

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA - XXIII ciclo-  
"SCIENZE RADIOLOGICHE ED ONCOLOGIA RADIOTERAPIACA"

*Coordinatore : Prof. Giovanni Carlo Ettore*

---

Dott.<sup>ssa</sup> Giovanna Di Franco

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA, SU COLTURE CELLULARI DI  
MELANOMA, DELLA RADIAZIONE FOTONICA E PROTONICA  
NELL'ASSOCIAZIONE RADIOCHEMIOTERAPICA

—————  
TESI DI DOTTORATO  
—————

Tutor :  
*Chiar.mo Prof. Giuseppe Privitera*

## INTRODUZIONE

Il melanoma costituisce, ad oggi, ancora una neoplasia a prognosi infausta gravata da un alto tasso di metastatizzazione e da una sensibilità variabile che lo rende poco responsivo ai trattamenti radio-chemioterapici applicabili. I melanociti, dai quali originano i melanomi, sono cellule dendritiche di origine neuro-ectodermica presenti nella regione giunzionale fra derma ed epidermide, nella coroide nonché, in misura minore nelle meningi, nella capsula dei linfonodi e nella mucosa dell'apparato digerente e respiratorio.

L'incidenza di tale patologia, rara ma in progressivo aumento negli ultimi cinquant'anni nella popolazione bianca, si aggira intorno al 2-3% di tutti i tumori maligni nel Nord Europa e negli USA (1).

Globalmente l'aumento di incidenza del melanoma è evidente in entrambi i sessi nella fascia d'età compresa fra i 35 e i 70 anni. Così come per le altre neoplasie anche per il melanoma sono stati identificati fattori di rischi esterni (esposizione a radiazioni UV, caratteristiche fenotipiche) ed individuali (instabilità genica e conseguenti anomalie) che ne possono favorire l'insorgenza.

La popolazione cellulare melanocitica è caratterizzata da diversi fattori che ne definiscono l'eterogeneità: il differente grado e tipologia di pigmentazione; la diversa morfologia cellulare; la diversa velocità di crescita e capacità di metastatizzare. Lo stadio della malattia definisce il trattamento più idoneo da applicare: chirurgico/radioterapico esclusivo (in relazione alla sede di insorgenza) associato a stretto follow-up; chirurgico associato a terapia sistemica; terapia

sistemica e/o locale palliativa. I risultati clinici ottenuti sono comunque condizionati dalla spiccata radio-chemioresistenza di questo tipo di cellule.

La malattia metastatica è gravata da prognosi infausta con una mediana di sopravvivenza di pochi mesi.

Nonostante quanto detto alcune forme di melanoma, specialmente quelle a localizzazione uveale sono curabili, fino ad un certo stadio, dal trattamento radiante esclusivo (protoni, brachiterapia) con conservazione d'organo.

1. RADIOBIOLOGIA: In radioterapia viene comunemente utilizzato un modello “lineare quadratico” con il quale viene quantizzata la sensibilità al frazionamento dei tessuti radiotrattati ovvero quanto una dose erogata per frazione possa influire sull'effetto biologico. La radio-resistenza, delle varie popolazioni cellulari, viene espressa in termini di un rapporto  $\alpha/\beta$ .

I tessuti che, a seguito di un lento turn-over cellulare (spalla della curva più larga), rispondono più lentamente al danno sono detti “late responders” e sono caratterizzati da un valore basso del rapporto  $\alpha/\beta$ . In vitro la radio-resistenza può essere misurata come la frazione cellulare che sopravvive a 2 Gy (SF2). Tale parametro può essere indicativo della risposta tumorale in vivo (16). I melanomi costituiscono, dal punto di vista radiobiologico, l'esempio più tipico di radio-resistenza, anche se le cellule di melanoma posseggano una radiosensibilità intrinseca piuttosto variabile e strettamente correlata alla capacità di riparare il danno subito.

2. CHEMIOTERAPIA: La chemioterapia induce, generalmente, una remissione parziale del tumore, la risposta completa è rara e non supera il 5%. I trattamenti chemioterapici sistemici ad agente singolo più efficaci nel melanoma includono gli agenti alchilanti, quali la dacarbazina e le nitrosouree, la cui azione farmacologica si esplica nel trasferire un gruppo alchilico al DNA. Il tasso di risposta che si può ottenere è inferiore al 25% (2). L'utilizzo dell'INF- $\alpha$  in monoterapia ha un'attività paragonabile a quella della dacarbazina, producendo risposte transitorie. Sono stati valutati anche i risultati di altri chemioterapici (cisplatino, vindesina e taxani) con risposte che comunque rimangono deludenti (3). Un leggero incremento delle risposte si è registrato nei protocolli polichemioterapici a costo di maggiore tossicità sistemica (4). Le metastasi epatiche, cerebrali e polmonari rispondono con un tasso ancora più basso ai regimi chemioterapici standard. L'overespressione di fattori angiogenetici nei melanomi, specialmente in quelli a localizzazione uveale, ha permesso, ultimamente, di utilizzare farmaci biologici (Bevacizumab) da soli o in associazione con chemioterapia (5).

3. RADIOTERAPIA: Diversi studi hanno valutato le risposte dei melanomi alle radiazioni fotoniche a fasci esterni, da contatto e protonica registrando buoni risultati in termini di risposta locale e di riduzione del tasso di metastatizzazione a distanza. Tuttavia, occorre precisare che gli adroni carichi presentano alcuni vantaggi potenziali rispetto ai fasci fotonici convenzionali (X o  $\gamma$ ) dovuti oltreché ad una migliore distribuzione della

dose nel bersaglio (picco di Bragg), anche ad alcune favorevoli caratteristiche radiobiologiche, in grado di aumentare l'effetto letale sulle cellule tumorali. La distribuzione spaziale dell'energia adronica viene definita dal picco di Bragg ed è caratterizzata da un passaggio, in un intervallo di pochi millimetri, dalla curva di isodose del 90% a quella del 10%. Tali caratteristiche dipendono dal tipo di particelle considerate e sono più evidenti negli ioni carbonio rispetto ai protoni.

La profondità alla quale si produce il picco di Bragg è direttamente proporzionale all'energia del fascio utilizzato. Il confronto fra diverse forme di energie avviene mediante la valutazione dell'EBR ( $D_\gamma/D$ ) ovvero dal rapporto fra la dose di energia assorbita necessaria per produrre un dato effetto studiato nel sistema esposto ( $D$ ) e la dose di fotoni ( $D_\gamma$ ) capace di determinare lo stesso effetto.

La valutazione dell'EBR dei protoni riveste un ruolo molto importante visto che è in relazione con la capacità di inattivare le cellule neoplastiche. L'EBR dei protoni dipende fortemente dal LET (trasferimento lineare di energia), raggiungendo un valore massimo a circa  $100\text{keV}/\mu\text{m}$ , che corrisponde al LET di un fascio protonico di energia nella gamma di 65 keV (16).

E' evidente pertanto una correlazione fra LET ed EBR. Inoltre il trattamento protonico offre alcuni vantaggi rispetto alla radioterapia convenzionale, soprattutto in relazione alla possibilità di erogare una dose uniforme all'interno del volume riducendo, in maniera significativa la dose assorbita dalle strutture adiacenti. In altri termini l'utilizzo di fasci protonici

rappresenta una nuova strada per modificare ed incrementare l'efficacia dei protocolli terapeutici.

Scopo di questo lavoro è quello di confrontare l'efficacia del fascio radiante protonico rispetto a quello fotonico in colture cellulari di melanoma in vitro e di valutare i risultati ottenuti dall'associazione radio-chemioterapica rispetto alle singole applicazioni.

## MATERIALI E METODI

Gli studi condotti comprendono quelli in cui sono stati confrontati i risultati ottenuti, in cellule di melanoma in vitro, dopo irradiazione con fotoni o protoni; e quelli in cui il confronto è avvenuto tra trattamento singolo (protonico o chemioterapico) e combinato, protonico associato a somministrazione di un agente alchilante (Fotemustina / Dacarbazina). Le cellule utilizzate in tutti gli studi analizzati sono state cellule di melanoma umano HTB 140.

Tali cellule presentano caratteristiche molto spiccate di radio-resistenza con una frazione di cellule sopravvivenenti a 2 Gy di radiazione protonica (SF2) pari a 0,931 (9). I fasci di radiazioni utilizzati sono stati: fotoni prodotti dal  $^{60}\text{Co}$  e protoni di energia pari a 62 MeV con rateo di dose di 15 Gy/min, applicando una dose compresa nel range fra gli 8 e i 24 Gy. La valutazione della vitalità e della capacità di proliferazione cellulare è stata valutata dopo 6h, 24h, 48h e 7 giorni dall'irradiazione (6, 16). Nel caso della valutazione degli effetti dei trattamenti combinati, chemio-radioterapici, sono stati valutati i risultati ottenuti da due tipi di studi:

1. nel primo caso le cellule sono state trattate o solo con il chemioterapico di riferimento (FM/DTIC) con un incremento di dose nel range compreso fra 0,05 e 2 mM, o con trattamento combinato: prima con chemioterapico alla dose di 100-250  $\mu\text{M}$  (valori che includono il 50% dell'inibizione di crescita  $\text{IC}_{50}$ ) e successivamente, dopo 24 ore, con irradiazione protonica. La dose utilizzata era compresa nel range fra i 12 e 16 Gy, range comunemente

utilizzato nel trattamento protonterapico del melanoma uveale, con un rateo di dose di 15 Gy/min. I risultati ottenuti sono stati valutati dopo 7 giorni (8).

2. nel secondo caso le cellule sono state irradiate con fascio protonico con dose compresa fra i 12 e i 16 Gy, con un rateo di dose di 15 Gy/min, e dopo quattro giorni trattate con chemioterapico (FM/DTIC) alla di 100 e 250  $\mu$ M. I risultati ottenuti sono stati valutati dopo 7 giorni dall'irradiazione, in modo da far coincidere il miglior periodo di valutazione dall'incubazione del chemioterapico (3 giorni ) e dall'irradiazione (7 giorni) (7).

I risultati ottenuti, in termini di inattivazione cellulare e di qualità dell'inattivazione cellulare, dai trattamenti combinati sono stati confrontati con quelli ottenuti dai trattamenti singoli.

La valutazione della vitalità dei cloni cellulari dopo trattamento è stata valutata mediante quantizzazione del contenuto proteico delle cellule vitali (MTT/SRB), mentre la loro proliferazione mediante il monitoraggio dell'incorporazione nel DNA del BrdU (7, 8).



## RISULTATI

I dati ottenuti dal primo confronto hanno evidenziato come l'irradiazione fotonica presenti la capacità di arrecare danni irreparabili al DNA, mentre quella protonica di determinare, oltre ai danni irreparabili al DNA, che includono l'instabilità genomica, anche l'apoptosi cellulare (6,16). La valutazione sia della vitalità che della riduzione della proliferazione cellulare è avvenuta in entrambi i casi dopo 7 giorni dall'irradiazione dimostrando un'efficacia del trattamento radiante rispetto alle colture di controllo non trattate (6).

Tuttavia tali risultati sono considerevolmente più evidenti con l'impiego di protoni rispetto ai raggi- $\gamma$  con un'efficacia biologica relativa (RBE) di 1.64 (16). A seguito dell'elevata radio-resistenza delle cellule HTB140, si osserva però solo un modesto accumulo delle cellule nella fase G2 / M del ciclo cellulare (16).

Nel caso di una prima incubazione con i chemioterapici è stato notato un effetto di inibizione cellulare per entrambi i farmaci a tutte le concentrazioni, con migliori effetti inibitori dopo 48 ore dal trattamento(8). Le cellule sottoposte a trattamento combinato con FM, alla concentrazione di 100 o 250  $\mu$ M, e a irradiazione protonica con 12 Gy hanno presentato una più spiccata inibizione della crescita cellulare se confrontate al gruppo che ha ricevuto solo l'irradiazione protonica (8). E' stato inoltre evidenziato come il tasso di inibizione sia dipendente dalla concentrazione di FM somministrata essendo maggiore nel gruppo sottoposto a 250  $\mu$ M e a 16 Gy rispetto a quello sottoposto a 100  $\mu$ M e alla stessa dose di radiazione protonica (8).

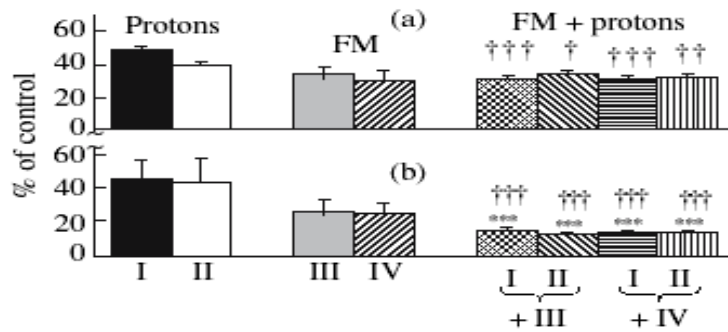


Fig.1: Valutazione della vitalità e del tasso di proliferazione cellulare mediante MTT (a) BrdU (b), rispettivamente dopo trattamento singolo e combinato con FM e protoni. Dose applicata: 12 (I) e 16 Gy (II). Dose di FM: 100 (III) e 250  $\mu$ M (IV)

Nel caso dello studio con DTIC è emerso è notato che le cellule sottoposte al solo trattamento con dacarbazina non mostravano una spiccata riduzione della vitalità se confrontate con il campione di cellule non trattate.

Una notevole riduzione del tasso di vitalità invece è stata registrata sia nel trattamento combinato DTIC + protoni che nel trattamento singolo protonico.

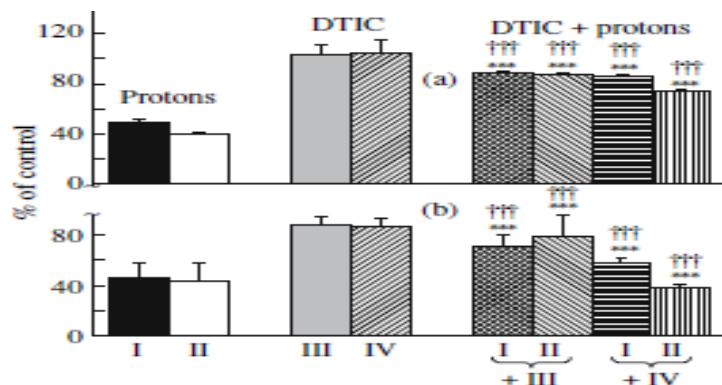


Fig.2: Valutazione della vitalità e del tasso di proliferazione cellulare mediante MTT (a) BrdU (b), rispettivamente dopo trattamento singolo e combinato con DTIC e protoni. Dose applicata: 12 (I) e 16 Gy (II). Dose di DTIC: 100 (III) e 250  $\mu$ M (IV)

La capacità di proliferazione cellulare invece era significativamente ridotta per tutti i trattamenti, sia singoli che combinati, se confrontati con il campione di cellule non trattate (8).

Gli effetti del trattamento combinato risultano migliori rispetto a quelli ottenuti dalla sola DTIC, sebbene l'inibizione cellulare è risultata massima nel trattamento singolo radiante.

La spiegazione del ridotto effetto combinato radio-chemioterapico utilizzando la DTIC è da ricercare nell'attivazione dell'enzima O<sub>6</sub>-metilguanina DNA-metiltransferasi da parte delle radiazioni ionizzanti che disattiva la DTIC (10).

Nel secondo gruppo di indagini, in cui l'irradiazione protonica è stata seguita dopo 4 giorni da somministrazione di FM/DTIC alla dose di 100-250  $\mu$ M (7), è stato evidenziato un migliore effetto sia sulla proliferazione che sulla vitalità cellulare nei gruppi trattati sia con singolo agente sia con trattamento combinato (protoni + fotemustina) rispetto al gruppo di controllo non trattato.

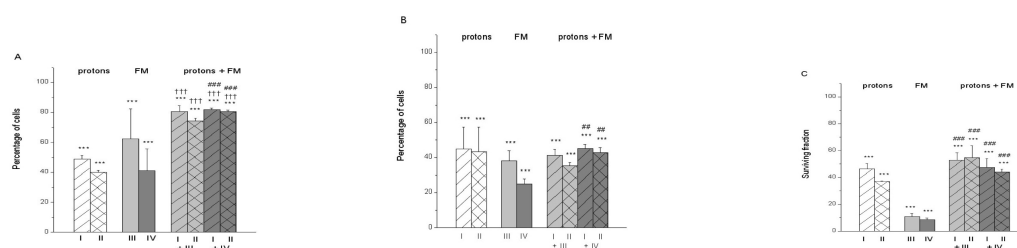


Fig.3: Effetti singoli e combinati di protoni e FM sulle cellule HTB140. Vitalità (A), proliferazione (B) e sopravvivenza (C) delle cellule HTB140 stimati dal SRB, BrdU e saggi clonogeni, rispettivamente, dopo trattamento singolo e combinato con protoni e FM. Dosi di irradiazione 12 (I) e 16 Gy (II). Concentrazioni del farmaco 100 (III) e microM 250 (IV).

Nel caso dell'utilizzo della DTIC i risultati sulla vitalità, proliferazione e sopravvivenza cellulare sono stati buoni se analizzati per singoli trattamenti, rispetto al confronto, ma meno pronunciati nei trattamenti combinati.

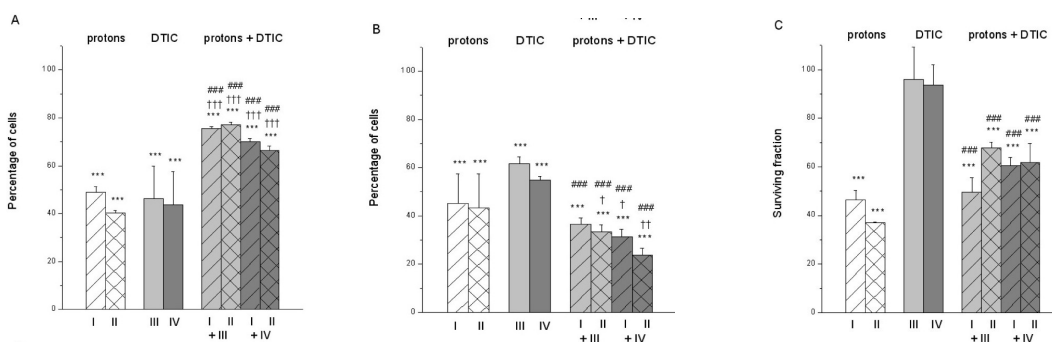


Fig.4: Effetti singoli e combinati di protoni e DTIC sulle cellule HTB140. Vitalità (A), proliferazione (B) e sopravvivenza (C) delle cellule HTB140 stimati dalla SRB, BrdU e saggi clonogeni, rispettivamente, dopo trattamento singolo e combinato con protoni e DTIC. Dosi di irradiazione 12 (I) e 16 Gy (II). Dosi di farmaco 100 (III) e  $\mu$ M 250 (IV).

Le fasi del ciclo cellulare sono risultate così modificate:

l'irradiazione protonica aumenta la quota di cellule in fase G1, nell'associazione fra protoni e FM è stato osservato un incremento delle cellule in fase S, G1 e G2 in relazione alla concentrazione del farmaco. Questi risultati sono in accordo con l'elevata radioresistenza delle cellule HTB140. Il trattamento combinato protoni/DTIC, non ha indotto importanti cambiamenti nel ciclo cellulare. Rispetto al controllo con protoni dopo trattamento combinato si è evidenziata una lieve riduzione della fase G1 e un aumento della fase S. La maggior parte delle cellule analizzate erano nella fase G1 / S, e quindi in grado di replicare il DNA.

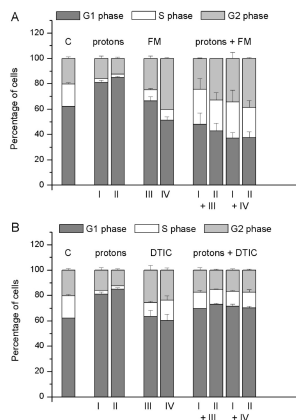


Fig.5: Analisi del ciclo cellulare dopo trattamento singolo e combinato con protoni e FM (A) o con protoni e DTIC (B). Dosi di irradiazione 12 (I) e 16 (II) Gy. Dosi di farmaco 100 (III) e  $\mu\text{M}$  250 (IV).

## DISCUSSIONE

La radio-chemioresistenza del melanoma maligno può essere correlata alla sua intrinseca eterogeneità fenotipica comprendente i diversi gradi di pigmentazione cellulare, la diversa morfologia e pattern di crescita. È stato dimostrato che quando si utilizzano le radiazioni convenzionali, la frazione cellulare che sopravvive a 2 Gy, nelle diverse linee di melanoma, varia da 0,36-0,96.

Per differenziare gli istotipi cellulari radio-resistenti da quelli radio-sensibili è stata valutata la frazione superstita a 2 Gy (SF2). I cloni che presentano una frazione inferiore a 0,35 sono considerati radio-sensibili, mentre quelli con valori superiori a 0,35 sono considerati radio-resistenti. Le linee cellulari con SF2 compreso fra 0,5-0,8, come glioma e carcinoma della vescica, sono considerati altamente radio-resistenti.

Le HTB140 sono, fra le linee cellulari di melanoma umano, quelle con i valori più alti di radioresistenza, rappresentando così il caso limite di resistenza cellulare (9).

Le linee cellulari di melanoma, sono state trattate sia con fotoni sia con protoni, quest'ultimi caratterizzati da un LET maggiore rispetto alle radiazioni convenzionali, evidenziando in quest'ultimo caso un maggior tasso di morte cellulare per apoptosi. L'irradiazione protonica ha una capacità notevolmente maggiore, rispetto ai raggi- $\gamma$ , di inattivare le cellule di melanoma HTB140.

Entro le prime 48 ore dopo l'irraggiamento, le cellule sottoposte a irradiazione protonica muoiono principalmente per apoptosi, successivamente si manifestano danni al DNA in entrambi i tipi di irradiazione (16).

E' da sottolineare l'importanza dell'EBR dei diversi fasci di irradiazione utilizzati (protoni e fotoni) nel determinare risultati diversi, in termini di efficacia, nel trattamento di colture cellulari. L'efficacia biologica relativa, definita dal rapporto  $(D\gamma/D)$  fra la dose di energia assorbita necessaria per produrre un dato effetto studiato nel sistema esposto (D) e la dose di fotoni ( $D\gamma$ ) capace di determinare lo stesso effetto dei protoni dipende fortemente dal LET. Comunemente viene assunto, per i parametri frequentemente utilizzati nel trattamento con protoni, un valore di EBR pari a 1.1 (18).

Tuttavia, è noto come l'EBR varia, in relazione al LET, nell'ambito del spread-out Bragg peak (SOBP) in base alla profondità (19) con andamento proporzionale (20, 21). Tale dato è in stretta relazione con i risultati ottenuti in termini di sopravvivenza cellulare passando da un SF2 di 0.88 a uno di 0.59 (20).

La risposta delle cellule HTB140 ai diversi farmaci chemioterapici non è uniforme e determina una moderata inattivazione cellulare. Fotemustina e dacarbazina, entrambi facenti parte degli agenti alchilanti, inattivano le cellule HTB140 determinando, in maniera diversa, un'alchilazione e un conseguente effetto citostatico cellulare.

Per ottenere una più marcata inattivazione cellulare, rispetto a quanto non sia possibile ottenere con trattamenti singoli (protoni/singoli farmaci chemioterapici), sono stati valutati gli effetti di trattamenti combinati che utilizzano terapia protonica, con dosi uguali a quelle usate nel trattamento dei melanomi uveali (9), e farmaci alchilanti, con concentrazioni di farmaco simili a quelli che producono il 50% di inibizione della crescita cellulare.

In un primo set-up sperimentale gli effetti della combinazione di farmaci e protoni sono stati stimati 7 giorni dopo l'irradiazione delle colture cellulari (8).

Nel secondo set-up per aumentare l'efficacia dei trattamenti combinati, in particolare la combinazione di DTIC e protoni, l'ordine di somministrazione di farmaci e radiazioni è stata invertita. Lo studio, infatti, è stato concepito conoscendo la sequenza temporale in cui fosse possibile ottenere, per ciascun singolo trattamento con FM, DTIC o protoni, il miglior risultato (10). Analizzando gli effetti delle due procedure di somministrazione delle radiazioni e agenti chemioterapici, in generale, non si sono registrati risultati significativamente migliori rispetto ai trattamenti singoli, quando presenti.

Tutti gli agenti studiati determinano danni al DNA cellulare, ma differiscono per il tipo di danno che inducono.

I protoni, così come le radiazioni convenzionali, inducono danni di tipo ossidativo alle basi del DNA determinando la rottura del singolo o del doppio filamento (12).

Gli agenti alchilanti di nuova generazione agiscono mediante il trasferimento di un gruppo metilico, mentre le nitrosouree esprimono la loro citotossicità attraverso la formazione di legami incrociati nel DNA sempre a seguito di una alchilazione (13).

Il meccanismo dominante di chemioresistenza agli agenti alchilanti è dovuto alla capacità di riparazione dei danni addotti al DNA mediante l'enzima O<sub>6</sub>-metilguanina DNA-metiltransferasi la cui attività viene incrementata dalle radiazioni ionizzanti (14). Alcune linee di cellule di melanoma esprimono di per sé elevati livelli di O<sub>6</sub>-metilguanina DNA-metiltransferasi.



L'effetto debole dei trattamenti combinati nelle cellule HTB140 è dovuto probabilmente al livello alto di O<sub>6</sub>-metilguanina DNA-metiltransferasi intrinsecamente presente in tali cellule sia incrementato dalla irradiazione protonica.

Un'altra possibile causa dei deludenti risultati del trattamento combinato è da riferire alla presenza del fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF-κB), intrinsecamente espresso nelle cellule di melanoma (15).

L'NF-κB è un elemento importante nello sviluppo e nella progressione di tumori maligni promuovendo la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, la metastatizzazione e l'angiogenesi. L' NF-κB regola anche l'apoptosi, induce la sovraespressione di Bcl-x, Bcl-2, fattore di crescita vascolare endoteliale e interleuchina-8. Questo può influenzare la resistenza all'apoptosi indotta dalle radiazioni e dalla chemioterapia.

## CONCLUSIONI

Lo studio eseguito ha avuto lo scopo di valutare l'efficacia dei trattamenti proposti nella cura del melanoma maligno.

Il trattamento protonterapico offre alcuni vantaggi rispetto alla radioterapia convenzionale, soprattutto in relazione alla possibilità di erogare una dose uniforme all'interno del volume riducendo, in maniera significativa, la dose assorbita dalle strutture adiacenti. Nel melanoma uveale, nonostante le caratteristiche biologiche delle cellule neoplastiche, riesce ad ottenere ottimi risultati in termini di controllo locale e di eye-retention.

Tali risultati sono dovuti alle caratteristiche fisiche del fascio e alla possibilità di erogare una dose elevata in ipofrazionamento riducendo i danni alle strutture circostanti. In altri termini l'utilizzo di fasci protonici è nuova arma terapeutica. L'associazione della radiazione protonica con farmaci chemioterapici non ha incrementato, come sperato, gli effetti inibitori sulle colture cellulari.

Recenti valutazioni cliniche hanno posto l'attenzione sul possibile utilizzo nel trattamento del melanoma di farmaci anti-angiogenetici. Studi effettuati utilizzando trattamenti combinati, su colture di cellule di melanoma, con Bevacizumab (5mg /ml), Fotemustina (100 e 250 $\mu$ M) e radiazione protonica (12 e 16 Gy) hanno portato a risultati incoraggianti con evidenza di riduzione della proliferazione cellulare e stimolazione dell'apoptosi (17)

## BIBLIOGRAFIA

1. M.B. Atkins, Curr. Opin. Oncol. "The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics" Vol 9 (2), 205-213 (1997).
2. R.M. MacKie, Arch. Dermatol. "Melanoma and the Dermatologist in the Third Millennium" Vol 136, 71-73 (2000).
3. D.Bafaloucos, D.Tsoutsos, H. Kalofonos, et al "Temozolomide and cisplatin versus temozolomide in patients with advanced melanoma: a randomized phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group" Ann. Oncol.16, 950-957 (2005).
4. S. M. Lee, D. C. Betticher, and N. Thatcher, "Melanoma: chemotherapy" Med. Bull. 51: 609-630 (1995).
5. Notting IC et al "Angiogenic Profile of Uveal Melanoma" Curr Eye Res, Vol 31 n° 9 , Pages 775-785 (2006).
6. Ristic-Fira A, Todorovic D, et al " Response of human melanoma cell line to low and high ionizing radiation" Ann N Y Acad Sci. 2007 Jan;1095:165-74

7. Ristic-Fira A, Koricanac LB, et al “Effects of fotemustina or dacarbazine on a melanoma cell line pretreated with therapeutic proton irradiation. *J of Exp & Clinical Cancer Research* 2009,28:50.
8. Koricanac LB, Petrovic IM, et al “HTB140 Melanoma Cells under Proton Irradiation and/or Alkylating Agents” *Russ. Journal of Physical Chemistry*.2007 Vol.81 n°9-1467-1470.
9. Petrovic I, Ristic-Fira A, Todorovic D, et al “Radiobiological analysis of human melanoma cell on the 62 MeV CATANA proton beam”*Int. Journal Radiat. Biol.* 82, 251-265 (2006).
10. J. A. Rafferty, A. R. Clarke, D. Sellappan, et al. “Induction of murine O-6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in response to ionizing radiation is p53 gene dose dependent”. *Oncogene* 12, 693-697. (1996).
11. Ristic-Fira A, Petrovic I, Todorovic D, et al “Assessment of the inhibitory effects of different radiation qualities or chemotherapeutic agens on a human melanoma cell line” *Phys Med.* 24: 187-195 (2008).
12. Kumula S, Niemiec P, Widel M et al “Apoptosis and clonogenic survival in three tumor cell lines exposed to gamma rays or chemical genotoxic agents” *Cell Mol Biol Lett* 2003, 8:655-665.

13. Rodriguez-Vincente J, Vicente-Ortega V, et al “The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines” *Cancer* 1998, 82:495-502.
14. Wilson RE, Hoey B, Margison GP “Ionizing radiation induces the enzyme O<sub>6</sub>-alkyltransferase mRNA and activity in mouse tissues” *Carcinogenesis* 1993, 14:679-683.
15. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T et al “Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappa B radiosensitizes human melanoma cells” *Mol Cancer Ther* 2004, 3:985-992.
16. Ristic-Fira A, Petrovic I, Todorovic D, et al “Radiobiological analysis of human melanoma cells on the 62 MeV CATANA proton beam” *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 82, No. 4, April 2006, pp. 251 – 265.
17. Koricanac LB, Zakula JJ, Petrovic IM, et al “Anti-tumor activity of fotemustina and protons in combination with Bevacizumab” *Chemotherapy*. 2010; 56 (3):214-22. Epub 2010 Jun 11.
18. N Tilly, J Johansson, U Isacson, et al “The influence of RBE variations in a clinical proton treatment plan for a hypopharynx cancer” *Phys. Med. Biol.* Jun 21;50(12):2765-77 (2005).

19. A Courdi, MD N Brassart, PhD J Hérault, PhD et al “The depth-dependent radiation response of human melanoma cells exposed to 65 MeV protons” *British Journal of Radiology* (1994) 67, 800-804 .
20. Petrović I, Ristić-Fira A, Todorović D, Korićanac L, et al “ Response of a radioresistant human melanoma cell line along the proton spread-out Bragg peak” *Int J Radiat Biol.* 2010 Jul 5.
21. Bettega D, Calzolari P, Chauvel P, Courdi A, et al “ Radiobiological studies on the 65 MeV therapeutic proton beam at Nice using human tumour cells” *Int J Radiat Biol.* 2000 Oct;76(10):1297-303.