

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЛЕТ	30.04.2018.
Оригина	
05	5158-1

**ОДЛУКА ВЕЋА ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ О
ФОРМИРАЊУ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 04.04.2018. године, одлуком бр. IV-03-247/24, формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом“ кандидата Гордане Шошић, у следећем саставу:

1. **Проф. др Александра Димитријевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник;
2. **Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;
3. **Проф. др Предраг Ђурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;
4. **Доц. др Светлана Ђукић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;
5. **Др сци. Данијела Радивојевић**, научни сарадник Биолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Гордане Шошић и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Гордане Шошић под називом „Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом“, урађена под менторством проф. др Мирјане Варјачић, редовног професора Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, представља оригиналну научну студију која се бави анализом хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви настале под утицајем присуства тромбофилије, на почетку трудноће, и одговора након вишемесечне примене LMWH, у порођају, као и проценом утицај хромозомске нестабилности мајке на хромозомску нестабилност у лимфоцитима периферне крви фетуса.

Стабилност генетичког материјала је кључна за нормалан пренатални и постнатални раст и развој. Интегритет генома је угрожен стално присутним оштећењем дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) из ендогених и егзогених извора. Током феталног развоја, долази до брзе ћелијске пролиферације, активне експресије гена и високог нивоа ДНК метаболизма што може повећати подложност генотоксичном инсулту.

За анализу спонтано насталих и индукованих хромозомских абериација у хуманим биомониторинг студијама *in vitro* и *in vivo* најчешће се користи микронуклеус тест (МН тест) у лимфоцитима периферне крви. Микронуклеуси представљају цитоплазматске екстрануклеарне хроматинске масе, са изгледом малих једара, која се не инкорпорирају у једро једне од ћерки ћелија током ћелијске деобе. Фреквенца МН се сматра квантитативним показатељем структурних и/или нумеричких абериација хромозома.

Досадашња знања су указала на повезаност хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви с репродуктивним капацитетом и компликацијама трудноћа, као што су рекурентни спонтани побачаји, преекламсија и интраутерини застој у расту и развоју фетуса. Подаци из литературе указују на везу између присутне хромозомске нестабилности у крви мајке са нестабилношћу генетичког материјала детета.

Трудноћа представља стање повишеног ризика за настанак тромбоза и тромбоемболизма. Присутна хиперкоагулабилност у трудноћи је изазвана повећањем концентрације фактора коагулације, смањењем количине природних антикоагуланаса и смањењем фибринолитичке активности крви.

Термин тромбофилија се употребљава када су у питању хердитарни и аквизитарни поремећаји хемостазног система код којих постоји склоност најчешће ка венским тромбозама. Ризик за компликације у трудноћи је повишен код мајки са урођеном или стеченом тромбофилијом. У трудноћи тромбофилија се клинички може јавити као једна или више тромботичких манифестација као што су: понављајући спонтани побачаји и компликације трудноће (интраутерини застој у расту, интраутерина фетална смрт, тешка прееклампсија, абрупција плацента).

Терапија избора у трудноћи компликованој тромбофилијом су нискомолекуларни хепарини – LMWH. Већи број студија је показао позитиван утицај терапије LMWH на исходе трудноћа код трудница с тромбофилијом и претходним компликацијама трудноћа. Поред антикоагулантног ефекта, истраживања показују да LMWH поседује и антиинфламаторни ефекат.

Ова студија је показала да су код трудница с тромбофилијом на почетку трудноће фреквенце цитогенетичких биомаркера: микронуклеуса (МН), нуклеоплазматских мостова (НПМ) и нуклеусних пупољака (НП), као мера хромозомских оштећења, значајно више у односу на здраве труднице. Код трудница с тромбофилијом запажа се значајно смањење фреквенце МН, НПМ, НП након вишемесечне LMWH терапије. У порођају нису утврђене значајне разлике у фреквенци МН између трудница на тромбопрофилакти и здравих трудница, и фреквенце МН у обе групе су биле уједначено ниске.

Овом студијом је утврђено да не постоји значајна разлика у фреквенци МН неонатуса мајки с тромбофилијом које су током своје трудноће биле под антикоагулантном LMWH терапијом и здравих мајки.

Закључак ове студије је да примена терапије LMWH током трудноће пацијенткиња с тромбофилијом има позитиван утицај на хромозомску стабилност, што се објашњава вероватним утицајем терапије LMWH на снижавање нивоа оксидационог стреса и антиинфламаторним ефектом. Резултати ове студије показују беневит LMWH терапије

током трудноће, у смислу повећања геномске стабилности и снижавању степена компликација у трудноћи које се доводе у везу са оштећењем ДНК, као што су PE и IUGR.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података „PubMed”, „Medline”, „KOBSON”, „SCIndeks”, помоћу следећих кључних речи: *микронуклеус, нуклеоплазматски мостови, нуклеусни тупољци, тромбофилија, тромбофилија у трудноћи, неонатуси*, није пронађена студија која се бавила таквим испитивањем у нашој земљи, нити у свету. Студија која је предмет ове дисертације је до сада прва која је обухватила популацију пацијенткиња - трудница које су праћене на Одељењу патологије трудноће, Клинике за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац, током 2015. и 2016. године..

На основу ових података, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата кандидата Гордане Шошић, „**Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом**“, представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Гордана Шошић рођена је 25.09.1972. године у Гучи. Основну школу и средњу школу завршила је у Чачку и носилац је Вукове дипломе у основној и средњој школи. Завршила је Биолошки факултет, Универзитета у Београду, (генерација 1991/1992), са просечном оценом 9,05 током студирања и стекла звање дипломираног биолога.

Након завршених основних студија, приправнички стаж је обавила у Здравственом центру Чачак. Државни испит положила је 2000. године пред комисијом Министарства здравља, Републике Србије и стекла звање дипломирани биолог - здравствени сарадник.

Обуку из клиничке цитологије завршила је 2007. године у Републичкој школи гинеколошке цитологије у ГАК „Народни фронт“, а доедукацију из гинеколошке цитодијагностике по Бетесда класификацији 2012. године у организацији Медицинског

факултета Универзитета у Београду у сарадњи са пројектом „Подршка увођењу Националног програма за рано откривање рака у Србији“. Испит за супервизора цервикалне цитологије положила је 2013. године у ГАК „Народни фронт“ и постављена је за првог акредитованог супервизора за Шумадијски округ у оквиру Националног пројекта за рано откривање карцинома грлића материце на територији Републике Србије. Од 2011/2012. године уписала је Докторске академске студије из области Хумана репродукција и развој на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу. Положила завршни докторантски испит 2014. године. Стално је запослена од 2010. године до данас у Одсеку цитогенетске дијагностике, Одељење контроле фертилитета, Клинике за гинекологију и акушерство, Клиничког центар Крагујевац, као дипломирани биолог-здравствени сардник, где обавља послове гинеколошке цитолошке дијагностике за пацијенткиње КЦ Крагујевац и Дома здравља Кнић, послове цитогенетске дијагностике, пренаталне цитогенетске дијагностике и генетског саветовалишта за пацијенте са територија Шумадијског, Моравичког, Расинског, Поморавског и Златиборског округа. Од 2013. године обавља гинеколошки цитолошки скрининг на рак грлића материце као акредитовани клинички супервизор цервикалне цитологије за територију града Крагујевца током 2013-2015. године, а од 2016. до данас за територију општине Аранђеловац. Од 1999. године до октобра 2010. године била је запослена као дипломирани биолог у цитолошкој лабораторији Здравственог центра Чачак.

Ангажована је као главни истраживач на Јуниор пројекту Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу под називом: „Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом“ (ЈП 02-15) од 2015. године.

Аутор је или коаутор више радова објављених у целини у домаћим и међународним часописима из области генетике, цитогенетике и цитологије. Континуирану медицинску едукацију наставља кроз бројне симпозијуме и конгресе из области гинеколошке цитодијагностике, пренаталне дијагностике и цитогенетике у земљи и иностранству. Члан је Цитолошке секције Српског лекарског друштва и Друштва генетичара Србије.

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Кандидат је аутор и коаутор у више оригиналних научних радова и први аутор у радовима објављеним у часописима индексираном на SCI листи, чиме је испунила услов за одбрану докторске дисертације.

Списак радова у часописима:

1. **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): doi: 10.1515/bjmg-2017-0024 **M23**
2. **Šošić GM, Sretenović S, Radivojević D, Jović N, Mirjana Varjačić M.** Impact of gene variants FV Leiden, FII G20210A, MTHFR C677T and PAI-1 4G/5G on pregnancy loss in women from Central Serbia. Ser J Exp Clin Res. 2017; doi: 10.1515/sjocr-2017-0070 **M51**
3. **Šošić GM, Babić G, Dimitrijević A, Mitrović S, Varjačić M.** Correlation between cervical cytology and histopathological cervical biopsy findings according to the Bethesda system. Ser J Exp Clin Res. 2014; 15 (4): 205-216. **M52**

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклањају. Урађено истраживање, циљеви и примењена методологија су у потпуности у складу са пријављеном и одобреном темом докторске дисертације.

Докторска дисертација је написана на 184 страна и садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви и хипотезе истраживања, Испитивана популација, материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци, Литература и Прилог.

Рад садржи пет слика, две схеме, 29 графикона и 28 табела. Цитиране су 413 библиографске јединице из домаћих и иностраних научно-стручних публикација.

У **УВОДНОМ ДЕЛУ** су описане актуелне дефиниције, инциденција, особености, етиологија и патофизиологија присуства цитогенетичких биомаркера, актуелна дефиниција, инциденција, особеност, етиологија и патофизиологија тромбофилије, патофизиолошке промене код трудноћа компликованих тромбофилијом и превенција компликација у трудноћи применом антикоагулантне терапије.

У делу **ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** описани су главни циљеви и хипотеза истраживања. Главни циљеви истраживања су били:

1. Ниво базалног оштећења наследног материјала у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом и код здравих трудница,
2. Постојање корелација између генетичке нестабилности и анамнезе претходних трудноћа, обољења и животних навика,
3. Ефекат тромбопрофилактичке терапије на степен хромозомске нестабилности код трудница с дијагностикованом тромбофилијом,
4. Предиктивна вредност МН теста на лимфоцитима периферне крви у односу на исход трудноће.

Постављене су следеће хипотезе:

1. Постоји статистички значајна разлика у фреквенци цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) у лимфоцитима периферне крви између трудница с тромбофилијом и здравих трудница пре примене тромбопрофилактичке терапије.
2. У лимфоцитима периферне крви трудница с тромбофилијом без антикоагулантне терапије постоји статистички значајно виша фреквенца цитогенетичких биомаркера.
3. Не постоји статистички значајна разлика у фреквенци цитогенетичких биомаркера у лимфоцитима периферне крви након примене тромбопрофилактичке терапије између трудница с тромбофилијом и здравих трудница.
4. Тромбопрофилакса утиче на значајно смањење МН фреквенце у лимфоцитима периферне крви.
5. Фреквенца МН у крви мајке у порођају је у корелацији с фреквенцом МН код неонатуса.
6. Фреквенце цитогенетичких биомаркера у крви неонатуса су на ниском нивоу и значајно ниже у односу на мајку.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА су подударни са наведеним у пријави докторске тезе, презентовани су на одговарајући начин прецизно и систематично. Наведени су критеријуми за формирање група, начин узорковања, варијабле и критеријуми укључења и искључења, као и статистичка обрада података. Студија је реализована по типу клиничке опсервационе проспективне кохортне студије и спроведена је на

пацијенткињама-трудницама на Одељењу патологије трудноће, Клинике за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац, током 2015. и 2016. године. Током испитивања пацијенткиње-труднице подељене су у две групе – кохорте. Прву кохорту су чиниле 37 трудница с присутном тромбофилијом, другу кохорту 37 здравих труднице без тромбофилије

Након потписивања писане сагласности и информисања о значају студије све труднице с тромбофилијом и здраве труднице су попуниле стандардизовани упитник, који је укључивао демографска питања, питања у вези са животним навикама, питања из репродуктивне и медицинске историје. Искључујући критеријуми у студији су били постојање инфективне или гинеколошке етиологије за настанак губитака и компликације претходних трудноћа. Сви подаци о личној и породичној анамнези везани за појаву тромбоза и компликација трудноћа, као и подаци о исходу актуелне трудноће, сакупљани су из историја болести пацијенткиња.

Дијагностички и терапијски приступ тромбофилији је спроведен независно од ове студије, према важећим болничким протоколима и актуелним водичима добре клиничке праксе у вези с тематиком овог истраживања.

Ради утврђивања нивоа генетичких оштећења у лимфоцитима периферне крви код трудница с тромбофилијом и здравих трудница коришћен је цитокинезис-блок микронуклеус (ЦБМН) тест, метода коју су 1985. године су модификовали Фенич и Морли.

Статистичка обрада резултата обухватила је методе дескриптивне статистике и тестирања хипотезе независних узорака: у случају нормалне расподеле података коришћен је Студентов t- тест независних узорака, односно Ман Витнијев (*Mann Whitney*) тест у случају расподеле података различите од нормале. За поређење атрибутивних обележја посматрања између група испитаница коришћен је Пирсонов hi-квадрат (*Pirson χ^2*) тест. Одступање од Харди – Вајнбергове (*Hardy-Weinberg-HWE*) равнотеже за сваку групу генотипова је анализирано коришћењем HWE калкулатора (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>), са вредношћу за $\chi^2 < 3,84$, χ^2 -тест за један степен слободе (df-1). Корелисаност обележја посматрања са присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) испитивана је Спирмановом (*Sperman*) корелацијом ранга (ρ). Испитивање предиктивних својстава независних варијабли (испитивање утицаја)

урађено је помоћу одговарајућег регресионог модела - мултипле линеарне регресионе анализе. За поређење резултата поновљених мерења коришћен је Вилкоксонов (*Wilcoxon*) тест ранга. Резултати су приказани табеларно и графички. Ниво вероватноће установљен је на $p < 0,05$. Статистичка обрада и анализа одрађена је у статистичком пакету PASWStatistics верзија 18 (*SPSS*, Чикаго, САД).

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА су прецизно приказани помоћу 28 табела, и 35 графикана који обухватају социо-демографске карактеристике, заступљеност крвних група АВО и RhD система, биохемијске маркере анеуплоидије, факторе урођене и стечене тромбофилије код трудница са тромбофилијом, цитогенетичке биомаркере у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса, ефекат терапије нискомолекуларним хепарином на хромозомску стабилност, исходе и компликације у трудноћи и дијагностичку тачност ЦБМН теста у одређивању присуства тромбофилије и појави компликација у трудноћи (сензитивноаст, специфичност и ROC крива). Статистичка обрада и анализа одрађена је у статистичком пакету PASWStatistics верзија 18 (*SPSS*, Чикаго, САД) и резултати су приказани табеларно и графички.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, анализирани су добијени резултати и упоређени са литературним подацима из ове области. У оквиру дискусије добијени резултати су дискутовани у контексту сличних, али и различитих података о учесталости, повезаности и утицају присуства тромбофилије на настанак хромозомске нестабилности и компликација у трудноћи, ефекту примене антикоагулантне терапије на стабилност генома и корелацији између хромозомска нестабилност у крви мајке с хромозомском нестабилношћу у крви детета.

Наведени су ставови из најзначајнијих научних радова из ове области. Литература је адекватна по обиму и садржају. Цитирано је 413 библиографских јединица.

На основу предходно изнетих чињеница, комисија сматра да завршена докторска дисертација под називом „**Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом**“, кандидата Гордане Шошић по обиму и квалитету одговара пријављеној и одобреној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Труднице с дијагнозом тромбофилије пре примене LMWH имају значајно вишу базалну фреквенцу цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) у односу на контролну групу здравих трудница, што указује да су хромозомска оштећења и хромозомска нестабилност (прекиди хромозома, губици хромозома или амплификација гена) значајна карактеристика ових пацијенткиња.
2. Најзначајнији предиктор базалне фреквенце МН у целој испитиваној популацији трудница је присуство урођене и стечене тромбофилије.
3. Примена терапије LMWH током трудноће пацијенткиња с тромбофилијом има позитиван утицај на хромозомску стабилност. Код трудница с тромбофилијом запажа се значајно смањење фреквенце МН, НПМ, НП након вишемесечне LMWH терапије. У порођају нису утврђене значајне разлике у фреквенци МН између трудница на тромбопрофилактици и здравих трудница, док су ове разлике постојале на почетку трудноће, а пре примене LMWH.
4. Хромозомска нестабилност код мајки током трудноће има утицаја на хромозомску нестабилност фетуса. Ово истраживање је утврдило да постоји значајна корелисаност између фреквенци МН код мајки и фреквенци МН код неонатуса, али су фреквенце МН неонатуса статистички значајно ниже у односу на фреквенце МН код мајки.
5. Примена терапије LMWH током трудноће пацијенткиња с тромбофилијом има позитиван утицај на хромозомску стабилност код неонатуса. У нашем истраживању није утврђена разлика између фреквенци МН неонатуса мајки с тромбофилијом које су током своје трудноће биле под антикоагулантном LMWH терапијом и здравих мајки.
6. Одређивање фреквенце МН у раној гестацији може бити користан параметар у праћењу трудноћа и развоју стратегије и адекватне терапије током трудноће.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати овог студијског истраживања показују потенцијалан генотоксичан ефекат тромбофилије у трудноћи, као и бенефит терапије LMWH на хромозомску стабилност. Досадашња истраживања говоре о томе да је плацента код трудница са тромбофилијом

изложена оксидационом стресу. С обзиром да је оксидациони стрес повезан са оштећењем молекула ДНК, отвара се поље за истраживање нових терапија, пре свега коришћењем антиоксиданаса.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Већи број резултата овог истраживања је успешно објављен у истакнутом часопису међународног значаја укључујући и усмена саопштења на научним и стручним скуповима:

1. **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): doi: 10.1515/bjmg-2017-0024 **M23**

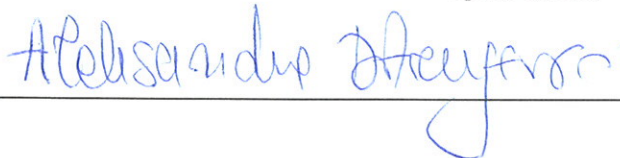
ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације **„Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом“**, кандидата Гордане Шошић на основу наведеног оцењује, да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено. Комисија сматра да докторска дисертација кандидата под менторством проф. др Мирјане Варјачић, има оригинални научни и практични значај.

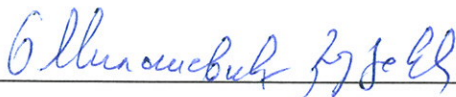
На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, да докторска дисертација под називом **„Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом“**, кандидата Гордане Шошић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

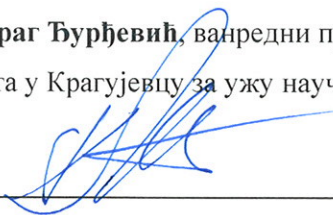
Проф. др Александра Димитријевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство,
председник;



Проф. др Оливера Милошевић-Ђурђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика,
члан;



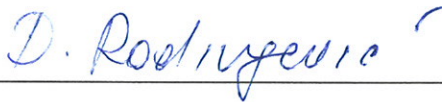
Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;



Доц. др Светлана Ђукић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;



Др сци. Данијела Радивојевић, научни сарадник Биолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија, члан.



У Крагујевцу, 20 април 2018. године