

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КРАГУЈЕВАЦ

**ИЗБОРНОМ ВЕЋУ  
МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА**

**Предмет: Оцена научне заснованости теме докторске дисертације**

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-1047/3-8 од 17. 02. 2010. године именована је комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под насловом: „**Поређење цитотоксичног и апоптоличног ефекта миотрексата и метотрексата *in vitro***“ кандидата др Татјане Кастратовић, у следећем саставу:

- 1. Проф. др Слободан Арсенијевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство - председник комисије;
- 2. Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области: Микробиологија и имунологија; Онкологија - члан;
- 3. Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија - члан;
- 4. Проф. др Вера Дондур**, редовни професор Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду – члан;
- 5. Проф. др Зоран Матовић**, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Крагујевцу – члан;

На основу увида у приложену документацију комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу следећи:

## ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др Татјана Кастратовић, испуњава све услове предвиђене Законом о Универзитету (члан 57) и Статутом Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу (члан 22) за израду докторске дисертације.

### I Биографски подаци

#### а) Лични подаци

Др Татјана Т. Кастратовић рођена је 24.02.1976. године у Крагујевцу где је завршила основну и средњу школу. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 1995/1996 године и дипломирала 2002. године са просечном оценом 9,63 (девет шездесет три). Током студија бавила се научно истраживачким радом и у том периоду више пута награђивана за постигнуте успехе од стране матичног факултета и Универзитета. У току студија била је стипендиста више програма за стипендирање студената (Министарства за науку и технологију, Скупштине града Крагујевца, Краљевине Норвешке). У периоду 2004 - 2005. године радила је у служби Хитне медицинске помоћи Дома здравља у Смедеревској паланци. Од 2006. године запослена је у Заводу за хитну медицинску помоћ у Крагујевцу.

Постдипломске студије на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу (смер хумана репродукција) уписала је школске 2003/2004 године а усмени докторантски испит положила је 29.09.2006.године са оценом 10 (десет). Од 2009. године истраживач је на јуниор пројекту Медицинског факултета у Крагујевцу број ЈП 01/09 под називом „Поређење цитотоксичног и апоптогичног ефекта миотрексата и метотрексата у *in vitro* систему,,

#### б) Научно-истраживачки рад и списак објављених радова

##### *Радови објављени у научним часописима од међународног значаја (М 20)*

1. Tanasković I, Mladenović-Mihajlović A, Ušaj-Knežević S, Stanković V, Aleksić A, **Kastratović T**, Aleksić A, Lazić Z, Mladenović-Bogdanović Z, Živanović A, Djurić J, Jovičić U, Šorak M. Histohemijska i imunohistohemijska analiza zida aterosklerotične abdominalne aneurizme aorte sa rupturom zida. Vojnosanitetski pregled. Потврда редакцијског одбора од 26.11.2009. године да је рад рецензиран и прихваћен за штампање (М 24; 1 бод)

2. Tanasković I, Lačković V, Raičević R, Lazić Z, Milosavljević Z, **Kastratović T**, Mladenović-Mihajlović A, Stanković V, Lačković M. Recent views on cytohistological characteristic and pathogenic mechanisms of the atherosclerotic lesions types I, II and III. Vojnosanitetski pregled. Потврда редакцијског одбора од 26.11.2009. године да је рад рецензиран и прихваћен за штампање (М 24; 1 бод)

3. **Kastratović T**, Tanasković I, Lačković V, Šorak M, Stanković V, Ljujić B, Sedlar S and Živanović A. Mitotic activity of smooth muscle cells of the mioma: does hormonal stimulation have an effect on the number of mitosis? Archives of biological sciences. 2010; 62(1): 39-45 (**M 24; 2 boda**)

4. Nikolić I, **Kastratović T**, Zelen I, Živanović A, Arsenijević S and Mitrović M. Cytosolic pro-apoptotic SPIKE induces mitochondrial apoptosis in cancer. Biochemical and Biochemical Research Communicationes. 2010; 395(2): 225-231 (**M 22 ; 5 бодова**)

***Радови објављени у часописима од националног значаја (M 50)***

1. **Kastratović T**, Arsenijević S, Vuković I, Mirković N, Aćimović Lj. Granulosa theca cell tumor: A case report and literature review. Medicus 2008; 8(4): 152–155 (**M 52; 1.5 бод**)

2. Stanković V, Tanasković I, Knežević M, **Kastratović T**, Mitrović S. Correlation of p53 expression level and colorectal carcinoma location. Ser J Clin Res 2009; 10(2): 53–59 (**M 52; 1.5 бод**)

3. Sedlar S, Jokić Z, **Kastratović T**, Živanović A. Laparoscopic treatment of endometrial cyst. Ginekologija i perinatologija 2009; 41(3-4): 3-5 (часопис није категорисан)

***Саопштења са међународних скупова, штампана изводу (M 30)***

1. Tanasković I, **Kastratović T**, Arsenijević N, Arsenijević S, Mladenović-Mihajlović A, Stanković V, Todorović V, Lačković V. The role of smooth muscle cells and vascular dendritic cells in the inflamantory response in atherosclerosis. Second EFIS/EJI syposium/postgraduate course Inflammation at the Interface of Innate and Acquired Immunity, Belgrade, 07-10 september 2008. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2008. Abstract book pp:103-104. (**M 33; 1 бод**)

2. Živanović A, Dimitrijević A, **Kastratović T**, Šorak M, Tanasković I. Endometrial thickness as predictor of the effectiveness of intracervical misoprostol in early pregnancy failure. 11 th ESC Congress Hag, Netherland, 19 - 22 May 2010. (**M 34; 0.5 бодова**)

Квантификацијом објављених радова, према члану 181 Статута медицинског факултета у Крагујевцу, кандидат др Татјана Кастратовић је као аутор и коаутор радова објављених у међународним и домаћим часописима показао да се његов досадашњи научно-истраживачки рад може вредновати са **13.5 бодова** (према критеријумима Правилника о поступку и начину вредновања и квантитативном исказивању научноистраживачких резултата истраживача, "Сл. гласник РС", бр. 38/2008).

## II Подаци о предложеној теми

Истраживања која су планирана за реализацију при изради ове тезе су из области Гинекологије и акушерства

### а) Предмет рада

Миоми материце су бенигни, моноклонални тумори глатко-мишићних ћелија миометријума или глатко-мишићних ћелија које се налазе у зидовима крвних судова утеруса (1). Миоми су најчешћи тумори женског репродуктивног тракта, представљају најчешћу индикацију за оперативни третман у гинекологији (33 %), а узрочник су хистеректомија у 77 % случајева (2,3,4).

Ови тумори у зависности од степена заступљености везивне компоненте деле се на: миоме (доминирају глаткомишићне ћелије), фибромиоме (подједнако су заступљени и глаткомишићне ћелије и везивно ткиво) и фиброме (садрже већу концентрацију везивног ткива). Терапија миома утеруса је медикаментозна и хируршка.

Циљ медикаментозне терапије миома утеруса је привремена или трајна редукција симптома, смањење величине миома, смањење менструалног крварења и побољшавање хематолошког статуса пацијенткиња. Медикаментозна терапија миома утеруса није негација хирургије и веома често помаже да хируршке методе лечења миома утеруса буду мање радикалне и безбедније по пацијенткиње.

Применом метотрексата у циљу конзервативног третмана миома утеруса (локална апликација 8-ог дана фоликуларне фазе менструалног циклуса, током три узастопна менструална циклуса) показано је смањење волумена миома за 20-30 % као и редуковано менструално крварење, што је за последицу имало побољшање хематолошког статуса пацијенткиња (5).

У светлу тих чињеница закључили смо да би употреба метотрексата у одговарајућим индикацијама смањила инциденцу хистеректомије и других инвазивних метода. С обзиром да метотрексат не узрокује артефицијалну менопаузу смањила би се употреба хормонске супституционе терапије.

Метотрексат је лек из групе антимаболита који делује на ензим дихидро-фолат-редуктазу (DHFR), инхибира редукцију фолне киселине и спречава њено учешће у синтези пурина (аденин и гуанин) и пиримидина (тимидин, цитозин и урацил). Ћелијама недостаје редукована фолна киселина – тетрахидрофолна киселина (FH 4), па није могућа синтеза DNK а у цитоплазми се накупља токсични дихидрофолат-полиглутамат (6,7). Обзиром да је резистентност туморских ћелија за сада највећа препрека ефикасности лека покушали смо да изнађемо решење овог проблема. Наиме, везујући се за DHFR метотрексат се смешта у пространи хидрофобни чеп. Запазили смо да га у том положају доминантно окружују аминокиселински остаци L-аргинина са којима ствара водоничне и Ван-дер Валсове везе, које су најодговорније за секундарну и терцијарну структуру а самим тим и активност супстрата.

Отуда и идеја да се направи смеша тј. водени раствор метотрексата и L-аргинина (миотрексат), чиме би се омогућила боља транслокација лека, дуже задржавање лека у ћелији и ефикаснији ензимски одговор. Комбинација ове две супстанце је хомогена микстура у којој свака од компоненти задржава свој хемијски идентитет а L-аргинин уједно омогућава транспорт метотрексата који је нерастворљив у води. Адукт миотрексат пријављен је Заводу за патенте под називом: „Фармацеутска композиција за лечење миома материце“ (број пријаве П-2001/0657) а признат и уписан у Регистар патената Завода за интелектуалну својину под бројем 50256.

## **б) Циљеви истраживања**

1. Утврђивање цитотоксичног ефекта л-аргинина, миотрексата и метотрексата;
2. Утврђивање апоптоичног ефекта ових супстанција;
3. Поређење цитотоксичног и апоптоичног ефекта миотрексата и метотрексата;
4. Одређивање механизма апоптозе ћелија након третирања миотрексатом;

## **ц) Материјал и методе**

У експериментима ћемо користити две стандардизоване ћелијске линије:

1. Т HESC ћелијска линија (ATCC®:CRL-4003<sup>tm</sup>) -хумани фибробласти пореклом из ендометријума утеруса, иморталисани хуманом теломераза реверзибилном

транскриптазом (hTERT). Ендометријалне ћелије за изоловање ове ћелијске линије воде порекло од миома. Ћелије ће се узгајати у DMEM-у (Dulbecco's modified eagle's medium) обогаћеним l-глутамином (200 mM), 1% неесенцијалним аминокиселинама, 1% ITS (од енг. insulin transferin supplement), penicillin-ом (100 IU/ml), streptomycin-ом (100 mg/ml) и 10% fetal bovine serum-ом (FBS).

2. HUVS-11 2D ћелијска линија (ATCC®: CRL-2481<sup>tm</sup>) -хумане глаткомишићне ћелије из умбиликалне вене. Ове ћелије ће се узгајати у Ham's F12 медијуму обогаћеним са 0.1 mg/ml хепарина, 0.003 mg/ml ECGS (ендотелијалног ћелијског фактора раста), penicillin-ом (100 IU/ml), streptomycin-ом (100 mg/ml) и 10% FBS-ом. Ћелије ће се узгајати на подлози 0.1 % свињског желатина. Ћелије ће бити инкубирани на 37 C° у атмосфери 5 % CO<sub>2</sub>.

Ефекат испитиваних супстанција на ћелијску вијабилност утврђиваће се МТТ колориметријском техником (8,9). Тест се изводи у 96-микротитар плочама са равним дном.

Ћелије ће се најпре третирати: l-аргинином, метотрексатом и миотрексатом одговарајућих концентрација а потом инкубирати МТТ солуцијом (5 mg/ml МТТ раствореним у PBS-у) 4 h на температури 37 C° у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>. По отклањању супернатанта ћелијама ће се додавати 200 µl DMSO-а, по бунарчићу, и вршити инкубација 30 минута на радној температури. Оптичка густина ће се одређивати на таласној дужини 595 nm (microplate multimode detector Zenyth 3100).

У циљу утврђивања апоптоличног ефекта испитиваних супстанција користиће се Annexin V-FITC у комбинацији са пропидијум јодидом (ПЈ) (10,11).

Ћелије ће се најпре третирати: l-аргинином, метотрексатом и миотрексатом одговарајућих концентрација, опрати 2 пута хладним PBS-ом и ресуспендовати у binding bufferu. У 100 µl ове солуције додаваће се 5 µl Annexin V-FITC и 5 µl ПЈ. Ћелије ће се инкубирати 15 минута на собној температури (25 C°) у мраку и након додавања 400 µl binding buffer-а анализирати на FACS-у (Becton-Dickinson, FACS-Calibur, Mountainview, CA, USA) у року од 1 h.

Механизам апоптотичког ефекта тј. ниво експресије анти-апоптотичних протеина (Bcl-2), активација про-апоптотичних протеина (Bax), евентуално ослобађање цитохрома ц из митохондрија као и активација ефекторне каспазе 3 биће одређивани флуоресцентном микроскопијом (12). Ћелије ће се третирати: l-аргинином, метотрексатом и миотрексатом одговарајућих концентрација, опрати у PBS-у и фиксирати у 4% формалдехиду, 23 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 77 mM  $\text{NaHPO}_4$  (pH 7.3). Потом ће се вршити њихова пермеабилитација у PBS/ 0.2% Triton X-100 и инкубација у blocking buffer-у (10% FCS и 0.1% Triton X-100 у PBS-у). Примарним и секундарним антителима ћелије ће се третирати у трајању од по 1 h на собној температури. Ћелије ће се посматрати конвенционалном флуоресцентном микроскопијом ( Olympus BX 51) а анализа слика ће се вршити ImageG софтвером.

Врста студије

Експериментална студија

Статистичка обрада података

Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD). Пре статистичке обраде података испитује се правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује тест који ће се користити за ту проверу). Ако је број вредности мањи од 50 за проверу се користи Shapiro-Wilk тест, а ако је узорак већи од 50 користи се Kolmogorov-Smirnov тест. На основу добијене вредности  $p$  одредићемо тест који ћемо користити за статистичку анализу. Статистичка значајност одређиваће се за ниво  $p = 0.05$ , тако да ако је  $p < 0,05$  вредности имају правилну расподелу и користиће се параметарски T – тест, а ако је  $p > 0,05$  користиће се непараметарски Mann-Whitney-ев тест. Користио би се такође и Che-Square тест алтернатива коју даје Mann-Whitney тест, јер у неким ситуацијама та алтернатива има већу снагу одбацивања нулте хипотезе него процентуални (%) тест. За статистичку обраду добијених резултата користићемо комерцијални програмски пакет SPSS (верзија 13). Добијени резултати биће приказани табеларно и графички.

#### **д) Очекивани резултати и значај истраживања:**

Значај истраживања је вишеструк. Осим испитивања ефекта L-аргинина, метотрексата и миотрексата *in vitro*, бољег разумевања физиологије фибробласта (ендометријума утеруса пореклом из миома) и глаткомишићних ћелија отвара се могућност примене ових супстанција у клиничком раду. Спровођењем ове студије очекујемо да покажемо евентуално већи цитотоксични и апоптотични ефекат миотрексата у поређењу са миотрексатом као и да утврдимо механизам апоптотичног ефекта миотрексата. SWAT анализа: потенцијална снага (добре иновативне способности; добре производне способности); потенцијалне слабости (нема); потенцијалне шансе (увођење лека у клиничку праксу; масовна производња лека у фармацеутској индустрији); потенцијалне опасности (непоказивање већег цитотоксичног и апоптотичног ефекта миотрексата у односу на метотрексат).

### **III Закључак и предлог Комисије**

На основу података презентованих у тачкама I и II извештаја, Комисија доноси следећи:

#### **ЗАКЉУЧАК**

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата кандидат др Татјана Кастратовић испуњава све законске услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, реч је о оригиналном научном истраживању које има за циљ поређење цитотоксичног и апоптотичног ефеката метотрексата и миотрексата *in vitro*.
3. Комисија сматра да ће докторска теза др Татјане Кастратовић, представљати темељну студију која ће показати цитотоксични и апоптотични ефекат као и механизам



апоптотичног ефекта миотрексата и отворити могућност примене ове супстанције у клиничком раду.

4. Комисија са задовољством предлаже Изборном већу Медицинског Факултета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Татјане Кастратовић под називом „**Поређење цитотоксичног и апоптотичног ефекта миотрексата и метотрексата *in vitro***“, одобри кандидату израду докторске дисертације и одлуку о одобрењу упути на даљи поступак Стручном већу Универзитета.

### **Предлог ментора**

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **Проф. др Слободана Арсенијевића**, редовног професора Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство.

### **Чланови комисије:**

1. Проф. др Слободан Арсенијевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство - председник комисије
- 

2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области: Микробиологија и имунологија; Онкологија – члан
-

3. Проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија – члан
- 

4. Проф. др Вера Дондур, редовни професор Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду – члан
- 

5. Проф. др Зоран Матовић, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Крагујевцу – члан
- 

У Крагујевцу