

Биолошки факултет
Број захтева:15/212-1
Датум: 06.04.2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија, Биологија ћелија и ткива.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Лела Р. Шурлан

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање:

Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

3. Година дипломирања: 2000.

4. Назив магистарске тезе кандидата: /

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена: /

6. Година одбране магистарске тезе: /

7. Година и назив факултета на коме је кандидат уписао докторске студије:

2006- Биолошки факултет, студијски програм Биологија ћелија и ткива.

Обавештамо Вас да је Наставно- научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.

2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.

3. Подаци о ментору:

4. Одлука Етичког одбора Клиничког центра Србије 674/3.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/212-06.04.2012.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 12. Статута Биолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно-научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости теме докторске дисертације кандидата:

Леле Р. Шурлан, дипломираног биолога, студента докторских студија, студијског програма Биологија ћелија и ткива, под насловом:

„Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“.

За менторе се именују:

1. Др Александра Кораћ, редовни професор, Биолошког факултета Универзитета у Београду;
2. Др Иван Тулић, редовни професор, Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: **Лелу Р. Шурлан**

А: Име и презиме ментора: **др Александра Кораћ**

Звање: **редовни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jovic M, Stancic A, Nenadic D, Cekic O, Nezic D, Milojevic P, Micovic S, Buzadzic B, **Korac A**, Otasevic V, Jankovic A, Vucetic M, Velickovic K, Golic I, Korac B. Mitochondrial molecular basis of sevoflurane and propofol cardioprotection in patients undergoing aortic valve replacement with cardiopulmonary bypass. *Cell Physiol Biochem*. 2012, 29:131-142.
2. Vucetic M, Otasevic V, **Korac A**, Stancic A, Jankovic A, Markelic M, Golic I, Velickovic K, Buzadzic B, Korac B. Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1 α and AMPK α . *BBA*. 2011, 1810:1252-1261.
3. Markelic M, Velickovic K, Golic I, Otasevic V, Stancic A, Jankovic A, Vucetic M, Buzadzic B, Korac B, **Korac A**. Endothelial cell apoptosis in brown adipose tissue of rats induced by hyperinsulinaemia: the possible role of TNF- α . 2011, *Eur. J. Histochem*. 55:187-193.
4. Otasevic V, **Korac A**, Buzadzic B, Stancic A, Jankovic A, Korac B. Nitric oxide and thermogenesis--challenge in molecular cell physiology. *Front Biosci*. 2011, 3:1180-95.
5. Petrović V, Buzadžić B, **Korać A**, Korać B. Antioxidative defense and mitochondrial thermogenic response in brown adipose tissue. *Genes Nutr*. 2010, 5:225-235.

Б: Име и презиме ментора: **др Иван Тулић**

Звање: **редовни професор, Универзитет у Београду- Медицински факултет**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Tulić I**, Tulić L, Micić J. Pregnancy in patient with Swyer syndrome. *Fertil. Steril*. 2011, 95:1789-1789.
2. Gojnic M, Filimonovic D, Arsenijevic LJ, Popovic N, Dugalic V, Jeremic V, **Tulic I**, Radonjic G, Pervulov M, Argirovic R. Cervical and duodenal polyps and their malignant alterations - case report. *Eur. J. Gynaec. Oncol*. 2007, 28:69-71.
3. Lalić N, Majkić-Singh N, Mićić S, Bojanić N, **Tulić I**. Predictive value of acrosome reaction with monoclonal antibodies GB24. *Yug. Med. Biochem*. 2000, 19:25-30.
4. Jovanović A, Jovanović S, **Tulić I**, Grbović L. Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Hum. Reprod*. 1998, 1:71-76.

5. Jovanović, A., Jovanović S, **Tulić I**, Grbović L. Effect of oxytocin as a partial agonist at vasoconstrictor vasopressin receptors on the human isolated uterine artery. Br. J. Pharmacol. 1997, 121:1468-1474.

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В, или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа, коју ће на предлог Универзитета донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41, и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односно дисертације.

Г) У случају да у ужуј научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

Декан Биолошког факултета

Датум: 06.04.2012.

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 09.03.2012. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Леле Р. Шурлан**, под насловом *„Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“*.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад Леле Р. Шурлан, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А) Биографија

Општи подаци:

Име и презиме: Лела Р. Шурлан

Датум и место рођења: 11.04.1971. год. Босански Нови, БиХ, СФРЈ

Образовање:

- 2006– *Докторске студије на Биолошком факултету; модул: Биологија ћелија и ткива.*
- 2001–2006 *Магистарске студије на Биолошком факултету; модул: Цитологија*
- 1990–2000 *Биолошки факултет Универзитета у Београду; студијска група Биологија; просечна оцена у току студија 8.63 и оцена 10 на одбрани дипломског рада.*
- 1985–1989 *Средња школа „Пролетерске бригаде“, математичко-физичко-рачунарског смера; образовни профил: програмер; Пуцарево, БиХ.*

Запослење: Клиника за гинекологију и акушерство КЦС, Београд

- 2007– *Биолог-ембриолог / клинички ембриолог
(Одељење асистираних репродукционих технологија, КГА, КЦС).*
- 2003–2006 *Биолог-истраживач приправник на пројекту деривације ембрионалних матичних ћелија
(Лабораторија за хуману генетику и истраживање; Специјална гинеколошка болница „Београд“).*

Курсеви:

- | | |
|------|---|
| 2011 | <i>ESHRE pre-congress course No.16: Academic Autrorship programme – key issues in getting published - the study design and write-up, Stockholm, Sweden</i> |
| 2010 | <i>ESHRE pre-congress course No.2: From gametes to embryo: Genetics and developmental biology, Rome, Italy</i> |
| 2009 | <i>ESHRE pre-congress course No.1: Paramedical group: Working together - theory and practice, Amsterdam, Netherlands</i> |
| 2009 | <i>ISIVF pre-congress course No.5: Germ Cell and Tissue Ovarian Preservation – Impact on IVM Development, 15th world Congress on In Vitro Fertilization, Geneva, Switzerland</i> |
| 2008 | <i>ESHRE pre-congress course No.2: SIG Embryology - The human IVF lab in 2008 and beyond, Barcelona, Spain</i> |
| 2007 | <i>Симпозијум-радионица: Витрификација, ИГА КЦС, 27-28. септембар, Београд</i> |
| 2003 | <i>Основе културе ћелије, практичан курс, блок-настава, Институт за нуклеарна истраживања „Винча“, Београд</i> |

Сертификати за рад и стручну оспособљеност

- | | |
|------|--|
| 2011 | <i>ESHRE Certificate for Clinical Embryologist; по стицању услова за приступање испиту, положен 02. јула 2011. Älvsjö, Stockholm, Sweden</i> |
| 2008 | <i>MESSER Technologies, стручна обука и испит за рад са течним азотом, угљен диоксидом, инсталацијама за снабдевање и посудама за складиштење, Београд 17.12.2008.</i> |

Чланство у научним друштвима и струковним удружењима:

1. Европско удружење за хуману репродукцију и ембриологију – ESHRE
2. Удружење за хуману репродукцију Србије
3. Специјална интересна група Ембриологија у оквиру UXPC; координатор групе (*Удружење клиничких ембриолога; председавајући Удружења)
4. Српско друштво за митохондријалну и слободно-радикалску физиологију

Чланство у стручним комисијама:

1. Републичка стручна комисија Министарства здравља за биомедицински потпомогнуто оплођење (РЦК МЗ за БМПО)
2. Комисија за доношење одлуке о испуњености услова за укључивање у процес вантелесне оплодње, у оквиру једне од надлежних Здравствених Установа РС (Комисија за ВТО при КГА КЦС)

Страни језици:

1. *Енглески језик, активно знање*
2. *Руски језик, пасивно знање*
3. *Шпански језик, базично знање*

Посебне активности и награде:

- 2011 *Best poster abstract award – The 4th International IVI Congress, Valencia, Spain*
- 2004–2005 *Стипендиста Националне службе за запошљавање („Помоћ за 200 младих талената уписаних на магистарске студије”)*

Б. Библиографија:

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Поглавље у монографији

1. **Šurlan L**, Korać A, Radunović N. *Poglavlje 1: Sex Cross-Talk: Nastanak i opstanak polnosti*. U: Cross Talk From cell to Human. Urednik N Radunović, Udruženje za Humanu Reprodukciju Srbije, Beograd, 2011. 11-18. ISBN 978-86-88525-03-9
2. **Šurlan L**, Krstić A, Macanović B, Vuletić S, Stanković V, Radunović N. *Poglavlje 15: Izjednačen sistem procene embriona*. U: Cross Talk From cell to Human, Ed Radunović N, Udruženje za Humanu Reprodukciju Srbije, Beograd, 2011. 123-125. ISBN 978-86-88525-03-9
3. Ljubić A, Micić J, **Šurlan L**, Marković A. *Poglavlje 17: Očuvanje fertilitnosti cryo-prezervacijom*. U: Cross talk From Cell to Human, Urednik N Radunović, Udruženje za humanu reprodukciju Srbije, Beograd, 2011. 129-132. ISBN 978-86-88525-03-9
4. **Šurlan L**, Radunović N. *Osnovi Urgentne Perinatologije. Omics - veza izmedju sistemske i “HD” biologije i perinatologije*. U: Urgentna stanja u Perinatalnoj medicini, Urednik N Radunović, Novi Astakos, Beograd, 2011. 9-15, ISBN 978-86-88525-01-5

Б2. Радови у часописима националног значаја

1. **Šurlan L**, Radunović N. *Cryopreservation in ART: Principles, Obstacles and Future perspectives*. Acta Clinica: Assisted reproduction technology in infertility therapy. Gost urednik: N Radunović, Klinički Centar Srbije, Beograd 2009, Vol.9 (3), 245-254. ISSN 1451-1134.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Šurlan L**, Radunović N. *Cell and its environment: How we “see” them*. 5th International symposium Recent Advances in Human Reproduction. Beograd, Srbija, 19-20. novembar 2010. U: Imaging in Human Reproduction, Ed: N Radunović, Beograd 2010, pp 13–19.

- 2 **Šurlan L**, Stanković V, Tulić I, Radunović N. *Koji vam je procenat? Upotreba i razumevanje IVF statistike*. 4.Simpozijum sa međunarodnim učešćem: Novosti u humanoј reprodukciji, Beograd, Srbija, 27-28.novembar 2009, pp 46-47.
- 3 **Šurlan L**, *Zalihe humanih oocita - nepovratna regresija kontra neo-oogenezi: novi koncepti u histologiji*. 3.Simpozijum sa međunarodnim učešćem: Novosti u humanoј reprodukciji, Beograd, Srbija, 5-6. decembar 2008, pp 83-84.
- 4 Stanković V, **Šurlan L**, Radunović N, Tulić I, Ljubić A, Vidaković S, Spremović S, Stojnić J, Micić J, Značaj analize rezultata vantelesne oplodnje. 6.ti Simpozijum sa međunarodnim učešćem Novosti u humanoј reprodukciji, 2-3.decembar 2011, Beograd, Srbija, Poglavlje 30, pp 207.
- 5 **Šurlan L**, Stankovic V, Micic JD, Stojnic J, Ljubic A, Radunović N, Tulic I. We picked up 1, 2 or 3 oocytes. Have we done enough?.1st Meeting on Oocyte: from Basic Research to Clinical Practice. Ovarian Club, Barcelona, Spain, 3-6. November 2011. Subm.No. 1043856.
- 6 **Šurlan L**, Golić I, Otašević V, Veličković K, Stanković V, Micić JD, Tulić I, Grubić M, Korać B, Korać A. Mitoptosis can contribute to the blastomeres fragmentation. The 4th International IVI Congress. Valencia, Spain, April 7-9, 2011, P-13, pp. 65.
- 7 **Šurlan L**, Golić I, Tulic I, Otasevic V, Korać B, Korać A. Mitochondrial distribution and nitric oxide production in partially fragmented human embryo. 52nd Symposium of the Society for Histochemistry. Prague, Czech Republic, 1-4. September 2010, P-19, pp. 92.
- 8 Stanković V, **Šurlan L**, Tošić T, Tulić I, Radunović N, Ljubić A, Vidaković S, Spremović S, Stojnić J. Istovremena primena IVF i ICSI metode - da ili ne? 3.Simpozijum sa međunarodnim učešćem: Novosti u humanoј reprodukciji, Beograd, Srbija, 5-6. decembar 2008, pp 92.
- 9 Tošić T, **Šurlan L**, Radunović N. Povezanost dana embriotransfera sa osobinama embriona i ishodom postupka vantelesne oplodnje (pilot studija). 3. Simpozijum sa međunarodnim učešćem: Novosti u humanoј reprodukciji, Beograd, Srbija, 5-6. decembar 2008, pp 94.

B4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

- 1 **Šurlan L**, Golić I, Otašević V, Veličković K, Stanković V, Tulić I, Markelić M, Stančić A, Janković A, Vučetić M, Buzadžić B, Korać B, Korać A. *Aktivna uloga mitohondrijalne populacije u fragmentaciji blastomera ranih embriona*. Prvi kongres - Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive. 24. septembar 2011, Beograd, Srbija, P-25, pp. 65.
- 2 **Šurlan L**, Stanković V, Radunović N. *Osobine ćelija koje određuju uspešnost krioprezervacije*. Simpozijum: Vitifikacija – novi postupak u vitifikaciji oocita i embriona. IGA KCS, Beograd, Srbija. 27-29. septembar 2007, O-2.
- 3 **Šurlan L**, Stanković V, Radunović N. Odmrzavanje oocite, embriona ili blastociste – rizična karika u krioprezervaciji. Simpozijum: Vitifikacija – novi postupak u vitifikaciji oocita i embriona. IGA KCS, Beograd, Srbija. 27-29. septembar 2007, O-7.

- 4 Šurlan L, Vuletić S. Radulović S. *Stem ćelije – pravci istraživanja i primena*. In Vitro Fertilization Update Workshop, 26. mart 2005, Beograd, Srbija, CD seminar book, pp. n.a. 2005.

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића

Полазне основе:

И поред значајне оптимизације услова културе ембриона током асистираних, *in vitro* фертилизације (IVF), морфолошки савршени ембриони, једнаких, лоптастих бластомера нису честа појава. Појава мембранских телашаца испуњених цитоплазмом и/или органелама – фрагментација бластомера током првих деоба браздања је у некој мери нормална и неретко пролазна појава која прати формирање ембриона. Континуирани „*time lapse*“ видео записи показују високу динамичност популације фрагмената: њихову мобилност и нестанак односно ресорпцију у размацама од пар минута, али и њихову постојаност и прогресивно ширење које може захватити и цео ембрион.

Фрагментација изражена у већој мери, праћена губитком једне или више бластомера повезује се са смањењем па и губитком развојног потенцијала раног ембриона (застој развића – *енгл.* embryo arrest). Способност формирања бластоцисте код таквих ембриона је смањена, као и шансе ембриона за успешну имплантацију.

Степен фрагментације се обично изражава у процентима запремине ембриона захваћене фрагментацијом, као и позицијом већине фрагмената (централна или периферна). Степен захваћености је основа за нумеричку оцену квалитета ембриона која је обавезна приликом селекције најбољих ембриона у IVF технологији. Фрагментисани ембрион, као такав, добија лошу оцену и по правилу бива изостављен из одабира за ембриотрансфер и/или криопрезервацију.

Мишљења о развојном капацитету, те способности опоравка таквих ембриона су данас углавном подељена, а број студија која расветљавају детаље ове појаве и њену физиолошку основу је неочековано оскудан. Ембриолозима и стручној јавности је доступан изузетно мали број публикованих, а употребљивих електрон-микрографија раних ембриона. Супротно томе, студије о морфологији ооцита и следствени критеријуми за њихов фертилизациони потенцијал изузетно су бројне.

Конвенционална, морфолошка оцена раних ембриона (посматрање под бинокуларном лупом, до 100x) даје само делимичну слику њиховог квалитета, не улазећи у очуваност молекулског наслеђа јајне ћелије и сперматозоида и нарочито, биоенергетског потенцијала за даљи развој.

Бројна популација митохондрија, наслеђена од јајне ћелије, која се приликом браздања раздељује међу бластомерима преузима кључну виталну односно биоенергетску улогу у животу и развоју преимплантационих ембриона. Осим продукције енергије, митохондрије регулишу различите функције ембриона Ca^{2+} и O_2 зависном сигнализацијом, као и путевима који подразумевају сигнализацију

посредовану рективним врстама кисеоника и азота, пре свега азот оксидом (NO) и супероксид анјон радикалом ($O_2^{\cdot-}$). Тренутно познавање митохондрија-зависних механизма који леже у основи фрагментације *in vitro* ембриона је оскудно и углавном базирано на испитивањима мембранског потенцијала митохондрија, без поузданих сазнања о другим параметрима митохондријалне функционалности. Наиме, пост-фертилизациона бројност митохондрија, њихова активност и ремоделирање ових органела, затим регулација дистрибуције по бластомерама и систем елиминације „лоших“ митохондрија само су нека од бројних питања која данас побуђују посебну истраживачку пажњу и дискусије.

Све ове чињенице заједно истичу значај истраживања које ће омогућити упознавање ћелијских и молекулских промена које леже у основи фрагментације ембриона и на том знању засновано увођење нових критеријума процене квалитета раних ембриона који ће се употребити за ембриотрансфер или криопрезервацију.

Предмет докторске дисертације:

Предмет истраживања предложен у оквиру овог рада јесте утврђивање ултраструктуре бластомера хуманих ембриона које показују мање или више изражену фрагментацију, те молекулских, метаболичких и редокс параметара (механизма) на нивоу ћелијских органела, нарочито митохондрија, који би требало да допринесу познавању и регулацији процеса фрагментације. На тај начин би студија могла да понуди и нове маркере квалитета *in vitro* ембриона.

Истраживања би обухватала:

- утврђивање присуства, морфологије и постојања градијента у дистрибуцији митохондрија између и унутар бластомера односно фрагмената;
- утврђивање функционалног стања митохондрија и постојања евентуалних разлика код квалитетних - нефрагментисаних, те ниско-фрагментисаних и високо-фрагментисаних ембриона;
- утврђивање укључености реактивних врста, тј. редокс-зависних механизма у фрагментацији и то пре свега на нивоу митохондрија ембриона;
- утврђивање постојања активних механизма репарације и компензовања раних поремећаја у периоду првих деоба браздања на нивоу митохондријалне популације ембриона;
- осветљавање улоге митохондрија у систему одржавања функционалне равнотеже раних ембриона и балансирања између наставка и застоја у развоју.

Научни циљ докторске дисертације:

Циљ истраживања је упознавање са детаљима ултраструктуре хуманих ембриона у периоду када се одређује њихова даља судбина (присуство, дистрибуција и стање ћелијских органела у бластомерама и, нарочито, фрагментима, да ли је сличност фрагмената са апоптотским телима привидна или суштинска, може ли се разјаснити висока променљивост и мобилност фрагмената унутар ембриона).

Поред тога, иако постоје истраживања која јасно указују на битност митохондрија у раном развоју ембриона, још увек се мало зна о молекулским механизмима фрагментације ембриона, а нарочито о променама које се том приликом дешавају у самим митохондријама. Стога је циљ ове докторске дисертације да

окарактерише евентуалне промене у митохондријама на структурном, метаболичком и молекулском нивоу које се дешавају током фрагментације ембриона. Услед њиховог садашњег недовољног познавања, продубљивање сазнања које ова дисертација омогућава, у погледу разумевања овог патолошког процеса, било би од значаја за унапређење квалитета ембриона, а тиме и успешности имплантације и повећања броја вијабилних трудноћа.

Предвиђена студија има за циљ да испита и редокс-зависност процеса фрагментације, те да се на основу података до којих се дође омогући примена редокс-активних супстанци током култивације ембриона, као нови терапеутски/фармаколошки приступ за побољшање преживљавања *in vitro* ембриона.

Оваквим ширим увидом у динамику раног развића омогућило би се унапређивање система култивације ембриона све до потенцијалних терапијских примена (боља контрола редокс услова, развој митохондријалне терапије...), а све у сврху добијања квалитетнијих ембриона.

Материјал и методи:

У студији ће се користити фрагментисани и нефрагментисани хумани преимплантациони ембриони добијени поступцима IVF, у стадијуму Дан-2 до Дан-4 по добијању ооцита (дан пункције фоликула је Дан 0) и то искључиво ембриони који су изостављени из поступка ембриотрансфера као сувишни или некавалитетни те као такви донирани у научно-истраживачке сврхе, по прибављању писане сагласности информисаних пацијената (пар укључен у поступак вантелесне оплодње).

Ембриони ће бити добијени технологијом биомедицински потпомогнутог оплођења (контролисана оваријална стимулација по стандардизованим клиничким протоколима, пункција фоликула са аспирацијом ооцита 34 ± 1 сата по администрацији финалне инјекције хуманог хорионског гонадотропног хормона; култура ооцита, сперматозоида, *in vitro fertilizacija* и култура ембриона у комерцијално доступним медијумима и по стандардизованим процедурама ембриолошке лабораторије). Током култивације на ембрионима неће бити вршена било каква нестандардна манипулација у смислу експеримента јер је култивација истих законски дозвољена искључиво у сврхе зачећа и добијања детета.

Све процедуре, поступци добијања и анализе које ће бити коришћене у овом истраживању одобрени су од стране Етичког одбора Клиничког центра Србије, одлука бр. 674/3 од 20.05.2010. Рани ембриони донирани у научно-истраживачке сврхе за потребе ове дисертације су у том смислу део исте кохорте и као такви подвргнути биолошком заустављању и даљим анализама.

Улога митохондрија у развоју, тј. фрагментацији раних ембриона испитиваће се праћењем митохондријалне динамике (структурне и метаболичке), као и продукцијом и локализацијом NO (коришћењем специфичне флуоресцентне пробе, диамино-флуоресцеин-2-ацетат) у зависности од степена фрагментације ембриона, у циљу расветљавања улоге митохондрија и реактивних врста у овом патолошком процесу.

Предвиђено је да се окарактеришу метаболички аспекти функционисања ембриона, пре свега метаболички статус митохондрија, нарочито током различитих фаза фрагментације, праћењем експресије (иРНК и протеинске) компоненти респираторног ланца. Функционални статус митохондрија у различито фрагментисаним ембрионима, пратиће се и коришћењем катјонске флуоресцентне пробе Mitotracker Green (MT), која улази у митохондрије зависно од њиховог мембранског потенцијала, делећи на тај начин

популацију митохондрија на активну и неактивну. Такође ће се пратити количина митохондријалне ДНК у ембрионима са различитим степеном фрагментације. Од посебног интереса за детерминисање разлика између ниске и масивне фрагментације, поред разлике у количини и локализацији NO и $O_2^{\bullet-}$, испитиваће се постојање евентуалних разлика у митохондријалној дистрибуцији у ембрионима различитих степена фрагментације, као и између бластомера у ембриону. Такође, пратиће се и митохондријална редистрибуција током ембрионалног развоја, која указује на улогу енергетске хомеостазе током развоја ембриона. У циљу карактеризације маркера одбацивања ембриона, пратиће се груписање митохондрија у кластере, као и колокализација митохондријалних кластера и ензима који продукују, тј. уклањају реактивне врсте, нарочито NO и $O_2^{\bullet-}$.

Редокс зависни сигнални путеви у фрагментацији, односно развоју ембриона у овом експерименталном моделу ће се пратити преко одговора на нивоу неких ензима антиоксидативне одбране, нарочито оних кључних за уклањање и продукцију $O_2^{\bullet-}$, Манган супероксид дисмутаза (MnSOD) и NADPH оксидазе (NOX) те изоформи NO синтаза (NOS): ендотелијалне, неуроналне и индуцибилне NOS.

Током ових истраживања ће се користити спектар различитих методолошких приступа: имунохистохемијски и имуноцитохемијски, за одређивање присуства, специфичне локализације протеина, као и субћелијске колокализације одређених протеина; специфичне методе микроскопије (светлосна, електронска, конфокална), морфометријске и стереолошке анализе, и квантитативни q-PCR (*енгл.*, polymerase chain reaction) за праћење експресије гена.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци):

1. Trounson A, Bongso A. (1996) Fertilization and development in humans. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 32:59
2. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Pölz W, Tews G. (2001) Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil. Steril.*, 76:281
3. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. (1999) Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil. Steril.*, 71:836
4. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2:93
5. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. (2001) A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage. *Hum. Reprod.*, 16:719.
6. Dumollard R, Duchon M, Carroll J. (2007) The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 77:21
7. Cummins, JM. (2004) The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 115 Suppl 1: p. S23
8. Cao X, Chen Y. (2009) Mitochondria and calcium signaling in embryonic development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20:337
9. Antczak M, Van Blerkom J. (1999) Temporal and spatial aspects of fragmentation in

early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum. Reprod.*, 14:429

10. Hardy K, Stark J, Winston RM (2003) Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol. Reprod.*, 68:1165

Г. Закључак и предлог:

На основу свега изнетог, Комисија сматра да је тема докторске дисертације Леле Р. Шурлан у потпуности научно заснована, актуелна, и да ће представљати значајан научни допринос расветљавању ултраструктуре бластомера хуманих ембриона које показују мање или више изражену фрагментацију, као и молекулских, метаболичких и редокс механизма на нивоу ћелијских органела, посебно митохондрија. На тај начин би ова студија могла да понуди и нове маркере квалитета *in vitro* ембриона, што је од изузетне важности за успешност асистираних репродукције. Стога, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да одобри израду докторске дисертације **Леле Р. Шурлан** под називом **„Молекулске и ултраструктурне промене током фрагментације преимплантационих хуманих ембриона: веза са застојем развића“**.

За менторе дисертације предлажу се **др Александра Кораћ**, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и **др Иван Тулић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Београд, 20.03.2012. године

Комисија:

др Александра Кораћ, редовни професор
Биолошки факултет
Универзитет у Београду

др Иван Тулић, редовни професор
Медицински факултет
Универзитет у Београду

др Весна Оташевић,
виши научни сарадник, ИБИСС
Универзитет у Београду

