

Медицински факултет
Универзитет у Крагујевцу
Крагујевац

НАУЧНО-НАСТАВНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Оцена научне заснованости теме докторске дисертације

Одлуком Научно наставног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу број:01-1048 од 28.02.2007.године именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације Мр сци мед Др Александре Томић-Лучић под називом:

"Концентрација хистамина у синовијалној течности и крви код пацијената који болују од реуматоидног артритиса и остеоартрозе"

На основу препоруке Научно-наставног већа комисија у саставу:

1. Проф. Др Снежана Живанчевић-Симоновић
 2. Проф. Др. Мирко Росић-потенцијални ментор
 3. Доц.Др.Милан Петронијевић
- подноси Научно-наставном већу

ИЗВЕШТАЈ

I Биографски подаци

Кандидат Мр.Др.Александра Томић-Лучић испуњава све услове предвиђене Законом о универзитету и Статутом Медицинског факултета за израду докторске дисертације.

а. Лични подаци

Александра Томић-Лучић рођена у Сарајеву 18.05.1968 год, где завршава основну и средњу школу. 20.01.1993.год. дипломирала на медицинском факултету у Београду са просечном оценом 9,36 и стекла звање **доктора медицине**.

Уписала последипломске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу где је 21.05.1998 год одбранила магистарску тезу под називом "Утицај глукагона на реактивну хиперемiju изолованог срца пацова" и стекла звање **магистра медицинских наука**.

14.11. 1994 год засновала радни однос на Медицинском факултету у Крагујевцу у почетку на месту асистента приправника на предмету физиологија, а од 1998 год у звању асистента на истоименом предмету.

На Медицинском факултету у Београду уписала специјализацију из интерне медицине коју успешно завршава 04.01.2001 год. и од тада ради као **специалиста интерне медицине** на Интерној клиници, Одељење за реуматологију, КЦ Крагујевац.

У току 2006 год. на Медицинском факултету у Крагујевцу уписује докторске студије и сада се налази на трећој години.

Удата, мајка двоје деце.

б. Научно истраживачки рад

Континуиран научно истраживачки рад Мр.Др.Александре Томић-Лучић огледа се у учешћу у истраживањима и публиковању радова у домаћим и међународним часописима као и презентацијама на конгресима и стручним скуповима.

ц. Списак радова

Радови штампани у целини у међународним часописима (P₅₁)

1. М.А. Rosic, S.B. Pantovic, **A.P. Lucic**, N. Ribarac-Stepic, T. Trtic, I. Andjelkovic, M.B. Segal. Triiodothyronine uptake by the isolated rat heart. Die Pharmazie, 1998; 5): 351-352.

2. M.A.Rosic, S.B.Pantovic, T.Trtic, N.Ribarac-Stepic, I.Z.Andjelkovic, **A.P.Lucic**, D.M. Mitrovic. Thyroxine uptake by the isolated rat heart. *Farmacii & terapia, intrnational journal on drugs and therapy*, 1996; 13(4): 100-104.
3. Rosić A. Mirko, **Lučić P. Aleksandra**, Pantović B. Suzana, Jankovic Slobodan, Rosić L. Gvozden, Mitrović Dušan & Andjelković Ivan. Mathematical analysis of reactive hyperaemia in the isolated rat heart with & without electrical pacing. *The Indian Journal of Medical Research*. 1998; 107: 274-280.
4. Rosic M. A., Pantovic S.B., **Lucic A.P.**, Ribarac-Stepic N., Andjelkovic I.Z. Kinetics of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) transport in the isolated rat heart. *Experimental Physiology*. 2001; 86 (1): 13-18.
5. Pantović B.S., Rosić L.G., Rosić A.M., Radosavljević M., Kojić M., Milovanović J., **Lučić P.A.**, Radovanović R.M., Zdravković S.V. Nov pristup biomehaničkim i funkcionalnim osobinama tkiva – nov dizajn primenjenog hardvera i softvera. *Medicus* 2005; Vol 6, N^o1; 18-20.

Радови штампани као сажети у међународним часописима

1. Andjelković, **A. Lučić**, G. Rosić, S. Pantović, G. Stefanović, E. Kršljak, Z. Kojić, M. Rosić. Histamine Fluorometric Assay During Reactive Hyperaemia in Isolated Rats Heart. *Balkan Journal of Clinical Laboratory*, 1996; 3(1): 169.

Радови штампани у целини у домаћим часописима са рецензијама (P₆₂)

1. **Александра П. Лучић**, Сузана Б. Пантовић, Гвозден Л. Росић, Милан Р Радовановић, Иван Анђелковић, Гордана Стефановић, Елена Кршљак и Мирко Росић. Утицај глукагона на параметре реактивне хиперемije на изолованом срцу пацова. *Медицински часопис*, 1996; 63(2): 7-10.
2. Сузана Б. Пантовић, **Александра П. Лучић**, Невена Рибарац-Степић, Гвозден Л. Росић, Милан Р Радовановић, Иван Анђелковић, Гордана Стефановић, Елена Кршљак и Мирко Росић. Транспорт тироксина у изолованом срцу пацова. *Медицински часопис*, 1996; 63(2): 33-37.

3. Милан Р Радовановић, Сава Милојевић, Иван Ж. Анђелковић, Сузана Б. Пантовић, **Александра П. Лучић**, Душан М. Митровић, Гвозден Ј. Росић и Мирко А. Росић. Ефекат пулсирајућег електромагнетног поља на срце и дисајне путеве пацова. Медицински часопис, 1997; 64(2): 12-15.

Радови саопштени на домаћим научним скуповима (Р₇₃)

1. С. Пантовић, **А. Лучић**, М. Росић, И. Анђелковић. Транспорт тироксина у изолованом срцу пацова. Кардиологија, 1996; 17(Супл.1): 10.
2. **А. Лучић**, С. Пантовић, М. Росић, З. Којић, И. Анђелковић. Утицај глукагона на параметре реактивне хиперемije на изолованом срцу пацова. Кардиологија, 1996; 17(Супл.1): 10.
3. Р. Лазаревић, М. Росић, П. Ристић, Г. Бабић, Г. Лукић, Ж. Мијаиловић, **А. Лучић**, С. Пантовић. Ефекат хистамина на КЦл-ом преконтраховани изоловани утерус код естрадиолом претретираних пацова. Зборник сажетака ХХИВ октобарских здравствених дана, 1996; 70.
4. М. Росић, С. Пантовић, **А. Лучић**, Г. Костић, Г. Стефановић, Е. Кршљак, И. Анђелковић. Концентрација хистамина у крви код деце која болују од алергијске астме. Југословенска медицинска биохемија, 1996; 15(4): 237.

Уџбеници и монографије (Р₂₁)

1. Мирко А. Росић, Иван Анђелковић, Предраг Б. Ђорђевић, Иван Спужић, Весна Бошњак-петровић, Сузана Б. Пантовић, **Александра П. Лучић**. Новине и стремљења у медицини. Крагујевац: Центар за научна истраживања Српске академије наука и уметности и Универзитета, 1999 (Библиотека Лицеум) књига 4).

2. Мирко Росић, Небојша Здравковић, Милош Којић (аутори); **Александра Лучић**, Сузана Пантовић, Бобан Стојановић (сарадници): Мултимедијални интерактивни програм физиологије скелетних мишића и неуромишићне синапсе, Српска академија наука и уметности, Универзитет у Крагујевцу, Центар за научна истраживања, Медицински факултет, Крагујевац; 1998. (ЈАА бр.с-76/98)

Радови саопштени на међународним скуповима (P₇₂)

1. Pantović B.S., **Lucic P.A.**, Ribarac-Stepić N., Radovanović R.M., Mitrović D. and Rosić A.M. Kinetics of thyroid hormone transport in the isolated rat heart. XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, Abstracts, 1997.
2. **Lucic P.A.** Pantović B.S., Andjelković I., Radovanović R.M. and Rosić A.M. Glucagon effects on the reactive hyperemia in the isolated rat heart. XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, Abstracts, 1997.
3. Rosic L.G., **Lucic P.A.**, Pantović B.S., Radovanović R.M., Mitrović D. and Rosic A.M. Dynamic analysis of the three-phasic vascular response to histamine in coronary circulation. XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, Abstracts, 1997.
4. Lazarevic D.R., Pantovic B.S., **Lucic P.A.**, Andjelkovic I., Radovanovic R.M., Babic M.G., Lukic G., Ristic P., Rosic G. and Rosic A.M. Effects of histamine and HMT inhibitors on the isolated rat uterus. XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, Abstracts, 1997.
5. Lazic Z., Rosic L.G., Pantovic B.S., **Lucic P.A.**, Radovanovic R.M., Andjelkovic I. and Rosic A.M. Effect of histamine methyl-transferase inhibitors on contractility isolated guinea pig trachea. XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, Abstracts, 1997.
6. Suzana B. Pantović, **Aleksandra P. Lucic**, Tomislav I. Nedeljkovic and Mirko A. Rosic. Glucagon effects on enhancement of histamine concentration induced by

cysteamine in different tissues. XIIIth International Congress of Pharmacology, München, Germany, Vol. 358 No 1 (Suppl.1), 1998.

7. **Aleksandra P. Lucic**, Suzana B. Pantovic, Tomislav I. Nedeljkovic and Mirko A. Rosic. Protective effects of glucagon on cysteamine induced duodenal ulcerogenesis. XIIIth International Congress of Pharmacology, München, Germany, Vol. 358 No 1 (Suppl.1), 1998.
8. G. Kostić, M. Rosić, B. Nestorović, **A. Lucić**, S. Pantović, B. Vuletić, Z. Živković, V. Pavlović. Relationship between histamine concentration in plasma and severity of acute asthmatic attack in children suffering from asthma

II Подаци о предложеној теми

Предложена тема је из области реуматологије

a. Предмет рада

Предмет истраживања докторске дисертације је упоредна студија нивоа хистамина у синовијалној течности и крви пацијената који пате од реуматоидног артритиса и остеоартрозе. Резултати подразумевају анализу постојећег односа добијених вредности концентрације хистамина са освртом на дијагнозу, дужину трајања обољења и његов интензитет, старост пацијената и терапију којом су били третирани.

Досадашња истраживања указују да мастоцити имају једну од кључних улога у инфламацији која доводи до деструкције зглоба. Активација мастоцита секретарогима као што су компоненте комплемента, антитела и цитокини доводи до ослобађања садржаја из гранула (хистамина, хепарина и протеиназа), као и продуката из цитоплазме (citoкина и леукотриена) Сви мастоцити имају експресију хистидин декарбоксилазе ензима есенциалног за продукцију хистамина. Хумани хондроцити такође поседују хистидин декарбоксилазу и производе хистамин који може да учествује у инфламаторном процесу и оштећењу зглоба. Ослобађање потентног медијатора хистамина утиче на све ћелије које имају експресију хистаминских рецептора укључујући хондроците,

макрофаге, Т лимфоците, ендотелне ћелије, фибробласте и остеокласте. Дејство хистамина на синовијалне фибробласте испољава се посредством Н1 рецептора и доводи до повећане пролиферације фибробласта. Доказано је такође да фибробласти у синовији пацијената који болују од реуматоидног артритиса имају смањену функцију Н2 рецептора. Хистамин је потентан индуктор остеокласне диференцијације и тај ефекат испољава се посредством Н2 рецептора.

Имунохистохемијска испитивања су показала постојање различите експресије хистаминских рецептора и хистидин декарбоксилазе на хуманим хондроцитима код пацијената са остеоартрозом у односу на здраву популацију. Степен имунопозитивности на хистамин и хистидин декарбоксилазу је нарочито повећан у одмаклим фазама остеоартрозе у односу на здраву популацију. Дејство хистамина на хондроците је вишеструко. Он делује стимулишући синтезу простагландина Е у хондроцитима и синовиоцитима, као и стимулишући синтезу металопроотеиназа из матрикса хондроцита. У експериментима ин витро доказан је стимулаторни ефекат хистамина на пролиферацију хуманих хондроцита посредством Н1 рецептора. Ови ефекти доприносе развоју дегенеративних промена на хрскавици код артроза. Такође хистамин ин витро стимулише ослобађање металопроотеиназа 13 и 3 из матрикса хуманих хондроцита и тај ефекат оставрује посредством Н1 рецептора. Познато је да металопроотеиназе заузимају значајно место у самом процесу хондроллизе који доводи до дегенеративних промена на хрскавици зглобова.

Када је концентрација хистамина у синовијалној течности у питању досадашња истраживања су показала веома контрадикторне резултате. Група аутора наводи да је концентрација хистамина у синовијалној течности већа код остеоартрозе у односу на реуматоидни артритис, што је у корелацији са бројем мастоцита у синовији, док Малоне налази да је ослобађање хистамина знатно веће код реуматоидног артритиса у односу на остеоартрозу. Исти аутор открива да синовијалне ћелије пацијената који болују од реуматоидног артритиса, а лече се базичном терапијом имају знатно мањи ниво хистамина. За разлику од напред наведених радова неки аутори налазе готово немерљиве концентрације хистамина у синовијалној течности и негирају разлику између те две групе болесника.

С обзиром на то да хистамин има евидентну улогу у деструкцији зглобова код реуматоидног артритиса, као и код остеоартрозе било би од значаја утврдити постоји ли разлика у концентрацији хистамина у синовијалној течности и крви тих пацијената. Истраживање у тој области има још већу оправданост с обзиром да су досадашња истраживања на том пољу показала веома контрадикторне резултате.

6. Циљеви студије

Циљ докторске дисертације је упоредна анализа концентрације хистамина у синовијалној течности и крви пацијената који болују од реуматоидног артритиса и остеоартрозе колена. Упоредна анализа резултата са акцентом на:

- дијагнозу
- старост и пол пацијената
- терапију којом су третирани.
- интензитет обољења.
- утврђивање валидности хистаминског индекса као параметра за бољу компарацију концентрације хистамина код реуматоидног артритиса и остеоартрозе

Радне хипотезе испитивања:

1. вредности концентрације хистамина у синовијалној течности као и у крви варирају у великој мери, увек постоји одрђени однос између вредности у крви и у синовијалној течности који називамо хистаминским индексом. Хистамински индекс се значајно разликује код пацијената који болују од реуматоидног артритиса и остеоартрозе.
2. постоје значајне разлике у нивоу хистамина у синовијалној течности код реуматоидног артритиса код пацијената који користе комбиновану базичну терапију (метотрексат, делагил) и пронисон (10мг дневно) у односу на оне који користе само делагил и НСАИЛ или само НСАИЛ
3. интраартикуларна примена гликокортикоида такође значајно смањује ниво хистамина у синовијалној течности.

4. нема значајне разлике у нивоу хистамина у синовијалној течности као ни у крви везано за пол и строст болесника.

ц. Материјал и методе

Испитивање обухвата пацијенте којима је постављена дијагноза реуматоидног артритиса или остеоартрозе по важећим критеријумима. Они су хоспитализовани на Одељењу за реуматологију Интерне клинике у Крагујевцу или су лечени у поликлиничкој субспецијалистичкој служби Интрне клинике. Код свих болесника биће проведено комплетно клиничко испитивање које обухвата: објективан преглед, лабораторијска испитивања крви и синовијалне течности и радиографију обољелих зглобова. За испитивање нивоа хистамина биће узети узорци (5мл) синовијалне течности која је добијена приликом пункције колена и узорци (5мл) пуне венске крви. За контролне вредности биће узети узорци пуне крви здраве популације.

Пацијенти су подељени у две главне групе према дијагнози коју имају: а. реуматоидни артритис, б. остеоартроза. Унутар сваке групе биће праћена концентрација хистамина у синовијалној течности и крви и њен однос с обзиром на дужину трајања болести и њен интензитет, терапију којом су третиранци пацијенти, старост пацијената и пол.

д. Методологија истраживања

Одређивање концентрације хистамина биће базирано на Фогеловој модификацији Схореове флуориметријске методе из 1988 год. Након иницијалног третмана 0,4N перхлорном киселином (4,5мл) и вортексовања у трајању од 5мин., узорци се центрифугирају на 3000обртаја/мин у трајању од 5 мин. На тај начин врши се припрема узорака за екстракцију хистамина која тече следећим редоследом:

а) 2мл супернатанта (након центрифугирања) + 0,75г NaCl солид + 0,25 мл 5N NaOH + 5мл н-бутанол, вортексовати а затим исцентрифугирати 4000обртаја/мин 5 мин.

б) одбацити водену –доњу фазу Пастеровом пипетом и у преосталу горњу фазу сипати 2,5 мл 0,1N NaOH + NaCl солид сатуратед, вортексовати 5 мин., а затим центрифугирати 3000 обрта/мин 5 мин.

ц) 2мл бутанолске- горње фазе + 1,25 мл 0,1N H₂SO₄ + 3,75 мл н-хептана, вортексовати 1мин., затим центрифугирати на 3000обртаја/мин 5 мин.

д) аспирирати горњу фазу помоћу водене пумпе или Пастерове пипете и преосталу доњу фазу користити за флуориметријско одређивање хистамина тј. есеј са ортофталдиалдехидом(о-ПТ)

Флуориметријски есеј хистамина

Есеј се изводи у малим киветама за флуориметрију и то са две групе кивета: пробом (П) и бланком(Б). За референтну вредност узима се дејонизована вода која такође има своју пробу и бланк. Стандардни раствори хистамина имају такође своју пробу и бланк, као и узорци. У току извођења есеја у прве четири кивете се сипа по 0,4мл дејонизоване воде, затим у стандардне кивете по 0,4мл стандарних раствора хистамина у растућим концентрацијама и на крју у остале кивете по 0,4 мл садржаја који су обијени претходном екстракцијом хистамина из узорака синовијалне течности и крви. Након тога у све кивете се додаје по 0,2мл 0,5N NaOH. После тога у пробни низ кивета се сипа по 50 микролитара о-ПТ претходно раствореног у метанолу, у концентрацији од 10мг/мл (1%). Одмах након 4 мин додаје се по 0,1мл 2N H₂ SO₄. На тај начин се снижава рН вредност медијума и прекида се реакција везивања хистамина са о-ПТ. За разлику од пробног низа у бланк низ кивета се прво додаје 0,1мл 2N H₂ SO₄, па тек затим 50 микролитара 1% раствора о-ПТ у метанолу.

Флуориметријско мерење кондензационог производа хистамина са о-ПТ -ом врши се на спектрофлуориметру Перкин-Елмер ЛС -5Б. Таласна дужина емисионе светлости износи 360nm, док је таласна дужина ексцитационе светлости 450nm (А 360/450). Након што су измерене вредности за све кивете приступа се израчунавању . Израчунава се разлика (П-Б) између пробе (П) и бланка (Б) за све кивете појединачно и означава се са ΔА. На основу ΔА вредности за кивете са дејонизованом водом добија се њихова средња вредност означена са Б. Све вредности ΔА добијене за стандарде хистамина и за узорке се умањују за вредност Б (ΔА-Б). Добијене вредности ΔА-Б за стандарде хистамина се деле са вредностима нмол/кив за сваки стандардни раствор

хистамина појединачно. На тај начин се добијају вредности означене са Φ . Уношењем вредности нмол/квив на x осу координатног система, а на y осу вредности $\Delta A-B$ конструише се стандардна крива за хистамин. На основу стандардне криве и формуле $\Sigma \Phi/n = \Phi$ (n је број стандардних раствора хистамина) израчунава се фактор флуоресценције (Φ). Након тога се вредности Φ уносе у формулу за израчунавање концентрације хистамина у узорцима из синовијалне течности и крви:

конц хистамина у кивети = $[(\Delta A-B)/\Phi] / \text{волумен екстракта}$

конц. хистамина у узорку = (конц хистамина у кивети / Вол. узорка) \times K

K је корекциони фактор за волумен и износио је у овом случају 4.

Статистичка обрада података

Статистичка обрада резултата врши се помоћу студентовог t теста, кориштењем границе вероватноће од 95%.

е. Очекивани резултати и значај студије

Очекује се да ће резултати овог истраживања показати постојање одређеног односа концентрације хистамина у крви и синовијалној течности који називамо хистамински индекс. Хистамински индекс би омогућио бољу компарацију концентрације хистамина у синовијалној течности и у крви пацијената са реуматоидним артритисом и остеоартрозом, које иначе варирају у великој мери. Очекују се значајне разлике у хистаминском индексу код пацијената који болују од реуматоидног артритиса и остеоартрозе. Наиме, очекује се да хистамински индекс показује статистички значајно више вредности код болесника који болују од реуматоидног артритиса у односу на остеоартрозу.

Такође се очекују значајне разлике у нивоу хистамина у синовијалној течности код реуматоидног артритиса код пацијената који користе комбиновану базичну терапију (метотрексат, делагил) и пронисон у односу на оне који користе само делагил и НСАИЛ или само НСАИЛ. Интраартикуларна примена

глицокортикоида такође би могла значајно да смањи ниво хистамина у синовијалној течности.

Не очекују се статистички значајне разлике у концентрацији хистамина у синовијалној течности нити у крви у зависности од старости и пола болесника који болују од реуматоидног артритиса

Очекује се да код остеоартрозе концентрација хистамина у синовијалној течности има тенденцију пораста пропорционално дужини трајања обољења и интензитету болести.

Резултати истраживања кандидата Мр.Др.Александра Томић-Лучић би могли имати значај у расветљавању комплексне улоге хистаминског система у патофизиологији реуматоидног артритиса и остеоартрозе.

III Закључак и предлог комисије

ЗАКЉУЧАК

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, Мр.Др. Александра Томић-Лучић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан кроз поделу пацијената према постављеној дијагнози на две одвојене групе: а. реуматоидни артритис и б. остеоартроза код којих ће бити праћена концентрација хистамина у синовијалној течности и у крви. Методологија одређивања концентрације хистамина у узорцима је до детаља прецизирана, почевши од екстракције хистамина, па све до флуориметријског есеја. Метода се базира на Фогеловој модификацији Схореове флуориметрејске методе из 1988. године.
3. Комисија сматра да ће докторска теза Мр. Др. Александре Томић-Лучић, под менторством проф.Др.Мирка Росића, представити темељну студију која ће успоставити одређену корелацију између клиничких параметара који се односе на реуматоидни артритис и остеоартрозу, и концентрације хистамина у синовијалној течности и крви пацијената. Резултати овог истраживања даће допринос у расветљавању комплексне улоге

хистаминског система у патофизиологији реуматоидног артритиса и остеоартрозе.

4. Комисија предлаже Научно-наставном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Мр сци мед Др. Александре Томић-Лучић под називом:

**"КОНЦЕНТРАЦИЈА ХИСТАМИНА У СИНОВИЈАЛНОЈ ТЕЧНОСТИ И
КРВИ ПАЦИЈЕНАТА КОЈИ БОЛУЈУ ОД РЕУМАТОИДНОГ
АРТРИТИСА И ОСТЕОАРТРОЗЕ"**

ПРЕДЛОГ МЕНТОРА

За ментора рада комисија предлаже **Проф Др.Мирка Росића**, редовног професора Медицинског факултета у Крагујевцу.

Председник Комисије

Проф.Др. Снежана Живанчевић-Симоновић

Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу
Научна област: Патолошка физиологија

Проф. Др. Мирко Росић

Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу
Научна област: Физиологија

Доц.Др.Милан Петронијевић

Доцент на ВМА, Београд
Научна област: Интерна медицина, субспецијалистичка област Реуматологија
