

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-7479/3-8 од 10.10.2012. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. Иване Николић под називом:

„УТИЦАЈ ЕСТРАДИОЛА, ПРОГЕСТЕРОНА И ЊИХОВИХ АНТАГОНИСТА (МОДУЛАТОРА) НА АПОПТОЗУ ИЗАЗВАНУ МЕТОТРЕКСАТОМ И МИОТРЕКСАТОМ НА ЕНДОМЕТРИЈАЛНИМ СТРОМАЛНИМ ЋЕЛИЈСКИМ ЛИНИЈАМА IN VITRO”

На основу одлуке Наставно-научног већа, дат је предлог за формирање Комисије у саставу:

- 1. проф. др Слободан Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Гинекологија и акушерство и Медицинска генетика, председник
- 2. проф. др Милица Простран**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, члан
- 3. проф. др Александар Живановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан
- 4. доц. др Владислав Воларевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
- 5. доц. др Иванка Зелен**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др мед. Ивана Николић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1 Кратка биографија кандидата

Др Ивана Николић, рођена 26.03.1981. у Фочи, Република Српска. Основну школу и средњу Медицинску школу завршила је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је 1999. а завршила у јуну 2006. године, са просечном оценом 8,14. Постдипломске студије на смеру Хумана репродукција на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је 2006. године. Усмени докторски испит на смеру Хумана репродукција положила је октобра 2008. године. Од 2007. године запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу на катедри Биохемија у звању инструктора у настави. Од октобра 2008. запослена је у звању сарадника у настави за ужу научну област Биохемија и од децембра 2009. запослена у звању асистента на предмету Биохемија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Учесник је актуелних пројеката Министарства наука Преклиничка испитивања биоактивних супстанци (ПИБАС), рег. бр. 41010 и Интерлеукин 33/ST2 сигнални пут и галектин 3 у патогенези експерименталних периапикалних промена, рег. бр. 175071 као и Јуниор пројеката Факултета медицинских наука Ефекат Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата *in vitro* ЈП 02-11.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „УТИЦАЈ ЕСТРАДИОЛА, ПРОГЕСТЕРОНА И ЊИХОВИХ АНТАГОНИСТА (МОДУЛАТОРА) НА АПОПТОЗУ ИЗАЗВАНУ МЕТОТРЕКСАТОМ И МИОТРЕКСАТОМ НА ЕНДОМЕТРИЈАЛНИМ СТРОМАЛНИМ ЋЕЛИЈСКИМ ЛИНИЈАМА *IN VITRO* ”

Предмет:

Ова студија ће се бавити утврђивањем утицаја естрадиола, прогестерона и њихових модулатора (Ралоксифена и Мифепристона) на апоптозу изазвану Метотрексатом и Миотрексатом на ендометријалним стромалним ћелијским линијама.

Хипотезе:

1. Испитиване супстанце узрокују апоптозу у ендометријалним стромалним ћелијама (ThESC ћелије)
2. Естроген модулише (мења) апоптотичне ефекте изазване Метотрексатом и Миотрексатом на ендометријалне стромалне ћелије (ThESC ћелије) у комбинацији са Ралоксифеном (селективним модулатором естрогенских рецептора).
3. Прогестерон модулише апоптотичне ефекте изазване Метотрексатом и Миотрексатом на ендометријалне стромалне ћелије (ThESC ћелије) у комбинацији са Мифепристоном (модулатор прогестеронских рецептора).

2.3 Подобност кандидата

Кандидат Др Ивана Николић објавила је пет радова у научним часописима од међународног и националног значаја, као и већи број сажетака. У часопису од националног значаја са рецензијом је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

А) Радови штампани у часописима од међународног значаја (категорија М20):

1. **Ivana Nikolic**, Tatjana Kastratovic, Ivanka Zelen, Aleksandar Zivanovic, Slobodan Arsenijevic and Marina Mitrovic. Cytosolic pro-apoptotic SPIKE induces mitochondrial apoptosis in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 395 225–231 (**М23 категорија, 3 бода**)
2. S Popovic, D Baskic, P Djurdjevic, I Zelen, M Mitrovic, **I Nikolic**, D Avramovic, M Radenkovic, N Arsenijevic Endoplasmic reticulum stress associated with caspases 4 and 2 mediates korbazol induced B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis. *JBUON* 2010; 15 (4) (**М23 категорија, 3 бода**)
3. Volarevic, V., Mitrovic, M., Milovanovic, M., Zelen, I., **Nikolic, I.**, Mitrovic, S., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., Protective Role of IL-33/ST2 Axis in Con A-Induced Hepatitis. [J Hepatol](#). 2012; 56 (1): 26-33 (**М21 категорија, 8 бодова**)
4. Зарић М, Митровић М, **Николић И**, Поповић С, Ђурђевић П, Баскић Д, Зелен И. Испитивање активности супероксид дизмутазе, каталазе и глутатион пероксидазе у плазми и лизатима лимфоцита оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије. *Медицински часопис, Српско лекарско друштво, Окружна подружница Крагујевац*, 2011; 45(2): 9-16. (**М52 категорија, 1,5 бода**)

Кандидат Др Ивана Николић је као аутор и коаутор радова објављених у међународним и домаћим часописима показала да се њен досадашњи научно-истраживачки рад може вредновати са **15,5 бодова**.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Најчешћи симптоми хиперплазије ендометријума су учестала и нерегуларна крварења, увећање волумена ендометријума, повећана компресија крвних судова на нивоу утеруса као и смањење контрактилности на нивоу ендометријума. Главни акценат конзервативног третмана хиперплазије ендометријума и осталих бенигнух промена утеруса стављен је на смањење обилности менструационог крварења. У медикаментозној терапији у којој се примењују GnRh антагонисти, СЕРМ, прогестеронски антагонисти, СПРМ, аналози соматостатина и други. Новија група лекова СЕРМ (Ралоксифен) и ПА (Мифепристон) представљају могуће и још увек

недовољно испитане лекове за терапију ендометријалне хиперплазије. Наиме још увек није показано који од ове групе лекова је ефикаснији у лечењу бенигнух промена у присуству женских полних хормона, није утврђена доза као ни механизам дејства ових лекова у присуству естрогена и прогестерона. Мифепристон као прогестеронски антагониста испољава у појединим ткивима агонистички ефекат услед чега је сврстан у тип 2 СПРМа, док Ралоксифен (СЕРМ) испољава чист антагонистички ефекат на утерус. Метотрексат иако је антимеритолит, показао се као јак индуктор апоптозе у фиброидима локалном применом осмог дана менструационог циклуса доводи до смањења обилности крварења и смањења волумена фиброида. Испитивања ефекта и дејства естрогена, прогестерона, њихових антагониста, као и Метотрексата и Миотрексата на овој ћелијској линији пружају могућност модификације конзервативног третмана симптома хиперплазије ендометријума пацијенткиња. (СЕРМ-селективни модулатор естрогесних рецептора, СПРМ-селективни модулатор прогестеронских рецептора, ПА-прогестеронски антагониста)

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљеви:

1. Утврдити ефекат испитиваних лекова (Ралоксифен, Мифепристон, Метотрексат и Миотрексат) и женских полних хормона (Естроген и Прогестерон) на вијабилност/цитотоксичност ендометријалних стромалних ћелија
2. Утврдити ефекат Естрогена и Прогестерона на апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата
3. Допринос утврђивању механизма апоптозе код испитиваних супстанци

Значај:

Значај ове студије је у испитивању ефекта женских полних хормона на апоптозу узроковану испитиваним супстанцама, утврђивању механизма апоптозе као и испитивању да ли постоји разлика у механизму дејства естрогена и прогестерона на апоптозу изазвану испитиваним лековима (утврђивање механизма) утиче. Битно је напоменути да предлог тезе обухвата новине које нису до сада урађене на ThESC ћелијској линији у које убрајамо утврђивање механизма апоптозе у присуству женских полних хормона код представника различите групе испитиваних лекова. Целокупни значај студије поред молекуларног има и основ за даља предклиничка истраживања тако и потенцијалом за клиничку студију која би у будућности дала резултате у погледу ефикасније терапије ових промена која би могла да смањи инциденцу највећег узрока хистеректомије код жена, да допринесе ефикаснијем лечењу као и превенцији многих других тумора који су зависни од женских полних хормона (позитивни ефекти лекова у превенцији тумора дојке и лечењу остеопрозе). На основу резултата студије очекује се да буде донешен закључак који од женских полних хормона утиче на активацију апоптозе када се примени са одређеном групом

испитиваних лекова у ин витро условима као и проширење сазнања о патенту Миотрексату

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Терапија хиперплазија ендометријалних стромалних ћелија је медикаментозна и хируршка (4, 5, 6). У медикаментозној терапији најчешће се користе GnRH антагонисти, селективни модулатори естрогенских и прогестеронских рецептора, инхибитори ароматазе, аналози соматостатина и други (6). Мифепристон припада типу 2 прогестеронских антагониста јер у зависности од типа ћелије може испољити антагонистички или агонистички ефекат (3). У утерусу Мифепристон испољава чист антагонистички ефекат (7), мада његов тачан механизам дејства у присуству женских полних хормона није утврђен (7). Ралоксифен, СЕРМ, вршећи модулацију естрогенских алфа и бета рецептора (8), активира транскрипцију гена за протеине који узрокују смрт или пролиферацију ћелије (8). Ралоксифен је регистрован за лечење остеопорозе (9) али новија истраживања показују да овај лек може да се користи у превенцији и лечењу великог броја хормон зависних тумора (10, 11). Метотрексат је лек из групе антиметаболита који делује на ензим дихидро-фолат-редуктазу, инхибира редукцију дихидро-фолне киселине чиме спречава синтезу ДНК. Метотрексат има честу примену у гинеколошким обољењима (8) смањује волумен миома, дозе овог лека примењене локално не испољавају цитотоксични, штетни ефекат на остале органе. Миотрексат (патентиран лек) представља водени раствор Метотрексата и Л аргинина у односу 1:5. Циљ тезе је да испита и утврди у којој мери женски полни хормони (Естроген и Прогестерон) могу утицати на апоптозу у ендометријалним стромалним ћелијски линијама као и то да ли њихова заједничка примена са испитиваним супстанцама мења тј утиче на апоптозу изазвану Метотрексатом и Миотрексатом. Апоптоза или програмирана ћелијска смрт може бити индукована на два начина, унутрашњим –митохондријалним путем и спољашњим путем (14, 15). За утврђивање механизма апоптозе неопходно је визуализовати, локализовати и одредити експресију одређених апоптотичних протеина као што су Bcl-2, Вах, Сyt c и каспаза 3 (14, 15).

2.7 Методе истраживања

А) Врста студије: Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

Б) Популација која се истражује: ThESC ћелијска линија, ATCC ®: CRL-4003tm, адхерентна ендометријална стромална ћелијска линија пореклом из ендометријума утеруса (пацијенткиња је имала дијагностикован миом) имортализована хуманом теломеразом, узгајане у комплетном медијуму DMEM 4,5g глюкозе/L, 2% L-глутамин (2mM), 1% пеницилин стрептомицин, 1% неесенцијалне аминокиселине, 1% инсулин трансферин суплемент и 10% FBS у инкубатору на температури од 37 °C и 5% CO₂ у стерилним фласковима погодним за адхерентне ћелије. Сви експерименти као и третирања ћелија испитиваним супстанцама обављају се при конфлуентности ћелија од 80% уколико метода не захтева другачије.

В) Метод:

Након достизања жељене конфлуентности нетретиране ћелије ће бити подељене у контролне и експерименталне групе.

МТТ тест: У циљу утврђивања цитотоксичног ефекта испитиваних супстанци на ендометријалним стромалним ћелијама користиће се МТТ тест цитотоксичности (42). Тест се изводи у 96 микро-титар плочама са равним дном. У првом реду испитиваће се спонтана цитотоксичност (ћелијама ће се додавати само медијум), а у осталим редовима индукована цитотоксичност (ћелијама ће се додавати испитиване супстанце одређених концентрација). Радиће се у трипликату. Након излагања ћелија испитиваним супстанцама следи инкубација ћелија МТТ штоком (5mg/ml МТТ раствореним у PBS-у) 4h на температури 37C° у атмосфери 5% CO₂. Након одливања супернатанта ћелијама ће се додати 200µl DMSO-а (инкубираће се 30 мин на радној температури) након чега ће се оптичка густина читати на Zenit-у на таласној дужини од 595 nm. Процент цитотоксичних ћелија рачунаће се по формули: Цитотоксичност (%) = [1-(експериментална група (OD))/(контролна група(OD)) x100].

Annexin V-Fitc Тест: У циљу утврђивања апоптоичног ефекта испитиваних супстанци користиће се Annexin V-FITC тест у комбинацији са пропидијум јодидом (PI). Након третирања ћелија испитиваним супстанцама, ћелије се перу 2 пута хладним PBS-ом и биће ресуспендоване у 1 x binding bufferu. У 100 µl ове солуције додаће се 5µl Annexin V-FITC и 5 µl PI. Следи инкубација ћелија 15 минута на собној температури (25C°) у мраку након чега се додаје 400µl 1x binding buffer-а и FACS анализа ће бити извршена у року од 1h.

Флуоресцентна микроскопија -Механизам апоптоичког ефекта биће одређиван флуоресцентном микроскопијом. Ћелије ће бити засејане на стерилисаним стакленим љуспицама (предходно постављене у 24 well plate плочу и инкубиране 24h у инкубатору) до достизања конфлуентности од 80%. Након третирања ћелије ће бити опране у PBS-у, а затим фиксиране. Пермеабиланизација ћелија биће извршена у 0.2% Triton-X/PBS, након чега ће уследити инкубација 30 минута у blocking buffer-у (10% FBS, 0.1% Triton X-100/PBS) (42). Инкубација ћелија примарним антителима у периоду од једног сата биће извршена са различитим анти-зечијим: BAX, Bcl-2, caspase-3 и анти-мишијим антителима: cytochrome-c, β-actin. Након инкубације уследиће прање ћелија у PBS-у и инкубација са секундарним флуоресцентним антителима: Alexa 488 и 594 (у мраку 1h, на собној температури). Флуоресценција ћелија посматраће се на конвенционалном микроскопу под увећањем 40X и 100X.

Варијабле:

Независне варијабле (узрок):

Независне варијабле студије представљају примењене испитиване супстанце, Ралоксифен, Метотрексат (у дози која има најмањи цитотоксични ефекат), Мифепристон, Миотрексат, естроген и прогестерон.

Зависне варијабле (исход):

Степен вијабилности, цитотоксичност лекова, механизам апоптозе, одређивање експресије и локализације протеина кључних за преживљавање или смрт ћелије представљају зависне варијабле студије.

Снага студије и одређивање величине узорка:

Величина група је одређена на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 95%, вероватноће грешке првог типа (α) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе. Укупна величина узорка (total sample size=134) израчуната је на основу програма G power и коришћењем теста корелације (Correlation: point biserial model).

Статистичка обрада података:

Пре статистичке обраде података испитује се правилност расподеле добијених вредности. Ако је број вредности мањи од 50 за проверу ће се користи Shapiro-Wilk тест, за узорак већи од 50 користи се Kolmogorov-Smirnov тест. На основу добијене вредности p одредићемо тест који ћемо користити за статистичку анализу (параметарски T – тест за $p < 0.05$ или непараметарски Mann-Whitney-ев тест ако је $p > 0.05$). За испитивање утицаја концентрације лека на исход користиће се тест регресије. Вредности добијених података ће се сматрати статистички значајним уколико је $p < 0.05$. За статистичку обраду података користиће се пакет SPSS 13. Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна девијација. Добијени резултати биће приказани табеларно и графички.

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Хиперплазије ендометријалних стромалних ћелија утеруса представљају главни узрок хистеректомије код жена, повезани су са повећањем инциденце инфертилитета и повећан је ризик од настанка карцинома ендометијума. Значај ове студије је у испитивању ефекта женских полних хормона на апоптозу узроковану испитиваним супстанцама, утврђивању механизма апоптозе као и испитивању да ли постоји разлика у механизму дејства естрогена и прогестерона на апоптозу изазвану испитиваним лековима (утврђивање механизма) утиче. Битно је напоменути да предлог тезе обухвата новине које нису до сада урађене на ThESC ћелијској линији у које убрајамо утврђивање механизма апоптозе у присуству женских полних хормона код представника различите групе испитиваних лекова. Целокупни значај студије поред молекуларног има и основ за даља предклиничка истраживања тако и потенцијалом за клиничку студију која би у будућности дала резултате у погледу ефикасније терапије ових промена која би могла да смањи инциденцу највећег узрока хистеректомије код жена, да допринесе ефикаснијем лечењу као и превенцији многих других тумора који су зависни од женских полних хормона (позитивни ефекти лекова у превенцији тумора дојке и лечењу остеопрозе).

На основу резултата студије очекује се да буде донешен закључак који од женских полних хормона утиче на активацију апоптозе када се примени са одређеном

групом испитиваних лекова у ин витро условима као и проширење сазнања о патенту Миотрексату

2.9 Оквирни садржај дисертације

Најчешћи симптоми хиперплазије ендометријума су учестала и нерегуларна крварења, увећање волумена ендометријума, повећана компресија крвних судова на нивоу утеруса као и смањење контрактилности на нивоу ендометријума. Главни акценат конзервативног третмана хиперплазије ендометријума и осталих бенигнух промена утеруса стављен је на смањење обилности менструационог крварења. У медикаментозној терапији у којој се примењују GnRh антагонисти, СЕРМ, прогестеронски антагонисти, СПРМ, аналози соматостатина и други. Новија група лекова СЕРМ (Ралоксифен) и ПА (Мифепристон) представљају могуће и још увек недовољно испитане лекове за терапију ендометријалне хиперплазије. Наиме још увек није показано који од ове групе лекова је ефикаснији у лечењу бенигнух промена у присуству женских полних хормона, није утврђена доза као ни механизам дејства ових лекова у присуству естрогена и прогестерона. На основу коришћења савремених методолошких приступа добијени резултати ће указати на који начин естроген, прогестерон, Мифепристон, Ралоксифен, Метотрексат и Миотрексат делују на стромалне ћелије ендометријума у *in vitro* условима и да ли за апоптотични ефекат испитиваних супстанци постоји примена у клиничкој студији.

2.10 Име потенцијалног ментора

Доц. Митровић Марина, Доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну области Биохемија.

2.11 Научна област дисертације

Медицина. Уже области биохемија, фармакологија и гинекологија

2.12 Научна област чланова комисије

1. проф. др Слободан Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Гинекологија и акушерство и Медицинска генетика, председник

2. проф. др Милица Простран, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, члан

3. проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан

4. доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

5. доц. др Иванка Зелен, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова, др Ивана Николић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитује утицај естрадиола, прогестерона и њихових антагониста (модулатора) на апоптозу изазвану Метотрексатом и Миотрексатом на ендометријалним стромалним ћелијским линијама *in vitro*.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Иване Николић бити од великог научног и практичног значаја, да се сагледа утицај женских полних хормона на апоптозу изазвану модулаторима женских полних хормона на ендометријалне ћелије утеруса.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Иване Николић под називом **„Утицај естрадиола, прогестерона и њихових антагониста (модулатора) на апоптозу изазвану Метотрексатом и Миотрексатом на ендометријалним стромалним ћелијским линијама *in vitro*”** и одобри њену израду.

проф. др Слободан Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Гинекологија и акушерство и Медицинска генетика, председник

проф. др Милица Простран, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, члан

проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан

доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

доц. др Иванка Зелен, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.
