

**Универзитет у Бањалуци
Медицински факултет**

Наставно-научном вијећу

**ПРЕДМЕТ: ИЗВЈЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЈЕНИ УРАЂЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Одлуком Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци број 18-3-850/2012 од 03. 12. 2012. године, именована је Комисија за оцјену урађене докторске дисертације под називом „УЛОГА СИМВАСТАТИНА У АПОПТОЗИ ИНФЛАМАТОРНИХ ЋЕЛИЈА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ ЕНДОТОКСИЧНОМ ШОКУ“ кандидата **мр сц др мед. Лане Нежић**, у саставу:

Др Свјетлана Стоисављевић Шатара, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци, ужа научна област: Фармакологија и токсикологија; председник Комисије

Др Момир Миков, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, ужа научна област: Фармакологија и токсикологија; члан

Др Ранко Шкрбић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци, ужа научна област: Фармакологија и токсикологија; ментор и члан.

Након детаљног прегледа урађене докторске дисертације кандидата **мр сц др мед. Лане Нежић**, Комисија Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци и Сенату Универзитета у Бањалуци подноси:

ИЗВЈЕШТАЈ О ОЦЈЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата мр сц др мед. Лане Нежић је написана латиничним писмом (фонт *Arial*, величина 11, проред 1,5) и штампана на А4 формату. Дисертација је написана прегледно, јасно и језички коректно, на 153 странице уз цитирање 121 научне референце. Илустрована је са 47 слика и 11 табела, које прате текст.

Докторска дисертација садржи осам поглавља: Увод, Хипотезе истраживања, Циљеви истраживања, Материјали и методе истраживања, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература.

У докторској дисертацији се поред наведених поглавља налазе: сажеци на српском и енглеском језику, листе скраћеница и њихова значења, прилози на крају дисертације који садрже попис слика, табела и публиковане радове из области истраживања.

2. УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У истраживањима објављеним до данас, није доказано у којој је мјери апоптоза заступљена у патофизиологији синдрома мултиорганске дисфункције у сепси, као ни врсте ћелија које доминантно подлијежу апоптози. Такођер, у научној литератури нису објављена истраживања која су у попуносу иста са овом докторском дисертацијом, а која су свеобухватно испитивала утицај статина на апоптозу и експресију кључних регулаторних молекула, у имуним и паренхиматозним ћелијама, у моделу сепсе односно експерименталном ендотоксичном шоку.

У поглављу Увод су јасно и логичким слиједом представљени подаци из научних референци, у којима су описане главне карактеристике сепсе, механизам дјеловања статина, молекуларни механизми и значај апоптозе у појединим клиничким стањима.

У уводном дијелу овог поглавља кандидат је дао основне информације о патофизиологији сепсе, синдрому системског инфламаторног одговора и мултиорганској дисфункцији органа у сепси. Описани су главни медијатори одговорни за развој синдрома системског инфламаторног одговора, односно интерлеукини и ћелије имунолошког система, као и њихова улога у развоју деструктивног имунолошког одговора. Дат је преглед потенцијалних терапијских приступа у сепси и септичком шоку, као и предности и недостаци њихове примјене.

Кандидат је описао механизам дјеловања статина и њихове плеитропне односно холестерол-независне ефекте са акцентом на антиинфламаторна и имуномодулаторна дејства. Детаљно су представљена епидемиолошка истраживања у којима је доказана боља прогноза и смањен морталитет у сепси, код болесника који су претходно били на третману статинима. Представљени су резултати експерименталних *in vitro* и *in vivo* истраживања, који су показали да статини побољшавају ток болести и преживљавање у

акутној инфламацији, ендотоксичном шоку или полимикробној сепси, као и њихове ефекте на хуморалне и целуларне медијаторе системског инфламаторног одговора.

Затим је дат преглед релативно малог броја истраживања објављених до данас, у којима је аутопсијским налазом доказано да код болесника преминулих услед сепсе постоји изражена апоптоза имуних ћелија, што је један од разлога имуносупресије и лоше прогнозе. Такођер, су наведени резултати истраживања проведених у експерименталном ендотоксичном шоку, који су показали да ендотоксин осим што индукује проинфламаторни одговор, изазива и апоптозу леукоцита и паренхиматозних ћелија.

Кандидат је затим прегледно и јасно описао молекуларне механизме апоптозе, односно најзначајније активаторе и проапоптотске интрацелуларне молекуле, антиапоптотске молекуле, нуклеарне рецепторе одговорне за регулацију преживљавања ћелија, механизме активације и интрацелуларне сигналне путеве апоптозе. Дат је преглед истраживања која су доказала ефекте статина на апоптозу малигних и/или имуних ћелија *in vitro*. На основу детаљног прегледа литературе и дефинисања проблема, претпостављено је да се протективно дјеловање статина у сепси оставарује утицајем на апоптозу инфламаторних, али и паренхиматозних ћелија.

Истраживање је имало јасно дефинисане циљеве: испитивање протективног и антиинфламаторног дејства симвастатина у експерименталном ендотоксичном шоку, и то анализом врсте и интензитета инфламације у паренхиматозним органима; испитивање утицаја симвастатина на експресију проапоптотских (*FADD, caspase-3, cytochrome C*) и антиапоптотских молекула (*survivin, BCL-XL i NF-κB*) у инфламаторним/имуним и паренхиматозним ћелијама, квантификација инфламаторних апоптотских ћелија у односу на ћелије које су заштићене потнецијалним дјеловањем лијека.

До данас нису познати интрацелуларни механизми којим статини дјелују на апоптозу ћелија, нити њихов утицај на апоптозу инфламаторних ћелија у моделу сепсе односно ендотоксичном шоку. Резултати овог истраживања дају допринос у разјашњењу механизма којима статини спречавају развој имуносупресије и оштећење паренхиматозних органа у сепси.

Литература кориштена у изради докторске дисертације је правилно цитирана, адекватна, савремена и укључују све аспекте истраживања дисертације.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Дизајн истраживања, примјена испитиваних супстанци, рад са експерименталним животињама и припрема изолованих органа, су јасно описани и одабрани у складу са савременим техничким и етичким принципима рада са животињама и биолошким материјалом, и важећом методологијом за анализу апоптозе. Истраживање је проведено на Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета у Бањалуци и Заводу за патологију Клиничког центра Бања Лука.

У истраживању *in vivo* на пацовима је примјењен стандардни модел сепсе тј експериментални ендотоксични шок, изазван примјеном средње леталне дозе ендотоксина (ЛД₅₀), који својим патофизиолошким особинама добро имитира сепсу код људи. Дозе симвастатина су изабране у складу са препорученим дозама за примјену код глодара (10-100 mg/kg/per os), еквивалентне оним у клиничкој примјени.

Експерименталне животиње су биле подјељене у контролну и експерименталне групе и то: групе третиране различите дозама ендотоксина ради одређивања ЛД₅₀, и групе које су добијале предтретман са симвастатином (10, 20 или 40 mg/kg/ per os/5 дана) и једну ЛД₅₀ ендотоксина. На основу података о преживљавању, стандардном формулом је израчуната ЛД₅₀ ендотоксина и стопа преживљавања код животиња који су добијале симвастатин. Након праћења преживљавања, животиње су жртвоване на порописан начин и изоловани су органи (јетра, слезена, плућа, бубрег и срце) за *in situ* истраживања.

Кандидат је детаљно представио поступке припреме органа за *in situ* истраживања. Патохистолошком анализом је квалитативно и квантитативно анализирана врста оштећења ткива у експерименталним групама, а интензитет изражен скором ткивног оштећења (*tissue damage score-TDS*). За анализу апоптозе је примјењена имунохистохемија, метода *TUNEL* (*Terminal deoxynucleotidyl trans dUTP nick end labeling*) и електронска микроскопија (ЕМ), односно комбинација биохемијских и морфолошких метода, што је омогућило квалитетнију процјену промјена на интрацелуларном нивоу.

Имунохистохемијска анализа је проведена примјеном специфичних антитијела, којима је визуализирана експресија молекула апоптозе (*FADD, caspase-3, cytochrome C, survivin, BCL-XL* и *NF-κB*) у различитим ћелијама. *TUNEL* методом су квантификоване апоптотске ћелије, одређен апоптотски индекс (АИ) и диференцирана некроза од апоптозе. Морфолошке карактеристике апоптотске ћелије су показане ЕМ.

Изабране методе су савремене и адекватне у испитиваној тематици, и остале су непромјењене током рада.

Адекватни статистички тестови су омогућили правилну анализу резултата, уз кориштење *MS Office Excel 2010* и *StatSoft Statistica v.10 software*.

4. РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

Истраживања која се баве испитивањем апоптозе у експерименталном ендотоксичном шоку, захтјевају свеобухватну анализу мултиплих сигналних путева одговорних за настанак ћелијске смрти. Докторска дисертација кандидата мр сц. др мед. Лане Нежић је управо пружила једну свеобухватну анализу којом се дошло до сљедећих најважнијих резултата и закључака. Симвастатин примјењен у краткотрајном предтретману, је значајно смањио леталитет животиња у ендотоксичном шоку. Хистопатолошком анализом је доказано да симвастатин смањује ткивна оштећења изазвана ЛД₅₀ ендотоксина, редукцијом инфламаторног инфилтрата и *TDS* у односу на ендотоксином третирану групу.

Имунохистохемијском анализом, *TUNEL* методом и ЕМ је потврђено да ендотоксин изазива екстензивну апоптозу инфламаторних и паренхиматозних ћелија, што је у корелацији са степеном оштећења ткива. Ендотоксин је индуковао активацију најзначајнијег ефекторног ензима апоптозе *caspase-3* и покренуо цитопротективне механизме који се огледају у експресији умјереног интензитета, антиапоптотских молекула *Bcl-XL* и *survivin*. Резултати су показали да ендотоксин активира апоптозу у инфламаторним и паренхиматозним ћелијама, доминантно индукцијом митохондријалног пута односно ослобађањем *cytochrome c*. Спољашњи пут активације апоптозе односно повећана експресија *FADD*, је доказана код макрофага јетре, лимфоцита слезене и хепатоцита. На основу ових резултата је закључено, да активација апоптозе у ендотоксичном шоку настаје укрштањем интрацелуларних сигналних путева.

Посебно важно је истакнути резултате који су показали улогу симвастатина у апоптози инфламаторних ћелија. Наиме, резултати су показали да симвастатин статистички значајно смањује интензитет апоптозе лимфоцита слезене, инфламаторног инфилтрата и ткивних макрофага јетре и плућа, редукцијом експресије и броја *caspase-3* позитивних ћелија у односу на ендотоксин групе. Значајан утицај симвастатина на апоптозу неутрофилних леукоцита није доказан. Симвастатин је индуковао повећану експресију антиапоптотског *Bcl-XL*, док његов значајан утицај на експресију *survivina* и *Nk-kB* није доказан. Потврђена је негативна корелација између активности *caspase-3* и *Bcl-XL* у инфламаторним ћелијама, што говори у прилог антиапоптотском дјеловању симвастатина. У анализи утицаја симвастатина на путеве активације апоптозе у имуним ћелијама, доказано је да он дјелује на експресију сигналних молекула митохондријалног пута активације апоптозе, редукцијом *cytochrome c* и индукцијом експресије *Bcl-XL*.

Резултати су такођер показали да симвастатин има значајну улогу у регулацији апоптозе паренхиматозних ћелија. У групи животиња које су добијале симвастатин је доказано да лијек редукује интензитет апоптозе, инхибицијом експресије *caspase-3* и значајном редукцијом АИ у односу на групу изложену само ЛД₅₀ ендотоксина. Симвастатин је индуковао и експресију антиапоптотских *Bcl-XL*, *survivina* и *Nk-kB* у већини паренхиматозних ћелија.

Позитивна корелација (*Pearson* коефицијент корелације) је доказана између *caspase-3* и *TUNEL* позитивних апоптотских инфламаторних и паренхиматозних ћелија у свим експерименталним групама, што указује на комплементарност примјењених метода у детекцији апоптозе. Ултраструктурне морфолошке промјене једра које су карактеристичне за апоптозу су доказане са ЕМ.

Комисија је констатовала да су резултати приказани логичним редом, квалитетним сликама испитиваних органа, прегледним и систематизованим табелама и графиконима, који у потпуности поризилазе из примјењене методологије истраживања. У дискусији добијених резултата кандидат је јасно анализирао резултате истраживања, и показао критичност и реалност у поређењу својих резултата са подацима из одговарајуће новије литературе, и на основу тога извео јасне закључке.

Прегледом докторске дисертације кандидата мр сц. др мед. Лане Нежић, Комисија сматра да је кандидат поднио рад који по садржају у потпуности одговара теми прихваћеној од старне Научно-наставног вијећа Медицинског факултета и Сената Универзитета у Бањалуци и да представља самосталан и оригиналан научни рад у области експерименталне фармакологије.

Резултати и закључци истраживања су значајан допринос разумјевању улоге симвастатина у инхибицији апоптозе ћелија инфламаторнох инфилтрата, лимфоцита слезене и ткивних макорфага, који на тај начин редукује имуносупресију у моделу сепсе и спречава развој синдрома мултиорганске дисфункције.

Антиапоптотски потенцијал симвастатина се огледа у инхибицији експресије ефекторног ензима *caspase-3*, што би могла бити циљна молекула у даљем изучавању механизма заштитног дјеловања статина у сепси и планирања испитивања њихове примјене у клиничким облицима синдрома системског инфламаторног одговора и сепсе.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

На основу прегледа и анализе достављене докторске дисертације, Комисија констатује да је дисертација кандидата мр сц. др мед. Лане Нежић под називом „УЛОГА СИМВАСТАТИНА У АПОПТОЗИ ИНФЛАМАТОРНИХ ЋЕЛИЈА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ ЕНДОТОКСИЧНОМ ШОКУ“ урађена по савременим принципима-научно истраживачког рада и резултат је самосталног и оригиналног истраживања. Комисија је закључила да су обављена сва планирана истраживања, реализовани постављени циљеви, а резултати су експлицитно приказани и разматрани у складу са најновијим истраживањима из ове области.

Резултати истраживања, која су била предмет ове докторске дисертације, доприносе објашњењу улоге апоптозе у развоју имуносупресије и настанку ткивног оштећења у ендотоксичном шоку, те потврди протективне улоге симвастатина у инхибицији апоптозе инфламаторних, али и паренхимских ћелија. Добијени резултати отварају могућност планирања испитивања нових циљних мјеста дјеловања статина и њихове примјене у другим индикацијама.

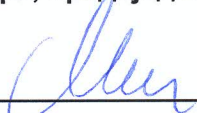
Ова дисертација је показала способност кандидата да јасно дефинише научни проблем и циљеве истраживања, и да истраживању и интерпретацији резултата приступи логично и свеобухватно. Дисертација је оригинална и њој сличних у нашој средини није било.

Комисија за оцјену урађене докторске дисертације једногласно даје позитивну оцјену докторске дисертације под називом „УЛОГА СИМВАСТАТИНА У АПОПТОЗИ ИНФЛАМАТОРНИХ ЋЕЛИЈА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ ЕНДОТОКСИЧНОМ ШОКУ“ кандидата мр сц. др мед. Лане Нежић и предлаже Наставно-научном вијећу Медицинског факултета и Сенату Универзитета у Бањалуци да усвоји позитивну оцјену Комисије и омогући кандидату да своју докторску дисертацију јавно брани.

Бања Лука, Нови Сад, децембар 2012.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ


Проф. Др Свјетлана Стоисављевић Шатара, предсједник Комисије


Проф. Др Момир Миков, члан


Проф. Др Ранко Шкрбић, ментор и члан.