

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ИВАНА С. НИКОЛИЋ

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

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ 2014.

САДРЖАЈ

1. Увод	1
1.1 Хиперплазије ендометријума	1
1.1.1 Епидемиологија	1
1.1.2 Хистогеназа	2
1.1.3 Етиологија и патогенеза.....	2
1.1.4 Клиничка слика	4
1.1.5 Терапија.....	5
1.2 Метотрексат	6
1.3 Миотрексат	8
1.4 Ралоксифен (Евиста)	9
1.5 Мифепристон.....	11
1.6 Естроген.....	12
1.7 Прогестерон	15
1.8 Апоптоза	17
1.8.1 Апоптоза опште карактеристике.....	17
1.8.2 Пuteви активације процеса апоптозе. Спољашњи и унутрашњи пут	19
1.8.3 Улога каспаза у апоптози.....	22
1.8.4 Регулација апоптозе: Bcl-2 фамилија протеина	24
2. Циљеви истраживања	27
3. Материјал и методе	28
3.1 Ћелијска линија и испитиване супстанце	28
3.2 МТТ тест цитотоксичности	29
3.3 ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности	31
3.4 Флуоресцентна микроскопија	31
3.4 Статистичка анализа података	31
4. Резултати	32
4.1.0 Метотрексат, Миотрексат, Ралоксифен, Мифепристон, Естроген и Прогестерон испољавају цитотоксично дејство на ендометријалне стромалне ћелије	32

4.1.1 Појединачни цитотоксични ефекат различитих доза Естрогена, Прогестерона, селективног модулятора естрогенских рецептора (Ралоксифена) и селективног модулятора прогестеронских рецептора (Мифепристона), Метотрексата и Миотрексата на инхибицију пролиферације ендометријалне стромалне ћелијске линије.....	34
4.1.2 Појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Естрогена и Ралоксифена у дози од 10^{-9} М на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у периоду од 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију.....	38
4.1.3 Појединачни и комбиновани ефекат Естрогена и Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата.....	44
4.1.4 Појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Прогестерона и Мифепристона на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у периоду од 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију.....	47
4.1.5 Естроген, Ралоксифен, Метотрексат и Миотрексат индукују апоптозу у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија).....	63
4.1.6 Ефекат комбиноване примене Естрогена и Ралоксифена на апоптотичност Миотрексата и Метотрексата у ендометријалној стромалној ћелијској линији у периоду од 24 часа.....	68
4.1.7 Комбиновани ефекат посттретманом Ралоксифеном на апоптотични ефекат Миотрексата и Метотрексата.....	69
4.1.8 Појединачни и комбиновани ефекат примене различитих доза Прогестерона и његовог модулятора Мифепристона на апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата.....	72
4.2. Механизам апоптозе индуковане Ралоксифеном, Естрогеном, Прогестероном, Мифепристоном и комбиноване примене Ралоксифен-Естроген истовремено на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија).....	75
4.2.1 Ралоксифен, Естроген, Прогестерон, Мифепристон и комбинована примена Ралоксифена-Естрогена истовремено узрокује смањење цитоплазматске експресије Bcl-2 протеина у ThESC ћелијској линији.....	75
4.2.2 Ралоксифен, Естроген, Прогестерон, Мифепристон и комбинована примена Ралоксифена-Естрогена истовремено, узрокује повећање експресије активног BAX протеина у ThESC ћелијској линији.....	78
4.2.3 Апоптоза индукована Ралоксифеном, Естрогеном, Прогестероном, Мифепристоном и истовременом применом Ралоксифена-Естрогена током 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију каспазно је зависна.....	79

4.2.4 Посттретман Ралоксифеном у дози од 10^{-9} М у комбинацији са Метотрексатом или Миотрексатом у дози од 1 μ М смањује експресију цитоплазматског Вcl-2 протеина и повећава експресију активног ВАХ протеина у ендометријалној стромалној ћелијској линији.....	82
5. Дискусија.....	86
6. Закључак.....	101
7. Литература.....	103

Докторат посвећујем мојој мами

Захвалница

Мом ментору и пријатељу Марини Митровић за знање, стрпљење, храброст, поверење и веру коју је имала у мене

Целокупној катедри Биохемије

Свим колегама

Мојим пријатељима

1. УВОД

1.1 Хиперплазије ендометријума

Зид утеруса изграђен је од ендометријума, миометријума и периметријума. Ендометријум је сачињен од ендометријалних жлезда, епителних ћелија и ендометријалних стромалних ћелија (1, 2). Ендометријум подлеже структурним променама у периоду од рођења до сенијума сваке жене. Репродуктивни период живота жене окарактерисан је структурним променама ендометријума које могу да се крећу од физиолошке хиперплазије изазване дејством хормона у различитим фазама менструационог циклуса и периода имплантације, до атрофије ендометријума која је карактеристична за период менопаузе, сенијума и за неимплантирани ендометријум (када није дошло до оплодње) (1, 2). Улога појединачних ћелијских ентитета посебно ендометријалних стромалних ћелија је круцијална у процесима децидуализације и имплантације заметка уз присуство нормалног хормонског статуса (3). Уколико дође до нарушавања морфологије и физиолошких карактеристика појединачних ћелијских ентитета ендометријума долази до настанка различитих обољења. Као један од примера обољења који настаје као резултат промене у структури жлезданих и стромалних ћелија уз поремећен хормонски статус, јесте хиперплазија ендометријума.

Ендометријалне хиперплазије представљају промене у структури ендометријума утеруса које карактерише прекомерни раст жлезданог и стромалног дела ендометријума са или без присутног различитог степена атипичности тј морфолошких абнормалности (4, 5) које су удружене са ирегуларним крварењима ван периода менструационог циклуса (6).

1.1.1. Епидемиологија

У епидемиологији ендометријалних хиперплазија тешко је говорити због више фактора који се мењају у различитим временским периодима. Неки од њих представљају рану дијагностику, повећање самосвести као и едукације жена о одређеним симптомима које не треба да занемарују, потом употреба хормонске терапије, ултразвучна

дијагностика као и побољшање дијагностичких процедура у које убрајамо и биопсију ендометријума. У истраживању које је вршено у периоду од 28 година испитивала се учесталост као и појава ендометријалних хиперплазија код жена старости од 18 до 90 година. Истраживање је дало податке на основу којих је закључено да је учесталост појаве ендометријалних хиперплазија највећа код жена у животном добу од 50-54 године као и да се ендометријалне хиперплазије ређе јављају код жена које су млађе од 30 година старости. Порастом година старости повећава се могућност да пацијенткиња развије атипичну хиперплазију са цитолошким променама што представља увод у преканцерозно стање (7, 8).

1.1.2. Хистогенеза

Хиперпластичне ендометријалне промене код којих су доминантне жлездане пролиферативне промене без присуства цитолошких и морфолошких промена класификују се као хиперплазије, док присуство цитолошке атипичности ове промене класификује као атипичне хиперплазије. У основи класификације и степена хиперпластичних промена, главни параметри представљају измене у очуваности структурних компоненти ћелијског и жлезданог дела ендометријума (4, 5). На основу категоризације Светске здравствене организације из 1994. године хиперплазије ендометријума се класификују на: прости хиперплазије без атипичности, сложене хиперплазије без атипичности, сложене атипичне хиперплазије и прости атипичне хиперплазије (4, 5, 9).

1.1.3. Етиологија и Патогенеза

Најчешћи узрок за развој ендометријалне хиперплазије представљају повишени ниво као и продужено деловање полног хормона естрогена са изостанком прогестеронског дејства локално (у утерусу). Овакви узроци најчешће се срећу код обољења као што су синдром полицистичних јајника, гојазност, све врсте тумора који секретују естроген, хипертензија, рана менарха, касна менопауза, дијабетес и многи други (4, 5, 9). Нормалан пролиферативни ендометријум присутан је током фоликуларне фазе и за њега је карактеристично да не садржи нагомилане жлезде унутар строме, док нормални

секреторни ендометријум, карактеристичан за лутеалну фазу може да садржи нагомилане жлезде које имају правилну распоређеност унутар строме које окружују ћелије које не показују митотску активност (4). Пролиферативно дејство естрогена на архитектурне компоненте ендометријума огледа се у различитим видовима дилатације гландуларних компоненти и активацији митозе жлезданих и ендометријалних ћелија (4). Под дејством естрогена активира се транскрипција гена одговорних за пролиферацију ендометријалних, гландуларних и стромалних компоненти са пратећом тромбозом малих крвних судова функционалног дела ендометријума што резултује појавом крварења (9, 10, 11). Као резултат прекомерне стимулације ендометријума од стране естрогена долази до пролиферације ендометријалних стромалних и жлезданих ћелија што резултује његовим задебљањем. Прва промена која настаје као резултат продуженог дејства естрогена на ендометријалне структуре јесте цистична дилатација појединих жлезда чиме се ова промена класификује као поремећени пролиферативни ендометријум (4, 5, 9, 11).

Повећана стопа пролиферације ендометријалних ћелија повећава и инциденцу за настанак и развој различитих видова грешака током транскрипције гена и умножавања ћелија што неминовно резултује повећањем учесталости за настанак ендометријалног карцинома (10).

Нормалан ендометријум истовремено представља извор и мету за деловање неколико фактора раста и цитокина који су активацијом својих рецептора укључени у пролиферацију и диференцијацију ендометријума (11). На пример епидермални фактор раста и инсулину сличан фактор раста IGF-I представљају посреднике у деловању естрогена на утерус. Истраживања су показала да терапија естрогенима повећава експресију EGF и EGF рецептора у утерусу као и IGF-I и IGF-II mRNA. Под одређеним околностима (продужено деловање естрогена), ови фактори раста могу деловати као онкогени узрокујући додатну, неконтролисану пролиферацију ендометријума што им даје изузетно битну улогу у патогенези ендометријалних хиперплазија и ендометријалног карцинома (11, 12, 13, 14).

Један од физиолошких, протективних механизма који служи за уклањање мртвих или мутираних ћелија у нашем организму представља процес апоптозе (14, 15). Као овакав, овај процес игра важну улогу у хомеостази, уклањању геномски оштећених ћелија и развоју великог броја ткива укључујући и утерус (15, 16, 17, 18, 19, 20). Апоптотични

механизми укључени су у цикличне промене ендометријалног ткива заједно са полним хормонима (21, 22) чиме регулишу и сам менструациони циклус (23). Нормални менструациони циклус карактерише повећање експресије Bcl-2 онкогена (локализованог на 18 хромозому) у току секреторне фазе менструационог циклуса што нам говори да је експресија овог протеина хормонски регулисана. Истраживања су показала да код ендометријалне хиперплазије постоји повећање експресије Bcl-2 протеина који одржава, стабилизује и активира путеве преживљавања чиме додатно стимулише пролиферацију ендометријалних ћелија. Поред Bcl-2 протеина, важну улогу у настанку ендометријалних хиперплазија игра FAS фамилија протеина која везивањем за FAS-L (FAS лиганд) иницира апоптоични процес. Истраживања су показала да постоји повећање експресије FAS и смањење експресије Bcl-2 протеина након третмана прогестероном (23, 24) што иде у прилог чињеници да прогестеронски ефекат позитивно утиче на нормалан процес огољавања ендометријума и спречавања настанка ендометријалне хиперплазије.

На основу ових чињеница можемо рећи да полни хормони регулишу процес апоптозе у ендометријуму. Поред хормонског деловања процес апоптозе је генски регулисан, преваходно од стране Bcl-2 онкогена који регулише синтезу протеина који блокирају или активирају ћелијску смрт. Промена у експресији одређених протеина из фамилије Bcl-2 протеина (укључујући BAX, Bcl2, BAK, NOXA, PUMA) доводи до настанка обољења услед прекомерне или пак недовољне активације апоптозе (15, 25). Због ових карактеристика ендометријалне хиперплазије (посебно аденоматозне атипичне хиперплазије) представљају преканцерозна стања (4, 18, 19).

1.1.4. Клиничка слика

Патофизиолошки механизми условљавају присуство/одсуство одређених субјективних тегоба или објективних знакова одређеног обољења. У клиничкој слици хиперплазије ендометријума један од најзначајнијих симптома обољења представљају учестала и нерегуларна крварења, увећање волумена ендометријума, повећана компресија крвних судова на нивоу утеруса као и смањење контрактилности на нивоу ендометријума. Појава ановулаторних менструационих циклуса (који узрокују инфертилитет) код жена у

репродуктивном периоду узрокована је истовременим продуженим дејством естрогена на ендометријум и одсуством прогестеронског деловања.

Поред крварења и инфертилитета главни акценат у раној дијагнози и лечењу ових бенигнух промена представља и спречавање развоја ендометријалног карцинома који представља други по узроку малгиних тумора репродуктивних органа код жена у развијеним земљама. Појава обилних или ирегуларних крварења представља снажан индикатор за постављање ране дијагнозе овог обољења. Дијагноза ендометријалне хиперплазије може да се постави ултразвучном дијагностиком, биопсијом и хистеректомијом (6, 7, 8).

1.1.5. Терапија

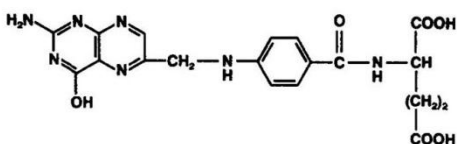
Терапија ендометријалне хиперплазије подразумева медикаментозни и хируршки приступ. Главни акценат конзервативног третмана хиперплазије ендометријума и осталих бенигнух промена утеруса стављен је на смањење обилности менструационог крварења. У циљу адекватне терапије поред лечења примарног иницијалног симптома обољења, акценат медикаментозне терапије треба да буде усмерен ка примарном извору тј узроку хиперплазије а то је наглашено временско деловање естрогенске компоненте на ендометријум у односу на прогестеронску компоненту. У циљу лечења употребљава се Медроксипрогестерон (испољава прогестеронски ефекат), агонисти-антагонисти Прогестрона, СЕРМ (селективни модулатори естрогенског рецептора)-Ралоксифен, СПРМ (модулатори Прогестеронских рецептора)-Мифепристон, антимераболити Метотрексат и остали (26, 27, 28).

Поред медикаментозне терапије, хируршки приступ лечења ових промена заснива се на хистеректомији и киретажи.

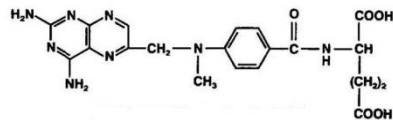
Због ове чињенице која хируршки третман ставља у други план, потребно је да се истраже нови медикаментозни приступи.

1.2. Метотрексат

Метотрексат (N_4 -amino- N_{10} -methyl-pteroylglutaminska киселина) је по хемијском саставу аминоптерин, аналог фолне киселине, који на атому азота има метил групу и на прстену уместо -ОН групе -NH₂ групу (Слика 1).



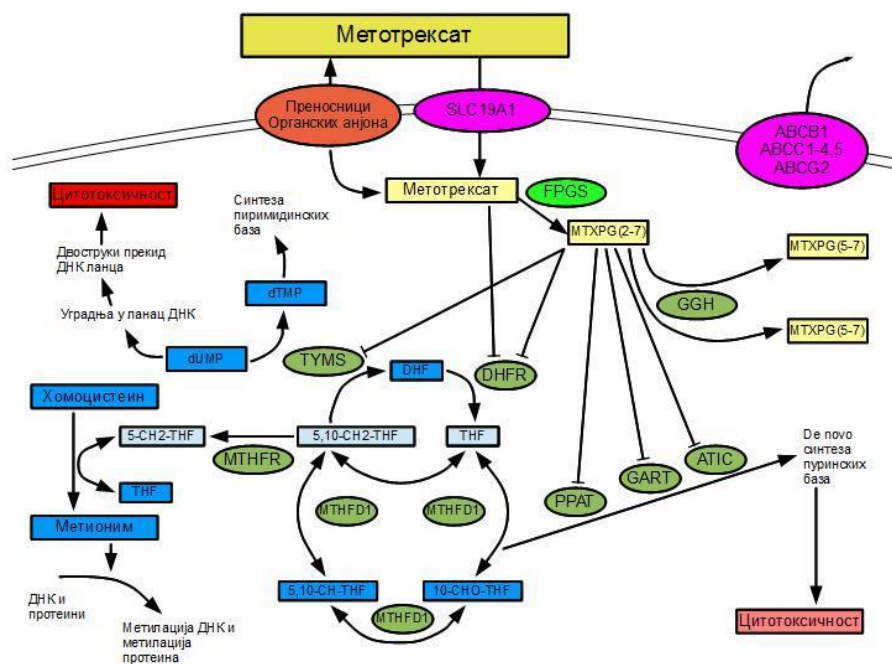
Фолна киселина



Метотрексат

Слика 1. Структура фолне киселине и Метотрексата

Главни ефекат Метотрексата заснован је на његовом деловању на дихидрофолат-редуктазу. Компетитивним механизмом инхибира редукцију фолне киселине у тетраhydrofolat чиме се онемогућава учешће редуковане фолне киселине (тетра-хидро фолат – THF4) у процесима синтезе пиримидинских база (dTMP) које улазе у састав ДНК. Као резултат немогућности синтезе кључних нуклеотида не постоји стварање ДНК чиме су даљи раст, умножавање и диференцијација ћелија онемогућени. За Метотрексат је карактеристично да делује на ћелије које имају висок степен дељења као и да делује у С фази ћелијског циклуса (29). Поред свог дејства на дихидро фолат редуктазу, Метотрексат такође показује одређени степен инхибиције активности тимидилат- синтетазе (TS) и фосфорибозил-глицинамид-формил-трансферазе (GART) (30). Механизам дејства Метотрексата приказан је Сликом 2.



Слика 2. Механизам дејства Метотрексата

Уколико се узме у обзир то да Метотрексат није лек који показује ткивну и ћелијску специфичност, јасно је да је овај лек нашао своју примену у терапији великог броја обољења као што су: реуматоидни артритис, псоријаза, карциноми дојке, карциноми тестиса, хориокарцином, медуло-бластом, остеогени саркоми, сквамозни карциноми главе и врата, миома утеруса, нон Хоџкинов лимфом (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40). Бројним истраживањима потврђено је да Метотрексат своје вишеструке ефекте (у које убрајамо имunosупресивне, анти-инфламаторне, анти-пролиферативне и цитотоксичне ефекте) остварује индуковањем апоптозе (41, 42, 43, 44, 45, 46).

Метотрексат се користи у терапији медикаментозног абортуса (обично у комбинацији са Мисопростволом, Мифепристоном) и ектопичних трудноћа (47, 48). Такође је ефикасан у профилакси акутног одбацивања уграђених графтова када се користи самостално или у комбинацији са циклоспорином А и/или преднизолом или FK506 (49, 50, 51, 52). Коришћење високих доза Метотрексата код лечења карцинома има цитотоксични ефекат на здраве ћелије са високим степеном деобе. Услед овога терапију Метотрексатом у високим дозама карактеришу нежељени пропратни симптоми као што су мучнина, повраћање, диареја, анемија, неутропенија и дерматитис.

Резистентност туморских ћелија представља највећу препреку ефикасности лека. Могући разлози за појаву резистенције према леку могу бити амплификација гена за DHFR а самим тим и пораст нивоа овог ензима; или алтерација ових гена што узрокује смањено везивање Метотрексата за DHFR; смањена активност полиглутамат-синтетазе, смањен ниво тимидилат- синтетазе, смањена активност транспортних протеина (53, 54, 55, 56).

1.3. Миотрексат

Фармацеутска композиција (Миотрексат) је лек припремљен који садржи Метотрексат и л-аргинин у молном односу 1: 5. Овако добијени раствор се стерилише и чува на температури од 4 до 8°C. Овај препарат је анализиран спектроскопским методама IR и NMR (HNMR и CNMR) и био је један од предмета истраживања докторске дисертације Др Татјане Кастратовић у којој је био испитиван механизам апоптозе узрокован дејством Метотрексата и Миотрексата на HUVS и ThESC ћелијску линију. Као мешавина Метотрексата и Л аргинина показано је да Миотрексат јаче индукује апоптозу у односу на Метотрексат на ендометријалним стромалним ћелијским линијама. Механизам апоптозе је такође показан и описан и заснива се на активацији унутрашњег митохондријалног пута, који за резултат има промену пермеабилности митохондријалне мембране, транслокацију проапоптотичног BAX протина из цитосола у спољашњу мембрану митохондрија, излазак цитохрома c из митохондрија у цитосол као и активацију каскаде каспаза што резултује смрћу ћелије. Поред активације BAX-а и транслокације цитохрома c из митохондрије у цитосол, одређивана је и укупна ендогена експресија антиапоптотичног Bcl-2 протеина задуженог за активацију путева преживљавања. Показано је да након третмана Миотрексатом долази до смањења експресије Bcl-2 протеина у односу на контролну нетретирану групу ћелија и групу ћелија третираних Метотрексатом. На основу добијених резултата показано је да је Миотрексат ефикаснији индуктор апоптозе у односу на Метотрексат ThESC ћелијским линијама (57). Према Међународној класификацији патената адукт Миотрексат класификован је као А 61 К 31/195 (WIPO Patent Application WO/2003/022260).

1.4. Ралоксифен

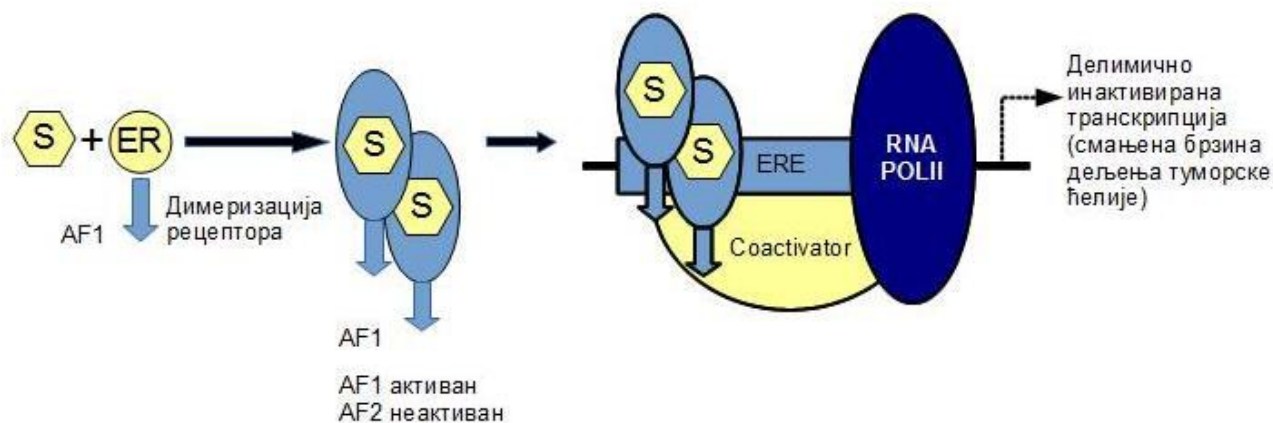
Селективни модулатори естрогенских рецептора, не хормонски лекови, своје дејство заснивају на везивању и модулацији естрогенских рецептора алфа и бета чиме у појединим органима (у зависности од дистрибуције естрогенских рецептора) испољавају чист естрогенско агонистички, антагонистички ефекат или мешовити ефекат. Највише испитивања вршено је на једном од представника ове групе лекова, Тамоксифен, који се показао као успешан лек у терапији карцинома дојке. Поред свог антагонистичког деловања у ткиву дојке, истраживања су показала да Тамоксифен повећава могућност развоја карцинома утеруса у коме испољава естрогенско агонистички ефекат. У циљу проналажења идеалног лека из групе СЕРМ, истраживања су се орјентисала на једног од новијих представника ове групе лекова, Ралоксифену (Евиста). За разлику од Тамоксифена, Ралоксифен испољава чист антагонистички ефекат у ткиву дојке и утеруса док је агонистички ефекат усмерен ка коштаном ткиву. Ралоксифен је најпре био коришћен у лечењу остеопорозе (58) код постменопаузалних жена, али даљим истраживањима показано је да Ралоксифен спречава развој тумора дојке као и тумора утеруса. Овај ефекат дејства Ралоксифена заснива се на раличитим механизмима деловања у појединим хормон зависним органима (59, 60). Због свог мешовитог дејства Ралоксифен је постао предмет истраживања у великом броју студија које су показале да поред обољења женских органа, Ралоксифен смањује могућност настанка и/или прогресије кардио-васкулаторних обољења (MORE студија) (61), користи се у превенцији карцинома дојке (STAR студија) (62), побољшава однос HDL/LDL што смањује ризик хиперлипидемије, инфаркта миокарда, инхибиторно делује на раст миома утеруса (63), инхибиторно делује на раст карцинома простате (64), смањује одговор глијалних ћелија у току неуроинфламаторних обољења (65) и смањује ризик когнитивних поремећаја код постменопаузалних жена (66).

Ралоксифен, СЕРМ припада класи бензотиофена (67). Везујући се за естрогенски алфа рецептор врши његову модулацију (са четири пута већим афинитетом према бета рецептору) (67, 68, 69), активира транскрипцију гена одговорних за синтезу протеина који узрокују смрт или пролиферацију ћелије (68). Истраживање које је вршено на Ishikawa ћелијској линији (ћелијска линија изолована из ендометријалног аденокарцинома)

испитивало је ефекте Ралоксифена и Тамоксифена (70). На основу резултата овог истраживања показано је да Ралоксифен спречава хиперплазију ендометријалних ћелија у односу на Тамоксифен. Ово дејство Ралоксифена заснива се на другачијем дејству Ралоксифена на метаболизам естрогена и његових метаболита у односу на Тамоксифен (70). Наиме, Тамоксифен услед свог агонистичног деловања на утерус узрокује појачање локалне синтезе естрогена и његов метаболизам усмерава ка стварању генотоксичних и хормонски активних метаболита естрогена (70). Захваљујући антагонистичким ефектима у ендометријуму Ралоксифен може да се користи у терапији ендометријалне хиперплазије.

Механизам деловања Ралоксифена заснива се на везивању и модулацији естрогенског рецептора алфа (и инхибицији његовог AF2 домена) што за крајњи резултат има активацију AF1 домена естрогенских рецептора који ангажовањем коактиватора делимично инактивирају транскрипцију гена одговорних за пролиферацију туморских ћелија (71). У свом истраживању Gulia Dayan et al., истичу да присуство терцијарног амина у бочном ланцу Ралоксифена који интерагује са аспарагином у положају 351 EP алфа је битан за испољавање антиестрогенског, тачније антагонистичног деловања у различитим моделима болести код животиња и ћелијских линија (71). Наиме ова структурна карактеристика Ралоксифена која узрокује формирање водоничне везе терцијарног амина са карбоксилном групом аспарагина у положају 351 лиганд везујућег домена (LBD) естрогенског рецептора алфа је битна разлика у односу на Тамоксифен који не формира водоничне везе са поменутом аминокиселином у лиганд везујућем домену (69, 71). На основу овога као и на основу истраживања у којима је извршена делеција или замена кључне аминокиселине у положају 351 код различитих ћелијских култура (HeLa-хумана ћелијска линија карцинома грлића материце, Ishikawa-хумана ћелијска линија ендометријалног аденокарцинома, MCF-7- хумана естроген алфа позитивна ћелијска линија карцинома дојке) резултати указују да антиестрогенска активност Ралоксифена у ћелијским линијама карцинома цервикса, дојке и ендометријалног аденокарцинома потиче од присуства водоничних везе између терцијарног амина и аспарагинске киселине у

положају 351 лиганд везујућег домена естрогенског рецептора (69, 71).



Слика 3. Везивање СЕРМа за естрогенске рецепторе са последичном инактивацијом АФ2 домена која резултује делимичном инактивацијом транскрипције гена.

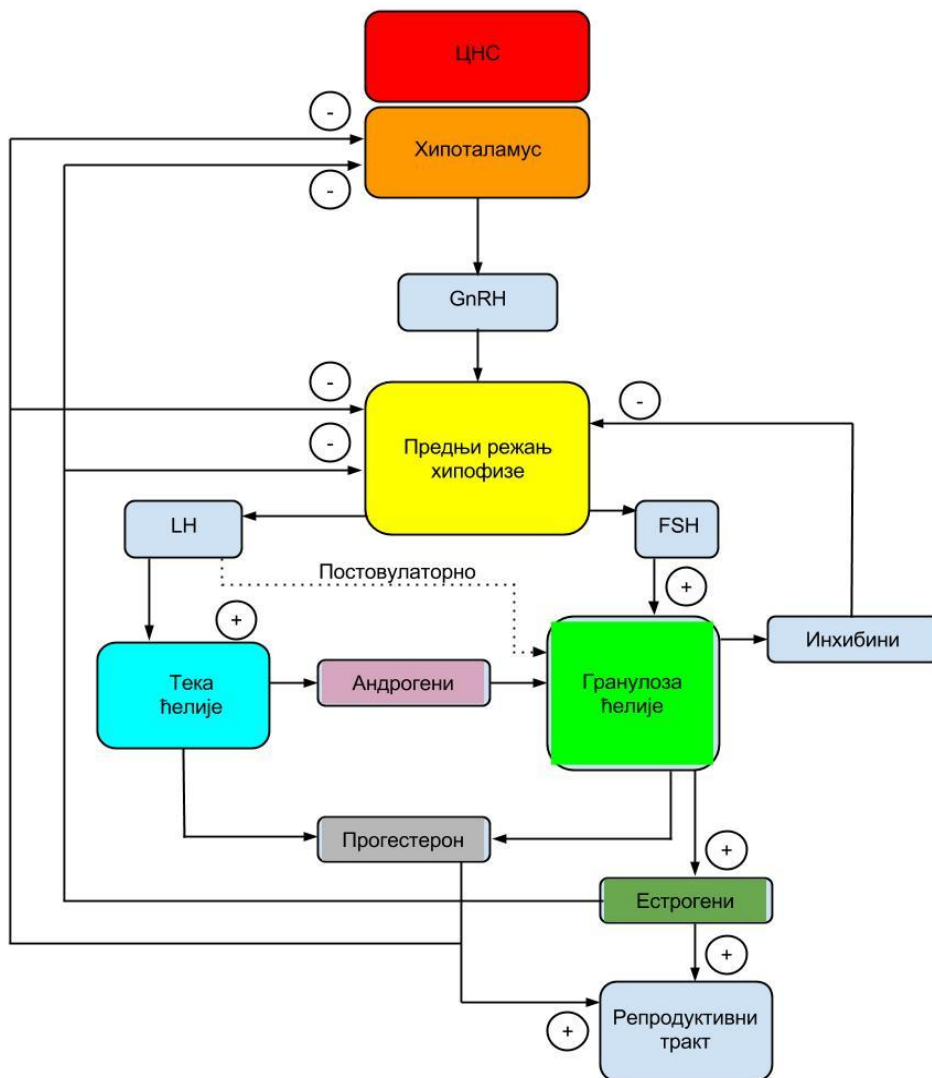
1.5. Мифепристон

Мифепристон (RU-486) припада класи антагониста прогестеронских и глюкокортикоидних рецептора (72, 73). Као синтетички 19-норстероид, механизам деловања заснива се на његовом везивању за интрацелуларне рецепторе хормона и модулацији у лиганд везујућим доменима рецептора чиме директно утиче на везивање репресора или коактиватора чиме активира или инхибира транскрипцију гена (74, 75). Мифепристон се превасходно користи као медикамент за изазивање артефицијалног абортуса (72, 74, 76, 77) али своју примену Мифепристон је пронашао и у пољима ендокринологије, онкологије и имунологије (72). Као хитно медицинско контрацептивно средство Мифепристон једнократном дозом успешно индукује порођај код fetus mortus in utero, код припреме цервикса за хируршки абортус чак и за регулацију менструационог циклуса (73, 76). Дуготрајна употреба Мифепристона показала се адекватном за лечење акутне психотичне депресије, Кушинговог синдрома, Алцхајмерове болести, ендометриоза, леомиома, менингеома, леомиосаркома, глаукома, глюкокортикоидно зависне хипертензије и одређених типова тумора дојке (74, 78, 80, 81, 82). У хемијској грађи Мифепристона издвајају се зимогени радикал на положају C17 који служи за

повезивање са прогестагенима, радикал на положају C11 који омогућава антиестрогенски ефекат и бета ланац на C18 који је неопходан за испољавање антагонистичког ефекта у односу на прогестационалне и глукокортикостероидне хормоне (73). Након везивања за прогестеронске рецепторе Мифепристон може да испољи антагонистички или агонистички хормонски ефекат у зависности од активације одређених сигналних путева (74). Везивањем за прогестеронске рецепторе локализоване у ендометријуму показано је да ниске дозе Мифепристон испољавају антипролиферативне ефекте у овом органу (77).

1.6. Естроген

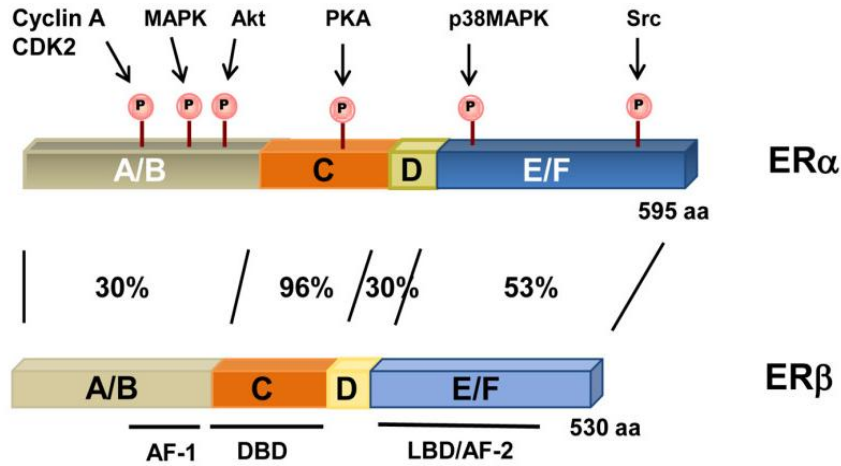
Естроген припада групи женских полних хормона који своје дејство остварује везивањем за естрогенске рецепторе, алфа и бета чија је експресија различита у различитим ткивима укључујући утерус, коштаног ткиво, срце и друге органе (83, 84, 85, 86, 87). Ефекат естрогена на нормалне ћелије усмерен је ка правцу пролиферације и раста ендометријалних ћелија, жлездане компоненте ткива дојке, стимулацији раста жлезданих компоненти и васкулогенезе у ендометријуму као и протективном дејству на метаболизам и очување коштаног система, ткива јетре, процесу зарастања рана итд. (88, 89, 90, 91). Још једна од битних улога естрогена огледа се у регулацији менструационог циклуса, припреми утеруса за имплантацију, регулацији овулације (92, 93). Услед плеотропног ефекта естрогена у различитим ткивима, јасно је да поремећај у метаболизму естрогена доводи до развоја различитих врста обољења органа у којима естроген испољава најјачи ефекат. Секретија естрогена регулисана је од стране хипоталамуса, предњег режња хипофизе и оваријума који представљају основ за један од начина регулације хормонске секреције а то је принцип позитивне повратне спреге (94). Естроген се примарно синтетише у оваријумима. Непосредно пре менструационог циклуса мале количине естрогена се синтетишу и активирају секрецију гонадотропног ослобађајућег хормона (GnRH) из хипоталамуса и лутенизирајућег хормона из предњег режња хипофизе. Гонадотропни хормон позитивно делује на ослобађање лутенизирајућег хормона чиме повратном спрегом остварују позитиван ефекат на оваријуме и узрокују ослобађање већих количина естрогена (Слика Позитивна повратна спрега).



Слика 4 - позитивна повратна спрега. Начин и принцип регулације секреције естрогена од стране хипоталамуса, хипофизе и оваријума.

Да би испољио своје дејство, естроген као липосолубилни полни хормон, везује се великим афинитетом за своје интрацелуларне, једарне рецепторе (95, 96). Хумани естрогенски рецептор припада групи лиганд зависним транскрипторним факторима у које убрајамо тироидни рецептор, андрогени рецептор, прогестеронски рецептор, гљукортикоидни рецептор и витамин Д рецептор (95, 96). Естрогенски рецептори (алфа

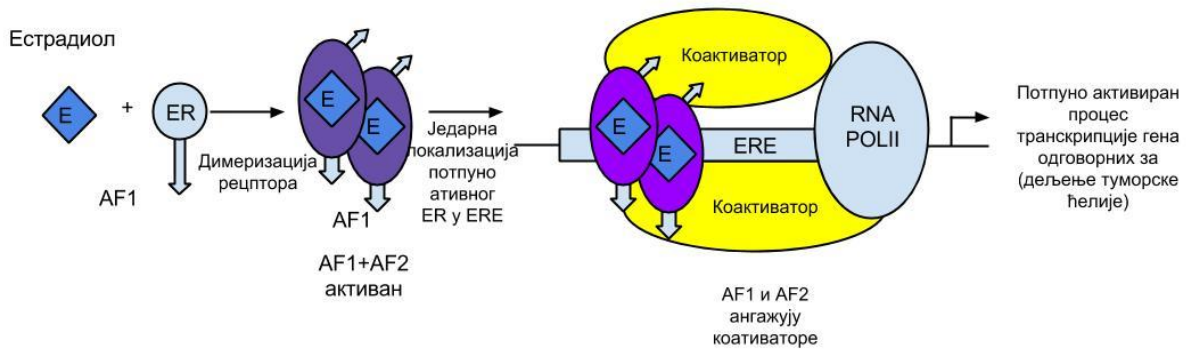
и бета) припадају породици стероидних рецептора који су изграђени из 6 региона обележеним словима А-Ф (95, 96). (Слика 5).



Слика 5 - Структурне карактеристике домена естрогенских рецептора алфа и бета.

Амино крај А-В домена укључен је током процеса трансактивације генске експресије и обележава се као AF-1, док регион Е-Ф домена (AF-2, лиганд везујући домен) има улогу промотера (95, 97, 98). Е регион домена естрогенског рецептора одговоран је за везивање естрогена, димеризацију рецептора и активацију процеса транскрипције (99), С (DNA-binding domain- ДНК везујући домен) регион је кључан за везивање са секвенцом молекулом ДНК и естроген одговарајућим елементима (estrogen response element (ERE)) на кључним генима (100, 101, 102) (Слика 6).

Механизам деловања Естрадиола



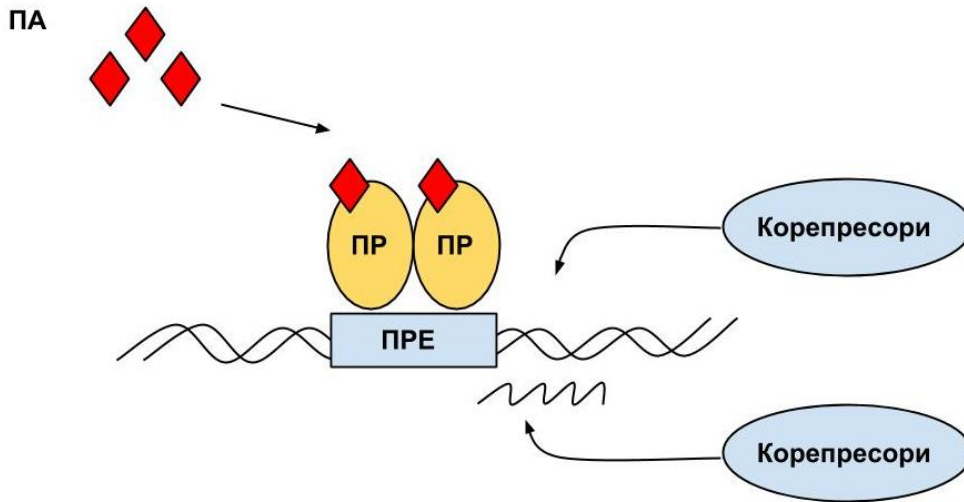
Слика 6. Механизам деловања Естрадиола

Експресија ЕР алфа доминантна је у утерусу, костима, јајницима, и хипоталамусу, док ЕР бета се доминантно налази експримован у бубрезима, мозгу, плућима, простати, срцу ... (101, 102). Поред разлике у експресији и локализацији између естрогенског алфа и бета рецептора истраживања су потврдила постојање структурне разлике. Наиме естрогенски алфа рецептор садржи 530 аминокиселина док ЕР бета 485 (102, 103). Разлика у А-В региону кључна је за активациону функцију (AF-1) рецептора тиме и интерреакцију са коактиваторима и или репресорима (99, 103, 104). Везивањем естрогена за ЕР долази до димеризације рецептора, везивања за секвенцу ДНК (ERE), асоцијације са једарним транскрипционим факторима чиме се ствара стабилни комплекс који мења активност РНК полимеразе у правцу активације или инхибиције процеса транскрипције гена (посредством AF1 и AF2 домена) који последично активирају или инхибирају процес транслације (105, 106, 107).

Поремећаји који су везани за регулацију метаболизма естрогена као и промену његове концентрације представљају један од узрока за развој различитих врста обољења остеопорозе, миома утеруса, ендометријалне хиперплазије, карцинома ендометријума и дојке, поремећаја менструационог циклуса, инфертилитета, обољења срца...

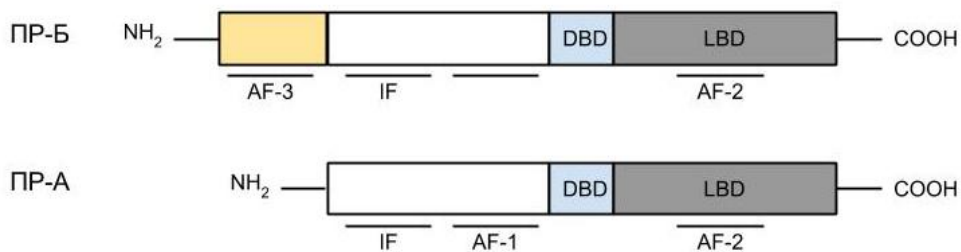
1.7. Прогестерон

Још један од кључних хормона који је неопходан за нормалан раст и развој женских репродуктивних органа поред естрогена, представља прогестерон чија је кључна улога назначена у припреми утеруса за имплантацију бластоцисте (108, 109) као и за диференцијацију млечних жлезда у периоду лактације (108). Као и остали представници стероидних хормона, прогестерон своје ефекте остварује везивањем за интрацелуларне прогестеронске рецепторе (стероидне) који су састављени из ДНК и лиганд везујућих домена (Слика 7).



Слика 7. Интерреакција прогестеронских антагониста (модулатора) прогестеронских рецептора и коактиватора и или корепресора

Постоје две врсте прогестеронских рецептора А и Б, који након везивања са хормоном подлежу конформационим променама у виду димеризације рецептора што представља облигаторан корак у даљем процесу у коме следи везивање за сегмент ДНК (110) (Слика 8).



Слика8. Структурне карактеристике и разлике у доменима Прогестеронских рецептора А и Б.

Код великог броја ћелија прогестеронски рецептор Б функционише као активатор за транскрипцију гена који узрокују ћелијску смрт или активацију пута преживљавања док прогестеронски рецептор А служи као транскрипциони инхибитор за стероидне, прогестеронске рецепторе (109, 110, 111) што иде у прилог чињеници да поред структурне разлике у доменима (112) постоји и разлика у транскрипционој активности у зависности од тога да ли се прогестерон везује за А или Б форму рецептора (109, 113). Различита експресија прогестеронских рецепторских изоформи јавља се код нормалних ћелија,

предоминација ПР-А у строми утеруса, предоминација ПР-Б у жлезданом епителу утеруса у периоду секреторне фазе менструационог циклуса (112, 114, 115).

Прогестерон игра важну улогу у припреми ендометријума за усађивање оплођене јајне ћелије, заједно са естрогеном учествује у регулацији менструационог циклуса, за разлику од естрогена прогестерон се лучи у другој фази циклуса од стране жутог тела (114, 115). Уколико не дође до оплодње, ниво прогестерона опада и ендометријум се припрема за нови менструациони циклус. Болести које су везане за промене у метаболизму прогестерона обухватају ендометријалне хиперплазије (дефицит прогестеронског деловања са превагом естрогенске компоненте), туморогенеза млечне жлезде и дојке (112, 116, 117) али истраживања показују и протективну улогу прогестерона у развоју оваријалног карцинома (109, 118). Наиме под дејством естрогена површински оваријални епител показује склоности ка малигној трансформацији у правцу оваријалног карцинома (109). Прогестерон као опонент естрогену, смањује митотске деобе и активира процес апоптозе код ћелија које су подлегле пролиферацији под дејством естрогена (119).

1.8. Апоптоза

1.8.1. Апоптоза- опште карактеристике

За велики број ћелија и организама фундаменталну тачку у процесима ембриогенезе, раста, диференцијације, пролиферације и смрти представља уравнотеженост метаболизма и хомеостазе (120, 121). Уз ове основне механизме апоптоза, програмирана ћелијска смрт, представља и заузима кључно место како у физиолошким процесима тако и у патологији различитих облика обољења као што су Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, малгинитети дојке, простате, утеруса, AIDS (120, 121, 122, 123, 124). Поремећајем равнотеже у смислу прекомерне активације или пак инхибиције апоптотичног механизма долази до настанка различитих видова обољења које карактерише малигна трансформација ћелија захваћених органа (121, 123, 124, 125, 126, 127). Чак половина обољења која се јавља код људи настаје као резултат дисрегулације механизма апоптозе

(128). Инхибиција апоптотичног механизма резултује бесмртношћу ћелије што повећава могућност за развој генетских грешака приликом транскрипције што резултује изменом физиолошких обележја нормалне ћелије и њеном малигном трансформацијом (125, 126, 127). Истраживања која су усмерена ка проналаску супстанци које ће деловати у правцу регулације нивоа експресије одређених проапоптотичних протеина, тачније активације апоптозе код одређеног типа ћелија, представљају истраживања која су отворила врата новом начину лечења малигних обољења (126, 127, 128, 129, 130).

Апоптозу карактерише низ морфолошких и биохемијских промена (табела 1).

Главне карактеристике ћелије која улази у процес апоптозе могу да се поделе на промене које су карактеристичне за рани стадијум апоптозе када се активирају одбрамбени механизми за преживљавање и промене које су карактеристичне за касни стадијум, стадијум извршења апоптозе када ћелија не поседује одбрамбене механизме и подлеже програмираној ћелијској смрти. Ћелијска смрт изазвана апоптозом може се поделити у две фазе и то прва фаза (фаза ране апоптозе) која подразумева активацију генетских и биохемијских медијатора (повећање цитоплазматске експресије Bcl-2 протеина) у циљу поправке насталог ћелијског оштећења и друга фаза (фаза касне апоптозе) у којој ћелија неминовно подлеже смрти због немогућности одбране и репарације оштећења који су настали у раној фази апоптозе (121, 124, 128). Неке од карактеристика ћелије која се налази у раној фази апоптозе подразумевају морфолошке промене које се огледају у губитку контакта са окружујућим ћелијама, долази до промена на цитоплазматској мембрани на којој се формирају мембранска проширења, ћелија се смањује (121, 125, 128). Након ових процеса ћелија улази у стадијум морфолошког неповратка који се карактерише интрануклеозомалном фрагментацијом молекула ДНК, кондензацијом хроматина, променом пропустљивости мембрана као и формирањем апоптотичног тела који бива фагоцитован од стране макрофага (121, 128).

АПОПТОЗА

Морфолошке карактеристике	Бубрење мембране, агрегација хроматина на једарној мембрани, скупљање цитоплазме и кондензација једра, фрагментација ћелија на мање делове, формирање апоптотичних тела, стварање пора на митохондријалној мембрани са укључивањем протеина из Bcl-2 породице
Биохемијске карактеристике	Енергетски зависни процеси, моно и олигонуклеозомалне фрагментације ДНК, ослобађање цитохрома ц, апоптоза индукујућег фактора и осталих фактора из митохондрија у цитоплазму, активација каспадне каскаде, измене у биохемији мембрана (транслокација фосфатидил серина са цитоплазматског на екстрацелуларни део мембране).

Табела 1. Морфолошке и биохемијске карактеристике апоптозе

1.8.2. Пuteви активације процеса апоптозе. Спољашњи и унутрашњи пут

Иницијација програмиране ћелијске смрти остварује се активацијом више сигналних путева који се међусобно разликују по морфолошким, молекуларним и биохемијским карактеристикама (131, 132, 133). За активацију и спровођење процеса апоптозе постоје два основна пута, спољашњи и унутрашњи апоптотични пут. Иако се разликују, ова два пута имају заједничку тачку сусретања, у митохондрији. Активацијом спољашњег или унутрашњег апоптотичног пута последично долази до промене у пермеабилности митохондријалне мембране и изласка про апоптотичних протеина у

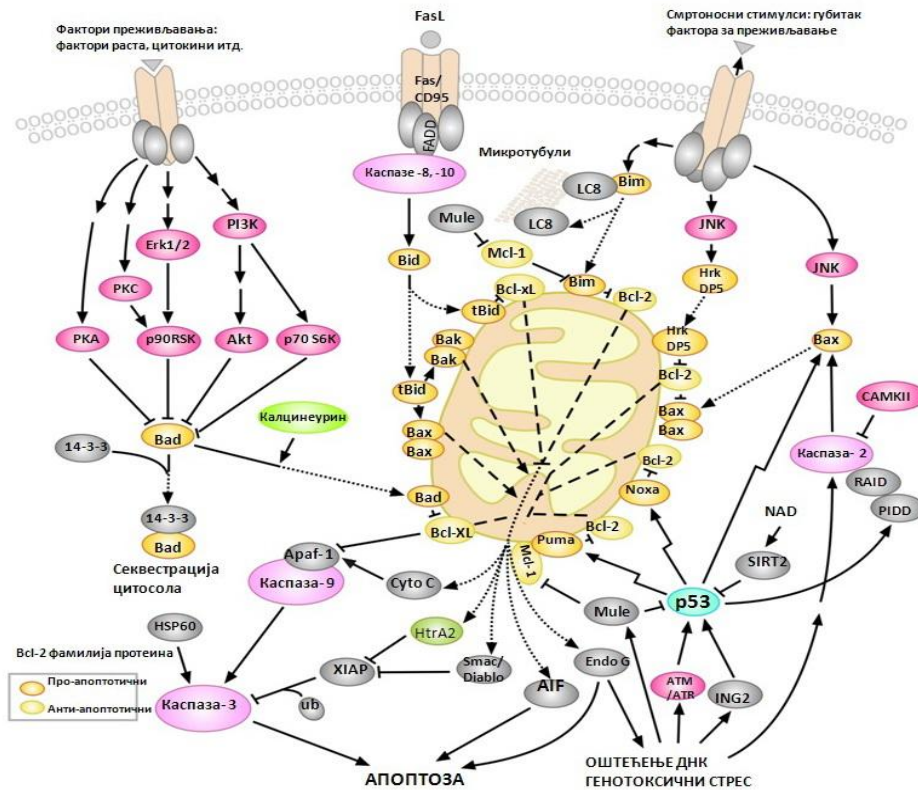
цитосол, и финално активацијом каскада каспазе што резултује смрћу ћелије (Слика 9). Два основна начина којима се покреће процес апоптозе спољашњим или унутрашњим путем подразумевају активацију мембранских рецептора смрти под дејством FAS лиганда, последичну активацију иницијаторске каспазе 8 (спољашњи пут) и оштећење функције митохондрија под утицајем различитих индуктора смрти као што су УВ зрачење, елиминација фактора раста, и осталих фактора (унутрашњи пут) чиме се оба пута спајају у један апоптотични пут без повратка чији је главни егзекутор ефекторна каспаза 3.

Главна тачка у регулацији унутрашњег (митохондријалног пута) представља поремећај у пермеабилности митохондријалне мембране. Означене као органеле у којима се ствара енергија у облику високо енергетског молекула АТФ-а, јасно је да поремећај у функционисању митохондрија директно ће се одразити на анаболичке, катаболичке процесе, пролиферацију, аутофагију, некрозу као и апоптозу (134).

Активација спољашњег апоптотичног пута остварује се посредством лиганд индуковане олигомеризације трансмембранских протеинских рецептора смрти (134). Највише проучавани представници ових рецептора припадају фамилији фактора некрозе тумора (од енг. tumor necrosis factor - TNF) и обухватају велики број протеина попут Fas/CD95, DR3, DR4, DR5 и DR6 (135, 136). За ове рецепторе карактеристично је да својим екстрацелуларним доменом везују сигналне молекуле ((у које убрајамо Fas лиганд, TNF- α , лимфотоксин (TNF- β) и TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)) узрокују олигомеризацију интрацелуларног домена смрти и доводе до асоцијације адапторног цитоплазматског протеина FADD (од енг. Fas Associated Death Domain) за које се затим последично везује иницијаторна прокаспаза -8 и доводи до њене активације као и активације иницијаторских каспаза укључујући каспазу 10 (136, 137, 138). За даље спровођење спољашњег пута апоптозе битна је активација каспазе 8. Активна каспаза 8 сече проапоптотични Bcl-2 протеин BID (протеин локализован у цитоплазми) чиме настаје tBID (truncated BID) који као такав се транслоцира унутар митохондрија (139, 140, 141, 142). За транслокацију tBID-а у митохондрије неопходна је промена пермеабилности митохондријалне мембране и активација BAX-а. Нарушавање интегритета митохондријалне мембране праћено је изласком цитохрома ц, AIF-1 и осталих протеина у цитоплазму ћелије. AIF-1 заједно са цитохромом ц и прокаспазом 9 формира апоптозом

који врши активацију ефекторних (извршилачких) каспаза 3, 6 и 7 које завршавају апоптотични процес.

Хомеостатска равнотежа сваке ћелије представља један од важних фактора за њено нормално функционисање. Комплексност као и функционалност ћелије и њене способности да одржи нормалну хомеостазу највећим делом јесу генетски контролисани. Наиме, како и сам метаболизам, раст, диференцијација, пролиферација тако и процес апоптозе и њених компоненти налазе се под генетском контролом. За структурне компоненте тј учеснике апоптозе главна карактеристика је та да они морају бити утишани, тј генетски супресовани или контролисани у циљу преживљавања ћелије преко промене у експресији гена за анти-апоптотичне молекуле. Покретањем неког од апоптотичних путева долази до повећане експресије про-апоптотичних компоненти и усмеравања ћелије у правцу смрти. Активација унутрашњег (митохондријалног пута) апоптозе може бити остварена великим бројем стимулуса у које убрајамо оштећење ДНК, повећање концентрације цитоплазматског калцијума, присуство оксидативног стреса и оштећења од стране слободних кисеоничних радикала или оштећење ендоплазматичног ретикулума (143). Митохондријални пут помера равнотежу код породице Bcl-2 протеина у правцу преваге про-апоптотичних представника који доводе до формирања апоптозома и последичне апоптозе посредоване каспазама (144, 145, 146, 147). Разноврсност и комплексност сигналних апоптотичних путева показује заједничку карактеристику која подразумева поремећај у контролним механизмима митохондрија. Превагом про-апоптотичних сигнала, интегритет митохондријалне мембране се мења, зауставља се продукција АТРа и долази до изласка потенцијално токсичних протеина у цитоплазму.

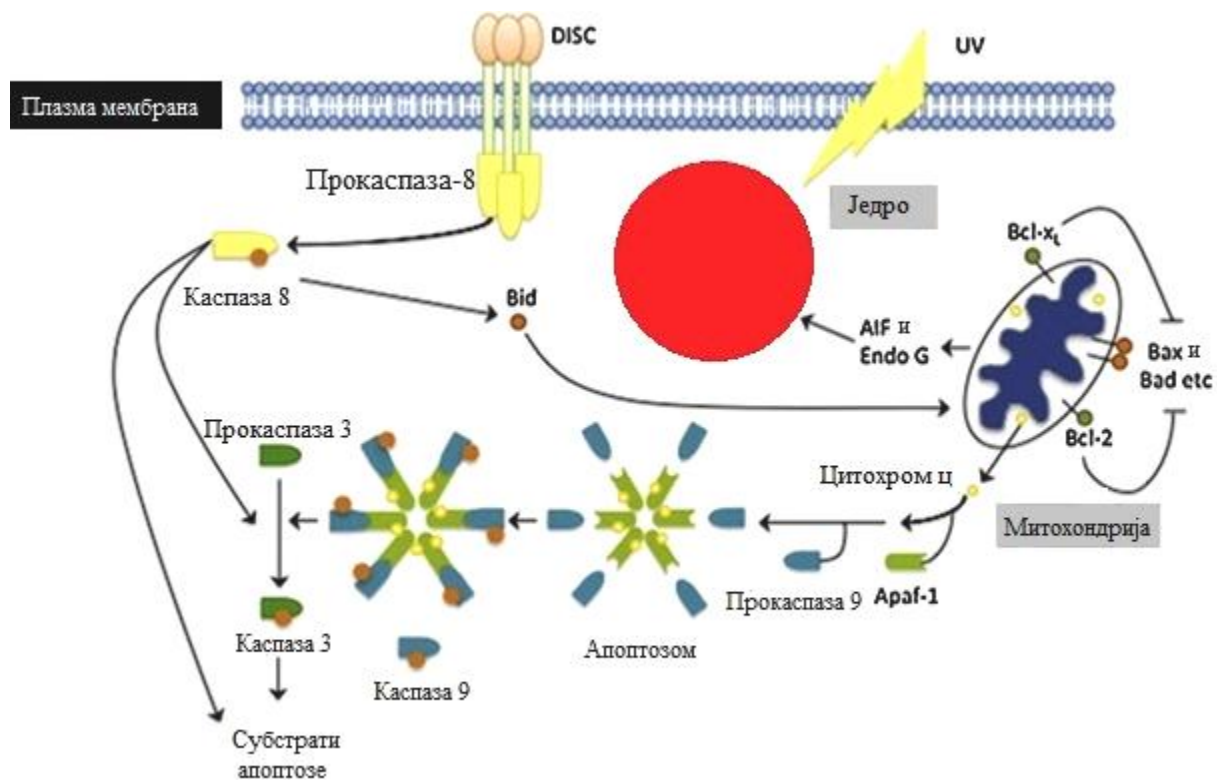


Слика 9. Механизам процеса апоптозе (57).

1.8.3. Улога каспаза у апоптози

Апоптоза као високо специфичан процес регулисан је од стране великог броја молекула. Два основна начина којим ћелија подлеже апоптози представљена су активацијом унутрашњег апоптотичног пута (митохондрије и ендоплазматични ретикулум) и активацијом спољашњег апоптотичног пута који подразумева ангажовање рецептора смрти (111). Централну улогу у процесу апоптозе заузимају каспазе (cysteine dependent aspartate specific proteases). Прва каспаза која је идентификована и означена као каспаза 1 (ICE (interleukin-1b converting enzyme) врши конверзију прекурсора интерлеукина 1b до јаког запаљенског медијатора (148, 149). До сада је идентификовано 14 различитих врста каспаза код сисара и њихова главна карактеристика је да се синтетишу у виду инактивних ензима, змогена тј прокаспаза које се активирају у процесу апотозе цепањем аспартатске резидуе (150, 151, 152). Каспазе по биохемијској класификацији припадају класи ендопептидаза (кидају пептидне везе унутар полипептидних ланаца) (152). У процесу апоптозе по функцији могу се разликовати

иницијаторне (апикалне) и егзекуторне (извршилачке, нисходне) каспазе (151). У својој структури све прокаспазе садрже протеазни домен који може да се подели на две подјединице, велику и малу подјединицу. Подела каспаза такође може бити извршена на основу њихове сличности у секвенци протеазног домена. Разликују се три групе каспаза: прва група су инфламаторне каспазе (каспаза 1,4, 5, 11, 12, 13 и 14), апоптотичне каспазе друге групе у којој се налазе каспазе 2, 3 и 7 и апоптотичне каспазе треће групе у којој су каспазе 6, 8, 9 и 10 (151, 153, 154). Све прокаспазе као и њихови активни облици подељени су на две велике групе у зависности од места и улоге у апоптотичном путу. Прву групу представљају иницијаторне каспазе (каспаза 2, 8, 9 и 10) док другу групу представљају егзекуторне, извршилачке каспазе (каспазе 3, 6 и 7) (153, 154, 155, 156). Иницијаторне и инфламаторне апоптотичне каспазе на аминок крају садрже продомене са око 100 аминокиселина, док ти продомени код егзекуторних каспаза не прелазе 30 аминокиселина (154). Иницијаторне прокаспазе представљају мономере док су егзекуторне прокаспазе димери. Процесом димеризације, тачније олигомеризације долази до активације иницијаторних каспаза моделом алостерне активације, другим речима међусобна близина иницијаторних прокаспаз узрокује њихову аутоактивацију (151, 156, 157). Наиме, након иницијације процеса апоптозе од стране унутрашњег пута и ослобађања цитохрома ц из митохондрија у цитоплазму долази до његовог везивања са бета јединицом АРАФ-1 (апоптоза активирајући фактор-1). Овим путем се формира хепомерички апоптозом (155). Иницијаторне прокаспазе 9 се везују за апоптозом и формирају холо-апоптозом (АРАФ-1, цитохром ц и прокаспаза 9) који инактивну прокаспазу 9 претвара у активну форму (153, 158, 159). Овако формиран активни комплекс протеолитичким путем сече и активира егзекуторне (извршилачке) прокаспазе 3 и 7 које финализирају процес апоптозе (160, 161, 162). Овим механизмом се врши активација осталих иницијаторних прокаспаз (162) (слика 1.). Као и сам процес апоптозе, процес активације каспазне каскаде је строго регулисан процес и не наступа у случају мањих оштећења ћелије. Активација каскаде каспаза врши се једино у случају ВАХ зависног ослобађања цитохрома ц из митохондрија (163). Овај процес може бити инхибиран од стране антиапоптотичних протеина Bcl-2 породице као што су Bcl-2, BCL-XL, BCL-W итд. Разлике у експресији протеина Bcl-2 породице у директној су корелацији са прогнозом и успешности лечења болести узрокованим поремећајем апоптозе (164).



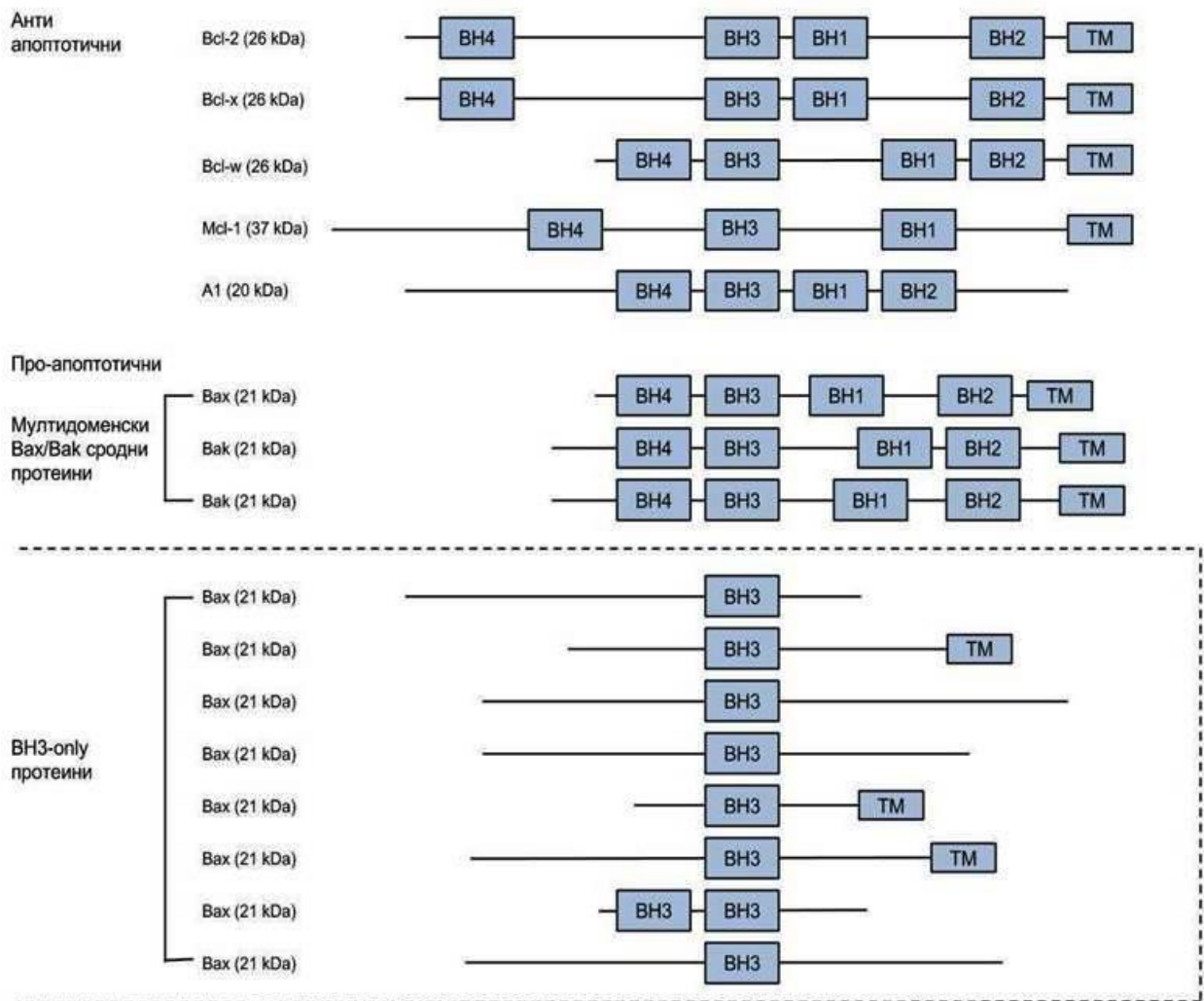
Слика 10. Пример активације иницијаторне прокаспазе 8 са формирањем апоптозома и активацијом извршилачких каспаза у процесу апоптозе.

1.8.4. Регулација апоптозе: Bcl-2 фамилија протеина

Протеини Bcl-2 (B-cell CLL/Lymphoma 2) породице су главни регулатори апоптозе. До данас је познато преко 25 чланова Bcl-2 породице који могу грубо бити подељени на оне који инхибирају процес апоптозе (анти-апоптотични) и оне који овај процес подстичу (про-апоптотични протеини) (165, 166). Породица Bcl-2 протеина поседује четири ВН домена (165, 166, 167). Највећи проценат протеина из ове породице у својој хемијској структури на карбоксилном крају поседује липосолубилни домен који је неопходан и круцијалан за њихову мембранску локализацију као и комуникацију са спољашњом митохондријалном мембраном (166). Локализација анти и проапоптотичних протеина се разликује управо због ове карактеристике. Наиме показано је да нормално постоји експресија Bcl-2 протеина у цитоплазми, митохондријама и ендоплазматичном

ретикулуму. Насупрот њима про-апоптотични протеини као што су Вах и Вид налазе се експримовани превасходно у цитоплазми и до промене њихове локализације ка митохондријалној мембрани долази једино у случају активације апоптозе (168, 169, 170, 171, 172, 173, 174).

На основу присуства ВН домена фамилија Bcl-2 протеина подељена је на три класе (Слика 11). Прву класу чине анти-апоптотични протеини који садрже сва четири ВН домена (Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1, A1, Bcl-w инхибирају апоптозу везујући се за про-апоптотичне чланове BCL-2 фамилије омогућавајући ћелијско преживљавање); следећу групу чине про-апоптотични протеини који садрже три ВН домена (BAX, BAK, Bcl-ranbo, Bfk и BOK) и последњу групу чине про-апоптотични такозвани ВН only протини који у својој структури поседују само домен ВН3 (Beclin-1, SPIKE, BID, BIK, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK, BNIP3, EGL-1) (168, 175). Локализација BAX-а је који се налази у облику мономера је ограничена на цитосол, док се олигомерна форма BAX налази на спољашњој митохондријалној мембрани и на ендоплазматичном ретикулуму. Активацијом BAX-а тј. ослобађањем његовог аминокраја од антиапоптотичних протеина Bcl-2 и транслокације из цитоплазме у спољашњу мембрану митохондрија долази до његове олигомеризације, стварања пора, измене пермеабилности митохондријалне мембране и ослобађања цитохрома ц из међумембранског простора у цитосол (176, 177, 178, 179, 180).



Слика 11. Bcl-2 породица протеина. На слици 3. приказана је класификација и подела Bcl-2 протеина на основу присуства и броја BH домена.

Познато је да је BH3 домен неопходан за међупротеинску интеракцију са анти-апоптотичним протеинима ове породице (168). Након изучавања која су обухватила идентификацију и карактеризацију BH3 домена ВIK, ВАК и других мулти доменских протеина, показано је да BH3 домен представља домен смрти (168, 179). Оваква тврдња доказана је експериментима у којим је мутација BH3 домена код BH3 only протеина изазивала смањење, тачније обуставу у везивању оваквих протеина са мутираним доменом за анти-апоптотичне представнике Bcl-2 породице, чиме је показана неприкосновена улога BH3 домена у изазивању процеса апоптозе (173, 181, 182).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Ова експериментална студија има за циљеве:

1. Утврђивање ефеката испитиваних лекова (Ралоксифен, Мифепристон, Метотрексат и Миотрексат) и женских полних хормона (Естроген и Прогестерон) на вијабилност/цитотоксичност ћелија
2. Утврђивање ефеката Естрогена и Прогестерона на апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата
3. Утврђивање механизма апоптотичног ефекта испитиваних супстанци

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Ћелијска линија и испитиване супстанце

Ћелијска линија која је коришћена за испитивање представља хумане ендометријалне стромалне ћелије налик на фибробласте ThESC ћелијска линија, изоловане из утеруса пацијенткиње. Ћелијска линија је наручена из American Type Culture Collection- ATCC (Manassas, USA). Ендометријалне стромалне ћелије су иморталисане хуманом теломераза реверзибилном транскриптазом (hTERT) тј. (ATCC[®]: CRL-4003tm). Ћелије су узгајане у DMEM-у (Dulbecco's modified eagle's medium; Sigma Aldrich; Germany) обогаченим са: L-глутамином (2 mM/l; Invitrogen; USA), 1% неесенцијалним аминокиселинама (Sigma Aldrich; Germany), 1% ITS-ом (од енг. insulin transferin supplement; BD Biosciences; USA), penicillin-streptomycin-ом (1 mM/l; Sigma Aldrich; Germany) и 10% FBS -ом (од енг. fetal bovine serum; Sigma Aldrich; Germany). Ћелијска линија је инкубирана на 37 C° у атмосфери 5 % CO₂.

Стерилизација медијума вршена је филтрирањем кроз нитроцелулозне филтере са порама дијаметра 0,22 μm и чувани су на +4 C°.

Експерименти су одобрени од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Крагујевцу (сада Факултет медицинских наука у Крагујевцу).

Ћелије су третиране растворима испитиваних супстанци:

Ралоксифен (Евиста) у концентрацијама 10⁻⁵М, 10⁻⁶М, 10⁻⁷М, 10⁻⁸М, 10⁻⁹М и 10⁻¹⁰М (шток раствор финалне концентрације Ралоксифена у дози од 10⁻³М прављен је у стерилном 1xPBS раствору, након чега су све остале испитиване концентрације Ралоксифена прављене у медијуму који не садржи серум).

Метотрексат (Sigma Aldrich; Germany) у концентрацијама: 16 μM, 8 μM, 4 μM, 2 μM, 1 μM, 0.1 μM и 0.01 μM. Шток Метотрексат раствора направљен је растварањем 100 mg Метотрексата у 10 ml 1M NaOH при чему је финална концентрација Метотрексата у

штоку износила 2.2×10^4 μM . Из шток раствора прављене су све преостале концентрације Метотрексата у медијуму који не садржи серум (ти раствори су радни раствори).

Миотрексат у концентрацијама: 16 μM , 8 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM , 0.1 μM и 0.01 μM . Миотрексат у финалној концентрацији од 2.2×10^4 μM у финалном волумену од 10ml направљен је растварањем Метотрексата у Л аргинину 11×10^4 μM (11×10^{-2} mol/L) у односу 1:5. Из шток раствора Миотрексата преостале испитиване концентрације прављене су такође у медијуму који не садржи серум.

Естроген (17- β -estradiol; Sigma-Aldrich), Прогестерон и Мифепристон растворени су у DMSOу чиме су направљени шток раствори са финалном концентрацијом за Естроген од 10^{-2} М, Прогестерон 10^{-1} М и Мифепристон 2.32×10^4 μM . Шток раствор Мифепристона чуван је на -20 $^\circ\text{C}$ док шток раствори Естрогена и Прогестерона су чувани на $+4$ $^\circ\text{C}$. Од ових шток раствора прављени су радни раствори различитих концентрација којима су третиране ћелије. Концентрације супстанци прављене су у медијуму који није садржао серум при чему финални волумен DMSO није премашио 0.1% у односу на укупну запремину за испитивану концентрацију појединачних супстанци. Концентрације свих супстанци су прављене непосредно пре вршења експеримента. За Естроген испитиване концентрације су биле следеће: 10^{-4} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М и 10^{-9} М; за Прогестерон 10^{-4} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М и 10^{-10} М и за Мифепристон 80 μM , 40 μM , 20 μM и 10 μM .

3. 2. МТТ тест цитотоксичности

Ефекат испитиваних супстанци на ћелијску вијабилност утврђиван је МТТ колориметријском техником (168). Тест се изводи у 96-микротитар плочама са равним дном. Заснива се на редукцији МТТ [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide; Sigma Chemical, ST. Lois, MO] до формазана, продукта митохондријалне дихидрогеназе у вијабилним ћелијама.

Ћелије су ресуспендоване у медијуму и распоређене у бунарчиће 96-микротитар плоче, тако да број ћелија у сваком од њих буде подједнак (1.8×10^4 ћелија/200 μl медијума). Ћелије су потом третиране испитиваним супстанцама појединачно (Ралоксифеном, Естрогеном, Прогестероном, Мифепристоном, Метотрексатом и Миотрексатом одговарајућих концентрација у трајању од 24 h). Након добијених

результата МТТ у даљем експерименту за комбиновани ефекат испитиваних супстанци коришћене су дозе испитиваних супстанци чија појединачна цитотоксичност није прелазила 10%. Комбинације испитиваних супстанци дате су у табели. Након инкубације комбинованих испитиваних супстанци у периоду од 24 часа поновљен је МТТ. Након екстракције појединачних и комбинованих испитиваних супстанци из бунара, ћелије су инкубиране МТТ раствором (5 mg/ml МТТ раствореним стерилном 1xPBS-у (10%) + RPMI (80%), FBS (10%), penicillin/streptomycin (1%) у односу на финални волумен) 3h на температури 37 C° у атмосфери 5% CO₂. Након инкубације ћелија, МТТ раствор је уклањан и ћелијама је додавано 200 µl DMSO-а (Sigma Chemical, ST. Lois,Mo) по бунару. Инкубација помоћу DMSO-а вршена је 30 минута на собној температури (25 C°) уз константно мешање на шејкеру. Оптичка густина (OD) одређивана је на таласној дужини 595 nm (microplate multimode detector, Zenyth 3100). Процент цитотоксичних ћелија рачунат је по формули: Цитотоксичност (%) = [1- (експериментална група (OD)) / (контролна група (OD)) x 100].

Име супстанце	Комбинација хормона и модулятора	Комбинација хормон, модулатор и цитостатик	Комбинација хормон и цитостатик	Комбинација модулатор и цитостатик
Естроген	Естроген+Ралоксифен	Естроген+Ралоксифен+МТХ Естроген+Ралоксифен+МҮО	Естроген+ МТХ Естроген+МҮО	МТХ+Ралоксифен МҮО+Ралоксифен Ралоксифен+ МТХ или МҮО
Прогестерон	Прогестерон+Мифепристон	Прогестерон+Мифепристон+МТХ Прогестерон+Мифепристон+МҮО	Прогестерон+МТХ Прогестерон+МҮО	МТХ+Мифепристон МҮО+Мифепристон Мифепристон+ МТХ или МҮО

Табела2. Табеларни приказ комбинације испитиваних супстанци у периоду од 24 часа

3.3. ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности

У циљу утврђивања апоптотичног ефекта испитиваних супстанци користиће се Annexin V-FITC тест у комбинацији са пропидијум јодидом (PI) (Annexin V-FITC Apoptosis; Detection Kit I; BD Pharmingen, US). Annexin V (или Annexin A5) представник је интрацелуларних протеина из породице анексина. Његова улога огледа се у везивању фосфатидил-серина који се код нормалних, здравих ћелија налази са унутрашње стране ћелијске мембране. Током ране апоптозе, услед губитка мембранске асиметрије долази до транслокације фосфатидил-серина на спољашњу страну ћелијске мембране. Флуорохромом обележен Annexin V у том случају се користи за идентификацију тј. детекцију апоптотичних ћелија.

Након третирања ћелија (5×10^5 ћелија/800 μ l) испитиваним супстанцама у различитим концентрацијама у периоду од 24 часа следи прање ћелија 2 пута хладним PBS-ом и њихово ресуспендовање у 1 x binding bufferu (10 % FBS и 0.1% Triton X). У 100 μ l ове солуције додаће се 5 μ l Annexin V-FITC и 5 μ l PI. Следи инкубација ћелија 15 минута на собној температури (25C°) у мраку након чега се додаје 400 μ l 1x binding buffer-a и FACS анализа ће бити извршена у року од 1h на FACS-у (Becton-Dickinson, FACS-Calibur, Mountainview, CA, USA).

3.4. Флуоресцентна микроскопија

Механизам апоптотичног ефекта испитиваних супстанци одређиван је флуоресцентном микроскопијом. Након засејавања ћелија (2×10^4 ћелија/400 μ l) на стерилисаним стакленим љуспицама (које су предходно постављене у 24 well plate плочу и инкубиране 24h у инкубатору) и до достизања конфлуентности од 80%, ћелије су третиране испитиваним супстанцама у концентрацијама чија цитотоксичност не прелази 10% ради могућности детекције одговарајућих протеина који су битни за апоптотични пут. Након третирања ћелије ће бити опране у PBS-у потом фиксиране у fixation buffer/u (4% параформалдехиду, 23 mM NaH₂PO₄ и 77 mM Na₂HPO₄, pH 7.3). Пермеабилизација ћелија извршена је у 0.2% Triton-X/PBS, након чега следи инкубација 30 минута у blocking buffer-у (10% FBS, 0.1% Triton X-100/PBS) (168). Инкубација ћелија примарним

антителима у периоду од једног сата извршена је различитим анти-зечијим: BAX (N20,sc-493; Santa Cruz Biotech.Inc), BCL-2 (DC21, sc-783; Santa Cruz Biotech.Inc), caspase-3 (#9661, Cell signaling Technology, USA), анти-мишијим антителима: cytochrome-c (G7421, Promega, USA), β -actin (#076, K4840; Sigma Aldrich; Germany) као и Anti-Estrogen Related Receptor alpha antibody и Anti-Progesterone Receptor antibody (поклон Др Љупке Иванишевић, Canada, Ottawa). Након инкубације ћелије су опране у PBS-у и инкубиране секундарним флуоресцентим антителима: Alexa 488 и 594 (у мраку 1h, на собној температури). Флуоресценција ћелија посматрана је на конвенционалном микроскопу марке Olympus, модел BX51 под увеличањем 40X и 100X. Анализа слика је извршена ImageJ софтвером.

3.5. Статистичка анализа података

За статистичку обраду података кориштени су Student-ов т-тест или непараметријски Mann–Whitney-јев тест суме рангова. Резултати су анализирани комерцијалним програмским пакетом SPSS (верзија 20) и приказани као средња вредност \pm SD (стандардна девијација) а статистичка значајност одређивана је за ниво $p= 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1.0. Метотрексат, Миотрексат, Ралоксифен, Мифепристон, Естроген и Прогестерон испољавају цитотоксично дејство на ендометријалне стромалне ћелије

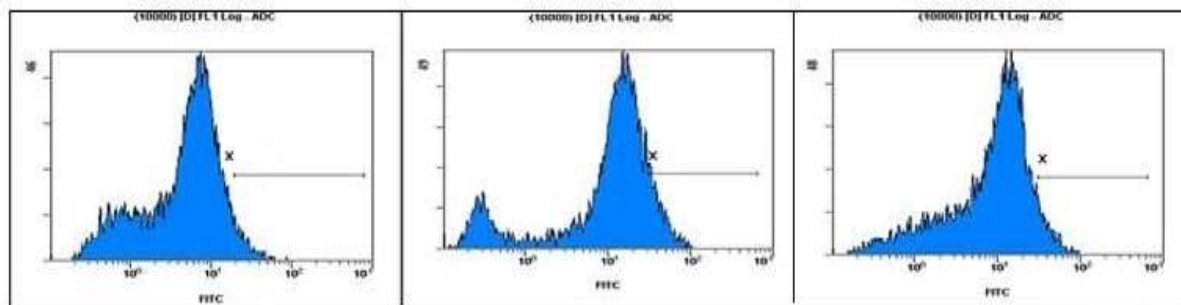
Основне ћелијске компоненте грађе хиперпластичних ендометријалних промена представљају ендометријалне стромалне ћелије. Као предканцерозно стање ове бенигне промене узрокују обилна крварења ван периода менструалног циклуса. Терапијски приступ овим променама подразумева инвазивне методе (киретаже чак и хистеректомије) и медикаментозну терапију која се у највећем проценту заснива на лековима који поседују хормонске карактеристике. У циљу испитивања нових и не инвазивних метода лечења ових промена, испитиван је ефекат женских полних хормона и њихових модулатора на

цитотоксичне ефекте Метотрексата и Миотрексата на ендометријалној стромалној ћелијској линији.

Један од циљева ове експерименталне студије био је испитивање појединачног и комбинованог цитотоксичног ефекта испитиваних супстанци, полних хормона и њихових модулатора на ThESC ћелијској линији. У циљу утврђивања појединачног и комбинованог цитотоксичног ефекта испитиваних супстанци коришћен је МТТ тест који мери активност ензима митохондријалне малат дехидрогеназе која редукује МТТ до формаза али само код живих, метаболички активних ћелија.

Након третмана ћелија испитиваним супстанцама различитих концентрација, укључујући Метотрексат (16 μ М; 8 μ М; 4 μ М и 1 μ М); Миотрексат (16 μ М; 8 μ М; 4 μ М и 1 μ М), Ралоксифен (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М), Естроген (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М), Прогестерон (10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10} М) и Мифепристон (40 μ М, 20 μ М и 10 μ М) у трајању од 24h на 37C° у атмосфери 5% CO₂ коришћењем МТТ теста и статистичке обраде очитаних резултата у циљу проналажења најмање дозе лекова која узрокује најмањи степен цитотоксичности утврђивани су како појединачни тако и комбиновани ефекти испитиваних супстанци на ендометријалну стромалну ћелијску линију као и ефекти женских полних хормона и њихових модулатора на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата.

У циљу испитивања ефекта женских полних хормона, модулатора њихових рецептора, као и њиховог утицаја на цитотоксични ефекат Метотрексата и Миотрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија), најпре је утврђена експресија естрогенских и прогестеронских рецептора користећи FACS анализу.



Контрола/
Секундарно антитело

Анти естрогенски
рецептор алфа

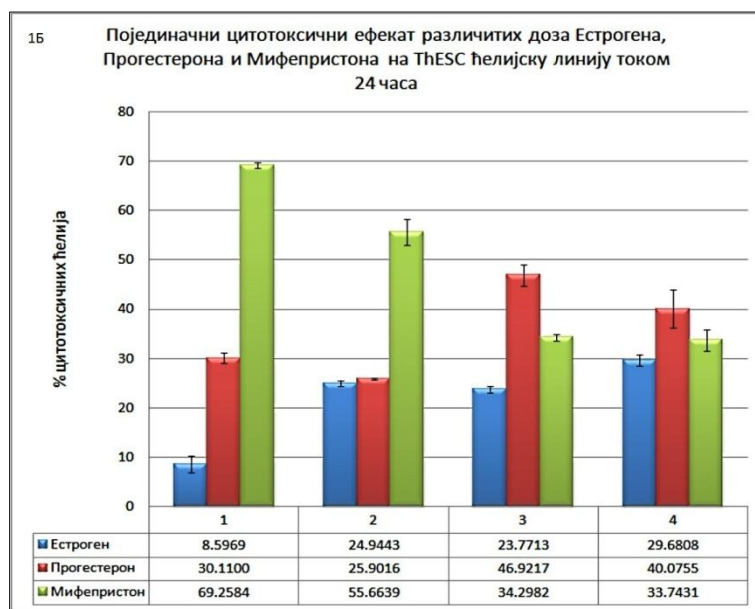
Анти прогестеронски рецептор Б

Приказ експресије естрогенског рецептора алфа и прогестеронског рецептора Б у ThESC ћелијској линији у односу на позитивну контролу (ћелијама је додато само секундарно

антитело Alexa 488-позитивна контрола). Након инкубације ћелија одговарајућим примарним антителима Anti-Estrogen Related Receptor alpha antibody и Anti-Progesterone Receptor antibody ћелије су инкубирани секундарним антителом Alexa 488. По завршеној инкубацији, FACS анализом је одређивана експресија естрогенског рецептора алфа и прогестеронског рецептора Б у ThESC ћелијској линији. На основу резултата FACS анализе можемо закључити постојање експресије испитиваних хормонских рецептора у поменутој ћелијској линији.

4.1.1. Појединачни цитотоксични ефекат различитих доза Естрогена, Прогестерона, селективног модулятора естрогенских рецептора (Ралоксифена) и селективног модулятора прогестеронских рецептора (Мифепристона), Метотрексата и Миотрексата на инхибицију пролиферације ендометријалне стромалне ћелијске линије

Појединачни цитотоксични ефекат различитих доза испитиваних супстанци на инхибицију пролиферације ендометријалне стромалне ћелијске линије (ThESC ћелијска линија) приказан је Графиконом 1А) и 1 Б). На Графикону 1А) приказан је појединачни цитотоксични ефекат различитих доза Метотрексата (16 μ М; 8 μ М; 4 μ М и 1 μ М), Миотрексата (16 μ М; 8 μ М; 4 μ М и 1 μ М) и Ралоксифена (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М) током 24 часа на раст ендометријалне стромалне ћелијске линију. Уочава се да испитиване супстанце испољавају цитотоксични ефекат који је у позитивној корелацији са концентрацијама ових супстанци. Наиме повећање концентрација испитиваних супстанци резултује повећањем цитотоксичног ефекта. Највећи степен цитотоксичности (појединачно и упоредно дејство Метотрексата и Миотрексата) који показује статистичку значајност у односу на све испитиване концентрације присутан је у дози од 16 μ М за Миотрексат (41,23%) и Метотрексат (26,66%). За највећу испитивану дозу Ралоксифена од 10^{-6} М проценат цитотоксичних ћелија у периоду од 24 часа износио је 18,04 %.



Графикон 1 А) Појединачни цитотоксични ефекат различитих доза Миотрексата, Метотрексата, Ралоксифена и **1 Б).** Естрогена, Прогестерона и Мифепристона у периоду од 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија). Ћелије (9×10^4 ћелија/ml) су третиране различитим концентрацијама испитиваних супстанци: Метотрексат (16µM; 8µM; 4µM и 1µM); Миотрексат (16µM; 8µM; 4µM и 1µM), Ралоксифен (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} M), Естроген (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} M), Прогестерон (10^{-4} , 10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10} M) и Мифепристон (60µM, 40µM, 20µM и 10µM) у трајању од 24 h на 37 C° у атмосфери 5% CO₂. По завршеној инкубацији вијабилност ћелија одређивана је МТТ

тестом. Цитотоксични ефекат испитиваних супстанци на ендометријалне стромалне ћелије (ThESC ћелијска линија) приказан је графиконом 1 А и 1 Б. Резултати представљају средње вредности 6 независних експеримената за сваку испитивану концентрацију \pm стандардна девијација (SD). На Графикону 1 Б изнад вредности цитотоксичности приказани су бројеви 1, 2, 3 и 4 који представљају дозе испитиваних супстанци. **Број 1** представља највеће испитиване дозе за Естроген, Прогестерон и Мифепристон (Естроген 10^{-4} , Прогестерон 10^{-4} М и Мифепристон $60\mu\text{M}$); **број 2** дозе за Естроген, Прогестерон и Мифепристон (Естроген 10^{-7} , Прогестерон 10^{-8} М и Мифепристон $40\mu\text{M}$); **број 3** дозе за Естроген, Прогестерон и Мифепристон (Естроген 10^{-8} , Прогестерон 10^{-9} М и Мифепристон $20\mu\text{M}$); број 4 дозе за Естроген, Прогестерон и Мифепристон (Естроген 10^{-9} , Прогестерон 10^{-10} М и Мифепристон $10\mu\text{M}$).

У групи са испитиваним максималним дозама сва три лека (за Миотрексат и Метотрексат $16\mu\text{M}$ и Ралоксифен 10^{-6}M) највећу цитотоксичност у периоду од 24 часа показују Миотрексат, Метотрексат потом Ралоксифен. Статистичком обрадом података појединачних доза испитиваних супстанци (Графикон 1 А) добијене су статистички значајне разлике уочавају се између доза Метотрексата од 16 и $8\mu\text{M}$ у односу на дозу од $1\mu\text{M}$ ($p>0.05$); за Миотрексат постоји статистички значајна разлика између свих коришћених доза док за испитиване дозе Ралоксифена постоји статистички значајна разлика између доза 10^{-6} и 10^{-9}M .

Поређењем и испитивањем групних доза за Метотрексат и Миотрексат ($8\mu\text{M}$) проценат цитотоксичних ћелија је био највећи за Миотрексат (27,67%) потом Метотрексат (20,93%) и на крају за Ралоксифен (17,24%). У овој групној концентрацији задржава се тренд статистички значајне разлике и цитотоксичности тако да највећи степен цитотоксичности показује Миотрексат ($8\mu\text{M}$), Метотрексат ($8\mu\text{M}$) потом Ралоксифен (10^{-7}M).

За групне дозе Метотрексата и Миотрексата од $4\mu\text{M}$ приметан је даљи тренд снижавања процента цитотоксичности. За Миотрексат (18,88%), Метотрексат (18,76%) и Ралоксифен у дози од 10^{-8}M (12,78%). За испитиване дозе Метотрексата и Миотрексата не постоји статистичка значајност, док за поменуте лекове и њихове дозе постоји статистичка значајност у односу на Ралоксифен.

Код ових концентрација примећује се да је највећу цитотоксичност испољавао Миотрексат, међутим у следећој испитиваној групној дози за Метотрексат и Миотрексат ($1\mu\text{M}$) и 10^{-9}M Ралоксифена, проценат цитотоксичности је највећи за Метотрексат и износи 9,289%, за Миотрексат 6,83% и Ралоксифен 5,099% цитотоксичних ћелија у периоду од 24 часа. Групно постојање статистички значајне разлике присутно је једино у случају Метотрексата $1\mu\text{M}$ и Ралоксифена 10^{-9}M . За све испитиване дозе поменутих лекова можемо закључити да постоји директна корелација између дозе и процента цитотоксичних ћелија. У циљу испитивања ефекта женских полних хормона и модулятора њихових рецептора на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у експериментима су коришћене најниже дозе које за поменуте лекове испољавају најмању цитотоксичност на испитиваној ћелијској линији.

На графикону 1Б) приказан је упоредни цитотоксични ефекат различитих доза Естрогена (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9}M), Прогестерона (10^{-4} , 10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10}M) и Мифепристона ($80\mu\text{M}$, $40\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ и $10\mu\text{M}$) у трајању од 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију. Подела различитих доза свих испитиваних супстанци организоване су по групама ради лакшег тумачења као и упоређивања добијених резултата. Група 1 представља највише испитиване дозе за Естроген (10^{-4}M), Прогестерон (10^{-4}M) и Мифепристон ($80\mu\text{M}$), Група 2 Естроген (10^{-7}M), Прогестерон (10^{-8}M) и Мифепристон ($40\mu\text{M}$), Група 3 Естроген (10^{-8}M), Прогестерон (10^{-9}M) и Мифепристон ($20\mu\text{M}$) и Група 4 Естроген (10^{-9}M), Прогестерон (10^{-10}M) и Мифепристон ($10\mu\text{M}$).

Појединачни цитотоксични ефекат различитих доза Естрогена није дозно зависан тако да при највећој дози Естроген 10^{-4}M цитотоксичност износи 8.59% са израженом статистички значајном разликом у односу на преостале испитиване дозе Естрогена. У дозама Естрогена од 10^{-7} и 10^{-8}M цитотоксичност је износила 24.94% и 23.77% при чему између ове две појединачне дозе не постоји статистички значајна разлика. Следећа испитивана појединачна доза Естрогена 10^{-9}M испољава највећу цитотоксичност (29.68%) и показује постојање статистички значајне разлике у односу на предходно испитиване дозе Естрогена (10^{-4} , 10^{-7} и 10^{-8}M). Слично Естрогену, Прогестерон такође не испољава дозну зависност, минимална цитотоксичност износи 26.169% за дозу од 10^{-8}M , док максимална цитотоксичност износи 44.42% при дози Прогестерона од 10^{-9}M . Уједно ова доза 10^{-9}M показује статистички значајну разлику у односу на остале испитиване

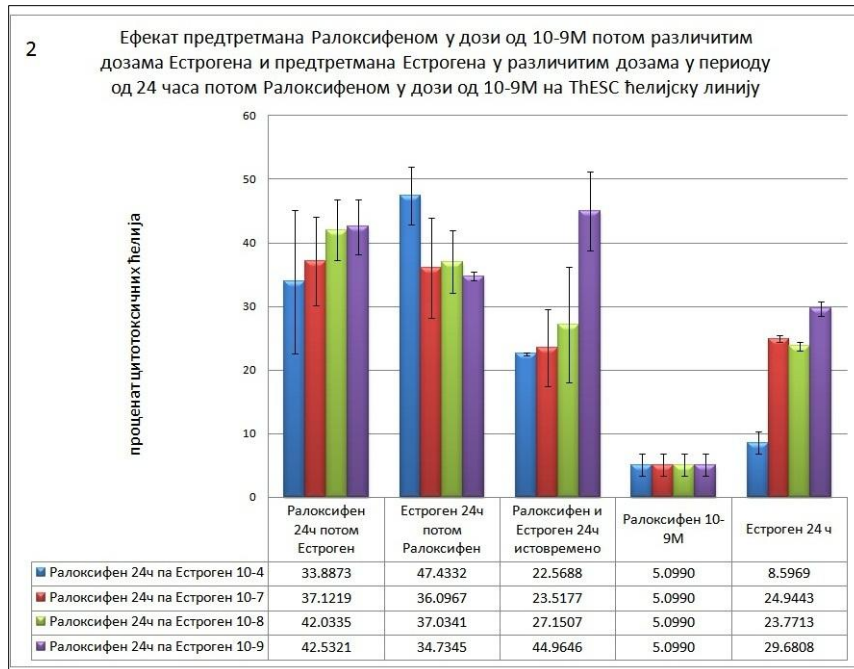
појединачне дозе Прогестерона у периоду од 24 часа. Код Мифепристона је присутна дозна зависност која се креће од максималне цитотоксичности за дозу од 60 μ М (69.25%) до минималне за испитивану дозу од 10 μ М (33.74%). Присутно је постојање статистички значајне разлике у појединачним дејствима различитих концентрација Мифепристона изузев у случају поређења ефекта доза Мифепристона од 20 и 10 μ М између којих не постоји статистички значајна разлика.

Статистичком обрадом података групних вредности (највеће испитиване дозе супстанци) у групи 1 присутна је статистички значајна разлика (у цитотоксичности) Мифепристона и Прогестерона у односу на Естроген. У групи 2 статистичка значајност у цитотоксичности је присутна једино у случају Мифепристона 40 μ М (55.66%) у односу на Прогестерон и Естроген. У групи 3 Прогестерон 10⁻⁹М показује статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на Естроген 10⁻⁸М и Мифепристон 20 μ М.

У последњој, четвртој групи не постоји статистички значајна разлика између дејства испитиваних супстанци.

4.1.2. Појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Естрогена и Ралоксифена у дози од 10⁻⁹ М на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у периоду од 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију

У циљу испитивања ефекта женских полних хормона (Естрогена и Прогестерона) као и њихових модулатора (Ралоксифен и Мифепристон) на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата испитиван је ефекат различитих доза Естрогена у комбинацији са дозама Ралоксифена (10⁻⁹М). Резултати указују на то да су дозе Метотрексата и Миотрексата које изазивају најмањи цитотоксични ефекат на ендометријалне стромалне ћелијске линије у периоду од 24 часа износиле 1 μ М. Коришћењем МТТ теста, испитиван је цитотоксични ефекта комбинације лекова у циљу утврђивања најефикасније комбинације лекова и најмање доза која је довољна да изазове смрт ћелије.



Графикон 2. Појединачни и комбиновани ефекат предтретмана Естрогеном различитих доза и Ралоксифеном (10⁻⁹М) на % цитотоксичних ћелија ендометријалне стромалне ћелијске линије у периоду од 24 часа. Ралоксифен 24 часа потом Естроген у различитим дозама у тексту су представљени као Група 1, различите дозе Естрогена 24 часа потом Ралоксифен у дози од 10⁻⁹М представљени су као Група 2 док Група 3 представља истовремену примену појединачних различитих доза Естрогена са фиксом дозом Ралоксифена 10⁻⁹М.

На **Графикону 2.** приказани су цитотоксични ефекти различитих комбинација предтретмана Ралоксифеном потом Естрогеном (Група 1), предтретмана Естрогеном потом Ралоксифеном (Група 2) и Естрогеном и Ралоксифеном истовремено (Група 3) на ThESC ћелијску линију у периоду од 24 часа. На основу добијених резултата МТТ теста примећује се да све комбинације испољавају већи цитотоксични ефекат у односу на појединачни цитотоксични ефекат испитиваних супстанци. Предтретман Ралоксифеном у концентрацији од 10⁻⁹М потом различитим дозама Естрогена (Група 1) показује цитотоксичност која је од 8.34 до 6.64 пута већа у односу на појединачни ефекат Ралоксифена у истој концентрацији; цитотоксичност комбинације испитиваних супстанци

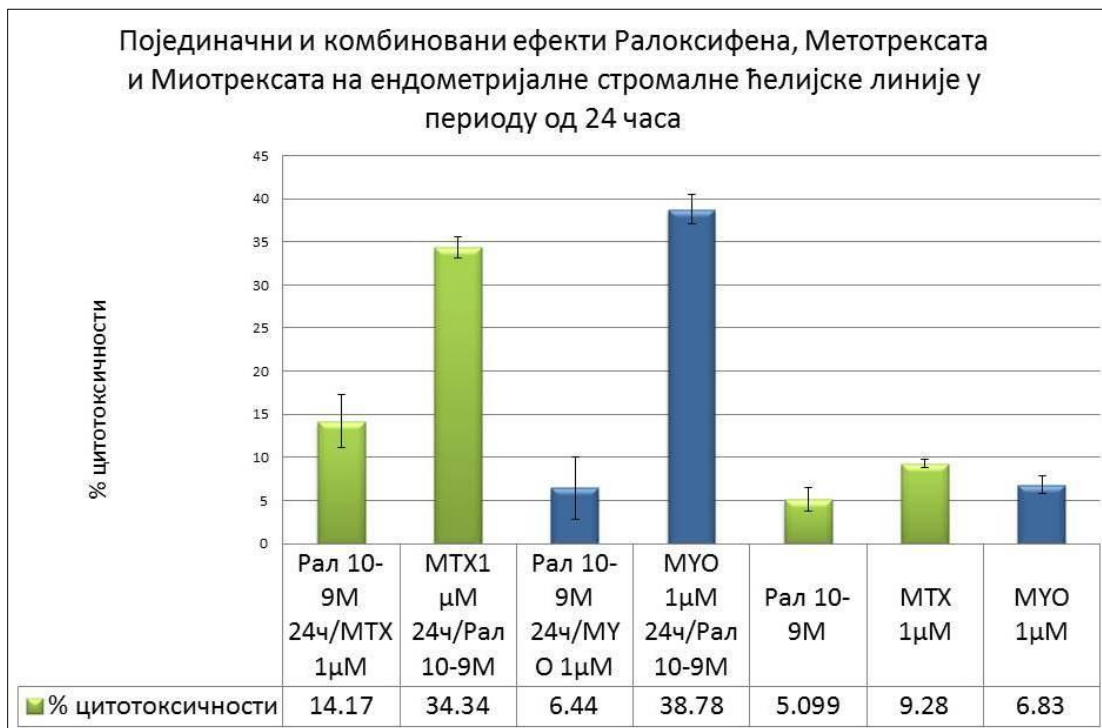
у односу на цитотоксичност различитих доза Естрогена већа је од 1.16 до 2.22 пута у односу на појединачни ефекат различитих доза Естрогена.

Статистичком обрадом добијених података вршено је упоређивање цитотоксичности појединачних доза Групе 1 (Ралоксифен 24 часа потом Естроген у различитим дозама), 2 (различите дозе Естрогена 24 часа потом Ралоксифен у дози од 10^{-9} М) и 3 (истовремену примену појединачних различитих доза Естрогена са фиксом дозом Ралоксифена 10^{-9} М) са цитотоксичним ефектом различитих доза Естрогена и појединачном дозом Ралоксифена од 10^{-9} М. Добијени резултати указују на постојање статистички значајне разлике између све три комбинације у Групама 1, 2 и 3 при дозама Естрогена 10^{-4} М у односу на појединачне дозе Естрогена 10^{-4} М (8.59%) и Ралоксифена (5.099%). У следећој дози Естрогена од 10^{-7} М која је коришћена у Групама 1, 2 и 3 не постоји статистички значајна разлика између њиховог појединачног цитотоксичног ефекта у односу на појединачни цитотоксични ефекат Естрогена у дози од 10^{-7} М (24.94%). Међутим у односу на појединачну дозу Ралоксифена постоји статистички значајна разлика у свим групама. Следећа доза Естрогена која је испитивана у Групама 1, 2 и 3 јесте доза од 10^{-8} М која није показала статистички значајну разлику у односу на цитотоксични ефекат између Групе 1 и 2. Једино у Групи 3 у односу на појединачни ефекат Естрогена у дози од 10^{-8} М (23.77%). У односу на појединачни ефекат Ралоксифена Групе 1, 2 и 3 показују статистички значајну разлику.

За последњу испитивану дозу Естрогена 10^{-9} М у Групама 1, 2 и 3 присутна је статистички битна разлика ($p > 0.05$) између комбинованог и појединачног ефекта Естрогена исте дозе (29.68%) и Ралоксифена у дози од 10^{-9} М (5.099%). На основу добијених резултата и њихове статистичке обраде можемо закључити да се највећи степен цитотоксичности од 44,96% постиже при истовременој апликацији Ралоксифена у дози од 10^{-9} М и најниже испитиване дозе Естрогена 10^{-9} М.

У даљем циљу испитивања цитотоксичног ефекта испитиваних супстанци проучавани су ефекти појединачне и комбиноване примене естрогенског модулятора Ралоксифена (10^{-9} М), Метотрексата и Миотрексата у дозама од $1\mu\text{M}$ током 24 часа (Графикон 3). Након третмана користећи МТТ тест испитивана је и упоређивана комбинована цитотоксичност испитиваних супстанци у циљу проналажења највеће цитотоксичности при датим најнижим испитиваним концентрацијама. Такође је

испитивано да ли предтретман Ралоксифеном потом Метотрексатом или Миотрексатом утиче на % цитотоксичности ћелија у односу на њихов појединачни ефекат.



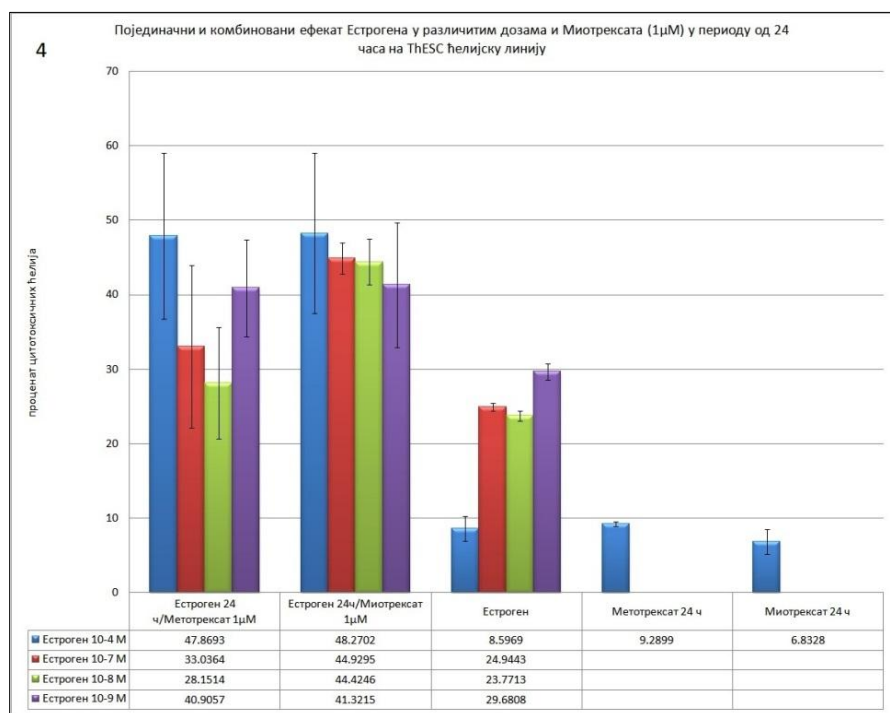
Графикон 3. Појединачни и комбиновани ефекат Ралоксифена (10^{-9} М), Метотрексата (1 μ М) и Миотрексата (1 μ М) на ендометријалне стромалне ћелије у току 24 часа. На графикону 3 приказан је ефекат Ралоксифена у фиксној дози од 10^{-9} М на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у дозама од 1 μ М током 24 часа. Уколико се Ралоксифен примени у комбинацији 24 часа пре третмана Метотрексатом и Миотрексатом долази до смањења цитотоксичности поменутих лекова у односу на комбинацију у којој се примењују Метотрексат и Миотрексат 24 часа пре. Најефикасији степен цитотоксичности при фиксним дозама испитиваних лекова присутан је код предтретмана Метотрексатом и Миотрексатом 24 часа, потом Ралоксифеном (34.34% и 38.78%).

На Графикону 3. испитиван је цитотоксични ефекат примене комбинација Ралоксифена, Метотрексата и Миотрексата на ThESC ћелијску линију. Обрадом резултата МТТ теста као и статистичком обрадом података резултати показују постојање статистички значајне разлике код комбиноване цитотоксичности у случају предтретмана Ралоксифеном (14.173%) и предтретмана Метотрексатом (34.348%) и Миотрексатом

(38.782%) у корист комбинација у којима је вршен предтретман Метотрексатом и Миотрехсатом. Ови предтретмани Метотрексатом и Миотрехсатом такође показују статистички значајну разлику цитотоксичности у односу на појединачни ефекат свих испитиваних супстанци.

На основу резултата МТТ теста и статистичке обраде података можемо закључити да предтретман Метотрексатом или Миотрехсатом потом Ралоксифеном 10^{-9} М повећава цитотоксични ефекат испитиваних комбинација у односу на појединачни ефекат испитиваних супстанци.

Следећи задатак било је испитивање ефекта различитих концентрација женског полног хормона Естрогена на појединачну и комбиновану цитотоксичност Метотрехсата и Миотрехсата (који су коришћени у фиксним дозама од $1\mu\text{M}$) у периоду од 24 часа (Графикон 4.).



Графикон 4. Појединачни и комбиновани ефекат примене Естрогена различитих концентрација на цитотоксичност Метотрехсата и Миотрехсата ($1\mu\text{M}$) у периоду од 24 часа. МТТ тест је вршен 24 часа након третмана испитиваним супстанцама.

Након третмана Естрогеном различитих концентрација, ћелије су третиране Метотрексатом и Миотрексатом у дози од $1\mu\text{M}$ након чега је МТТ тест урађен по напред описаној методологији. Резултати МТТ теста и статистичке обраде података показали су следеће:

У случају предтретмана Естрогеном у дози од 10^{-4}M у комбинацији са Метотрексатом (47.86%) и Миотрексатом (48.27%) постоји статистички значајна разлика у комбинованој цитотоксичности у односу на појединачни ефекат Естрогена у дози од 10^{-4}M (8.59%). Обе комбинације у показују статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на појединачне ефекте Метотрксата (9.28%) и Миотрксата (6.83%).

У случају предтретмана Естрогеном у дози од 10^{-7}M у комбинацији са Метотрексатом (33.03%) и Миотрексатом (44.92%) постоји статистички значајна разлика једино код комбинације са Миотрексатом у односу на појединачни ефекат Естрогена у дози од 10^{-7}M (24.94%). Обе комбинације показују статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на појединачне ефекте Метотрксата (9.28%) и Миотрксата (6.83%).

Предтретман Естрогеном у дози од 10^{-8}M у комбинацији са Метотрексатом (28.15%) и Миотрексатом (44.42%) показује постојање статистички значајне разлике једино код комбинације са Миотрексатом у односу на појединачни ефекат Естрогена у дози од 10^{-8}M (23.77%). Обе комбинације показују статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на појединачне ефекте Метотрксата (9.28%) и Миотрксата (6.83%).

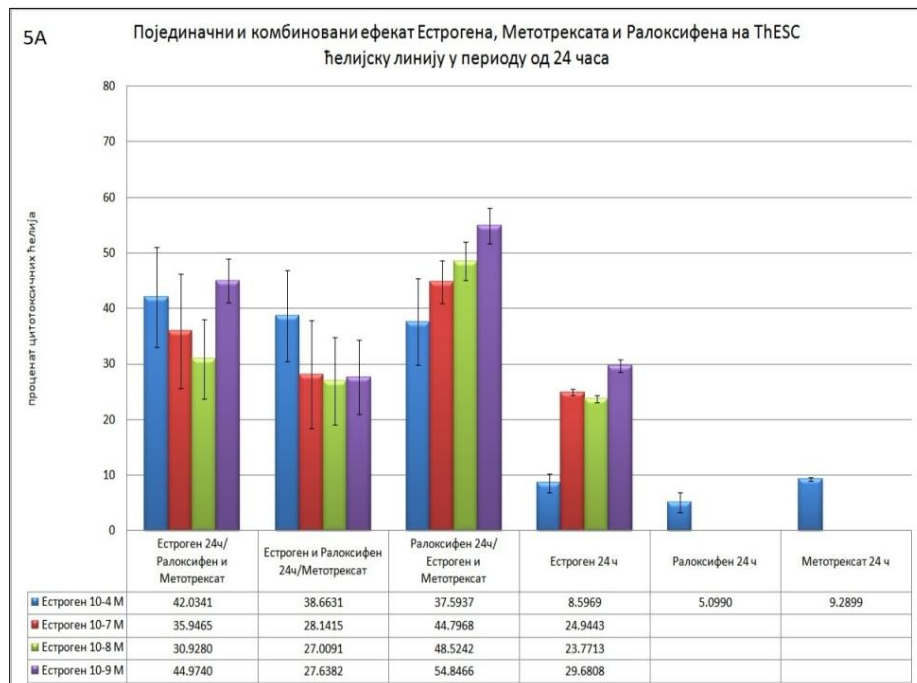
Предтретман Естрогеном у дози од 10^{-9}M у комбинацији са Метотрексатом (40.90%) и Миотрексатом (41.32%) испољава статистички значајну разлику код обе комбинације у односу на појединачни ефекат Естрогена у дози од 10^{-9}M (29.68%). Обе комбинације показују статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на појединачне ефекте Метотрксата (9.28%) и Миотрксата (6.83%).

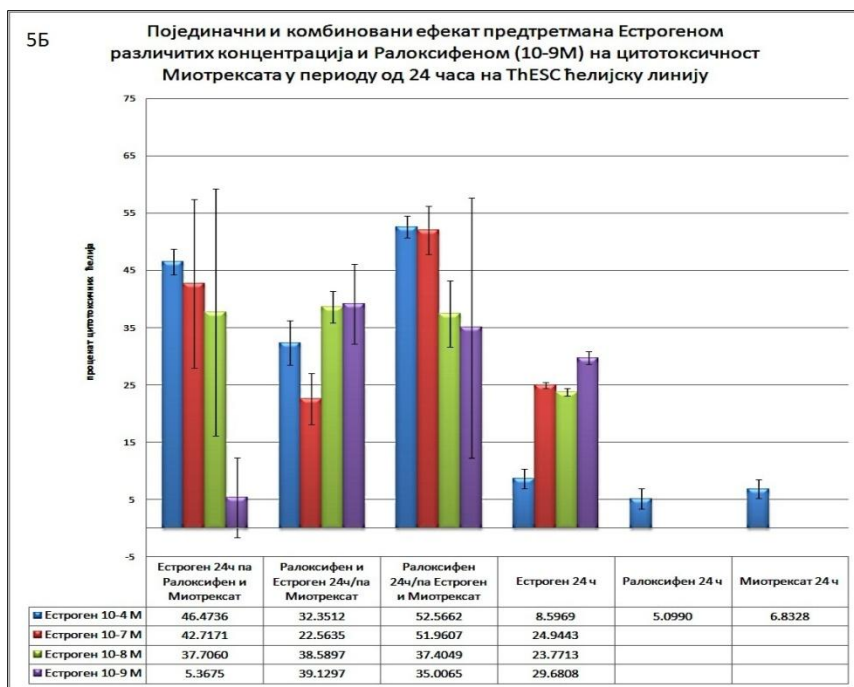
На основу ових резултата можемо закључити да предтретман различитим дозама Естрогена повећава цитотоксичност ћелија у комбинацији са Метотрексатом и Миотрексатом у односу на њихов појединачни цитотоксични ефекат, као и у односу на појединачну цитотоксичност самог Естрогена. Цитотоксичност Естрогена у комбинацији

са Метотрексатом или Миотрексатом не показује статистички значајне разлике и праћена је трендом опадања цитотоксичности у случају смањења концентрације Естрогена.

4.1.3 Појединачни и комбиновани ефекат Естрогена и Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата

Испитивањем ефекта различитих концентрација Естрогена и селективног естрогенског модулятора Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата на основу добијених МТТ резултата може се закључити да је комбинована цитотоксичност испитиваних супстанци већа у односу на њихову појединачну цитотоксичност. Различите врсте комбинације лекова на Графикону 5 А обележене су као Група 1 (Естроген 24 часа/Ралоксифен и Метотрексат), Група 2 (Естроген и Ралоксифен 24 часа/ Метотрексат) и Група 3 (Ралоксифен 24 часа/ Естроген и Метотрексат), а затим вршено је упоређивање комбинованог цитотоксичног ефекта са појединачним одговарајућим дозама Естрогена, Ралоксифена, и цитостатика.





Графикон 5. 5А) Појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Естрогена и селективног модулятора естрогенских рецептора Ралоксифена (10^{-9}M) на цитотоксичност Метотрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију у периоду од 24 часа. 5 Б) Појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Естрогена и селективног модулятора естрогенских рецептора Ралоксифена (10^{-9}M) на цитотоксичност Миотрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију у периоду од 24 часа.

На основу статистичких података добијени резултати (Графикон 5 А) указују на то да Група 1 (42.03%), 2 (38.66%) и 3 (37.59%) за дозу Естрогена од 10^{-4}M показују статистички значајне разлике у комбинованој цитотоксичности у односу на појединачни ефекат Естрогена исте дозе (8.59%), као и у односу на појединачне цитотоксичне ефекте Метотрексата (9.28%) и Ралоксифена (5.09%). У случају када су групне дозе Естрогена 10^{-7} и 10^{-8}M , статистичка значајност је испољена једино код Групе 3 (44.79% и 48.52%) у односу на појединачно дејство Естрогена 10^{-7}M (24.94% и 23.77%). У случају када је групна доза Естрогена 10^{-9}M статистичка значајност није испољена једино код Групе 2 (27.63%) у односу на појединачно дејство Естрогена 10^{-9}M (29.68%). Све испитиване групе показују висок степен статистичке значајности у односу на појединачне

цитотоксичне ефекте Метотрексата (9.28%) и Ралоксифена (5.099%). На основу добијених резултата МТТ теста и статистичке обраде података можемо закључити да највећи степен цитотоксичности, који је уједно праћен и високим степеном статистички значајне разлике, присутан је између Групе 3 у односу на појединачне и комбиноване ефекате испитиваних супстанци. Највећи степен комбиноване цитотоксичности при најмањим испитиваним концентрацијама лекова присутан је у Групи 3, предтретман Ралоксифеном 24 часа потом истовремена апликација Естрогена (10^{-9}M) и Метотрексата у фиксној дози од $1\mu\text{M}$ који износи (54.84%). Овај степен цитотоксичности већи је у односу на појединачне вредности комбинација приказаних на Графиконима 2, 3 и 4 што нам говори у прилог чињеници да предтретман Ралоксифеном (селективним модулатором естрогенских рецептора) повећава комбиновану и појединачну цитотоксичност Естрогена и Метотрексата.

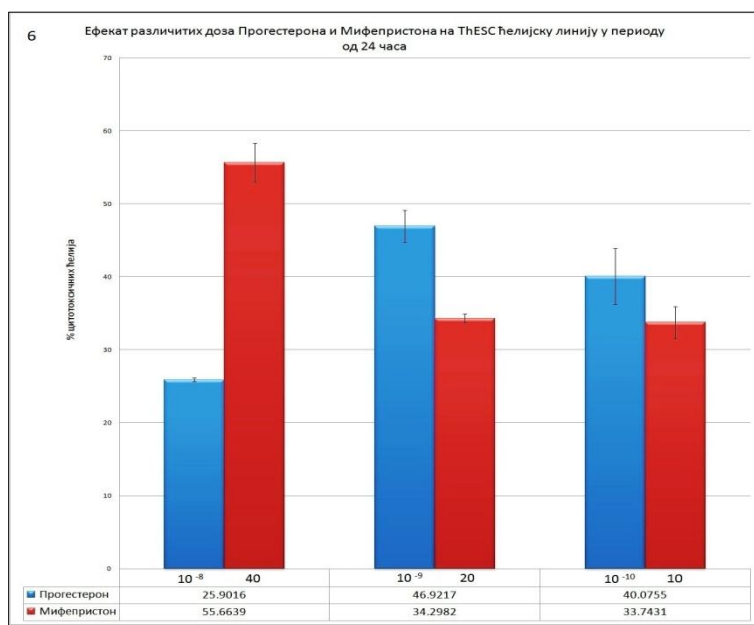
Након испитивања ефекта различитих доза Естрогена и Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата, испитиван је и њихов ефекат на цитотоксичност Миотрексата у дози од $1\mu\text{M}$ (**Графикон 5 Б**). Различите врсте комбинације лекова на Графикону 5Б обележене су као Група 1 (Естроген 24ч/Ралоксифен и Миотрексат), Група 2 (Естроген и Ралоксифен/ Миотрексат) и Група 3 (Ралоксифен 24 часа/ Естроген и Миотрексат) вршено је упоређивање цитотоксичног ефекта са појединачним одговарајућим дозама Естрогена. На основу обраде статистичких података добијени резултати указују на то да Групе 1, 2 и 3 за дозу Естрогена 10^{-4}M (46.47, 32.35 и 52.56 %) показују статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на појединачни ефекат Естрогена исте дозе (8.59%). У случају када су групне доза Естрогена 10^{-7} и 10^{-8}M статистичка значајност није испољена једино код Групе 2 и Групе 1 (22.56% и 37.70%) у односу на појединачно дејство Естрогена 10^{-7}M и 10^{-8}M (24.94% и 23.77%). У случају када је групна доза Естрогена 10^{-9}M статистичка значајност је испољена једино код Групе 1 (5.36%) у односу на појединачно дејство Естрогена 10^{-9}M (29.68%). Све испитиване групе показују висок степен статистичке значајности у односу на појединачне ефекте Миотрексата (6.83%) и Ралоксифена (5.099%).

На основу добијених резултата можемо закључити да је највећи степен цитотоксичности уједно праћен са високим степеном статистички значајне разлике између Групе 3 и појединачних ефеката испитиваних супстанци. На основу добијених резултата као и на Графикону 5 А можемо закључити да је највећи степен

цитотоксичности уједно праћен са високим степеном статистички значајне разлике између Групе 3 и појединачних ефеката испитиваних супстанци.

4.1.4. Појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Прогестерона и Мифепристона на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у периоду од 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију

Након испитивања ефекта различитих доза Естрогена и Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата, следећом групом експеримената користећи МТТ тест проучаван је појединачни и комбиновани ефекат различитих доза Прогестерона и Мифепристона на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата током 24 часа на ThESC ћелијској линији. Као и за Естроген и Ралоксифен, најпре је испитиван појединачни ефекат различитих доза Прогестерона и Мифепристона на вијабилност ендометријалне ћелијске линије (Графикон 6). Испитиване дозе за Прогестерон су 10^{-4} , 10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10} М, док за Мифепристон су 60, 40, 20 и $10\mu\text{M}$ у периоду од 24 часа. Након третмана ћелија појединачним различитим дозама Прогестерона и Мифепристона урађен је МТТ тест помоћу кога је израчунат проценат мртвих ћелија 24 часа након третмана испитиваним супстанцама.



Графикон 6. Цитотоксични ефекат различитих доза Прогестерона и Мифепристона на ThESC ћелијску линију у периоду од 24 часа. Група 1 представљена је највишим испитиваним концентрацијама Прогестерона 10^{-8} М и Мифепристона 40 μ М; Група 2: Прогестерон 10^{-9} М и Мифепристон 20 μ М и Група 3: Прогестерон 10^{-10} М и Мифепристон 10 μ М.

Након достизања конfluентности ћелија од 85%, пребацивањем у 96 плочу, ћелије су третиране користећи следеће концентрације испитиваних супстанци. За Прогестерон (10^{-8} М, 10^{-9} М и 10^{-10} М), Мифепристон (40, 20 и 10 μ М) (**Графикон 6**).

Након третмана ћелија испитиваним супстанцама, коришћењем МТТ теста одређиван је цитотоксични ефекат испитиваних супстанци на вијабилност ћелија. Резултати добијени МТТ тестом који су приказани на Графикону 6 указују на то да Прогестерон и Мифепристон показују различит ефекат на цитотоксичност ћелија при ниским и високим концентрацијама у току 24 часа. Концентрације испитиваних супстанци биле су следеће: за Прогестерон (10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10} М) и за Мифепристон (40, 20 и 10 μ М). Добијени резултати указују на то да Мифепристон показује дозну зависност (за дозу од 40 μ М цитотоксичност је 55.66%; за 20 μ М је 34.29% и за 10 μ М је 33.74%) што није случај са Прогестероном (за 10^{-8} је 25.90% , за 10^{-9} је 46.92% и за 10^{-10} М је 40.07 %) као и то да при најнижим испитиваним концентрацијама однос цитотоксичног дејства између Прогестерона и Мифепристона иде у прилог Прогестерона (Прогестерон 40.075%, а Мифепристон 33.74%).

Статистичком обрадом резултата добијених МТТ тестом, приметно је постојање статистички значајне разлика у комбинованој цитотоксичности Група 1 и 2 у односу на појединачни цитотоксични ефекат Прогестерона и Мифепристона. За Групу 1 $p < 0.05$ ($p = 0.03$) и за Групу 2 $p = 0.01$ што указује на висок степен статистичке значајности између цитотоксичног ефекта испитиваних супстанци. У групи 3 (Прогестерон 10^{-10} М и Мифепристон 10 μ М) статистичком обрадом података добијени резултати указују на то да у овој групи не постоји статистички значајна разлика у цитотоксичном дејству између испитиваних супстанци ($p = 0.069$).

Након испитивања појединачног цитотоксичног дејства различитих доза Прогестерона и Мифепристона на ендометријалну стромалну ћелијску линију, испитиван

је утицај различитих доза Прогестерона на цитотоксичност Мифепристона и обрнуто (утицај Мифепристона на цитотоксичност Прогестерона).

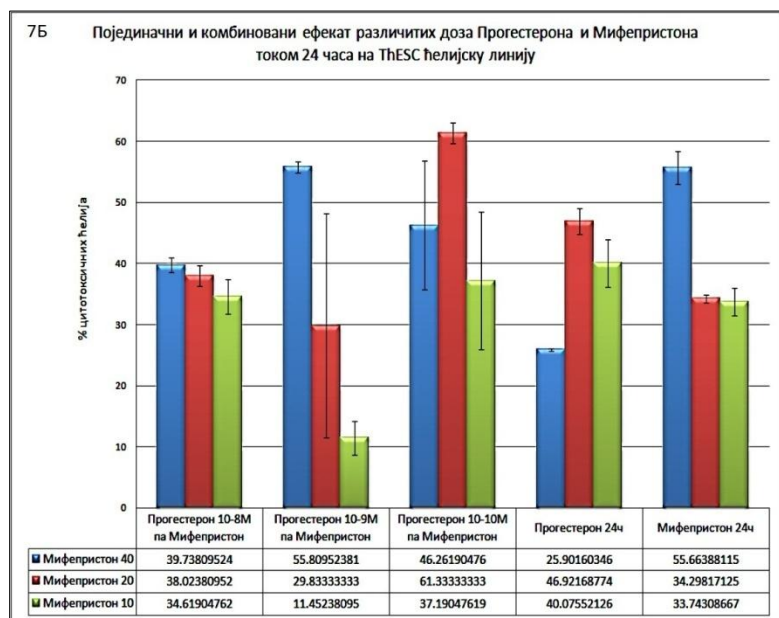
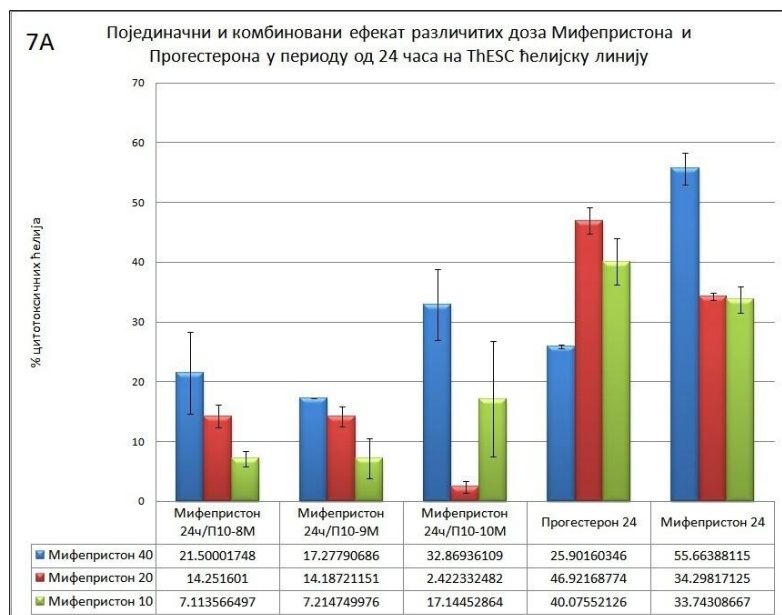
Резултати предтретмана Прогестероном и Мифепристоном приказани су на **Графикону 7 А** и **7 Б**.

Група 1 на Графикону 7А представљена је комбинацијама различитих доза Мифепристона 24 часа/Прогестерон 10^{-8} М са показаном цитотоксичношћу од 21.50%, 14.25% и 7.11 %, група 2: различите дозе Мифепристона 24 часа/Прогестерон 10^{-9} М (17.27%, 14.18% и 7.21%) и Група 3: различите дозе Мифепристона 24 часа/Прогестерон 10^{-10} М (32.86, 2.42 и 17.14%). На основу резултата МТТ теста и статистичке обраде података вршено је упоређивање и утврђивање постојања статистички значајне разлике у цитотоксичном дејству између Групе 1, 2 и 3 у односу на одговарајуће појединачне дозе Прогестерона и Мифепристона.

Добијени резултати показују постојање статистички значајне разлике у комбинованој цитотоксичности у групама 1, 2 и 3 у односу на појединачне тј. одговарајуће дозе Прогестерона (Група 1 је поређена са појединачним дејством Прогестерона концентрације 10^{-8} М, Група 3 је поређена са појединачним дејством Прогестерона концентрације 10^{-9} М.) при чему је у свим комбинацијама $p < 0.05$.

Следеће поређење у цитотоксичном ефекту вршено је између Група 1, 2 и 3 (**Графикон 7А**) са дозама Мифепристона од 40 μ М (21.50, 17.27 и 32.86 %), 20 μ М (14.25, 14.18 и 2.42%) и 10 μ М (7.11, 7.21 и 17.14%) у односу на појединачни ефекат Мифепристона у току 24 часа 40 μ М (55.66%), 20 μ М (34.29%) и 10 μ М (33.74%). Статистичком обрадом добијених података резултати указују на постојање статистичке сигнификантности у цитотоксичном ефекту између Група 1, 2 и 3 у односу на одговарајуће дозе Мифепристона ($p < 0.05$).

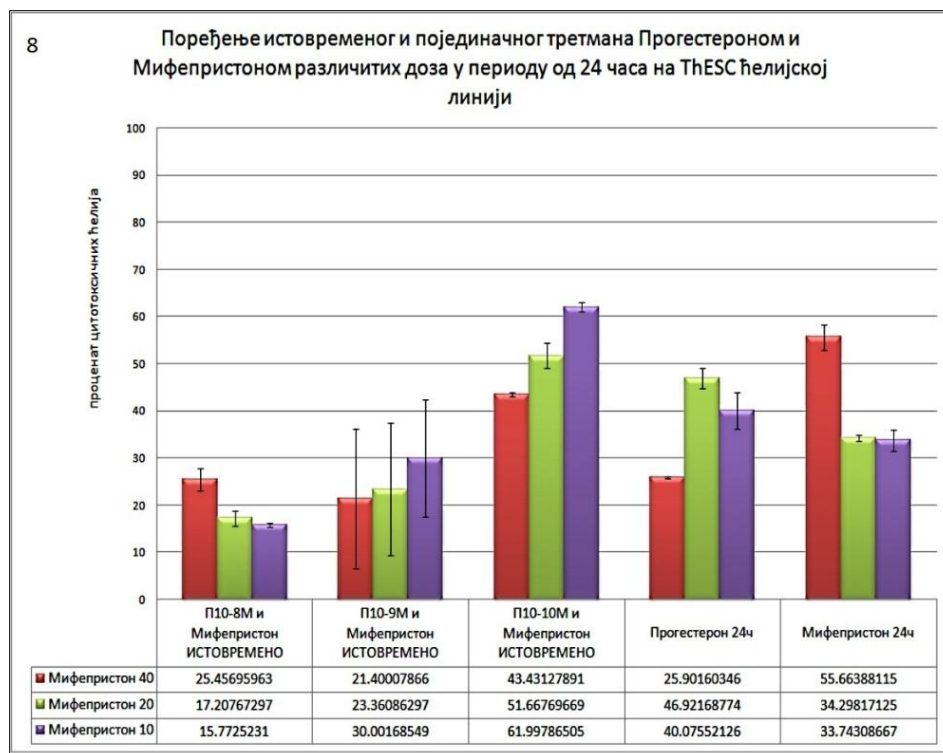
На основу добијених резултата можемо закључити да предтретман Мифепристоном па Прогестероном у различитим концентрацијама статистички значајно смањује цитотоксично дејство у односу на цитотоксични ефекта који показују различите концентрације Прогестерона и Мифепристона када се примене сами.



Графикон 7. 7 А). Појединачни и комбиновани ефекат предтретмана различитим дозама Мифепристона потом Прогестерона у периоду од 24 часа на ThESC ћелијску линију. Група 1 на Графикону 7А. представљена је комбинацијама различитих доза Мифепристона (40, 20 и 10 μ М) 24 часа/Прогестерон 10⁻⁸ М (21.50, 14.25 и 7.11 %), Група 2 различите дозе Мифепристона (40, 20 и 10 μ М) 24 часа/Прогестерон 10⁻⁹ М (17.27, 14.18 и 7.21%) и Група 3 различите дозе Мифепристона (40, 20 и 10 μ М) 24 часа/Прогестерон 10⁻¹⁰ М (32.86, 2.42 и 17.14%). 7 Б) Појединачни и комбиновани ефекат предтретмана

различитим дозама Прогестерона потом Мифепристона у периоду од 24 часа на ThESC ћелијску линију. Група 1 на Графикону 7Б. представљена је комбинацијом Прогестерон 10^{-8} М/Мифепристон (40, 20 и $10\mu\text{M}$) током 24 часа (39.73, 38.02 и 34.61 %), Група 2 комбинацијом Прогестерон 10^{-9} М/Мифепристон (40, 20 и $10\mu\text{M}$) током 24 часа (55.80, 29.83 и 11.45%), и Група 3 комбинацијом Прогестерон 10^{-10} М/Мифепристон (40, 20 и $10\mu\text{M}$) током 24 часа (46.26, 61.33 и 37.19%).

Статистичком обрадом података који су приказани на **Графикону 7Б.** вршено је упоређивање цитотоксичног ефекта Групе 1 (различите дозе Мифепристона са Прогестероном 10^{-8} М) најпре у односу на појединачну цитотксичност Прогестерона 10^{-8} М (25.90%) при чему је утврђено присуство статистички значајне разлике у цитотоксичном ефекту између Групе 1 и Прогестерона 10^{-8} М ($p=0.001$, 0.01 и 0.017). Групе 2 и 3 у односу на појединачни цитотксични ефекат Прогестерона одговарајућих концентрација (Група 2/Прогестерон 10^{-9} М 24 часа и Група3/Прогестерон 10^{-10} М 24 часа) не показују статистички значајну разлику код групе 2 за концентрацију Мифепристона од $20\mu\text{M}$ ($p=0.150$) и Групу 3 за концентрацију Мифепристона од $10\mu\text{M}$ ($p=0.531$). У случају када се предтретман изврши различитим дозама Прогестерона (Графикон 7 Б) потом различитим дозама Мифепристона примећује се да је проценат цитотоксичних ћелија при истим испитиваним дозама обе супстанце мањи или исти у односу на њихово појединачно цитотоксично дејство.



Графикон 8. Ефекат истовремене примене различитих доза Прогестерона и Мифепристона на ендометријалну стромалну ћелијску линију у периоду од 24 часа. Група 1 представља Прогестерон 10^{-8} М и Мифепристон у дозама од 40, 20 и 10 μ М током 24 часа, Група 2 Прогестерон 10^{-9} М и Мифепристон у дозама од 40, 20 и 10 μ М током 24 часа и Група 3 Прогестерон 10^{-10} М и Мифепристон у дозама од 40, 20 и 10 μ М током 24 часа.

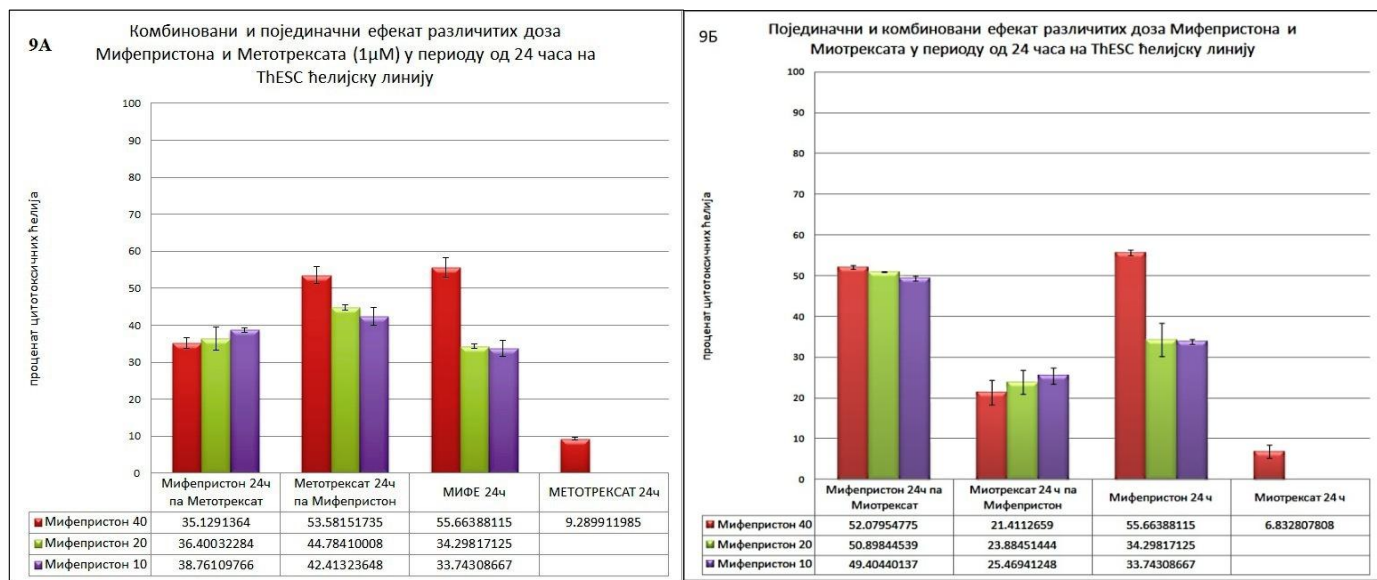
Након третмана ендометријалних стромалних ћелијских линија различитим дозама Прогестерона и Мифепристона који су додати истовремено током 24 часа коришћењем МТТ теста одређивана је комбинована цитотоксичност испитиваних супстанци у циљу утврђивања најефикасније дозе лекова која испољава највећи проценат цитотоксичности (**Графикон 8**). На основу МТТ теста и статистичком обрадом података вршено је упоређивање Групе 1 (Прогестерон 10^{-8} М и Мифепристон у дозама од 40, 20 и 10 μ М током 24 часа) са појединачном дозом Прогестерона 10^{-8} М при чему је показано и утврђено постојање статистички значајне разлика код Групе 1 за дозе Мифепристона од 20 и 10 μ М (17.20 и 15.77% $p=0.012$ и 0.001) и Прогестерона 10^{-8} М у односу на појединачно дејство Прогестерона одговарајуће дозе од 10^{-8} М (25.901%). Група 1 такође показује

статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на појединачне различите дозе Мифепристона ($p=0.002, 0.003$ и 0.000).

У случају Групе 2 (Прогестерон $10^{-9}M$ и Мифепристон у дозама од 40, 20 и 10 μM током 24) и појединачне дозе Прогестерона $10^{-9}M$ резултати МТТ теста и статистичке обраде података указују на то да не постоји статистички значајна разлика у цитотоксичном дејству поменуте Групе у односу на појединачно дејство Прогестерона $10^{-9}M$ што је и случај са различитим дозама Мифепристона.

Група 3 (Прогестерон $10^{-10}M$ и Мифепристон у дозама од 40, 20 и 10 μM током 24) у односу на појединачно дејство Прогестерона у дози од $10^{-10}M$ показује присуство статистички значајне разлике (43.43, 51.66 и 61.99 % $p=0.005, 0.0017$ и 0.001) што је и случај са различитим дозама Мифепристона. На основу добијених резултата можемо закључити да је највећи степен цитотоксичности при најнижим испитиваним концентрацијама лекова присутан у Групи 3, тј у групи у којој су дозе Прогестерона $10^{-10}M$ и Мифепристона 10 μm (61.99%) тј. да се највећи степен цитотоксичности при најнижим испитиваним дозама постиже код истовремене апликације најнижих доза Прогестерона и Мифепристона у односу на све испитиване комбинације као и у односу на њихов појединачни ефекат.

Графикон 9. 9 А). Комбиновани и појединачни ефекат различитих доза Мифепристона и



Метотрексата (1 μM) у периоду од 24 часа на ThESC ћелијску линију. 9 Б). Комбиновани и појединачни ефекат различитих доза Мифепристона и Миотрексата (1 μM) у периоду од 24 часа на ThESC ћелијску линију.

Следећим МТТ тестом (**Графикон 9**) вршено је утврђивање ефекта предтретмана различитих доза Мифепристона на цитотоксичност Метотрексата (Графикон 9А) и Миотрексата (Графикон 9Б) који су коришћени у фиксним концентрацијама од 1 μM током 24 часа. Након третмана ћелија испитиваним супстанцама, коришћењем МТТ теста одређивана је цитотоксичност испитиваних супстанци у циљу утврђивања најмање дозе лекова која испољава највећи проценат цитотоксичности.

На **Графикону 9 А** приказани су резултати МТТ теста у коме је испитиван ефекат различитих доза Мифепристона на цитотоксичност Метотрексата. Резултати МТТ теста и статистичке обраде података показују да Група 1 (Мифепристон различитих концентрација па Метотрексат) (35.12%, 36.40 % и 38.76%) показују статистички значајну разлику у цитотоксичности у односу на групу 2 (Метотрексат у фиксној дози праћен различитим дозама Мифепристона; 53.58, 44.78 и 42.41%), док у односу на цитотоксичност појединачних доза Мифепристона не показује статистички значајну разлику (55.66, 34.29 % и 33.74%) при чему је p за даде Групу 1 $p=0.000$. Група 1 такође показује статистички битну разлику у цитотоксичности у односу на појединачно дејство Метотрексата (9.28%). У Групи 2 једина статистички битна разлика у односу на појединачну дозу Мифепристона од 20 μM присутна је код комбинације Метотрексат 24 часа потом Мифепристон 20 μM и она износи $p=0.001$. Група 2 такође показује присуство статистички значајне разлике у односу на појединачну вредност цитотоксичности Метотрексата (9.289).

Добијени резултати указују на то да се цитотоксични ефекат повећава у случају када се предтретман обави најпре Метотрексатом а потом Мифепристоном различитих концентрација.

Ефекат комбиноване, истовремене и појединачне примене различитих доза Мифепристона и Миотрексата (1 μM) на степен цитотоксичности ендометријалних стромалних ћелија приказан је на **графикону 9 Б**. У случају комбинација Мифепристон па Миотрексат (Група 1) и Миотрексат па Мифепристон (Група 2) статистичка обрада

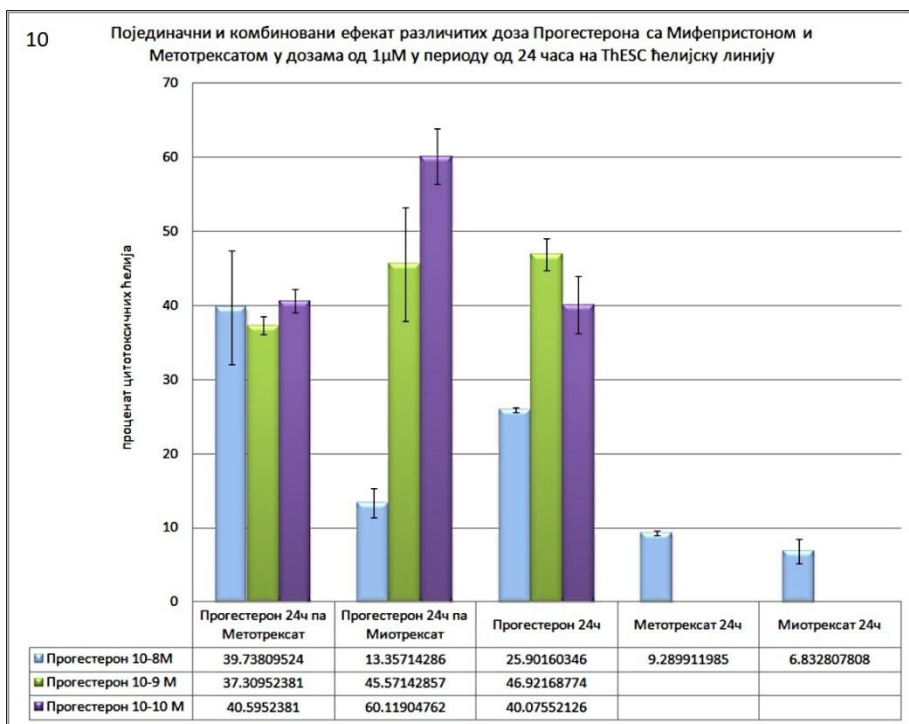
података указује на то да постоји разлика између цитотоксичног ефекта у обе групе (Мифепристон па Миотрексат 52.07, 50.89 и 49.40% и Миотрексат па Мифепристон 21.41, 23.88 и 25.46%) у односу на појединачно дејство Миотрексата (6.83%). Група 1 у односу на појединачне различите дозе Мифепристона испољава статистички значајну разлику у смислу повећања цитотоксичности, док Група 2 показује статистички значајну разлику у смислу смањења цитотоксичности у односу на појединачне ефекте Мифепристона. На основу добијених резултата можемо закључити да предтретман Мифепристомом потом Миотрексатом повећава цитотоксичну ефикасност у односу на појединачни ефекат испитиваних лекова.

Добијени резултати указују на то да се цитотоксични ефекат испитиваних супстанци повећава у оба случаја, али највећи проценат цитотоксичних ћелија при свим, укључујући и најмање дозе Мифепристона присутан је на Графикону 9Б код кога је предтретман ендометријалних стромалних ћелија вршен различитим дозама Мифепристона 24 часа потом фиксном дозом Миотрексата.

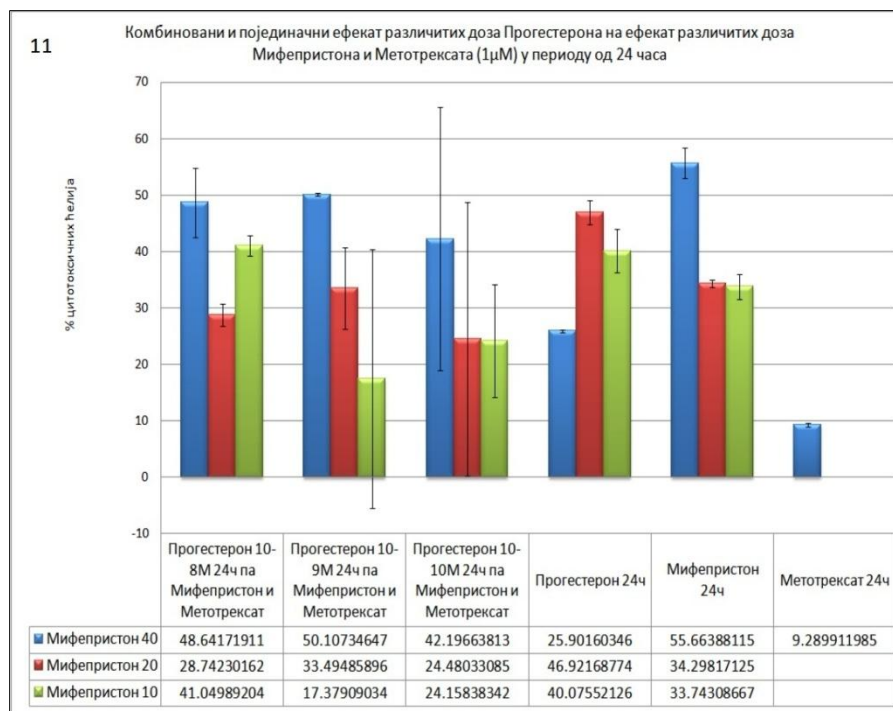
Поред испитивања ефекта различитих комбинација Мифепристона на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у дозама од 1 μ М, испитиван је и ефекат различитих доза Прогестерона на цитотоксичност поменутих супстанци. Резултати су приказани на **Графикону 10**. Група 1 (Прогестерон па Метотрексат) и Група 2 (Прогестерон па Миотрексат).

Коришћењем резултата добијених МТТ тестом као и статистичком обрадом података, резултати указују на то да Група 1 и Група 2 показују статистички значајну разлику у односу на појединачно дејство Метотрексата и Миотрексата, међутим у односу на појединачне дозе Прогестерона, статистички значајна разлика није присутна једино у случају када је у Групама 1 и 2 Прогестерон у дози од 10⁻⁹М.

На основу ових резултата можемо закључити да Прогестерон примењен у испитиваним дозама повећава цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата. Најефикаснија комбинација која при најмањим дозама испитиваних лекова постиже највећи степен цитотоксичности (60.11%) резервисана је за Групу 2 (Прогестерон 24ч праћен Миотрексатом).



Графикон 10. Ефекат различитих доза Прогестерона на цитотоксичност Метотрексата (1 μ М) и Миотрексата (1 μ М) на ThESC ћелијској линији у периоду од 24 часа. Група 1 представљена је различитим дозама Прогестерона током 24 часа потом Метотрексатом у дози од 1 μ М и Група 2 представљена је различитим дозама Прогестерона током 24 часа потом Миотрексатом у дози од 1 μ М.

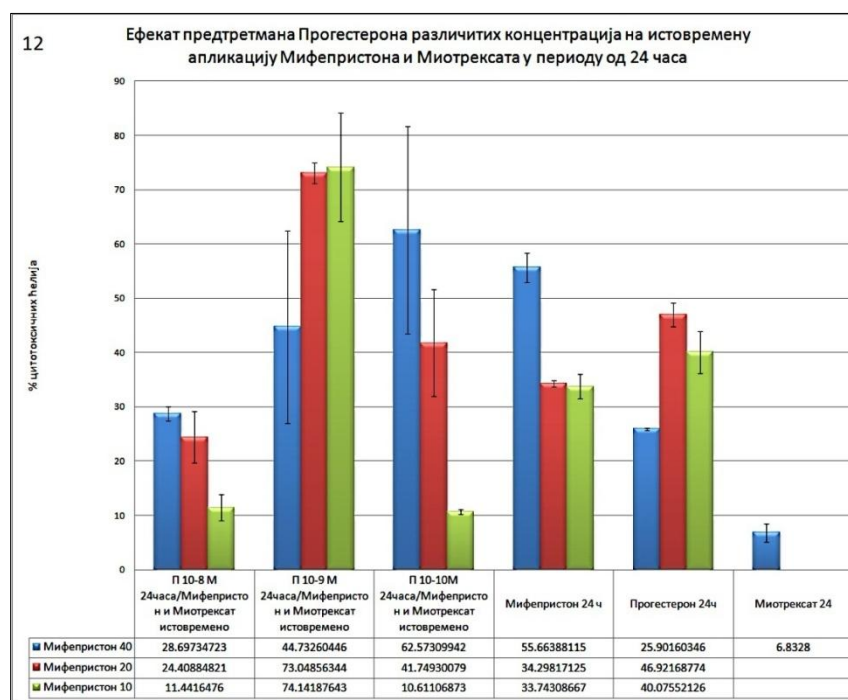


Графикон 11. Комбиновани и појединачни ефекат различитих доза Прогестерона на истовремену примену Мифепристона различитих доза и Метотрексата (1 μ M) у ендометријалној стромалној ћелијској линији. Група 1 представљена је предтретманом Прогестероном у дози од 10⁻⁸M током 24 часа након чега је уследио третман различитим дозама Мифепристона и фиксном дозом Метотрексата; Група 2 представљена је предтретманом Прогестероном у дози од 10⁻⁹M током 24 часа након чега је уследио третман различитим дозама Мифепристона и фиксном дозом Метотрексата и Група 3 представљена је предтретманом Прогестероном у дози од 10⁻¹⁰M током 24 часа након чега је уследио третман различитим дозама Мифепристона и фиксном дозом Метотрексата.

Следећим МТТ тестом испитиван је ефекат предтретмана различитим дозама Прогестерона на истовремени комбиновани ефекат различитих доза Мифепристона и фиксне дозе Метотрексата у циљу проналаска најефикасније дозе комбинације ових лекова која испољава највећи степен цитотоксичности на ендометријалну стромалну ћелијску линију у периоду од 24 часа (**Графикон 11**).

На Графикону 11. приказани су резултати МТТ теста у коме је испитиван ефекат различитих доза Прогестерона на цитотоксичност истовремене примене Мифепристона и

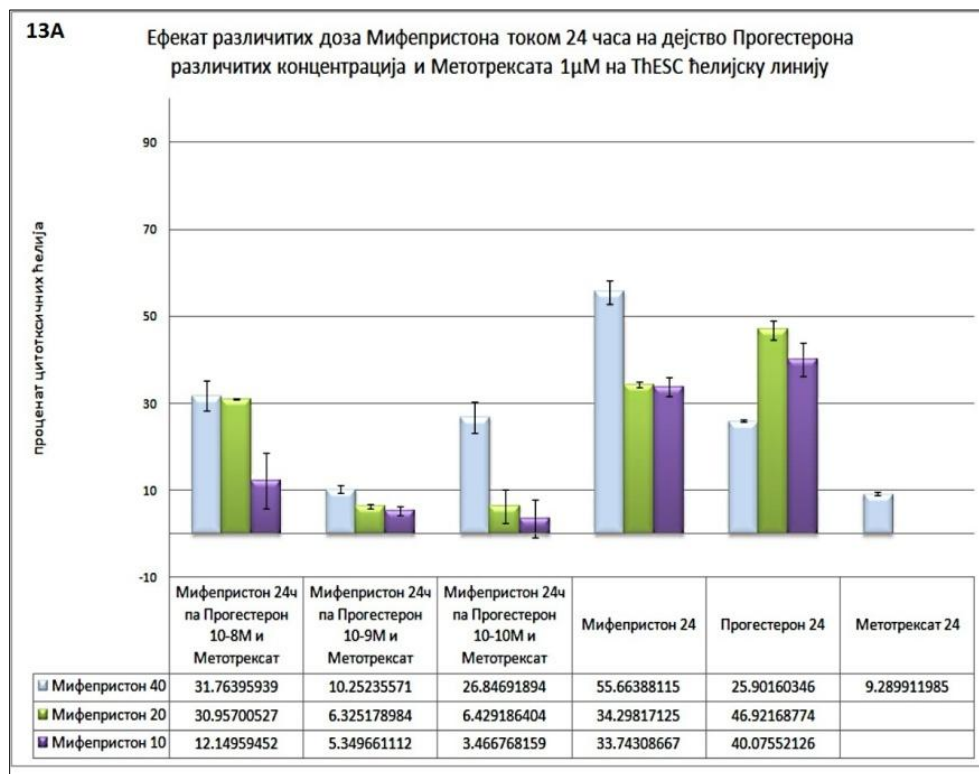
Метотрексата. На основу резултата приказаних на Графикону 11, примећујемо да не постоји статистички значајна разлика у цитотоксичности код Групе 1 (комбинација у којој је доза Прогестерона 10^{-8}M 48.64%) у односу на појединачну цитотоксичност Мифепристона и Прогестерона (55.66 и 25.90%). Цитотоксичност свих комбинација у односу на појединачну цитотоксичност Метотрексата је статистички значајно већа. На основу добијених резултата и статистичком обрадом истих може се закључити да предтретман различитим дозама Прогестерона не мења у многоме цитотоксичност испитиваних комбинација у односу на појединачне ефекте испитиваних лекова.

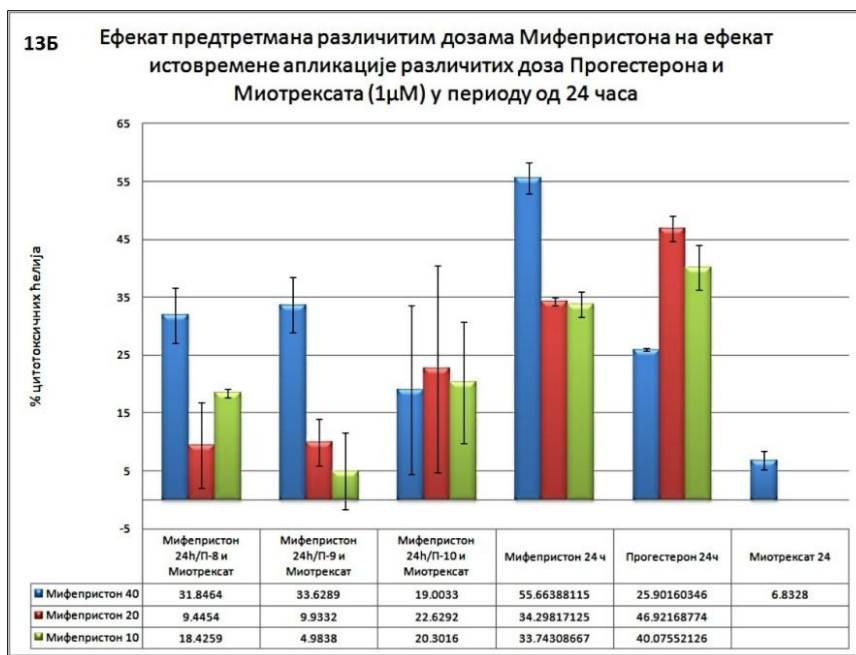


Графикон 12. Комбиновани и појединачни ефекат различитих доза Прогестерона на истовремену примену Мифепристона различитих доза и Миотрексата ($1\mu\text{M}$) на ендометријалној стромалној ћелијској линији. Група 1 представљена је предтретманом Прогестероном у дози од 10^{-8}M током 24 часа након чега је уследио третман различитим дозама Мифепристона и фиксном дозом Миотрексата; Група 2 представљена је предтретманом Прогестероном у дози од 10^{-9}M током 24 часа након чега је уследио третман различитим дозама Мифепристона и фиксном дозом Миотрексата и Група 3

представљена је предтретманом Прогестероном у дози од 10^{-10} М током 24 часа наком чега је уследио третман различитим дозама Мифепристона и фиксном дозом Миотрексата.

На **Графикону 12**, приказани су резултати МТТ теста у коме је испитиван ефекат Прогестерона на цитотоксичност истовремене примене Мифепристона и Миотрексата. На основу резултата приказаних на Графикону 12 и њихове статистичке обраде најефикаснија комбинација која показује статистички значајно повећање цитотоксичности у односу на остале комбинације као и појединачне цитотоксичности испитиваних супстанци представља Група 2 (комбинација Прогестерон 10^{-9} М/Мифепристон и Миотрексат истовремено, 44.73, 73.04 и 74.14%). Ова група такође показује и највећи степен цитотоксичности који је постигнут при најнижим концентрацијама испитиваних лекова.





Графикон 13. А. Ефекат предтретмана различитим дозама Мифепристона током 24 часа на дејство истовремене апликације различитих доза Прогестерона и Метотрексата у дози од 1 μ М.

Следећим МТТ тестом утврђиван је ефекат појединачне примене различитих доза Мифепристона као и комбиновани ефекат истовремене примене различитих доза Мифепристона и Прогестерона на цитотоксичност Миотрексата. Појединачним и комбинованим предтретманима Мифепристоном и његовом комбинацијом са Прогестероном у раличитим концентрацијама коришћењем МТТ теста испитивано је да ли постоји промена у степену цитотксичности уколико се врше комбиновани предтретмани. Циљ овог као и осталих комбинованих експеримената базиран је на проналаску идеалне комбинације поменутих лекова који при најнижим испитиваним концентрацијама узрокују највећи степен цитотоксичности у односу на појединачну цитотоксичност испитиваних супстанци.

На **Графикону 13 А.** Комбинације су подељене на следећи начин: Група 1 (Мифепристон различитих доза 24 часа потом Прогестерон у дози од 10-8М и Метотрексат 1 μ М); Група 2 (Мифепристон различитих доза 24 часа потом Прогестерон у дози од 10-9М и Метотрексат 1 μ М) и Група 3 (Мифепристон различитих доза 24 часа потом Прогестерон у дози од 10⁻¹⁰М и Метотрексат 1 μ М). Резултати добијени

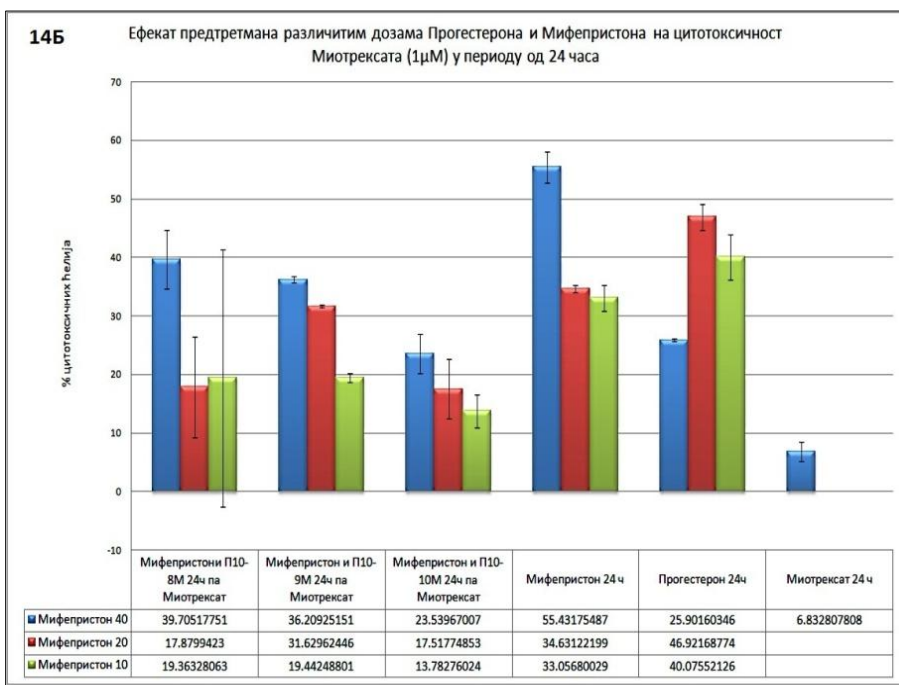
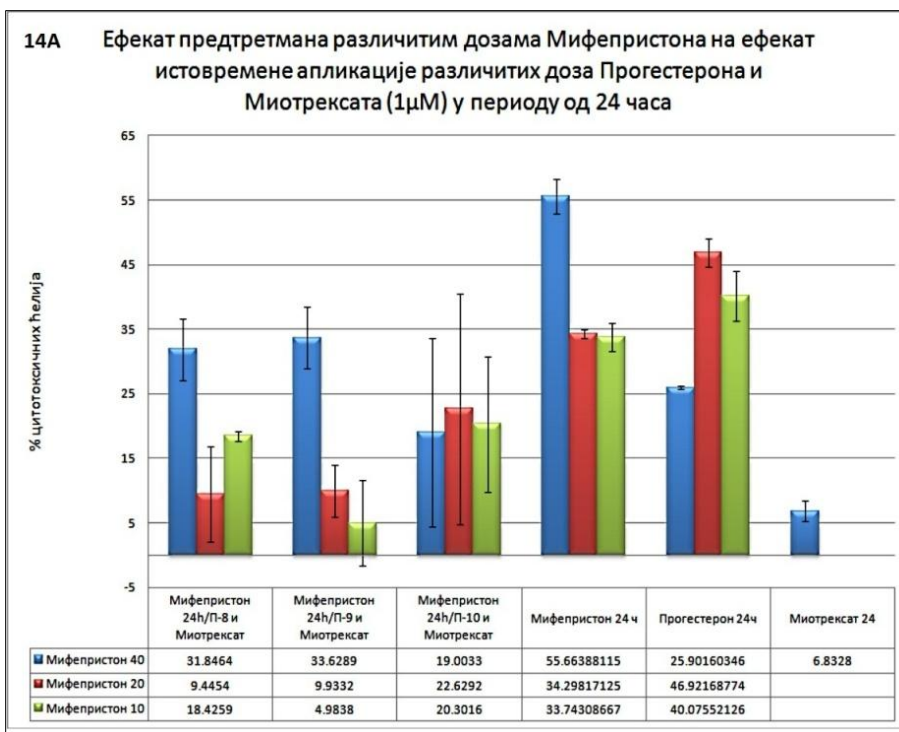
коришћењем МТТ теста и статистичке обраде података указују на то да постоји статистички значајна разлика између цитотоксичности Метотрексата у дози од 1 μ М у односу на Групе 1 и 3 ($p < 0.05$) док не постоји разлика у односу на цитотоксичност Групе 2 и појединачни ефекат Метотрексата. За Групе 2 и 3 добијени резултати показују постојање статистички значајне разлике у цитотоксичности у односу на одговарајуће појединачне дозе Мифепристона ($p < 0.05$). Статистичком обрадом података за Групу 1, 2 и 3 присутна је статистички значајна разлика у цитотоксичном ефекту свих група у односу на појединачне дозе Прогестерона ($p < 0.05$).

На основу свих добијених резултата можемо закључити да предтретман различитим дозама Мифепристона праћен третманом Прогестероном различитих доза и Метотрексата у фиксној дози статистички значајно смањује цитотоксичност у односу на појединачне ефекте испитиваних супстанци.

У случају када се предтретман врши истовременом апликацијом различитих доза Мифепристона и Прогестерона (**Графикон 13 Б**) распоред група је исти као у предходним графиконима, обрадом података примећено је да Група 1 (31.84, 9.44 и 18.42%) показује статистички значајну разлику у односу на цитотоксичност различитих доза Мифепристона, и појединачних доза Миотрексата и Прогестерона у дози од 10⁻⁸М ($p < 0.05$). У Групи 2 статистичка значајност ($p < 0.05$) је присутна у односу на појединачну дозу Прогестерона 10⁻⁹М, свих доза Мифепристона али не и у односу на Миотрексат. Дозе из Групе 2 које не показују статистички значајну разлику у односу на појединачни ефекат Миотрексата показују следеће цитотоксичности- 9.93 и 4.98%.

За Групу 3 не постоји статистички значајна разлика у односу на појединачне ефекте испитиваних супстанци.

Свеобухватна анализа Графикона 13 као и **Графикона 14** говори у прилог чињеници да предтретмани различитим дозама Мифепристона (самостално) и Мифепристон-Прогестерон, смањују цитотоксичност у односу на појединачни ефекат испитиваних супстанци.

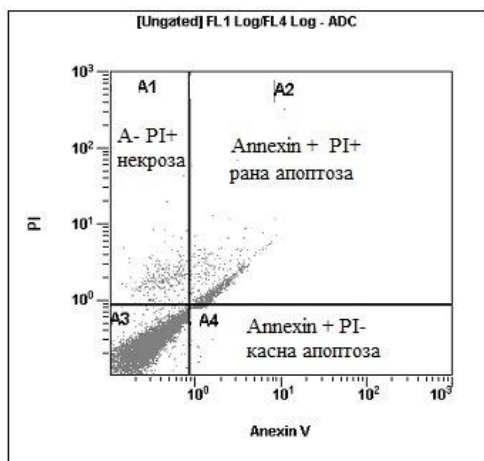


Графикон 14. А.) Ефекат предтретмана различитим дозама Мифепристана током 24 часа на дејство истовремене апликације различитих доза Прогестерона и Миотрексата у дози од 1 μ М. **Б.)** Ефекат предтретмана различитим дозама Мифепристана и Прогестерона током 24 часа на цитотоксичност Миотрексата у дози од 1 μ М.

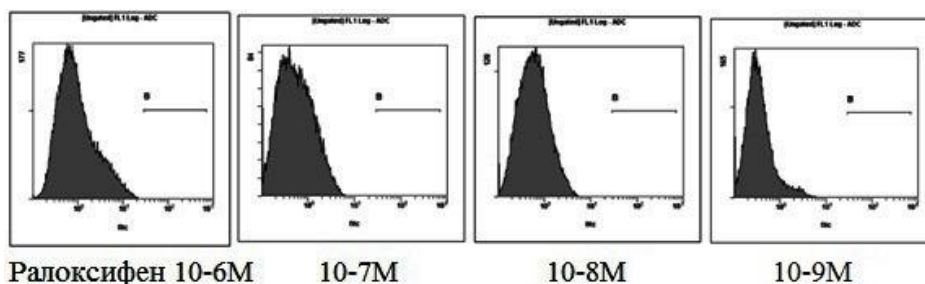
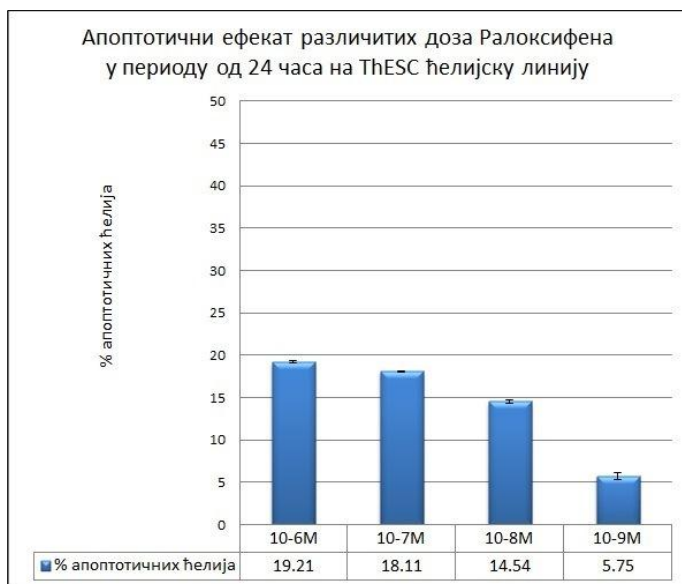
4.1.5. Естроген, Ралоксифен, Метотрексат и Миотрексат индукују апоптозу у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија)

Пошто су добијени МТТ резултати показали да испитиване супстанце испољавају како појединачни тако и комбиовани цитотоксични ефекат на ендометријалну стромалну ћелијску линију, наредним експериментима је испитивано да ли је цитотоксичност ових супстанци у појединачном и комбинованом дејству последица некрозе или апоптозе ендометријалних стромалних ћелијских линија.

Након третирања ThESC ћелијске линије Ралоксифеном (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М), Естрогеном (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М), Прогестероном (10^{-4} , 10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10} М), Мифепристоном (60, 40, 20 и 10 μ М), Метотрексатом (16 μ М; 8 μ М; 4 μ М; 2 μ М и 1 μ М) и Миотрексатом (16 μ М; 8 μ М; 4 μ М; 2 μ М и 1 μ М) у трајању од 24 часа на 37С° у атмосфери 5%СО₂ ћелије смо бојили Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом и FACS анализом одређивали проценат апоптотичних ћелија. Приликом испитивања апоптотичног ефекта различитих концентрација испитиваних супстанци један од циљева био је и утврђивање, тачније испитивање дозе поменутих лекова која изазива апоптотични ефекат до 10% ради утврђивања, детекције, локализације протеина који су кључни за механизам апоптозе (метода Имунофлуоросценције). Процент апоптотичних ћелија одређиван је на следећи начин:



Укупна апоптоза=A2 (рана апоптоза)+A4 (касна апоптоза)

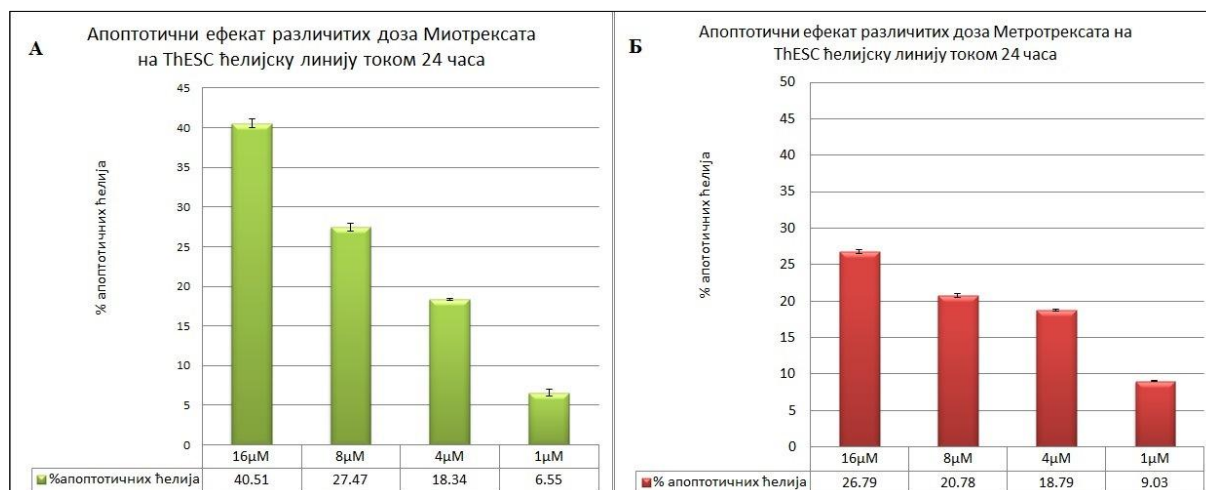


Графикон 15. Апоптотични ефекат различитих доза Ралоксифена на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5×10^5 ћелија/800 μ l) су третиране различитим концентрацијама Ралоксифена (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} M) у трајању од 24 часа на 37C° и 5%CO₂. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија. Резултати укупне ћелијске смрти представљају збир процената свих Annexin V позитивних ћелија (ћелије у раној и касној апоптози) и некротичних (Annexin V негативних ћелија) а изражени су као средње вредности 3 независна експеримената за сваку испитивану концентрацију \pm стандардна девијација (SD).

На **Графикону 15.** Коришћењем FACS анализе одређиван је апоптотични ефекат различитих доза Ралоксифена (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} M) на ThESC ћелијску линију током 24 часа. На основу резултата FACS анализе примећује се да је највећи проценат

апоптотичних ћелија присутан при највећој испитиваној концентрацији Ралоксифена 10^{-6} = 19.21% и да проценат апоптотичних ћелија опада са смањењем концентрације Ралоксифена. Најнижа испитивана концентрација Ралоксифена 10^{-9} М показује апоптотични ефекат од 5.75% од укупног броја ћелија. Резултати који су добијени FACS анализом потврђују резултате МТТ теста у којима Ралоксифен испољава дозно зависни цитотоксични ефекат на на ThESC ћелијску линију. Статистичком обрадом података показано је да најнижа испитивана доза Ралоксифена 10^{-9} М показује статистички значајну разлику у апоптотичном ефекту у односу на преостале испитиване дозе Ралоксифена.

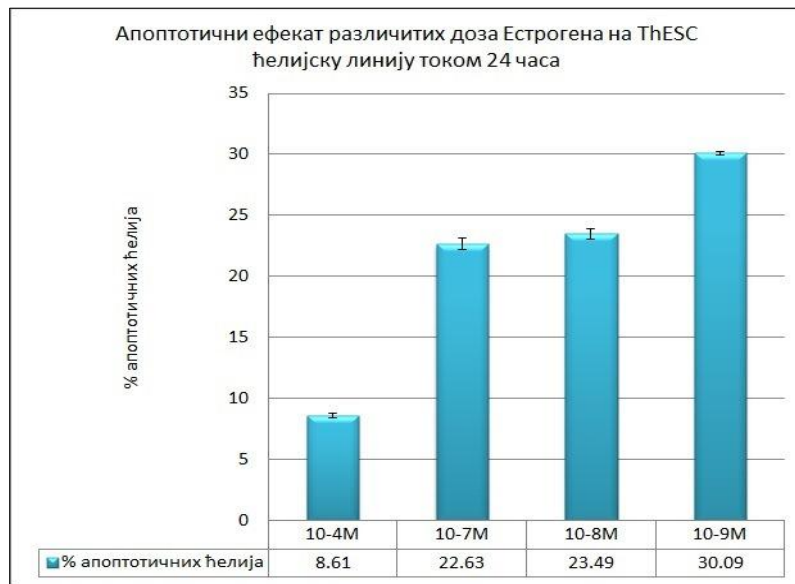
Испитивањем апоптотичног ефекта различитих доза Миотрексата и Метотрексата (Графикон 16 А и Б) коришћењем FACS анализе добијени резултати указују на то да оба испитивана лека показују дозну зависност као и то да Миотрексат при највећој испитиваној дози од 16 μ М показује апоптотични ефекат 40.51% који је статистички значајно већи ($p=0,004$) у односу на апоптотични ефекат Метотрексата исте концентрације (26.79%). Најнижи степен апоптотичног дејства показују најниже испитиване концентрације Миотрексата и Метотрексата од 1 μ М које износе 6.55% и 9.03%. Управо ове концентрације Метотрексата и Миотрексата (1 μ М) су у позитивној корелацији са резултатима МТТ теста и оне су услед изазивања најмањег оштећења ћелије биле коришћене као фиксне дозе у даљим експериментима у циљу утврђивања утицаја женских полних хормона и њихових модулатора на њихов цитотоксични и апоптотични ефекат.



Графикон 16. А и Б. Графички приказ апоптотичног ефекта различитих доза Миотрексата и Метотрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5×10^5 ћелија/800 μ л) су третиране различитим

концентрацијама Миотрексата и Метотрексата (16, 8, 4 и 1 μ M) у трајању од 24 часа на 37C° и 5%CO₂. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија.

Испитивањем апоптотичног ефекта различитих доза Естрогена (**Графикон 17**) коришћењем FACS анализе добијени резултати указују на то да Естроген не испољава дозну зависност као и то да је његов апоптотични ефекат највећи при најмањој испитиваној дози 10⁻⁹M=30.9%. Резултати који су добијени МТТ тестом потврђују резултате који су добијени FACS анализом. У циљу даљег испитивања утицаја женског полног хормона Естрогена и његовог модулятора Ралоксифена на апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата, коришћене су концентрације Естрогена које показују најнижи и највећи степен апоптотичности (10⁻⁴ и 10⁻⁹M) на ендометријалну стромалну ћелијску линију током периода од 24 часа.



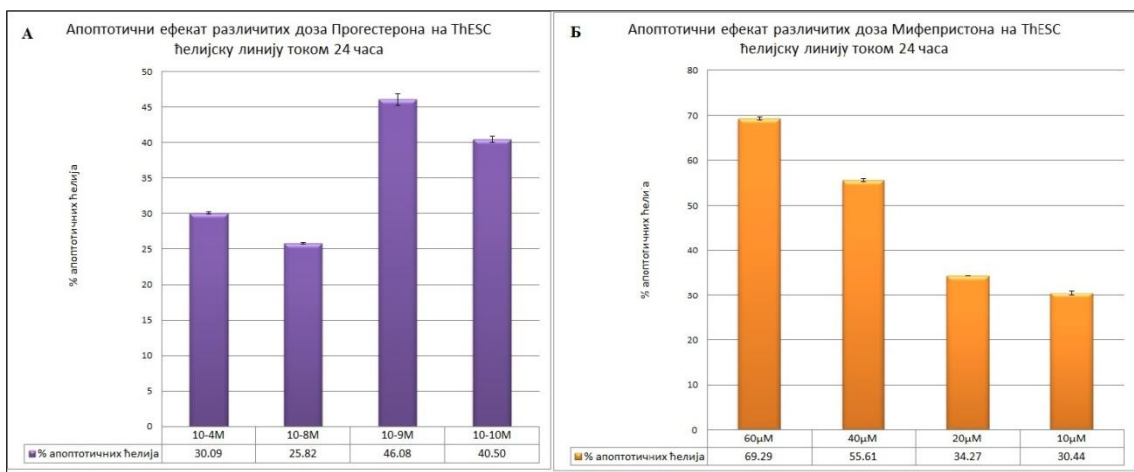
Графикон 17. Апоптотични ефекат различитих доза Естрогена на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5x10⁵ ћелија/800 μ l) су третиране различитим концентрацијама Естрогена (10⁻⁴, 10⁻⁷, 10⁻⁸ и 10⁻⁹M) у трајању од 24 часа на 37C° и 5%CO₂. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија.

Након утврђивања апоптотичног ефекта Естрогена као и његових доза које ће се користити у даљем истраживању, следеће је било утврђивање апоптотичног ефекта различитих доза Прогестерона и његовог модулятора Мифепристона у ThESC ћелијској линији након третмана од 24 часа (**Графикон 18 А и Б**).

За Прогестерон (Графикон 18 А) испитиване дозе су биле (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М) док за Мифепристон (Графикон 18 Б) испитиване дозе су биле (60, 40, 20 и 10 μ М) у трајању од 24 часа на 37C° и 5%CO₂. FACS анализом показано је да у случају Прогестерона не постоји дозна зависност и корелација са процентом апоптотичних ћелија након третмана од 24 часа. Највећи степен апоптотичног дејства присутан је у најнижој испитиваној дози Прогестерона од 10^{-10} М (49.50%), док је најнижи апоптотични ефекат био заступљен код дозе Прогестерона од 10^{-8} М (25.82%). Статистичком обрадом резултата FACS анализе показано је да постоји статистички значајна разлика у апоптотичном ефекту између доза Прогестерона од 10^{-8} и 10^{-10} М при чему су ове дозе Прогестерона коришћене у даљем испитивању његовог ефекта на цитотоксичност Миотрексата и Метотрексата.

На Графикону 18 Б приказан је апоптотични ефекат различитих доза Мифепристона на ендометријалну стромалну ћелијску линију у периоду од 24 часа. Испитиване дозе Мифепристона показују дозну зависност, при чему се највећи апоптотични ефекат постиже при дози Мифепристона од 60 μ М (69.29%). Ова доза Мифепристона која показује највеће апоптотично дејство премашује опсеге нашег предмета истраживања и изостављена је у даљим експериментима. Наиме циљ истраживања јесте тај да се испита ефекат женских полних хормона и њихових модулятора на цитотоксични и апоптотични ефекат Миотрексата и Метотрексата, при чему се користе дозе цитостатика које показују најмањи степен оштећења ћелије. Вођени овим циљем истраживања, испитује се и упоређује ефекат најнижих али и највиших концентрација женских полних хормона и њихових модулятора на апоптотични ефекат фиксних и најнижих доза Миотрексата и Метотрексата у циљу проналаaska комбинације оне концентрације лекова који појединачно не узрокују апоптозу али који при заједничкој апликацији узрокују највећи степен ћелијске смрти.

На основу добијених резултата и вођени основним циљем истраживања, користеће се дозе Мифепристона које испољавају највиши и најнижи степен ћелијске смрти - 40 (55.61%) и 10 μ М (30.44%).

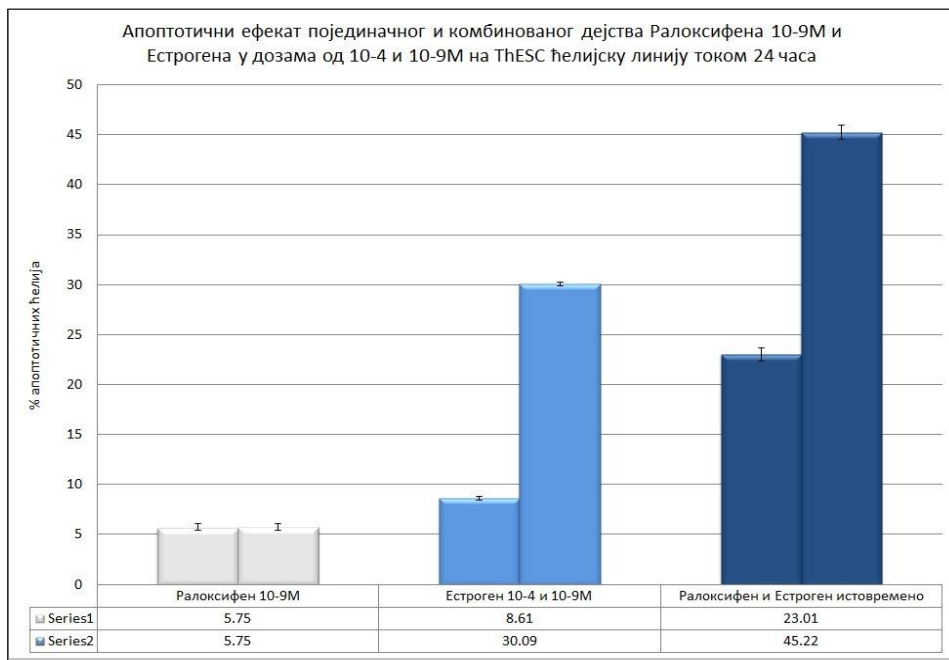


Графикон 18. А и Б) Апототични ефекат различитих доза Прогестерона и Мифепристона на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5×10^5 ћелија/800μl) су третиране различитим концентрацијама Прогестерона (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М) и Мифепристона (60, 40, 20 и 10μМ) у трајању од 24 часа на 37C° и 5%CO₂. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропиридијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апототичних ћелија.

4.1.6. Ефекат комбиноване примене Естрогена и Ралоксифена на апототичност Миотрексата и Метотрексата у ендометријалној стромалној ћелијској линији у периоду од 24 часа

У циљу утврђивања ефекта Естрогена и Ралоксифена на апототични ефекат Миотрексата и Метотрексата, FACS анализом је најпре испитан ефекат истовремене примене Естрогена (10^{-4} и 10^{-9} М) и Ралоксифена (10^{-9} М) у односу на дејство њихових појединачних доза (**Графикон 19**). Након третмана ендометријалних стромалних ћелијских линија истовременом апликацијом различитих доза Естрогена (10^{-4} и 10^{-9} М) са Ралоксифеном (10^{-9} М), добијени резултати указују на то да истовремена апликација испитиваних лекова статистички значајно повећава проценат апототичних ћелија (Естроген 10^{-4} М+Ралоксифен 10^{-9} М=23.01%) у односу на ефекат који се постиже појединачном апликацијом испитиваних супстанци (Естроген од 8.61% и Ралоксифен

5.75%) као и то да не постоји статистички значајна разлика између апоптотичног ефекта комбинованих доза и процента апоптотичних ћелија.

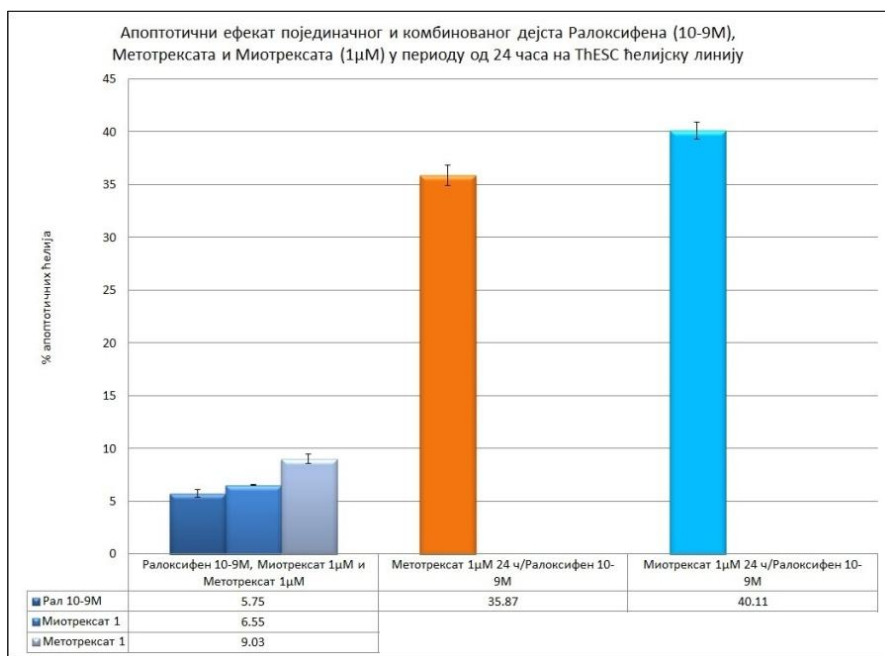


Графикон 19. Апоптотични ефекат појединачног и комбинованог дејства различитих доза Естрогена и Ралоксифена у дози од 10⁻⁹М на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5x10⁵ ћелија/800μl) су третиране различитим концентрацијама Естрогена (10⁻⁴ и 10⁻⁹М) у трајању од 24 часа на 37С° и 5%СО₂. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија.

4.1.7 Комбиновани ефекат посттретманом Ралоксифеном на апоптотични ефекат Миотрексата и Метотрексата.

Приликом испитивања ефекта Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата коришћењем МТТ теста показано је постојање повишеног цитотоксичног ефекта код комбинације Ралоксифен 10⁻⁹М 24 часа/Метотрексат 1μМ и Ралоксифен 10⁻⁹М 24/Миотрексат 1μМ у односу на појединачни ефекат испитиваних супстанци. Међутим иако постоји повећање цитотоксичног ефекта, статистички значајнији ефекат се постиже у случају када се предтретман врши најпре цитостатицима (Миотрексатом и

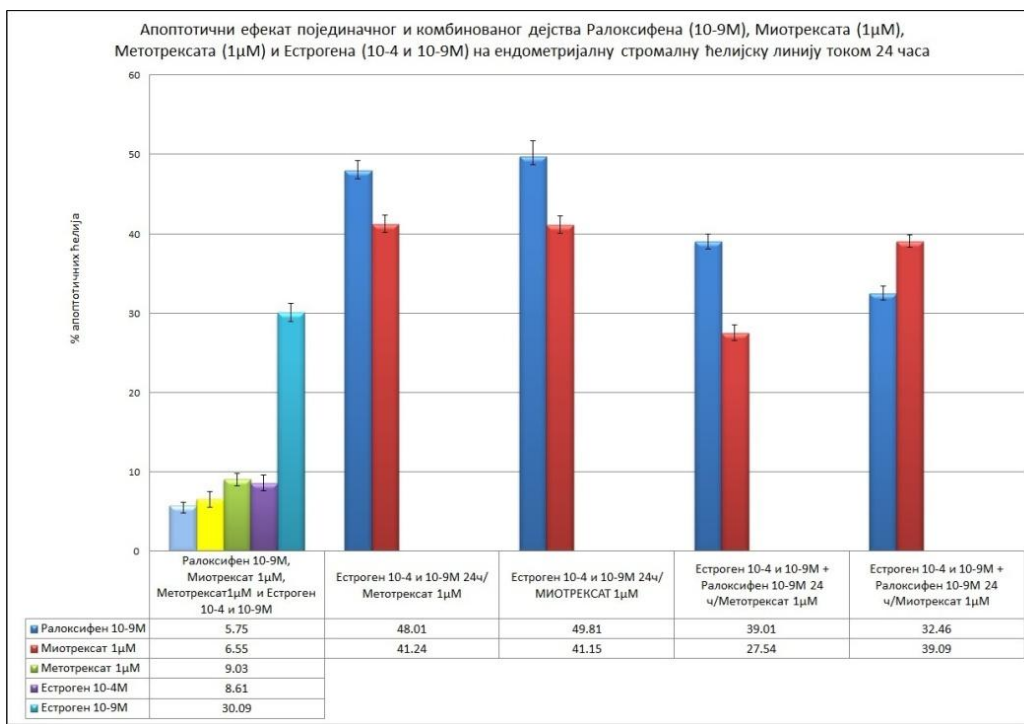
Метотрексатом) па потом Ралоксифеном. У складу са овом чињеницом, FACS анализом обухваћена је комбинација код које је одређиван апоптотични ефекат комбинација које су праћене предтретманима Миотрексатом и Метотрексатом, потом Ралоксифеном (**Графикон 20**). Добијени резултати FACS анализе потврђују и позитивно корелирају са резултатима МТТ теста. FACS анализом показано је да се најефикаснији апоптотични ефекат постиже у комбинацији Миотрексат 1 μ М 24 часа/Ралоксифен 10⁻⁹М (40.11%) у односу на појединачне ефекте испитиваних супстанци и комбинације Миотрексат 1 μ М 24 часа/Ралоксифен 10⁻⁹М (35.87%).



Графикон 20. Апоптотични ефекат појединачног и комбинованог дејства Ралоксифена, Метотрексата и Миотрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5x10⁵ ћелија/800 μ л) су третиране фиксним дозама Ралоксифена (10⁻⁹ М), Метотрексата и Миотрексата (1 μ М) у трајању од 24 часа на 37С^о и 5%СО₂. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија.

Следећи експеримент обухватио је испитивање ефекта појединачне и комбиноване примене различитих доза Естрогена (10⁻⁴ и 10⁻⁹М) и његовог модулятора Ралоксифена (10⁻⁹М) на апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата (**Графикон 21**). Обрадом

результата добијених FACS анализом примећује се да Естроген примењен у обе дозе (10^{-4} и 10^{-9} M) статистички значајно повећава и доприноси апоптотичном ефекту Метотрексата и Миотрексата у поређењу са појединачним ефектима испитиваних супстанци као и у односу на третман у коме су примењени Естроген и Ралоксифен истовремено праћени фиксним дозама Метотрексата и Миотрексата.



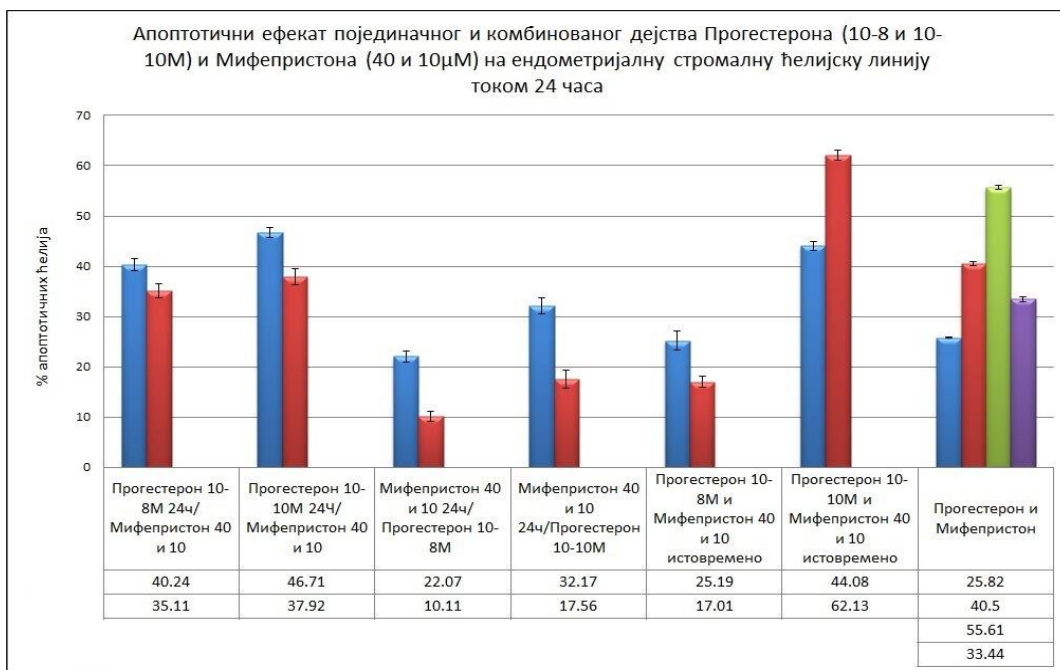
Графикон 21. Апоптотични ефекат појединачног и комбинованог дејства Ралоксифена, Метотрексата, Миотрексата и различитих доза Естрогена на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Ћелије (5×10^5 ћелија/800μl) су третиране фиксним дозама Ралоксифена (10^{-9} M), Метотрексата и Миотрексата (1μM) и Естрогена (10^{-4} и 10^{-9} M) у трајању од 24 часа на 37°C и $5\% \text{CO}_2$. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом, FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија

Добијени резултати указују на то да Естроген позитивно утиче и повећава апоптотични ефекат Миотрексата и Метотрексата, док примењен у комбинацији са Ралоксифеном то повећање степена ћелијске смрти не показује статистички значајну разлику у односу на појединачно дејство Естрогена концентрације од 10^{-9} M.

4.1.8 Појединачни и комбиновани ефекат примене различитих доза Прогестерона и његовог модулятора Мифепристона на апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата

Након испитивања ефекта појединачне и комбиноване примене различитих доза Естрогена и његовог модулятора Ралоксифена на апоптотични ефекат Миотрексата и Метотрексата, следеће испитивање обухватило је истраживање ефекта појединачне и комбиноване примене различитих доза Прогестерона и његовог модулятора Мифепристона на апоптотични ефекат Миотрексата и Метотрексата (**Графикон 22**).

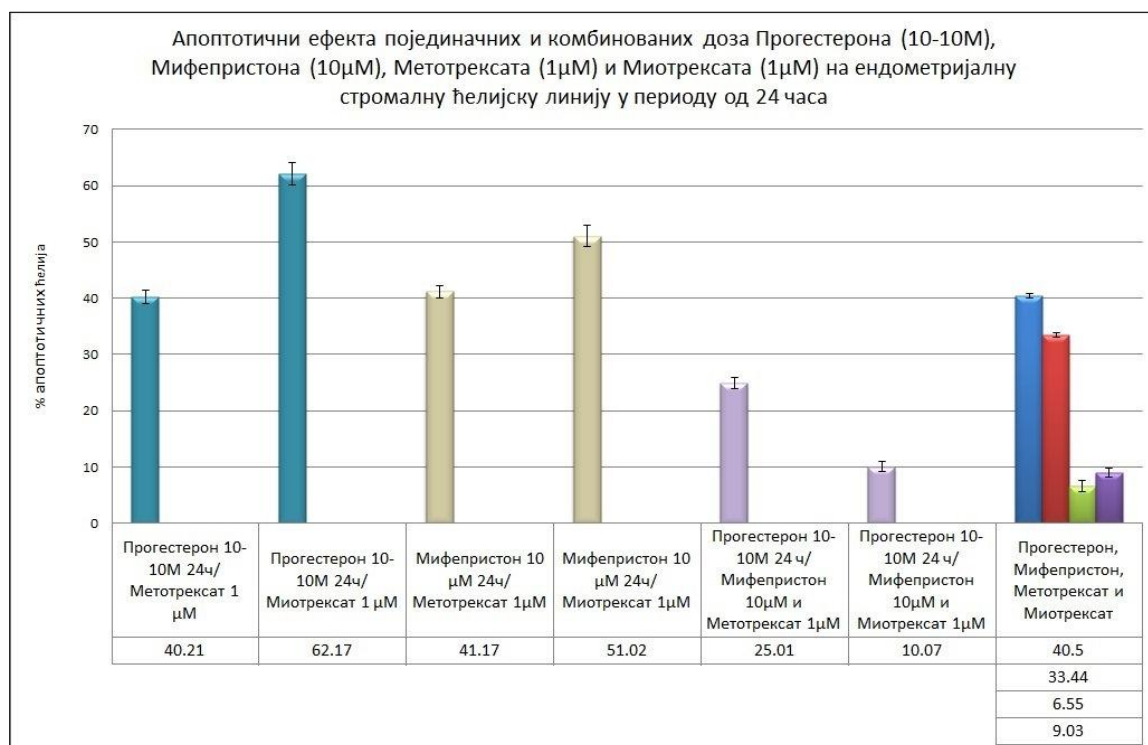
Обрадом резултата добијених након појединачне и комбиноване примене различитих доза Прогестерона и Мифепристона на апоптотичне ефекте Миотрексата и Метотрексата, на основу добијених резултата можемо закључити да се најефикаснији апоптотични ефекат постиже при најнижим испитиваним концентрацијама лекова истовременом применом Прогестерона 10^{-10} М и Мифепристона 10 μ М (62.13%). Уколико се у комбинацијама испитиваних лекова користио Мифепристон у дози од 10 μ М, примећује се смањење апоптотичног ефекта комбиноване примене лекова (10.11, 17.56 и 17.01%) у односу на појединачни ефекат Мифепристона исте концентрације (33.44%). Вредности апоптотичног ефекта у случају комбиноване примене лекова Прогестерон 10^{-8} и 10^{-10} М током 24 часа/Мифепристон 10 μ М (35.11 и 37.92%) не показују статистички значајну разлику у односу на појединачни апоптотични ефекат Мифепристона у концентрацији од 10 μ М (33.44%). Такође све испитиване комбинације лекова у којим је коришћен Мифепристон у дози од 40 μ М, показују смањење степена ћелијске смрти у односу на појединачни апоптотични ефекат Мифепристона 40 μ М (55.61%).



Графикон 22. Апоптотични ефекат појединачног и комбинованог дејства различитих доза Прогестерона (10^{-8} и 10^{-10} М) различитих доза Мифепристона (40 и $10\mu\text{M}$) на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Третман ћелија (5×10^5 ћелија/ $800\mu\text{l}$) извршен је Прогестероном у дозама од 10^{-8} и 10^{-10} М 24 часа, потом Мифепристоном у дозама 40 и $10\mu\text{M}$ и обрнуто (предтретман Мифепристоном од 40 и $10\mu\text{M}$ током 24 часа, потом Прогестероном у дозама од 10^{-8} и 10^{-10} М) на 37C° и $5\%\text{CO}_2$. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропиридијум-јодидом FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија.

Приликом испитивања ефекта Прогестерона 10^{-10} М и Мифепристона на апоптотични ефекат Миотрекстат и Метотрексата, резултати добијени FACS анализом (**Графикон 23.**) и статистичком обрадом података показују да највећи степен комбинованог апоптотичног дејства у односу на појединачно дејство испитиваних супстанци постиже се у случају када се третман ћелија изврши Прогестероном 10^{-10} М 24 часа потом Миотрексатом у дози од $1\mu\text{M}$ (62.17%), потом предтретман Мифепристоном $10\mu\text{M}$ 24 часа праћен Миотрексатом у дози од $1\mu\text{M}$ (51.02%).

Добијени резултати указују на то да Прогестерон и Мифепристон испољавају позитиван ефекат на апоптотично дејство Миотрексата у односу на ефекат који имају на Метотрексат.



Графикон 23. Апоптотични ефекат појединачног и комбинованог дејства различитих доза Прогестерона (10^{-8} и 10^{-10} M) и Мифепристона на апоптотични ефекат фиксних доза Миотрексата и Метотрексата ($1\mu\text{M}$) на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија) током 24 часа. Третман ћелија (5×10^5 ћелија/ $800\mu\text{l}$) извршен је Прогестероном у дозама од 10^{-8} и 10^{-10} M 24 часа потом Метотрексатом или Миотрексатом ($1\mu\text{M}$), Мифепристоном у дозама 40 и $10\mu\text{M}$ током 24 часа потом Метотрексатом и Миотрексаом ($1\mu\text{M}$) и Прогестероном у дозама од 10^{-8} и 10^{-10} M 24 часа потом комбинацијом различитих доза Мифепристона (40 и $10\mu\text{M}$) са фиксном дозама Метотрексата или Миотрексата истовремено на 37C° и $5\%\text{CO}_2$. По завршеној инкубацији и бојењу ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум-јодидом FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија.

4.2. Механизам апоптозе индуковане Ралоксифеном, Естрогеном, Прогестероном, Мифепристоном и комбиноване примене Ралоксифен-Естроген истовремено на ендометријалну стромалну ћелијску линију (ThESC ћелијска линија)

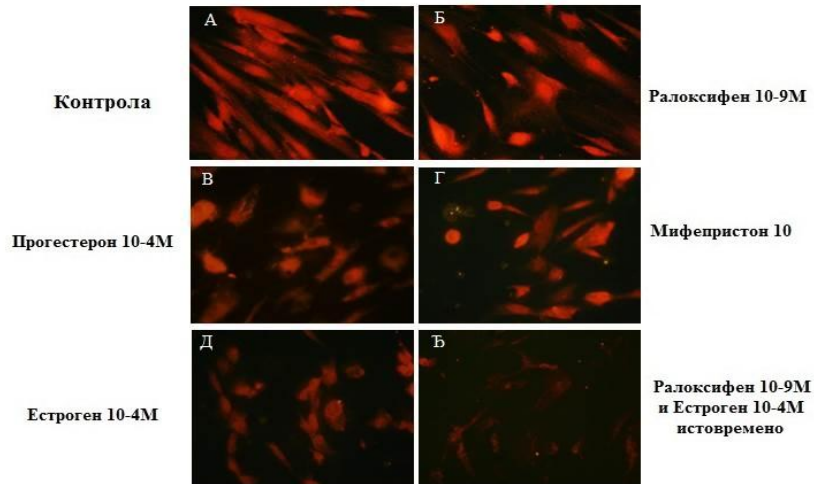
4.2.1. Ралоксифен, Естроген, Прогестерон, Мифепристон и комбинована примена Ралоксифена-Естрогена истовремено узрокује смањење цитоплазматске експресије Bcl-2 протеина у ThESC ћелијској линији.

Након утврђивања апоптотичног дејства појединачне и комбиноване примене испитиваних лекова помоћу FACS анализе, следећи корак је било утврђивање механизма апоптозе помоћу којих испитивани лекови у одређеним дозама индукују смрт ендометријалне стромалне ћелијске линије. Наиме за утврђивање механизма апоптозе, тачније утврђивања нивоа експресије одређених про и анти апоптотичних протеина, проценат апоптотичног дејства испитиваних супстанци неопходан је да буде у опсегу до 40%. Резултати FACS анализе који су у складу са овим правилом предствљају следеће дозе испитиваних лекова: Ралоксифен у дози од 10^{-9} М (5.75%), Естроген 10^{-4} М (8.6%), Прогестерон 10^{-4} М (30.09%), Мифепристон 10μ М (30.4%) као и комбинована истовремена примена Ралоксифена 10^{-9} М и Естрогена 10^{-4} М (23.01%). Вођени овом чињеницом након двадесет и четворочасовног третмана ендометријалних стромалних ћелијских линија Ралоксифеном у дози од 10^{-9} М, Естрогеном 10^{-4} М, Прогестероном 10^{-4} М, Мифепристоном 10μ М као и комбинованом истовременом применом Ралоксифена 10^{-9} М и Естрогена 10^{-4} М експресија Bcl-2 протеина у ThESC ћелијској линији била је одређивана методом имунофлуоросценције. Такође је битно напоменути да су појединачне експресије Bcl-2, BAX и каспазе 3 код третмана ендометријалних стромалних ћелија Метотрексатом и Миотрексатом приказани у докторској дисертацији Татјане Кастратовић (57). У доступним резултатима истраживања које је испитивало појединачне ефекте Метотрексата и Миотрексата али у концентрацијама од 8μ М испитиваних супстанци на експресију цитоплазматског Bcl-2 протеина показано је да се експресија Bcl-2 протеина смањује у ендометријалној стромалној ћелијској линији. Експресија Bcl-2 протеина у ћелијама

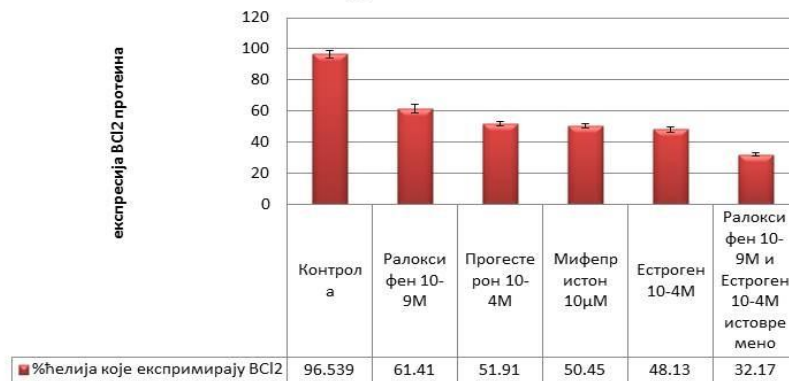
тертираним Метотрексатом у концентрацији од 8 μ М износила је 19.54% док за Миотрексат исте концентрације проценат експресије Bcl-2 протеина износио је 71.35% (57). Ефекти Метротрексата и Миотрексата на експресију каспазе 3 и активног ВАХа у истоименом истраживању били су следећи: Експресија активне каспазе 3 за Метотрексат 8 μ М (7.75%) и Миотрексат (37.36%), експресија активног ВАХа за Метотрексат 8 μ М (22.9%) и Миотрексат (32.42%) (57).

Bcl-2 припада групи анти-апоптотичних протеина који инхибирају процес апоптозе. Њихова повећана експресија ћелијама омогућава ћелијско преживљавање. Дејством различитих стимулса који ћелију уводе у апоптозу експресија овог протеина се смањује. Као резултат стимулације, третмана ендометријалне стромалне ћелијске линије Ралоксифеном у дози од 10⁻⁹М, Естрогеном 10⁻⁴М, Прогестероном 10⁻⁴М, Мифепристоном 10 μ М као и комбинованом истовременом применом Ралоксифена 10⁻⁹М и Естрогена 10⁻⁴М експресија Bcl-2 протеина је смањена у односу на контролне (нетретиране ћелије) чиме се потврђује да испитивани лекови индукују апоптозу у ThESC ћелијској линији (Слика 12).

Највећи степен смањење експресије Bcl-2 протеина примећен је код истовремене апликације Ралоксифена 10⁻⁹М и Естрогена 10⁻⁴М током 24 часа до 37.17%. Овај резултат говори да истовремена примена Ралоксифена и Естрогена у датим концентрацијама представља најачи индуктивни агенс за процес апоптозе испитиван на ендометријалној стромалној ћелијској линији. Преостали испитивани агенси су такође изазвали смањење експресије Bcl-2 протеина у односу на контролну, нетретирану групу ћелија код које је експресија била 96.53%.



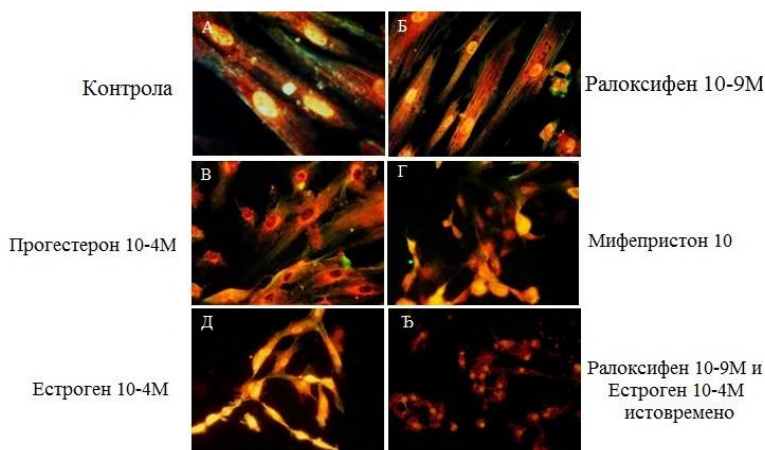
Цитоплазматска експресија Bcl2 протеина након третмана различитим лековима током периода од 24 часа



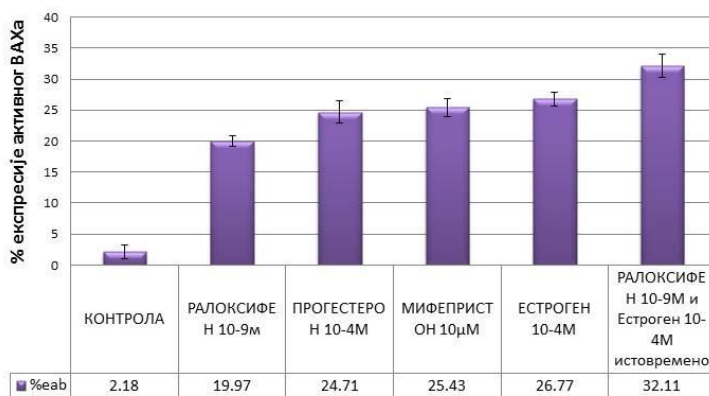
Слика 12. Имунофлуоресцентни приказ експресије анти-апоптогичног протеина Bcl-2 у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија). Након третирања ћелија (2×10^4 ћелија/400μl) Ралоксифеном 10^{-9} М, Прогестероном 10^{-4} М, Естрогеном 10^{-4} М, Мифепристоном 10μМ и истовременом применом Ралоксифена 10^{-9} М и Естрогена 10^{-4} М у периоду од 24 часа на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 . Након третирања ћелија испитиваним лековима, вршено је њихово бојење са анти- Bcl-2 антителом. Поступак бојења је описан у поглављу Материјал и методе. Ћелије су посматране под увећањем X 100. Анализа нивоа активације овог протеина у третираним и нетретираним ћелијама вршена је на подједнаком броја ћелија у три различита видна поља ImageJ софтвером. Статистичка анализа вршена је Mann-Whitney-евим тестом за независне узорке а статистичка значајност одређивана је за ниво $p < 0,05$.

4.2.2. Ралоксифен, Естроген, Прогестерон, Мифепристон и комбинована примена Ралоксифена-Естрогена истовремено, узрокује повећање експресије активног ВАХ протеина у ThESC ћелијској линији.

За индукцију процеса апоптозе поред смањења експресије анти апоптотичних протеина, неопходно је повећање експресије (и/или активација проапоптотичних) протеина који врше промоцију апоптозе. Један од таквих протеина чија експресија се мења индукцијом апоптозе, тј мења се из правца цитоплазма (здрава ћелија, повишена експресија) у правцу митохондрије (ћелија која подлеже процесу апоптозе са изменом у пермеабилности митохондријалне мембране, смањена цитоплазматска експресија) јесте ВАХ. Након третмана испитиваним лековима одређивани су експресија као и проценат активног N терминалног ВАХ протеина у ендометријалној стромалној ћелијској линији (Слика 13).



Експресија активног ВАХ протеина у ендометријалним стромалним ћелијама након третмана различитим лековима у трајању од 24 часа

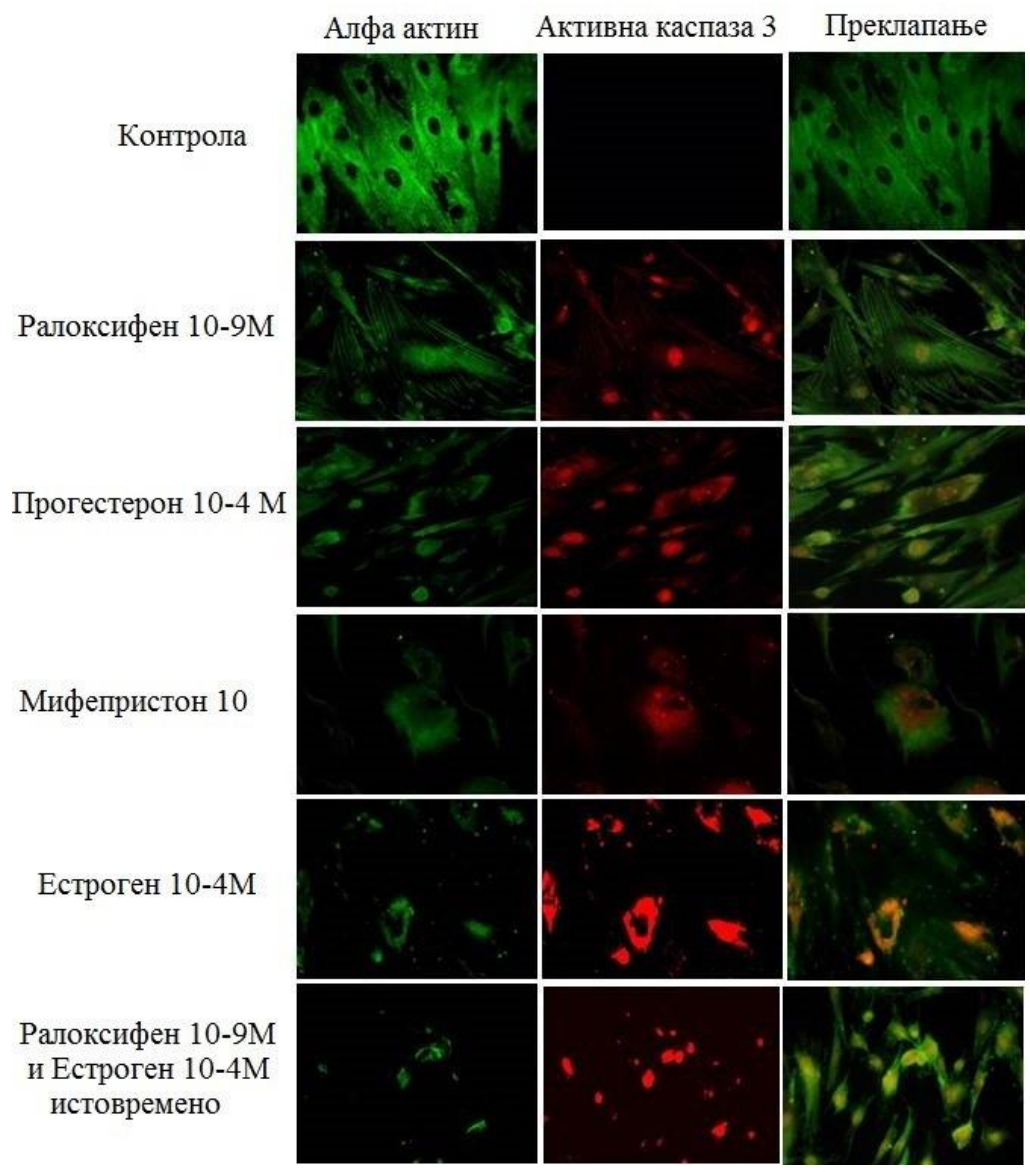


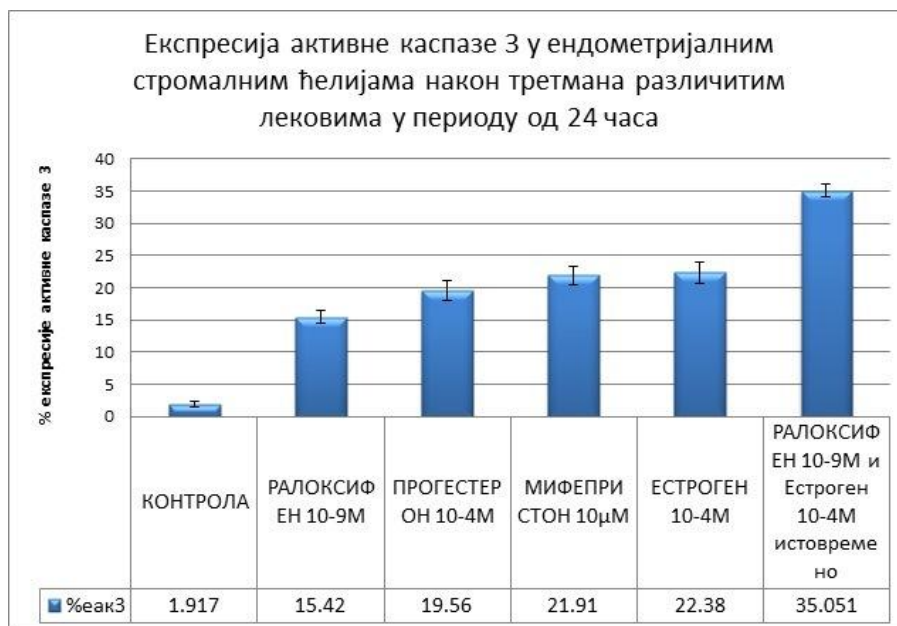
Слика 13. Имунофлуоресцентни приказ експресије анти-апоптотичног протеина ВАХ у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија). Након третирања ћелија (2×10^4 ћелија/400 μ l) Ралоксифеном 10^{-9} М, Прогестероном 10^{-4} М, Естрогеном 10^{-4} М, Мифепристоном 10 μ М и истовременом применом Ралоксифена 10^{-9} М и Естрогена 10^{-4} М у периоду од 24 часа на 37 С° и 5% CO₂. Након третирања ћелија испитиваним лековима, вршено је њихово бојење са анти- ВАХ антителом. Поступак бојења је описан у поглављу Материјал и методе. Ћелије су посматране под увећањем X 100. Анализа нивоа активације овог протеина у третираним и нетретираним ћелијама вршена је на подједнаком броја ћелија у три различита видна поља ImageJ софтвером. Статистичка анализа вршена је Mann-Whitney-евим тестом за независне узорке а статистичка значајност одређивана је за ниво $p < 0,05$.

На основу добијених резултата примећује се смањење експресије активног ВАХ протеина у смеру од контролне група (2.18%) ка истовремено третираним ћелијама Ралоксифеном и Естрогеном (32.11%).

4.2.3. Апоптоза индукована Ралоксифеном, Естрогеном, Прогестероном, Мифепристоном и истовременом применом Ралоксифена-Естрогена током 24 часа на ендометријалну стромалну ћелијску линију каспазно је зависна

Да би дошло до активације каспазе 3 неопходан предуслов је излазак цитохрома ц из интермембранског простора митохондрија. Цитохром ц заједно са Аraf 1 и иницијаторском прокаспазом- 9 изграђује апоптозом чиме се активира прокаспаза- 9 у каспазу- 9 што резултује активацијом нисходне, ефекторске каспазе 3. Активна каспаза 3 узрокује цепање актинских влакна, дезинтеграцију цитоскелета ћелије и стварање апоптотичних тела. Промене на цитоскелету третираних ендометријалних стромалних ћелија уочавају се на слици 14.



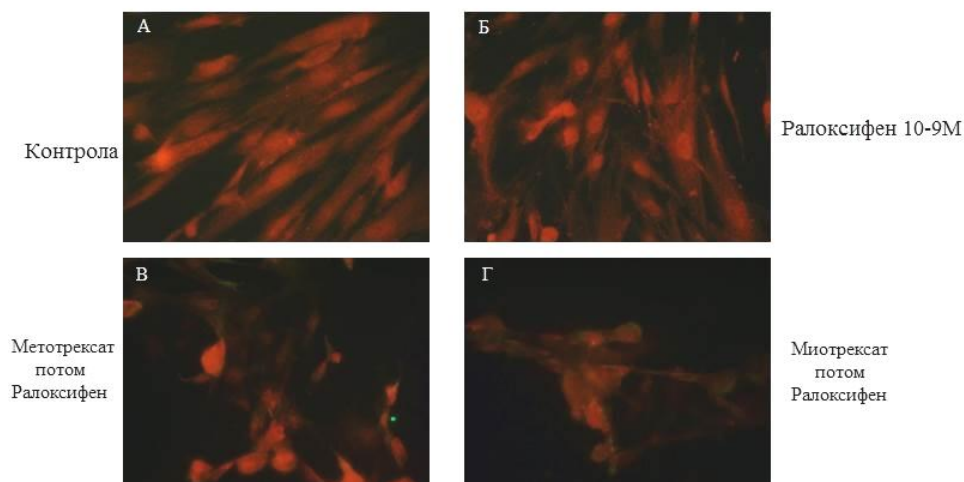


Слика 14. Имунофлуоресцентни приказ експресије ефекторне каспазе 3 у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија). Након третирања ћелија (2×10^4 ћелија/400µl) Ралоксифеном 10^{-9} М, Прогестероном 10^{-4} М, Естрогеном 10^{-4} М, Мифепристоном 10µМ и истовременом применом Ралоксифена 10^{-9} М и Естрогена 10^{-4} М у периоду од 24 часа на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $5\% \text{ CO}_2$ вршено је њихово бојење анти-β-актином и анти-активном каспазом 3 као што је описано у поглављу Материјал и методе. Анализа нивоа активације каспазе 3 у третираним и нетретираним ћелијама вршена је на подједнаком броја ћелија у три различита видна поља ImageJ софтвером. Статистичка анализа вршена је Mann-Whitney-евим тестом за независне узорке а статистичка значајност одређивана је за ниво $p < 0,05$.

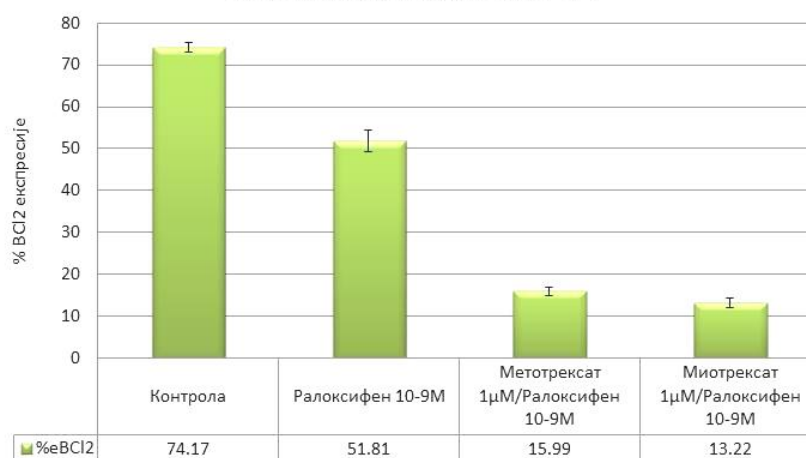
Резултати добијени одређивањем експресије активне каспазе 3 указују на увећање апоптотичног дејства и могућности индукције апоптозе која је приказана у растућем низу (Слика 14). Највећа експресија активне каспазе 3 у односу на контролне ћелије (1.91%) примећена је код истовременог третмана Ралоксифеном и Естрогеном током 24 часа (35.05%), што говори у прилог чињеници да ова комбинација лекова представља најјачи индуктор апоптозе за ендометријалну стромалну ћелијску линију.

4.2.4. Посттретман Ралоксифеном у дози од 10^{-9} М у комбинацији са Метотрексатом или Миотрексатом у дози од 1 μ М смањује експресију цитоплазматског Bcl-2 протеина и повећава експресију активног BAX протеина у ендометријалној стромалној ћелијској линији

Још један од резултата који је добијен током експерименталног рада представља резултат дејства посттретмана Ралоксифеном у фиксној дози од 10^{-9} М на цитотоксични ефекат Метотрексата и Миотрексата у дозама од 1 μ М. Наиме на основу резултата цитотоксичности примећено је да посттретман Ралоксифеном у дози од 10^{-9} М статистички значајно повећава цитотоксични ефекат Метотрексата и Миотрексата (34.34% и 38.78%) у односу на њихов појединачни цитотоксични ефекат као и у односу на појединачни цитотоксични ефекат Ралоксифена. На основу резултата МТТ теста код ћелија које су третиране Ралоксифеном након третмана Метотрексатом и Миотрексатом имунофлуоросцентном методом одређивана је експресија Bcl-2 и BAX протеина (Слика 15).



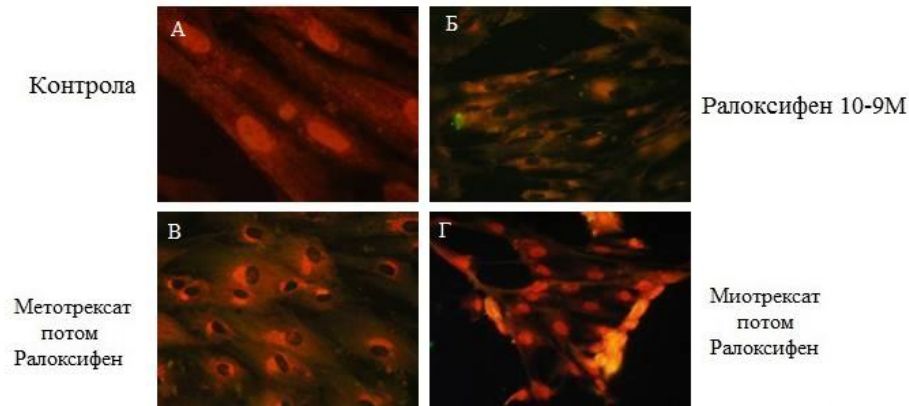
Цитоплазматска експресија Bcl2 протеина у ендометријалној стромалној ћелијској линији након појединачног третмана Ралоксифеном 10^{-9} М и комбинованог третмана са Метотрексатом и Миотрексатом у трајању од 24 часа



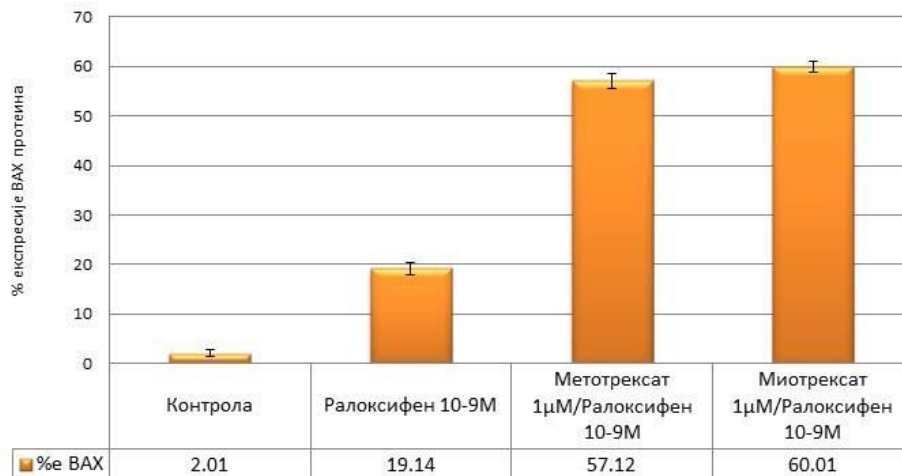
Слика 15. Имунофлуоресцентни приказ експресије анти-апоптогичног протеина Bcl-2 у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија). Након третирања ћелија (2×10^4 ћелија/ 400μ l) Метотрексатом и Миотрексатом 1μ М потом Ралоксифеном 10^{-9} М у периоду од 24 часа на $37\text{ }^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . Након третирања ћелија испитиваним лековима, вршено је њихово бојење са анти- Bcl-2 антителом. Поступак бојења је описан у поглављу Материјал и методе. Ћелије су посматране под увеличањем X 100. Анализа нивоа активације овог протеина у третираним и нетретираним ћелијама вршена је на подједнаком броја ћелија у три различита видна поља ImageJ софтвером. Статистичка анализа вршена је Mann-Whitney-евим тестом за независне узорке а статистичка значајност одређивана је за ниво $p < 0,05$. 37.92 I 64.17

Након третирања ћелија комбинованом применом Метотрексата и Миотрексата са Ралоксифеном примећено је статистички значајно смањење цитоплазматске експресије Bcl-2 протеина у свим третираним групама. У контролној групи ћелија експресија Bcl-2 протеина износила је 74.17% док прилоком појединачног третмана Ралоксифеном у дози од 10^{-9} М цитоплазматска експресија Bcl-2 протеина смањује на вредност од 21.81%. У доступним резултатима истраживања које је испитивало појединачне ефекте Метотрексата и Миотрексата али у концентрацијама од 8 μ М испитиваних супстанци на експресију цитоплазматског Bcl-2 протеина показало је такође да се експресија Bcl-2 протеина смањује у ендометријалној стромалној ћелијској линији за Метотрексат у концентрацији од 8 μ М износи 19.54% док за Миотрексат исте концентрације проценат експресије износи 71.35% (57). Третман Метотрексатом или Миотрексатом праћен третманом Ралоксифеном (15.99% и 13.22%) статистички значајно смањује експресију Bcl-2 протеина у цитоплазми ендометријалних стромалних ћелија што говори у прилог чињеници да су одбрамбени механизми под комбинованим дејством испитиваних лекова у великој мери инхибирани.

Поред смањења експресије цитоплазматског Bcl-2 протеина, код истоимене комбиноване примене испитиваних лекова одређивана је и експресија BAX протеина ради прецизнијег одређивања механизма апоптозе (Слика 16).



Експресија активног ВАХ протеина у ендометријалној стромалној ћелијској линији након комбинованог третмана Метотрексатом и Миотрексатом потом Ралоксифеном у трајању од 24 часа



Слика 16. Имунофлуоресцентни приказ експресије анти-апоптотичног протеина ВАХ у ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија). Након третирања ћелија (2×10^4 ћелија/400µl) Метотрексатом и Миотрексатом 1µМ потом Ралоксифеном 10^{-9} М у периоду од 24 часа на 37°C и $5\%\text{CO}_2$. Након третирања ћелија испитиваним лековима, вршено је њихово бојење са анти- Bcl-2 антителом. Поступак бојења је описан у поглављу Материјал и методе. Ћелије су посматране под увеличањем X 100. Анализа нивоа активације овог протеина у третираним и нетретираним ћелијама вршена је на подједнаком броја ћелија у три различита видна поља ImageJ софтвером. Статистичка анализа вршена је Mann-Whitney-евим тестом за независне узорке а статистичка значајност одређивана је за ниво $p < 0,05$.

Након третирања ћелија комбинованом применом Метотрексата и Миотрексата у дозама од 1 μ М потом Ралоксифеном 10⁻⁹М примећено је статистички значајно повећање експресије активног ВАХ протеина у свим третираним групама осим у контролној групи ћелија (2.01%). Прилоком појединачног третмана Ралоксифеном у дози од 10⁻⁹М експресија ВАХ протеина повећава се на вредност од 19.14%. Третман Метотрексатом или Миотрексатом праћен третманом Ралоксифеном (57.12% и 60.01%) статистички значајно повећава експресију активног ВАХ протеина у ендометријалним стромалним ћелијама што говори у прилог чињеници да су поред инхибираних одбрамбених механизма активирани апоптотични механизми који уводе ћелију у смрт.

5. ДИСКУСИЈА

Неопходан предуслов за развој процеса ендометријалне хиперплазије представљају постојање хормонског дисбаланса и нарушавање физиолошке морфологије ћелијских ентитета ендометријума (жлезданих и стромалних ћелија). Генерално говорећи у терапији хиперплазије ендометријума примаран је медикаментозни и хируршки приступ који за циљ има смањење обима крварења као и стабилизацију и умањење величине хиперпластичне промене. У основи медикаментозних приступа који се користе за лечење ендометријалних хиперплазија лежи основни процес програмиране ћелијске смрти, апоптозе. Најчешћи узрок за развој ендометријалне хиперплазије представља повишен ниво и продужено деловање полног хормона естрогена са изостанком прогестеронског дејства локално (у утерусу). Током последње деценије истраживања везана за медикаментозни приступ третмана ендометријалне хиперплазије усмерена су у правцу регулисања узрока обољења кључних за настанак ових промена. У терапији ових промена користе се лекови који умањују дејство естрогена модулацијом естрогенских рецептора (SERM-селективно модулатори естрогенских рецептора), који продужавају дејство Прогестеронске компоненте (SPRM-селективни модулатори прогестеронских рецептора), GnRH комбинованих агониста или применом ниских доза Метотрексата (клиничка студија спроведена од стране Живановића и сарадника) који доводи до смањивања величине

промене узроковане хиперплазијом, смањује менструално крварење, инциденцу хистеректомија и других инвазивних метода (26, 27, 28, 39).

Предмет овог истраживања било је испитивање ефекта женских полних хормона и модулатора њихових рецептора на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију.

Резултати добијени овом *in vitro* експерименталном студијом показују да Ралоксифен, Метотрексат и Миотрексат испољавају појединачни цитотоксични ефекат на ендометријалној стромалној ћелијској линији (ThESC ћелијска линија) и да је њихово цитотоксично дејство дозно-зависно (Графикон 1 А). У ранијим истраживањима који обухватају ову ћелијску линију показано је да Метотрексат и Миотрексат испољавају цитотоксични ефекат након 24 часа деловања (57), као и да је тај цитотоксични ефекат дозно зависан. Резултати овог истраживања који су добијени МТТ тестом потврђују да испитиване супстанце имају цитотоксични ефекат који показује дозну зависност као и то да је цитотоксични ефекат Миотрексата већи при испитиваним вишим дозама у односу на испитиване дозе Метотрексата. Тренд цитотоксичности између Миотрексата и Метотрексата мења се у корист Миотрексата почевши од испитиване дозе од 4 μ М. У резултатима истраживањима која су обухватила остале ћелијске линије дојке, хепатоцелуларног карцинома, ћелијским линијама леукемије, ћелијској линији хуманог хориокарцинома (33, 44, 45, 54, 55, 56) показано је да Метотрексат свој цитотоксични ефекат остварује активацијом процеса апоптозе као и то да је његов механизам дејства преваходно усмерен ка С фази ћелијског циклуса која је резервисана за процес синтезе молекула ДНК.

Литературни подаци везани за ефекте Ралоксифена на вијабилност ћелија, указују на то да испитивани лек показује значајан инхибиторни ефект на пролиферацију великог броја ћелијских линија у које убрајамо: хумана ћелијска линија карцинома простате и колоне (59, 60) и примарно изолована ћелијска линија миома утеруса (63). Везивањем за естрогенске рецепторе (са 4 пута већим афинитетом према естрогенском алфа рецептору у односу на ЕР бета) Ралоксифен врши модулацију рецептора и активира транскрипцију гена одговорних за синтезу протеина који узрокују смрт или пролиферацију ћелије (67, 68 и 69). У свом истраживању Gulia Dayan et al., истичу да структурна карактеристика Ралоксифена која узрокује формирање водоничне везе терцијарног амина са

каробоксилном групом аспарагина у положају 351 лиганд везујућег домена (LBD) естрогенског рецептора алфа је битна разлика у односу на Тамоксифен који не формира водоничне везе са поменутом аминокиселином у лиганд везујућем домену (69, 71). На основу овога као и на основу истраживања у којима је извршена делеција или замена кључне аминокиселине у положају 351 код различитих ћелијских култура (HeLa-хумана ћелијска линија карцинома грлића материце, Ishikawa-хумана ћелијска линија ендометријалног аденокарцинома, MCF-7- хумана естроген алфа позитивна ћелијска линија карцинома дојке) резултати указују да антиестрогенска активност Ралоксифена у ћелијским линијама карцинома цервикса, дојке и ендометријалног аденокарцинома потиче од присуства водоничних везе између терцијарног амина и аспарагинске киселине у положају 351 лиганд везујућег домена естрогенског рецептора алфа (69, 71). Ове структурне карактеристике Ралоксифена у литератури пружају објашњење за антиестрогенске карактеристике Ралоксифена у ткиву утеруса.

Наши резултати указују на то да Ралоксифен примењен појединачно испољава цитотоксични ефекат на ендометријалну стромалну ћелијску линију (Графикон 1А), као и то да је његов цитотоксични ефекат дозно зависан. Ефекат којим Ралоксифен инхибира пролиферацију великог броја ћелијских линија које обухватају велики број различитих органа који експримирају естрогенске рецепторе, везан је најпре за својство Ралоксифена да модулацијом естрогенских рецептора узрокује инактивацију гена који су одговорни за пролиферативни циклус ћелија. У истраживању које су спровели Williams-Brown MY et al (70) испитиван је појединачни цитотоксични ефекат Ралоксифена и Тамоксифена на Ishikawa ћелијску линију. Као један од могућих разлога за антагонистичке ефекте између Тамоксифена и Ралоксифена на пролиферацију Ishikawa ћелијске линије, аутори су као једно од објашњења цитотоксичног ефекта Ралоксифена дали мишљење да услед постојања различите структуре, конформационих промена, начина удруживања коактиватора као и постојања различитог афинитета према естрогенских рецепторима Тамоксифен и Ралоксифен узрокују промоцију различитих гена који учествују у метаболизму Естрогена и његових метаболита. Ово истраживање такође је показало да Ралоксифен испољава цитотоксични ефекат док Тамоксифен узрокује пролиферацију Ishikawa ћелијске линије. У истраживању које је обухватило испитивање ефекта појединачно примењеног Ралоксифена на вијабилност примарне ћелијске линије

изолиране из миома утеруса Jin Liu et al., (63) добијени резултати указују на то да Ралоксифен примењен у концентрацијама од 10^{-7} и 10^{-8} М активира пролиферацију ћелија, док при нижој концентрацији (10^{-9} М) Ралоксифен смањује пролиферацију ћелија.

У складу са тим, резултати нашег истраживања указују на то да Ралоксифен испољава највећи степен цитотоксичности при највећој испитиваној дози 10^{-5} М (18.04%) (Графикон 1А) док се тај ефекат смањује три пута и при испитиваној дози од 10^{-9} М износи 5.09% у односу на контролне ћелије. Иако је цитотоксични ефекат Ралоксифена при дози од 10^{-9} М низак он не може бити занемарен.

Поред испитивања ефекта поменутих супстанци на вијабилност ендометријалне стромалне ћелијске линије у доступној литератури нема информација о дејству различитих доза Естрогена, Прогестерона и Мифепристона на вијабилност ThESC ћелија. За естроген и прогестерон познато је да делују преко својих једарних рецептора при чијем везивању долази до димеризације рецептора, везивања за секвенцу ДНК (ERE), асоцијације са једарним транскрипционим факторима чиме се ствара стабилни комплекс који мења активност РНК полимеразе у правцу активације или инхибиције процеса транскрипције и последично активације или инхибиције процеса транслације тј активације или инхибиције пролиферације ћелија (105, 106, 107).

Наиме на експериментима који су вршени на епителу утеруса мишева који су позитивни и негативни на експресију естрогенских рецептора, Cook et al., указују на то да је пролиферативни процес епитела утеруса индиректно стромално зависан. Другим речима повећана експресија естрогенског рецептора алфа која је локализована највећим делом у строми, задужена и заслужна је за пролиферативне ефекте које естроген испољава на епител (84). Резултати студије коју су обавили Jin et al., (63) указују на постојање пролиферативног ефекта појединачне дозе Естрогена у дози од 10^{-7} М (без испитивања ефекта различитих доза) на примарно изолованој култури ћелија које воде порекло из миома утеруса. Као један од водећих проблема везаних за примену хормонске терапије представља постојање појаве резистентности на хормонске лекове. У складу са тим истраживања која су рађена на Ishikawa ћелијској линији указују на то да деловањем прогестина долази до појаве резистенције и смањења експресије естрогенског рецептора алфа и прогестеронског рецептора бета чиме се повећава степен пролиферације ћелија (183). У другом истраживању које обављено на Ishikawa ћелијској линији (184) добијени

результати указују на то да постоји смањење у вијабилности ћелија које су третиране Мегестрол ацетатом и да је тај ефекат резултат активације апоптотичног пута.

Резултати нашег истраживања указују на то да Естроген и Прогестерон примењени у различитим дозама испољавају цитотоксични ефекат (Графикон 1Б) али да тај ефекат није дозно зависан. Наиме при високим дозама Естрогена 10^{-4} М цитотоксични ефекат је био најнижи и износио је 8.59% цитотоксичних ћелија за Прогестерон 10^{-4} М 69.25%; смањењем дозе Естрогена цитотоксични ефекат се повећавао тако да при дози Естрогена од 10^{-9} М он је износио 29.68% цитотоксичних ћелија. Повећање дозе Прогестерона смањивало је цитотоксични ефекат тако да при дози од 10^{-10} М цитотоксични ефекат је износио 33.74%.

Добијени резултати у складу су са литературним подацима у којима се такође потврђује да ниске дозе естрогена инхибирају пролиферацију ћелија (60).

Током последње две деценије, истраживања су усмерена у правцу испитивања и проналаска идеалне медикаментозне комбиноване терапије која се заснива на садејству два лека у циљу смањења хиперпластичних промена као и заустављању процеса њихове малигне трансформације.

У нашем истраживању испитиван је комбиновани ефекат пред и постретмана испитиваним супстанцама. Наиме један од новијих трендова и приступа медикаментозној терапији представља стварање ткивно-специфичних естрогенских комплекса код којих се ефекат мешовитог естрогенског дејства у појединим ткивима постиже комбиновањем неког од SERM представника са коњугованим естрогенима (185). У истраживању које је спроведено од стране Paszkiewicz и сарадника испитиван је ефекат примене SERM-а (Тамоксифена и Ралоксифена) у комбинацији са естрогенима на експресију MUC1 (трансмембрански протеин чија је експресија стероидно регулисана и чија је основна улога у везивању патогена и спречавању њиховог контакта са ћелијом) на Ishikawa ћелијској линији (186, 187). Резултати ове студије указују на то да Тамоксифен примењен сам или у комбинацији са естрогеном инхибира синтезу MUC1, док Ралоксифен примењен сам (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} М) и у комбинацији са Естрогеном 10^{-7} М стимулише и активира синтезу MUC1 на испитиваној Ishikawa ћелијској линији. На животињском моделу менопаузе зеца, испитиван је ефекат комбиноване примене Ралоксифена, Аспирина и Естрогена на липидни статус, тежину утеруса, агрегацију тромбоцита као и промене које

захватају млечне жлезде и патолошке промене на зидовима аорте (188). Резултати овог истраживања указују на то комбинована примена поменутих лекова испољава позитивно дејство на инхибицију атеросклеротских промена, инхибирају се пролиферативни процеси ткива дојке и утеруса као и то да поменута комбинација лекова смањује степен агрегације тромбоцита (188). Такође у студијама које испитују ефекат комбиноване примене Ралоксифена и Естрогена на вазомоторне симптоме као и на промене у ткиву ендометријума (189, 190) примећено је да комбиновани ефекат Ралоксифена и Естрогена смањује степен ендометријалне стимулације као и вазомоторне симптоме у односу на појединачни ефекат оба лека. На ћелијској линији тумора дојке MCF-7 појединачним коришћењем Ралоксифена у ниским дозама (1 и 4 μ M) примећено је смањење синтезе колагена за 50%, док повећање дозе Ралоксифена је умањило синтезу колагена за 25% (191). Комбинованом апликацијом најпре 2nM Естрогена потом Ралоксифеном у нижим дозама, примећено је да ова комбинација инхибира синтезу колагена, док у случају примене Естрогена у комбинацији са високим дозама Ралоксифена долази до активације процеса синтезе колагена у туморској ћелијској линији. Овим експериментом аутори су показали да Ралоксифен може да се користи у циљу превенције развоја карцинома дојке (191). Поред ових испитивања аутори Wang et al., и Xiang et al., (192, 193, 194) испитивали су ефекте комбиноване примене различитих доза Ралоксифена и 17 бета естрадиола на степен пролиферације на примарно изолованој васкуларној глатко мишићној ћелијској култури, хуманој ћелијској линији ендотела дојке као и у експерименталном моделу атеросклерозе зеца на аортном зиду и у ткиву дојке. Резултати ових истраживања показали су да је ефекат комбиноване примене различитих доза Ралоксифена и 17 бета естрадиола на пролиферацију инхибиран код свих испитиваних ћелијских линија у односу на појединачни пролиферативни ефекат испитиваних супстанци. Још једна од студија која је спроведена у циљу испитивања успешности комбиноване примене Естрогена и Ралоксифена објављена је у истраживању које су спровели Valiati и сарадници (195) који наглашавају да комбинованом применом 17 бета естрадиола (перкутано) и Ралоксифена долази до испољавања протективног дејства комбиноване примене поменутих лекова на ендометријум. У нашем истраживању коришћене су најниже испитиване концентрације Ралоксифена (фиксна доза 10⁻⁹M) у комбинацији са различитим дозама Естрогена. Поред коришћења различитих доза Естрогена, експериментима су обухваћени различити облици

третмана (Предтретман Ралоксифеном, посттретман Ралоксифеном и истовремена апликација Ралоксифена и Естрогена) у циљу испитивања најефикасније комбинације која постиже највећи цитотоксични ефекат (60). На основу резултата нашег експеримента добијени резултати указују на то да комбинованом применом најпре Ралоксифена у концентрацији од 10^{-9} М потом Естрогена у различитим дозама долази (33.88%, 37.12%, 42.03% и 42.52%) до повећања цитотоксичног ефекта у односу на појединачни ефекат испиваних супстанци (Графикон 2). Резултати нашег експеримента су у складу са литературним подацима који указују на већу ефикасност у смислу инхибиције пролиферације у случају комбиноване примене Ралоксифена и естрогена у односу на њихов појединачни ефекат. У односу на све испитиване комбинације, предтретман Ралоксифеном потом Естрогеном различитих доза, посттретман Ралоксифеном коме је предходио третман различитим дозама Естрогена и истовремена апликација оба лека, примећено је да је највећи степен цитотоксичности при фиксној дози Ралоксифена и променљивим дозама Естрогена присутан у комбинацији предтретман Ралоксифеном потом Естрогеном различитих доза.

Још један од новијих трендова у медикаментозној терапији тумора који су хормонски зависни, предствала комбиновање цитостатских лекова са лековима који испољавају различите ефекте у различитим ткивима у циљу проналаска идеалне комбинације лекова која испољава цитотоксични ефекат на туморске ћелије а истовремено не изазива оштећење осталих ткива и органа. Нека од истраживања која су испитивала цитотоксични и протективни ефекат комбиноване медикаментозне терапије вршена су на туморским ћелијама карцинома дојке и ћелијама коштане сржи (196, 197). У овим истраживањима испитиван је цитотоксични ефекат комбиноване терапије Ралоксифеном, 5 флуоро урацилом и Метотрексатом у циљу проналажења редоследа примењиваних лекова који показују највећи степен цитотоксичности. Резултати ових истраживања показали су да се највећи степен цитотоксичности на MCF-7 туморској линији карцинома дојке и истовремени протективни ефекат на ћелије коштане сржи постиже када је редослед примењених лекова следећи: 5флуоро-урацил/Метотрексат потом Ралоксифен. У резултатима истраживања које су спровели De Soto и сарадници на MCF-7 ћелијској линији показано је да администрација Ралоксифена ($10\mu\text{M}$) испољава антагонистички ефекат и умањује цитотоксично дејство Метотрексата (198). Поред комбиноване терапије

Метотрексат и Ралоксифен у литератури се приказују такође и резултати цитотоксичности у случају комбиноване терапије Метотрексата и Тамоксифена (представник СЕРМ-а) на МCF-7 туморској линији карцинома дојке (199). Резултати овог истраживања потврђују резултате који су показани у студији са Ралоксифеном, наиме предтретман Тамоксифеном потом Метотрексатом умањује цитотоксични ефекат који Метотрексат испољава на МCF-7 туморској линији карцинома дојке. У случају када је испитиван ефекат Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата на ThESC ћелијској линији добијени резултати указују на то да се највећи степен цитотоксичности испољава у случају комбинације Метотрексат потом Ралоксифен (34.34%) као и Миотрексат-Ралоксифен (38.78%) (у литератури за Миотрексат нема података) (Графикон 3). У случају када се испитивани лекови примене појединачно у фиксним дозама њихова цитотоксичност је практично занемарљива. Међутим комбинованом применом испитиваних лекова (предтретмани и посттретмани Ралоксифеном) примећено је да се цитотоксичност лекова примењених у комбинацији повећава од 3 до 5 пута.

Регулацијом процеса синтезе протеина хормони учествују у процесу регулације метаболичких активности репродуктивних органа жене (31). Као антиметаболит, Метотрексат инхибира синтезу нуклеинских киселина и протеина при чему не показује ткивну специфичност. Једно од питања које се поставља јесте комбиновани утицај Естрогена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата. Литературни подаци указују на то да комбинована примена Естрогена и Метотрексата представља једну од могућих комбинација лекова за решење ургентних стања у гинекологији која обухватају *placenta accreta* и *placenta increta* (200). Остали доступни литературни подаци указују на то да комбинована примена Естроген и Метотрексата позитивно делује на појаву резистенције туморских ћелијских линија дојке (MCF-7) према Метотрексату (201), узрокује смањење интрацелуларног нивоа антиметаболита као и то да се флуидност ћелијских мембрана у случају комбиноване примене ова два лека умањује (202). Резултати истраживања која су вршена на утерусу пацова указују на то да примена 17 бета естрадиола и Метотрексата показује неспецифичну реакцију као и појаву инхибиторног дејства, тј умањења степена цитотоксичности Метотрексата (203). У литератури нема доступних података за комбиновану примenu Естрогена и Миотрексата. На основу резултата који су добијени у нашем истраживању можемо закључити да комбинована примена Естрогена-

Метотрекста/Миотрексата (Графикон 4) повећава цитотоксични ефекат (дозно зависан) на ендометријалну стромалну ћелијску линију у односу на појединачни ефекат који ови лекови испољавају.

Испитивањем цитотоксичног и апоптотичног ефекта Прогестерона, Мифепристона као и њихове комбинације са Метотрексом и Миотрексом, литературни подаци показују различитост у односу на врсту ћелијске линије на којој су експерименти вршени. Најновији литературни подаци указују на то да предтретман Мифепристомом потом Прогестероном ативира развој Пуркињевих ћелија (204). Међутим остали доступни литературни подаци указују на то да Прогестерон и Мифепристон када се примене појединачно испољавају цитотоксични и апоптотични ефекат који се знатно смањује када се ови лекови примене у комбинацији (205, 206, 207). На ћелијским линијама хуманог малигног глиома U87MG, хуманог остеосаркома U-2OS и SAOS-2, хуманог карцинома простате LNCaP и PC-3 карцинома дојке MCF-7 и MDA-MB 23, као и карцинома оваријума SK-OV3 и OVCAR-3 испитиване дозе Мифепристона износиле су 5, 10, 20 и 40 μ M (205, 206). При овим испитиваним концентрацијама Мифепристона показано је постојање цитотоксичног ефекта и инхибиције раста свих ћелијских линија при чему је ћелијска линија тумора дојке MDA-MB 23 захтевала веће концентрације Мифепристона за постизање истог цитотоксичног ефекта као на другим ћелијским линијама (205). Појединачни цитотоксични ефекат Мифепристона литературно је приказан у истраживању које је спроведено на ћелијској линији холоангиокарцинома FRH-0201 (207) док његов комбиновани ефекат са Прогестероном приказан је у истраживањима која су рађена на Ishikawa ћелијској линији (208, 209). У овим истраживањима показано је да комбинованом применом Мифепристона и Прогестерона цитотоксични и апоптотични ефекти се не мењају у значајном смислу.

Испитивањем цитотоксичног и апоптотичног ефекта различитих појединачних и комбинованих доза Прогестерона и Мифепристона наши резултати указују на то да се цитотоксични и апоптотични ефекат комбиноване примене ова два лека не мења статистички значајно у односу на појединачни цитотоксични и апоптотични ефекат Мифепристона и Прогестерона (Графикон 7 А, Б, Графикон 8 и Графикон 22). Различитости у литературним подацима које су везане за цитотоксичне и апоптотичне ефекте Мифепристона на различитим ћелијским линијама могу бити објашњена и

карактеристикама које Мифепристон показује према прогестеронским али и глукортикоидним рецепторима. Приликом испитивања ефекта комбиноване примене Мифепристона и Кортизола на степен повећања броја цитотоксичних утерусних НК ћелија Yuezhou и сарадници су показали да комбинована примена оба лека смањује број НК ћелија у односу на то када се Мифепристон примени појединачно. У складу са овим резултатима аутори наглашавају да се повећање броја цитотоксичних утерусних НК ћелија које настаје као резултат самосталне примене Мифепристона развија услед његових анти прогестеронских и анти глукортикоидних својстава (208). Мифепристон своје дејство остварује везујући се за прогестеронске, гликокортикоидне и андрогене рецепторе на ћелији (209). Везујући се за прогестеронске рецепторе Мифепристон узрокује различите конформационе промене рецептора које се у знатноме разликују од оних промена које су настале као резултат везивања Прогестерона за прогестеронске рецепторе. Наиме везивањем Прогестерона за прогестеронске рецепторе долази до конформационих промена новонасталог комплекса, везивања хроматина и активације гена одговорних за транскрипцију и синтезу протеина. Везивањем Мифепристона за прогестеронске рецепторе долази до формирања комплекса али изостаје активација гена одговорних за транскрипцију. Активација гена одговорних за траскрипцију одвија се преко прогестеронског рецептора Б не преко PR-A који делује као репресор како за PR-B одговорну транскрипцију тако и за естроген рецептор посредујућу транскрипцију чиме се објаснити антиестрогенски ефекат неких прогестеронских антагониста (209). Још једно од истраживања које показује антагонистичке ефекте комбиноване примене прогестерона и Мифепристона спровели су Jain и сарадници који су у свом истраживању испитивали ефекат комбиноване примене депо медроксипрогестерон ацетата потом Мифепристона на експресију естрогенских и прогестеронских рецептора на ћелијама ендометријума које су добијене биопсијом (210). Резултати овог истраживања указују на то да посттретман Мифепристомом узрокује повећање експресије ендометријалног естрогенског рецептора алфа и прогестеронског рецептора Б што за резултат има активацију и пролиферацију ћелија (210). У сличном истраживању које су спровели Meng и сарадници испитиван је ефекат Мифепристона на експресију естрогенских и прогестеронских рецептора на епителијалним и стромалним ендометријалним ћелијама (211). Резултати овог

истраживања показали су да Мифепристон узрокује повећање експресије естрогенског бета и прогестеронског Б рецептора на епителијалним ендометријалним ћелијама.

Литературни подаци указују на то да појава смањења цитотоксичног ефекта код комбиноване примене Мифепристона и Прогестерона највероватније настаје као резултат промене експресије естрогенских рецептора алфа и прогестеронских рецептора што последично резултује појавом пролиферативног ефекта уместо синергистичког, адитивног цитотоксичног ефекта на ћелије.

Резултати нашег истраживања указују на то да се цитотоксични и апоптотични ефекти комбиноване примене Прогестерона са Метотрексатом и Миотрексатом увећавају једино у случају комбиноване примене Прогестерона са Миотрексатом (Графикон 23). У случају комбиноване примене Прогестерона и Метотрексата не постоји промена у цитотоксичном и апоптотичном дејству у односу на појединачни ефекат испитиваних супстанци. Комбинованом применом Прогестерона и Метотрексата литературни подаци указују на то да Прогестерон смањује пропустљивост ћелијске мембране чиме смањује и сам цитотоксични ефекат Метотрексата на ћелијској линији тумора дојке (212, 213).

Најновија истраживања која су вршена на ћелијској линији карцинома оваријума НО-8910 указују на то да Прогестерон умањује цитотоксични и апоптотични ефекат цисплатине (214). Након комбинованог третмана Прогестероном и Цисплатином резултати су показали смањење експресије прогестеронских рецептора и прогестеронске рецепторске мембранске компоненте 1 (PGRMC1) и повећање у експресији прогестеронске рецепторске мембранске компоненте 2 (PGRMC2). Самостална примена Цисплатине резултовала је повећањем експресије прогестеронских рецептора и прогестеронске рецепторске мембранске компоненте 1 (PGRMC1) док је примећено смањење експресије прогестеронске рецепторске мембранске компоненте 2 (PGRMC2). Улога PGRMC1 огледа се и у смањењу експресије гена који учествују у процесу апоптозе (Bad, Caspase-3, Caspase-4) тако да је његова експресија измењена код синдрома полицистичних јајника и инфертилитета (215).

Комбинована примена Мифепристона са Метотрексатом у литератури је назначена као медикаментозни начин за решавање ектопичних и тубарних трудноћа (216, 217, 218) док литературни подаци комбинације Мифепристон-Миотрексат нису доступни. На основу наших резултата можемо закључити да комбинација лекова Мифепристон-

Метотрексат повећава цитотоксични и апоптотични ефекат у односу на појединачни ефекат који испољавају оба лека (Графикон 23) као и то да су ефекти комбинације Мифепристон-Миоттрексат статистички значајнија у поређењу са комбинованом применом Мифепристон-Метотрексат и појединачним ефектом испитиваних лекова.

Након утврђивања цитотоксичних и апоптотичних ефеката испитиваних лекова као и улоге женских полних хормона и модулатора њихових рецептора на цитотоксичност Метотрексата и Миоттрексата на ендометријалну стромалну ћелијску линију, неопходно је утврдити механизам којим поменути лекови индукују ћелијску смрт-апоптозу. Такође је битно напоменути да су појединачне експресије Bcl-2, BAX и каспазе 3 код третмана ендометријалних стромалних ћелија Метотрексатом и Миоттрексатом приказани у докторској дисертацији Татјане Кастратовић (57). У доступним резултатим истраживање које је испитивало појединачне ефекте Метотрексата и Миоттрексата али у концентрацијама од 8 μ M испитиваних супстанци на експресију цитоплазматског Bcl-2 протеина показано је да се експресија Bcl-2 протеина смањује у ендометријалној стромалној ћелијској линији. Експресија Bcl-2 протеина у ћелијама тертираним Метотрексатом у концентрацији од 8 μ M износила је 19.54% док за Миоттрексат исте концентрације проценат експресије Bcl-2 протеина износио је 71.35% (57). Ефекти Метотрексата и Миоттрексата на експресију каспазе 3 и активног BAXа у истоименом истраживању били су следећи: Експресија активног каспазе 3 за Метотрексат 8 μ M (7.75%) и Миоттрексат (37.36%), експресија активног BAXа за Метотрексат 8 μ M (22.9%) и Миоттрексат (32.42%) (57). Како сваки процес у нашем организму има одређену функцију и позитивне као и негативне последице, тако и ћелијска смрт не може да се посматра као процес са искључиво негативним последицама. Литературни подаци указују на вишеструку корист апоптозе под којима подразумевамо одржавање хомеостазе, у периоду интраутериног развоја учествује у формирању органа, формира отиске прстију и уништавање оболелих ћелија (131, 219) и многи други процеси. Негативне стране апоптозе које за резултат имају настанак обољења као што су малигни тумори или бенигни тумори и промене (у које убрајамо и ендометријалне хиперплазије) велики број обољења AIDS, неуродегенеративне болести- Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, шлог или аутоимунске болести) настају као резултат прекомерне активације или чак изостанка процеса апоптозе (219).

Баланс између прекомерне активације или изостанка апоптотичног процеса јесте баланс који је важан фактор одлуке између болести и здравља. Механизми који учествују у овој контроли представљени су протеинима који индукују и протеинима који инхибирају процес апоптозе.

Један од протеина који штите ћелију и индукују пут преживљавања као резултат борбе против претећих агенаса јесте цитоплазматски антиапоптотични Bcl-2 протеин. Наиме, као резултат одговора ћелије на дејство апоптотичних агенаса експресија цитоплазматског Bcl-2 протеина се смањује што резултира губитком механизма за одржавање ћелије у животу и на крају активацијом и егзекуцијом апоптотичног процеса. Главне карактеристике тумора (миоми утеруса) у стању без индуковане апоптозе као и при индукцији апоптозе помоћу лекова јесте повећана експресија цитоплазматског Bcl-2 протеина (220, 221). Као резултат повећане експресије Bcl-2 ћелија активира пут преживљавања и заобилази механизме којима се може деловати на њу.

У циљу утврђивања механизма апоптозе који до сада ниси показани на ендометријалној стромалној ћелијској линији неопходно је одредити експресију следећих протеина Bcl-2, BAX и каспазе 3, а који играју кључну улогу у процесу активације и егзекуције апоптозе.

Један од циљева нашег истраживања било је утврђивање цитоплазматске експресије Bcl-2 протеина у ендометријалној стромалној ћелијској линији након третмана испитиваним лековима (Ралоксифен, Естроген, Прогестерон, Мифепристон и комбинована истовремена примена Ралоксифена и Естрогена) (Слика 12). У истраживању које је спроведено од стране Jin Liu и сарадника показано је да Ралоксифен у дози од 10^{-9} M изазива смањење експресије Bcl-2 протеина у примарној култури ћелија изолованих из леомиома утеруса (63) док је повећање експресије Bcl-2 протеина примећено у случају апликације Прогестерона у ћелијама хуманог утерусног леомиома (222). Резултати истраживања које је вршено на Ishikawa ћелијској линији указују на то да Ралоксифен индукује апоптозу ових ћелија (221). До сличних резултата који су везани са смањењу експресију Bcl-2 протеина на ћелијским линијама карцинома јајника OVCAR-3, SKOV-3 и ZAO под дејством Мифепристона дошли су Fauvet (206), Li (223), Wang (224) са сарадницима. Наши резултати који се односе на експресију Bcl-2 протеина у цитоплазми ендометријалних стромалних ћелијских линија након третмана Ралоксифеном 10^{-9} M

(процентуална експресија Bcl2 61.41%) и Мифепристоном 10 μ M (процентуална експресија Bcl2 50.45%) (Слика 12) у позитивној су корелацији са литературним подацима. Литературни подаци везани за ефекте Прогестерона и Естрогена на способност индукције апоптозе објављени су у истраживању које је вршено од стране Viqar и сарадника (225) и Formby (226) у чијим резултатима Прогестерон у дози од 10⁻⁶M индукује апоптозу у малигним епителијалним ћелијама оваријума и ћелијској линији карцинома дојке. У нама доступној литератури нема резултата ефекта женских полних хормона на експресију Bcl-2 протеина и индукцију апоптозе у ThESC ћелијској линији. Наши резултати указују на то да се експресија Bcl-2 протеина смањује након третмана Естрогеном 10⁻⁴ M (48.13%) и Прогестероном 10⁻⁴M (51.91%). Интересантно је постојање најмање експресије Bcl2 протеина у случају истовременог комбинованог дејства Ралоксифена 10⁻⁹M и Естрогена 10⁻⁴M (31.17%).

У циљу утврђивања механизма апоптозе неопходно је одредити експресију BAX а и експресију активне (егзекуторне каспазе 3) у ендометријалним стромалним ћелијским линијама након третмана испитиваним лековима (Слика 13 и Слика 14).

Истраживање које је спроведено на ћелијским линијама карцинома простате (227) указује на то да Ралоксифен и Естроген узрокују повећање експресије каспазе 3 са пратећим смањењем експресије Bcl-2 протеина (што је у позитивној корелацији са добијеним резултатима). Истраживања која су везана за експресију BAXа у нормалном ткиву дојке и ткиву тумора дојке (228, 229) указују на то да третман Ралоксифеном не мења експресију BAXа у оба испитивана случаја. Резултати нашег истраживања који су добијени одређивањем експресије BAXа у ThESC ћелијској линији након појединачног третмана Ралоксифеном у дози од 10⁻⁹M (Слика 13) у супротности су са наведеним литературним подацима 228 и 229. Наиме експресија BAXа након третмана Ралоксифеном повећана је у односу на контролне ћелије и износи 19.97% док највећи степен експресије BAXа присутан је код истовременог комбинованог третмана Ралоксифеном и Естрогеном (32.11%). У истраживању које су спровели Palomba и сарадници (230) показано је да Ралоксифен узрокује промену у односу Bcl-2/BAX чиме фаворизује и идукује апоптозу у леомиомима утеруса постменопаузалних жена.

Резултати нашег истраживања указују на то да након третмана ћелија испитиваним супстанцама расте експресија N терминалног тј. активног ВАХа (Слика 13) (карактеристичан за митохондрије).

Истраживање спроведено на Ishikawa ћелијској линији (221), ћелијској линији карцинома простате показало (227, 232) је да Ралоксифен узрокује повећање експресије егзекуторне каспазе 3 и узрокује реализацију апоптотичног пута зависног од митохондрија. Слични резултати који су везани за повећање експресије и егзекуцију апоптозе од стране активне каспазе 3 узроковану третманом Мифепристоном добијени су у истраживањима која су обухватила лутенуизирајуће гранулоза ћелије (233), ћелије карцинома дојке (234) и Прогестероном за Jurkat (235) ћелије и хумане сперматозое (236). Литературни подаци наглашавају улогу Естрогена у процесу апоптозе у *in vivo* моделима анти-хормонске резистенције (237, 238). Активација апоптозе од стране Естрогена заснива се на промени пермеабилитета митохондријалне мембране као и промени у експресији Bcl-2 протеина (239). На основу резултата нашег истраживања (Слика 14) можемо закључити да се експресија активне каспазе 3 повећава почевши од Ралоксифеном третираних ћелија (15.42%) до највећег степена експресије активне каспазе 3 који је био присутан код истовременог комбинованог третмана Ралоксифеном и Естрогеном (35.05%).

На основу резултата нашег истраживања можемо закључити да све испитиване супстанце индукују апоптозу у ендометријалној стромалној ћелијској линији као и то да је највећи степен апоптотичног дејства (при најнижим токсичним дозама) присутан у случају истовремене апликације Ралоксифена и Естрогена. Овим можемо рећи да се пут којим испитивани лекови индукују апоптозу остварује смањењем експресије Bcl-2, повећањем експресије ВАХа и активацијом каспазе 3, што указује на индукцију апоптозе од стране митохондријалног пута. Такође резултати указују на то да Естроген повећава цитотоксични ефекат Ралоксифена, Метотрексата и Миотрексата. У вези са другим полним хормоном, Прогестероном, резултати нашег истраживања указују на то да Прогестерон смањује или не мења значајно цитотоксични ефекат Мифепристона, Метотрексата и Миотрексата када се примени у пред или посттретману.

Међутим у резултатима се показује да посттретман Ралоксифеном појачава цитотоксични ефекат Метотрексата и Миотрексата који они појединачно испољавају на ендометријалну стромалну ћелијску линију. Наши резултати су у позитивној корелацији

са резултатима истраживања које су објавили Fryar (196) и Das (197) који су показали да постретман Ралоксифеном увећава цитотоксични ефекат Метотрексата и 5 флуороурацила на ћелије карцинома дојке и коштане сржи. У циљу испитивања механизма апоптотичног дејства поменутих комбинација одређивана је експресија Bcl-2 и BAX протеина након третмана испитиваним супстанцама у периоду од 24 часа (Слика 15). Добијени резултати су у позитивној корелацији са нивоима експресије испитиваних протеина као и механизму апоптотичног дејства. Наиме експресија Bcl-2 протеина у ћелијама које су третиране Метотрексатом или Миотрексатом у дозама од 1 μ M потом Ралоксифеном у дози од 10⁻⁹M, била је смањена у односу на контролну групу ћелија. За комбинацију Метотрексат-Ралоксифен износила је 15.99% док је за комбинацију Миотрексат-Ралоксифен износила 13.22%.

Одређивање експресије BAX код ћелија карцинома стомака (240) показала су да Метотрексат изазива повећање експресије овог протеина. У истраживању које је спроведено на пацовима примећено је да апликација Метотрексата зауставља процес сперматогенезе и индукује апоптозу germ ћелија променом у односу експресије Bcl-2/BAX у корист BAXа. Резултати експресије Bcl-2 и BAXа након посттретмана Ралоксифеном (предходио третман Метотрексатом или Миотрексатом) које смо добили у нашем експерименту позитивно корелирају са литературним подацима и указују на активацију апоптотичног пута митохондријалним механизмом.

6. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата који су били предмет истраживања докторске дисертације донети су следећи закључци:

- Све испитиване супстанце испољавају цитотоксични ефекат на ендометријалну стромалну ћелијску линију
- Ефекат женског полног хормона Естрогена и селективног модулятора естрогенских рецептора Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата усмерена је у правцу повећања цитотоксичног ефекта (могући механизам у смислу узајамног синергистичког ефекта)

- Апликацијом нетоксичних доза Метотрексата или Миотрексата потом у Ралоксифена у дози од 10^{-9} М долази до појаве повећања цитотоксичног ефекта Метотрексата или Миотрексата (интерреакција Метотрексата или Миотрексата са Ралоксифеном амплификује и значајно повећава цитотоксични ефекат)
- Прогестерон и модулатор прогестеронског рецептора Мифепристон, комбинованом применом умањују цитотоксичне ефекте испитиваних супстанци (могући антагонистички ефекат)
- Механизам апоптозе испитиваних супстанци одвија се активацијом митохондријалног пута (смањењем експресије цитоплазматског Bcl-2 протеина, као и повећањем у експресији BAX протеина и активне каспазе3)
- Потребно је испитати механизме активације и индукције апоптотичних механизма који се одвијају под дејством испитиваних лекова на осталим ћелијским линијама тумора као и на животињским моделима људских болести.

7. ЛІТЕРАТУРА

1. Jiménez-Ayala M, Jiménez-Ayala B: Endometrial Adenocarcinoma: Prevention and Early Diagnosis. Cytology of normal endometrium. Basel, S.Karger AG, (2008), pp 32-39
ISBN: 978-3-8055-8480-7, e-ISBN: 978-3-8055-8481-4
2. Ferenczy A, Bergeron C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. Ann N Y Acad Sci. 1991;622:6-27.
3. Mary J. Laws, Robert N. Taylor, Neil Sidell, Francesco J. DeMayo, John P. Lydon, David E. Gutstein, Milan K. Bagchi and Indrani C. Bagchi. Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. NIH Public Access. 2008;135(15): 2659–2668
4. Salman MC, Usubutun A, Boynukalin K, Yuce K. Comparison of WHO and endometrial intraepithelial neoplasia classifications in predicting the presence of coexistent malignancy in endometrial hyperplasia. J Gynecol Oncol. 2010;21(2):97-101
5. S. Fu, J. C. Gambone, and J. S. Berek. Pathophysiology and management of endometrial hyperplasia and carcinoma. West J Med. 1990; 153(1): 50–61.
6. Gültekin M, Dogan NU, Aksan G, Ozgul N. Management of endometrial hyperplasia. Minerva Ginecol. 2010;62(5):433-45.
7. Reed SD, Newton KM, Clinton WL, Epplein M, Garcia R, Allison K, Voigt LF, Weiss NS. Incidence of endometrial hyperplasia. Am J Obstet Gynecol. 2009;200(6):678.e1.
8. Anastasiadis PG, Skaphida PG, Koutlaki NG, Galazios GC, Tsikouras PN, Liberis VA. Descriptive epidemiology of endometrial hyperplasia in patients with abnormal uterine bleeding. Eur J Gynaecol Oncol. 2000;21(2):131-4.

9. George L. Mutter, Endometrial Precancers: The Benign Endometrial Hyperplasia Sequence and EIN. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26(2):103-14.
10. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985;56(2):403-12.
11. Ana-Maria Bamberger, Chritoph M. Bamberger and Heinrich M. Schulte. Molecular mechanism of proliferation in endometrial tumor cells. *Human reproduction.* 1998; 4(5);526-531
12. L. T. Van der Ven, P. J. Roholl, T. Gloudemans, S. C. Van Buul-Offers, M. J. Welters, B. A. Bladergroen, J. A. Faber, J. S. Sussenbach, and W. Den Otter. Expression of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and IGF binding protein-3 in normal, begin and malignant smooth muscle tissues. *Br J Cancer.* 1997; 75:1631–40.
13. Rosemary O'Connor, Andrea Kauffmann-Zeh, Yimao Liu, Sophie Lehar, Gerard I. Evan, Renato Baserga, and Walter A. Blattler. Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1997;17(1):427–35.
14. Hala Maghraby, Amani Kazem. Expression patterns of apoptosis related proteins Bcl-2 and Bak in endometrial hyperplasia and carcinoma and their correlation to estrogen and progesterone receptor status. *Jornal of the medical research institute (JMRI).* 2007;28(3):254-63.
15. T.Harada, A.Kaponis, T.Iwabe, F.Taniguchi, G.Makrydimas,N.Sofkitis, M.Paschopoulos, E.Paraskevaidis and N.Terakawa. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Human Reproduction Update.* 2004;10(1): 29-38.
19. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nakano R. Apotosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1999;15:1799-809

20. Pal'tsev MA, Demura SA, Kogan EA, Jaques G, Zende B. Role of Bcl-2, Bax and Bak in spontaneous apoptosis and proliferation in neuroendocrine lung tumors: immunohistochemical study. *Bull Exp Bio Med* 2000;130: 697-700.
21. Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV. Differential expression of members of the Bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of Bax. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2738-46.
22. Vaskiyuo TE, Stenback F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. Apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 165(1-2):75-83.
23. A. Li, J.C. Felix, J. Hao, P. Minoo and J.K. Jain. Menstrual-like breakdown and apoptosis in human endometrial explants. *Hum. Reprod.* 2005;20(6):1709-1719.
24. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, et al. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod.* 2001;16:2103–2108.
25. Jordan S, Randall LM, Karamurzin Y, Ward P, Lin F, Brewster W, Monk BJ. Differentiating squamous cell carcinoma of the cervix and epithelioid trophoblastic tumor. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(5):918-22.
26. Ushijima K, Yahata H, Yoshikawa H, Konishi I, Yasugi T, Saito T, Nakanishi T, Sasaki H, Saji F, Iwasaka T, Hatae M, Kodama S, Saito T, Terakawa N, Yaegashi N, Hiura M, Sakamoto A, Tsuda H, Fukunaga M, Kamura T. Multicenter phase II study of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for endometrial carcinoma and atypical hyperplasia in young women. *J Clin Oncol.* 2007;25(19):2798-803.
27. SD Reed, LF Voigt, KM Newton, R Garcia, HK Allison, M Epplen, D Jordan, E Swisher and NS Weiss. Progestin Therapy of Complex Endometrial Hyperplasia With and Without Atypia. *Obstet Gynecol.* 2009;113(3): 655–662.

28. Davies GC, Huster WJ, Shen W, Mitlak B, Plouffe L Jr, Shah A, Cohen FJ. Endometrial response to raloxifene compared with placebo, cyclical hormone replacement therapy, and unopposed estrogen in postmenopausal women. *Menopause*. 1999;6(3):188-95.
29. Henghe Tian and Bruce N. Cronstein. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate. Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007;65(3):168-73
30. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(10):1520-4.
31. Bruce N. Cronstein. Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Pharmacological Reviews*. 2005;57(2):163-172
32. Miheller P, Kiss LS, Mandel M, Lakatos PL. Methotrexate: Should We Start Using it in Clinical Practice? *Curr Drug Targets*. 2013 May 6. [Epub ahead of print]
33. Cheng XL, Zhou TY, Li B, Li MY, Li L, Li ZQ, Lu W. Methotrexate and 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside exert synergistic anticancer action against human breast cancer and hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(7):951-9
34. Ueda T, Yamauchi T, Kawai T, Ohono Y, Kawakami S, Yonese J. Low dose COMPE. Cisplatin, vincristine, methotrexate, peplomycin, etoposide chemotherapy for advanced testicular cancer. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1994;85(4):626-31.
35. Herbert A. Dietzel, Richard H. Schwarz. Primary Treatment of Choriocarcinoma With Methotrexate. *Arch Surg*. 1966;92(2):301-303.

36. Junichi Yoshimura, Kenichi Nishiyama, Hiroshi Mori, Hideaki Takahashi, Yukihiro Fujii. Intrathecal chemotherapy for refractory disseminated medulloblastoma. *Childs Nerv Syst.* 2008;24(5):581-5.
37. van Dalen EC, van As JW, de Camargo B. Methotrexate for high-grade osteosarcoma in children and young adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;11(5):CD006325. doi: 10.1002/14651858.
38. Peyrade F, Cupissol D, Geoffrois L, Rolland F, Borel C, Ciais C, Faivre S, Guigay J. Systemic treatment and medical management of metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: Review of the literature and proposal for management changes. *Oral Oncol.* 2013;49(6):482-91.
39. Živanović A, Arsenijević S, Janković S, Jevremović M. Methotrexat in the therapy of uterus leiomyomas. *Archive of Oncology.* 1998;6(3): 95-7.
40. Brastianos PK, Batchelor TT. Primary central nervous system lymphoma: overview of current treatment strategies. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012;26(4):897-916.
41. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P and Revillard JP. Immunosuppressive Properties of Methotrexate: Apoptosis and Clonal Deletion of Activated Peripheral T Cells. *J Clin Invest.* 1998;102(2):322–8.
42. Nakazawa F, Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Sawai T, Uzuki M et al. Methotrexate inhibits rheumatoid synovitis by inducing apoptosis. *The Journal of Rheumatology.* 2001; 28(8):1800-8.
43. Shiroky JB, Neville C, Esdaile JM, Choquette D, Zummer M, Hazeltine M et al. Low-dose methotrexate with leucovorin (folinic acid) in the management of rheumatoid arthritis. Results of a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 1993;6(6):795-803.

44. Floros KV, Maroulio T, Andreas S. Topotecan and methotrexate alter expression of the apoptosis-related genes BCL2, FAS and BCL2L12 in leukemic HL-60 cells. *Biological chemistry*. 2006;387(12):1629-33.
45. Chena YX, Lva WG, Chenb HZ, Yeb F, Xiea X. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;143(2):107-11.
46. Merckle CM, Moor IM, Penton BS, Torres BJ, Schaeffer RC, Montgomery DW. Methotrexate causes apoptosis in postmitotic endothelial cells. *Biological Research For Nursing*. 2000;2(1):5-14.
47. Richard U, Hausknecht MD. Methotrexate and Misoprostol to Terminate Early Pregnancy. *N Engl J Med*. 1995;333(9):537-40.
48. Mol F, Mol BW, Ankum WM, van der Veen F, Hajenius PJ. Current evidence on surgery, systemic methotrexate and expectant management in the treatment of tubal ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;14(4):309-19.
49. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*. 1986;314:729-35.
50. Nash RA, Pineiro LA, Storb R, Deeg JH, Fitzsimmons WE, Furlong T et al. FK506 combination with methotrexate for the prevention of graft-versus-host disease after marrow transplantation from matched unrelated donors. *Blood*. 1996;88:3634-41.
51. Chao NJ, Schmidt GM, Niland JC, Amylon MD, Dagens AC, Long GD et al. Cyclosporine, methotrexate and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1993;329:1225-30.

52. Olsen SL, O'Connell JB, Bristow MR and Renlund DG. Methotrexate as an adjunct in the treatment of persistent mild cardiac allograft rejection. *Transplantation*. 1990;50:773–5.
53. Gorlic R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med*. 1996;335:1041–8.
54. Miyachi H, Takemura Y, Ando Y, Scanlon KJ. The role of folates in the development of methotrexate resistance in human leukemia cell line K562. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1992; 119:101–5.
55. Miyachi H, Takemura Y, Kobayashi H, Ando K, Ando Y. Differential alterations of dihydrofolate reductase gene in human leukemia cell lines made resistant to various folate analogues. *Jpn J Cancer Res*. 1993;84:9–12.
56. Miyachi H, Takemura Y, Kobayashi H, Ando Y. Expression of variant dihydrofolate reductase with decreased binding affinity to antifolates in MOLT-3 human leukemia cell lines resistant to trimetrexate. *Cancer Lett*. 1995;88:93–9.
57. Татјана Кастратовић. Докторска дисертација. Поређење цитотокичног и апоптогичног ефекта Миотрексата и Метотрексата *in vivo*. Универзитет у Крагујевцу. 2011.
58. Birkhäuser M. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis, *Ther Umsch*. 2012;69(3):163-72.
59. Zhang YX, Kong CZ. The role of mitogen-activated protein kinase cascades in inhibition of proliferation in human prostate carcinoma cells by raloxifene: an *in vitro* experiment. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008;88(4):271-5

60. Tu Z, Ma Y, Tian J, Li H, Akers W, Achilefu S, Gu Y. Estrogen receptor β potentiates the antiproliferative effect of raloxifene and affects the cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(7):1091-103.
61. D. Agnusdei, N. Iori. Raloxifene: Results from the MORE study. *J Musculoskel Neuron Interact* 2000;1(2):127-132
62. Victor G. Vogel, Joseph P. Costantino, D. Lawrence Wickerham, Walter M. Cronin, Reena S. Cecchini, James N. Atkins, Therese B. Bevers, Louis Fehrenbacher, Eduardo R. Pajon, James L. Wade, André Robidoux, Richard G. Margolese, Joan James, Scott M. Lippman, Carolyn D. Runowicz, Patricia A. Ganz, Steven E. Reis, Wortia McCaskill-Stevens, Leslie G. Ford, V. Craig Jordan, Norman Wolmark. Effects of Tamoxifen vs Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease OutcomesThe NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial. *JAMA*. 2006; 295(2)3.
63. Jin Liu, Hiroya Matsuo, Qin Xu, Wei Chen, Jiayin Wang and Takeshi Maruo. Concentration-dependent effects of a selective estrogen receptor modulator raloxifene on proliferation and apoptosis in human uterine leiomyoma cells cultured in vitro. *Hum. Reprod*. 2007;22(5):1253-1259.
64. Shazer RL, Jain A, Galkin AV, Cinman N, Nguyen KN, Natale RB, Gross M, Green L, Bender LI, Holden S, Kaplan L, Agus DB. Raloxifene, an oestrogen-receptor-beta-targeted therapy, inhibits androgen-independent prostate cancer growth: results from preclinical studies and a pilot phase II clinical trial. *BJU Int*. 2006;97(4):691-7.
65. Arevalo MA, Diz-Chaves Y, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells. *J Neuroendocrinol*. 2012;24(1):183-90.
66. Yaffe K, Krueger K, Cummings SR, Blackwell T, Henderson VW, Sarkar S, Ensrud K, Grady D. Effect of raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older

women: the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) randomized trial. *Am J Psychiatry*. 2005;162(4):683-90.

67. Steven R. Goldstein, Suresh Siddhanti, Angelina V. Ciaccia and Leo Plouffe Jr. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Human reproduction update* 2000;6(3):212-224.

68. Meng Kian Tee, Inez Rogatsky, Christina Tzagarakis-Foster, Aleksandra Cvorovic, Jinping An, Robert J. Christy, Keith R. Yamamoto, and Dale C. Leitman. Estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Target Genes with Estrogen Receptors α and β in Box. *Mol Biol Cell*. 2004(3): 1262–1272.

69. Benita S Katzenellenbogen, Inho Choia, Regis Delage-Mourroux, Tracy R Edigerb, Paolo G.V Martinia, Monica Montanoa, Jun Suna, Karen Weisa, John A Katzenellenbogen. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2000;74(5):279–285.

70. Williams-Brown MY, Salih SM, Xu X, Veenstra TD, Saeed M, Theiler SK, Diaz-Arrastia CR, Salama SA. The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;126(3-5):78-86.

71. Guila Dayan, Mathieu Lupien, Anick Auger, Silvia I. Anghel, Walter Rocha, Sebastien Croisette, John A. Katzenellenbogen, and Sylvie Mader. Tamoxifen and Raloxifene Differ in Their Functional Interactions with Aspartate 351 of Estrogen Receptor α . *Mol Pharmacol*. 2006;70:579–588.

72. Yuezhou Chen, Yan Wang, Yaling Zhuang, Feng Zhou, Lili Huang. Mifepristone Increases the Cytotoxicity of Uterine Natural Killer Cells by Acting as a Glucocorticoid Antagonist via ERK Activation. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36413.

73. Nathalie Chabbert-Buffet, Geri Meduri, Philippe Bouchard and Irving M. Spitz. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Human Reproduction Update*. 2005;11(3):293–307.
74. F. Cadepond, A. Ulmann and E.E. Baulieu. RU-486 (Mifepristone): Mechanisms of action and clinical uses. *Annu. Rev. Med.* 1997;48:129-56.
75. Heikinheimo O, Kekkonen R, Lahteenmaki P. The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogestin action. *Contraception*. 2003;68:421-426
76. Eric A. Schaff. Mifepristone: ten years later. *Contraception*. 2010;8:1-7.
77. Julietta Fiscella, Thomas Bonfiglio, Paul Winters, Steven H. Eisinger and Kevin Fiscella. Distinguishing features of endometrial pathology following exposure to the progesterone receptor modulator Mifepristone. *Hum Pathol*. 2011;42(7):947-953.
78. Engman M, Skoog L, Soderqvist G, Gemzell-Danielsson K. The effect of mifepristone on breast cell proliferation in premenopausal women evaluated through fine needle aspiration cytology. *Hum Reprod*. 2008;23:2072-2079.
79. Engman M, Granberg S, Williams AR, Meng CX, Lalitkumar PGL, Gemzell-Danielsson K. Mifepristone for treatment of uterine leiomyoma. A prospective randomized placebo controlled trial. *Hum Reprod*. 2009;24:1870-1879.
80. Peter Gallagher and Allan H Young. Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2006;2(1):33–42.
81. Bagaria M, Suneja A, Vaid NB, Guleria K, Mishra K. Low-dose mifepristone in treatment of uterine leiomyoma: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009;49:77-83

82. Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Ulmann A, Baulieu EE, Yen SS. Treatment of endometriosis with the antiprogesterone mifepristone (RU486). *Fertil Steril*. 1996;65:23-28.
83. David L. Buchanan, Tommy Setiawan, Dennis B. Lubahn, Julia A. Taylor, Takeshi Kurita, Gerald R. Cunha and Paul S. Cooke. Tissue Compartment-Specific Estrogen Receptor- α Participation in the Mouse Uterine Epithelial Secretory Response. *Endocrinology*. 1999;140(1):484-491.
84. P. S. Cooke, D. L. Buchanan, P. Young, T. Setiawan, J. Brody, K. S. Korach, J. Taylor, D. B. Lubahn, And G. R. Cunha. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94:6535–6540.
85. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 1997;138(11):4613-21.
86. Knapp P, Chabowski A, Błachnio-Zabielska A, Walentowicz-Sadlecka M, Grabiec M, Knapp P. Expression of Estrogen Receptors (α , β), Cyclooxygenase-2 and Aromatase in normal endometrium and endometrioid cancer of uterus. *Adv Med Sci*. 2013;24:1-8.doi:10.2478/v10039-012-0055-1.
87. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. 2013;19(3):197-209.
88. Bruce Ettinger, Harry K. Genant and Christopher E. Cann. Long-Term Estrogen Replacement Therapy Prevents Bone Loss and Fractures. *Ann Intern Med*. 1985;102(3):319-324.

89. Shimizu I, Ito S. Protection of estrogens against the progression of chronic liver disease. *Hepatol Res.* 2007;37(4):239-47.
90. Xin S, Liu W, Cheng B. Biological effects of estrogen on capillary vessel formation in wound healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2009;23(12):1502-5.
91. Douglas W. Losordo, Jeffrey M. Isner. Estrogen and Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2001;2:6-12.
92. Findlay JK, Britt K, Kerr JB, O'Donnell L, Jones ME, Drummond AE, Simpson ER. The road to ovulation: the role of oestrogens. *Reprod Fertil Dev.* 2001;13(7-8):543-7.
93. Groothuis PG, Dassen HH, Romano A, Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update.* 2007;13(4):405-17.
94. Araki S, Minakami H, Konuma S, Akabori A, Tamada T. Analysis of the positive feedback effect of estrogen on the release of gonadotropin in women. *Endocrinol Jpn.* 1978;25(1):59-65.
95. Warner M, Nilsson S, Gustafsson JA. The estrogen receptor family. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999;11(3):249-54.
96. Ana Aranda and Angel Pascual. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1269-1304.
97. Moutsatsou, P. and Sekeris, C.E. Estrogen and progesterone receptors in the endometrium. *Ann. NY Acad. Sci.* 1997;816:99-115.
98. Billon-Galés A, Krust A, Fontaine C, Abot A, Flouriot G, Toutain C, Berges H, Gadeau AP, Lenfant F, Gourdy P, Chambon P, Arnal JF. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor-

alpha is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(32):13311-6.

99. Peters GA, Khan SA. Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol*. 1999;13(2):286-96.

100. Mosselman S., Polman, J., and Dijkema, R. ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996;392:49–53.

101. Böttner M, Thelen P, Jarry H. Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;doi:pii: S0960-0760(13)00052-6. 10.1016/j.jsbmb.2013.03.003.

102. Marc Ruff, Monique Gangloff, Jean Marie Wurtz and Dino Moras. Estrogen receptor transcription and transactivation Structure–function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res* 2000;2:353–359.

103. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M: The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:122–126.

104. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863–870.

105. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S & Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:19858–19862.

106. Ogawa, S., Eng, V. Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W. Roles of Estrogen Receptor-Alpha Gene Expression in Reproduction-Related Behaviors in Female Mice. *Endocrinology*. 1998;139(12):5070-5081.
107. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GGJM and Gustafsson J-Å. Mouse estrogen receptor b forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor a. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1486–1496.
108. Halasz M, Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoplast invasion. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):43-50.
109. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:339-55.
110. D X Wen, Y F Xu, D E Mais, M E Goldman and D P McDonnell. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol*. 1994;14(12):8356-8364.
111. Giangrande PH, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res*. 1999;54:291-313.
112. Graham JD, Clarke CL. Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res*. 2002;4(5):187-90.
113. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*. 2004;128(2):139-46.
114. Conneely OM. Progesterone receptors and ovulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(198):37-44. doi: 10.1007/978-3-642-02062-9_3.

115. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2963–2971.
116. Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003;8(2):205-14.
117. Mc Cormack O, Harrison M, Kerin MJ, McCann A. Role of the progesterone receptor (PR) and the PR isoforms in breast cancer. *Crit Rev Oncog.* 2007;13(4):283-301.
118. Diep CH, Charles NJ, Gilks CB, Kalloger SE, Argenta PA, Lange CA. Progesterone receptors induce FOXO1-dependent senescence in ovarian cancer cells. *Cell Cycle.* 2013;12(9):1433-49.
119. Shuk-Mei Ho. Estrogen, Progesterone and Epithelial Ovarian Cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003;1:73.
120. Andersen JL, Kornbluth S. The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. *Mol Cell.* 2013;49(3):399-410.
121. Alfons Lawen. Apoptosis—an introduction. *BioEssays* 2003;25:888–896
122. Danial NN, Krosmeier SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116:205-19.
123. Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr Med Chem.* 2009;16(31):4058-65.
124. R. Ramírez Chamond, J. Carracedo Añón, C. Moreno Aguilar y F. Guerra Pasadas. Apoptosis and disease. *Alergol Inmunol Clin.* 1999;14(6):367-374.
125. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 2002;1:19-30.

126. Rebecca SY Wong . Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011;30:87
127. Zivny J, Klener P Jr, Pytlik R, Andera L. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies *Curr Pharm Des.* 2010;16(1):11-33.
128. Neeta Singh. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy : An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2007;22(2):6-16.
129. Katragadda L, Carter BZ, Borthakur G. XIAP antisense therapy with AEG 35156 in acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013;22(5):663-70.
130. Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol Chem.* 2013;394(7):831-43.
131. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14:1237–1243.
132. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16:3–11.
133. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19:107–120.
134. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;111(9):1198-207.

135. Walczak H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(5):a008698
136. Krammer PH. CD95s deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000;407:789-95.
137. Grunert M, Gottschalk K, Kapahnke J, Gündisch S, Kieser A, Jeremias I. The adaptor protein FADD and the initiator caspase-8 mediate activation of NF- κ B by TRAIL. *Cell Death Dis.* 2012;3:e414.
138. Lee EW, Seo J, Jeong M, Lee S, Song J. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep.* 2012;45(9):496-508.
139. Segal M, Niazi S, Simons MP, Galati SA, Zangrilli JG. Bid activation during induction of extrinsic and intrinsic apoptosis in eosinophils. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(7):518-24.
140. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S93-104.
141. Gérecová G, Kopanicová J, Jaká P, Běhalová L, Juhásová B, Bhatia-Kiššová I, Forte M, Polčic P, Mentel M. BH3-only proteins Noxa, Bik, Bmf and Bid activate Bax and Bak indirectly when studied in yeast model. *FEMS Yeast Res.* 2013. doi: 10.1111/1567-1364.12074.
142. Song G, Chen GG, Hu T, Lai PB. Bid stands at the crossroad of stress-response pathways. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(6):584-92.
143. Zhao Hongmei. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. "Apoptosis and Medicine", Chapter 1, book edited by Tobias M. Ntuli, ISBN 978-953-51-0701-9, Published: August 16, 2012 under CC BY 3.0 license DOI: 10.5772/50129

144. Stephen W. G. Tait & Douglas R. Green. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11:621-632.
145. Grant Dewson and Ruth M. Kluck. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci*. 2009;122:2801-2808.
146. Susan Haupt, Michael Berger, Zehavit Goldberg and Ygal Haupt. Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science*. 2003;116:4077-4085.
147. Li H, Bergeron L, Cryns V, Pastemack MS, Zhu H, Shi L et al. Activation of caspase-2 in apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21010-7.
148. Rebecca SY Wong . Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011;30:87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
149. Cerretti, D. P., C. J. Kozlosky, B. Mosley, N. Nelson, K. Van Ness, T. A. Greenstreet, C. J. March, S. R. Kronheim, T. Druck, L. A. Cannizzaro et al., Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1992;256(5053):97–100.
150. Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, Keith O. Elliston, Julia M. Ayala, Francesca J. Casano, Jayne Chin, Gloria J.-F. Ding, Linda A. Egger, Erin P. Gaffney, Guadalupe Limjuco, Oksana C. Palyha, S. M. Raju, Anna M. Rolando, J. Paul Salley, Ting-Ting Yamin, Terry D. Lee, John E. Shively, Malcolm Maccross, Richard A. Mumford, John A. Schmidt & Michael J. Tocci. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992;356:768–774.
151. Yigong Shi. Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell*. 2004;117:855–858.
152. Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem*. 2003;39:25-40.

153. Howard Y. Chang and Xiaolu Yang. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821–846.
154. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1028-42.
155. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
156. Sarah H. MacKenzie, A. Clay Clark. Death by Caspase Dimerization. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2012;747:55-73.
157. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):56-65.
158. Guerrero AD, Schmitz I, Chen M, Wang J. Promotion of Caspase Activation by Caspase-9-mediated Feedback Amplification of Mitochondrial Damage. *J Clin Cell Immunol.* 2012;3(3).
159. Shujun Yuan and Christopher W. Akey. Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. *Structure.*2013;21(4):501-515.
160. Julia C. Hoffmann, Alexander Pappa, Peter H. Krammer and Inna N. Lavrik. A New C-Terminal Cleavage Product of Procaspase-8, p30, Defines an Alternative Pathway of Procaspase-8 Activation. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(16):4431-4440.
161. David W. Chang, Zheng Xing, Vanessa L. Capacio, Marcus E. Peter and Xiaolu Yang. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *The EMBO Journal.* 2003;22:4132 – 4142.

162. Fadeel B, Ottosson A, Pervaiz S. Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):443-52.
163. Thibaud T, Renault, Konstantinos V. Floros, Jerry E. Chipuk. BAK/BAX activation and cytochrome c release assays using isolated mitochondria. *Methods.* 2013;61(2):146-55.
164. Seervi M, Joseph J, Sobhan PK, Bhavya BC, Santhoshkumar TR. Essential requirement of cytochrome c release for caspase activation by procaspase-activating compound defined by cellular models. *Cell Death Dis.* 2011;2:e207. doi: 10.1038/cddis.2011.90.
165. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1415-30.
166. J.M. Adams, C.S. Cory. The Bcl-2 Protein Family:Arbiters of Cell Survival. *Science.* 1998;281:1322–1325.
167. Adams, J. M., and Cory, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26:61–66.
168. Nikolic I, Kastratovic T, Zelen I, Zivanovic A, Arsenijevic S, Mitrovic M. Cytosolic pro-apoptotic SPIKE induces mitochondrial apoptosis in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395(2):225-31.
169. Stojanovic M, Germain M, Nguyen M, Shore GC. BAP31 and its caspase cleavage product regulate cell surface expression of tetraspanins and integrin-mediated cell survival. *J Biol Chem.* 2005;280(34):30018-24.
170. Douglas R. Green, John C. Reed. Mitochondria and Apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-1312.
171. K.G. Wolter, Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi, R.J.Youle, J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Cell Biol.*1997;139:1281–1292.

172. Anthony J. Valentijn, John-Paul Upton, Nicola Bates and Andrew P. Gilmore. Bax targeting to mitochondria occurs via both tail anchor dependent and independent mechanisms. *Cell Death Differ.* 2008;15(8):1243–1254.
173. A Nechushtan, C L Smith, Y T Hsu, and R J Youle. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* 1999;18(9): 2330–2341.
174. Peter E. Czabotar et. al., Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell.* 2013;152(3):Pages 519–531.
175. Letialo A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Krosmeier SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototipe cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2002;2:183-92.
176. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ et al. Proapoptotic BAX and BAK a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292:727-30.
177. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 2008;18(4):157-64.
178. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644(2-3):83-94.
179. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S2-19. doi: 10.1038/onc.2009.39.
180. Hamsa Puthalakath, Lorraine A. O'Reilly, Priscilla Gunn, Lily Lee, Priscilla N. Kelly, Nicholas D. Huntington, Peter D. Hughes, Ewa M. Michalak, Jennifer McKimm-Breschkin, Noburo Motoyama, Tomomi Gotoh, Shizuo Akira, Philippe Bouillet and Andreas Strasser. ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell.* 2007;129:1337–1349.

181. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1998;8(8):324-30.
182. Philippe Bouillet and Andreas Strasser. BH3-only proteins — evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci.* 2002;115:1567-1574.
183. SHUNJUN ZHAO, GENXIA LI, LI YANG, LEI LI and HONGYU LI. Response-specific progesterin resistance in a newly characterized Ishikawa human endometrial cancer subcell line resulting from long-term exposure to medroxyprogesterone acetate. *ONCOLOGY LETTERS* 2013; 5: 139-144.
184. Xiao-Yu P, Yan J, Cui-Ping F, Ya-Nan W, Hua L, Hua-Jun L. Altered claudin-4 expression in progesterone-treated endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa. *Int J Gynecol Cancer.* 2012; 22(9):1585-90.
185. Mirkin S, Komm BS. Tissue-selective estrogen complexes for postmenopausal women. *Maturitas.* 2013 doi: 10.1016/j.maturitas.2013.06.003.
186. Paszkiewicz-Gadek A, Porowska H, Pietruczuk M, Haczynski J, Kisiel DG, Wolczynski S. Effect of estradiol and raloxifene on MUC1 expression and adhesive properties of Ishikawa cells. *Oncol Rep.* 2005;14(2):583-9.
187. Paszkiewicz-Gadek A, Porowska H, Anchim T, Wołczyński S, Gindzieński A. Biosynthesis of MUC1 mucin in human endometrial adenocarcinoma is modulated by estradiol and tamoxifen. *Gynecol Endocrinol.* 2003;17(1):37-44.
188. Fa-lin YANG, Ke-qing HU, Xin WANG, Zi-mo LIU, Qin HU, Ji-fu LI, Hong HE. Combination of raloxifene, aspirin and estrogen as novel paradigm of hormone replacement therapy in rabbit model of menopause. *Acta Pharmacologica Sinica* (2011) 32: 1031–1037.

189. Stovall DW, Utian WH, Gass ML, Qu Y, Muram D, Wong M, Plouffe L Jr. The effects of combined raloxifene and oral estrogen on vasomotor symptoms and endometrial safety. *Menopause*. 2007;14(3 Pt 1):510-7.
190. Neven P, Quail D, Lévrier M, Aguas F, Thé HS, De Geyter C, Glant MD, Beck H, Bosio-LeGoux B, Schmitt H, Hottgenroth A, Nickelsen T. Uterine effects of estrogen plus progestin therapy and raloxifene: adjudicated results from the EURALOX study. *Obstet Gynecol*. 2004;103(5 Pt 1):881-91.
191. Wołczyński S, Surazyński A, Swiatecka J, Pałka J. Estrogenic and antiestrogenic effects of raloxifene on collagen metabolism in breast cancer MCF-7 cells. *Gynecol Endocrinol*. 2001;15(3):225-33.
192. Carneiro AL, de Cassia de Maio Dardes R, Haidar MA. Estrogens plus raloxifene on endometrial safety and menopausal symptoms--semisystematic review. *Menopause*. 2012;19(7):830-4.
193. Wang TH, Xiang QL, Chen JW, Pan H, Cui YH. Raloxifene plus 17beta-estradiol inhibits proliferation of primary cultured vascular smooth muscle cells and human mammary endothelial cells via the janus kinase/signal transducer and activator of transcription3 cascade. *Eur J Pharmacol*. 2007;561(1-3):7-13.
194. Xiang QL, Chen Y, Lin GP, Tan Z, Wang TH. Effects of selective estrogen receptor modulator raloxifene plus 17-beta estradiol in aorta and mammary gland of female experimental atherosclerosis rabbits and possible involvement of ERK signal transduction pathway. *Chin J Physiol*. 2006;49(3):132-40.
195. Valiati B, Capp E, Edelweiss MI, de Freitas FM, Wender MC. Effect of raloxifene and low-dose percutaneous 17beta-estradiol on menopause symptoms and endometrium--a randomized controlled trial. *Maturitas*. 2009;62(1):81-4.

196. Fryar EB, Das JR, Davis JH, Desoto JA, Laniyan I, Southerland WM, Bowen D. Raloxifene attenuation of 5-FU/methotrexate cytotoxicity in human breast cancer cells: the importance of sequence in combination chemotherapy. *Anticancer Res.* 2006;26(3A):1861-7.
197. Das JR, Fryar EB, Epie NN, Southerland WM, Bowen D. Raloxifene attenuation of methotrexate cytotoxicity in human bone marrow by sequence-dependent administration of raloxifene, 5-FU/methotrexate. *Anticancer Res.* 2006;26(3A):1877-83.
198. De Soto JA, Bowen D, Davis JH, Southerland WM, Hawkins M Jr. Sequence- and time-dependent antagonism between raloxifene and methotrexate in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2002;22(2A):1007-9.
199. Bowen D, Southerland WM, Hawkins M Jr, Johnson DH. Sequence-dependent antagonism between tamoxifen and methotrexate in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2000;20(3A):1415-7.
200. Mizuno T, Takagi H, Matsunami K, Imai A. Sequential methotrexate treatment with and estrogen and progestin in a retained adhesive placenta. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2010;37(4):331-2.
201. Paul A.Thibodeau, Nathalie Bissonnette, Suzanne Kocsis Be'dard, Darel Hunting and Benoit Paquette. Induction by estrogens of methotrexate resistance in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 1998;19(9):1545–1552.
202. Robert Clarke, Hendrik W.van den Berg,Richard F.Murphy. Reduction of the Membrane Fluidity of Human Breast Cancer Cells by Tamoxifen And 17p-Estradiol. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1990;82(21):1702-1705.
203. I.D. Morris & T.M. Stephen. In vitro and In vivo interactions of methotrexate and other

antimetabolites with the oestrogen high affinity receptors of the rat uterus. *Br. J. Cancer* (1983), 47, 433-437.

204. Wessel L, Balakrishnan-Renuka A, Henkel C, Meyer HE, Meller K, Brand-Saberi B, Theiss C. Long-term incubation with mifepristone (MLTI) increases the spine density in developing Purkinje cells: new insights into progesterone receptor mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Aug 28.

205. Chelsea R Tieszen, Alicia A Goyeneche, BreeAnn N Brandhagen, Casey T Ortbahn and Carlos M Telleria. Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer* 2011,11:207

206. Fauvet R, Dufournet Etienne C, Poncelet C, Bringuier AF, Feldmann G, Daraï E. Effects of progesterone and anti-progestin (mifepristone) treatment on proliferation and apoptosis of the human ovarian cancer cell line, OVCAR-3. *Oncol Rep.* 2006 Apr;15(4):743-8.

207. Qi-Long Sun, Xu-Guang Zhang, Quan-Tai Xing, Peng Ding, Jin-Bo Feng, Xiao-Peng Wu Zhan-Min Wang. A study of mifepristone/IFN- γ -induced apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line FRH-0201 in vitro. *OncoTargets and Therapy* 2012;5 335–342.

208. Yuezhou Chen, Yan Wang, Yaling Zhuang, Feng Zhou, Lili Huang. Mifepristone Increases the Cytotoxicity of Uterine Natural Killer Cells by Acting as a Glucocorticoid Antagonist via ERK Activation. *PLoS ONE* 7(5): e36413. doi:10.1371/journal.pone.0036413.

209. Regine Sitruk-Ware and Irving M. Spitz. Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* 68 (2003) 409 – 420.

210. Jain JK, Li A, Yang W, Minoos P, Felix JC. Mifepristone alters expression of endometrial steroid receptors and their cofactors in new users of medroxyprogesterone acetate. *Fertil Steril.* 2007;87(1):8-23.

211. Meng CX, Andersson KL, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PG. Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model. *Fertil Steril*. 2009;91(1):256-64. Moe BG, Vereide AB, Orbo A, Sager G. High concentrations of progesterone and mifepristone mutually reinforce cell cycle retardation and induction of apoptosis. *Anticancer Res*. 2009;29(4):1053-8.
212. Reed MJ, Ross MS, Ghilchik MW. The effect of oestrogens and medroxyprogesterone acetate on the uptake of cytotoxic drugs by MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res*. 1992;12(2):533-6.
213. Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci*. 2000;67(7):743-57.
214. Zhu X, Han Y, Fang Z, Wu W, Ji M, Teng F, Zhu W, Yang X, Jia X, Zhang C. Progesterone protects ovarian cancer cells from cisplatin-induced inhibitory effects through progesterone receptor membrane component 1/2 as well as AKT signaling. *Oncol Rep*. 2013;30(5):2488-94.
215. Peluso JJ. Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. *Front Neurosci*. 2013;7:99.
216. Gazvani MR, Baruah DN, Alfirevic Z, Emery SJ. Mifepristone in combination with methotrexate for the medical treatment of tubal pregnancy: a randomized, controlled trial. *Hum Reprod*. 1998;13(7):1987-90.
217. Song HD, Chen SL, He JX, Qiu YW. Combined use of methotrexate and mifepristone for ectopic pregnancy management: a meta- analysis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006 ;26(12):1815-7.

218. Perdu M, Camus E, Rozenberg P, Goffinet F, Chastang C, Philippe HJ, Nisand I. Treating ectopic pregnancy with the combination of mifepristone and methotrexate: a phase II nonrandomized study. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(3 Pt 1):640-3.
219. Andrew G Renehan, Catherine Booth and Christopher S Potten. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ.* 2001; 322(7301): 1536–1538.
220. Gao Z, Matsuo H, Wang Y, Nakago S. and Maruo T. Up-Regulation by IGF-I of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Bcl-2 Protein Expression in Human Uterine Leiomyoma Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(11):5593–9.
221. Shoko Morishima, Masa-Aki Shibata, Masahide Ohmichi, Yoshinori Otsuki. Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, induces mitochondria-mediated apoptosis in human endometrial carcinoma cells. *Medical Molecular Morphology.* 2008;41(3):132-138
223. Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:293–9.
223. Li Q, Li JJ, Zhao XB, Ji M. Study of effect of mifepristone on apoptosis of human ovarian cancer cell line 3AO. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2003;38(10):625-8.
224. WANG Gang, SHANG Hui-ling, XIE Yong, XIAO Ping, LI Xiao-jie, LIN Tie-cheng, LI Guang-yi. Effects of mifepristone on the proliferation, apoptosis and cis-diamminedichloroplatinum sensitivity of cultured chemoresistant human ovarian cancer cells. *Chinese Medical Journal* 2005;118(4):333-336
225. Viqar Syed and Shuk-Mei Ho. Progesterone-induced apoptosis in immortalized normal and malignant human ovarian surface epithelial cells involves enhanced expression of FasL. *Oncogene* 2003;22: 6883–6890.

226. B Formby and TS Wiley. Progesterone inhibits growth and induces apoptosis in breast cancer cells: inverse effects on Bcl-2 and p53. *Ann Clin Lab Sci* November 1, 1998;28(6): 360-369
227. Rossi V, Bellastella G, De Rosa C, Abbondanza C, Visconti D, Maione L, Chieffi P, Della Ragione F, Prezioso D, De Bellis A, Bellastella A, Sinisi AA. Raloxifene induces cell death and inhibits proliferation through multiple signaling pathways in prostate cancer cells expressing different levels of estrogen receptor α and β . *J Cell Physiol*. 2011;226(5):1334-9.
228. Lopes-Costa PV, dos Santos AR, da Silva BB. The effect of raloxifene on Bax protein expression in breast carcinomas of postmenopausal women *Diagn Cytopathol*. 2012;40(7):570-4.
229. Furtado-Veloso AM, Lopes IM, Lopes-Costa PV, Santos LG, Silva BB. Expression of Bax protein in normal tissue of premenopausal women treated with raloxifene. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(4):177-81.
230. Palomba S, Orio F Jr, Russo T, Falbo A, Tolino A, Lombardi G, Cimini V, Zullo F. Antiproliferative and proapoptotic effects of raloxifene on uterine leiomyomas in postmenopausal women. *Fertil Steril*. 2005;84(1):154-61.
231. He F, Zhang W, Zhang H. Apoptotic signaling pathways in uteri of rats with endometrial hyperplasia induced by ovariectomy combined with estrogen. *Gynecol Obstet Invest*. 2013;76(1):51-6.
232. Zhang YX, Kong CZ. The role of mitogen-activated protein kinase cascades in inhibition of proliferation in human prostate carcinoma cells by raloxifene: an in vitro experiment. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008;88(4):271-5
233. Zhang W, Huang L, Zhuang Y, Wang W. The effect of mifepristone on apoptosis and caspase-3 activation in human ovarian luteinized granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;141(2):131-6.

234. Virgil T. Gaddy, John T. Barrett, Jennifer N. Delk, et al. Mifepristone Induces Growth Arrest, Caspase Activation, and Apoptosis of Estrogen Receptor-Expressing, Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:5215-5225.
235. Asami Kon, Bo Yuan, Tomoyuki Hanazawa, Hidetomo Kikuchi, Mari Sato, Ryota Furutani, Norio Takagi, Hiroo Toyoda. Contribution of membrane progesterone receptor α to the induction of progesterone-mediated apoptosis associated with mitochondrial membrane disruption and caspase cascade activation in Jurkat cell lines. DOI: 10.3892/or.2013.2657
236. Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, Garcia JF, Paredes SD, Barriga C, Rodriguez AB, Pariente JA. CASPASE 3 ACTIVATION IN HUMAN SPERMATOZOA IN RESPONSE TO PROGESTERONE. *Acta Physiologica* 2007; Volume 190, Supplement 655
237. Osipo C, Gajdos C, Liu H, Chen B, Jordan VC: Paradoxical action of fulvestrant in estradiol-induced regression of tamoxifen-stimulated breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95:1597-1608.
238. Zhang Y, Zhao H, Asztalos S, Chisamore M, Sitabkhan Y, Tonetti DA: Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 2009, 7:498-510.
239. Joan S Lewis-Wambi and V Craig Jordan. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Research* 2009, 11:206
240. Florou D, Patsis C, Ardavanis A, Scorilas A. Effect of doxorubicin, oxaliplatin, and methotrexate administration on the transcriptional activity of BCL-2 family gene members in stomach cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(7):587-96.

241. Sukhotnik I, Nativ O, Roitburt A, Bejar D, Coran AG, Mogilner JG, Nativ O. Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat. *Pediatr Surg Int.* 2013;29(2):179-84.

ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације: Монографска публикација

ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација

ВР

Аутор: Др Ивана Николић

АУ

Ментор/коментор: Проф. Марина Митровић, Ванредни професор

МН

Наслов рада: Утицај Естрадиола, Прогестерона и њихових антагониста (модулатора)
НР на апоптозу изазвану Метотрексатом и Миотрексатом на
ендометријалним стромалним ћелијским линијама *in vitro*

Језик публикације: Српски (ћирилица)
ЈП

Језик извода: Српски (ћирилица) / енглески
ЈИ

Земља публикавања: Србија
ЗП

Уже географско подручје: Србија
УГП

Година: 2014
ГО

Издавач: Ауторски репринт
ИЗ

Место и адреса: 34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Србија
МС

Физичи опис рада: Дисертација садржи: 132 стране, 7 поглавља, 23 графикана, 16 слика, 2
ФО табеле и 241 референцу

Научна област: Медицина

Научна дисциплина: Гинекологија и акушерство / Хумана репродукција
ДИ

Предметна одредница/ кључне речи апоптоза, ендометријална хиперплазија,
естроген, прогестерон

ПО

УДК

Чува се: Библиотека Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
ЧУ

Важна напомена:
МН

Извод:

ИД

Увод: Ендометријалне хиперплазије одликују се прекомерним раст жлезданог и стромалног дела ендометријума са или без атипичности које су удружене са ирегуларним крварењима ван периода менструационог циклуса. Најчешћи узрок за развој ендометријалне хиперплазије представљају повишени ниво и продужено деловање естрогена са изостанком прогестеронског дејства у утерусу.

Циљ: Циљ овог истраживања било је утврђивање појединачног и комбинованог ефекта испитиваних лекова (Ралоксифен, Мифепристон) и женских полних хормона (Естроген и Прогестерон) на цитотоксични и апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата као и утврђивање механизма апоптозе у ендометријалној стромалној ћелијској линији.

Метод: Ћелијска линија која је коришћена за испитивање представља хумане ендометријалне стромалне ћелије налик на фибробласте ThESC ћелијска линија. Ћелије су биле подељене на две групе- експериментална група ћелија (ћелије третиране испитиваним супстанцама) и контролна група ћелија (ћелије без третмана). Ћелије су третиране растворима различитих концентрација испитиваних супстанци Ралоксифен, Мифепристон, Естроген, Прогестерон, Метотрексат и Миотрексат у периоду од 24 часа. Након третмана испитиваним супстанцама (појединачно и у комбинацијама) од 24 часа користећи МТТ тест одређиван је цитотоксични ефекат испитиваних супстанци, потом коришћењем методе Annexin V FITC одређиван је проценат апоптотичних ћелија експерименталне групе и методом имунофлуоросценције одређиване су експресија и локализација кључних протеина за апоптозу. Упоредивање добијених резултата спроведених метода вршено је између експерименталне и контролне групе ћелија. Методом имунофлуоросценције утврђен је и механизам апоптотичног дејства испитиваних супстанци што до сада у истраживањима није показано.

Резултати: Уочава се да Метотрексат, Миотрексат и Ралоксифен испољавају цитотоксични ефекат који је у позитивној корелацији са концентрацијама ових супстанци. Највећи степен цитотоксичности је у дози од 16 μM за Миотрексат (41,23%) и Метотрексат (26,66%).

Појединачни цитотоксични ефекат различитих доза Естрогена није дозно зависан тако да при највећој дози Естроген 10^{-4}M цитотоксичност износи 8.59% са израженом статистички значајном разликом у односу на преостале испитиване дозе Естрогена. Доза Естрогена 10^{-9}M испољава највећу цитотоксичност (29.68%) и показује постојање статистички значајне разлике у односу на предходно испитиване дозе Естрогена (10^{-4} , 10^{-7} и 10^{-8}M). Код комбиноване примене, предтретман Ралоксифеном у комбинацији са најнижом дозом естрогена показује цитотоксичност 42.53% док предтретман најнижом дозом естрогена потом Ралоксифеном даје цитотоксичност која износи 34.73%. Комбинација оба испитивана лека има већу цитотоксичност у односу на обе појединачне цитотоксичности естрогена и Ралоксифена (29.09 и 5.09%). У случају када је предтретман вршен најнижом

дозом цитостатика (Метотрексат, Миотрексат) потом Ралоксифеном у фиксној дози цитотоксичности су показивале веће вредности (34.34 и 38.78%) у односу на појединачне цитотоксичности лекова као и у односу на цитотоксичност која је била присутна уколико се предtretман врши са Ралоксифеном (14.17 и 6.44%). Естроген дат 24 часа пре Метотрексата и Миотрексата у значајном повећава цитотоксичност (40.90-48.27%) у односу на појединачни ефекат испитиваних лекова (6.82-29.68%). Комбинована примена Ралоксифена-Естрогена и Метотрексата испољила је највећи степен цитотоксичности у односу на цитотоксични ефекат који је испољен када се третман врши у комбинацијама естроген 24 часа потом Ралоксифен и Метотрексат-Миотрексат и у случају Естроген и Ралоксифен 24 часа потом Метотрексат или Миотрексат. Прогестерон и модулатор прогестеронског рецептора Мифепристон, комбинованом применом умањују цитотоксичне ефекте испитиваних супстанци.

Закључак: На основу резултата који су били предмет истраживања докторске дисертације донети су следећи закључци:

- Све испитиване супстанце испољавају цитотоксични ефекат на ендометријалну стромалну ћелијску линију.
- Ефекат женског полног хормона Естрогена и селективног модулятора естрогенских рецептора Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата усмерена је у правцу повећања цитотоксичног ефекта.
- Апликацијом нетоксичних доза Метотрексата или Миотрексата потом у Ралоксифена у дози од 10^{-9} М долази до појаве повећања цитотоксичног ефекта Метотрексата или Миотрексата.
- Прогестерон и модулатор прогестеронског рецептора Мифепристон, комбинованом применом умањују цитотоксичне ефекте испитиваних супстанци.
- Механизам апоптозе испитиваних супстанци одвија се активацијом митохондријалног пута (смањењем експресије цитоплазматског Bcl-2 протеина, као и повећањем у експресији ВАХпротеина и активне каспазе3).

Датум прихватања теме од стране ННВ: 23.12.2013.године

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

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. проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type: Monographic publication

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Dr Ivana Nikolic

AU

Menthor/co-mentor Prof. Marina Mitrovic

MN

Title: Effects of estradiol, progesterone and their antagonists (modulators) on both Methotrexate and Myotrexate induced apoptosis on endometrial stromal cell line in vitro

TI

Language of text: Serbian (Cyrilic)

LT

Language of abstract: Serbian (Cyrilic) / English

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Serbia

LP

Publication year: 2014

PY

Publisher: Autor reprint
PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69
PP

Physical description The thesis contains 132 pages, 7 chapters, 23 graphs, 2 tables and
PD 241 citations.

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Gynecology and obstetrics / Human reproduction
SD

Subject/key words: apoptosis, endometrial hyperplasia, estrogen, progesteron
SKW

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac,
34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69

Note:
N

Abstract:

AB

Introduction: Endometrial uterine hyperplasias are characterized with both glandular and stromal endometrial over proliferation in presence or absence of the cell atypia followed with irregular bleeding outside menstrual cycle. The most common cause for the development of endometrial hyperplasia represents both elevated level of estrogen and prolonged estrogen effect in the absence of progesterone effect in uterus.

Aim: The aim of this study was to investigate single and combined effects of Raloxifene, Mifepristone, female sex hormones (Estrogen and Progesterone) on both cytotoxic and apoptotic effect of Methotrexate and Myotrexate and to the determinate their apoptotic mechanism in the endometrial stromal cell line.

Method: The cell line used for the experiments represents fibroblast like, human endometrial stromal cell line, ThESC cell line. The cells were divided into two groups- experimental group (cells treated with investigated substances) and control group of the cells (untreated cells). Treatment of the cells was performed with solutions of investigated substances (Raloxifene, Mifepristone, Estrogen, Progesterone, Methotrexate and Myotrexate) with different concentrations for 24 hour period. After 24 hour of single and combined treatment with investigated substances MTT assay was used in order to determine cytotoxic effect, followed by Annexin V FITC assay for determination of the percentage of apoptotic cells and by using immunofluorescence method both expression and localization of key regulatory apoptotic proteins were determined. Results obtained using all methods were compared between experimental and control group of the cells. Using immunofluorescence method the precise apoptotic mechanism was determined which by now had not been showed in ongoing experiments.

Results: Obtained result show that cytotoxic effect of Methotrexate, Myotrexate and Raloxifene had dose dependant manner. The highest cytotoxic effect was present in 16 μ M dose both for Myotrexate and (41.23%), Methotrexate (26.66%). Single cytotoxic effect for estrogen did not express dose dependence, for the highest estrogen dose 10^{-4} M cytotoxicity was 8.59% and it showed statistically significant difference compared to other doses of estrogen. The most cytotoxic dose of estrogen 10^{-9} M (29.68%) showed statistically significant difference compared to other investigated doses of estrogen (10^{-4} , 10^{-7} и 10^{-8} M). Combined effect of Raloxifene pretreatment followed with lowest estrogen dose expressed cytotoxic effect of 42.53%, while cytotoxic effect in the case of estrogen pretreatment followed by Raloxifene was 34.73%. Combined use of both investigated drugs had higher cytotoxic effect compared to their single cytotoxic effect (29.09 and 5.09%). In the case when the pretreatment was conducted with the lowest dose of cytostatic (Methotrexate, Myotrexate) followed with Raloxifene, cytotoxic effect of used combination was statistically higher (34.34 and 38.78%) compared to single cytotoxic effects of investigated drugs and also in the case when pretreatment was conducted with Raloxifene (14.17 и 6.44%) followed by Methotrexate or Myotrexate. Estrogen application 24 hour prior to Methotrexate or Myotrexate statistically higher cytotoxic effect (40.90-48.27%) compare to the single cytotoxic effect of investigated drugs (6.82-29.68%). Following combination Raloxifene 24h-Estrogen and Methotrexate had highest cytotoxic effect compared to the cytotoxic effect of other combinations that included Estrogen 24h followed by Raloxifene and Methotrexate or Myotrexate. Both progesterone and Mifepristone caused lowering of the cytotoxic effect of investigated drugs when being used in combination.

Conclusion: Based on the results conducted in this doctoral thesis research the following conclusions were obtained:

- All investigated substances have cytotoxic effect on endometrial stromal cell line

- Both estrogen and Raloxifene express positive effect, by increasing cytotoxicity effect of both Methotrexate and Myotrexate.
- Pretreatment with non toxic doses of both Methotrexate and Myotrexate followed by Raloxifene 10^{-9} M cause amplification in cytotoxicity of both drugs.
- Progesterone combined with Mifepristone caused lowering of the cytotoxic effects of investigated substances (Methotrexate and Myotrexate).
- Investigated substances induce apoptosis by activation of mitochondrial apoptotic pathway (lowering in the expression of cytoplasmic Bcl-2 and over expression of both BAX and caspase 3).

Accepted by the Scientific Board on:

23.12.2012.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

1. Prof. dr Slobodan Arsenijevic, Professor of Gynecology and obstetrics Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman

2. Prof. dr Milica Prostran, Professor of Pharmacology Medical faculty, University of Belgrade, member

3. Prof. dr Aleksandar Zivanovic, Professor of Gynecology and obstetrics Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

4. Doc. dr Vladislav Volarevic, Docent of Microbiology and immunology Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

5. Prof. dr Ivanka Zelen, Professor of Biochemistry Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Ивана Николић
Датум и место рођења: 26.03.1981. Фоча
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Биохемија. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај Естрадиола, Прогестерона и њихових антагониста (модулатора) на апоптозу изазвану Метотрексатом и Миотрексатом на ендометријалним стромалним ћелијским линијама in vitro
Број страница: 132
Број слика: 16
Број библиографских података: 241
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Марина Митровић, Ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 23.02.2012.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 25.12.2012.године, одлуком број 746/7
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 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. проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

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. проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник.
2. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
3. проф. др Милица Простран, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, Клиничка фармакологија и токсикологија, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник.
2. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
3. проф. др Милица Простран, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, Клиничка фармакологија и токсикологија, члан

Датум одбране дисертације: