

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.06.2021. године, на основу молбе ментора, др Павла Р. Анђуса, редовног професора, Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Душице М. Кочовић**, истраживача сарадника, Катедре за општу физиологију и биофизику, под насловом: **„Употреба раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу“**, у саставу: др Павле Р. Анђус, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Марко Даковић, ванредни професор, Факултет за Физичку Хемију, Универзитет у Београду, др Биљана Божић Недељковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала написану докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација **Душице М. Кочовић**, под насловом **„Употреба раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу“** написана је на 103 стране. Припремљена је према упутству за техничко обликовање докторских дисертација на Универзитету у Београду. Теза садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и одређеној комисији, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику (2 стране), листу скраћеница (2 стране), садржај (2 стране), увод (27 страна: стр. 1-27), циљеве рада (2 стране: стр. 28, 29), материјал и методе (7 страна: стр. 30-36), резултате: (25 страна: стр. 37-61), дискусију (8 страна: стр. 62-69), закључке (1 страна: стр. 70), литературу (17 страна: стр. 71-87), биографију аутора (1 страна), изјаву о ауторству (1 страна), изјаву о истоветности електронске и штампане верзије докторског рада (1 страна) и изјаву о коришћењу (2 стране). У оквиру докторске дисертације се налази 30 слика и 3 табеле. Сlike које су преузете и модификоване у уводу су правилно цитиране према

основном извору за који је рађена модификација. Дисертација садржи 231 литературних цитата.

## **Анализа докторске дисертације**

Предмет ове докторске дисертације је био да се применом иновативног приступа са Раманском спектроскопијом прати дејство тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу. Употребљен је нови природни потенцијални радиопротектор на бази аминотиола – GL2011. Као комплементарна техника Раманској спектроскопији употребљена је инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом и синхротронским извором зрачења. Додатно, праћене су промене на ћелијском нивоу, као и свеобухватан ефекат радиопротектора на неуроинфламаторност праћењем нивоа проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина у периферној циркулацији гама озрачених пацова и пацова са аплицираним радиопротектором GL2011. Ради компаративног приступа испитиван је радиопротективан ефекат анизомидина.

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи укупно девет потпоглавља где су објашњени основни појмови који су важни за разумевање тезе. У првом потпоглављу **“Јонизујуће зрачење”** наведене су врсте јонизујућег зрачења, као и њихови извори и потенцијална примена у медицини. У другом потпоглављу **“Интеракција јонизујућег зрачења са материјом”** описани су појмови везани за процес предаје енергије материји, линерани трансфер енергије и специфична јонизација, као и начин на који се остварује интеракција са материјом у случају деловања честичног и фотонског зрачења. Описан је фотоелектричан ефекат, Комптонов ефекат и ефекат стварања парова електрон-позитрон. Приказан је процес ексцитације и јонизације молекула воде, и последични настанак слободних радикала. Дефинисана је апсорбована доза зрачења, ефективна (еквивалентна) доза зрачења, релативна биолошка ефикасност зрачења, као и смртоносна доза зрачења. У оквиру овог потпоглавља постоје два дела, **“Интеракција јонизујућег зрачења са биолошким системима”**, где је уопштено објашњен директан и индиректан ефекат јонизујућег зрачења на биолошке молекуле, и **“Интеракција јонизујућег зрачења са биолошки активним молекулима”**, где је детаљно описано дејство јонизујућег зрачења на нуклеинске киселине, протеине, липиде и шећере. У трећем потпоглављу **“Осетљивост ткива на јонизујуће зрачење”** истакнут је значај различите осетљивости ћелија и ткива

на зрачење, али и симптоми и оштећења који се јављају након зрачења можданог ткива. У четвртом потпоглављу **“Одговор организма на јонизујуће зрачење”** говори се о јонизујућем зрачењу као стресору који активира имунски одговор, као и о повезаности имунског и нервног система. У петом потпоглављу **“Радијационо индукована неуроинфламација”** акценат је стављен на дејство јонизујућег зрачења на мождано ткиво, па је кроз два додатна дела под називом **“Микроглија”** и **“Астроцити”** детаљно описана морфологија и функција глијалних ћелија, као и њихов одговор на дејство јонизујућег зрачења. У трећем делу овог потпоглавља **“Инфламаторни молекулски медијатори”** дати су основни појмови о цитокинима, а описан је и значај успостављања равнотеже између проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина. У шестом потпоглављу **“Радиопротектори”** дефинисане су супстанције које штите од јонизујућег зрачења. Наведени су различити радиопротективни агенси и њихови механизми деловања. У седмом потпоглављу **“Тиолни радиопротектори”** разматрана су тиолна једињења. У два додатна дела под називом **“Амифостин”** и **“GL2011”** описана је досадашња примена ових тиолних једињења и евентуални нежељени ефекти који се могу јавити са њиховом употребом. Осмо потпоглавље **“Анизомицин”** описује механизам деловања анизомицина и његову вишеструку примену у медицини и истраживањима. Последње потпоглавље **“Молекулска спектроскопија”** објашњава значај примене спектроскопских метода у биологији и медицини. Указано је на то да се спектроскопске методе заснивају на појавама емисије, апсорпције, флуоресценције или расејања електромагнетног зрачења са испитиваног узорка и да разликујемо основно и побуђено електронско стање молекула са низом вибрационих и ротационих прелаза насталих услед апсорбовања или расејања светлости са узорка, као и да та разлика у односу на почетни енергетски ниво даје карактеристичан спектар узорка. Такође, приказане су врсте молекулских вибрација. У оквиру овог потпоглавља, у делу под називом **“Раманска и микрораманска спектроскопија”** описан је принцип рада и инструментација ове спектроскопске технике. Истакнуто је да симетричне вибрације истезања узрокују највећу промену поларизабилности и да дају најинтензивније Раманско (нееластично) расејање. Додатно, написано је и да се у Раманској микроспектроскопији као светлосни извор могу користити ласери различитих таласних дужина, али и да је за испитивање биолошких узорака пожељно користи ласере дугих таласних дужина како би се избегла појава

флуоресценције. У наредном делу под називом **“Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом”** описан је принцип рада ове спектроскопске технике. Истакнуто је да асиметричне вибрације истезања узрокују промену диполног момента и најинтензивнију апсорпцију светлости. Такође, описан је Мишелсонов интерферометар као основни део FTIR микроспектроскопије и принцип рада заснован на интерференцији зрачења при чему настаје посебан облик сигнала – интерферограм, који се мора разложити на своје фреквенцијске компоненте путем математичке операције “Фуријеове трансформације” да би се очитали спектрални подаци. Наведене су различите врсте детектора које се користе и њихови принципи рада. У делу под називом **“Синхротронска FTIR микроспектроскопија”** наведене су предности употребе синхротронског извора зрачења за ФТИР микроспектроскопију. Шематски је приказан извор електрона, линеарни и кружни акцелератор честица са помоћним прстеном за складиштење електрона у високом вакууму.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања** наведени су научни циљеви који се односе на испитивање радиопротективног потенцијала GL2011 и анизомицина.

- Упоредити тиолне радиопротекторе чији су представници GL2011 и амифостин са не-тиолним агенсом анизомицином.
- Испитати молекуларне промене на можданом ткиву мужјака албино Вистар пацова излаганим гама зрачењу из кобалтног извора 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) са или без примене тиолног једињења GL2011 или анизомицина, употребом иновативног приступа Раманске микроспектроскопије.
- Испитати степен активације и пролиферације микроглије и астроцита, као и морфолошке промене ових ћелија у можданом ткиву пацова услед озрачивања и примене потенцијалних радиопротектора.
- Испитати промене проинфламаторних (интерлеукин 6, IL-6 и фактора некрозе тумора алфа, TNF- $\alpha$ ) и анти-инфламаторних (интерлеукина 10, IL-10) цитокина у периферној циркулацији озрачених пацова и пацова са аплицираним тиолним једињењем GL2011 или анизомицином у различитим временским периодима пре и након зрачења.
- Као комплементарну технику Раманској спектроскопији, употребити Синхротронску FTIR микроспектроскопију на можданим ткивним пресецима

озрачених и животиња са радиопротекцијом ради добијања додатних података о молекуларним механизмима деловања радиопротектора.

- Proceniti ефикасност испитиваних супстанци, као и ефикасност примене у различитим временским периодима пре и након озрачивања пацова (компарација два радиопротектора).

Поглавље **Материјал и Методе** садржи укупно девет потпоглавља. У првом потпоглављу **“Експерименталне животиње”** наведени су подаци о узгајању експерименталних животиња, њиховој старости и полу, као и подаци о Етичкој дозволи за рад са животињама. У другом потпоглављу **“Експериментални дизајн”** дато је објашњење експерименталних група. Приказана је хронологија целог експеримента од тренутка третмана гама зрацима и радиопротекторима до момента жртвовања и изоловања ткива за даљу анализу. У трећем потпоглављу **“Третман животиња гама зрачењем и радиопротекторима”** дати су подаци о коришћеном извору и дози гама зрачења, о дози радиопротектора GL2011 и анизомицина. На основу литературних података описан је протокол зрачења целог тела пацова. У четвртном потпоглављу **“Преживљавање”** наведен је број животиња по експерименталној групи код којих је праћено преживљавање и то да је преживљавање праћено код оних животиња код којих је рађен ензимско-имунолошки тест, а чија су ткива касније употребљена за имунохистохемијску анализу. Такође, наведено је да су подаци преживљавања приказани у виду Каплан-Мејер кривих. У петом потпоглављу **“Припрема ткива и ткивних пресека за Раманску микроспектроскопију- снимање, обрада и анализа Раманских спектра”** дат је опис припреме узорака и ткивних пресека за Раманску микроспектроскопију, опис употребе специјалних плочица за наношење ткивних пресека. Према атласу можданих мапа прецизирано је које су координате употребљених можданих пресека. Описан је поступак калибрације инструмента, подешавање свих параметара за снимање, укључујући одабир и снагу ласера, објектив, отвор бленде (“pinhole”), број прореза (1800) по 1мм дужине дифракционе решетке. Наведена је резолуција снимљених спектра, као и време снимања истих. Дати су подаци о софтверима који су употребљени за анализу Раманских спектра. Наведен је и укупан број животиња и снимљених спектра по животињи за процену радиопротективног потенцијала GL2011 и анизомицина. У потпоглављу **“Припрема ткива и ткивних пресека за имунохистохемију – имунофлуоресцентно обележавање**

**можданих пресека и њихова анализа”** детаљно је описан поступак транскардијалне перфузије животиња, употребљених раствора, фиксације ткива за имунохистохемијска испитивања и припреме можданих пресека. Такође, детаљно је описан поступак имунофлуоресцентног бојења. Дат је увид у коришћена примарна и секундарна антитела и њиховим произвођачима, времену инкубације, броју испирања, финалној припреми за снимање, као и о негативној контроли у експерименту. Описан је поступак снимања на конфокалном ласерском скенирајућем микроскопу, а наведени су и подаци о употребљеном објективу, ласерима и филтерима. Наведен је софтвер који је употребљен за анализу слика добијених на конфокалном микроскопу, начин на који је анализа урађена, као и укупан број животиња и снимака по групи. У седмом потпоглављу **“Припрема узорака за праћење цитокина, методологија – ензимско имунолошки тест (ELISA)”** наведено је време узимања крви експерименталних животиња, поступак издвајања и чувања плазме, као и подаци о броју узорака. Наведени су сви употребљени реагенси, као и детаљан опис везујућих и детектујућих антитела, њихови произвођачи и концентрације. Описан је цео поступак извођења ове методе, укључујући и финално читавање боје на спектрофотометру. У осмом потпоглављу **“Припрема ткивних пресека за Синхротронску FTIR микроспектроскопију, снимање узорака и анализа спектра”** описан је поступак припреме ткива, ткивних пресека, као и специфичности чувања и транспорта узорака. Дати су подаци о микроскопу, детектору, површини испитиваног ткивног пресека, спектралној резолуцији, броју употребљених животиња и снимљених спектра, као и о софтверима који су употребљени за анализу спектра. У деветом потпоглављу **“Статистика”** дати су подаци о статистичкој анализи за сваку примењену методу. Наведен је употребљен софтвер као и примењени статистички тестови.

Поглавље **Резултати** садржи укупно седам делова. У првом потпоглављу **“Преживљавање озрачених мужјака албино Вистар пацова и пацова са аплицираним радиопротекторима GL2011 и анизомицином пре или после зрачења”** представљени су текстуално и путем Каплан-Меиер крива процентуални подаци преживљавања пацова по групама услед зрачења и радиопротекције са леком GL2011 или анизомицином током 30 дана од третмана. У потпоглављу **“Рамански спектри можданих ткивних пресека озрачених Вистар пацова и пацова са примењеним радиопротектором GL2011 и анизомицином”** представљене су молекуларне промене услед зрачења и/или примене

радиопротектора детектованих употребом Раманске микроспектроскопије. У оквиру овог потпоглавља постоје два дела. У првом делу под називом **“Радиопротекција са GL2011”** приказан је усредњен и нормализован Рамански спектар продужене мождине контролне групе са најистакнутијим спектралним тракама и таласним бројевима на којима се јављају. У тексту су наведене доминантне траке у Раманским спектрима. Приказан је диференцијални спектар контролне групе и групе озрачених животиња, као и контролне групе и групе озрачених животиња са примењеним радиопротектором GL2011 пре зрачења или 3 или 6 часова после зрачења. На диференцијалним спектрима је показано где је дошло до повећања или смањења одређене спектралне траке, након чега је графички представљен статистички значајан ефекат радиопротектора GL2011 на интензитет трака од нуклеинских киселина и аминокиселина - триптофана и фенилаланина. У другом делу под називом **“Радиопротекција са анизомицином”** приказан је усредњен и нормализован спектар жуљевитог тела контролне групе животиња, као и спектар продужене мождине контролне групе, групе озрачених животиња и озрачених животиња са анизомицином примењеним пре зрачења. На спектрима су обележене детектоване спектралне траке, које су описане и у тексту. Такође, дат је и табеларан приказ детектованих спектралних трака. Приказани су диференцијални спектри контролне групе и групе озрачених животиња, као и групе озрачених животиња и група које су примиле анизомицин пре зрачења или 3 или 6 часова после зрачења. Наведене су спектралне траке код којих је дошло до промене интензитета. Дат је графички приказ спектралних трака код којих је уочен статистички значајан ефекат радиопротекције са анизомицином. У трећем потпоглављу **“Синхротронски FTIR спектри можданих ткивних пресека озрачених Вистар пацова и пацова са примењеним радиопротекторима GL2011 и анизомицином”** представљени су подаци добијени са овом техником. Приказан је усредњен и нормализован синхротронски FTIR спектар продужене мождине пацова са основним детектованим спектралним тракама. Наведени су основни критеријуми у мултиваријантној анализи главних компонената, што је подразумевало да је резултат подударан код обе контролне животиње и да је зрачење довело до значајне промене одређене спектралне траке у односу на неозрачену групу животиња. Приказани су делови спектра, који су задовољавали ове критеријуме и који су показали значајан ефекат радиопротекције са GL2011 или анизомицином за први и други сет животиња. Приказан је

део спектра са амид 2 траком, асиметричним истежућим вибрацијама фосфата и естрима. Такође, приказане су и одговарајуће криве оптерећења које су указале на то где је тачно постојала разлика између група. На тај начин приказан је значајан ефекат радиопротектора за целу област са протеинима и естрима. Резултати мултиваријантне анализе основних компонената су приказани и графички за сваки део спектра који је представљен. Обележене су статистички значајне разлике у односу на контролну и групу озрачених животиња. У тексту је дат детаљан опис промена интензитета спектралних трака и њихових помераја са статистички значајним ефектима. У четвртом потпоглављу **“Процена радиопротективног потенцијала GL2011 анализом промена на глијалним ћелијама”** представљен је радиопротективни ефекат аминотиола GL2011 кроз процену активације глијалних ћелија. Приказане су репрезентативне слике имунофлуоресцентно обојених можданих пресека снимљених на конфокалном микроскопу. Дат је графички приказ процентуалне заступљености маркера за микроглију (Iba-1) и астроците (GFAP) за сваку експерименталну групу. У првом делу под називом **“Микроглијалне ћелије”** описане су уочене морфолошке промене на микроглији након третмана зрачењем и/или радиопротектором GL2011. Истакнуто је да је једино група са радиопротектором GL2011 аплицираним 6 часова након зрачења показала статистички значајно смањење процента позитивних пиксела за радиопротектор GL2011 у поређењу са озраченом групом. Такође, да примена самог радиопротектора није имала штетан ефекат на микроглију. У другом делу **“Астроцити”** наведено је да нису детектоване значајне промене у процентуалној заступљености маркера за астроците, али и да су уочене промене у морфологији астроцита услед зрачења. Уочено је да радиопротектор има значајну улогу у заштити и одржавању компактније структуре астроцита ако се примени после зрачења. У петом потпоглављу **“Процена радиопротективног потенцијала анизомицина анализом промена на глијалним ћелијама”** приказане су слике имунохистохемијског бојења можданих пресека сликаних на конфокалном микроскопу из области соматосензорног кортекса, беле масе (corpus callosum) и продужене мождине. Приказана је процентуална заступљеност маркера за микроглију и астроците у свакој од испитиваних можданих регија, за сваку експерименталну групу. Истакнуто је да је анизомицин значајно смањио експресију микроглијалног маркера Иба-1 независно од мождане регије и времена апликације, али и да нису уочене значајне промене за маркер астроцита. У шестом потпоглављу **“Процена**



**радиопротективног потенцијала GL2011 анализом нивоа цитокина у плазми”** приказани су резултати ензимско-имунолошког теста. Дат је графички приказ детектованог нивоа проинфламаторних цитокина (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) и анти-инфламаторног цитокина (IL-10) у свим експерименталним групама, 24 часа, 7. и 28. дана након третмана зрачењем и/или радиопротектором GL2011. Обележене су значајне разлике у односу на контролну и групу озрачених животиња. У тексту су детаљно описане промене у нивоу наведених цитокина за сваку експерименталну групу. У седмом потпоглављу **“Процена радиопротективног потенцијала анизомицина анализом нивоа цитокина у плазми”** дат је табеларан приказ средњих вредности са стандардним грешкама за детектоване нивое два про-инфламаторна цитокина (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) и једног анти-инфламаторног цитокина (IL-10) у свим експерименталним групама, 24 часа, 7. и 28. дана након третмана зрачењем и/или анизомицином. Статистички значајне разлике су обележене у односу на контролну и групу озрачених животиња. У тексту су описане промене у детектованим нивоима цитокина за сваку експерименталну групу.

Поглавље **Дискусија** састоји се од три потпоглавља. У овом поглављу дата је анализа резултата добијених у овој докторској дисертацији уз поређење са постојећом литературом. У првом потпоглављу **“Молекуларне промене у продуженој мождини пацова озрачених и третираних са леком GL2011 или анизомицином као радиопротектором”** најпре је истакнут значај добијених резултата у погледу ефикасности примењене једне дозе лека GL2011 и поређење са претходним студијама где је лек показао свој радиопротективан ефекат са применом у три дозе. Дискутоване су благе промене у Раманским спектрима озрачених животиња. Урађено је поређење са литературно доступним подацима и наведени су могући узроци добијених разлика, као што је дизајн студије, односно време праћења промена на мозгу и доза примењеног зрачења. Наведени су литературни подаци о дејству јонизујућег зрачења на протеине и липиде, што је било у позитивној корелацији са добијеним резултатима на Раманском микроспектрометру и синхротронској FTIR микроспектроскопији у овој студији. Такође, на основу литературних података указано је на то да повећање интензитета така од протеина у групама са леком GL2011 аплицираним после зрачења може бити последица активације транскрипционих фактора који контролишу експресију гена за проинфламаторне цитокине, а чије је повећано присуство детектовано и у овој студији употребом ензимско-

имунолошког теста. Дискутовано је деловање аминотиола GL2011 и анизомицина на повећање интензитета трака од нуклеинских киселина, што је указало на могућу стабилизацију генетичког материјала, с обзиром да је радијација имала супротан ефекат. Дискутован је повећан ниво интензитета траке од фенилаланина, што је објашњено метаболизмом ове аминокиселине и тиме да повећан ниво про-инфламаторног цитокина ИЛ-6 који је детектован у овој студији, може смањити доступност ензима који доводе до конверзије фенилаланина у тирозин у метаболизму синтезе допамина, што последично доводи до повећања фенилаланина. Такође, промене у интензитету триптофана су објашњене постојањем везе између проинфламаторних цитокина попут ИЛ-6 и метаболизма триптофана. Добијени ефекат анизомицина на аминокиселине је летаратурно потврђен. Резултати синхротронске FTIR микроспектроскопије су повезани са резултатима добијеним на Раманској микроспектроскопији. Истакнуто је да је радиопротективни ефекат био нарочито изражен у делу спектра са асиметричним истежућим вибрацијама нуклеинских киселина, што је повезано са детектованим порастом интензитета трака од нуклеинских киселина детектованих са Раманском микроспектроскопијом и појачаном експресијом протеина, проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина. Наведено је и да примена самог GL2011 и анизомицина без зрачења индукује сличне промене као и зрачење, али и да се тај ефекат губи ако се лекови примене пре или после зрачења. У другом потпоглављу **“Промене у глијалним ћелијама мозга озрачених пацова и третираних радиопротектором GL2011 и анизомицином”** наведене су карактеристике активираних микроглије, након чега су дискутоване скромне промене у морфологији микроглије након зрачења са нагласком на примењен протокол зрачења као могући узрок. Такође, дискутован је инхибиторан ефекат примене самог лека GL2011 без зрачења и његове примене шест часова након зрачења. Дискутован је и инхибиторан ефекат анизомицина на неуроинфламацију у соматосензорном кортексу, белој маси (corpus callosum) и продуженој мождини. Објашњен је различит образац понашања микроглије у праћеним можданим регијама. Наведени су литературни подаци који говоре о томе да дозе преко 10 греја могу довести до изражите активације микроглије. Такође, наведени су неки други фактори који могу одредити ефекат зрачења, као нпр. старост јединке. Наведен је значај астроцита у регулацији хомеостазе, излучивању хранљивих материја и експресији антиоксидативних ензима, као и у метаболизму

неуротрансмитера и аминокиселина. Објашњено је да се изразита глиоза након зрачења јавља са већом дозом зрачења и у виду касних ефеката – неколико месеци након зрачења. Такође, као могући разлог за не тако изразите промене у концентрацији маркера астроцита наводи се протокол зрачења целог организма, а не само предела главе. С друге стране, наведено је да изражена фрагментација астроцита у групи озрачених животиња, као и у групи са GL2011 примењеним пре зрачења, указује на то да је GL2011 ефикаснији у примени након зрачења. Истакнуто је и да ни један третман анизомицином као радиопротектором није значајно утицао на маркер астроцита – GFAP. У трећем потпоглављу **“Промене у проинфламаторним и анти-инфламаторним цитокинима плазме Вистар пацова након излагања гама зрачењу и радиопротекцији са GL2011 или анизомицином”** истакнут је значај испитивања цитокина у радијационим испитивањима. Наведено је да су мозак и имунски систем у константној двосмерној интеракцији. Такође, истакнуто је да балансирање између проинфламаторног и анти-инфламаторног одговора може дуго да осцилира након зрачења. Стимулаторно дејство GL2011 на проинфламаторне цитокине је упоређено са механизмом деловања друге врсте радиопротектора – имуномодулаторима. Дискутоване су промене у нивоу цитокина индуковане зрачењем, као и у свим групама са радиопротектором GL2011 аплицираним пре или после зрачења. Истакнуто је да пораст нивоа IL-6 и TNF- $\alpha$  са пратећим порастом IL-10 у свим озраченим групама са леком GL2011 (примењеним пре или после зрачења) указује на успостављање баланса између про-инфламаторних и анти-инфламаторних цитокина и на лековит ефекат GL2011 у свим временима апликације лека са зрачењем. Дискутовано је о неуропротективном деловању анизомицина, његовом механизму деловања, мултифункционалним карактеристикама и примени у различитим биохемијским истраживањима. Истакнуто је да је ефекат анизомицина као радиопротектора постао очигледан више са применом после зрачења, али и да је ниво TNF-алфа био драстично повећан последњег дана експеримента.

У последњем пасусу **Дискусије** урађено је поређење тиолног радиопротектора амифостина са тиолним једињењем GL2011. На основу литературних података, истакнуте су предности новог потенцијалног радиопротектора GL2011. Такође, урађено је поређење тиолног једињења GL2011 са анизомицином и указано на то да би драстичне промене у молекуларним маркерима након примене самог анизомицина као и анизомицина

примењеног 6 часова након зрачења могле бити ограничавајући фактор за његову примену у радиопротекцији.

У поглављу **Закључци** сумирани су резултати, изведени су најбитнији закључци и дате су сугестије за даља истраживања:

1. У погледу преживљавања животиња, аминотиолни радиопротектор GL2011 је имао исти ефекат када се примени пре или после зрачења, за разлику од анизомицина који се показао ефикаснији у примени после зрачења.

2. Раманска микроспектроскопија примењена на ткивним пресецима продужене мождине пацова показала је на молекуларном нивоу, да оба радиопротектора делују тако што повећавају синтезу нуклеинских киселина независно од времена апликације, што је указало на то да би механизам којим врше своју радиопротективну активност могао бити стабилизација генетичког материјала. Такође, радиопротектори GL2011 и анизомицин су индуковали пораст интензитета спектралних трака аминокиселина и протеина нарочито са применом после зрачења.

3. Анализа FTIR спектра, добијених са синхротронског извора инфрацрвеног зрачења, ткивних пресека продужене мождине пацова је показала значајан ефекат за оба радиопротектора у области протеина и естера, амида 2 и асиметричног фосфата. Примена анизомицина у оба испитивана сета животиња довела је до промене у интензитетима трака за све назначене спектралне опсеге и сва три времена примене, док је примена GL2011 највећи ефекат на траке показала при примени 3 часа након зрачења, мада интензитет траке значајно варира и са применом овог једињења и пре зрачења.

4. Показано је да радиопротектори GL2011 и анизомицин не испољавају негативно дејство на глијалне ћелије мозга пацова и делују на њихово очување код озрачених животиња. GL2011 је утицао на смањену инфилтрацију микроглијалних ћелија продужене мождине нарочито ако је примењен после зрачења, док је анизомицин индуковао смањење бојења на микроглијални маркер Иба-1 у свим испитиваним можданим регијама (продужена мождина, соматосензорни кортекс и бела маса – corpus callosum) независно од времена примене са зрачењем.

5. Показано је да радиопротектор GL2011 делује и као модулатор сигналних путева цитокина, што је вероватно и један од механизма којим остварује своју радиопротективну улогу. Баланс про-инфламаторног и анти-инфламаторног одговора

указује на позитиван ефекат радиопротектора GL2011 примењеног било пре или после зрачења.

6. Анализа цитокина је показала да анизомицин испољава своје радиопротективно дејство тек у каснијим временима примене повећањем нивоа цитокина (3 и 6 часова након зрачења). У групи животиња код којих је анизомицин примењен пре зрачења није дошло до значајних промена у нивоу цитокина у плазми што је указало на могућу десензибилизацију индуковану применом анизомицина пре зрачења.

7. Примена самог анизомицина индукује сложене промене у про-инфламаторним цитокинима, што захтева даља испитивања дејства самог лека на већој групи животиња.

Поглавље **Литература** садржи 231 библиографску јединицу. Наведени литературни цитати су од значаја за област којом се бави ова докторска дисертација и правилно су цитирани у дисертацији.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Коковић DM**, Bajuk-Bogdanović D, Pećinar I, Božić Nedeljković B, Daković M, Andjus PR (2021) Assessment of cellular and molecular changes in the rat brain after gamma radiation and radioprotection by anisomycin. *J. Radiat. Res. In press.* (M22)  
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrab045>
2. **Коковић DM**, Bajuk-Bogdanović D, Maslovarić I, Božić Nedeljković B, Andjus PR, Daković M (2021) Raman spectral analysis of the brainstem and responses of neuroglia and cytokines in whole-body gamma-irradiated rats after administration of aminothiol-based radioprotector GL2011. *Arch Biol Sci. In press.* (M23)  
<https://doi.org/10.2298/ABS210129011K>
3. **Коковић D**, Jovanović M, Bajuk-Bogdanović D. Raman Spectroscopic Characterization of Biomolecular Changes of Irradiated Rat Brain Tissue. *In: AIS3 Proceedings: Nano for Health.* Eds. Andjus P, Batinelli P, Spasojević P 2016, Proceedings, pp. 173-175. (M14)

### Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Коковић D, Jovanović M, Bajuk-Bogdanović D. Assessment of changes in irradiated rat brain tissue using Raman spectroscopy. *Raman4Clinics – Clinical Biophotonics.* 28.05-02.06. 2016, Jena, Nemačka. (M34)
2. Коковић DM, Korenić A, Andjus PR, and Dučić T. The effects of two novel radioprotectors in the rat brainstem of gamma-irradiated rats followed by Synchrotron FTIR spectroscopy. 14<sup>th</sup> Goettingen Meeting of the German Neuroscience Society. 22.03. - 30.03. 2021. Poster number: T12-3. (M34)

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Коковић D, Bajuk-Bogdanović D, Jovanović M, Daković M. The effects of gamma radiation in the rat central nervous system followed by Raman Spectroscopy. 9<sup>th</sup> Photonics Workshop. 02.03. - 06. 03. 2016, Kopaonik, Srbija. (M64)

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Душице М. Кочовић броја индекса Б3030/2013 послата је дана 23. 06. 2021. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио истог дана. Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да **индекс подударности износи 21%**. Увидом је утврђено подударање са 199 примарна извора. Готово сва уочена појединачна подударања су у опсегу мањем од 1%. Поклапања се односе на стандардно присутне

делове докторских дисертација (навођење назива институција, уобичајених скраћеница, стручних термина, општих фраза, назива поглавља, уређаја и захвалницу). Узимајући у обзир наведено, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње **Душице М. Кочовић**, под насловом **„Употреба раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу“**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

### **Мишљење и предлог Комисије**

Докторска дисертација под насловом **„Употреба раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу“** представља оригиналан научни рад кандидаткиње **Душице М. Кочовић** и представља значајан допринос у демонстрацији примене Раманске спектроскопије за истраживања у области радијационе биологије и испитивања дејства радиопротективних супстанција. У дисертацији су детаљно испитани механизми деловања потенцијалног радиопротектора - тиолног једињења GL2011, као и антибиотика анизомицина. Ова истраживања су значајна јер указују на радиопротективну ефикасност тиолног једињења GL2011, нарочито у примени после зрачења, што је указало на могућу потенцијалну примену лека не само у радиотерапији, већ и у радијационим незгодама и катастрофама, за које тренутно не постоји адекватна терапија. Током периода израде дисертације, кандидаткиња је показала висок степен самосталности и ефикасности у раду.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације **Душице М. Кочовић** под насловом „**Употреба раманске спектроскопије за праћење дејства тиолних радиопротектора на молекуларне промене у мозгу пацова излаганог гама зрачењу**“.

**КОМИСИЈА:**

У Београду, 15.06.2021. године

---

др Павле Р. Анђус, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Марко Даковић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију

---

др Биљана Божић Недељковић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет