

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО		06.02.2024	
Оргјед.	Број	Датум	Вредност
807	807		

**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-967/35 од 15.12.2023. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Александре Димитријевић и предложеног ментора за израду докторске дисертације под називом:

**„Инфламационо-оксидациони статус трудница које болују од тромбофилије“**

Чланови испитне комисије су:

- Проф. др Горан Бабић** - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник;
- Проф. др Петар Арсенијевић** - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан;
- Доц. др Милан Докић** - доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

## **2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

### **2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације**

Тромбофилија представља читав низ урођених и стечених поремећаја згрушавања крви који су повезани са артеријским и венским тромбозама. У великом броју компликација трудноће тромбоза има главну улогу. До данас познате урођене тромбофилије препознају се у следећим облицима: дефицијенција или недостатак ендогених антикоагулантних протеина антитромбина, протеина С, протеина S, абнормалности фактора V Leiden. Док се облици стечене тромбофилије препознају као антифосфолипидна антитела, постоји доста показатеља да су урођена и стечена тромбофилија део патофизиолошког процеса који је уско повезан са низом компликација у трудноћи, као што су интраутерини застој раста, прееклампсија и прерано одлужљивање постељице. Међутим, та повезаност још увек није довољно научно истражена. Такође, постоји тромбофилија упарених наследних и стечених фактора која убраја поремећај фактора VIII – VIII c, инхибитори протеина С.

Једна од првих студија која је показивала на повезаност између тромбофилије и компликација у трудноћи је била *Kupferminc* и сарадника из 1999. године. Аутори су установили преваленцу од 65% мутација повезаних са тромбофилијом. Лабораторијско испитивање тромбофилије се препоручује код жена које су имале три или више спонтаних побачаја у првом триместру, два или више у другом триместру или једну интраутерину смрт плода током трећег триместра трудноће (7,8). У овим тромбофилијама превентивна примена антикоагулативне терапије током трудноће доводи до успешног исхода трудноће, док без терапије свега 20% трудноћа са тромбофилијом би имала повољан исход.

Оксидација је битан је процес стварања енергије неопходне за све физиолошке процесе. У току уобичајених биохемијских процеса стварају се и слободни радикали који се одмах укључују у биохемијске реакције, али у нефизиолошким условима, њихово повећање доводи до оксидативног стреса. Као такви, могу имати двоструку улогу у људском организму, која зависи од тога, да ли се у већој мери стварају, или их антиоксидативни механизми не уклањају у довољној мери. То су атоми или молекули који у свом последњем електронском омотачу поседују електроне у вишку, јако су реактивни, траже супстрат да би се редуковали, а њега оксидовали. Тако настали слободни радикал се назива секундарни слободни радикал и покреће читаву каскаду даљих оксидација и редукција које временом постају јачег интензитета и захватају већи број биомолекула. Овај процес је битан јер физиолошки омогућава активност леукоцита (фагоцитозу), сигналну трансдукцију и апоптозу. Постоји више врста слободних радикала кисеонични, азотни, угљоводонични. Супротно томе, њихово негативно дејство испољава се на више начина:

липидном пероксидацијом, старајући проатерогене, проинфламаторне, промутагене и канцерогене молекуле. Затим, оксидацијом протеина, стварајући веће молекулске форме као и фрагментацију бочних ланаца и модификацијом ДНК која представља први корак у канцерогенези, мутагенези и старењу. Повећану продукцију слободних радикала стимулишу и интерлеукин 6 (IL-6), фактор некроз тумора алфа (TNF- $\alpha$ ), као медијатори запљења, а који настају у условима недостатка протеина С (хетерозиготи), као и код *Leiden* тромбофилије.

У научној литератури нема података о повезаности тромбофилије, инфламације и оксидативног стреса у трудноћи. Будући да је повезаност инфламације и оксидативног стреса са развојем трудноће трудница са тромбофилијом недовољно позната, циљ ове студије је био истражити да ли постоје разлике у оксидационо-инфламацијском статусу трудница са тромбофилијом у различитим фазама трудноће.

## **2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада**

Након анализе параметара оксидационо-инфламацијског статуса трудница са тромбофилијом у првом, другом и трећем триместру, стећиће се дубљи увид у патофизиолошке механизме који леже у основи поремећаја који се јављају током трудноће пацијенткиња са тромбофилијом. Ови резултати послужиће као основа за даље испитивање оксидационо-инфламацијског статуса као потенцијалног терапеутског циља у третману тромбофилије у трудноћи.

## **2.3. Наслов, циљеви и хипотезе докторске дисертације**

**Наслов:** Инфламационо-оксидациони статус трудница које болују од тромбофилије

**Циљеви:**

1. - Испитати да ли постоји разлика у концентрацијама прооксидативних маркера код трудница оболелих од тромбофилије у односу на здраве труднице у првом, другом и трећем триместру трудноће.
2. - Испитати да ли постоји разлика у активности параметара антиоксидационог система заштите код трудница оболелих од тромбофилије у односу на здраве труднице у првом, другом и трећем триместру трудноће.
3. - Испитати да ли постоји разлика у концентрацијама интерлеукина 6 (IL-6) и фактора некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) код трудница оболелих од тромбофилије у односу на здраве труднице у првом, другом и трећем триместру трудноће.

### **Хипотезе:**

- Постоји разлика у концентрацијама прооксидативних маркера код трудница оболелих од тромбофилије у односу на здраве труднице у првом, другом и трећем триместру трудноће.
- Постоји разлика у активности ензима антиоксидационог система заштите код трудница оболелих од тромбофилије у односу на здраве труднице у првом, другом и трећем триместру трудноће.
- Постоји разлика у концентрацијама интерлеукина 6 (IL-6) и фактора некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) код трудница оболелих од тромбофилије у односу на здраве труднице у првом, другом и трећем триместру трудноће.

## **2.4. Методе истраживања**

### **2.4.1. Врста студије**

Студија је клиничка, експериментална, контролисана, на материјалу хуманог порекла.

### **2.4.2. Популација која се истражује**

Студија би обухватила 120 испитаница, подељених у две једнаке групе. Контролну групу би чиниле хематолошки здраве труднице (без дијагнозе тромбофилије), док би експерименталну групу чиниле труднице које болују од тромбофилије.

Труднице из обе групе ће писаном сагласношћу, добровољно прихватити учешће у студији. Наведено испитивање је одобрено од стране Етичког одбора Клиничког центра (број 01/2862), од 02.03.2016. године.

#### **1. Укључујући критеријуми:**

- Труднице са доказаном тромбофилијом и труднице без тромбофилије

#### **2. Искључујући критеријуми:**

• Труднице које су трудноћу, по укључивању у студију, завршиле као missed abortion (одсуство срчане акције пре 12. недеље гестације)

• Труднице које су трудноћу, по укључивању у студију, завршиле спонтаним побачајем (утерино крварење пре 12. недеље гестације)

### **2.4.3. Узорковање**

#### **Узорковање биолошког материјала**

Код испитаница ће се одређивати следећи параметри:

- Акушерска анамнеза (број претходних трудноћа са тромбофилијом, број претходних

побачаја)

- Године живота
- Паритет
- Врста тромбофилије
- Телесна маса, дужина и пол новорођенчета на рођењу
- Конзумирање цигарета
- Примена нискомолекуларних хепарина код доказане тромбофилије

### **УЗОРКОВАЊЕ**

Узорци крви потребни за одређивање доле наведених параметара би се скупљали у различитим временским интервалима трудноће. Код хематолошки здравих трудница узорци ће се узимати у првом триместру (11-14 недеље гестације приликом узимања крви за Double test), другом триместру (21-24 недеље гестације приликом узимања крви током оралног теста оптерећења глукозом) и трећем триместру (31-34 недеља гестације приликом узимања крви за редовну контролу комплетне крвне слике и ултразвука). Узорковање крви вршиће се у гинеколошкој амбуланти Клинике за гинекологију и акушерство Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу.

Код трудница које болују од тромбофилије узорци крви ће се узимати у истим временским интервалима, у лабораторији Клинике за хематологију Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу. У узорцима крви ће се одређивати маркери оксидационог стреса и инфламације, и то:

#### **Индекс липидне пероксидације (TBARS)**

Индекс липидне пероксидације (TBARS) ће се одређивати индиректно преко продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА). Мерење се одвија на таласној дужини  $\lambda = 530\text{nm}$ .

#### **Концентрација нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )**

Концентрација азот монооксида (NO) ће се одређивати на основу количине ослобођених нитрита. Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Мерење се одвија на таласној дужини  $\lambda = 550\text{nm}$ .

#### **Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ )**

Одређивање концентрације супероксид анион радикала се заснива на реакцији  $\text{O}_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) до нитроформазан плавог. Мерење се одвија на таласној дужини  $\lambda = 550\text{nm}$ .

#### **Водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Детерминација количине водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) се заснива на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (Horse Radish Peroxidase - HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције  $\lambda_{max}=610nm$ .

#### **Супероксид дизмутаза (SOD)**

Одређивање активности SOD спроводи се адреналинском методом. Ова метода припада групи метода "негативног" типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од  $O_2$ . Присутна SOD уклања  $O_2$  и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm.

#### **Каталаза (CAT)**

Активност каталазе ће се одређивати по методи Beutler-а. Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник пероксид апсорбује светлост.

#### **Редуковани глутатион (GSH)**

Активност редукованог глутатиона (GSH) одеђиваће се спектрофотометријски по методи Beutler-а, а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5-дителио-бис-6,2-нитробензевом киселином (DTNB).

Мерење концентрација наведених параметара биће спроведено на UV/VIS спектрофотометру.

#### **Концентрација проинфламаторних цитокини – интерлеукина 6 (IL-6) и фактора некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ )**

Концентрација цитокина (IL-6) и (TNF- $\alpha$ ) одређиваће се комерцијалним ELISA китовима специфичним за хумане цитокине (Human IL-6 DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA; human TNF- $\alpha$  /TNFSF1A DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA).

### **2.4.5. Снага студије и величине узорка**

Прорачун величине узрока је извршен на основу резултата претходно објављене студије у којој је праћен ензими антиоксидативне одбране у плаценти код наследне тромбофилије. За прорачун је коришћен Т-тест за независне узорке, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G\*Power*). Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан студијски узорак је прорачунат на 60 по групи.

### **2.4.6. Статистичка анализа**

Подаци о основним карактеристикама експерименталне и контролне групе трудница биће обрађени и приказани методама дескриптивне статистике. За континуалне варијабле користиће се средња вредност  $\pm$  стандардна девијација, минимум и максимум уколико подаци прате нормалну расподелу, односно медијана и перцентили уколико подаци не прате нормалну расподелу, док ће за категоријске варијабле бити приказана учесталост (проценти). Након провере нормалности расподеле података за континуалне варијабле, за процену утицаја независних варијабли на посматрани исход користиће се одговарајући параметарски или непараметарски тестови (ANOVA или Kruskal Valis тест, уз одговарајућу пост-хок анализу). За процену значајности разлике у учесталости код категоријских варијабли користиће се Хи-квадрат тест, док ће се у случају мале учесталости појединих категорија користити Фишеров тест. Вредност  $p < 0.05$  ће се сматрати статистички значајном, а интервал поверења за све тестове ће бити 95%. За одређивање јачине повезаности варијабли користиће се одговарајући коефицијент корелације (Пирсонов или Спирманов) зависно од тога да ли подаци прате нормалну расподелу. Добијени резултати ће бити груписани и приказани, табеларно и графички. Сви подаци ће се анализирати коришћењем статистичког програма IBM statistics SPSS верзија 20.

## **2.5. Значај истраживања за развој науке**

Тромбофилија је болест у експанзији. Ово истраживање би требало да по први пут испита да ли и на који начин инфламационо-оксидациони статус утиче на развојни ток трудноћа трудница које болују од тромбофилије, што би имало вишеструке импликације на терапијске могућности код трудница – давање антиоксиданаса и самим тим веће шансе у остваривању материнства.

## **2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје**

Оксидациони стрес представља поремећај равнотеже између формирања слободних кисеоничких врста и капацитета антиоксидативних механизма, који нису у стању да их неутралишу. Слободни радикали као секундарни гласници у многим ћелијским сигналним процесима, омогућавају ћелијску и ванћелијску хомеостазу, а њихова велика реактивност потиче од једног или више неспарених електрона. Када се нађу у високим концентрацијама тада се нарушава равнотежа са антиоксидативним системом. Исто се дешава и током инфламације те долази до озбиљних оштећења биолошких молекула, што за последицу има читав низ патофизиолошких промена па и саму смрт ћелије. Због тога инфламационо-оксидативни стрес има значајну улогу у патогенези многих компликација које могу настати током трудноће. Будући да трудноћа, као физиолошко стање, услед ангиогенезе и промењеног хормонског статуса доводи до извесног повећања оксидативног стреса и

инфламације, у неким случајевима развој трудноће може да оптерећен додатним патофизиолошким дешавањима, као што је то случај код тромбофилија у трудноћи.

Тромбофилија је специфично стање појачане функционалности хемостазног система које карактерише склоност ка настанку тромбоза, које доводе до повећаног стварања медијатора инфламације на нивоу ендотела где је поново повећана концентрација липидних хидропероксида као маркера оксидативног оштећења. На оксидативни статус трудница такође утичу животне навике, прекомерна тежина и пушење. Да би утврдили да ли постоји разлика између оксидативних промена у развојном току трудноће хематолошки здравих трудница и трудноћа праћених тромбофилијом, одређивани су маркери оксидативног стреса у првом, другом и трећем триместру. Досадашње студије нису испитивале утицај инфламационо-оксидативног стреса на трудноћу праћену тромбофилијом у различитим фазама трудноће. Циљ нашег истраживања је испитати утицај инфламационо-оксидационог статуса на развојни ток трудноће хематолошки здравих и трудница које болују од тромбофилије.

## **2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата**

Александра Димитријевић је рођена 27.10.1984. у Ћуприји, Република Србија. Завршила је основну школу и средњу медицинску школу у Ћуприји, а дипломирала је биологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Постдипломске студије је уписала на Медицинском факултету у Крагујевцу - смер: Хумана репродукција и развој. Запослена је у Институту за јавно здраље у Крагујевцу. Удата, мајка двоје деце.

Као први аутор објавила је један рад у целини у часопису категорије M51, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

**Dimitrijevic A, Jakovljevic V, Jovic N, Djuric J, Andric K, Joksimovic Jovic J. Oxidative stress and thrombophilia: focus on pregnancy-related pathophysiological mechanisms. Experimental and Applied Biomedical Research. 2023; doi: 10.2478/eabr-2023-0010. M51**

## **3. Предлог ментора**

За ментора ове докторске дисертације предлаже се **проф. др Јанко Ђурић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство. Предложени ментор испуњава све услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

### **3.1. Компетентност ментора**

проф. др Јанко Ђурић - редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство.



#### **Референце предложеног ментора:**

1. Protrka Z, Dimitrijevic A, Jovic N, Kastratovic T, Djuric J, Nedovic J, Zivanovic S, Vujic A, Drakulic SM, Djonovic N, Arsenijevic P. Expression analysis of the Beclin-1 in premalignant and malignant tissues of the uterine cervix. *Eur J Gynaec Oncol.* 2018;39(6):915-20.
2. Protrka Z, Arsenijevic P, Jovic N, Zivanovic S, Djuric J, Dimitrijevic A. A case of uterine torsion in term pregnancy associated with placental abruption and intrauterine fetal demise. *Clin Exp Obstet Gyn* 2018;45(2): 287-289
3. Jankovic SM, Stojadinovic D, Stojadinovic M, Jankovic SV, Djuric JM, Stojic I, Kostic M. Angiotensin Receptor Blocker Losartan Inhibits Spontaneous Motility of Isolated Human Ureter. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2016;41(6):835-838
4. T. Kastratović, S. Arsenijević, Z. Matović, M. Mitrović, I. Nikolić, Z. Milosavljević, Z. Protrka, M. Šorak, J. Đurić . Methotrexate and myotrexate induce apoptosis in human myoma fibroblasts (T hES cell line) via mitochondrial pathway. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2015; 72(3):455-464.
5. Jankovic SM, Jankovic SV, Stojadinovic D, Stojadinovic M, Djuric JM, Stojic I. Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Blocker Inhibits Spontaneous Activity of Human Ureter. *Pharmacology* 2015; 96(3-4):181-183.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина. Уже научне области: Гинекологија и акушерство и Хистологија и ембриологија.

Предмет истраживања се односи на анализирање параметара оксидационог стреса и инфламације у првом, другом и трећем триместру трудница са тромбофилијом. У научној литератури нема података о повезаности тромбофилије, инфламације и оксидативног стреса у трудноћи. Будући да је повезаност инфламације и оксидативног стреса са развојем трудноће трудница са тромбофилијом недовољно позната, циљ ове студије је био истражити да ли постоје разлике у оксидационо-инфламацијском статусу трудница са тромбофилијом у различитим фазама трудноће.

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Горан Бабић** - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник;
2. **Проф. др Петар Арсенијевић** - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан;
3. **Доц. др Милан Докић** - доцент Медицинских факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.

Сви предложени чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Александре Димитријевић имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

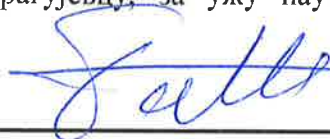
### Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада Александре Димитријевић, комисија закључује да кандидат испуњава услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Александре Димитријевић под називом: „**Инфламационо-оксидациони статус трудница које болују од тромбофилије**“ и одобри њену израду.

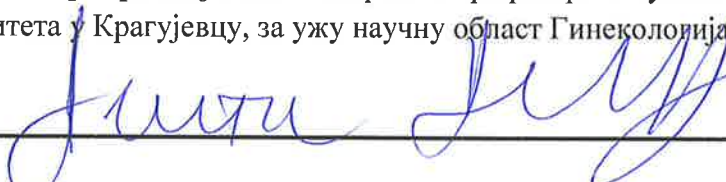
### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Горан Бабић - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник



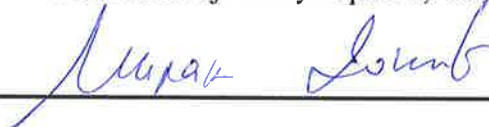
---

2. Проф. др Петар Арсенијевић - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан



---

3. Доц. др Милан Докић - доцент Медицинских факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан



---

У Крагујевцу, децембар 2023. године