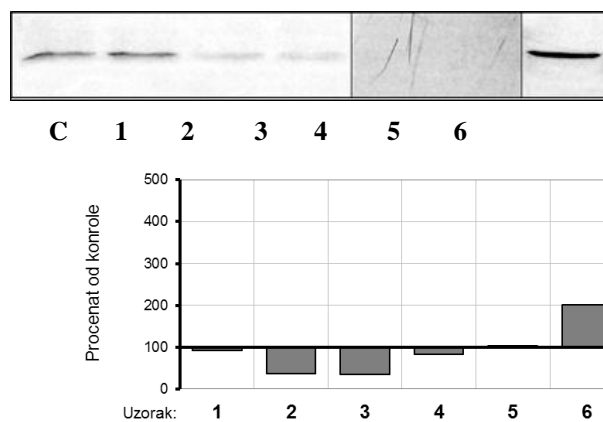
Slika 26. Ekspresija PARP proteina kod HT-29 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

## 6.5.2. Uticaj različitih režima zračenja na ekspresiju proteina kod MRC-5 ćelijske linije

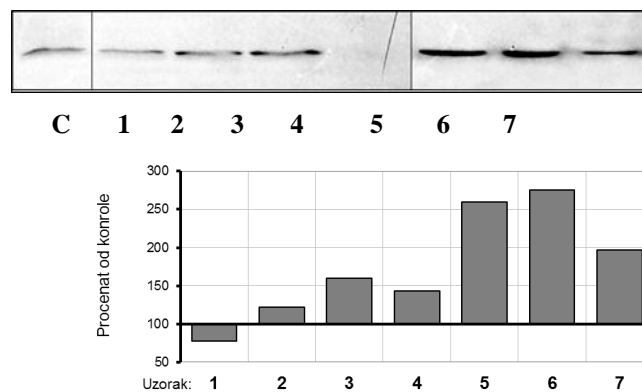
### *P53- ekspresija proteina*

Kod MRC-5 ćelijske linije pokazana je ekspresija proteina p53 za doze od 0,07Gy u režimu zračenja II, 0,03+2Gy, 0,05+2Gy i 0,07+2 Gy u oba režima, za sve ostale doze ekspresija proteina p53 je bila niža od kontrole ili približno kao i ekspresija kod ćelija koje nisu zračene (Slika 27).

**A.**



**B.**

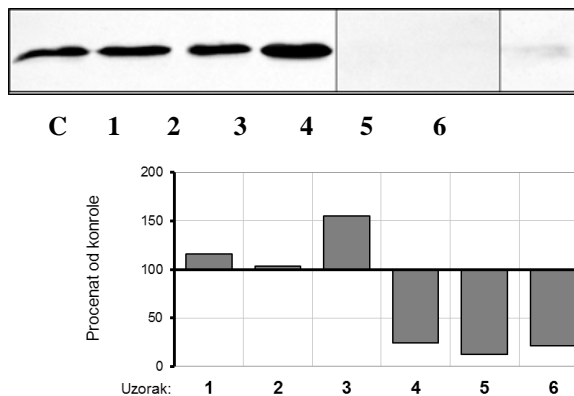


Slika 27. Ekspresija P53 proteina kod MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

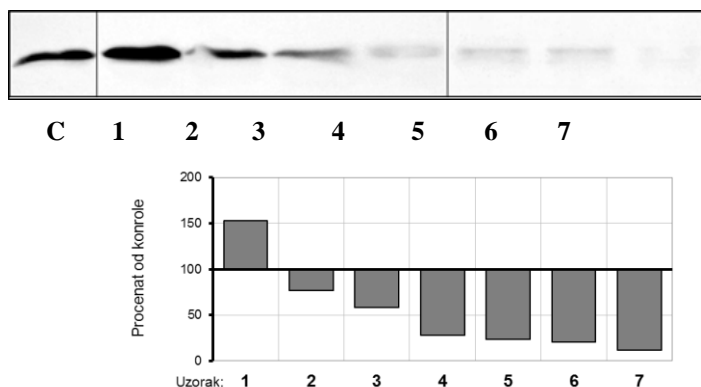
*p38 MAPK - ekspresija proteina*

Kod ćelijske linije MRC-5 za isporučene doze od 0,03Gy, 0,05Gy, i 0,07Gy samo prvog dana i za dozu od 2Gy dnevno u toku 4 dana dobijena je pozitivna ekspresija p38 MAPK u odnosu na kontrolu. Za sve ostale aplikovane doze dobijen je niži nivo ekspresije u odnosu na kontrolu (Slika 28).

A.



B.



Slika 28. Ekspresija p38 MAPK proteina kod MRC5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4- 0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

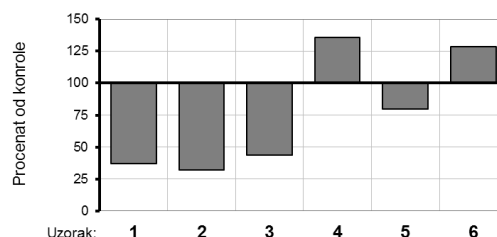
*Bcl-2 - ekspresija proteina*

Kod ćelijske linije MRC-5 pokazana je ekspresija proteina Bcl-2 nakon isporuke doza od 0,03Gy, 0,05Gy, 0,07Gy, 0,03+2Gy, 0,05+2Gy i 0,07+2Gy u režimu zračenja II viša od nivoa nezračene kontrole (Slika 29).

A.

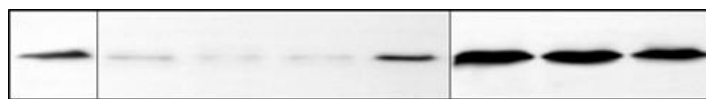


C 1 2 3 4 5 6

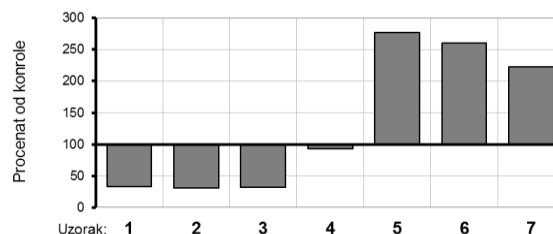


Uzorak: 1 2 3 4 5 6

B.



C 1 2 3 4 5 6 7



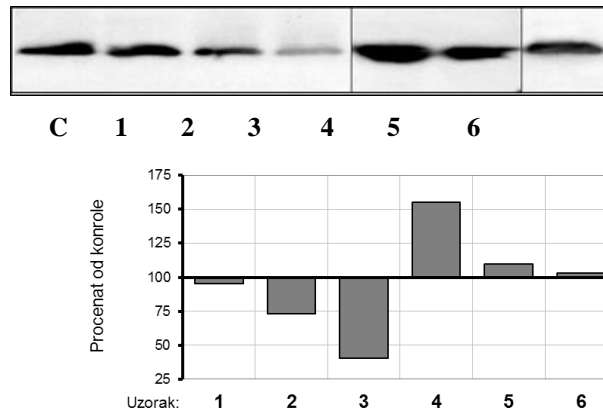
Uzorak: 1 2 3 4 5 6 7

Slika 29. Ekspresija Bcl-2 proteina kod MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

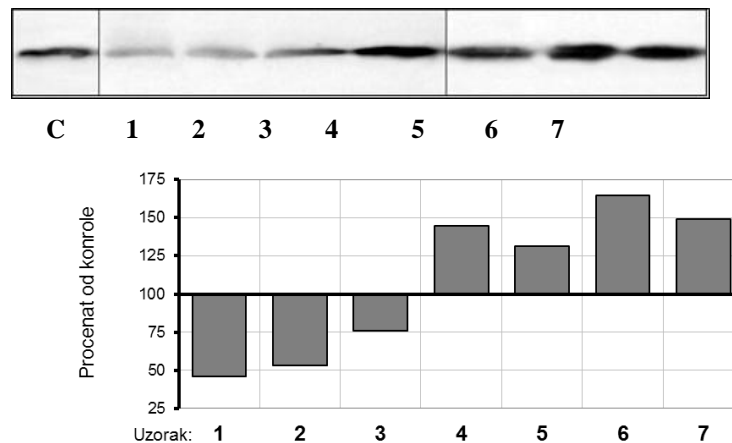
*Bax - ekspresija proteina*

Kod ćelijske linije MRC-5 koja je primila doze od 0,07+2Gy u režimu zračenja I i 0,03Gy, 0,05Gy, 0,07Gy, 0,03+2Gy, 0,05+2Gy i 0,07+2Gy u režimu zračenja II detektovan je viši nivo ekspresije proteina Bax u odnosu na kontrolu koja nije primila JZ (Slika 30).

A.



B.

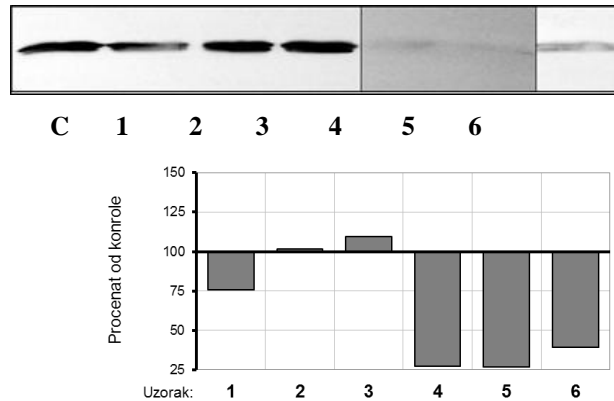


Slika 30. Ekspresija Bax proteina kod MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

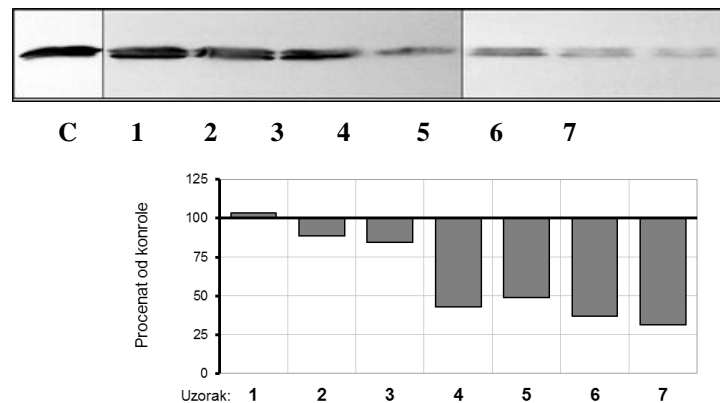
*Citohrom c- ekspresija proteina*

Kod MRC-5 ćelijske linije za doze od 2Gy i doze od 0,05Gy i 0,07Gy u režimu zračenja I pokazan je viši nivo ekspresije proteina citohrom *c* u odnosu na kontrolu koja nije zračena (Slika 31).

A.



B.



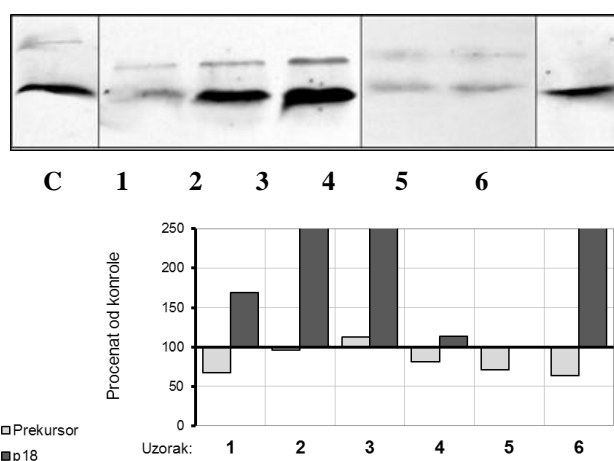
Slika 31. Ekspresija citohrom *c* proteina kod MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4- 0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.



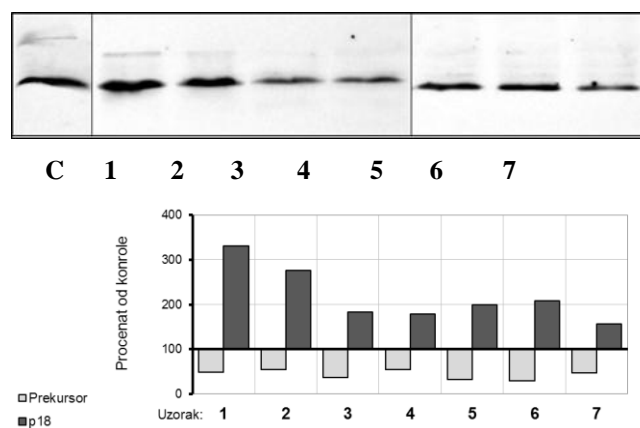
*Kaspaza 3 - ekspresija proteina*

Kod ćelijske linije MRC-5 za sve doze osim 0,05Gy svaki dan pokazan je povišen nivo ekspresije aktivnog oblika kaspaze 3 u odnosu na kontrolu. Dobijen je i viši nivo ekspresije kod MRC-5 ćelija koje su primile dozu od 0,07Gy u toku prvog dana, za sve preostale doze dobijen je niži nivo ekspresije prekursora kaspaze 3 (Slika 32).

A.



B.

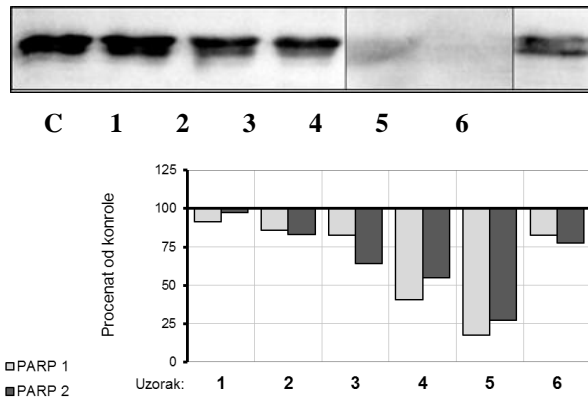


Slika 32. Ekspresija kaspaza 3 proteina kod MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4- 0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

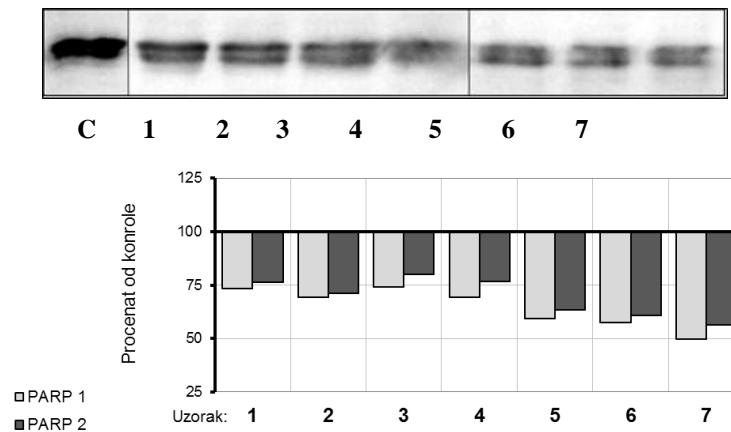
*PARP- ekspresija proteina*

Kod ćelijske linije MRC-5 nakon iradijacije sa svim planiranim dozama JZ dobijen je niži nivo ekspresije i PARP 1 i PARP 2 proteina u odnosu na kontrolu koja nije primila JZ (Slika 33).

A.



B.



Slika 33. Ekspresija PARP proteina kod MRC-5 ćelijske linije u režimima zračenja I i II. C – nezračena kontrola A. 1 - 0,03Gy I; 2 – 0,05Gy I; 3 – 0,07Gy I; 4-0,03Gy II; 5 – 0,05Gy II; 6 – 0,07Gy II. B. 1 – 2Gy; 2 – 0,03+2Gy I; 3 – 0,05+2Gy I; 4 – 0,07+2Gy I; 5 – 0,03+2Gy II; 6 – 0,05+2Gy II; 7 – 0,07+2Gy II.

## 7. DISKUSIJA

U ovom istraživanju ispitivan je radiobiološki odgovor dve humane ćelijske linije: adenokarcinoma kolona, HT-29, i normalnih fibroblasta pluća, MRC-5, na dva različita režima zračenja. U okviru biološkog odgovora praćeno je preživljavanje ćelija (vijabilnost ćelija), stepen oštećenja naslednog materijala i promene u ekspresiji proteinskih komponenti signalnih puteva – p53, apoptoze, PARP i p38 MAPK.

Vijabilnost ćelija izloženih primenjenim režimima zračenja ispitana je standardnim kolorimetrijskim testom koji koristi tetrazolijum so MTT. Ovim testom se procenjuje metabolička aktivnost ćelija, odnosno aktivnost mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze da redukuje MTT u nerastvorljivi formazan. Određen broj ćelija preživi zračenje uz manja ili veća oštećenja koja se mogu preneti na neposredne potomke pri čemu posledice oštećenja mogu biti različite uključujući poremećaje u proliferaciji ćelije. Stoga je preživljavanje zračenih ćelija praćeno 72h što približno odgovara periodu od dva ili tri ćelijska ciklusa čime je obuhvaćena najmanje još jedna generacija potomaka iste ćelije.

Izlaganje HT-29 i MRC-5 ćelija samo niskim pre-iradijacionim dozama JZ, u režimima I i II izazvalo je povećano preživljavanje obe vrste ćelija, ali su razlike očigledne i zavise od načina primene pre-iradijacionih doza JZ. Jednokratno izlaganje niskim dozama JZ (režim zračenja I), osim doze od 0,07Gy u HT-29 ćelijama, podjednako je povećalo preživljavanje obe vrste ćelija, u poređenju sa višekratnom primenom istih doza JZ (režim zračenja II). Preživljavanje HT-29 ćelija je značajno veće u poređenju sa preživljavanjem fibroblasta pluća MRC-5 za sve niske doze JZ. Ipak, jasno se uočava da je odgovor HT-29 ćelija, za razliku od MRC-5 ćelija, zavisao od doze JZ bez obzira da li su primenjene jedanput ili više puta: preživljavanje HT-29 ćelija smanjivalo se s povećanjem doze zračenja.

Poznato je da niske doze JZ mogu povećati preživljavanje ćelija, ali i da odgovor različitih ćelija na istu dozu JZ ne mora biti istovetan [39,76]. U ovom istraživanju može se uočiti da radiobiološki efekti u malignim HT-29 i normalnim

MRC-5 ćelijama zavise od veličine pre-iradijacione doze JZ. Tako je najveće preživljavanje obe vrste ćelija postignuto nakon izlaganja najmanjoj dozi (0,03Gy) JZ, dok je doza od 0,07Gy smanjila preživljavanje HT-29 ćelija u oba režima zračenja, a pod istim uslovima indukovala aditivni efekat i povećano preživljavanje zdravih, MRC-5 ćelija. Bilo je očekivano da višekratna primena niskih doza JZ na HT-29 ćelije izazove slabije preživljavanje ćelija u poređenju sa nezračenom kontrolom. Međutim, posmatrajući trend preživljavanja ćelija u režimu zračenja II kod obe ćelijske linije, može se zapaziti da se kod HT-29 ćelija, za razliku od zdrave ćelijske linije, vijabilnost smanjuje sa povećanjem doze što se može objasniti razvojem fenomena hiperradiosenzitivnosti. Hiperadiosenzitivni fenomen zabeležili su mnogi autori za doze JZ manje od 0,5Gy [78,79,95].

Preživljavanje HT-29 i MRC-5 ćelija praćeno je i nakon primene dva režima adaptivnog zračenja (režimi zračenja I i II, pre-iradijacione doze praćene sa 2Gy) koji su se razlikovali samo u broju primljenih pre-iradijacionih doza JZ. U režimu zračenja I ćelije su jednokratno, samo prvog dana, primile odgovarajuću pre-iradijacionu dozu JZ, a u režimu II svaki dan tokom četvorodnevog zračenja, 4h pre konvencionalne doze od 2Gy. Značajne promene primećene su u odgovoru HT-29 ćelija na dozu od 0,07Gy. U oba režima zračenja, mada više nakon primene režima zračenja II, beleži se pad vijabilnosti u odnosu na kontrolne vrednosti. Slično su, u istim uslovima, odgovorile i MRC-5 ćelije.

Podaci iz literature o efektima niskih doza zračenja ukazuju na različite rezultate. Schwarz i sar. [39] su dobili statistički značajno niže preživljavanje HT-29 ćelija i humanih fibroblasta za doze od 0,05Gy i 0,1Gy u odnosu na nezračenu kontrolu. Joo i sar. [180] nisu dobili statistički značajnu razliku u preživljavanju ćelija bazofilne leukemije pacova, RBL-2H3, merenu MTT testom za doze ispod 0,1Gy. Navedeni rezultati dobijeni su nakon jednokratnog zračenja niskim dozama JZ. U našem istraživanju uz pomoć MTT testa, nakon isporuke samo niskih doza JZ u oba režima zračenja, osim za dozu od 0,07Gy, beležimo povećane vrednosti apsorbance u obe ćelijske linije. Neobično je da je doza od 0,07Gy data u toku četiri dana izazvala proliferativni efekat u odnosu na jednokratnu dozu od 0,07Gy. Odgovor ćelijskih linija nakon primene niskih doza JZ može da dovede do radiorezistencije i kod tumorskih i kod zdravih ćelijskih linija [181]. Treba napomenuti da je primenom doza od 0,03Gy i 0,05Gy dobijena povećana ćelijska

vijabilnost i nakon jednokratne i nakon višekratne isporuke JZ, što bi moglo biti posledica razvijanja radiorezistencije za pomenute doze kod ove dve ćelijske linije. Moguće je da bi dobijenu radiorezistenciju zamenila hiperradiosenzitivnost nakon povećanog broja frakcija, kao što su opisali Marples i sar. [80].

Dobijeni rezultati preživljavanja ćelija nakon primenjenih režima zračenja prikazani su u formi procentualnog odnosa prema ćelijama ozračenim samo sa 2Gy u toku četiri dana tj. bez primene pre-iradijacionih doza. Poređenjem vijabilnosti MRC-5 ćelija zračenih sa 2Gy, sa vijabilnošću MRC-5 ćelija nakon pre-iradijacije praćene dozom od 2 Gy (radioadaptivno zračenje), u oba režima zračenja, nije dobijena statistički značajna razlika. Kod HT-29 ćelija pri radioadaptivnom zračenju u režimu II beleži se povećano preživljavanje za niže preiradijacione doze koje je statistički značajno u odnosu na vijabilnost HT-29 ćelija zračenih sa 2Gy. Jedino smanjeno preživljavanje HT-29 ćelija u režimu zračenja II (oko 25%) zabeleženo je nakon doze od 0,07+2Gy u poređenju sa rezultatom dobijenim nakon isporuke 2Gy. U eksperimentima koji su opisali [39-41] pre-iradijacija ćelija sa 0,05Gy nakon koje je sledila znatno viša doza JZ, značajno je smanjila vijabilnost tumorskih ćelija dok je vijabilnost zdravih ćelija bila neznatno veća ili manja u odnosu na dozu bez pre-iradijacije. Nasupot ovome, pored smanjenja vijabilnosti, postoje studije koje pokazuju da nakon inicijalne (*engl.* priming) doze dolazi i do povećane vijabilnosti. Razlog za ovako različite rezultate mogu biti različite pre-iradijacione doze. Najčešće su korišćene pre-iradijacione doze u intervalu od 0,01Gy do 0,1Gy mada su korišćenene i doze izvan pomenutog opsega [39-41,76,77,182,183]. Jiang i sar. [184] su primenom jednokratnog zračenja niskim dozama koja su praćena jednokratnom visokom dozom jonizujućeg zračenja, takodje indukovali radioadaptivni odgovor MRC-5 ćelija i to za dozu od 0,075Gy nakon koje je sledila doza od 4Gy. Korišćena pre-iradijaciona doza je veoma približna onoj koju smo mi koristili, i koja je, u režimu zračenja I, izazvala povećanu vijabilnost MRC-5 ćelija u poređenju sa dozom od 2Gy, iako ne i statistički značajnu. Radioadaptivni odgovor u ovoj studiji, kao i u našem istraživanju, dobijen je korišćenjem humanih fibroblasta [184].

Sagledavajući dostupne literaturne podatke, uočava se širok spektar različitih rezultata koji se zajednički mogu svesti na to da se primenom pojedinih niskih doza može modulirati odgovor ćelija na zračenje u smislu senzitivirajućeg efekta (smanjene vijabilnosti) ili poštednog efekta (povećane vijabilnosti) pri korišćenju različitih

ćelijskih linija i režima zračenja [39-41,76,77,182,183]. Na osnovu rezultata preživljavanja HT-29 i MRC-5 ćelija u ovom istraživanju, može se zaključiti da se u radioterapijskom smislu, koji podrazumeva poštedu zdravih ćelija i maksimalni efekat JZ na tumorske ćelije, odgovarajući biološki odgovor dobija nakon 0,05+2Gy u režimu zračenja I i nakon 0,07+2Gy u režimu zračenja II.

Izlaganje ćelija jonizujućem zračenju može dovesti do različitih ishoda uključujući i promene na nivou hromozoma. Uticaj različitih režima zračenja na integritet hromozoma i merenje stepena oštećenja hromozoma u ovom istraživanju urađeno je testom mikronukleusa (CBMN). Test mikronukleusa je široko rasprostranjen standardni test genotoksičnosti kojim se pouzdano može pratiti odgovor ćelija na niske doze jonizujućeg zračenja [185,186]. Incidencija mikronukleusa u HT-29 ćelijama nakon jednokratne ili višekratne primene samo niskih doza JZ nije bila statistički značajno veća u poređenju sa nezračenim kontrolnim uzorcima za sve aplikovane doze. Međutim, u MRC-5 ćelijama, iste niske doze JZ izazvale su dozno-zavisno povećanje incidencije mikronukleusa. Razlike u incidenciji MN bile su statistički značajne u odnosu na nezračenu kontrolu, ali ne i između isporučenih doza.

Porast incidencije MN u obe ćelijske linije pratio je povećanje doze JZ u oba radioadaptivna režima zračenja (terapijska doza od 2Gy nakon niske pre-iradijacione doze). Statistički značajne razlike dobijene su nakon doza od 0,05+2Gy i 0,07+2Gy u režimu zračenja I odnosno nakon svih doza u režimu zračenja II u HT-29 ćelijama u odnosu na nezračenu kontrolu. U MRC-5 ćelijama nakon radioadaptivnog zračenja sve doze u oba režima zračenja indukovale su statistički značajno više MN u odnosu na kontrolu. Sagledavajući dobijene rezultate testa mikronukleusa primećujemo da radioadaptivni tip zračenja (niske doze JZ praćene terapijskom dozom od 2Gy) ni u jednom od dva dizajnirana režima nije pokazao manju incidenciju MN u odnosu na zračenje u dozi od 2Gy (samo doza od 2Gy isporučena u toku četiri dana). Test mikronukleusa je veoma dobar i osetljiv test za određivanje radiosenzitivnosti [187,188]. Dobijeni rezultati ukazuju da je stepen oštećenja hromozoma kod vijabilnih ćelija za većinu isporučenih doza pokazao trend dozne zavisnosti.

Jonizujuće zračenje može oštetiti svoj primarni ciljnik, DNK, direktno ili indirektno, a najvažniji tip lezija jesu jednolančani i dvolančani prekidi DNK molekula. Ukoliko se oštećenja ne poprave nastala lezija u DNK može odvesti ćeliju u apoptozu kada enzimi cepaju DNK u fragmente veličine oko 180bp koji se mogu detektovati elektroforezom. Testom DNK fragmentacije kod HT-29 ćelija za samo pre-iradijacionu dozu od 0,07Gy u oba režima zračenja i za sve tri niske pre-iradijacione doze praćene terapijskom dozom od 2Gy u režimu zračenja II pronađeni su fragmenti manji od 200bp, što ukazuje da je došlo do apoptoze. U MRC-5 ćelijskoj liniji fragmenti DNK manji od 200bp detektovani su za sve primenjene doze zračenja, osim za dozu 0,03Gy+2Gy u režimu zračenja II.

Razlika u odgovoru između HT-29 i MRC-5 ćelijske linije u testu fragmentacije DNK mogla bi se objasniti različitim odgovorom zdrave i tumorske ćelije na stres. Na osnovu dobijenih rezultata, apoptoza je testom DNK fragmentacije registrovana kod MRC-5 za gotovo sve doze zračenja u oba režima, a ovakav odgovor nije nađen kod HT-29 ćelija. Ova razlika suštinski može biti uslovljena mutacijama p53 gena kod tumorskih ćelija i polimorfizmom p38 MAPK, kao i njegove uloge u odgovoru na niske doze jonizujućeg zračenja kod tumorskih ćelija, što može da vodi ka radiorezistenciji tumorskih ćelija [164].

Ghardi i sar. [189] su na mononuklearnim ćelijama krvi nakon izlaganja niskim dozama jonizujućeg zračenja takođe dobili fragmente koji ukazuju na proces apoptoze. Test fragmentacije DNK su koristili i drugi autori da bi detektovali odgovor ćelija na jonizujuće zračenje [190,191]. Istraživanja su pokazala da odgovor zavisi od doze zračenja (postoji dozna zavisnost), što smo i mi dobili u ovom istraživanju za HT-29 ćelije. Takođe, odgovor može biti veoma različit zavisno od vrste ćelija na kojima se ispituje fragmentacija DNK izazvana JZ [190,191].

U cilju sagledavanja efekta JZ na primarnu sekvencu DNK, odabran je fragment p53 gena, prema Liu i Bodmer [177]. Iako je pokazan dozno-zavisni trend u smislu povećanja broja mutacija sa povećanjem doze, generalno možemo zaključiti da ovaj test nije adekvatan u sagledavanju efekata JZ na tumorske i zdrave ćelije, u primenjenom dizajnu naših eksperimenata. Razlog tome su višestruke neuspešne amplifikacije željenog fragmenta p53 gena i razlike u primarnoj sekvenci p53 gena tumorskih i zdravih ćelija. Stoga nije bilo moguće odrediti referentnu kontrolu za

međusobna poređenja, te bi preporuka bila da se u ovim ispitivanjima koristi sekvenca DNK koja je istovetna u tumorskim i zdravim ćelijama.

Ekspresija proteina u signalnim putevima preživljavanja i apoptoze analizirana je Western blot metodom. Ovim istraživanjem obuhvaćena je ekspresija p53, p38 MAPK, PARP, Bax, Bcl-2, citohrom *c* i kaspaza 3 proteina. Nivo ekspresije svakog proteina ponaosob prikazan je u odnosu na nivo ekspresije nezračene kontrole. Pored toga, prikazane su razlike u ekspresiji proteina zavisno od režima zračenja (I i II), i poređeni su odgovori dobijeni u okviru režima zračenja I i II u odnosu na kontrolno zračenje od 2Gy. Analize su urađene za svaku ćelijsku liniju ponaosob, a na kraju su analizirane razlike u nivou ekspresije ispitivanih proteina između ćelijskih linija HT-29 i MRC-5.

Ekspresija **p53** proteina u MRC-5 ćelijama je niža za sve jednokratno primenjene niske doze JZ, dok je u HT-29 ćelijama, u istim uslovima, ekspresija p53 veća samo za dozu od 0,07Gy u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Višekratna primena niskih doza JZ povećala je ekspresiju proteina p53 u MRC-5 ćelijama samo za dozu od 0,07Gy, dok je u HT-29 ćelijama za istu dozu ekspresija niža od kontrole. Viši nivo ekspresije beleži se za doze od 0,03Gy i 0,05Gy kod HT-29 ćelijske linije. Oba režima radioadaptivnog zračenja, u obe ćelijske linije izazivaju viši nivo ekspresije p53 u odnosu na kontrolu i u odnosu na isporučenu dozu od 2Gy bez pre-iradijacije.

U literaturi postoji mnogo podataka o delovanju/ekspresiji p53 nakon izlaganja visokim dozama jonizujućeg zračenja, a mnogo manje kada su u pitanju niske doze JZ. Povišena ekspresija p53 može da vodi ka apoptozi, popravci oštećenja u DNK ili zaustavljanju ćelijskog ciklusa (G1/G2 arestu) [115,192,193]. Shin i sar. [194] pokazali su da niske doze JZ deluju protektivno i da mogu suprimirati aktivaciju p53 nastalu nakon citotoksičnog efekta. Takođe, Enns i sar. [79] ukazuju da je za aktivaciju p53 niskim dozama JZ koja vodi ka apoptozi potrebno da zračenje izazove potreban nivo oštećenja u ćeliji. Rezultati dobijeni za niske doze JZ u ovom istraživanju su značajni jer pokazuju kod kojih niskih doza dolazi do povećane ili snižene ekspresije p53 proteina u odnosu na nezračenu kontrolu od čega može da zavisi dalji odgovor ćelije na JZ.



U MRC-5 ćelijama dobijena je povišena ekspresija p38 MAPK za uzorke koji su jednokratno primili samo niske doze JZ i dozu od 2Gy dnevno u toku 4 dana, u odnosu na nezračenu kontrolu. Za sve ostale isporučene doze JZ dobijena je niža ekspresija p38 MAPK. Kod HT-29 ćelijske linije ekspresija ovog proteina bila je niža za sve isporučene doze JZ u odnosu na nezračene ćelije.

Aktiviranje p38 MAPK signalnog puta, prema nekim autorima, u vezi je sa preživljavanjem i protektivnim dejstvom nakon primene jonizujućeg zračenja. Još uvek nije objašnjena različita uloga p38 MAPK, dok se različiti efekti p38 MAPK na apoptozu u različitim tipovima ćelija mogu pripisati heterogenosti u ekspresiji i aktivaciji različitih izoformi p38 MAPK [159,163]. Nekoliko studija je pokazalo da je aktivacija p53 proteina indukovana sa p38 MAPK i da se to dešava nakon DNK oštećenja, što ukazuje na tesnu vezu između ova dva signalna puta nakon isporuke JZ i na važnu ulogu p38 MAPK protein [162,170,194].

Profil ekspresije anti-apoptotskog regulatornog proteina **Bcl-2** u HT-29 i MRC-5 ćelijama je potpuno različit u režimu zračenja I i II, osim za dozu 0,05Gy u režimu II. Režim zračenja I u HT-29 ćelijama indukuje ekspresiju Bcl-2 koja je nešto viša od vrednosti dobijenih u kontrolnom, nezračenom uzorku, dok je za iste uslove dobijen značajno niži nivo ekspresije u MRC-5 ćelijama.

Takođe, različit nivo ekspresije Bcl-2 proteina u obe ćelijske linije dobijen je i nakon višekratne primene niskih doza JZ (režim zračenja II), s tim da je u HT-29 ćelijama ekspresija Bcl-2 značajno niža, a u MRC-5 ćelijama značajno viša (osim za dozu 0,05Gy) u poređenju sa vrednostima dobijenim iz nezračenog uzorka.

Posmatrajući ekspresiju proteina Bcl-2, kao važnog proteina u mitohondrijalnom, unutrašnjem putu apoptoze, Koehler i sar [195] su primetili da gašenje Bcl-2 proteina nije dovelo do smanjene vijabilnosti ćelija merene MTT testom što smo i mi pokazali našim eksperimentima sa HT-29 ćelijama. Međutim, Lin [196] je pokazao da niži nivo ekspresije Bcl-2 proteina dovodi do manje vijabilnosti (MTT test) ćelija humanog karcinoma pankreasa. Azimian i sar. [138], kao i Toosi i sar. [197] ukazuju da niske doze JZ same ili praćene visokim dozama (radioadaptivni tip zračenja) mogu da povećaju ekspresiju Bcl-2.

Generalno, rezultati ekspresije Bcl-2 proteina u našim eksperimentima pokazuju da je nakon isporuke JZ njegova ekspresija u tumorskim ćelijama niža što je u skladu sa nalazima Koehler i sar. [195].

Sve jednokratno ili višekratno aplikovane niske doze JZ povećale su ekspresiju pro-apoptotskog proteina **Bax** u HT-29 ćelijama u poređenju sa nezračenom kontrolom, ali nakon primene radioadaptivnog zračenja u režimima I i II nije detektovana ekspresija Bax proteina viša od nivoa nezračene kontrole. U MRC-5 ćelijama, međutim, nakon radioadaptivnog zračenja 0,07+2Gy u režimu zračenja I, kao i sve doze u režimu zračenja II, indukovale su viši nivo ekspresije proteina Bax u odnosu na kontrolne, nezračene ćelije. Ovi rezultati ukazuju na osetljivost zdrave ćelijske linije nakon navedenih doza u režimu zračenja I i II (0,07+2 Gy; 0,03+2Gy; 0,05+2Gy, 0,07+2Gy).

Ekspresija efektorne **kaspaze-3** je u obe ćelijske linije, za skoro sve doze JZ bila veća nego u nezračenoj kontroli. Prema Joiner i sar. [16] nakon isporuke samo niskih doza zračenja, <0,3Gy, dolazi do boljeg ubijanja ćelija po jedinici doze nego kada su u pitanju visoke doze koje mogu da pobude radioprotektivne mehanizme. Zapaža se da i niske doze JZ mogu da izazovu ekspresiju kaspaze-3 i konsektivno da dovedu do apoptoze, najverovatnije apoptozom koja je uslovljena aktiviranjem kaskade nakon okidanja p53 signalnog puta [115]. Povišeni nivo ekspresije efektorne kaspaze-3 govori u prilog tome da se, i pored nekih naizgled neusaglašenih rezultata u slučaju niskih doza, primenom oba režima zračenja indukuje apoptoza.

U obe ćelijske linije ekspresija **citohroma c** je niža od vrednosti dobijene u kontrolnom uzorku za gotovo sve primenjene doze JZ. U MRC-5 ćelijama nijedna primenjena doza JZ nije indukovala ekspresiju proteina PARP1 i PARP2 veću od kontrolnih vrednosti dok je u HT-29 ćelijama ekspresija PARP1 proteina neznatno veća od kontrolnih vrednosti i dobijena je za pre-iradijacione doze 0,05Gy i 0,07Gy i dozu 0,05 +2Gy u režimu zračenja I.

Nakon radioadaptivnog zračenja (niske doze praćene dozom od 2Gy), u HT-29 ćelijama primećujemo različit nivo ekspresije samo Bcl-2 proteina između režima

zračenja I i režima zračenja II. Režim zračenja I (pre-iradijacija samo prvog dana nakon koje sledi 2Gy) dovodi do višeg nivoa ekspresije Bcl-2 proteina u odnosu na niži nivo ekspresije u režimu zračenja II (svakodnevna pre-iradijacija praćena sa 2Gy). Drugi ispitivani proteini u HT-29 ćelijskoj liniji nisu pokazali opisanu razliku u ekspresiji proteina između radioadaptivnog zračenja režima I i režima zračenja II. Ukoliko poredimo ekspresiju proteina nakon zračenja dozom od 2Gy bez pre-iradijacije sa radioadaptivnim zračenjem u oba režima primećujemo razliku u ekspresiji proteina p53, Bax i kaspaze-3. Ekspresija proteina p53 i kaspaze-3 je niža nakon zračenja dozom od 2Gy a viša nakon radioadaptivnog zračenja u oba režima zračenja. Kod Bax proteina beležimo suprotno, odnosno višu ekspresiju proteina nakon zračenja dozom od 2Gy. Evaluacijom rezultata ekspresije proteina nakon delovanja samo niskih doza JZ u režimu zračenja I (niske doze samo prvi dan) nasuprot režima zračenja II (multiple niske doze) različit nivo ekspresije dobijen je za proteine p53 i Bcl-2. Kada su u pitanju samo niske doze JZ, nivo ekspresije proteina p53 je viši u režimu zračenja II nego nakon primene režima zračenja I, dok je ekspresija Bcl-2 proteina, suprotno, viša u režimu zračenja I. Takođe, unutar režima zračenja I, poredeći samo niske doze JZ nasuprot radioadaptivnom zračenju, mogu se primetiti razlike u ekspresiji p53 i Bax proteina. Sličan fenomen se u režimu zračenja II zapaža za Bax protein.

Nakon radioadaptivnog zračenja MRC-5 ćelijske linije primećujemo različit nivo ekspresije Bcl-2 i Bax proteina između režima zračenja I i II. Ekspresija Bax i Bcl-2 proteina je niža u režimu zračenja I (pre-iradijacija samo prvog dana nakon koje sledi 2Gy) od one dobijene u režimu zračenja II (svakodnevna pre-iradijacija praćena sa 2Gy). Od navedenog trenda odstupa doza 0,07 +2 Gy u režimu zračenja I jer uslovljava povišenu ekspresiju Bax proteina. Za druge ispitivane proteine nije nađena razlika u ekspresiji između radioadaptivnog zračenja režima I i II. Ukoliko poredimo ekspresiju proteina nakon zračenja dozom od 2Gy bez pre-iradijacije sa radioadaptivnim zračenjem u oba režima, primećujemo razliku u ekspresiji p38 MAPK, citohrom C i p53 proteina. Ekspresija proteina p38 MAPK i citohroma c je viša nakon zračenja dozom od 2Gy u odnosu na nižu ekspresiju pomenutih proteina nakon radioadaptivnog zračenja u oba režima; kod proteina p53 beležimo suprotno - nižu ekspresiju nakon zračenja dozom od 2Gy. Evaluacijom rezultata ekspresije

proteina nakon delovanja samo niskih doza JZ u oba režima zračenja, utvrđen je različit nivo ekspresije Bax, Bcl-2 i p38 MAPK proteina. Ekspresije Bax i Bcl-2 proteina je viša u režimu zračenja II, a ekspresija p38 MAPK je suprotno, viša u režimu zračenja I. Takođe, unutar režima zračenja I, poredeći samo niske doze JZ nasuprot radioadaptivnom zračenju, mogu se primetiti razlike u ekspresiji p53, citohrom *C* i p38 MAPK proteina. Sličan fenomen se ne zapaža u režimu zračenja II.

Poznato je da od odnosa proapoptotskih i antiapoptotskih članova Bcl-2 porodice zavisi mitohondrijalni put apoptoze [198]. Proteini Bax i Bcl-2 su veoma bitni u regulaciji unutrašnjeg apoptotskog puta [199,130,131,134,136,137,139]. Aktivacija i povišena ekspresija Bax proteina i niži nivo ekspresije Bcl-2 proteina dovodi do kaskade koja vodi ka aktiviranju kaspaze-3 i apoptoze [130,131]. Prilikom radioadaptivnog zračenja, između režima I i II, zabeležena je razlika u ekspresiji ispitivanih proteina koja se može objasniti delovanjem niskih pre-iradijacionih doza na modulisanje radiobiološkog odgovora obe ćelijske linije (HT-29 i MRC-5). Evaluacijom ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u obe ćelijske linije smatramo da je njihova ekspresija kao i njihov međusobni odnos veoma važan deo radioadaptivnog zračenja, odnosno da su razlike u ekspresiji ovih proteina odraz različitog radiobiološkog odgovora koji opet zavisi od primenjenog režima zračenja.

Utvrđena je i razlika u ekspresiji proteina između radioadaptivnog zračenja u oba režima (I i II) i zračenja sa samo 2Gy u toku četiri dana. Razlika je utvrđena za ekspresiju p53, Bax i kaspaze-3 proteina kod HT-29 ćelijske linije i p38 MAPK, citohrom *c* i p53 proteina kod MRC-5 ćelija. Poznato je da p38 MAPK reguliše različite aktivnosti u ćeliji: proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu ili preživljavanje, zapaljenje i urođeni imunitet. Jedna od uloga p38 MAPK ogleda se u ranoj fazi, pre mitohondrijalne disfunkcije i aktivacije kaspaze-3 preko mitohondrijalnog unutrašnjeg signalnog puta [115]. Nasuprot ulozi u aktivaciji kaspaze-3, p38 MAPK može da, u uslovima prekomerne ekspresije ili inhibicije, dovede do smanjenog otpuštanja citohroma *c* i smanjenog aktiviranja kaspaze-3 nakon zračenja [163]. Takođe je poznato da nakon radioadaptivnog zračenja dozama koje su slične dozama u našem eksperimentu, dolazi do povišene ekspresije proteina p53 što smo pokazali u našem istraživanju i to za radioadaptivno zračenje u oba režima u obe ćelijske

linije [62,66,106,200,201]. Dokaz da radioadaptivno zračenje deluje drugačijim mehanizmom od neadaptivnog, potvrđuje i razlika u ekspresiji citohroma *c* između radioadaptivnog zračenja u oba režima i samo zračenja sa 2Gy u MRC-5 ćelijskoj liniji. Citohrom *c* je bitan činilac apoptotskog puta i značajan aktivator kaspaze-3 [109]. Još jedan dokaz o drugačijem molekularnom odgovoru između radioadaptivnog i neradioadaptivnog odgovora predstavlja i ekspresija proteina za niske doze JZ u režimu zračenja I: nivo ekspresije p38 MAPK, citohroma *c* i p53 sličniji je rezultatima dobijenim za dozu od 2Gy nego za radioadaptivni režim zračenja I.

Analizirajući radioadaptivno zračenje između HT-29 i MRC-5 ćelijske linije u oba režima zračenja (I i II) primećuju se razlike u ekspresiji proteina Bax i Bcl-2. Naime, u HT-29 ćelijama nakon radioadaptivnog zračenja u oba režima, za Bax protein beleži se niži nivo ekspresije u poređenju sa nezračenom kontrolom, za razliku od MRC-5 ćelija kod kojih je za sve doze, osim za 0,03+2Gy i 0,05+2Gy u režimu zračenja I, nađen viši nivo ekspresije Bax proteina. Takođe i nivo ekspresije Bcl-2 proteina nakon primene radioadaptivnog zračenja u oba režima pokazuje suprotan trend (kao slika u ogledalu) poredeći HT-29 i MRC-5 ćelijsku liniju. Unutrašnji put apoptoze reguliše familija Bcl-2 proteina. Pro-apoptotski i anti-apoptotski signali koji se paralelno aktiviraju i oba konvergiraju ka membrani mitohondrija koja će, u slučaju da preovladaju pro-apoptotski signali, postati propustljiva [192,202]. I Bcl-2 i Bax protein kontrolišu drugi proteini i signalni putevi, između ostalih i protein p53 [203]. Različita ekspresija p53 proteina u zdravim i tumorskim ćelijama se može objasniti time što kod više od 50 posto tumora postoji mutacija upravo u p53 genu. Kastan i sar [204] navode da različit odgovor p53 proteina umnogome zavisi od mutacija u kodirajućem delu gena p53. Ekspresija proteina p53 može da vodi, u zavisnosti od aktiviranja nishodnih signalnih puteva, do apoptoze ili preživljavanja ćelija [109,110,205].

Takođe, važnu ulogu u regulaciji unutrašnjeg puta apoptoze i kontrolu Bax protein ima p38 MAPK. Poznato je da p38 MAPK deluje na propustljivost mitohondrijalne membrane i oslobađanje citohroma *c*. Jedan od načina na koji p38MAPK deluje na apoptozu može da bude i uticaj na fosforilaciju p53 što u daljem toku može uticati na p53-zavisnu apoptozu. Svi mehanizmi koji deluju na

smanjenu inhibiciju p38 MAPK konsektivno dovode do toga da nakon zračenja nema adekvatnog odgovora koji vodi ka apoptozi sprečavajući delovanje Bax proteina u njegovoj ulozi destabilizacije mitohondrijalne membrane [159]. Veoma je verovatno da su Bax i Bcl-2 jedni od ključnih proteina uključenih u radiobiološki odgovor nakon radioadaptivnog zračenja kod obe ispitivane ćelijske linije. Takođe veoma je važno naglasiti da ekspresija Bcl-2 i Bax proteina zavisi od p53 i p38 MAPK signalnog puta [206]. U ovom istraživanju pokazana je razlika u ekspresiji proteina u odnosu na ispitivane ćelijske linije, odnosno razlika između tumorske HT-29 i zdrave MRC-5 ćelijske linije.

Rezultati ekspresije proteina doprineli su ostvarivanju i poslednjeg cilja ovog istraživanja - utvrđena je promena ekspresije proteina u signalnim putevima apoptoze kao i njihova veza sa p53 i p38 MAPK signalnim putevima. Time je dat doprinos rasvetljavanju molekularnih mehanizma koji leže u osnovi ćelijskog odgovora zdravih i tumorskih ćelija na samo niske pre-iradijacione doze jonizujućeg zračenja, kao i na radioadaptivno zračenje.

## 8. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata istraživanja radiobioloških efekata niskih pre-iradijacionih doza na humane ćelijske linije kolorektalnog karcinoma (HT-29) i fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), može se zaključiti:

1.

Izlaganje ćelija niskim pre-iradijacionim dozama JZ, jednokratno ili višekratno, izazvalo je povećano preživljavanje HT-29 i MRC-5 ćelija.

- Jednokratno izlaganje niskim dozama JZ podjednako je povećalo preživljavanje obe vrste ćelija s tim da je doza od 0,07Gy za oko 14% smanjila preživljavanje HT-29 ćelija u poređenju sa MRC-5 ćelijama.
- Višestruko izlaganje ćelija niskim dozama JZ značajno je povećalo preživljavanje HT-29 ćelija u poređenju sa humanim fibroblastima pluća MRC-5.
- Odgovor HT-29 ćelija na jednokratnu i višekratnu primenu niskih doza JZ bio je dozno zavisn - veće doze su izazvale slabije preživljavanje HT-29 ćelija, dok se odgovor MRC-5 ćelija u istim uslovima nije značajnije menjao bez obzira na tip zračenja.

Vijabilnost HT-29 ćelija nakon zračenja prema režimu I je niža nego nakon zračenja u režimu II u poređenju sa netretiranim ćelijama.

- Iako zračenje u režimu II značajno povećava preživljavanje HT-29 ćelija jasna je tendencija opadanja, tako da je za dozu 0,05+2Gy preživljavanje na nivou netretiranih ćelija, a dozu od 0,07+2Gy preživi svega 40% HT-29 ćelija.
- Odgovor MRC-5 ćelija na oba režima zračenja je ujednačen, ali je preživljavanje niže nakon zračenja u režimu II; razlika u preživljavanju ćelija za dozu zračenja 0,07+2Gy između dva režima zračenja je oko 20%.

Na osnovu ovih rezultata zaključujemo da višekratna primena niskih doza JZ nije značajno smanjila vijabilnost HT-29 ćelija, dok su dve radioadaptivne doze (0,05+2Gy i 0,07+2Gy), adekvatne doze JZ za radioterapijski postulat poštede zdravih ćelija i bolji antitumorski efekat u odnosu na neradioadaptivno zračenje od 2Gy u toku 4 dana.

Ovim je postignut jedan od ciljeva istraživanja - pokazana je mogućnost modulisanja ćelijskog odgovora na JZ uz pomoć niskih doza JZ koje su praćene dozom od 2Gy (radioadaptivni tip zračenja) u oba dizajnirana režima zračenja;

2.

- Incidencija mikronukleusa u HT-29 ćelijama nakon jednokratne ili višekratne primene samo niskih doza JZ nije bila statistički značajno veća u poređenju sa nezračenim kontrolnim uzorcima za sve aplikovane doze.
- U MRC-5 ćelijama, iste niske doze JZ izazvale su dozno-zavisno povećanje incidencije mikronukleusa. Razlike u incidenciji MN bile su statistički značajne u odnosu na nezračenu kontrolu, ali ne i između isporučenih doza.
- Porast incidencije MN u obe ćelijske linije pratio je povećanje doze JZ u oba radioadaptivna režima zračenja.

Rezultati ukazuju da je stepen oštećenja hromozoma za većinu isporučenih doza pokazao dozno zavisni trend i da predstavlja adekvatan test za određivanje stepena oštećenja hromozoma nakon dejstva JZ.

Dozno-zavisno oštećenje naslednog materijala izazvano radioadaptivnim zračenjem potvrđuje hipotezu da je stepen oštećenja zdravih, MRC-5, ćelija manji nego u ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma, čime je takođe ispunjen jedan od ciljeva ovog istraživanja;

3.

Testom fragmentacije DNK detektovano je prisustvo fragmenata DNK koji odgovaraju fragmentima koji nastaju tokom procesa apoptoze.

- Fragmentacija DNK je zabeležena za pojedine doze JZ u obe ćelijske linije, a uočena je i razlika u odgovoru zdrave i tumorske ćelijske linije.



- Test fragmentacije DNK je kvalitativni test pa rezultate nije moguće kvantifikovati.

Detekcijom mutacija primarne sekvence fragmenta p53 gena pokazano je da se broj mutacija povećava sa povećanjem doze JZ.

Međutim, zbog nedostatka adekvatne kontrole, nije bilo moguće kvantitativno izraziti rezultat, te možemo zaključiti da ovaj test, u našem dizajnu eksperimenta, nije sasvim adekvatan u sagledavanja efekata JZ na tumorske i zdrave ćelije;

4.

Profil ekspresije proteina koji učestvuju u procesu apoptoze u HT-29 i MRC-5 ćelijama razlikuje se zavisno od primenjenog režima zračenja.

- U HT-29 ćelijama zabeležena je različita ekspresija anti-apoptotskog proteina Bcl-2, pri čemu je nivo ekspresije Bcl-2 proteina u odnosu na nezračenu kontrolu, i u poređenju sa odgovorom MRC-5 ćelija niži nakon primene radioadaptivnog režima zračenja II.
- Sve jednokratno ili višekratno aplikovane niske doze JZ povećale su ekspresiju pro-apoptotskog proteina Bax u HT-29 ćelijama u poređenju sa nezračenom kontrolom, dok je nakon radioadaptivnog zračenja, nezavisno od režima zračenja, ekspresija ovog proteina bila na nivou nezračene kontrole.
- U MRC-5 ćelijama, radioadaptivno zračenje u režimu II indukovalo je viši nivo ekspresije proteina Bax u odnosu na kontrolne.
- Ekspresija efektorne kaspaze-3 je u obe ćelijske linije, za skoro sve doze JZ bila veća nego u nezračenoj kontroli.
- U MRC-5 ćelijama nije nađena razlika u ekspresiji proteina PARP1 i PARP2 između dva radioadaptivna režima zračenja, dok je u HT-29 ćelijama ekspresija PARP 1 proteina neznatno veća od kontrolnih vrednosti za većinu doza JZ u režimu zračenja I.

Oba režima radioadaptivnog zračenja, u obe ćelijske linije izazivaju viši nivo ekspresije p53 u odnosu na kontrolu i u odnosu na isporučenu dozu od 2Gy bez pre-iradijacije.

Ekspresija p38 MAPK proteina u HT-29 ćelijama bila je niža za sve isporučene doze JZ u odnosu na nezračene ćelije.

U MRC-5 ćelijama, povišena ekspresija p38 MAPK utvrđena je samo u uzorcima koji su jednokratno primili samo niske doze JZ i dozu od 2Gy dnevno tokom 4 dana, u odnosu na nezračenu kontrolu.

Razlike u ekspresiji ispitivanih proteina dobijene nakon primene dva režima radioadaptivnog zračenja mogu se objasniti delovanjem niskih pre-iradijacionih doza JZ na modulisanje radiobiološkog odgovora obe ćelijske linije.

Nivo ekspresije Bcl-2 i Bax proteina i njihov međusobni odnos, u obe ćelijske linije, su odraz različitog radiobiološkog odgovora ispitivanih ćelija koji zavisi od primenjenog režima zračenja.

Rezultati ekspresije proteina doprineli su ostvarivanju i poslednjeg cilja ovog istraživanja - utvrđena je promena ekspresije proteina u signalnim putevima apoptoze kao i njihova veza sa p53 i p38 MAPK signalnim putevima. Time je dat doprinos rasvetljavanju molekularnih mehanizma koji leže u osnovi ćelijskog odgovora zdravih i tumorskih ćelija na niske pre-iradijacione doze jonizujućeg zračenja, kao i na radioadaptivno zračenje.

## 9. LITERATURA

1. Jamal A, Bray F, Melissa M., Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (2): 69–90.
2. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci* 2012; 9(3):193-199.
3. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer* 2005; 104 (6): 1129–1137.
4. Khan FM, Gerbi BJ. *Treatment Planning in Radiation Oncology.* 3<sup>rd</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2012.
5. Gundarson LL. *Clinical Radiation Oncology.* Elsevier, Philadelphia, USA. 2011.
6. Bernier J, Domezge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350(19):1945-1952.
7. International Commission on Radiation Units and Measurements, Inc. (ICRU) 1999
8. Feng FY, Kim HM, Lyden TH, Haxer MJ, Feng M, Worden FP. Intensity-modulated radiotherapy of head and neck cancer aiming to reduce dysphagia: early dose-effect relationships for the swallowing structures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68(5):1289-1298.
9. Wang-Chesebro A, Xia P, Coleman J, Akazawa C, Roach M 3rd. Intensity-modulated radiotherapy improves lymph node coverage and dose to critical

structures compared with three-dimensional conformal radiation therapy in clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66 (3): 654-662.

10. Gill S, Thomas J, Fox C, Kron T, Rolfo A, Leahy M et al. Acute toxicity in prostate cancer patients treated with and without image-guided radiotherapy. *Radiat Oncol.* 2011; 6: 145.

11. Nowsheen S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol.* 2012; 34 (3): 243–254.

12. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. *Basic Radiation Oncology.* Springer, 2010.

13. Joiner M, Van der Kogel A. *Basic clinical radiobiology.* Edvard Arnold, 2009.

14. Strachan P., Read T. *Human Molecular Genetics,* 4<sup>th</sup> Edition. Elsevier, 2012.

15. Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: evidence for an adaptive response to low dose exposures? *Dose Response.* 2006; 25(4): 283-290.

16. Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, Robson T, Arrand JE, Skov KA, et al. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1996; 358 (2): 171–183.

17. Assis ML, De Mattos JC, Caceres MR, Dantas FJ, Asad LM, Asad NR, et al, Adaptive response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protects against SnCl<sub>2</sub> damage: The OxyR system involvement. *Biochimie* 2002; 84: 291-294.

18. Chankova SG, Bryant PE. Acceleration of DNA-double strand rejoining during the adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radiat Biol Radioecol* 2002; 42: 600-603.

19. Gajendiran N, Jeevanram RK. Environmental radiation as the conditioning factor for the survival of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J Exp Biol.* 2002; 40:95-100.
20. Rubinelli P, Siripornadulsil S, Gao-Rubinelli F, Sayre RT. Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Evidence for H43 protein function in iron assimilation. *Planta* 2002; 215: 1-13.
21. Schlade-Bartusiak K, Stembalska-Kozłowska A, Bernady M, Kudyba M, Sasiadek M. Analysis of adaptive response to bleomycin and mitomycin C. *Mutat Res.* 2002; 513: 75-81.
22. Sedgwick B, Lindahl T. Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* 2002; 21: 8886-8894.
23. Jovtchev G, Stergios M. Genotoxic and adaptive effect of cadmium chloride in *Hordeum vulgare* meristem cells. *Compt Rend Acad Bulg Sci* 2003; 56:75-80.
24. Patra J, Sahoo MK, Panda BB. Persistence and prevention of aluminium- and paraquat-induced adaptive response to methyl mercuric chloride in plant cells *in vivo*. *Mutat Res*, 2003 538: 51-61.
25. Savina N, Dalivelya O, Kuzhir T. Adaptive response to alkylating agents in the *Drosophila* sex-linked recessive lethal assay. *Mutat Res* 2003; 535: 195-204.
26. Ulsh BA, Miller SM, Mallory FF, Mitchel REJ, Morrison DP and Boreham DR. Cytogenetic dose-response and adaptive response in cells of ungulate species exposed to ionizing radiation. *J Environ Radioact* 2004; 74:73-81.
27. Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Hei TK. Radiation-induced bystander effect and adaptive response in mammalian cells. *Adv Space Res* 2004; 34: 1368-1372.

28. Atanasova P, Hadjidekova V, Darroudi F. Influence of conditioning on cell survival and initial chromosome damage in X-irradiated human cells. *Trakia J Sci* 2005; 3: 37-42.
29. Chankova GS, Matos JA, Simões F, Bryant PE. (2005) Adaptive response of a new radioresistant strain of *Chlamydomonas reinhardtii* and correlation with increased DNA double-strand break rejoining. *Int J Radiat Biol* 2005; 81:509-514.
30. Chankova SG, Dimova E, Dimitrova M, Bryant PE. Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat Environ Biophys* 2007; 46: 409-416.
31. Coleman MA, Yin E, Peterson LE, Nelson D, Sorensen K, Tuckera JD et al. Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. *Radiat Res* 2005; 164: 369-382.
32. Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB. Ionizing radiation-dependent  $\gamma$ -H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 2566-2576.
33. Lanza V, Pretazzoli V, Olivieri G, Pascarella G, Panconesi A, Negri R. Transcriptional response of human umbilical vein endothelial cells to low doses of ionizing radiation. *J Radiat Res* 2005; 46: 265-276.
34. Rohankhedkar MS, Mulrooney SB, Wedemeyer WJ, Hausinger RP. The AidB component of the *Escherichia coli* adaptive response to alkylating agents is a flavin-containing, DNA-binding protein. *J Bacteriol* 2006; 188: 223-230.
35. Seo HR, Chung HY, Lee YJ, Bae S, Lee SJ, Lee YS. p27Cip/Kip is involved in Hsp25 or inducible Hsp70 mediated adaptive response by low dose radiation. *J Radiat Res* 2006; 47: 83-90.

36. Dimova EG, Bryant PE, Chankova SG. "Adaptive response" - some underlying mechanisms and open questions. *Genet. Mol. Biol.* 2008; 31 (2): 396 – 408.
37. Hou J, Wang F, Kong P, Yu PKN, Wang H, et al. Gene Profiling Characteristics of Radioadaptive Response in AG01522 Normal Human Fibroblasts. *PLoS ONE* 2015; 10(4):doi: 10.1371/journal.pone.0123316
38. Toprani SM, Das B. Role of base excision repair genes and proteins in gamma-irradiated resting human peripheral blood mononuclear cells. *Mutagenesis* 2015; 30(2): 247-261.
39. Schwartz SB, Schaffer PM, Kulka U, Ertl-Wagner B, Hell R, Schaffer M. The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiat Oncol* 2008; 23: 3-12.
40. Schaffer M, Schwarz SB, Kulka U, Busch M, Dühmke E. Adaptive doses of irradiation - an approach to a new therapy concept for bladder cancer? *Radiation and Environmental Biophysics* 2004; 43 (4): 271-276.
41. Schaffer M, Balandin A, Ertl-Wagner B, Schaffer P, Bonavina L, Hofstette A, Kulka U. Does Photofrin II Combined with a Radio-Adaptive Dose Lead to a Synergistic or Additive Effect after Ionising Irradiation in Vitro? *Journal of Cancer Therapy* 2011; 2: 595-600.
42. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 1984; 223: 594-597.
43. Mortazavi SMJ, Ikushima T, Mozdarani H. Variability of chromosomal radioadaptive response in human lymphocytes. *Iran J Radiat Res* 2003; 1:55-61.

44. Sawant SG, Randers-Pehrson G, Metting NF, Hall EJ. Adaptive response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T(1/2) cells in culture. *Radiat Res* 2001; 156: 177-180.
45. Boreham DR, Mitchel REJ. DNA repair in *Chlamydomonas reinhardtii* induced by heat shock and gamma radiation. *Radiat Res* 1993; 135: 365-371.
46. Colombi D, Gomes SL. An *alkB* gene homolog is differentially transcribed during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *J Bacteriol* 1997; 179: 3139-3145.
47. Zasukhina GD, Vasyleva IM, Semyachkina AN. Independence of DNA repair after gamma irradiation and radioadaptive response in lymphocytes of patients with Bloom syndrome - In Russian. *Radiats Biol Radioecol* 2000; 40: 513-515.
48. Pelevina II, Aleshchenko AV, Antoshchina MM, Gotlib VI, Kudriashova OV, Semenova LP et al. The reaction of cell population to low level of irradiation. *Radiats Biol Radioecol* 2003; 43: 161-166.
49. Joksic G, Petrovic S. Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed *in vivo* to low doses of ionizing radiation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2004; 23: 195-206.
50. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 2003; 111: 583-593.
51. Kim CS, Kim JM, Nam SY, Yang KH, Jeong M, Kim HS et al. Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts. *J Radiat Res.*2007; 48(5): 407-415.
52. Tubiana M. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris)



and of the Academie Nationale de Medecine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 317-319.

53. Goldberg Z, Lehnert BE. Radiation-induced effects in unirradiated cells: A review and implications in cancer. *Int J Oncol* 2002; 21: 337-349.

54. Asad NR, Asad LMBO, de Almeida CEB, Felzenszwalb I, Cabral-Neto JB, Leitão AC. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. Coli* genome. *Genet Mol Biol* 2004; 27: 291-303.

55. Matsumoto H, Takahashi A, Ohinishi T. Radiation-induced adaptive response and bystander effects. *Biol Sci Space* 2004; 18: 247-254.

56. Tapio S, Jacob V. Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys.* 2007; 46(1): 1-12.

57. Mitchel REJ, Burchart P, Wyatt H. A Lower Dose Threshold for the *In Vivo* Protective Adaptive Response to Radiation. Tumorigenesis in Chronically Exposed Normal and *Trp53*Heterozygous C57BL/6 Mice. *Radiation Research* 2008; 170(6): 765-775.

58. Barquinero JF, Barrios L, Caballin MR, Miro R, Ribas M, Subias A et al. Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1995; 67: 187-191.

59. Monsieurs MA, Thierens HM, Vral A, Brans B, De Ridder L, Dierckx RA. Patient dosimetry after <sup>131</sup>I-MIBG therapy for neuroblastoma and carcinoid tumours. *Nuclear Medicine Communications* 2001; 22 (4): 367-374.

60. Ito M, Shibamoto Y, Ayakawa S, Tomita N, Sugie C, Ogino H. Regular Paper Low-Dose Whole-Body Irradiation Induced Radioadaptive Response in C57BL/6 Mice. *J Radiat Res* 2007; 48: 455–460.
61. Flegal FN, Devantier Y, McNamee JP, Wilkins RC. Quicksan dicentric chromosome analysis for radiation biodosimetry. *Health Phys* 2010; 98(2): 276–281.
62. Okazaki R, Ootsuyama A, Norimura T. TP53 and TP53-Related Genes Associated with Protection from Apoptosis in the Radioadaptive Response. *Radiation Research* 2007; 167 (1): 51-57.
63. Joiner MC, Lambin P, Marples B. Adaptive response and induced resistance. *CR Acad Sci III* 1999; 322: 167-175.
64. Babu ST, Akhtar TA, Lampi MA, Tripuranthakam S, Dixon GD, Greenberg BM. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant Cell Physiol* 2003; 44: 1320-1329.
65. Bryant PE. Evidence for inducible DNA-associated proteins formed during the development of increased resistance to radiation in *Chlamydomonas*. *Prog Phys Theor Chem* 1974; 6: 305-313.
66. Wolff S. The adaptive response in radiobiology: Evolving insights and implications. *Environ Health Persp* 1998; 106: S277-283.
67. Mendez-Alvarez S, Leisinger U, Eggen RI. Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Microbiol* 1999; 2: 15-22.
68. Pajovic SB, Joksic G, Pejic S, Kasapovic J, Cuttone G, Masotti L. Antioxidant dose response in human blood cells exposed to different types of irradiation. *The Sciences* 2001; 1: 133-136.

69. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 2002; 53: 1237-1247.
70. Sasiadek M, Schlade-Bartusiak K, Zych M, Noga L, Czernarmazowicz H. Opposite responses in two DNA repair capacity tests in lymphocytes of head and neck cancer patients. *J Appl Genet* 2002; 43: 525-534.
71. Coleman MA, Yin E, Peterson LE, Nelson D, Sorensen K, Tucker JD et al. Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. *Radiat Res.* 2005; 164(4 Pt 1): 369-382.
72. Girigoswami BK, Ghosh R. Response to gamma-irradiation in V79 cells conditioned by repeated treatment with low doses of hydrogen peroxide. *Radiat Environ Biophys* 2005; 44: 131-137.
73. Nenoj M, Wang B, Vares G. In vivo radioadaptive response: a review of studies relevant to radiation-induced cancer risk. *Hum Exp Toxicol.* 2015; 34(3): 272-283.
74. Bae S, Kim K, Cha HJ, Choi Y, Shin SH, An IS et al. Low-dose  $\gamma$ -irradiation induces dual radio-adaptive responses depending on the post-irradiation time by altering microRNA expression profiles in normal human dermal fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2015 Jan; 35(1): 227-37.
75. Yu HS, Xue HW, Guo CB, Song AQ, Shen FZ, Liang J et al. Low dose radiation increased the therapeutic efficacy of cyclophosphamide on s(180) sarcoma bearing mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 2007; 48: 281-288.
76. Djan I, Solajic S, Djan M, Vucinic N, Popovic D, Ilic M, Lučić S, Bogdanovic G. Radiobiological effects of multiple vs. single low-dose pre-irradiation on the HT29 cell line. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014; 18 (4): 230–233.

77. Djan I, Solajic S, Petrovic B, Djan M, Erak M, Belkacemi Y et al. Radio-adaptive doses effect on HT29 and MRC5 cell lines: comparison in hypo and hyper fractionation regime. *Int. J. Radiat. Res.* 2015; 13(1): 25-30.
78. Castillo H, Schoderbek, Dulal S, Escobar S, Wood J, Nelson R et al. Stress induction in the bacteria *Shewanella oneidensis* and *Deinococcus radiodurans* in response to below-background ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology.* 2015; 91(9): 749-756.
79. Enns L, Bogen KT, Wizniak J, Murtha AD, Weinfeld M. Low-Dose Radiation Hypersensitivity Is Associated With p53-Dependent Apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2004; 2: 557-566.
80. Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 70(5): 1310-1318.
81. Collis SJ, Schwaninger JM, Ntambi AJ, Keller TW, Nelson WG, Dillehay LE et al. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem.* 2004; 279: 49624–49632.
82. Redpath JL, Short SC, Woodcock M., Johnston PJ. Low-dose reduction in transformation frequency compared with unirradiated controls: The role of hyper-radiosensitivity to cell death. *Radiat Res.* 2003; 159: 433–436.
83. Dey S, Spring PM, Arnold S, Valentino J, Chendil D, Regine WF. et al. Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of Paclitaxel in wild-type and mutant p53 head and neck tumor cell lines. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 1557–1565.
84. Arnold SM, Regine WF, Ahmed MM, Valentino J, Spring P, Kudrimoti M et al. Low-dose fractionated radiation as a chemopotentiator of neoadjuvant paclitaxel and carboplatin for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck:

Results of a new treatment paradigm. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58: .1411–1417

85. Spring PM, Arnold SM, Shajahan S, Brown B, Dey S, Lele SM et al. Low dose fractionated radiation potentiates the effects of taxotere in nude mice xenografts of squamous cell carcinoma of head and neck. *Cell Cycle.* 2004; 3: 479–485.

86. Schettino G, Folkard M, Prise KM, Vojnovic B, Bowey AG, Michael BD. Low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79 cells targeted with counted protons using a charged-particle microbeam. *Radiat Res.* 2001; 156(5 Pt 1): 526-534.

87. Carlsson J, Hakansson E, Eriksson V, Grawe J, Wester K, Grusell E et al. Early effects of low dose-rate radiation on cultured tumor cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2003; 18: 663–670.

88. Wouters BG, Skarsgard LD. The response of a human tumor cell line to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity. *Radiat. Res.* 1994; 138: S76–S80.

89. Marples B, Lambin P, Skov KA, Joiner MC. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1997; 71: 721–735.

90. Short SC, Mitchell SA, Boulton P, Woodcock M, Joiner MC. The response of human glioma cell lines to low-dose radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol* 1999; 75:1341–1348.

91. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 2001; 49: 379–389.

92. Saikat D, Rabiraja S, Daicy G, Vijaykumar TC, Subhashini J. Radiobiological Response of Cervical Cancer Cell Line in Low Dose Region: Evidence of Low Dose

Hypersensitivity (HRS) and Induced Radioresistance (IRR). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015; 9(6): 05-08.

93. Harney J, Short SC, Shah N, Joiner M, Saunders MI. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 59(4): 1190-1195.

94. Honoré HB, Bentzen SM. A modelling study of the potential influence of low dose hypersensitivity on radiation treatment planning *Radiother Oncol*. 2006; 79(1): 115-121.

95. Xue L, Furusawa Y, Yu D. ATR signaling cooperates with ATM in the mechanism of low dose hypersensitivity induced by carbon ion beam DNA Repair (Amst). 2015a; 34: 1-8.

96. Marples B. Is low-dose hyper-radiosensitivity a measure of G2-phase cell radiosensitivity? *Cancer Metastasis Rev*. 2004; 23(3-4): 197-207.

97. Marples B, Wouters BG, Joiner MC. An association between the radiation-induced arrest of G2-phase cells and low-dose hyper-radiosensitivity: a plausible underlying mechanism? *Radiat Res*. 2003; 160(1): 38-45.

98. Xue L, Furusawa Y, Okayasu R, Miura M, Cui X, Liu C et al. The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. *DNA Repair* 2015b; 25: 72-83.

99. Krueger SA, Joiner MC, Weinfeld M, Piasentin E, Marples B. Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity *Radiat Res*. 2007; 167(3): 260-267.

100. Ghorai A, Sarma A, Bhattacharyya NP, Ghosh U. Carbon ion beam triggers both caspase-dependent and caspase-independent pathway of apoptosis in HeLa and status of PARP-1 controls intensity of apoptosis. *Apoptosis*. 2015; 20(4): 562-580.

101. Prasanna A, Ahmed MM, Mohiuddin M, Coleman CN. Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypofractionated radiation therapy J. Thorac Dis 2014; 6(4): 287-302.
102. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojs Z, Waligórski M. Evidence of low-dose hyper-radiosensitivity in normal cells of cervix cancer patients? Radiat Prot Dosimetry. 2006; 122: 282–284.
103. Leonard BE. Adaptive response: Part II. Further modeling for dose rate and time influences. Int J Radiat Biol. 2007; 83(6): 395-408.
104. Mitchel RE, Dolling JA, Misonoh J, Boreham DR. Influence of prior exposure to low-dose adapting radiation on radiation-induced teratogenic effects in fetal mice with varying Trp53 function. Radiat Res. 2002; 158(4): 458-463.
105. MacCallum DE, Hall PA, Wright EG. The Trp53 pathway is induced in vivo by low doses of gamma radiation.. Radiat Res. 2001; 156(3): 324-327.
106. Okazaki R, Ootsuyama A, Norimura T. Radioadaptive response for protection against radiation-induced teratogenesis. Radiat Res. 2005; 163(3): 266-270.
107. Wolff S. Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. Mutat Res. 1996; 358(2): 135-142.
108. Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Pereira E, Fachin AL, Cardoso RS, Junta CM et al. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. Mutat Res. 2003; 544(2-3): 403-413.
109. Lee J, Lim KT. Normalizing effect of SJSZ glycoprotein (38 kDa) on proliferating cell nuclear antigen and interferon- $\gamma$  in diethylnitrosamine-induced mice splenocytes. J Cell Biochem. 2013; 114(4): 808-815.

110. Gudkov A. Microarray analysis of p53-mediated transcription: multi-thousand piece puzzle or invitation to collective thinking. *Cancer Biol Ther.* 2003; 2(4): 444-445.
111. Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell.* 2005; 123(1): 49-63.
113. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* 2005; 126: 111–117.
114. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S et al. Radiation-induced cell signaling: insideout and outside-in. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 789-801.
115. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology *Nature Reviews Cancer* 2016; 16: 20–33
116. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(9): 647-656.
117. Harigai M, Miyashita T, Hanada M, Reed JC. A cis-acting element in the BCL-2 gene controls expression through translational mechanisms. *Oncogene.* 1996; 12(6): 1369-1374.
118. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53 dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 2000; 102(6): 849-862.



119. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001; 3: 683-694.
120. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(6): 3032-3040.
121. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*. 2014; 4: 285.
122. Zitvogel L, Kroemer G. CANCER. A p53-regulated immune checkpoint relevant to cancer. *Science*. 2015; 349(6247): 476-477.
123. Chakraborty M, Abrams SI, Camphausen K, Liu K, Scott T, Coleman CNet et al. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2003; 170(12): 6338-6347.
124. Kroemer G, Piacentini M. Dying to survive - apoptosis, necroptosis, autophagy as supreme experiments of nature. *Int J Dev Biol* 2015; 59(1-3): 5-9.
125. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res*. 2012; 111(9): 1198-1207.
126. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16(6): 329-344.
127. Balcer-Kubiczek EK Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword. *Exp Oncol* 2012; 34: 277–285.
128. Radogna F, Dicato M, Diederich Marc. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochem Pharmacol* 2015; 94: 1-11.

129. Barker EH, Paget TEJ, Khan AA, Harrington JK. The tumor microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 409.
130. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis turns TNF lethal. *Immunity*. 2011; 35(6): 849-851
131. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19: 107–120.
132. David CN, Schmidt N, Schade M, Pauly B, Alexandrova O, Bottger A. Hydra and the evolution of apoptosis. *Integr. Comp. Biol.* 2005; 45: 631–638.
133. Daish TJ, Mills K, Kumar S. *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell*. 2004; 7(6): 909-915.
134. Brajušković G, Vukosavić SO, Cerović S, Knežević Ušaj S, Slobodan Marjanović, Romac S. Interakcija Bcl-2 i Bax proteina u limfocitima B iz periferne krvi bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom *Vojnosanit Pregl* 2005; 62(5): 357-363.
135. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5(4): a008714.
136. Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, Kriwacki RW, Kuwana T, Green DR. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008a; 105(51): 20327-20332.
137. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*. 2008b; 18(4): 157-164.

138. Azimian H, Taghi MBT, Rezaei AR, Rafatpanah H, Hamzehloei H, Fardid R. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. *J Med Phys.* 2015; 40(1): 38–44.
139. Johnson MD, Wu X, Aithmitti N, Morrison RS. Peg3/Pw1 Is a Mediator between p53 and Bax in DNA Damage-induced Neuronal Death *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 23000-23007.
140. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008; 27(48): 6194-6206.
141. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005; 4(3): 138-144.
142. Palai TK, Mishra SR. Caspases: An apoptosis mediator. *J Adv Vet Anim Res.* 2015; 2(1): 18-22.
143. Vempati UD, Diaz F, Barrientos A, Narisawa S, Mian AM, Millán JL et al. Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(5): 1771-1783.
144. Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A et al. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell.* 2005; 121(4): 579-591.
145. Yong-Ling PO, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9: 532-542.
146. Sosna J, Voigt S, Mathieu S, Lange A, Thon L, Davarnia P et al. TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71(2): 331-348.

147. Li M, Yu X. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in DNA damage response and cancer chemotherapy. *Oncogene*. 2015; 34(26): 3349-3356.
148. Zhang F, Lau SS, Monks TJ. A dual role for poly(ADP-ribose) polymerase-1 during caspase-dependent apoptosis. *Toxicol Sci*. 2012; 128(1): 103-114.
149. Efimova EV, Mauceri HJ, Golden DW, Labay E, Bindokas VP, Darga TE et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor induces accelerated senescence in irradiated breast cancer cells and tumors. *Cancer Res*. 2010; 70(15): 6277-6282.
150. Khan K, Araki K, Wang D, Li G, Li X, Zhang J et al. Head and neck cancer radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor GPI-15427. *Head Neck*. 2010; 32(3): 381-391.
151. Simbulan-Rosenthal CM, Haddad BR, Rosenthal DS, Weaver Z, Coleman A, Luo R et al. Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(23): 13191-13196.
152. Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, Joiner M, Marples B. PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58(2): 410-419.
153. Kalmar-Nagy K, Degrell P, Szabo A, Sumegi K, Wittmann I, Gallyas F Jr et al. PARP inhibition attenuates acute kidney allograft rejection by suppressing cell death pathways and activating PI-3K-Akt cascade. *PLoS One*. 2013; 8(12): e81928.
154. Kleczkowska HE, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in the adaptive response. *Mutat Res*. 1996; 358(2): 215-221.

155. Marples B, Joiner MC. Modification of survival by DNA repair modifiers: a probable explanation for the phenomenon of increased radioresistance. *Int J Radiat Biol.* 2000; 76(3): 305-312.
156. Ghosh S, Narang H, Sarma A, Krishna M. DNA damage response signaling in lung adenocarcinoma A549 cells following gamma and carbon beam irradiation. *Mutation Research—Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2011; 716 (1-2): 10–19.
157. Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol.* 2015; 89(6): 867-882.
158. Guyton KZ, Gorospe M, Kensler TW, Holbrook NJ. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res.* 1996; 56(15): 3480-3485.
159. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer.* 2013; 4(9-10): 401-408.
160. Kyriakis JM. Life-or-death decisions. *Nature* 2001; 414(6861): 265-266.
161. Yosimichi G, Nakanishi T, Nishida T, Hattori T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem.* 2001; 268(23): 6058-6065.
162. Wang D, Han S, Peng R, Jiao C, Wang X, Han Z et al. DUSP28 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulation of the p38 MAPK signaling. *Int J Oncol.* 2014; 45(6): 2596-2604.
163. Choi SY, Kim MJ, Kang CM, Bae S, Cho CK, Soh JW et al. Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to

ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(11): 7049-7059.

164. Park JS, Carter S, Reardon DB, Schmidt-Ullrich R, Dent P, Fisher PB. Roles for basal and stimulated p21(Cip-1/WAF1/MDA6) expression and mitogen-activated protein kinase signaling in radiation-induced cell cycle checkpoint control in carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* 1999; 10(12): 4231-4246.

165. Park JI, Lee MG, Cho K, Park BJ, Chae KS, Byun DS et al. Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene.* 2003; 22(28): 4314-4332.

166. Khandrika L, Lieberman R, Koul S, Kumar B, Maroni P, Chandhoke R et al. Hypoxia-associated p38 mitogen-activated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1alpha levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene.* 2009; 28(9): 1248-1260.

167. Kumar B, Koul S, Petersen J, Khandrika L, Hwa JS, Meacham RB et al. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res.* 2010; 70(2): 832-841.

168. Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2003; 97(12): 3017-3026.

169. Greenberg AK, Basu S, Hu J, Yie TA, Tchou-Wong KM, Rom WN et al. Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26(5): 558-564.

170. Bulavin DV, Fornace AJ Jr. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.* 2004; 92: 95-118.
171. Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle.* 2006; 5(8): 824-828.
172. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer.* 2013; 4(9-10): 342-359.
173. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
174. Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M (2010) Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials? *Mutagenesis* 26:185–193
175. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.
176. *Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory manual., 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.*
177. Liu Y, Bodmer WF. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(4): 976-981.
178. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254.
179. StatSoft, Inc. (2012). STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

180. Joo HM, Nam SY, Yang KH, Kim CS, Jin YW, Kim JY. The effects of low-dose ionizing radiation in the activated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) mast cells. *J Biol Chem.* 2012; 287(33): 27789-27795.
181. Gridley DS, Williams JR, Slater JM. Low-dose/low-dose-rate radiation: a feasible strategy to improve cancer radiotherapy? *Cancer Therapy* 2005; 3, 105-130.
182. Day TK, Zeng G, Hooker AM, Bhat M, Scott BR, Turner DR et al. Extremely low priming doses of X radiation induce an adaptive response for chromosomal inversions in pKZ1 mouse prostate. *Radiat Res.* 2006; 66(5): 757-766.
183. Ryan LA, Seymour CB, Mothersill CE. Investigation of non-linear adaptive responses and split dose recovery induced by ionizing radiation in three human epithelial derived cell lines. *Dose Response.* 2009; 7(4): 292-306.
184. Jiang H, Xu Y, Li W, Ma K, Cai L, Wang G. Low-dose radiation does not induce proliferation in tumor cells in vitro and in vivo. *Radiat Res.* 2008; 170(4): 477-487.
185. Ponzinibbio MV, Crudeli C, Peral-García P, Seoane A. Low-dose radiation employed in diagnostic imaging causes genetic effects in cultured cells. *Acta Radiol.* 2010; 51(9): 1028-1033.
186. Vral A, Louagie H, Thierens H. Micronucleus frequencies in cytokinesis-blocked human B lymphocytes after low dose gamma-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1998; 73: 549-555.
187. Kimura H. Usefulness of micronucleus assay in radiosensitivity tests using human cancer cell lines. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1998; 89(8): 712-720.



188. Bannister LA, Serran ML, Mantha RR. Low-Dose Gamma Radiation Does Not Induce an Adaptive Response for Micronucleus Induction in Mouse Splenocytes. *Radiat Res.* 2015; 184(5): 533-544.
189. Ghardi M, Moreels M, Chatelain B, Chatelain C, Baatout S. Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med.* 2012; 29(5): 769-780.
190. Ozsahin M, Ozsahin H, Shi Y, Larsson B, Würgler FE, Crompton NE. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 38(2): 429-440.
191. Hertveldt K, Philippé J, Thierens H, Cornelissen M, Vral A, De Ridder L. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 1997; 71(4): 429-433.
192. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer* 2010, 9:135
193. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene.* 2007; 26(56): 7773-7779.
194. Shin JS, Jin DH, Hong SW, Kim JE, Jung DJ, Kang JS. Abstract 1106: CEACAM1 expression dependent on p53 after DNA damage. In: Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2010 Apr 17-21; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2010; 70(8 Suppl): Abstract nr 1106.
195. Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, Urbanik T, Kautz N, Elssner C et al. Beyond cell death - antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One.* 2013; 8(10): e76446.

196. Lin YL. Development of “Smart” Particles for Silencing Antiapoptotic Bcl-2 Protein Expression in Epithelial Cancer Cells. PhD thesis. University of Michigan, USA, 2013.
197. Toossi MTB, Azimian H, Rezaei AR, Rafatpanah H, Hamzehloei T, Fardid R. Low-dose irradiation alters the radio-sensitivity of human peripheral blood lymphocytes. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering May 26-31, 2012, Beijing, China. IFMBE Proceedings 2012; 39: 41-44.
198. Wong YH, Abdul Kadir H. Induction of Mitochondria-Mediated Apoptosis in Ca Ski Human Cervical Cancer Cells Triggered by Mollic Acid Arabinoside Isolated from *Leea indica*. Evid Based Complement Alternat Med. 2012: 684-740.
199. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. Biomed Res Int. 2014: e150845
200. MacCallum DE, Hall PA, Wright EG. The Trp53 pathway is induced in vivo by low doses of gamma radiation. Radiat Res. 2001; 156(3): 324-327.
201. Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Pereira E, Fachin AL, Cardoso RS, Junta CM et al. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. Mutat Res. 2003; 544(2-3): 403-413.
202. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. Curr Opin Cell Biol. 2009; 21(6): 871-877.
203. Pohl F, Grosse J, Grimm D, Brockhoff G, Westphal K, Moosbauer J et al. Changes of apoptosis, p53, and bcl-2 by irradiation in poorly differentiated thyroid carcinoma cell lines: a prognostic marker for the prospect of therapeutic success? Thyroid. 2010; 20(2): 159-166.

204. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304.

205. Jolliffe K, Derry WB. TheTP53 signaling network in mammals and worms A. *Briefings In Functional Genomics* 2013; 12 (2): 129-141.

206. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang YW, Murray D. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(11): 22409-22435.