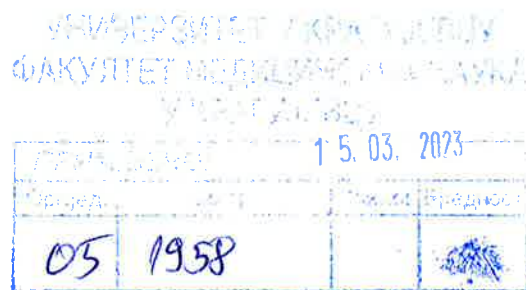


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-72/24 од 21.02.2023. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Николе Јовића и предложеног ментора за израду докторске дисертације под називом:

„Повезаност експресије галектина-3 и инфламацијских цитокина у претерминском порођају са хориоамнионитисом“

Чланови испитне комисије су:

1. Проф. др Жељко Миковић - редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник;
2. Проф. др Јелена Миловановић - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. Доц. др Горан Бабић - доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 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

Претермински порођај (ПП) се дефинише као порођај пре 37. недеље гестације и водећи је узрок перинаталног морталитета и морбидитета. Настанак спонтаног ПП је углавном индукован инфламацијом, са или без потврђене инфекције. Хориоамнионитис представља запаљенску реакцију која се одвија у феталним мембранама (амнион и хорион), иако се инфламација може проширити и на хорионске ресице и децидуу. Процењена учесталост хориоамнионитиса је 2–4% код терминских порођаја (ТП) и чак 40–70% код ПП.

Асептична и инфламација повезана са инфекцијом, доводи до ослобађања проинфламаторних цитокина, пре свега интерлеукина 1 β (IL-1 β). IL-1 β стимулише биосинтезу простагландина који доводе до сазревања грлића материце и контракција материце које претходе порођају. Експресија IL-1 β је показана у миометријуму, грлићу материце и амнионским мембранама током порођаја, без обзира на присуство инфекције. Његове вредности се повећавају у крви мајке, амнионској течности, плаценти и феталним мембранама, као и ткиву материце током ПП, посебно ако је изазван инфекцијом. IL-1 β се сматра кључним покретачем запаљења код ПП.

У некомпликованом ТП се вредности интерлеукина 6 (IL-6) повећавају у миометријуму, хориодецидуи, грлићу и крви мајке за разлику од IL-1 β , чије се вредности смањују. Током активне фазе порођаја, нивои IL-6 у плазми мајке повећавају се за 1,5 пут у поређењу са вредностима код жена које нису трудне. Исто се дешава и код ПП, где су нивои IL-6 значајно повишени у поређењу са ТП. Интересантно је да Gal-1 експримиран у децидуи смањује инфламацијски одговор нисходном регулацијом IL-6.

Gal-3 је ендогени лектин који остварује и про- и анти- инфламацијске ефекте у различитим патолошким стањима. Показано је да се експресија Gal-3 повећава у феталним мембранама и амнионском епителу код породиља које су имале хориоамнионску инфекцију и превремену руптуру плозових овојака (*preterm prelabor rupture of the membranes* - PPRM), у поређењу са групом без хориоамнионитиса. Ипак, детаљна анализа експресије Gal-3 у различитим деловима постеличног ткива, и корелација са експресијом IL-6 и IL-1 β у ПП и ТП до сада није испитивана.

Циљ ове студије је анализирање експресије Gal-3 и проинфламацијских цитокина у децидуи и хорионским чупицама, феталним мембранама, као и у серуму добијеном из крви мајке и крви пупчаника током терминског и претерминског порођаја, њихову међусобну корелацију и њихову корелацију са биохемијским параметрима инфламације.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Након израчунавања корелације између нивоа експресије IL-1 β , IL-6 и Gal-3 у постелици и плодовим овојцима и корелације између експресије IL-1 β , IL-6, Gal-3 и проинфламаторних параметара (леукоцити, CRP и фибриноген) у крви мајке и пупчаника, стећиће се дубљи увид у патофизиолошке механизме који леже у основи хориоамнионитиса као покретача ПП. Ови резултати послужиће као основа за даље испитивање Gal-3 као потенцијалног терапеутског циља у превенцији претерминског порођаја.

2.3. Наслов, циљеви и хипотезе докторске дисертације

Наслов: Повезаност експресије галектина-3 и инфламацијских цитокина у претерминском порођају са хориоамнионитисом

Циљеви:

Основни циљ овог истраживања је да се испита удруженост експресије Gal-3 и проинфламацијских цитокина који играју кључну улогу у развоју ПП што би пружило оквир за даља истраживања о улози Gal-3 у патогенетском механизму и терминског и претерминског порођаја.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Испитати експресију Gal-3 у у ткиву постелице и плодовим овојцима и утврдити концентрацију Gal-3 у серуму добијеном из крви мајке и крви пупчаника у терминским и претерминским порођајима.
2. Испитати експресију IL-1 β у у ткиву постелице и плодовим овојцима и утврдити концентрацију IL-1 β у серуму добијеном из крви мајке и крви пупчаника у терминским и претерминским порођајима.
3. Испитати експресију IL-6 у у ткиву постелице и плодовим овојцима и утврдити концентрацију IL-6 у серуму добијеном из крви мајке и крви пупчаника у терминским и претерминским порођајима.
4. Испитати да ли постоји корелација између испитиваних параметара у ткиву постелице и плодовим овојцима и серумима и да ли су у корелацији са системским биохемијским маркерима инфламације.

Хипотезе:

1. Експресија Gal-3 у ткиву постељице и плодовим овојцима и серуму је већа у случајевима претерминског порођаја удруженог са хориоамнионитисом у поређењу са терминским порођајем без хориоамнионитиса.
2. Експресија IL-1 β у ткиву постељице и плодовим овојцима и серуму је већа у случајевима претерминског порођаја удруженог са хориоамнионитисом у поређењу са терминским порођајем без хориоамнионитиса.
3. Експресија IL-6 у ткиву постељице и плодовим овојцима и серуму је већа у случајевима претерминског порођаја удруженог са хориоамнионитисом у поређењу са терминским порођајем без хориоамнионитиса.
4. Постоји корелација између испитиваних параметара у ткиву постељице и плодовим овојцима и серумима као и корелација Gal-3 и инфламацијских цитокина са системским биохемијским маркерима инфламације у крви мајке и крви пупчаника.

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

Испитивањем ће бити обухваћено 40 трудница, подељених у две групе. Прва група ће бити експериментална група, и чиниће је 20 трудница са претерминским порођајем (25.0 – 36.6 недеља трудноће), рачунајући време према акушерском термину. Контролну групу чиниће 20 трудница са терминским порођајем (од 37.0 – 41.6 недеља трудноће). Труднице из обе групе ће писаном сагласношћу, добровољно прихватити учешће у студији.

2.4.3. Узорковање

Узорковање биолошког материјала

По смештају у порођајну салу, трудницама ће бити узоркована периферна крв из кубиталне вене (2 узорка по 5 ml). Крв из умбиликалне вене (2 узорка по 5 ml) ће бити узоркована унутар првог минута од клемовања пупчаника. Крв ће бити узоркована стандардним *Vacutainer* системом у хепаринизоване, вакууминизирани епрувете. Један узорак ће се користити за стандардна лабораторијска испитивања (број леукоцита, концентрација фибриногена и CRP-а), а други за испитивање концентрације IL-1 β , IL-6 и Gal-3.

Узорковање цервиковагиналног бриса ће бити спроведено стандарном методом за микробиолошку дијагностику, и одмах по узорковању транспортован у Микробиолошку лабораторију Универзитетског клиничког центра Крагујевац, што је стандардна процедура током збрињавања труднице током порођаја.

Након порођаја, биће узоркован комплетни диск плаценте са пупчаном врпцом и плодовим овојцима. Део постеличног ткива и плозових овојака са више места ће бити узоркован у криовајлице, и ускладиштен на -80°C у Центру за молекулску медицину Факултета медицинских наука, до тренутка извођења PCR анализа. Преостало ткиво ће бити одложено у пластичне, хемијски чисте посуде са 4% формалином, а затим обрађено стандардним патохистолошким процедурама за добијање парафинских блокова. Ткиво постелице и плозових овојака ће се анализирати патохистолошки у циљу потврде постојања хистолошког хориоамнионитиса.

Достављање и чување биолошког материјала

Крв из које ће се одређивати број леукоцита, концентрација фибриногена и С-реактивног протеина (*C-reactive protein* - CRP), обрађиваће се у централној лабораторији Универзитетског клиничког центра Крагујевац, одмах након узимања узорка.

Узорци крви за одређивање концентрације IL-1 β , IL-6 и Gal-3, обрађиваће се у Центру за молекулску медицину Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, одмах након узорковања. Након центрифугирања, издвојени серум ће се чувати на температури од минус 70°C .

Обрада биолошког материјала

Одређивање концентрације IL-1 β , IL-6 и Gal-3 у серуму ELISA методом

Концентрације цитокина IL-1 β , IL-6 и Gal-3 у серуму мајке и пупчаника одређиваће се комерцијалним ELISA китовима према утврђеном протоколу произвођача.

Хистолошка анализа ткива постелице и плозових овојака

Исечци ткива у парафинским калупима бојиће се хематоксилин – еозином и анализираће се присуство инфламацијског инфилтрата. Парафински исечци ће се користити и за имунохистохемијска бојења антителима специфичним за IL-1 β , IL-6 и Gal-3.

Имунохистохемијска анализа ткива постелице и плозових овојака

Исечци парафинских блокова ће бити серијски исечени на дебљину од 4–5 μm и узимани на *SuperFrost* плочице. Пресеци ће бити депарафинизовани и рехидратисани у етанолу. Депарафинисани исечци ће се инкубирати са моноклонским антителима специфичним за IL-1 β , IL-6 и Gal-3 током ноћи у влажној комори на 4°C . Везана антитела ће се визуализовати помоћу конјугата специфичног за зеца и мишја антитела и фотомикрографисањем помоћу дигиталне камере повезане са светлосним микроскопом (Olympus BX51).

Интензитет бојења ће бити оцењен на следећи начин: 0 за неактивност, 1 за присуство слабо обојених, 2 за умерено обојених и 3 за јако обојених ћелије. Процент обојених ћелија је оцењен на следећи начин: 0 за нема позитивних ћелија, 1 за ретке и изоловане позитивне ћелије, 2 за <50% позитивних ћелија и 3 за >51%, позитивне ћелије. Два резултата ће бити умножена да би се добио коначан резултат који је између 0 и 9 (13).

Квантитативна анализа експресије (ниво иРНК) IL-1 β , IL-6 и Gal-3 у ткиву плаценте и плодних овојака

RT-PCR техником ће се испитати да ли постоји разлика у експресији IL-1, IL-6 и Gal-3 у ткиву плаценте и плодних овојака у терминским и претерминским порођајима. Изолација укупне рибонуклеинске киселине (енг. *ribonucleic acid*, RNA) из ткива плаценте ће се урадити употребом тризол реагенса. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA (енг. *Complementary Deoxyribonucleic acid*, cDNA) ће се урадити коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)*, према упутству произвођача, након чега ће се мерити експресија IL-1, IL-6 и Gal-3 методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енг. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енг. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR). Реакција qRT-PCR ће се урадити у *Mastercycler[®] ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*).

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле

1. Претермински порођај (од 25.0 до 36.6 недеља трудноће) и термински порођај (од 37.0 – 41.6 недеља трудноће)
2. Иницијални чинилац започињања порођаја – руптура плодних овојака или присуство порођајних материчних контракција
3. Паритет
4. Број претходних превремених порођаја
5. Присуство или одсуство цервикагиналне инфекције

Зависне варијабле

1. Број леукоцита, концентрација фибриногена и *CRP* у серуму мајке и пупчаника
2. Концентрација IL-1, IL-6 и Gal-3 у серуму мајке и пупчаника
3. Хистолошки скор који указује на степен експресије IL-1, IL-6 и Gal-3 у ткиву плаценте и плодних овојака
4. Релативна количина mRNA за IL-1, IL-6 и Gal-3 у ткиву плаценте и плодних овојака

2.4.5. Снага студије и величине узорка

Величина узорка израчуната је на основу резултата претходно публиковане студије, у којој је испитивана улога проинфламаторних цитокина у претерминском и терминском порођају. За прорачун је коришћен Т-тест за независне узорке, двоструко, уз претпоставку α грешке од 0,05, и снаге студије 0.8, уз коришћење одговарајућег рачунарског програма *G*Power*. Узимањем у обзир резултате наведене студије, израчуната је потребна величина узорка од 13 испитаница по групи.

2.4.6. Статистичка анализа

Подаци ће бити анализирани коришћењем комерцијално доступног софтвера IBM SPSS Statistic 20.0. Резултати ће бити приказани као средња вредност и стандардна грешка. Резултати ће бити анализирани коришћењем Студентовог т-теста за независне узорке ако подаци имају нормалну дистрибуцију или Mann–Whitney теста за податке који немају нормалне дистрибуције. Спирмановом корелацијом ће се проценити могућа повезаност између изабраних варијабли. Јачина корелације ће бити дефинисана као негативна или позитивна слаба (-0,3 до -0,1 или 0,1 до 0,3), умерена (-0,5 до -0,3 или 0,3 до 0,5) или јака (-1,0 до -0,5 или 1,0 до 0,5). Статистичка значајност је постављена на $p < 0,05$.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Патогенеза претерминског порођаја, посебно оног који је компликован хориоамнионитисом, представља изузетну перинатолошку енигму. Досадашња истраживања нису успела до краја да објасне и повежу у јединствену целину бројна биохемијска, молекуларна, имунолошка и патофизиолошка збивања која прате претермински порођај. Резултати овог истраживања пружиће дубљи увид у патофизиолошке механизме који леже у основи хориоамнионитиса као покретача претерминског порођаја, посебно са биохемијског и имунолошког аспекта. Испитаћемо улогу Gal-3 у иницијацији претерминског порођаја и хориоамнионитиса, као и његов однос са до сада познатим проинфламаторним цитокинима, маркерима претерминског порођаја иницираних инфламацијом.

Очекује се да студија покаже постојање корелације између експресије Gal-3 и експресије инфламацијских цитокина IL-1 β и IL-6 у различитим деловима постељичног ткива (децидуа и хорионске ресице), плодовим овојцима и серуму мајке и пупчаника, што би могло да укаже да Gal-3 учествује у регулацији продукције инфламацијских цитокина који играју кључну улогу и у терминском и у претерминском порођају. Ови резултати послужиће као основа за даље испитивање Gal-3 и као потенцијалног терапеутског циља у превенцији овог перинатолошког проблема.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Gal-3 је ендогени лектин који остварује и про- и анти- инфламацијске ефекте у реазличитим патолошким стањима. Показано је да се експресија Gal-3 повећава у феталним мембранама и амнионском епителу код породиља које су имале хориоамнионску инфекцију и превремену руптуру плодових овојака (*preterm prelabor rupture of the membranes* - PPRM), у поређењу са групом без хориоамнионитиса. Ипак, детаљна анализа експресије Gal-3 у различитим деловима постељичног ткива, и корелација са експресијом IL-6 и IL-1 β у терминском и претерминском порођају до сада није испитивана.

Циљ ове студије је анализирање експресије Gal-3 и проинфламацијских цитокина у децидуи и хорионским чулицама, феталним мембранама, као и у серуму добијеном из крви мајке и крви пупчаника током терминског и претерминског порођаја, њихову међусобну корелацију и њихову корелацију са биохемијским параметрима инфламације.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Др Никола Јовић рођен је 06. септембра 1987. године у Крагујевцу. Основну школу "Рада Шубакић" у Грузи завршио је као носилац дипломе "Вук Караџић". Средњу медицинску школу "Сестре Нинковић" у Крагујевцу завршио је 2006. године је као носилац дипломе "Вук Караџић" и дипломе "Сестре Нинковић" која се додељује најбољем ученику у генерацији. Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу завршио је 2012. године са просечном оценом 9.47. На истом факултету је положио специјалистички испит из гинекологије и акушерства 2019. године, са одличном оценом. Запошљен као специјалиста гинекологије и акушерства на Клиници за гинекологију и акушерство, УКЦ Крагујевац, и као асистент на Катедри за гинекологију и акушерство, ФМН Крагујевац, Универзитета у Крагујевцу. Студент је треће године докторских академских студија на предмету Хумана репродукција и развој, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Положио усмени докторски испит. На субспецијализацији из перинатологије на Медицинском факултету, Универзитета у Београду. Члан председништва Секције за перинаталну и неонаталну медицину, Члан Лекарске коморе Србије, Члан Српског лекарског друштва. Аутор бројних радова објављених у домаћим и међународним часописима са рецензијом, као и неколико помоћних уџбеника.

Као први аутор објавио је један рад у целини у часопису категорије M52, чиме је испунио услов за пријаву докторске дисертације:

Jovic N, Varjadic M, Nenadovic Zivanovic A. Characteristics of pregnancy, delivery and postpartum period in pregnant women with diagnosed gestational diabetes mellitus. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17(2):133-137. **M51**

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Мирјана Варјачић, 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 Мирјана Варјачић - редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство.

Референце предложеног ментора:

1. Jakovljevic M, Wu W, Merrick J, Cerda A, **Varjagic M**, Sugahara T. Asian innovation in pharmaceutical and medical device industry - beyond tomorrow. *J Med Econ.* 2021;24(sup1):42-50.
2. Jakovljevic M, Liu Y, Cerda A, Simonyan M, Correia T, Mariita RM, Kumara AS, Garcia L, Krstic K, Osabohien R, Toan TK, Adhikari C, Chuc NTK, Khatri RB, Chattu VK, Wang L, Wijeratne T, Kouassi E, Khan HN, **Varjagic M**. The Global South political economy of health financing and spending landscape - history and presence. *J Med Econ.* 2021;24(sup1):25-33.
3. Radonjic D, Raicevic S, Kljakic D, **Varjagic M**. The reasons for unusable lipemic blood plasma in transfusion treatment. *Srp Arh Celok Lek.* 2021;149(7-8):449-454.
4. Jakovljevic MM, Netz Y, Buttigieg SC, Adany R, Laaser U, **Varjagic M**. Population aging and migration - history and UN forecasts in the EU-28 and its east and south near neighborhood - one century perspective 1950-2050. *Global Health.* 2018;14(1):30.
5. Šošić GM, Jović N, Rakić B, Dimitrijević A, **Varjačić M**. Association Between Inherited Thrombophilia in Pregnancy and Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes. *Balkan J Med Genet.* 2017;20(2):11-18.

4. Научна област дисертације

Медицина.

Предмет истраживања се односи на анализирање експресије Gal-3 и проинфламацијских цитокина у децидуи и хорионским чупицама, феталним мембранама, као и у серуму добијеном из крви мајке и крви пупчаника током терминског и

претерминског порођаја, њихове међусобне корелације и њихове корелације са биохемијским параметрима инфламације. Након спроведеног истраживања стећиће се дубљи увид у патофизиолошке механизме који леже у основи хориоамнионитиса као покретача претерминског порођаја. Ови резултати послужиће као основа за даље испитивање Gal-3 као потенцијалног терапеутског циља у превенцији претерминског порођаја.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Жељко Миковић** - редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник;
2. **Проф. др Јелена Миловановић** - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. **Доц. др Горан Бабић** - доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан.

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

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада Николе Јовића, 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 Николе Јовића под називом: „Повезаност експресије галектина-3 и инфламацијских цитокина у претерминском порођају са хориоамнионитисом“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Жељко Миковић - редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник



2. Проф. др Јелена Миловановић - ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан



3. Доц. др Горан Бабић - доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан



У Крагујевцу, фебруар 2023. године