

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 14. 04. 2016. godine, odre ena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije „**Statini pospešuju zarastanje rana blokiraju i aktivaciju glukokortikoidnog receptora farenzil pirofosfatom, me uproizvodom u sintezi holesterola**“ kandidata **dr Saše Vukeli a**, **magistra medicinskih nauka**, u sastavu:

1. **Prof. dr Ana Savi Radojevi** , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Doc.dr Snežana Mini** , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Dejan Baski** , Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu

Mentor ove doktorske disertacije je **doc. dr Svetlana Popadi** , a komentor **prof. dr Marjana Tomi -Cani** .

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi Komisije podnose Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

**I Z V E Š T A J**

**A. Prikaz sadržaja disertacije:**

Doktorska disertacija „**Statini pospešuju zarastanje rana blokiraju i aktivaciju glukokortikoidnog receptora farenzil pirofosfatom, medjuproizvodom u sintezi holesterola**“ je napisana na 70 strana i podeljena je u devet poglavlja: Uvod (12 strana), Ciljevi (1 strana), Materijal i metode (7 strana), Rezultati (22 strane), Diskusija (8 strana), Zaklju ci (1 strana), Literatura (18 strana) i Skra enice (1 strana). Disertacija uklju uje 2 sheme, 14 priloga, kao i 119 bibliografskih jedinica.

**UVOD** se sastoji od 9 celina i uklju uje dve sheme. Uvod obuhvata definiciju i epidemiološke odlike akutnih i hroni nih rana, analizu faza u zarastanju akutnih rana i

molekularne mehanizme koji ih kontrolišu, značaj inhibitornih signala u procesu zarastanja akutnih rana i patogenezi poremećaja zarastanja, ulogu glukokortikoidnih hormona u inhibiciji zarastanja rana i njihov signalni mehanizam dejstva. Dodatno je razmatran funkcionalni značaj farnezil pirofosfata (FPP) kao intermedijarnog metabolita u mevalonatskom putu sinteze holesterola i farnezilacije proteina, njegovo dejstvo kao liganda za nuklearne hormonske receptore, a naročito glukokortikoidni receptor. Posebno je razmatrana uloga FPP-a i mevalonatskog sintetskog puta u mehanizmu dejstva plejotropnih efekata statina i značaj ovih efekata u reparaciji tkiva sa posebnim osvrtom na zarastanje rana.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su jasno definisani i obuhvataju: 1. Dokazivanje da promena koncentracije FPP menja aktivnost GR i utiče na transkripciju gena na izolovanim ljudskim keratinocitima *in vitro* koži ljudi *ex vivo*; 2. Ispitivanje da li povećanje koncentracije endogenog FPP-a inhibicijom skvalen sintetaze i dodavanje egzogenog FPP-a imaju isti efekat na aktivaciju glukokortikoidnog receptora, produkciju proinflamatornih medijatora i migraciju izolovanih keratinocita *in vitro*; 3. Analizu uticaja inhibicije izoprenilacije/farnezilacije proteina na aktivaciju glukokortikoidnog signalnog puta FPP-om; i 4. Ispitivanje uticaja promene koncentracije FPP-a i aktivacije glukokortikoidnog receptora na dinamiku zarastanja akutnih rana *ex vivo*.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** opisana su tehnike gajenja keratinocita i organokulture humane kože, histopatologija i imunocitohemijsko bojenje, test migracije keratinocita i *ex vivo* model zarastanja akutne rane. Opisane su standardne molekularno-biološke tehnike izolacije proteina i imunoblot. Takođe, detaljno i jasno su opisane metode izolacije i prečišćavanja RNK i DNK, esej imunoprecipitacije hromatina, tehnika transkripcionih profila (DNK mikroip), plazmidi, tehnika tranzijentne transfekcije ćelija i esej hloramfenikol aciltransferaze.

U poglavlju **REZULTATI** sistematično i detaljno, u sedam odeljaka, opisani su rezultati ispitivanja dejstva endogenog i egzogenog FPP-a na aktivaciju glukokortikoidnog signalnog puta i regulaciju transkripcije ciljnih gena. Utvrđene su sličnosti i razlike specifičnih transkripcionih efekata glukokortikoidnih hormona i FPP-a u keratinocitima, korišćenjem genomske tehnike transkripcionih profila. Ispitan je efekat egzogenog i endogenog FPP-a na migraciju keratinocita i epitelizacija akutnih rana, kao i uloga aktivacije glukokortikoidnog signalnog puta i farnezilacije proteina u tim efektima. Utvrđeno je značaj

represije keratina 6 za inhibiciju epitelizacije rana FPP-om. Tako e, ispitivan je efekat mevastatina na aktivaciju glukokortikoidnog receptora FPP-om, kao i njegovo dejstvo na migraciju keratinocita i dinamiku zarastanja rana. Dobijeni rezultati su ilustrovani sa 15 priloga. Detaljan opis dobijenih rezultata dat je u odeljku B ovog izveštaja.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan na in povezao rezultate ovog istraživanja sa rezultatima sli nih istraživanja objavljenih u me unarodnim nau nim asopisima. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaklju ke i hipoteze koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u kontekstu rezultata drugih autora koji imaju isti nau ni interes. Rezultati istraživanja koji su dobijeni po prvi put i o kojima ne postoje dostupni podaci u nau noj literaturi, objašnjeni su na odgovaraju i na in.

U poglavlju **ZAKLJU CI** navedeni su najzna ajniji zaklju ci koji su potpuno u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja i dobijenim rezultatima.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 119 bibliografskih jedinica. Bibliografske jedinice su citirane vankuerskim stilom.

## **B. Kratak opis najvažnijih rezultata**

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da egzogeno dodati FPP može da aktivira glukokortikoidni signalni put u keratinocitima delujući kao agonista GR, nezavisno od prisustva glukokortikoidnih hormona *in vitro* i *ex vivo*. Identičan rezultat dobijen je povišenjem nivoa endogenog FPP-a u ćelijama, inhibicijom enzima skvalen sintetaze zaragozinskom kiselinom (ZGA). Interesantan je nalaz da mevastatin sprečava aktivaciju receptora sa ZGA. Eksperimentalni rezultati ukazuju da su ovi efekti direktna posledica vezivanja egzogenog ili endogenog FPP-a za glukokortikoidni receptor, a ne modulacije biosinteze holesterola ili farnezilacije proteina. Poređenje specifičnih transkripcionih efekata deksametazona i FPP-a, analizom transkripcionih profila pokazalo je značajno, ali ne i potpuno, preklapanje između gena regulisanih glukokortikoidima i FPP-om. Analiza genskog profila u ćelijama sa većom koncentracijom FPP, ukazala je na inhibiciju gena značajnih za interferon  $\gamma$  signalni put, citomotilitet i remodelovanje ekstracelularnog matriksa. U daljem istraživanju korišćenjem funkcionalnih studija autor je pokazao da i FPP i ZGA inhibiraju migraciju keratinocita i epitelizaciju *in vitro* i *ex vivo* i da je inhibicija zarastanja rana delom

posledica represije keratina 6. Na kraju, dokazana je hipoteza da mevastatin delujući kao inhibitor enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-reduktaze, ne samo da neutrališe efekat ZGA na aktivaciju GR i inhibiciju epitelizacije, već i *sui generis* stimuliše epitelizaciju akutnih rana snižavajući nivo endogenog FPP.

### **C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

Mnogobrojni podaci iz savremene literature ukazuju da statini pored svoje izuzetno važne uloge u terapiji ateroskleroze, mogu na osnovu svojih plejotropnih efekata imati i značajno dejstvo na reparaciju tkiva i zarastanje rana. Međutim, mehanizam plejotropnih efekata statina nije dosada u potpunosti razjašnjen. Klasični mehanizam dejstva, opisan u literaturi je inhibicija farnezilacije, usled smanjenja nivoa endogenog FPP-a. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da postoji novi način na koji statini ostvaruju svoje efekte i koji se zasniva na modulaciji aktivnosti glukokortikoidnog signalnog puta. Prethodno je u literaturi opisano da FPP može da se veže kao ligand za niz nuklearnih hormonskih receptora poput tiroidnog, estrogenog i glukokortikoidnog receptora. Međutim, prvi put je opisano u ovoj disertaciji da FPP ne predstavlja samo putativni ligand, već i agonistu za glukokortikoidni receptor. Razlike u transkripcionom profilu između klasičnih agonista deksametazona i FPP-a, koje je autor pokazao u radu, mogu da potiču ili od dejstva FPP-a na druge nuklearne receptore i barem delimično usled njegovog dejstva kao mešovitog agonista antagonistu ili parcijalnog agonistu. Ovo je u skladu sa istraživanjima drugih autora koja su pokazala da se receptor aktiviran parcijalnim agonistom vezuje za DNK na drugačiji način, što utiče na njegov kapacitet za regrutaciju koregulatora i remodelovanje hromatina. Naravno, ovo sve ima značajne posledice na promenu ekspresije ciljnih gena.

Podaci iz literature ukazuju da statini mogu imati korisnu ulogu u zarastanju rana, što je u skladu sa rezultatima prezentovanim u ovoj studiji. Rezultati ove doktorske disertacije i publikovani rad koji čini deo doktorske disertacije po prvi put detaljno opisuju molekularne procese koji predstavljaju osnovu ovog dejstva, sa posebnim osvrtom na aktivaciju glukokortikoidnog signalnog puta, migraciju keratinocita, ekspresiju keratina 6 i epitelizaciju rana. Jasno je pokazano da su ovi efekti statina posledica inhibicije sinteze FPP-a. U skladu sa tim, rezultati ovog istraživanja ukazuju da modulacija sinteze holesterola i farnezilacija proteina nije značajna za pozitivno dejstvo statina na zarastanje rana, za razliku od prethodno objavljenih studija.

## **Objavljeni ili saopšteni rezultati koji ine deo teze**

1. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Vouthounis C, Krzyzanowska A, Das S, et al. Farnesyl pyrophosphate inhibits epithelialization and wound healing through the glucocorticoid receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(3):1980-8

## **D. Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa disertacije)**

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan nau ni doprinos razumevanju mehanizma dejstva plejotropnih efekata statina i njihovoj potencijalnoj terapijskoj ulozi u stimulaciji zarastanja akutnih i hroničnih rana. Suštinu ovog otkrića predstavlja nalaz da FPP, međuproizvod u biosintezi holesterola, može da inhibira epitelizaciju i zatvaranje rana delujući kao agonista glukokortikoidnog receptora. Genomski profil FPP-a pokazuje značajno preklapanje sa transkripcionim efektima glukokortikoidnih hormona. Ovo otkriće predstavlja novi pomak u razumevanju biološke uloge steroidnih hormona i njihovih receptora, jer u ovom slučaju funkcionalna aktivacija glukokortikoidnog signalnog puta ne zavisi od prisustva kortikosteroida i posledica je dejstva endogeno prisutnog metabolita koji ne pripada steroidnoj familiji molekula.

Doprinos ove teze boljem razumevanju plejotropnih efekata statina predstavlja nalaz da ovi lekovi promovišu zarastanje rana upravo na osnovu inhibicije mevalonatskog sintetskog puta i konsekventnog smanjenju nivoa endogenog FPP i posledično njegovog dejstva na GR. S druge strane, pokazali smo da statini promovišu zarastanje rana novootkrivenim mehanizmom dejstva, koje se upravo zasniva na inhibiciji mevalonatskog sintetskog puta i konsekventnom smanjenju nivoa endogenog FPP. i njegovog dejstva na GR. Ovi rezultati pružaju uvid u do sada nepoznate mehanizme regulacije zarastanja rana i otvaraju mogućnost novih terapijskih pristupa u korišćenju statina kao lekova u terapiji, kako akutnih tako i hroničnih rana.



## **E. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije**

Doktorska disertacija pod nazivom „**Statini pospešuju zarastanje rana blokiraju i aktivaciju glukokortikoidnog receptora farenzil pirofosfatom, medjuproizvodom u sintezi holesterola**“ kandidata dr Saše Vukeli , magistra medicinskih nauka, po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživa kim ciljevima, koriš enoj savremenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaklju cima ispunjava sve kriterijume dobro osmišljene, ura ene i napisane doktorske disertacije.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Statini pospešuju zarastanje rana blokiraju i aktivaciju glukokortikoidnog receptora farenzil pirofosfatom, medjuproizvodom u sintezi holesterola**“ kandidata dr Saše Vukeli , magistra medicinskih nauka, i odobri javnu odbranu.

**Mentor:**

---

Doc. dr Svetlana Popadi

**Komentor:**

---

Prof. dr Marjana Tomi -Cani

**lanovi Komisije**

---

Prof. dr Ana Savi Radojevi

---

Doc. dr Snežana Mini

---

Prof. dr Dejan Baski