

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Komisiji za poslediplomsku nastavu – doktorske studije

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 11.06.2015. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije koja je prijavljena pod naslovom „**Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo galektina u ćelijama trofoblasta čoveka *in vitro***“, kandidata dipl. farmaceuta-medicinskog biohemičara Danice Čujić.

Posle pregledane disertacije podnosimo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 129 strana, ima 8 tabela, 41 sliku i 285 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (33 strane), Ciljevi istraživanja (2 strane), Materijali i metode (21 strana), Rezultati istraživanja (32 strane), Diskusija (14 strana), Zaključci (2 strane) i Literatura (25 strana).

U poglavlju **Uvod**, na osnovu pregleda relevantnih literaturnih podataka, iznet je prikaz trenutnih saznanja koja se neposredno odnose na predmet istraživanja. Uvodni deo doktorske disertacije sastoji se iz tri celine. U prvom delu su opisana strukturna i funkcionalna svojstva galektina, proteina koji ispoljavaju lektinsku aktivnost. Pokazano je da galektini mogu učestvovati u različitim reproduktivnim procesima [Than i sar., 2009]. Procesi implantacije embriona, formiranja placentne i decidualizacija objašnjeni su na ćelijskom i molekularnom nivou. Posebno su istaknuti diferencijacija trofoblasta i invazija ekstravilusnog trofoblasta (EVT), kao neophodni preduslov za uspostavljanje i održavanje trudnoće, odnosno sinteza i uloga steroidnih hormona u placenti. Na osnovu sveobuhvatne analize uloge galektina u procesu reprodukcije i steroidnih hormona, kao značajnih regulatornih faktora tokom trudnoće, ukazala se potreba za ispitivanjem uticaja steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo galektina u trofoblastu čoveka *in vitro*.

U poglavlju **Cilj** doktorske disertacije jasno i koncizno se iznosi i obrazlaže cilj istraživanja u okviru ovog rada – *in vitro* ispitivanje uticaja steroidnih hormona progesterona (P₄), estradiola (E₂) i testosterona (TE), sintetskog glukokortikoida deksametazona (DEX) i odgovarajućih antagonista mifepristona (RU486), flutamida (F) i fulvestranta (I) na

ekspresiju galektina-1, -3 i -8 u EVT ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Na osnovu literaturnih podataka postavljeni su sledeći ciljevi: 1. ispitivanje uticaja steroidnih hormona i antagonista steroidnih receptora na galektin-1, -3 i -8 na nivou transkripcije, translacije i sekrecije u EVT *in vitro*, 2. ispitivanje uticaja steroidnih hormona na funkcionalna svojstva EVT testovima ćelijske vijabilnosti, migracije i invazije *in vitro*, 3. izolovanje i karakterizacija galektina-1 iz humane placente trećeg trimestra, 4. proizvodnja poliklonskih antitela prema galektinu-1 i njihova karakterizacija, 5. razvoj ELISA testa za određivanje galektina-1 u biološkom materijalu.

Kroz poglavlje **Materijali i metode**, kandidatkinja je pokazala da vlada svim tehnikama, instrumentalnim metodama i postupcima koji su korišćeni tokom izvođenja eksperimentalnog dela teze. Pored toga, detaljno su opisani korišćena ćelijska linija i uzorci tkiva, reagensi i sav potreban materijal primenjen u ovom istraživanju. Kao eksperimentalni model za ispitivanje uticaja steroidnih hormona i odgovarajućih antagonista na nivoe galektina u trofoblastu korišćena je ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo, koja predstavlja reprezentativni model za ispitivanje funkcionalnih svojstava trofoblasta [Graham i sar., 1993]. Ćelije su tretirane progesteronom (P₄), estradiolom (E₂), testosteronom (TE), deksametazonom (DEX) i odgovarajućim antagonistima mifepristonom (RU486), flutamidom (F) i fulvestrantom (I) u koncentracijama od 10 i 1000 nM, tokom 48 sati, pri standardnim uslovima gajenja ćelija (sterilni uslovi, 37°C, 5% CO₂). Kao kontrola korišćene su ćelije koje su gajene samo u odgovarajućem ćelijskom medijumu. RIA testom je određivana koncentracija steroidnih hormona u kondicioniranim ćelijskim medijumima. Uticaj ispitivanih farmakološki aktivnih supstanci na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija praćen je MTT testom. Promena nivoa galektina-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijama pod uticajem steroidnih hormona i antagonista, praćena je paralelno 1) na nivou genske ekspresije - na osnovu relativne promene ekspresije odgovarajuće iRNK, primenom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*real-time* PCR) i 2) na proteinskom nivou u ćelijama i kondicioniranom medijumu primenom SDS-PAGE i imunoblota, dok je prisustvo slobodnog galektina-1 u ćelijskom medijumu dodatno ispitano primenom SELDI-TOF MS. Funkcionalne *in vitro* studije uticaja E₂ na HTR-8/SVneo ćelije obuhvatile su praćenje ćelijske migracije i ćelijske invazije.

Postupak izolovanja placentnog galektina-1 iz tkiva placente čoveka trećeg trimestra (placenta uzeta neposredno nakon porođaja) sastojao se iz nekoliko faza: homogenizacija tkiva, priprema laktoznog ekstrakta, prečišćavanje afinitetnom hromatografijom na Lac-Sepharose 4B koloni. Potvrda dobijanja čiste frakcije galektina-1 i identifikacija izolovanog i prečišćenog proteina izvršeni su pomoću SDS-PAGE i bojenja srebrom, imunoblota i SELDI-TOF MS. Lektinska aktivnost dobijenog proteina ispitana je testovima hemaglutinacije i lektinskim testom na čvrstoj fazi.

Poliklonska antitela prema humanom galektinu-1 proizvedena su imunizacijom kunića izolovanim placentnim galektinom-1. Po izdvajanju iz seruma kunića kaprilnom kiselinom, antitela su okarakterisana i upotrebljena za dizajniranje ELISA testa za određivanje galektina-1 u biološkom materijalu.

Dobijeni rezultati obrađeni su statistički. Za testiranje značajnosti između različitih grupa, u zavisnosti od distribucije vrednosti, primenjen je test analize varijanse (ANOVA), uz SNK post-hoc test, odnosno Kruskal-Wallis neparametarski test. Statistički značajnim smatrane su razlike za koje je p vrednost bila $< 0,05$.

B. OPIS DOBIJENIH REZULTATA

U poglavlju **Rezultati** dat je pregled rezultata, dobijenih na osnovu sprovedenih eksperimentalnih istraživanja. Rezultati su prikazani u vidu grafika ili dokumentovani odgovarajućim slikama. Prikaz rezultata je organizovan u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja. Dobijeni rezultati grupisani su u tri celine.

Prvi deo rezultata se odnosi na praćenje *in vitro* uticaja steroidnih hormona progesterona (P_4), estradiola (E_2) i testosterona (TE), sintetskog glukokortikoida deksametazona (DEX) i odgovarajućih antagonista mifepristona (RU486), flutamida (F) i fulvestranta (I), pri pojedinačnoj koncentraciji od 10 nM ili 1000, primenjenoj tokom 48 h, na svojstva HTR-8/SVneo ćelija i na nivoe galektina-1, -3 i -8 u ovoj ćelijskoj liniji. Pokazano je da HTR-8/SVneo ćelijska linija ne sintetiše steroidne hormone, ali da predstavlja ciljno mesto njihovog delovanja. Praćenjem vijabilnosti HTR-8/SVneo ćelija nakon tretiranja steroidnim hormonima i odgovarajućim antagonistima, pokazano je da preživljavanje ćelija ne zavisi od uticaja steroidnih hormona. Pokazano je da su galektin-1, -3 i 8 u EVT steroid-specifično modulirani na nivou transkripcije, translacije i sekrecije. Na nivou iRNK pokazano je da jedino E_2 utiče na ekspresiju sva tri galektina, stimulišući, u odnosu na kontrolu, pri nižoj koncentraciji (10 nM), odnosno inhibirajući ekspresiju *LGALS1*, 3 i 8 gena pri koncentraciji od 1000 nM. Ovaj efekat E_2 je bio izraženiji na ekspresiju *LGALS1* i *LGALS3*, dok je ekspresija *LGALS8* bila manje podložna uticaju ovog hormona. Ekspresija gena za galektin-1 je bila najosetljivija na tretman steroidnim hormonima. Tako su TE i F ispoljili sličan efekat na ekspresiju *LGALS1* kao i E_2 – niže koncentracije su delovale stimulatorno, a više inhibitorno na ekspresiju *LGALS1* gena u odnosu na kontrolu. Pored toga, P_4 pri koncentraciji od 10 nM, DEX pri koncentraciji od 1000 nM, kao i RU486 u obe ispitivane koncentracije ispoljili su inhibitorno delovanje na ekspresiju gena za galektin-1 u odnosu na kontrolu. Pri koncentraciji od 1000 nM F je suprimirao ekspresiju *LGALS3* gena u odnosu na kontrolu. Najmanju osetljivost na tretman steroidnim hormonima pokazao je *LGALS8* gen, koji je reagovao samo na tretman E_2 . Uporednom analizom uočeno je da su svi primenjeni hormoni i antagonisti u određenoj i relativno maloj meri ostvarili uticaj na ekspresiju *LGALS1* gena, dok je samo E_2 menjao nivo iRNK za sva tri ispitivana galektina.

Slično kao i na nivou iRNK, na proteinskom nivou u ćelijskom lizatu, najveću osetljivost na tretman steroidnim hormonima pokazao je galektin-1. Obe koncentracije P_4 blago su stimulisale nivo galektina-1 u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, DEX i RU486 su doveli do blagog, ali statistički značajnog smanjenja produkcije galektina-1. Mifepriston (1000 nM) je smanjio nivo galektina-1 u HTR-8/SVneo ćelijama na polovinu u odnosu na kontrolu. Sličan efekat ostvaren je i na nivo galektina-3 u HTR-8/SVneo ćelijama. Uočen je blagi, ali ne i statistički značajan stimulatorni efekat P_4 u odnosu na kontrolu, dok je supresija

galektina-3 postignuta DEX (10 nM) i RU486 (1000 nM) u odnosu na kontrolu. Pored toga, inhibitorni efekat DEX i RU486 postignut je i u odnosu na tretman P₄. Efekat E₂ na nivo galektina-1 u HTR-8/SVneo ćelijama bio je gotovo isti na proteinskom, kao i na nivou genske ekspresije. Nivo galektina-3 nije se značajno menjao pod uticajem E₂, dok je nivo galektina-8 stimulisan višom, a inhibiran nižom koncentracijom E₂.

U okviru ovog rada takođe je ispitivana sekrecija galektina od strane HTR-8/SV neo ćelija. Najpre je u kondicioniranim ćelijskim medijumima utvrđeno prisustvo sva tri ispitivana galektina. Dalje je pokazano da je oslobađanje galektina-1, -3 i -8 od strane HTR-8/SVneo ćelija takođe steroid-specifično modulirano. Stimulacija sekrecije galektina-1 u odnosu na kontrolu postignuta je delovanjem E₂ i I pri koncentraciji od 10 nM. Dobijeni rezultati su pokazali da niža koncentracija P₄ umereno, ali značajno stimuliše sekreciju galektina-3 u odnosu na kontrolu. Tretman višim koncentracijama P₄, DEX i RU486 blago inhibira sekreciju galektina-3. Sekrecija galektina-3 je bila stimulirana, u odnosu na kontrolu, pod uticajem obe koncentracije E₂, ali i nakon tretmana I (10 nM i 1000 nM).

Za razliku od genske ekspresije i nivoa galektina-8 u ćelijama, sekrecija ovog lektina je značajno bila modulirana steroidnim hormonima. Pri koncentraciji od 10 nM P₄ i DEX stimulirali su sekreciju galektina-8, dok je RU486 (1000 nM) delovao inhibitorno. Pri višoj koncentraciji TE je delovao inhibitorno na sekreciju galektina-8. U zavisnosti od primenjene koncentracije, F, kao i E₂, je ispoljio suprotno delovanje u odnosu na kontrolu – pri koncentraciji od 10 nM je stimulirao, a pri koncentraciji od 1000 nM inhibirao oslobađanje galektina-8. Suprotno tome, viša koncentracija I značajno je stimulirala oslobađanje ovog lektina i to u odnosu na kontrolu, kao i u odnosu na istu koncentraciju E₂.

Funkcionalnim testovima pokazano je inhibitorno delovanje E₂ na migraciju (10 nM E₂) i invaziju (10 i 1000 nM E₂) HTR-8/SVneo ćelija.

Humani galektin-1 izolovan je iz placentnog tkiva laktoznom ekstrakcijom i prečišćen afinitetnom hromatografijom na Lac-Sepharose 4B koloni. Elektroforezom (SDS-PAGE) i bojenjem gela srebrom pokazano je prisustvo jedinstvene trake od ~14 kDa. Imunoblotom, uz korišćenje poliklonskih antitela specifičnih prema humanom galektinu-1, takođe je detektovana specifična traka od ~14 kDa. SELDI-TOF maseni spektar placentnog galektina-1 upoređen je sa masenim spektrima dva rekombinantna humana galektina (rh-gal-1 i Ox-rhgal-1). U spektru placentnog galektina-1 detektovani su molekularni joni sledećih m/z: 14607,69; 14933,21; 15078,15 i 15843,09. Na osnovu prisustva molekularnih jona prisutnih sa m/z 14607,69 (karakterističan za Ox-rhgal-1) i 14933,21 (karakterističan za rh-gal-1) pokazana je identičnost izolovanog galektina-1 u odnosu na rekombinantne galektine-1. Lektinska aktivnost izolovanog placentnog galektina-1 pokazana je testovima hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije, kao i lektinskim testom na čvrstoj fazi. Dobijeni rezultati analize izolovanog placentnog galektina-1 ukazuju da je izolovani placentni galektin-1 zadržao strukturne, antigene i lektinske karakteristike.

Izolovani i okarakterisani placentni galektin-1 poslužio je za imunizaciju kunića i dobijanje poliklonskih anti-galektin-1 antitela. Dvostrukom imunodifuzijom u gelu agara pokazana je specifična reaktivnost kunićevog antiseruma prema galektinu-1. Poliklonska antitela (IgG frakcija) prema humanom placentnom galektinu-1 izdvojena su iz antiseruma

kaprilnom kiselinom. SELDI-TOF MS i imunoelektroforezom pokazana je homogenost dobijenih antitela. Imunoreaktivnost prečišćenih antitela prema galektinu-1 potvrđena je imunoblotom. Ova antitela su upotrebljena za dizajniranje ELISA testa, kojim je omogućeno kvantitativno određivanje galektina-1 u biološkom materijalu, odnosno ispitivanje dijagnostičkog potencijala galektina-1. Pilot studija izvedena je sa uzorcima seruma pacijenata obolelih od *Myasthenia gravis*. Nakon određivanja galektina-1 u serumu zdravih osoba, odnosno pacijenata obolelih od *Myasthenia gravis*, preliminarni rezultati su pokazali da su vrednosti galektina-1 statistički značajno veće kod pacijenata sa *Myasthenia gravis*.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Tokom implantacije embriona dolazi do složenih interakcija između blastociste i endometrijuma, koje su posredovane brojnim molekulima sekretovanim bilo od strane trofoblasta ili decidue majke [Staun-Ram i Shalev, 2005]. Nakon uspešne implantacije embriona, sledi formiranje placente, koja omogućava preživljavanje i razvoj fetusa [Lunghi i sar., 2007]. Jedna od karakteristika EVT je ćelijska invazivnost. Ova trofoblastna subpopulacija ima ključnu ulogu tokom placentacije. Invazija trofoblasta u tkivo majke je strogo regulisan i koordinisan proces. Smatra se da su steroidni hormoni među glavnim regulatorima implantacije, placentacije, kao i diferencijacije i invazije trofoblasta [Malassine i Cronier, 2002; Halasz i Szekeres-Bartho, 2013]. Među molekulima uključenim u invaziju trofoblasta i formiranje placente, nalaze se i galektini, animalni lektini koji ispoljavaju afinitet prema β -galaktozidnoj strukturi [Than i sar., 2012].

U okviru ovog rada ispitivan je uticaj steroidnih hormona P_4 , E_2 i TE i sintetskog glukokortikoida DEX, analoga kortizola, kao i uticaj antagonista steroidnih receptora mifepristona, F i I na galektin-1, -3 i -8 u EVT. Ispitivanja u ovom radu su vršena *in vitro*, na imortalizovanoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo, koja predstavlja pogodan model-sistem za ispitivanje adhezivnih, migratornih i invazivnih i proliferativnih svojstava trofoblasta [Hannan i sar., 2010].

Kako je već pokazano da steroidni hormoni mogu regulisati neke od funkcija EVT u placenti čoveka, u ovom radu je ispitivano da li ovi hormoni mogu uticati na ekspresiju tri člana familije galektina prisutnih u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji: galektina-1, -3 i -8. Pre nego što su HTR-8/SVneo ćelije tretirane steroidnim hormonima, određivanjem steroidnih hormona u kondicioniranim ćelijskim medijumima nisu detektovani steroidni hormoni. Ovim su potvrđeni prethodni rezultati ranijih istraživanja naše laboratorije [Bojić-Trbojević i sar., 2008]. Nemogućnost HTR-8/SVneo ćelijske linije da sintetiše steroidne hormone je bila očekivana, imajući u vidu da je EVT krajnje diferencirana populacija trofoblasta, koja se odlikuje dominantno migratorno/invazivnim fenotipom. S druge strane, u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji prethodno je pokazano prisustvo funkcionalnih receptora za steroidne hormone: obe izoforme PR (PRA i PRB), obe izoforme GR ($GR\alpha$ i $GR\beta$), kao i $ER\beta$ forma, tako da ove ćelije mogu biti ciljno mesto delovanja steroidnih hormona [Liu i sar., 2007; Cervellati i sar., 2011; Cervellati i sar., 2013].

Tretman steroidnim hormonima i njihovima antagonistima u ovom radu nije uticao na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija, što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama. Tako su Liu i sar. predložili da bi efekat P₄ na preživljavanje HTR-8/SVneo mogao da se ostvaruje inhibicijom apoptoze [Liu i sar., 2007]. Dok P₄ nije uticao na broj HTR-8/SVneo ćelija, betametazon i RU486 su ispoljili inhibitorni efekat na ćelijsku vijabilnost, ali tek nakon inkubacije od tri dana [Cervellati i sar., 2011]. Druga grupa autora, koristeći takođe HTR-8/SVneo ćelijsku liniju kao model, zaključila je da P₄ ispoljava inhibitorno delovanje na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija, ali tek pri koncentraciji P₄ od 20 µM (značajno višoj od ovde korišćene), dok E₂ nije pokazao značajan efekat [Chen i sar., 2011]. Glukokortikoidi utiču na preživljavanje ćelija koje eksprimiraju GR, kao što su BeWo i JEG-3, a efekat zavisi od uslova u kojima su ćelije gajene, tj. sa ili bez FCS [Mandl i sar., 2006]. Iako postoji nekoliko studija koje su ispitivale uticaj steroidnih hormona na vijabilnost EVT *in vitro*, razlike u dizajnu eksperimenata, pre svega uslovi u kojima su ćelije gajene (sa ili bez FCS), koncentracije steroidnih hormona i vreme tokom koga su ćelije tretirane se razlikuju, tako da se iz dosadašnjih rezultata ne može izvesti jedinstveni zaključak.

Ekspresija galektina je precizno regulisana, tkivno-specifična, ili u zavisnosti od određene faze razvoja. Prethodno je pokazano da EVT prvog trimestra, na iRNK i proteinskom nivou ispoljava tri predstavnika familije galektina: galektin-1, -3 i -8 [Kolundzic i sar., 2011]. Postoji nekoliko osnova za pretpostavku da bi steroidni hormoni, kao fiziološki regulatori tokom trudnoće, mogli uticati i na ekspresiju pripadnika familije galektina u placenti. To su, pre svega prisustvo od HRE sekvenci u promotorskim regionima gena za sva tri navedena galektina, kao i činjenica da se nivo galektina-1 i -3 u endometrijumu žena menja tokom menstrualnog ciklusa [von Wolff i sar., 2005; Than i sar., 2008b]. Pored toga, ekspresija galektina-1 se menja kod ženki glodara tokom estrusa, prateći promene u nivou estrogena i P₄ [Choe i sar., 1997]. Takođe, pokazano je da i glukokortikoidi mogu modulirati galektin-1 i -3 [Clerch i sar., 1987; Dabelic i sar., 2006].

Rezultati dobijeni u okviru ovog rada pokazali su da je ekspresija gena za galektin-1, -3 i u 8 modulirana u trofoblastu steroid-specifično i zavisno od koncentracije. Pri koncentraciji od 10 nM, E₂ je ispoljio najizraženiji efekat na ekspresiju *LGALS1* i *LGALS3*, stimulišući više nego dvostruko njihovu ekspresiju, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na tretman E₂ od 1000 nM. Stimulatorni efekat E₂ pri koncentraciji od 10 nM na ekspresiju *LGALS8* gena je bio slabije izražen. Slično ovome, E₂ je takođe stimulisao ekspresiju *LGALS3* gena u horiokarcinomskoj BeWo ćelijskoj liniji [Yang i sar., 2011]. Ekspresija *LGALS1* gena, ali ne i *LGALS3* i *LGALS8* gena, je suprimirana nakon tretmana P₄, DEX (1000 nM), kao i mifepristonom (10 i 1000 nM). Pretpostavljeno je da su ovi efekti uglavnom ostvareni posredstvom GR, koji je najzastupljeniji steroidni receptor u placenti prvog trimestra. Mifepriston kao parcijalni agonist GR i PR ne mora ispoljavati isključivo suprotne efekte u odnosu na P₄ i glukokortikoide, a njegovo agonističko delovanje je, između ostalog, pokazano i u HTR-8/SVneo ćelijama [Cervellati i sar., 2011]. Supresija ekspresije *LGALS1* i *LGALS3* gena je postignuta je višim koncentracijama TE i F. Iako do danas, prisustvo androgenog receptora u EVT prvog trimestra nije pokazano, na osnovu nekih patoloških stanja vezanih za trudnoću, kao što su gestacijski *Diabetes mellitus* ili sindrom policističnih

jajnika, pretpostavljeno je da bi i androgeni hormoni mogli uticati na funkciju trofoblasta [Uzelac i sar., 2010; Palomba i sar., 2012]. Postoji mogućnost da andogeni, kao plejotropni hormoni, svoj efekat mogu ostvariti genomskim i negenomskim delovanjem, ali mehanizam kojim ostvaruju svoju aktivnost u placenti još uvek nije poznat [Uzelac i sar., 2010].

Slično kao i na nivou iRNK, sinteza proteina galektina-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijama podleže uticaju steroidnih hormona. Prethodno je pokazano da je regulacija različitih proteina, na primer komponenti placentnog ECM ili MMP-9 u trofoblastu i placenti pod parakrinom kontrolom P_4 , pri čemu ovaj hormon može ostvariti stimulatorno, ali i inhibitorno delovanje [Shimonovitz i sar., 1998]. Prethodni rezultati su pokazali da je nivo galektina-1 i 3 u ćelijama trofoblasta takođe podložan uticaju P_4 , pri čemu je ovaj uticaj vremenski i dozno zavistan [Bojić-Trbojević i sar., 2008; Yang i sar., 2011]. U ovom radu sintetski glukokortikoid DEX nije ostvario značajan efekat na galektin-1, -3 i -8 na proteinskom nivou u HTR-8/SVneo ćelijama, iako je pokazano da u horiokarcinomskim ćelijama JAr i JEG-3 DEX smanjuje nivo galektina-1 [Bojić-Trbojević i sar., 2010]. Različit efekat DEX u HTR-8/SVneo u odnosu na maligno transformisane JAr i JEG-3 ćelije mogao bi biti posledica različite ekspresije receptora za steroidne hormone, steroidogene aktivnosti, kao i ekspresije galektina-1 u ovim ćelijskim linijama. Dabelić i sar. su pokazali da je ekspresija galektina-3 u kulturi makrofaga podložna delovanju glukokortikoida, pri čemu glukokortikoidi ostvaruju diferencijalnu modulaciju ekspresije ovog galektina na nivou transkriptoma i genoma [Dabelić i sar., 2006]. Može se pretpostaviti da glukokortikoidi svoje delovanje ostvaruju različitim mehanizmima, što pruža mogućnost da se njihov efekat manifestuje u zavisnosti od tipa ćelija.

Kako ne poseduju signalnu sekvencu, galektini se van ćelije oslobađaju neklasičnim putem, zahvaljujući interakciji sa odgovarajućim glikopartnerima [Hughes, 1999]. Imunoblotom je utvrđeno da HTR-8/SVneo ćelije sekretuju u medijum sva tri prisutna galektina. Galektin-1 je detektovan u medijumu HTR-8/SVneo ćelija kao protein mase 14,6 kDa. Primenom specifičnih anti-galektin-3 antitela u kondicioniranim medijumima ćelija detektovane su tri trake (31 kDa, 33 kDa i 66 kDa), dok su upotrebom anti-galektin-8 antitela detektovane dve trake (31 kDa i 66 kDa). Razlika u masama sekretovanog i ćelijskog galektina-3 i -8 mogla bi se objasniti njihovom post-translacionom modifikacijom i/ili vezivanjem odgovarajućih glikoliganada. Slično ovome, Hadari i sar., su uočili razlike u molekulskim masama unutar- i vanćelijskog galektina-8 u ćelijskoj liniji humanog karcinoma pluća 1299 [Hadari i sar., 2000]. Slično nivou iRNK i ukupnih proteina, i sekrecija ovih galektina je osetljiva na tretman steroidnim hormonima i njihovim antagonistima. Dok samo E_2 stimuliše sekreciju sva tri prisutna galektina, niža koncentracija P_4 stimuliše oslobađanje galektina-3 i -8. Pored toga, dobijeni rezultati su pokazali da je sekrecija galektina-8 najviše podložna uticaju steroidnih hormona. U literaturi je malo dostupnih podataka o molekulima koji utiču na sekreciju galektina. Pokazano je da hipoksija utiče na oslobađanje galektina-1 u ćelijama skvamoznog karcinoma glave i vrata [Le i sar., 2005]. U BeWo ćelijama sekrecija galektina-3 je stimulirana E_2 , P_4 i hCG [Yang i sar., 2011]. U kulturama ćelija karcinoma pluća, natrijum-butirat inhibirao je ekspresiju galektina-8 na transkripcionom nivou, ali promene na nivou unutarćelijske lokalizacije ili sekrecije nisu uočene [Bidon i sar., 2001].

Invazivnost je zajedničko svojstvo EVT i tumorskih ćelija, ali za razliku od malignih, invazija ćelija trofoblasta je precizno regulisana i kontrolisana, vremenski ograničena na prvi trimestar, kao i prostorno na invaziju u endometrijum i unutrašnju trećinu miometrijuma [Lala i sar., 2002]. Uticaj E_2 na migratorna svojstva HTR-8/SVneo ćelija ispitan je primenom *wound healing* metode. Dobijeni rezultati su pokazali da niža koncentracija E_2 značajno smanjuje migraciju HTR-8/SVneo ćelija. Slično tome, E_2 je ispoljio i inhibitorski efekat i na invaziju ćelija, pri čemu je supresija invazije postignuta sa obe ispitivane koncentracije. Kako je pokazano da E_2 ne utiče na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija, supresija migracije i invazije HTR-8/SVneo ćelija nije rezultat uticaja E_2 na broj živih ćelija. Prethodno je pokazano da invazija trofoblasta može biti modulirana P_4 i glukokortikoidima [Bojić-Trbojević i sar., 2008; Chen i sar., 2011]. Inhibitorsko delovanje P_4 na invaziju trofoblasta delimično se može objasniti inhibicijom aktivnosti MMP-2 i -9, ključnih proteolitičkih enzima trofoblasta [Shimonovitz i sar., 1998; Goldman i Shalev, 2006]. Postojeći podaci u literaturi koji se odnose na uticaj estrogena na invazivnost trofoblasta nisu konzistentni. Chen i saradnici, koristeći takođe HTR-8/SVneo ćelijsku liniju kao model, nisu našli da se invazija trofoblasta menja pod uticajem E_2 , iako je utvrđeno da ove ćelije preuzimaju E_2 iz okolnog medijuma [Chen i sar., 2011]. Druga grupa autora, koristeći takođe ovu ćelijsku liniju kao model, nije pratila direktan uticaj E_2 na invazivnost trofoblasta, ali je pokazala da E_2 simulira ekspresiju IGFBP-7, koji pak deluje inhibitorski na migraciju [Liu i sar., 2012]. Inhibitorsko delovanje estrogenih hormona na trofoblast pokazan je i *in vivo*. Pepe i Albrecht su serijom eksperimenata na babunima demonstrirali uticaj estrogena na funkciju trofoblasta [Albrecht i sar., 2006; Bonagura i sar., 2008; Bonagura i sar., 2012]. Tokom gestacije nivo sinteze i koncentracije estrogena rastu, što bi moglo biti od značaja za funkciju trofoblasta. Porast E_2 tokom gestacije smanjuje prodiranje trofoblasta u tkivo majke. Slično, tokom humane trudnoće, invazija trofoblasta se zaustavlja na prelasku prvog u drugi trimestar. Kako invazija trofoblasta zavisi od ravnoteže između faktora koji je stimulišu i onih koji je suprimiraju, pretpostavlja se da bi niža i viša koncentracija E_2 koje odgovaraju koncentracijama ovog hormona tokom prvog, odnosno trećeg trimestra, mogle ostvariti različite fiziološke uloge tokom gestacije.

Placentni galektin-1 je prvi galektin izolovan i okarakterisan kod čoveka [Hirabayashi i Kasai, 1984]. U ovom radu placenta nakon porođaja je takođe poslužila kao izvor za izolovanje galektina-1. Standardna procedura za izolovanje galektina-1 zasniva se na osnovnom svojstvu, lektinskoj aktivnosti, pa laktozna ekstrakcija iz tkiva i afinitetno prečišćavanje na koloni predstavljaju pouzdan metod za dobijanje čistog preparata galektina-1. Nakon izolovanja iz tkiva i prečišćavanja, karakterizacija galektina izvršena je primenom SDS-PAGE, imunoblota i MS. Ovim metodama je pokazano da je izolovan protein mase ~14,6 kDa, koga su specifično prepoznala antitela prema galektinu-1. Izolovani placentni galektin-1 takođe je zadržao svoja funkcionalna svojstva, što je pokazano lektinskim testom na čvrstoj fazi i testovima hemaglutinacije. Analiza placentnog galektina-1 primenom SELDI-TOF MS, omogućila je detekciju molekularnih formi ovog lektina. Poređenjem izolovanog galektina-1 sa rekombinantnim humanim galektinima, od kojih jedan predstavlja redukovani lektin (rh-gal-1), a drugi oksidovanu formu (Ox-gal-1) uočeno je da izolovani

lektin sadrži obe forme. Poznato je da biološka aktivnost galektina-1 zavisi od njegove molekulske forme, odnosno od lektinskih svojstava. Redukovana forma galektina-1 ima lektinsku aktivnost i odgovorna je za adheziju ćelija glatke muskulature i imunomodularnu funkciju [Moiseeva i sar., 1999; Camby i sar., 2006]. S druge strane, oksidovana forma galektina-1 ima drugačiju funkcionalnu aktivnost i identifikovana je kao faktor regeneracije perifernih nerava [Inagaki i sar., 2000]. U trofoblastu *in vitro* galektin-1 stimuliše invaziju, ali se taj uticaj ostvaruje prvenstveno njegovom lektinskom aktivnošću [Kolundzic i sar., 2011]. Međutim, dalja ispitivanja su neophodna da bi se utvrdilo kako promena redoks statusa galektina-1 može uticati na biološke funkcije ovog lektina u trofoblastu.

Kako je pokazano da je galektin-1 uključen u različite patofiziološke procese, onedavno je počeo da se ispituje značaj ovog lektina kao biomarkera [Saussez i sar., 2008; Watanabe i sar., 2011; Ouyang i sar., 2013]. Poliklonska antitela prema humanom galektinu-1, dobijena u laboratoriji INEP, upotrebljena su za formiranje ELISA testa za određivanje koncentracije galektina-1 u biološkom materijalu. U ovom radu je ispitivana moguća promena koncentracije galektina-1 u serumu pacijenata obolelih od autoimunog neurološkog oboljenja *Myasthenia gravis* (MG). Iako je ranije pretpostavljeno da su promene u ekspresiji galektina-1 u timusu povezane sa nastankom bolesti, galektin-1 nije određivan u serumu pacijenata obolelih od MG [Hafer-Macko i sar., 1996]. Preliminarni rezultati su pokazali povećane vrednosti galektina-1 kod pacijenata obolelih od MG u odnosu na zdravu populaciju. Primećeno je da se koncentracija galektina-1 menja i kod nekih patoloških stanja vezanih za trudnoću, kao što su spontani pobačaj i preeklampsija [Tirado-Gonzalez i sar., 2013]. Iako je galektin-1 ispitivan kao biomarker u različitim bolestima, još uvek nije poznato da li su promene nivoa galektina-1 u perifernoj cirkulaciji uzrok ili posledica patofiziološkog procesa.

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Značaj istraživanja na ćelijskom i molekularnom nivou leži u potrebi boljeg razumevanja regulacije galektina trofoblasta. Podaci prezentovani ovom tezom pružaju originalan doprinos boljem razumevanju uticaja steroidnih hormona na sintezu i sekreciju galektina trofoblasta. Za sada, broj istraživanja koji je ispitivao efekte steroidnih hormona u samom trofoblastu je relativno mali. Prethodno je, u nekim drugim sistemima, pokazano da steroidni hormoni mogu regulisati ekspresiju nekih od članova galektinske familije. Kako je poznato da je modulacije genske ekspresije steroidnim hormonima prilično složena, sa veoma ispoljenim tkivno i organ-specifičnim efektima, efekat steroidnih hormona na ekspresiju galektina ne mora nužno biti isti u trofoblastu kao u do sada ispitivanim tkivima. Osim toga, prethodno je pokazano je da P₄ i E₂ u trofoblastu mogu ispoljiti i negenomsko delovanje [Gellersen i sar., 2009; Gambino i sar., 2010].

Nivo proteina regulisan je na nekoliko različitih nivoa, prvenstveno transkripcionom, posttranskripcionom, translacionom i posttranslacionom. Usled toga, nije neuobičajeno odsustvo korelacije iRNK i nivoa proteina, odnosno često ne postoji linearna ekstrapolacija transkriptoma na proteom [Schwanhausser i sar., 2011]. U okviru ovog rada, paralelnim

ispitivanjem na genskom i proteinskom nivou steroidni hormoni su pokazani kao regulatori ekspresije i nivoa galektina-1, -3 i -8 u trofoblastu *in vitro*. Iako u literaturi do sada postoje podaci o uticaju P₄ i E₂, odnosno glukokortikoida na sintezu galektina-1, mnogo manje se zna o mogućem uticaju steroidnih hormona na sekreciju galektina. Rezultati dobijeni u okviru ovog rada ukazuju da je oslobađanje galektina u trofoblastu precizno i selektivno regulisano. Kako sekrecija galektina zavisi od njihove interakcije sa odgovarajućim glikopartnerima, moglo bi se pretpostaviti da steroidni hormoni mogu uticati na sekreciju galektina delujući direktno na same galektine ili indirektno, menjajući nivo odgovarajućih vezujućih proteina.

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ovog rada pružena su nova saznanja o modulaciji galektina steroidnim hormonima u EVT *in vitro* na nivou genske transkripcije, translacije i sekrecije. Na osnovu toga može se pretpostaviti da modulacija nivoa galektina-1, -3 i -8 steroidnim hormonima predstavlja jedan od načina kontrole biološke uloge koju ovi proteini ostvaruju u placenti. Samim tim, otvaraju se mogućnosti za dalje ispitivanje regulacije galektina steroidnim hormonima, pre svega u kliničkom kontekstu vezanom za problem neuspešne implantacije ili patologije placente.

Takođe, ovim radom su u trofoblastnoj ćelijskoj liniji, kao i u tkivu placente trećeg trimestra čoveka, identifikovane višestruke molekulske forme galektina-1. Ostaje dalje da se utvrdi da li ove forme ispoljavaju različitu lektinsku, pa samim tim i biološku aktivnost, čime bi se dalje doprinelo boljem razumevanju fizioloških i patoloških stanja placente. Kako su galektini povezani sa različitim patofiziološkim procesima i u placenti, opravdano je ispitivanje i njihovog potencijalnog dijagnostičkog značaja u određenim bolestima [Božić i sar., 2004; Jeschke i sar., 2007; Than i sar., 2008a]. Mogućnost da se nivo potencijalnog biomarkera odredi jednostavnim metodom, jedan je od preduslova njegove rutinske primene. U okviru ove teze, na osnovu izolovanog i prečišćenog placentnog galektina-1 i proizvedenih specifičnih anti-galektin-1 antitela, dizajniran je ELISA test. Ovim testom je moguće odrediti nivo galektina-1 u biološkom materijalu, odnosno omogućeno je ispitivanje potencijalnog dijagnostičkog značaja galektina-1 u poremećajima vezanim za reprodukciju.

E. CITIRANA RELEVANTNA LITERATURA

Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW, Pepe GJ. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta*. 2006;27(4-5):483-90.

Bidon N, Brichory F, Thomas D, Cavalier A, Caulet-Maugendre S, Bourguet P, Dazord L. Sodium butyrate induces growth inhibition and modulates galectin-8 expression in human lung carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2001;21(2a):1049-55.

Bojić-Trbojević Ž, Božić M, Vićovac L. Steroid hormones modulate galectin-1 in the trophoblast HTR-8/SVneo cell line. *Arch Biol Sci*. 2008;60:11-23.

Bojić-Trbojević Ž, Kolundžić N, Petronijević M, Vićovac L. Choriocarcinoma cell line Response to Dexamethasone. *Journal of Medical Biochemistry* 2010. p. 107.

Bonagura TW, Pepe GJ, Enders AC, Albrecht ED. Suppression of extravillous trophoblast vascular endothelial growth factor expression and uterine spiral artery invasion by estrogen during early baboon pregnancy. *Endocrinology*. 2008;149(10):5078-87.

Bonagura TW, Babischkin JS, Aberdeen GW, Pepe GJ, Albrecht ED. Prematurely elevating estradiol in early baboon pregnancy suppresses uterine artery remodeling and expression of extravillous placental vascular endothelial growth factor and alpha1beta1 and alpha5beta1 integrins. *Endocrinology*. 2012;153(6):2897-906.

Božić M, Petronijević M, Milenković S, Atanacković J, Lazić J, Vićovac L. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta*. 2004;25(10):797-802.

Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006;16(11):137r-57r.

Cervellati F, Pavan B, Lunghi L, Manni E, Fabbri E, Mascoli C, Biondi C, Patella A, Vesce F. Betamethasone, progesterone and RU-486 (mifepristone) exert similar effects on connexin expression in trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(2):319-28.

Cervellati F, Valacchi G, Lunghi L, Fabbri E, Valbonesi P, Marci R, Biondi C, Vesce F. 17-beta-Estradiol counteracts the effects of high frequency electromagnetic fields on trophoblastic connexins and integrins. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:280850.

Chen JZ, Wong MH, Brennecke SP, Keogh RJ. The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;342(1-2):73-80.

Choe YS, Shim C, Choi D, Lee CS, Lee KK, Kim K. Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol Reprod Dev*. 1997;48(2):261-6.

Clerch LB, Whitney PL, Massaro D. Rat lung lectin synthesis, degradation and activation. Developmental regulation and modulation by dexamethasone. *Biochem J*. 1987;245(3):683-90.

Dabelic S, Supraha S, Dumic J. Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(4):701-9.

Gambino YP, Maymo JL, Perez-Perez A, Duenas JL, Sanchez-Margalet V, Calvo JC, Varone CL. 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol Reprod*. 2010;83(1):42-51.

Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2009;15(1):119-38.

Goldman S, Shalev E. Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol Reprod*. 2006;74(1):13-22.

Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*. 1993;206(2):204-11.

Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R, Zick Y. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 13):2385-97.

Hafer-Macko C, Pang M, Seilhamer JJ, Baum LG. Galectin-1 is expressed by thymic epithelial cells in myasthenia gravis. *Glycoconj J.* 1996;13(4):591-7.

Halasz M, Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol.* 2013;97(1):43-50.

Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod.* 2010;82(2):235-45.

Hirabayashi J, Kasai K. Human placenta beta-galactoside-binding lectin. Purification and some properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122(3):938-44.

Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473(1):172-85.

Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem.* 2000;267(10):2955-64.

Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta.* 2007;28(11-12):1165-73.

Kolundzic N, Bojic-Trbojevic Z, Kovacevic T, Stefanoska I, Kadoya T, Vicovac L. Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery--a functional study in vitro. *PLoS One.* 2011;6(12):e28514.

Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(2):142-9.

Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, Zhao S, Kong C, Richardson D, O'Byrne KJ, Giaccia AJ, Koong AC. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol.* 2005;23(35):8932-41.

Liu J, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Xu Q, Maruo T. The effects of progesterone on apoptosis in the human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(12):869-74.

Liu ZK, Liu HY, Fang WN, Yang Y, Wang HM, Peng JP. Insulin-like growth factor binding protein 7 modulates estrogen-induced trophoblast proliferation and invasion in HTR-8 and JEG-3 cells. *Cell Biochem Biophys.* 2012;63(1):73-84.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:6.

Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine.* 2002;19(1):3-11.

Mandl M, Ghaffari-Tabrizi N, Haas J, Nohammer G, Desoye G. Differential glucocorticoid effects on proliferation and invasion of human trophoblast cell lines. *Reproduction.* 2006;132(1):159-67.

Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res.* 1999;36(1):47-58.

Ouyang J, Plutschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, Neuberg D, Engert A, Shipp MA. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2013;121(17):3431-3.

Palomba S, Russo T, Falbo A, Di Cello A, Amendola G, Mazza R, Tolino A, Zullo F, Tucci L, La Sala GB. Decidual endovascular trophoblast invasion in women with polycystic ovary syndrome: an experimental case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):2441-9.

Saussez S, Glinioer D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, Andre S, Gabius HJ, Laurent G. Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid.* 2008;18(7):705-12.

Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011;473(7347):337-42.

Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S. Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(3):457-61.

Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:56.

Than NG, Kim SS, Abbas A, Han YM, Hotra J, Tarca AL, Erez O, Wildman DE, Kusanovic JP, Pineles B, Montenegro D, Edwin SS, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Espinoza J, Hassan SS, Papp Z, Romero R. Chorioamnionitis and increased galectin-1 expression in PPROM --an anti-inflammatory response in the fetal membranes? *Am J Reprod Immunol.* 2008a;60(4):298-311.

Than NG, Romero R, Erez O, Weckle A, Tarca AL, Hotra J, Abbas A, Han YM, Kim SS, Kusanovic JP, Gotsch F, Hou Z, Santolaya-Forgas J, Benirschke K, Papp Z, Grossman LI, Goodman M, Wildman DE. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008b;105(41):15819-24.

Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagyi A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z, Wildman DE. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(24):9731-6.

Than NG, Romero R, Kim CJ, McGowen MR, Papp Z, Wildman DE. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(1):23-31.

Tirado-Gonzalez I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M, Blois SM. Galectin-1 influences

trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(1):43-53.

Uzelac PS, Li X, Lin J, Neese LD, Lin L, Nakajima ST, Bohler H, Lei Z. Dysregulation of leptin and testosterone production and their receptor expression in the human placenta with gestational diabetes mellitus. *Placenta.* 2010;31(7):581-8.

von Wolff M, Wang X, Gabius HJ, Strowitzki T. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod.* 2005;11(3):189-94.

Watanabe M, Takemasa I, Kaneko N, Yokoyama Y, Matsuo E, Iwasa S, Mori M, Matsuura N, Monden M, Nishimura O. Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncol Rep.* 2011;25(5):1217-26.

Yang H, Taylor HS, Lei C, Cheng C, Zhang W. Hormonal regulation of galectin 3 in trophoblasts and its effects on endometrium. *Reprod Sci.* 2011;18(11):1118-27.

F. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

M23 – Rad u međunarodnom naučnom časopisu

1. **Ćujić D**, Bojić-Trbojević Ž, Tošić N, Pavlović S. i Vićovac Lj. Effect of steroids on transcription and secretion of Gal-1 by the human trophoblast cell line *in vitro*. *Arch Biol Sci.* 2013. 65(4): 1331-1337. (IF 0,889; Chemistry, Multidisciplinary 105/148)

2. **Ćujić D**, Bojić-Trbojević Ž, Kolundžić N, Kadoya T i Vićovac Lj. Molecular forms of galectin-1 from human placenta and trophoblast cells. *J Serb Chem Soc.* 2015. 80(2): 159-169. (IF 0,889; Chemistry, Multidisciplinary 105/148)

M34 - Saopštenja sa međunarodnih skupova

3. Kolundžić N, Bojić-Trbojević Ž, **Ćujić D**, Abu Rabi T, Jovanović Krivokuća M, Vićovac Lj. Galectin-1 as a modulator of human trophoblast invasiveness *in vitro*. CTR Annual Trophoblast Meeting 2014, July 2014, Cambridge, UK.

4. **Ćujić D**, Bojić-Trbojević Ž, Kolundžić N, Vićovac Lj. Effect of 17- β estradiol on human trophoblast invasiveness and galectin-1 expression *in vitro*. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International participation, October 29-31, 2014 Belgrade, Serbia. Book of abstracts p220.

5. Bojić-Trbojević Ž, Jovanović-Krivokuća M, Kolundžić N, **Ćujić D**, Vićovac Lj. Is Galectin-1 binding to mucins functionally relevant for human trophoblast. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International participation, October 29-31, 2014 Belgrade, Serbia. Book of abstracts p42.

G. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Doktorska disertacija kandidata dipl. farmaceuta-medicinskog biohemičara Danice Ćujić, istraživača saradnika, pod nazivom „**Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivoe galektina u ćelijama trofoblasta čoveka *in vitro***“ predstavlja značajan doprinos u rasvetljavanju uloge koju bi steroidni hormoni, kao faktori regulacije ekspresije i nivoa galektina-1, -3 i -8 mogli imati u EVT. Na osnovu izložene analize doktorske disertacije, Komisija zaključuje da su postavljeni ciljevi uspešno ostvareni i da su postignuti rezultati originalni. Na osnovu svega iznetog, članovi ove Komisije predlažu Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „**Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivoe galektina u ćelijama trofoblasta čoveka *in vitro***“.

Članovi komisije:

1. _____

Dr Slavica Spasić, profesor emeritus, mentor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. _____

Dr Žanka Bojić-Trbojević, naučni saradnik, mentor,
Institut za Primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu

3. _____

Dr Ljiljana Vićovac Panić, naučni savetnik,
Institut za Primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu