

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ**

1. ОДЛУКА НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-14219/3-8 од 24.12.2014. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Гордане Шошић, дипломираног биолога, под називом:

**„ ФРЕКВЕНЦА МИКРОНУКЛЕУСА У ЛИМФОЦИТИМА ПЕРИФЕРНЕ
КРВИ КОД ТРУДНИЦА СА ТРОМБОФИЛИЈОМ“**

На основу одлуке Наставно-научног већа формирана је Комисија у саставу:

1. **проф. др Оливера Милошевић Ђорђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник
2. **проф. др Мирјана Варјачић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан
3. **проф. др Љиљана Тукић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хематологија, члан

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

**ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Кандидат Гордана Шошић, дипломирани биолог, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета Медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. КРАТКА БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Гордана Шошић, дипломирани биолог је рођена 25.09.1972. године у Гучи. Основну школу и Гимназију је завршила у Чачку као носилац Вукове дипломе. Основне академске студија на Биолошком факултету Универзитета у Београду је завршила са просечном оценом 9,05. Академске 2011/2012. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, смер Хумана репродукција и развој. Положила је све програмом студија предвиђене испите, као и усмени докторантски испит јануара 2014. године.

Као дипломирани биолог од 1999. до 2010. год. била је запослена у Цитолошкој лабораторији, Здравственог центар Чачак, док је од новембра 2010. год. запослена у Одсеку цитогенетске дијагностике Одељење контроле фертилитета, Клинике за

гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац на пословима дипломираног биолога - здравственог сарадника.

У Републичкој школи гинеколошке цитологије у ГАК „ Народни фронт“ завршила је 2007. године основни напредни курс гинеколошке цитодијагностике, 2012. год. доедукацију из Бетхесда цитолошке класификације у ГАК „ Народни фронт“. Испит за супервизора цервикалне цитологије, у оквиру Националног програма за рано откривање рака у Србији, је положила 2013. год у ГАК „Народни фронт“. Поред основних послова у Одсеку за цитогенетску дијагностику, учествује и у Националном програму скрининга на рак грлића материце, као клинички супервизор цервикалне цитологије за шумадијски округ.

Аутор је или коаутор радова објављених у целини у домаћим и интернационалним часописима. Учествовала је на симпозијумима и конгресима из области гинеколошке цитодијагностике, из области пренаталне дијагностике и цитогенетике. Члан је Цитолошке секције Српског лекарског друштва.

2.2. НАСЛОВ, ПРЕДМЕТ И ХИПОТЕЗЕ ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ

Наслов:

„Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом ”

Предмет:

Ова студија ће се бавити утврђивањем фреквенце микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви мајке и пупчаника неонатуса код здравих трудница и трудница са тромбофилијом. Овом студијом ће се или потврдити или доказати одсуство мутагеног ефекта тромбофилије, тромбопрофилактике и компликација ове болести током трудноће.

Хипотезе:

1. Постоји статистички значајна разлика у фреквенци микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви у кохорти трудница са тромбофилијом у односу на кохорту здравих трудница.
2. Не постоји статистички значајна разлика у фреквенци микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница на тромбопрофилактичкој терапији у односу на здраве труднице.
3. У лимфоцитима периферне крви трудница са тромбофилијом постоји статистички значајно повећање фреквенце микронуклеуса.
4. У лимфоцитима крви из пупчаника новорођенчади мајки чија је трудноћа компликована тромбофилијом не постоји статистички значајно повећање фреквенце микронуклеуса.
5. Постоји статистички значајна разлика у фреквенци микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви у случајевима трудница са наслеђеном тромбофилијом у односу на труднице са стеченом тромбофилијом.
6. Постоји статистички значајна разлика у фреквенци микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код група трудница са различитим генетским узроцима тромбофилије.
7. Постоји статистички значајна разлика у фреквенци микронуклеуса лимфоцита периферне крви између групе трудница са позитивним исходом трудноће и групе трудница са негативним исходом трудноће.

8. Просечна фреквенца микронуклеуса лимфоцита периферне крви код трудница са позитивним исходом трудноће је знатно нижа у односу на труднице са негативним исходом трудноће.

9. Фреквенца микронуклеуса лимфоцита периферне крви код трудница са потврђеним хромозомским аберацијама плода је статистички значајно виша него код трудница са нормалним кариотипом плода.

2.3. ПОДОБНОСТ КАНДИДАТА

Кандидат Гордана Шошић је као први аутор објавила рад у целини у научном часопису са рецензијом који излази на једном од светских језика, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

- **Šošić G**, Babić G, Dimitrijević A, Mitrović S, Varjačić M. Correlation of cervical cytology with histopathological cervical biopsy findings according to the Bethesda system. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2014;15(4):205-216. DOI: 10.2478/SJECR-2014-0026 (M52)

Остали радови објављени у научним часописима:

1. **Šošić G**, Milošević-Đerić A, Novaković T. Amniocentezom potvrđen slučaj triploidije fetusa (69,XXX) nakon neinvazivnog skrining testa sa povećanim biohemijskim rizikom na hromozomopatije u prvom trimestru trudnoće. Medicinski časopis. 2013;47(4):203-208. (M53)
2. **Šošić G**, Varjačić M. Uticaj fizičke aktivnosti na stepen hromozomskih aberacija. TIMS. Acta. 2015;9(1):49-61. (M52)
3. Milošević Đerić A, Ristanović B, Aćimović M, Kokošar-Paunović M, Marković R, Arsić D, Bacotić B, Jakovljević V, **Šošić G**, Novaković T. Incidenca hromozomskih aberacija otkrivenih prenatalno metodom amniocenteza u opštoj bolnici Užice u periodu 2006–2014. godine. Medicinski glasnik Specijalna bolnica za bolesti štitaste žlezde i bolesti metabolizma Zlatibor. 2014;19(55):17-26. (M53)

2.4. ПРЕГЛЕД СТАЊА У ПОДРУЧЈУ ИСТРАЖИВАЊА

У трудноћи и пуерперијуму су присутне све три компоненте Вириховљеве тријаде: хиперкоагулабилност, венска стаза и повреда крвног суда. Хиперкоагулабилност и хипофибринолиза у трудноћи смањује ризик од губитка крви током имлантације, плацентације и трећег порођајног доба. Физиолошке промене у систему коагулације и фибринолизе током трудноће могу реаговати са урођеним и стеченим стањима тромбофилије, при чему расте ризик од тромбоемболијских компликација. Тромбоза плаценталних крвних судова, која може довести до инфаркта плаценте и плацентале инсуфицијенције, се сматра узроком поновљених спонтаних побачаја код жена са тромбофилијом. Такође, оштећење плацентне васкуларизације може довести до интраутериног застоја у расту, интраутерине феталне смрти, абрупције плацентне и прееклампсије. Истраживања у овој области показала су значај тромбопрофилактике, чијом се применом повећава стопа наталитета.

Микронуклеуси представљају цитоплазматске хроматинске масе са изгледом малих једара, који настају под дејством кластрогених и анеугених агенаса и садрже део хроматинског материјал који се не инкорпорира у једро једне од ћерки ћелија током ћелијске деобе. Квантификација микронуклеуса се врши микронуклеус тестом (МН тестом) којим се детектују ефекти различитих хемијских, физичких и биолошких мутагена. Присуство микронуклеуса је показатељ присуства хромозомских аберација, а фреквенца микронуклеуса директно је пропорционална степену хромозомских аберација. Микронуклеуси су присутни код људи као спонтано настали (0 до 12 МН на 1000 бинуклеарних лимфоцита периферне крви), а на пораст фреквенце микронуклеуса утиче пол, старење, телесна тежина, присуство инфламације, јонизујуће зрачење, примена одређених лекова. Фреквенца микронуклеуса је у позитивној корелацији са оптерећеном породичном анамнезом у вези са обољевањем од канцера и са патогенезом метаболичких и кардиоваскуларни болести. Животне навике који доводе до оштећења генома утичу и на повишење фреквенце микронуклеуса (пушење, алкохол, дијета са дефицијенцијом витамина и суплемената).

Тромбозне компликације не настају код свих жена са тромбофилијом током трудноће, што указује на постојање додатних, за сада још недовољно познатих чинилаца који учествују у настанку и развоју овог поремећаја. Не постоје клинички спроведене студије које би процениле мутагени потенцијал тромбофилије и компликација везаних за ово стање у трудноћи, док мутагеност нискомолекуларних хепарина није утврђена *in vitro* тестовима (Амесов тест, тест хромозомских аберација на хуманим лимфоцитима, Mouse Lymphoma тест) као и *in vivo* тесту хромозомских аберација у ћелијама коштане сржи пацова. Не постоје доступни подаци о спроведеном МН тесту након употребе нискомолекуларних хепарина на хуманим лимфоцитима.

2.5. ЗНАЧАЈ И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА СА СТАНОВИШТА АКТУЕЛНОСТИ У ОДРЕЂЕНОЈ НАУЧНОЈ ОБЛАСТИ

Значај ове студије се заснива на могућности коришћења МН теста као биомаркера мутагених промена насталих услед присутне тромбофилије у трудноћи. На основу МН теста на лимфоцитима периферне крви мајки са тромбофилијом и здравих мајки, и њихове деце, можемо сагледати утицај ове врсте болести на настанак геномске нестабилности, односно потврдити присуство или одсуство мутагеног потенцијала тромбофилије.

Очекује се да ће резултати ове студије потврдити терапијски значај и непостојање мутагеног ефекта тромбопрофилактике која се рутински користе у превенцији и терапији компликација трудноће настале услед присутне урођене или стечене тромбофилије.

2.6. ВЕЗА СА ДОСАДАШЊИМ ИСТРАЖИВАЊИМА

Највећи број студија које су испитивале степен хромозомских аберација МН тестом су утврдиле пораст фреквенцу микронуклеуса у односу на: пол, године живота, присуство инфламаторних процеса, прекомерну телесну тежину, изложеност јонизујућем зрачењу, пушење, алкохолизам и исхрану са дефицијенцијом витамина и суплемената. Студије су потврдиле да је фреквенца микронуклеуса у позитивној корелацији са оптерећеном породичном анамнезом у вези са обољевањем од канцера и са патогенезом метаболичких и кардиоваскуларни болести. У студији Fenech M. из 1998. године измерена је базичне фреквенце микронуклеуса код жена непушача од 20.

до 49. године живота. Група истраживача на челу са Furness DLF је у студији из 2010. године изнела податке према којима се пораст фреквенце микронуклеуса у раној трудноћи може повезати са преекламсијом и/или интраутериним застојем у расту фетуса у каснијој трудноћи. Нема података о спроведеним студијама које су се бавиле проценом утицаја тромбофилије на степен оштећења генома мереног микронуклеус тестом.

Мутагеност нискомолекуларних хепарина није утврђена *in vitro* тестовима (Амесов тест, тест хромозомских аберација на хуманим лимфоцитима, Mouse Lymphoma тест) као и *in vivo* тесту хромозомских аберација у ћелијама коштане сржи пацова. Не постоје доступни литературни подаци о спроведеном МН тесту након употребе нискомолекуларних хепарина на хуманим лимфоцитима.

Истраживањем које је предмет ове докторске тезе били би испитивани мутагени ефекти тромбофилије, тромбопрофилактике и компликација ове болести током трудноће.

2.7. МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

А. ВРСТА СТУДИЈЕ

Истраживање ће бити реализовано по типу клиничке опсервационе проспективне кохортне студије и спровешће се на трудницама, болнички леченим у периоду од 2015. - 2016. год. на Одељењу патологије трудноће, Клинике за гинекологију и акушерство Клиничког центра Крагујевац. Дијагностички и терапијски приступ тромбофилији биће спроведен независно од ове студије, према важећим болничким протоколима и актуелним водичима добре клиничке праксе везаним за тематику овог истраживања. Подаци ће се прикупљати проспективно, али и анализирати ретроспективно, из историја болести пацијената.

Б. ИСПИТАНИЦИ

Студија ће се спровести на пацијенткињама-трудницама са територија општина које према плану организације здравствених установа Републике Србије остварују право на здравствену услугу на терцијарном нивоу здравствене заштите на Одељењу патологије трудноће, Клинике за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац, током 2015. год . и 2016. год.

У студију ће бити укључена група од најмање 56 пацијенткиња старости од 20. до 45. године код којих ће се ултразвучно дијагностификовати трудноћа.

Испитивањем би били обухваћене пацијенткиње-труднице подељени у две групе-кохорте. Прву кохорту ће чинити најмање 19 трудница са присутном урођеном или стеченом тромбофилијом. Другу кохорту ће чинити најмање 37 трудница без тромбофилије које испуњавају критеријуме предвиђене протоколом испитивања. При томе ће се водити рачуна да труднице у кохорти без тромбофилије одговарају кохорти трудница са тромбофилијом према социо-епидемиолошким карактеристикама (узраст, телесна тежина, пушачки статус и придружене болести).

Критеријуми за укључивање пацијента у студију:

- Потписана изјава о добровољном учествовању у испитивању
- Хематолошким и генетским испитивањима потврђено присуство или одсуство тромбофилије

Критеријуми за неукључивање пацијента у студију:

- Труднице са присутним анатомским малформацијама плода
- Труднице са присутним инфективним поремећајима
- Новонастала болест или стање које могу утицати на вредности испитиваних параметара

В. УЗОРКОВАЊЕ

Пацијенткиње које учествују у овој студији су стратификовани случајни узорак, добијене тако што је испитивана популација трудница лечених на Клиници за гинекологију и акушерство Клиничког центра Крагујевац подељена према критеријуму за груписање (позитиван и негативан налаз тромбофилије), а затим се из сваке групе извлачи једноставни случајни узорак уз помоћ рачунарског програма EXCEL уз функцију Data sort и то тако да на сваку пацијенткињу из кохорте са присутном тромбофилијом долазе по две пацијенткиње из кохорте здравих трудница. Испитанице из две кохорте би биле усклађене према према социо-епидемиолошким карактеристикама (узраст, телесна тежина, пушачки статус, придружене болести).

Крв ће се трудницама узимати венепункцијом на почетку трудноће до 9. недеље и у порођају, као и крв из пупчаника након порођаја и клемовања пупчаника. Пацијенткињама ће се узимати по 20 ml венске крви и 20 ml крви из пупчаника, уобичајним поступком, након потписивања информисаног пристанка.

Лабораторијско испитивање ће се вршити на коагулационе параметре. Такође ће се одређивати рутинске анализе које подразумевају хематолошки статус, протеински, ензимски, јонски и липидни профил и остале биохемијске анализе од значаја, као и фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима СВМН методом.

Учесталост микронуклеуса у бинуклеарним ћелијама периферне крви биће анализирана применом „Citokinezis blok mikronukleus testa“ (СВМН)(модификована метода Fenecha и Morley opisana 1985. године). Пуна хепаринизирана крв 20-25 капи (0,5 ml) биће додата у стерилне бочица са 5 ml комплетног медијума за култивацију лимфоцита (РВМах Karyotyping,). Сваки узорак крви биће засејан у дупликату и инкубиран 72h на 37°C. Након 44h од почетка култивације културама ће бити додат Citohalazin В у финалној концентрацији од 4µg/ml. Инкубација ћелијских култура ће затим бити настављена још додатних 28h. По завршетку инкубације и иницијалне центрифуге (12 мин. на 1800 обртаја), ћелијска супензија ће се испирати у физиолошком раствору и поново центрифугирати. Ћелијске супензије ће се затим третирати хладним (4°C) хипотоним, 0.56% раствором КС1 и центрифугирати, два пута, а затим се фиксирати три пута свежим Карнојевим фиксативом (сирћетна киселина и метанол у односу 1:3). Након последњег центрифугирања, супернатан ће се пажљиво одлити и ресуспендовати у малој количини фиксатива и добијени материјал ће се развлачити на сува и хладна предметна стакла, а затим ће се препарати сушити под лампом. Осушене плочице биће бојене 2% раствором Giemse у трајању од 12 минута. Фреквенца микронуклеуса биће одређивана анализом 1000 бинуклеарних ћелија (ВН) по особи светлосним микроскопом при увећању од 1000X.

Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ

Независне варијабле:

- **присуство фактор V Leiden генске мутације** (квалитативна варијабла) - дели се у три групе: без мутације, хетерозиготни носиоци мутације, хомозиготни носиоци мутације. Одређује се PCR методом.
- **одређивање APC резистенције** – (квалитативна варијабла) - дели се у две групе: присуство и одсуство (модификовани aPTT тест)
- **присуство протромбин генске мутације 20210A** (квалитативна варијабла) - дели се у три групе: без мутације, хетерозиготни носиоци мутације, хомозиготни носиоци мутације. Одређује се PCR методом.
- **присуство дефицијенције протеина C** (квалитативна варијабла) - дели се у две групе: тип I, тип II. Одређује се PC функционалним тестом.
- **присуство дефицијенције протеина S** (квалитативна варијабла) - дели се у три групе: тип I, тип II, тип III. Одређује се PS функционалним тестом
- **дефицијенција антитромбина** (квалитативна варијабла)- дели се у две групе: тип I, тип II. Одређује се AT функционалним тестом
- **повећање фактора VIII** (одређивања FVIII)
- **ниво инхибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1)** (квалитативна варијабла) - дели се у три групе: одсуство мутације, хетерозиготи за 4G/4G мутацију, хомозиготи за 4G/4G мутацију
- **одређивање нивоа хомоцистеина** (квалитативна варијабла)- дели се у три групе: лака хиперхомоцистеинија (16-24 $\mu\text{mol/l}$), средња (25-100 $\mu\text{mol/l}$) и тешка (>100 $\mu\text{mol/l}$)
- **присуство антифосфолипидног синдрома** (квалитативна варијабла)- две групе- присуство и одсуство. Одређује се на основу клиничких критеријума: обстетричких и лабораторијских (присуство aPL, LA, aCL, a β 2GP-I, AnxA5)
- **присуство Diabetes mellitus тип 1** (квалитативна варијабла) – две групе - присуство и одсуство. Лабораторијски тестови: одређивања гликемије, орални глукоза толерант тест и преглед урина- одређивање гликозурује и кетонских тела у урину.
- **присуство интраутериног застоја у расту** - (квалитативна варијабла) две групе: нормалан раст и IUGR - телесна тежина испод дест перцентила за дату гестацијску старост. Врши се сонографско испитивања и одређивање анатомије и морфологије плода (CRL, BPD, FL, AC)
- **хипертензија** (квалитативна варијабла)- дели се у четири групе: хипертензија изазвана трудноћом, хронична хипертензија која је постојала пре трудноће, хронична хипертензија са суперпонираном хипертензијом изазваном трудноћом, HELLP синдром) - артеријски крвни притисак мери се трудницама у лежећем положају, у висини срца, три пута дневно и изражава се као средњи артеријски притисак.
- **функција штитне жлезде** (квалитативна варијабла) - дели се на три групе: хипотироза (повишен ниво fT4, супримирано лучење TSH, повишена концентрација TS At), нормална функција и хипертиреоза (FT4 повећан, снижен TSH).

- **кариотип плода** (квалитативна варијабла) - дели се у две групе: нормалан и кариотип са присутним хромозомских аберацијама. Ради се рана амниоцентеза само у строго индикованим случајевима, на основу датог генетског савета.
- **број спонтаних побачаја** (квалитативна варијабла) - Подаци се добијају на основу индивидуалног интервјуа и деле се на 3 категорије: прва - без спонтаних побачаја, друга - од 1 до 2 спонтана побачаја, трећа - 3 и више спонтаних побачаја
- **присуство абрупције плаценте у претходној трудноћи** (квалитативна варијабла) - дели се у две групе: присутна и одсутна
- **паритет** (квалитативна варијабла) - Подаци се добијају из личне анамнезе и деле се на три категорије: без порођаја, један порођаја и два и више порођаја.
- **порођај** - (квалитативна варијабла) - три групе- partus praematurus (претермински порођај 20-37 НГ), partus maturus (термински порођај 38-42НГ), partus serotinus (пренесена трудноћа>42НГ)
- **новорођенче** (квалитативна варијабла) - четири групе- imaturus (рођен пре 28 НГ), neonatus praetemporarius (рођено између 28-36 НГ), neonatus temporarius neonatus (рођено између 37 и 42 НГ), posttemporarius (рођено после 42 НГ)
- **телесна маса на рођењу новорођенчета** (квалитативна варијабла)
- **трудноћа** (квалитативна варијабла) - две групе- једноплодна и вишеплодна - одређује се сонографски
- **начин завршетка трудноће** (квалитативна варијабла) - две групе: природан порођај и царски рез
- **оптерећена породична анамнеза** (квалитативна варијабла) - две групе: без обољења вена у породици, са пристним обољењем вена у породици, присутним тромбоемболијским болестима (инфаркт, шлог)
- **траума мајке** (квалитативна варијабла) - две групе: трудноћа без трауме и са траумом (хирушка интервенција, фетоскопија, инвазивна дијагностика)
- **ранији намерни побачаји** (квалитативна варијабла) - две групе: са и без ранијих намерних побачаја- добијају се на основу медицинске документације
- **примењена терапија у току трудноће** (квалитативна варијабла) - (без терапије, нискомолекуларни хепарин, утрөгестан, инсулин, токолитици, антибиотици, еутирокс, антихипертензиви)

Збуњујуће варијабле:

- **животна доб** (квалитативна варијабла) - Подаци се добијају на основу индивидуалног интервјуа и деле се на 3 групе: прва од 20. до 29. год., друга група од 30. до 39.год и трећа група од 40. до 49. године живота.
- **пушење** (дихотома квалитативна варијабла)- Подаци се добијају на основу индивидуалног интервјуа и деле се на групе: прва- пушачи, друга -непушачи
- **гојазност** (квалитативна варијабла)- Подаци се добијају на основу израчунавања индекс телесне масе (ВМІ) и деле се на шест група: неухрањеност (<18,5), идеална маса (18,5-24,9), прекомерна маса(25-29,9), блага гојазност(30-34,9), тешка гојазност(35-39,9), екстремна гојазност (>40)

Зависна варијабла:

- **Фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви** (квантитативна варијабла)
– Анализа се више хиљада лимфобласта по светлосним микроскопом, а резултати се изражавају на 1000 бинуклеарних ћелија ћелија.

Д. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

На основу вероватноће грешке I типа ($\alpha = 0,05$) за двосмерно тестирање хипотеза, снаге студије од 0,8, вероватноћа грешке II типа ($\beta = 0,2$), однос броја испитаника по групама 1:2 у корист кохорте здравих трудница (на сваку пацијентињу из кохорте са тромбофилијом долазе по две пацијенткиње из кохорте здравих трудница) израчуната је величина узорка из података студије Fenech M. из 1998. год. и студије Furness DLF et al. из 2010.год .

У студије Fenech-а средња вредност (mean) \pm SD базичне фреквенце микронуклеуса код жена непушача у односу на године живота валидних за нашу студију је износила $16,43 \pm 7,1$. У студији Furness et al. средња вредност (mean) \pm SD микронуклеуса у налазу групе трудноћа са ниским и високим ризиком износила је $20,625 \pm 1,575$. На основу података из ових студија израчуната је **величина ефекта** као разлика између средњих вредности микронуклеуса у групи здравих жена непушача старости везаних за нашу студију и у налазу групе жена са ризичним трудноћама. **Стандардизована величина ефекта** је израчуната као величина ефекта подељена са стандардном девијацијом уз помоћ програма **G*Power 3.1.3** и износи **0,841**. На основу наведених параметара (уз помоћ програма **G*Power 3.1.3**) је израчунато да је у кохорти здравих трудница потребно најмање **37** пацијенткиња, а у кохорти трудница са тромбофилијом потребно је најмање **19** пацијенткиња, односно укупна величина узорка би тебало да буде најмање **56** трудница.

Ђ. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Од добијених података ће се формирати рачунарска база и статистичка обрада података ће се вршити уз помоћ програма SPSSInc/PASWStatistics18. Статистичка обрада резултата ће обухватити методе дескриптивне статистике и тестирања хипотезе независних узорака. За анализу квалитативних варијабли методама дескриптивне статистике ће се користи фреквенце њихових вредности, а за квантитативне варијабле средњу вредност, стандардно одступање, минимум, максимум и медијана. У приказу резултата користиће се мере централне тенденције и мере варијабилитета у складу са типом расподеле. Резултати ће бити приказани и табеларно и графички. Врста статистичких тестова ће бити условљена карактером прикупљених података (категоријалне или нумеричке варијабле) и типом њихове расподеле. Ниво вероватноће ће бити установљен на $p < 0,05$. Нормалност расподеле квантитативне варијабле проценићемо Колмогоров-Смирнов тестом. Уколико квантитативна варијабла прати нормалну расподелу разлике између две групе у средњим вредностима варијабле (фреквенца МН) утврдиће се параметријским Студентовим Т-тест за независне узорке, а у колико не прати нормалну расподелу применићемо непараметријски Mann-Whitney U test.

Значајност разлике између две групе у учесталости категоријских варијабли биће утврђене Пирсоновим Хи квадрат тестом независности и Фишеровим тестом.

Утицај независних варијабли на исход ће се процењивати помоћу релативног ризика (RR) као односа кумулативне инциденце изложених датом фактору и кумулативне инциденце неизложених датом фактору. Помоћу бинарне логистичке регресије утврдиће се значај појединих фактора ризика, када они заједнички и самостално делују. Подаци ће се сматрати статистички значајним уколико је вероватноћа нулте хипотезе мања од 5% ($p < 0,05$).

2.8. ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу МН теста на лимфоцитима периферне крви мајки са тромбофилијом, здравих мајки и њихове деце, ће се потврдити присуство или одсуство мутагеног потенцијала тромбофилије. Очекује се да ће резултати ове студије потврдити терапијски значај и непостојање мутагеног ефекта тромбопрофилактике, која се рутински користе у превенцији и терапији компликација трудноће настале услед присутне урођене или стечене тромбофилије.

Резултати овог истраживања ће допринети бољем разумевању поремећаја коагулације, њихове повезаности са компликацијама у трудноћи и њиховог утицаја на генетски материјал.

2.9. ОКВИРНИ САДРЖАЈ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Физиолошке промене у систему коагулације и фибринолизе током трудноће могу реаговати са урођеним и стеченим стањима тромбофилије, при чему расте ризик од тромбоемболијских компликација, што може довести до поновљених спонтаних побачаја, интраутериног застоја у расту, интраутерине феталне смрти, абрупције плацентне и прееклампсије. Тромбозне компликације не настају код свих жена са тромбофилијом током трудноће, што указује на постојање додатних, за сада још недовољно познатих чинилаца који учествују у настанку и развоју овог поремећаја. Не постоје клинички спроведене студије које би процениле мутагени потенцијал тромбофилије и компликација везаних за ово стање у трудноћи.

Истраживање ће бити реализовано по типу клиничке опсервационе проспективне кохортне студије и спровешће се на *кохорти* трудница са тромбофилијом и *кохорти* трудница без тромбофилије. Свим учесницима у студији ће се венепункцијом узимати периферна крв и крв из пупчаника новорођенчади након порођаја која ће се рутински лабораторијски испитивати и из које ће се одређивати фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима СВМН методом (МН тест).

На основу МН теста у лимфоцитима периферне крви мајке и пупчаника неонатуса можемо сагледати утицај тромбофилије на настанак геномске нестабилности, односно потврдити присуство или одсуство мутагеног потенцијала код ове врсте болести. Очекује се да ће резултати ове студије потврдити непостојање мутагеног ефекта нискомолекуларних хепарина који се користе у превенцији и терапији тромбоза у трудноћи. Резултати ове студије би допринели бољој процени и сагледавању утицаја тромбофилије на ток трудноће и на њен исход.

2.10. ИМЕ МЕНТОРА

Комисија предлаже за ментора ове докторске дисертације **Проф. др Мирјану Варјачић**, редовног професора Факултета медицински наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство.

2.11. НАУЧНА ОБЛАСТ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Медицина. Ужа научна област: Генетика

2.12. НАУЧНА ОБЛАСТ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

- 1. проф. др Оливера Милошевић Ђорђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник
- 2. проф. др Мирјана Варјачић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан
- 3. проф. др Љиљана Тукић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хематологија, члан

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова Гордана Шошић, дипломирани биолог, испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и Законом о високом образовању за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен, а научна методологија јасна и прецизна.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза научно и практично допринети бољем разумевању поремећаја коагулације, њихове повезаности са компликацијама у трудноћи и њиховог утицаја на генетски материјал.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Гордане Шошић, дипломираног биолога, под називом „Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Оливера Милошевић Ђорђевић,
редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Генетика, председник

Проф. др Мирјана Варјачић,
редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан

Проф. др Љиљана Тукић,
редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду
за ужу научну област Хематологија, члан

Крагујевац,

20.01.2015. године