

# УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

## МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

### ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ КАНДИДАТА ИГОРА ЂАНА

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
1. Датум и орган који је именовео комисију 11.02.2016. Наставно-научно веће Медицинског факултета у Новом Саду
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:  - проф. др Дарјана Јовановић, редовни професор, Онкологија; 1.10.2006., Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, председник - проф. др Кармен Станков, ванредни професор, Биохемија, 1.09.2012., Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, члан - проф. др Јелена Пураћ, ванредни професор, Молекуларна биологија, 1.07.2015., Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, члан
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
1. Име, име једног родитеља, презиме: Игор (Мојсије) Ђан
2. Датум рођења, општина, држава: 28.03.1976., Сомбор, Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, основне дипломске академске студије медицине и мастер академске студије из области клиничке медицине; звање: доктор медицине Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, специјалистичке студије – радијациона онкологије; звање: специјалиста радијационе онкологије
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2010.; Докторске студије клиничке медицине
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Радиобиолошки ефекти ниских пре-ирадијационих доза јонизујућег зрачења на хумане ћелијске линије HT29 и MRC5
<b>IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл. Докторска дисертација „Радиобиолошки ефекти ниских пре-ирадијационих доза јонизујућег зрачења на хумане ћелијске линије HT29 и MRC5“ кандидата Игора Ђана написана је на 104 стране текста, подељеног у 9 поглавља (Увод - 3 стране; Преглед литературе - 15 страна; Циљ рада - 1 страна, Радне хипотезе истраживања - 1 страна; Материјал и методе рада - 10 страна; Резултати - 33 стране,

Дискусија – 12 страна, Закључак - 4 стране, Литература - 25 страна). Рад садржи 6 табела и 33 слике. На почетку докторске дисертације налази се неопходна кључна документација на српском и енглеском језику, Садржај и Захвалница. На крају се налази биографија кандидата.

## **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

У поглављу **УВОД** кандидат сажето износи опис основних појмова и постулата у области онкологије, радијационе онкологије, као и радиобиологије и радиоадаптивног зрачења, а у ширем контексту експерименталне онкологије. Поред тога, кандидат износи основне дефиниције и типове јонизујућег зрачења и њихових ефеката по живе системе. Такође, кандидат уводи у основне принципе модулисања одговора живих система на ниске дозе јонизујућег зрачења. Кандидат јасно дефинише појмове радиоадаптивно зрачење у ужем смислу, хиперрадиосензитација/хиперрадиорезистенција и појам „by-standard“ ефекта. На крају кандидат кратко износи значај истраживања молекуларних механизма који су у основи одговора на ниске дозе јонизујућег зрачења.

Поглавље **ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ** садржи два подпоглавља, подељених према проблематици у неколико целина, са прегледом најновијих сазнања из области истраживања ове докторске дисертације. У првом подпоглављу кандидат износи најновија сазнања о радиобиолошким одговорима на ниске дозе зрачења, и посебно подпоглавље у овом делу се бави радиоадаптивним одговором у ужем смислу, феноменом хиперрадиосензитивности и повећане радиорезистенције. Кандидат посебну пажњу посвећује разматрању литературе која се бави ефектима примене ниских пре-ирадијационих доза на различите типове ћелијских линија и опис потенцијалних молекуларних механизма одговора ових ћелија, у смислу праћења различитих сигналних путева.

У првом подпоглављу кандидат јасно износи основне појмове и напредна знања о радиобиолошком одговору на ниске дозе зрачења, као и на радиоадаптивно зрачење, уз опис експерименталних других аутора и јасан приказ њихових резултата.

У другом подпоглављу кандидат даје детаљан опис молекуларних механизма радиоадаптивног одговора након примене ниских доза зрачења и радиоадаптивног зрачења. Подпоглавље је подељено на четири целине, где свака целина детаљно и јасно описује појединачне сигналне путеве који се активирају након дејства ниских доза јонизујућег зрачења, као и након радиоадаптивног зрачења. Кандидат је јасно описао новија истраживања у области сигналног апоптозоног пута, р53 сигналног пута као и PАРР и р38 МАРК сигналног пута. Текст је пропраћен са две илустрације.

На основу прикупљених литературних података и претходних сазнања кандидат поставља јасне циљеве у поглављу **ЦИЉ РАДА:**

1. да се утврди оптимални режим испоруке зрачне терапије у смислу пре-ирадијационе дозе након које следи већа куративна доза, која ће довести до смањеног преживљавања и смањења деобног потенцијала туморских ћелија, а у исто време изазвати адаптивни (радиорезистентан) одговор код здравих ћелија;
2. да се детектује степен преживљавања туморских и здравих ћелија; оштећења хромозома (присуство микронуклеуса); фрагментације ДНК и разлике у примарној секвенци р53; након примењених режима зрачења и различитих пре-ирадијационих ниских доза јонизујућег зрачења;
3. да се утврди промена експресије кључних протеина у сигналном путу апоптозе и њихова веза са р53 и р38 МАРК сигналним путевима након примењених режима зрачења;
4. да се на основу добијених резултата упореде молекуларни механизми који леже у основи ћелијског одговора здравих и туморских ћелија на ниске пре-ирадијационе дозе јонизујућег зрачења и на два различита режима радиоадаптивног зрачења.

На основу прегледа литературе кандидат је дефинисао следеће одреднице **РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА:**

1. Зрачењем туморских ћелија ниским дозама јонизујућег зрачења након којих следи висока куративна доза (2Gy) очекује се значајно смањење преживљавања у односу на ћелије које су озрачене само са куративном дозом без пре-ирадијације. Насупрот томе, код здравих ћелија уз пре-ирадијацију очекује се значајна поштеда здравих ћелија у смислу одржаног или повећаног преживљавања;
2. У узорцима ћелијских линија које показују радиоадаптивни ефекат у смислу радиорезистенције утврдиће се мањи број микронуклеуса и мања фрагментација ДНК, као и мања промена примарне ДНК секвенце р53 гена, док се супротан ефекат очекује у осетљивој туморској ћелијској линији;
3. Очекује се разлика у експресији кључних апоптозоноских протеина зависно од режима зрачења као и различита експресија протеина у ћелијама које су примиле радиоадаптивни режим зрачења у

поређењу са ћелијама које су примиле само куративну дозу зрачења.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** садржи детаљан опис материјала, односно ћелијских линија које су коришћене у овом истраживању. Даље, кандидат даје детаљан опис метода које је користио у оцени радиобиолошког одговора ћелија, односно у оцени преживљавања ћелија, оштећења наследног материјала и експресије одабраних протеина сигналних путева апоптозе, p53 и p38 MAPK сигналних путева. У подпоглављу које се бави методама статистичке обраде података кандидат је јасно навео коришћене статистичке методе применом одговарајућег програмског пакета.

**РЕЗУЛТАТИ** рада су изложени у шестом поглављу које је подељено на пет подпоглавља, а текстуални приказ је илустрован са 28 слика и 6 табела. У првом делу су систематично и јасно приказани резултати анализе утицаја различитих режима зрачења на преживљавање ћелија применом МТТ теста. Добијени подаци су правилно статистички обрађени, и приказани првенствено кроз бројне графиконе, који сликовито дају увид у различите ефекте режима зрачења на две хумане ћелијске линије у смислу преживљавања. У наредном подпоглављу кандидат износи резултате анализе утицаја различитих режима зрачења на структуру хромозома применом теста микронуклеуса. Подаци добијени применом различитих статистичких анализа су адекватно табеларно или графички приказани што олакшава праћење разлика и специфичности примењеног теста. Следи приказ резултата теста ДНК фрагментације, са јасним образложењем приказаних слика. Након тога, кандидат критички излаже анализу промене секвенци p53 гена, односно фрагмента одабраног за анализу у овом истраживању. На крају поглавља Резултати кандидат приказује резултате анализе експресије седам одабраних протеина апоптоских, p53 и p38 MAPK сигналних путева, одвојено за сваку ћелијску линију, HT 29 и MRC5. Све приказане слике које илуструју промену експресије протеина након излагања ниским пре-ирадијационим дозама кандидат јасно описује у овом поглављу.

У делу **ДИСКУСИЈА**, кандидат је дао критичку анализу и интерпретацију експерименталних резултата. На основу добијених резултата кандидат пореди радиобиолошки одговор здраве и туморске ћелијске линије међусобно након два дизајнирана режима зрачења, уз помоћ МТТ теста вијабилности. Добијен је различит радиобиолошки одговор између здраве и туморске ћелијске линије при чему је за дозу од 0,07 Gy у режиму зрачења II код туморске ћелијске линије добијено ниже преживљавање које је праћено већим преживљавањем у здоровој ћелијској линији. Исти тренд је показан у режиму зрачења I за пре-ирадијациону дозу од 0,05Gy. Добијени резултати су у сагласности са претходним истраживањима од стране Schwarz и сар.(2011) као и Schaffer и сар. (2004,2011). Такође је показан и дозно завасан тренд степена оштећења код вијабилних ћелија обе ћелијске линије. Кандидат је у раду утврдио и степен фрагментације ДНК и показао различит радиобиолошки одговор између здраве и туморске ћелијске линије што је у складу са литературом и истраживањима које указују да различит степен мутације p53, који је већи код туморских ћелија доводи до различитог одговора на ниске пре-ирадијационе дозе и на радиоадаптивно зрачење. Након радиоадаптивног зрачења у режиму зрачења I и II добијена је разлика у експресији Bcl-2 код HT29 ћелијске линије а за MRC5 ћелије је добијена различита експресија Bcl-2 и Вах протеина. Поред наведеног различит ниво експресије неких од испитиваних протеина добијен је при поређењу између дозе од 2Gy без пре-ирадијације и радиоадаптивног зрачења. Сагледавањем свих резултата кандидат закључује да резултати ове дисертације имају велики значај у разумевању и појашњењу молекуларних механизма који леже у основи радиобиолошког одговора на ниске пре-ирадијационе дозе као и на радиоадаптивно зрачење.

У оквиру поглавља **ЗАКЉУЧАК**, на основу добијених резултата наведени су закључци који су правилно изведени и јасно и разумљиво формулисани у складу са постављеним циљевима докторске дисертације.

Девето поглавље **ЛИТЕРАТУРА** представља списак литературе. Укупно је цитирано 206 литературних јединица, које обухватају библиографске податке везане за истраживања о радиобиолошким одговорима на ниске дозе јонизујућег зрачења, радиоадаптивно зрачење, сигнални пут апоптозе у односу на испитиване протеине и њихову експресију, као и p53, p38 MAPK и PARP експресију протеина након излагања ћелија радиоадаптивном зрачењу и ниском пре-ирадијационом дозом јонизујућег зрачења. Највећи број литературних навода подразумева радове објављене у току последњих десет година у врхунским међународним часописима.

**VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

1. 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. (M23)
2. 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.

## **VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу резултата истраживања радиобиолошких ефеката ниских пре-ирадијационих доза на хумане ћелијске линије колоректалног карцинома (HT-29) и феталних фибробласта плућа (MRC-5), кандидат изводи неколико закључака

1.

- Излагање ћелија ниским пре-ирадијационим дозама јонизујућег зрачења (J3), једнократно или виšekратно, изазвало је повећано преживљавање HT-29 и MRC-5 ћелија.
- Једнократно излагање ниским дозама J3 подједнако је повећало преживљавање обе врсте ћелија с тим да је доза од 0,07Gy за око 14% смањила преживљавање HT-29 ћелија у поређењу са MRC-5 ћелијама.
- Вишеструко излагање ћелија ниским дозама J3 значајно је повећало преживљавање HT-29 ћелија у поређењу са хуманим фибробластима плућа MRC-5.
- Одговор HT-29 ћелија на једнократну и виšekратну примену ниских доза J3 био је дозно зависан - веће дозе су изазвале слабије преживљавање HT-29 ћелија, док се одговор MRC-5 ћелија у истим условима није значајније мењао без обзира на тип зрачења.

Вијабилност HT-29 ћелија након зрачења према режиму I је нижа него након зрачења у режиму II у поређењу са нетретираним ћелијама.

- Иако зрачење у режиму II значајно повећава преживљавање HT-29 ћелија јасна је тенденција опадања, тако да је за дозу 0,05+2Gy преживљавање на нивоу нетретираних ћелија, а дозу од 0,07+2Gy преживи свега 40% HT-29 ћелија.
- Одговор MRC-5 ћелија на оба режима зрачења је уједначен, али је преживљавање ниже након зрачења у режиму II; разлика у преживљавању ћелија за дозу зрачења 0,07+2Gy између два режима зрачења је око 20%.

Општи закључак кандидата је да виšekратна примена ниских доза J3 није значајно смањила вијабилност HT-29 ћелија, док су две радиоадаптивне дозе (0,05+2Gy и 0,07+2Gy), адекватне дозе J3 за радиотерапијски постулат поштеде здравих ћелија и бољи антитуморски ефекат у односу на нерадиоадаптивно зрачење од 2Gy у току 4 дана. Показана је могућност модулисања ћелијског одговора на J3 уз помоћ ниских доза J3 које су праћене дозом од 2Gy (радиоадаптивни тип зрачења) у оба дизајнирана режима зрачења.

2.

- Инциденција микронуклеуса (МН) у HT-29 ћелијама након једнократне или виšekратне примене само ниских доза J3 није била статистички значајно већа у поређењу са незраченим контролним узорцима за све апликоване дозе.
- У MRC-5 ћелијама, исте ниске дозе J3 изазвале су дозно-зависно повећање инциденције микронуклеуса. Разлике у инциденцији МН биле су статистички значајне у односу на незрачену контролу, али не и између испоручених доза.
- Пораст инциденције МН у обе ћелијске линије пратио је повећање дозе J3 у оба радиоадаптивна режима зрачења.

Општи закључак је да је степен оштећења хромозома за већину испоручених доза показао дозно зависни тренд и да представља адекватан тест за одређивање степена оштећења хромозома након дејства J3. Дозно-зависно оштећење наследног материјала изазвано радиоадаптивним зрачењем потврђује хипотезу да је степен оштећења здравих, MRC-5, ћелија мањи него у ћелијама

колоректалног аденокарцинома, чиме је такође испуњен један од циљева овог истраживања.

3. Тестом фрагментације ДНК детектовано је присуство фрагмената ДНК који одговарају фрагментима који настају током процеса апоптозе. Фрагментација ДНК је забележена за поједине дозе ЈЗ у обе ћелијске линије, а уочена је и разлика у одговору здраве и туморске ћелијске линије.

Детекцијом мутација примарне секвенце фрагмента p53 гена показано је да се број мутација повећава са повећањем дозе ЈЗ. Међутим, због недостатка адекватне контроле, није било могуће квантитативно изразити резултат, те кандидат закључује да овај тест, у овом дизајну експеримента, није сасвим адекватан у сагледавања ефеката ЈЗ на туморске и здраве ћелије.

4. Профил експресије протеина који учествују у процесу апоптозе у HT-29 и MRC-5 ћелијама разликовао се зависно од примењеног режима зрачења.

- У HT-29 ћелијама забележена је различита експресија анти-апоптотског протеина Bcl-2, при чему је ниво експресије Bcl-2 протеина у односу на незрачену контролу, и у поређењу са одговором MRC-5 ћелија нижи након примене радиоадаптивног режима зрачења II.
- Све једнократно или виšekратно апликоване ниске дозе ЈЗ повећале су експресију про-апоптотског протеина Вах у HT-29 ћелијама у поређењу са незраченом контролом, док је након радиоадаптивног зрачења, независно од режима зрачења, експресија овог протеина била на нивоу незрачене контроле.
- У MRC-5 ћелијама, радиоадаптивно зрачење у режиму II индуковало је виши ниво експресије протеина Вах у односу на контролу.
- Експресија ефекторне каспазе-3 је у обе ћелијске линије, за скоро све дозе ЈЗ била већа него у незраченој контроли.
- У MRC-5 ћелијама није нађена разлика у експресији протеина PARP1 и PARP2 између два радиоадаптивна режима зрачења, док је у HT-29 ћелијама експресија PARP 1 протеина незнатно већа од контролних вредности за већину доза ЈЗ у режиму зрачења I.

Општи закључак је да оба режима радиоадаптивног зрачења, у обе ћелијске линије изазивају виши ниво експресије p53 у односу на контролу и у односу на испоручену дозу од 2Gу без пре-ирадијације.

Експресија p38 MAPK протеина у HT-29 ћелијама била је нижа за све испоручене дозе ЈЗ у односу на незрачене ћелије.

У MRC-5 ћелијама, повишена експресија p38 MAPK утврђена је само у узорцима који су једнократно примили само ниске дозе ЈЗ и дозу од 2Gу дневно током 4 дана, у односу на незрачену контролу.

Разлике у експресији испитиваних протеина добијене након примене два режима радиоадаптивног зрачења кандидат објашњава деловањем ниских пре-ирадијационих доза ЈЗ на модулисање радиобиолошког одговора обе ћелијске линије.

Ниво експресије Bcl-2 и Вах протеина и њихов међусобни однос, у обе ћелијске линије, су одраз различитог радиобиолошког одговора испитиваних ћелија који зависи од примењеног режима зрачења.

Резултати експресије протеина допринели су остваривању и последњег циља овог истраживања - утврђена је промена експресије протеина у сигналним путевима апоптозе као и њихова веза са p53 и p38 MAPK сигналним путевима. Тиме је дат допринос расветљавању молекуларних механизма који леже у основи ћелијског одговора здравих и туморских ћелија на ниске пре-ирадијационе дозе јонизујућег зрачења, као и радиоадаптивно зрачење.

#### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат је веома рационално приступио приказу, обради и анализи великог броја резултата које је успешно систематизовао у логичке целине. Резултати истраживања су прегледно и аналитички представљени, статистички адекватно обрађени, детаљно продискутовани, објективно и критички упоређивани са резултатима других аутора. Прегледности резултата значајно доприносе многобројни графיקони и табеле. На основу детаљне дискусије изведени су закључци који дају одговоре на постављене циљеве докторске дисертације.

#### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме Комисија оцењује да је докторска дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.
2. Да ли дисертација садржи све битне елементе Дисертација садржи све битне елементе као што су: дефинисање теме, циљева и значаја истраживања, преглед постојећих истраживања, приказ методологије рада, јасан и систематичан приказ резултата и њихову адекватну дискусију. Закључци су правилно изведени на основу добијених резултата. У списку литературе налазе се све литературне јединице које су цитиране у тексту дисертације.
3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци Комисија сматра да ова докторска дисертација представља оригиналан научни допринос у области онкологије (радијационе онкологије). Посебан акценат Комисија ставља на резултате који су омогућили детаљну карактеризацију радиобиолошког одговора две хумане ћелијске линије на ниске дозе јонизујућег зрачења у дизајнираним режимима експеримента. Специфичан допринос оригиналности даје чињеница да су описани молекуларни механизми који леже у основи ових одговора на основу свих података, а кроз анализу експресије одабраних протеина. Резултати ове докторске дисертације имају и практичан значај који се огледа у могућности примене ових сазнања у даљим научним истраживањима на анималним моделима и евентуално клиничким истраживањима, са циљем имплементације резултата у свакодневну онколошку праксу.
4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Комисија је мишљења да ова докторска дисертација нема недостатака, постављени циљеви су испуњени.
<b>X ПРЕДЛОГ:</b>
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
Комисија предлаже да се докторска дисертација под насловом „ <b>Радиобиолошки ефекти ниских пре-ирадијационих доза јонизујућег зрачења на хумане ћелијске линије HT29 и MRC5</b> “ прихвати и да се кандидату <b>Игору Бану</b> одобри одбрана

датум: 4.03.2016.

#### ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Проф. др Дарјана Јовановић, председник  
Медицински факултет Нови Сад

Проф. др Кармен Станков, члан  
Медицински факултет Нови Сад

Проф. др Јелена Пураћ, члан  
Природно-математички факултет, Нови Сад