

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Изборног већа**

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-3497/3-8 од 18.5.2011. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Александре Младеновић Михајловић, под називом:

**„АНАЛИЗА ЦИТОХИСТОЛОШКИХ ФАКТОРА КОЈИ ДОПРИНОСЕ ПОЈАВИ НЕПРАВИЛНИХ КРВАРЕЊА, БОЛА И ФЕБРИЛНОСТИ КОД ПАЦИЈЕНТКИЊА СА МИОМИМА УТЕРУСА”**

Чланови комисије су:

- 1. проф. др Слободан Јанковић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација
- 2. проф. др Милица Берисавац**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Гинекологија и акушерство
- 3. доц. др Ирена Танасковић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија.

**2.1 Кратка биографија кандидата**

Др Александра Младеновић Михајловић је рођена у Београду 13.2.1958. год. где је завршила основну школу, гимназију и Медицински факултет. Медицински факултет је уписала 1977 год и завршила га 1982 год са просечном оценом 9,14. Специјалистички стаж из гинекологије и акушерства је обавила у Београду, а специјалистички испит положила 1991 год са одличном оценом. Звање примаријуса је стекла 2001 год. Постављена је на место шефа Одељења гинекологије са перинатологијом и оперативом 2002 год, а на место начелника Болнице за гинекологију и акушерство КБЦ Звездара 2009 год.

**2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе**

**Наслов:** „АНАЛИЗА ЦИТОХИСТОЛОШКИХ ФАКТОРА КОЈИ ДОПРИНОСЕ ПОЈАВИ НЕПРАВИЛНИХ КРВАРЕЊА, БОЛА И ФЕБРИЛНОСТИ КОД ПАЦИЈЕНТКИЊА СА МИОМИМА УТЕРУСА”

**Предмет:** Ова студија ће се бавити утврђивањем значајних цитохистолошких фактора који су повезани са крварењем, болом и/или фебрилношћу код пацијенткиња са миомима утеруса и одређивањем њиховог релативног значаја.

**Хипотезе:**

- Експресија дезмина у глатким мишићним ћелијама потврђује високо диференцирани контрактилни фенотип. Хипотеза овог истраживања је да глатке мишићне ћелије у анализираним миомима експримирају синтетски фенотип, односно услед дејства различитих фактора не развијају високо диференцирани контрактилни фенотип (изостанак дезминске експресије уз експресију виментина).
- Експресија виментина корелира са синтетским фенотипом глатких мишићних ћелија утврђеним на нивоу трансмисионе електронске микроскопије.
- Постоји повезаност синтетског фенотипа глатких мишићних ћелија са стварањем повећане количине екстрацелуларног матрикса, односно глатке мишићне ћелије чине доминантну ћелијску популацију у миомима и упркос фенотипским карактеристикама сличним фибробластима, представљају посебан ентитет из кога се развијају миоми.
- Миоми настају пролиферацијом матичних глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа, без утицаја васкуларних глатких мишићних ћелија из неоваскуларних формација.
- Код миома добијених од пацијенткиња са израженим крварењем, високо васкуларизована везивоткивна компонента доминира над глаткомишићном; могуће је да овај тип миома настаје пролиферацијом фибробласта везивног ткива.
- Код миома добијених од пацијенткиња са боловима и повишеном телесном температуром присутна је изражена леукоцитна и лимфоцитна инфилтрација.

### 2.3 Подобност кандидата

Кандидат је објавио један рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

- **Младеновић Михаиловић А**, Младеновић Богдановић З, Митровић П, Танасковић И, Ушај Кнежевић С, Станојевић М. Имуноцитохемијске карактеристике субмукозних миома утеруса. Војносанитетски преглед 2010; 67(12): 977-982. M23, 3бодa

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Миоми-лејомиоми су јасно ограничени бенигни тумори глаткомишићног ткива материце који представљају групу најважнијих бенигнух тумора овог органа. Најчешће се јављају у периоду између 35. и 50. године живота, а присутни су у око 35-

40% жена, а по неким ауторима у чак 75% случајева. Након менопаузе, фреквенца ових тумора опада и износи свега 4%. Од свих гинеколошких болесница, 4-6% има присутан миом утеруса. Подједнако је заступљен код жена које су рађале и које нису рађале. Узроци настанка миома су многоструки и још увек недовољно потврђени и доказани. Значајним фактором у настанку овог тумора сматра се наслеђе (миомске породице), затим расна припадност (три пута је чешћи код црнкиња него код жена беле расе), као и тип конституције (атлетска, а посебно пикничка конституција представљају предиспонирајући фактор). Ипак, данас се сматра да је хормонска стимулација један од најзначајнијих чинилаца у патогенези овог обољења.

Основна структурна јединица грађе миома је глатка мишићна ћелија контрактилног фенотипа. Према литературним подацима, глатке мишићне ћелије могу да експримирају два фенотипска статуса: *контракtilни* и *синтетски*.

За разлику од глатких мишићних ћелија контрактилног фенотипа, ћелије синтетског фенотипа нису међусобно спојене комуникантним спојевима. У цитоплазми имају веома развијене синтетске органеле, гранулисани ендоплазматски ретикулум и Голџи апарат, са врло мало миофибрила. Овај фенотипски статус је карактеристичан за почетне фазе развоја глатких мишићних ћелија, током ембрионалног живота и током раста. Ове слабодиферентоване форме синтетишу колаген, еластин и протеогликане, па подсећају на фибробласте. Одговарају на дејство цитокина и специфичних фактора раста. Истраживања су показала да глатке мишићне ћелије и у адултном добу, у неким обољењима могу да експримирају синтетски фенотип. Сматра се да је један од кључних момената у патогенези ових обољења губљење експресије маркера диференцираног контрактилног фенотипа, односно њихов прелазак из контрактилног у синтетски фенотип. Ова фенотипска трансформација омогућава миграцију глатких мишићних ћелија, њихову пролиферацију и синтетску активност.

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

**Циљ:** Утврдити значајне цитохистолошке факторе који су повезани са крварењем, болом и/или фебрилношћу код пацијенткиња са миомима утеруса и одредити њихов релативни значај.

**Значај.** Резултати ове тезе ће повећати могућности лечења миома и превенције компликација. Утврђивање повезаности цитохистолошких фактора са компликацијама и исходима лечења миома ће омогућити бољу интерпретацију патохистолошких налаза миома и адекватнији избор терапијских метода.

## **2.6 Веза са досадашњим истраживањима**

Дуго се сматрало да миоми воде порекло од мишићних ћелија утеруса или од фибробласта. Ова теорија имала је присталице због присуства везивноткивне компоненте у миомима. Тумори који садрже већу концентрацију везивног ткива,

називају се фиброми. Међутим, у светлу експерименталних радова који датирају од средине двадесетог века, преовладало је мишљење да миоми, фибромиоми и фиброми, воде порекло од глатких мишићних ћелија утеруса. Miller и Ludovici су 1955. године доказали *in vitro* студијом да миоми воде порекло од глатких мишићних ћелија утеруса. Постоје хипотезе да миоми утеруса могу да настану и од глатких мишићних ћелија које се налазе у зидовима крвних судова утеруса.

Ембрионално порекло ових ћелија, које у великој мери одређује њихове имунохистохемијске карактеристике, је различито. Упркос многим истраживањима, хистогенеза миома још увек није сасвим разјашњена. Према најновијим литературним подацима, сматра се да глатке мишићне ћелије утеруса воде порекло од плурипотентног утерусног примордијума, кога чине епителне целомске и мезенхимне субцеломске ћелије. Разлику у настанку ендометријума и миометријума готово да је немогуће одредити, с обзиром да већ у раном ембрионалном добу нестаје граница између епитела и мезенхима оних делова *Muller*-ових канала из којих настаје утерус. С тога, захваљујући биопотенцијалу не може се јасно одредити генеза неоплазми које се развијају у материци те су оправдане претпоставке појединих аутора да ћелије ових тумора воде порекло од стромалних ћелија ендометријума.

Студије које изучавају развој глатких мишићних ћелија у ткивима која воде порекло од ендодерма (дигестивни и уринарни тракт) и од мезодерма (*Miller*), током феталног развоја, показују да је развој глатких мишићних ћелија у мезодермалним ткивима спорији од развоја глатких мишићних ћелија у ендодермалним ткивима. Недиференциране ћелије које пролиферишу и диференцирају се у глатке мишићне ћелије утеруса, током феталног периода имају дужи период нестабилности при чему су изложене многобројним спољашњим факторима као што су стероидни хормони или фактори раста мајке. Недиференциране ћелије на које утичу за сада непознати матернални фактори, вероватно постају касније прогениторне ћелије од којих се развијају миоми. Прогениторне ћелије остају у миому и вероватно почињу раст после менархе, растући током репродуктивног периода, када постоји највећа активност оваријума. У постменопаузи, када долази до пада концентрације стероидних хормона долази до престанка раста миома.

Патогенеза миома утеруса тиме остаје контроверзна и дискутабилна, па би прецизно одређивање имунохистохемијских карактеристика глатких мишићних ћелија миома и њиховог ембрионалног порекла допринело бољем разумевању патохистолошких механизма који доводе до настанка миома, а тиме и унапређењу постојећих терапијских процедура.

Осим тога, досадашње бројне студије оријентисане претежно на анализу дегенеративних промена у миомима (попут хијалине дегенерације) нису ни потврдиле ни оповргле повезаност микроскопског налаза и клиничке презентације миома. Према поменутих литературним подацима, најчешћа дегенеративна промена у миомима је хијалина дегенерација, међутим, доказано је да хијалина дегенерација не утиче на појаву карактеристичних симптома. Симптоми попут бола и грознице постоје код пацијенткиња са миомом, који у трудноћи подлеже црвеној дегенерацији. Слично се дешава и са торквираним или инфарцерираним миомима или код миома код кога се развила инфекција.

Свако обољење настаје и развија се по одређеним патофизиолошким механизмима који условљавају присуство или одсуство одређених субјективних тегоба

или објективних знакова обољења. Симптоми и знаци обољења који се јављају код пацијенткиња са миомима могу бити појединачни или мултипли и зависе од локализације, величине и броја присутних тумора. Како досадашње клиничке и базичне студије које изучавају повезаност између присутних симптома и дегенеративних промена нису показале значајну корелацију између ових параметара, намеће се потреба да се детаљнијом и свеобухватнијом анализом морфолошких карактеристика миома и упоредним прегледом добијених резултата са клиничким сликама анализираних група пацијенткиња, допринесе бољем разумевању патогенезе овог обољења, што је основни циљ ове студије.

## 2.7 Методе истраживања

**Врста студије.** Ова студија је дизајнирана као сет од три студије случај/контрола. **Случајеви** ће бити пацијенткиње са миомима које имају неправилна крварења, болове или фебрилност, а **контроле** пацијенткиње са миомима без наведених компликација, сличне старости као случајеви.

**Популација која се истражује.** Популацију чине пацијенткиње са миомима утеруса Болнице за гинекологију и акушерство КБЦ-а „Звездара“ у Београду, лечење у последњих 5 година.

### **Узорци**

У овом истраживању биће коришћен хистолошки материјал добијен током операција пацијенткиња са миомима утеруса. Узорци ће бити анализирани морфолошки и упоређени са неизмењеним делом зида утеруса који ће послужити као контрола. Резултати морфолошке анализе биће приказани хистолошким фотомикрографијама.

### **Хистолошка испитивања**

У циљу добијања што више података релевантних за утврђивање детаљне структуре узорака, биће коришћене бројне рутинске и селективне хистохемијске технике, имунохистохемијске методе, као и метода трансмисионе електронске микроскопије.

### **Рутинске хистохемијске методе бојења**

У рутинској обради препарата, добијени узорци биће фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24h, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци миома утеруса биће дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласту. Попречни серијски пресеци, дебљине 5  $\mu\text{m}$ , биће сечени микротомима *Leica SM 2000R* и *Leica Reinhart Austria*. После депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци ће бити бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и монтирани на плочице са *Canada* балзамом (20).

### **Селективне методе бојења**

У истраживању промена у везивном ткиву миома, користиће се следеће селективне методе бојења: селективне технике за еластична влакна (*Weigert van Gieson*-ова, *Verhoeff van Gieson*-ова метода и орцеин), методе за доказивање муцина (*PAS* и *alcian blue-PAS* реакција), селективне методе за колагена влакна (*Grosman Malory*-ева метода за колагена влакна, *Van Gieson*-ова метода за колагена влакна, ретикулинска метода), као и трихромне технике (трихромно бојење по *Masson*-у и *Azzan Heidehain*-ова реакција), према оригиналним транскрипцијама (13, 14).

### **Методологија имунохистохемијских бојења**

Ткиво ће бити фиксирано у 4 %-тном неутралном пуферованом формалдехиду 24 часа и калупљено у парапласту. Резови дебљине 5  $\mu\text{m}$ , биће монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost* и сушени на температури од 56°C у току 1 сата.

Имунохистохемијске методе биће коришћене за идентификацију следећих антигена експримираних на структурним компонентама миома (глатким мишићним ћелијама, фибробластима, ендотелним ћелијама крвних судова, васкуларним глатким мишићним ћелијама, ћелијама везивног ткива и компонентама екстрацелуларног матрикса): виментин,  $\alpha$ -глаткомишићни актин, дезмин, тешки ланци глаткомишићног миозина, S-100 протеин, колаген IV, ламинин, фибронектин, CD3, CD31, CD34, CD45 (LCA), CD68, *von Willebrand*-ов фактор и PCNA. Процедура имунохистохемијског бојења подразумеваће поступке демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирања препарата са примарним антисерумом и поступак извођења 2 имунохистохемијске методе - LSAB+ - HRP и EnVision+ - HRP.

#### ***Демаскирање антигена***

Након депарафинизације и рехидрације ткивних пресека вршиће се демаскирање антигена одговарајућим поступцима. Формалдехид у току фиксације, као и парафин у току калупљења, изазивају стеричке промене протеина у ткиву, формирањем интермолекуларних веза. Дуготрајна формалинска фиксација може да маскира антигене и умањи ефекат специфичног бојења. Демаскирање антигена је процес обнављања примарне стеричке конфигурације антигена, уклањањем нежељених интермолекуларних веза. Демаскирање антигена врши се високом температуром (у воденом купатилу, микроталасној пећници или у претис лонцу) или протеолитичком дигестијом одговарајућим ензимом (ДАКО Спецификација).

*Демаскирање антигена загревањем у микроталасној пећници.* За овај процес биће коришћена кућна микроталасна пећница *Mulinex Compact*. Демаскирање антигена вршиће се је у 0,1 М цитратном пуферу, рН 6,0 на 800W, у трајању 21 минут.

*Демаскирање антигена загревањем у воденом купатилу.* За демаскирање тешких ланаца глаткомишићног миозина користиће се поступак загревања препарата у воденом купатилу у 0,1 М цитратном пуферу, рН 6,0, у трајању од 40 минута. Препарати ће бити претходно третираны поступком протеолитичке дигестије химотрипсином.

*Демаскирање антигена употребом претис лонца.* Поступак демаскирања антигена у претис лонцу биће коришћен за CD3. Поступак траје 2 минута, а препарати су потопљени у 3л 0,1М цитратног пуфера рН 6,0.

*Демаскирање антигена протеолитичком дигестијом.* За демаскирање тешких ланаца глаткомишићног миозина користи се комерцијални препарат химотрипсина који представља 0,1% химотрипсин у 0,1% CaCl<sub>2</sub> (Sigma C-4129) рН 7,8. Раствор се загрева до 37° Ц. Стаклене плочице са исечцима се прво загреју до температуре од 37° Ц у дестилованој води, а након тога се пребаце у свеже припремљен и загрејан раствор химотрипсина и инкубирају у трајању од 30 минута. Комерцијални препарат ензима проназе биће коришћен за поступак демаскирања S-100 протеина (10 минута на собној температури).

### ***Блокирање ендогене пероксидазе***

Након демаскирања антигена следи блокирање ендогене пероксидазе, 3 %-тним воденим раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у трајању од 15 минута.

### ***Инкубирање примарног антитела***

Након блокирања ендогене пероксидазе, следи доношење примарног антитела и инкубација у трајању од 1h на собној температури у влажној комори.

***Актин*** глатких мишићних ћелија представља а изоформу протеина актина који формира актинске микрофиламенте дијаметра 5нм. Антитела на овај протеин селективно боје актинске микрофиламенте присутне у цитоплазми глатких мишићних ћелија крвних судова, миоепителних ћелија, перицита и стромалних ћелија дигестивног тракта, тестиса, дојке и оваријума (15). Ово антитело не реагује са актином фибрибласта (β и γ цитоплазматски актин), попречно пругастих мишића (α-саркоплазматски) и кардиомиоцита (α-миокардијални). Међутим, ово антитело реагује са миофибробластима у бенигним и реактивним фибробластним лезијама, као и са перисинусоидалним ћелијама јетре (15). У овом истраживању имунохистохемијска реакција за доказивање α-глаткомишићног актина биће коришћена за испитивање дистрибуције глатких мишићних ћелија у миомима.

***CD3*** представља мембрански рецептор који се може детектовати на површини зрелих Т лимфоцита периферне крви. Детектован је на раним тимоцитима и његова експресија је утврђена као један од првих знакова Т ћелијске диференцијације. Због тога се сматра високо специфичним маркером Т лимфоцита. Поликлонска антитела су изолована по свом афинитету за имобилисани CD3 антиген. Антитело реагује са интрацитоплазматским сегментом CD3 антигена експримираним на CD3 лимфоцитима. CD3 антиген је састављен од пет полипептидних ланаца (γ, δ, ε, η и ζ), са молекулском масом 16-28 кДа (16, 17). У овој студији биће коришћен за утврђивање Т лимфоцитне инфилтрације у миомима.

***CD31*** (енгл. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule–PECAM) је трансмембрански гликопротеин присутан на површини ендотелних ћелија и разних хемопоеетских ћелија. Припада суперфамилији имуноглобулина са адхезивним својствима (18). Неке студије су показале повећану ендотелну CD31 експресију у почетним фазама атеросклерозе. Скоро све бенигне васкуларне неоплазме експримирају овај антиген, као и 80 до 100% ангисаркома. У овој студији биће коришћен за идентификацију ендотелних ћелија новоформираних крвних судова за васкуларизацију миома (18).

***CD34*** (енгл. Human Progenitor Cell Antigen) је трансмембрански гликопротеин, молекулске масе 105-120 кДа који се налази на површини васкуларних ендотелних

ћелија, као и већине унипотентних и плурипотентних хемопоеетских ћелија лимфоидне и мијелоидне лозе, прогениторских ћелија као и неких ткивних фибробласта (19, 20, 21). Представља лиганд за Л-селектин (CD62), експримиран на мембрани леукоцита (21). У овом истраживању имунохистохемијско бојење на CD34 биће коришћено у испитивању дистрибуције фибробласта везивног ткива и као и могућег присуства прогениторних прекурзорских ћелија миома.

**CD45** или *LCA*, заједнички леукоцитни антиген (енгл. Leukocyte Common Antigen–LCA), представља велики површински трансмембрански гликопротеин, експримиран на свим хемопоеетским ћелијама са једром. Идентификоване су различите изоформе АБЦ, АБ, БЦ, Б и О. Молекулска маса изоформи се креће од 180 кДа за О до 220 кДа за АБЦ изоформу. Све изоформе имају исти интрацелуларни сегмент повезан са тирозин фосфатидном активношћу, што сугерише да је LCA ћелијски рецептор укључен у сигналну трансдукцију. Анти CD45 антитело је мешавина два моноклонска антитела 2B11 (изолованог из ћелија неопластичног Т целуларног лимфома) које реагује са епитопима четири LCA изоформе (180, 190, 205 и 220 кДа) и PD7/26 које реагује са епитопима три LCA изоформе (190, 205 и 220 кДа). У нормалном ткиву, LCA боји мембране али понекад може да обоји и цитоплазму. Макрофаги и хистиоцити реагују варијабилним интензитетом на ово антитело. Полиморфонуклеари реагују слабо, док плазма ћелије не показују реакцију. У овој студији биће коришћен за утврђивање леукоцитног запаљењског инфилтрата у миомима.

**CD68** антиген масе 110 кДа је високогликолизирани трансмембрански протеин типа I, углавном локализован у лизозомима. Молекуларни клон CD68 припада LAMP/LGP фамилији лизозомалних гликопротеина. Антитело боји макрофаге у великом броју ткива, укључујући Купферове ћелије јетре, макрофаге слезине, плућа и косне сржи. Присутан је на површини макрофага, моноцита и мастоцита, као и ћелија акутне мијелобластне леукемије. Антиген презентујуће ћелије не показују реакцију, као ни прекурсори беле лозе и гранулоцити. У овом истраживању, експресија CD68 биће испитивана у циљу утврђивања присуства макрофага у миомима.

**Дезмин** је протеински молекул тежине 53 до 55 кДа који учествује у формирању интермедијарних филамената диференцираних глатких, скелетених и срчаних мишићних ћелија. У овом истраживању имунохистохемијско бојење за дезмин биће коришћено за утврђивање присуства и дистрибуције формираних, диференцираних глатких мишићних ћелија контрактилног фенотипа у миомима.

**Фибронектин** је велики димерни протеин са Ц-терминалним дисулфидним мостовима, који се налази у саставу базалне мембране. Представља главно место повезивања ћелија и екстрацелуларног матрикса. Велике количине овог протеина се налазе у циркулишућој крви и учествују у интеракцији васкуларног зида и тромбоцита. У овом истраживању, имунохистохемијско бојење за фибронектин биће коришћено за испитивање базалне мембране новоформираних крвних судова као и базалне ламине глатких мишићних ћелија.

**Колаген типа IV** представља компоненту базалне мембране. Имунохистохемијским бојењем на колаген IV могу се идентификовати базалне мембране у многим ткивима и органима укључујући бубрег, кожу, плућа, плаценту и крвне судове. У овом



истраживању биће коришћено у испитивању интегритета базалне мембране ендотела новоформираних крвних судова у миомима.

**Ламинин** је основни протеин у саставу базалне ламине. Постоји 7 изоформи овог протеина. Ламинин садржи велики број "везујућих" места на којима се припајају остале компоненте екстрацелуларног матрикса. У овом истраживању, имунохистохемијско бојење за ламинин биће коришћено у испитивању састава базалних ламина глатких мишићних ћелија.

**Миозин** је контрактилни протеин већине мишићних ћелија, који се налази у саставу миозинских филамената (12 до 16 нм). Постоје две различите изоформе овог протеина, од којих је једна присутна у глатким мишићима, а друга је специфична за скелетне мишићне ћелије. Тешки ланац миозина је цитоплазматски структурни протеин који представља главну компоненту контрактилног апарата глатких мишићних ћелија и појављује се врло рано у току ембрионалног развоја. Постоје две изоформе овог протеина МНС1 и МНС2. Имунохистохемијским бојењем тешких ланаца миозина могу се идентификовати обе изоформе и то у медији крвних судова и у неоинтими, као и у периацинусним и перидукталним миоепителним ћелијама плувачних жлезда и дојке. У овом истраживању, имунохистохемијска реакција за идентификацију тешких ланаца миозина, користиће се за утврђивање дистрибуције глатких мишићних ћелија контрактилног фенотипа у миомима.

**PCNA** (енгл. Proliferating Cell Nuclear Antigen–PCNA) је протеин молекулске масе 36 кДа, који је идентификован као ко-фактор у функцији ДНА-полимеразе. Сматра се поузданим показатељом ћелијске пролиферације, односно, митозе. Овај молекул има дуг полу-живот, па може да се идентификује у ћелијама дуго након изласка из М фазе. Међутим, још увек није изолован и секвенциран цео ген за PCNA. Познато је да је његова експресија индукована под дејством фактора раста у *ин vivo* условима, посебно у туморским ћелијама. У овом истраживању имунохистохемијска реакција за идентификацију PCNA користиће се за утврђивање пролиферишућих ћелија у миомима.

**S-100 протеин** је кисели протеин мале молекулске тежине који је најпре изолован из можданог ткива. Антитела усмерена на овај протеин реагују са А и Б подјединицом S-100 протеина. S-100А подјединица састоји се од једног а и једног б ланца, док је S-100Б протеин састављен од 2 б ланца. S-100 фамилија протеина обухвата деветнаест чланова који се експримирају у великом броју ћелијских типова. S-100 протеин налази се у глијалним и епендималним ћелијама ЦНС-а, Швановим ћелијама периферног нервног система, меланоцитима, хондроцитима, адипоцитима, кардиомиоцитима, глатким и срчаним мишићним ћелијама, хистиоцитима и Лангерхансовим ћелијама, као и интердигитантним ретикуларним ћелијама лимфних чворова. У наведеним ћелијама S-100 протеин се налази и у једру и у цитоплазми. Експресија подтипова S-100 протеина је повезана са интраћелијским процесима који имају  $Ca^{++}$  посредовану регулацију, попут пролиферације, диференцијације и фосфорилације. У овом истраживању примењиваће се за испитивање дистрибуције пролиферишућих глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа у миомима.

**Виментин** је протеин молекулске масе 52 до 57 кДа у интермедијарним филаменатима ћелија мезенхималног порекла: фибробласта, ендотелних ћелија,

глатких мишићних ћелија, хондроцита, лимфоцита и ћелија крви. Неке од наведених ћелијских популација поред виментинских садрже и друге типове интермедијарних филамената. Тако васкуларне глатке мишићне ћелије коекспримирају виментин и дезмин, а глијалне ћелије виментин и кисели глијални протеин (GFAP). У патологији имунохистохемијско бојење на виментин користи се за диференцијацију малигних тумора мезанхималног порекла и карцинома. Међутим, и неки епителни тумори, пре свега бубрега, плућа, желуца, дојке, материце, јајника и тиреоидне жлезде, као и мешовити тумори пљувачних жлезда могу да експримирају овај антиген, што се сматра последицом коекспресије виментинских и кератинских филамената у туморским ћелијама и чињеницом да антитета на виментин могу да показују укрштenu реактивност са цитокератинским интермедијарним филаментима. Коекспресија виментина и дезмина запажена је у неким туморима меког ткива као што су рабдомиосаркоми и леиомиосаркоми. У овом истраживању биће коришћен за испитивање дистрибуције глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа у миомима и праћење очуваности ендотелног омотача и дистрибуције новоформираних крвних судова у неоваскуларизацији миома.

***Von Willebrand-ов фактор*** је велики мултимерни протеин који се синтетише и депонује у Вајбел Паладеовим (енгл. Weibel Palade) телашцима ендотелних ћелија. Овај протеин може да се идентификује и у мегакариоцитима и мастоцитима, а позитивну реакцију показује и већина бенигних тумора ендотелног порекла. У овом истраживању биће коришћен за испитивање очуваности ендотелног слоја неоваскуларних формација у миомима.

### ***Имунохистохемијске методе за визуелизацију комплекса антиген -антитело***

Биће коришћене две високо сензитивне и специфичне имунохистохемијске технике DAKO LSAB<sup>+</sup>/HRP или AP и *EnVision*/HRP.

#### **DAKO LSAB<sup>+</sup>/HRP или AP**

Методом DAKO LSAB<sup>+</sup>/HRP или AP биће имунохистохемијски доказано присуство следећих антигена: виментин,  $\alpha$ -глаткомишићни актин, дезмин, тешки ланци глаткомишићног миозина, S-100 протеин, колаген IV, ламинин, фибронектин, CD31, CD34, CD68, *von Willebrand*-ов фактор и PCNA. Поступак извођења DAKO LSAB<sup>+</sup>/HRP или AP методом састоји се у следећем. Након блокирања активности ендогене пероксидазе, ткивни пресеци се инкубирају са одговарајућим примарним антителом, као што је напред описано, након чега следи инкубација, прво са биотинизираним везујућим антителом, а затим са стрептавидином обележеним пероксидазом. Поступак се завршава инкубацијом пресека у мешавини супстрат-хромогена (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 3-амино-9-етил карбазол у N,N-диметилформамиду, AEC + Substrate-Chromogen kit, Cat. No K 3469, DAKO-Denmark), 5 минута на собној температури. Као општи испирач и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења биће коришћен 0,1 М фосфатни пуфер рН 7,4. Ћелијска једра биће бојена *Mayer*-овим хематоксилином.

#### **DAKO *EnVision*/HRP**

Методом DAKO *EnVision*/HRP имунохистохемијски ће се доказивати присуство у испитиваним структурама CD3 и CD45 (LCA) антигена. У једној од најсавременијих

метода за имунохистохемијску детекцију антигена, са комерцијалним називом *EnVision* након поступка демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе и апликације примарног антитета, примењује се *EnVision* комплекс који представља коњуговани полимер састављен од великог броја секундарних антитета која су везана директно за декстранску основу која садржи пероксидазу рена. У овој процедури примарна антитета се примењују у концентрацији која је 4-10 пута већа него стандардна LSAB техника. У техници *EnVision* као хромоген за визуелизацију користи се боја нови фуксин (engl. New Fuchsin)

### ***Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења***

Сва имунохистохемијска бојења биће изведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама UK NEQAS (енгл. UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry). Пресеци нормалног зида дебелог црева добијени хируршком ресекцијом послужиће као контролни узорци за доказивања присуства глаткомишићног актина, дезмина, тешких ланаца глаткомишићног миозина, S-100 протеина и виментина. Такође, на истим пресецима у крвним судовима различитих слојева зида црева тестираће се и присуство CD31, CD34 и *von Willebrand*-овог фактора. Ткивни пресеци лимфног чвора са фоликуларном хиперплазијом тестираће се као контролни узорци за присуство LCA (CD45) и CD68 антигена. Плочастослојевит епител нормалне коже у хируршким узорцима примарног карцинома дојке послужиће као примарна контрола за доказивање експресије колагена IV, ламинина и фибронектина. Као позитивни контролни узорци за тестирање пролиферативног антигена PCNA, користиће се узорци слузнице желуца у непосредној околини аденокарцинома желуца. Сви "позитивни" контролни узорци, раније су виšekратно тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Биће припремани на исти начин као и испитивани узорци у овом истраживању. Као негативна контрола у току имунохистохемијских бојења послужиће узорци ткива третирани неимуним серумом уместо примарног антитета.

### **Трансмисиона електронска микроскопија**

#### ***Припрема ткива за електронску микроскопију***

Фиксација се врши у присуству пуфера који одржава рН вредност, осмоларитет и јонски састав. Подразумева прецизну концентрацију фиксатива одређену температуру и трајање фиксације. Стандардни протокол, подразумева префиксацију у глутаралдехиду да би се стабилизовали протеини, а након тога постфиксацију у осмијум тетраоксиду, да би се очували липиди. Префиксација се врши у раствору 2,5% глутаралдехида у 0,1 М какодилатном пуферу (рН 7,4), преко ноћи на температури 4 °С. Постфиксација се врши у 1% раствору OsO<sub>4</sub> у 0,1 М какодилатном пуферу, 1h на 4°С. Узорци се након тога остављају у 4,8% уранил ацетату (засићен раствор) да одстоје преко ноћи на 4°С.

Након фиксације би уследила дехидратација у растућем реду алкохола и калупљење у *епону 812*. Сечење узорака ће бити вршено на ултрамикротому марке *LKB II*. Полутанки пресеци бојиће се толуидин плавим, а ултратанки 2%-тним раствором уранил ацетата и олово-цитрата, на уобичајен начин.

***Снага студије и величина узорка.*** Величину група одређујемо на основу следећих

почетних параметара: снаге студије од 80%, вероватноће грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0.05 за двосмерно тестирање нулте хипотезе Хи-квадрат тестом и минималне разлике у вредностима заступљености имунохистохемијских маркера од 30%, уз учесталост у контролној групи од 30%. Уз такве параметре, потребно је **укупно 95 пацијената у обе групе (63 у контролној групи и 32 у групи случајева)**. Пацијенти ће бити дистрибуирани међу групама у односу 2:1.

**Статистичка обрада података.** Добијени подаци ће прво бити обрађени методама дескриптивне статистике, уз коришћење мера централне тенденције и стандардне девијације. Сви подаци биће табеларно и графички приказани. Од метода инференцијалне статистике користићемо Kuskal-Walrus-ов тест и једнофакторску анализу варијансе. Избор расподеле података (једнофакторна анализа варијансе код параметријских у Kuskal-Walrus-у код непараметријских података). За анализу квантитативних обележја посматрања између анализираних 3 групе испитаница, користиће се Хи квадрат тест. На крају анализе за одређивање предиктора разлике између посматраних група пацијенткиња користиће се мултиваријантне регресиони модели. Ниво статистичке значајности ће бити постављен на вредности вероватноће нулте хипотезе од 0.05.

## 2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати ове студије би показали основне морфолошке, имуноцитохемијске и хистохемијске карактеристике анализираних узорака што ће бити илустровано хистолошким фотомикрографијама. Након анализе узорака миома у овој студији очекује се утврђивање синтетског фенотипа глатких мишићних ћелија у зиду тумора (изостанак експресије дезмина уз истовремену појаву експресије виментина), утврђивање њиховог порекла на основу показаних имунохистохемијских карактеристика, утврђивање степена њихове диференцијације, а тиме и патогенетских механизма који узрокују стварање ове врсте тумора. Очекује се да добијени резултати потврде или искључе могућу повезаност глатких мишићних ћелија крвних судова који васкуларизују миому са глатким мишићним ћелијама у саставу миома. Резултати би указали и на степен леукоцитне и лимфоцитне инфилтрације миома, односно, очекује се да се покаже да ли је и у којој мери овај процес праћен запаљењском реакцијом.

Резултати би такође допринели утврђивању односа еластичних и колагених влакана, као и присуства фибробласта у саставу екстрацелуларног матрикса везивног ткива миома и указали у којој мери глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа својом синтетском активношћу узрокују стварање везивног ткива у тумору, а у којој мери је то допринос матичних фибробласта, код све три групе узорака. Такође се очекује да се утврди прецизна диференцијација између фибробласта, као матичних ћелија везивног ткива и глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа, односно потврда њихове хетерогености, пошто досадашње теорије о патогенези миома нису са потпуном прецизношћу потврдиле која од ове две ћелијске популације има кључну улогу у развоју миома. Овај структурни аспект ће током студије бити додатно размотрен у светлу различитих клиничких карактеристика миома.

Најважнији резултати анализе узорака миома у овој студији требало би да покажу да је клиничка презентација одређеног типа миома одређена његовом структуром.

Резултати студије показали би и да пролиферишуће глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа чине доминантну ћелијску популацију у миомима и да упркос сличним фенотипским карактеристикама представљају сасвим издвојен морфолошки ентитет у односу на фибробласте локализоване у везивном ткиву миома. Такође, очекивани закључак ове студије би могао да буде да је симптоматологија миома и њихова клиничка слика условљена односом ћелијске и везивноткивне компоненте у овим туморима, као и степеном васкуларизације тумора и леукоцитном и лимфоцитном инфилтрацијом.

## 2.9 Оквирни садржај дисертације

Предмет овог истраживања је евалуација улоге глатких мишићних ћелија, као и утврђивање састава екстрацелуларног матрикса у структури најчешћих бенигнух тумора женског репродуктивног система – миома утеруса, односно улога ових морфолошких компоненти у специфичној патогенези анализираних промена. Истраживање ће обухватити карактеристике различитих клиничких презентација миома, анализу цитохистолошке организације миома у различитим групама одабраним према постојећим клиничким презентацијама, као и утврђивање могуће повезаности клиничке слике са утврђеним структурним променама.

Ова ретроспективна студија типа случај-контрола обухватиће интраоперативно добијене узорке миома од пацијенткиња Одељења за гинекологију и акушерство Клиничко-болничког центра «Звездара» у Београду, након абдоминалне хистеректомије по Aldridg-у. Случајеви ће бити пацијенткиње са миомима које су оживеле неправилна крвављења, болове или фебрилност, а контроле пацијенткиње са миомима, а без ових компликација.

За анализу структуре узорака биће коришћене две имунохистохемијске методе: LSAB<sup>+</sup>/HRP и EnVision<sup>+</sup>/HRP. Имунохистохемијске методе биће коришћене за идентификацију следећих антигена експримираних на структурним компонентама миома (глатким мишићним ћелијама, фибробластима, ендотелним ћелијама крвних судова, васкуларним глатким мишићним ћелијама, ћелијама везивног ткива и компонентама екстрацелуларног матрикса): виментин,  $\alpha$ -глаткомишићни актин, дезмин, тешки ланци глаткомишићног миозина, S-100 протеин, колаген IV, ламинин, фибронектин, CD3, CD31, CD34, CD45 (LCA), CD68, *von Willebrand*-ов фактор и PCNA. Метода трансмисионе електронске микроскопије биће коришћена за ултраструктурну анализу глатких мишићних ћелија у миомима, односно за испитивање њиховог фенотипског статуса.

Након анализе узорака миома у овој студији очекује се утврђивање синтетског фенотипа глатких мишићних ћелија у зиду тумора, утврђивање њиховог порекла на основу показаних имунохистохемијских карактеристика, утврђивање степена њихове диференцијације, а тиме и патогенетских механизма који узрокују стварање ове врсте тумора. Очекује се да добијени резултати потврде или искључе могућу повезаност глатких мишићних ћелија крвних судова који васкуларизују миоме са глатким мишићним ћелијама у саставу миома. Очекивани резултати би указали и на степен леукоцитне и лимфоцитне инфилтрације миома, односно, очекује се да се покаже да ли је и у којој мери овај процес праћен запаљењском реакцијом. Очекивани резултати би такође допринели утврђивању односа еластичних и колагених влакана, као и присуства

фибробласта у саставу екстрацелуларног матрикса везивног ткива миома и указали у којој мери глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа својом синтетском активношћу узрокују стварање везивног ткива у тумору, а у којој мери је то допринос матичних фибробласта. Такође се очекује да се утврди прецизна диференцијација између фибробласта, као матичних ћелија везивног ткива и глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа, односно потврда њихове хетерогености, пошто досадашње теорије о патогенези миома нису са потпуном прецизношћу потврдиле која од ове две ћелијске популације има кључну улогу у развоју миома. Овај структурни аспект ће током студије бити додатно размотрен у светлу различитих клиничких карактеристика миома. Најважнији очекивани резултати анализе узорака миома у овој студији требало би да покажу да је клиничка презентација одређеног типа миома одређена његовом структуром.

Очекивани закључак студије био би да пролиферишуће глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа чине доминантну ћелијску популацију у миомима и да упркос сличним фенотипским карактеристикама представљају сасвим издвојен морфолошки ентитет у односу на фибробласте локализоване у везивном ткиву миома. Такође, очекивани закључак ове студије би могао да буде да је симптоматологија миома и њихова клиничка слика условљена односом ћелијске и везивноткивне компоненте у овим туморима, као и степеном васкуларизације тумора и леукоцитном и лимфоцитном инфилтрацијом.

## **2.10 Научна област дисертације**

Медицина. Ужа област гинекологија.

## **2.11 Научна област чланова комисије**

**1. проф. др Слободан Јанковић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

**2. проф. др Милица Берисавац**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Гинекологија и акушерство

**3. доц. др Ирена Танасковић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија.

## **Закључак и предлог комисије**

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова, **др Александра Младеновић Михајловић** 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 испитују цитохистолошки фактори који утичу на појаву компликација миома утеруса.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза **др Александре Младеновић Михајловић** бити од великог научног и практичног значаја, да се сагледају цитохистолошки фактори повезани са компликацијама миома утеруса.

4. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Александре Младеновић Михајловић** под називом „**Анализа цитохистолошких фактора који доприносе појави неправилних крварења, бола и фебрилности код пацијенткиња са миомима утеруса.**” и одобри њену израду.

**проф. др Слободан Јанковић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

---

**проф. др Милица Берисавац**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Гинекологија и акушерство

---

**доц. др Ирена Танасковић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија

---

У Крагујевцу, 1.6.2011.

