

ПРИМЉЕНО: 18.07.17			
Бр. уписа	Бр. уписа	Година	Број
05	88818	-	8

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-03-689/38, од 05.07.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Марина Јовановић, под називом:

„Повезаност метаболичког синдрома и имунских параметара са клиничким и патохистолошким карактеристикама болесника са улцерозним колитисом“

Чланови комисије су:

1. **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. **проф. др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
3. **проф. др Срђан Ђурановић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат де Марина Јовановић рођена је 22.07.1977. године у Крагујевцу, где је завршила основну школу и средњу медицинску школу. Интегрисане академске студије медицине на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је школске 1996/1997. године, а завршила их на истом факултету 08.06.2006. године, са просечном оценом 9,09 (девет и 9/100), чиме је стекла стручно звање доктор медицине. По завршетку основних студија обавила је лекарски стаж, у КЦ Крагујевац и ДЗ Крагујевац у трајању од 6 месеци, и положила стручни испит за доктора медицине. Од 04. јануара 2007. ради у Клиничком центру Крагујевац. Започела је специјалистички стаж из интерне медицине 01. маја 2009., на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, а 16. септембра 2013. положила специјалистички испит одличном оценом и стекла звање специјалиста интерне медицине.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, уписала је школске 2013/2014. године. Усмени докторски испит је положила у мају 2017. године. Од 2014. године запослена је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где до данас обавља послове сарадника у настави за ужу научну област Интерна медицина. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Повезаност метаболичког синдрома и имунских параметара са клиничким и патохистолошким карактеристикама болесника са улцерозним колитисом“

Предмет: Испитивање повезаности развојних фаза метаболичког синдрома са тежином болести, те локалним и системским имунским одговором код пацијената са улцерозним колитисом

Хипотеза: Поједине фазе метаболичког синдрома различито утичу на клиничко-патолошке карактеристике улцерозног колитиса.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M52 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Gajovic N, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- β as a marker of ulcerative colitis and disease severity. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019. M52

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Улцерозни колитис (енгл. Ulcerative colitis- UC) је хронична болест коју карактерише запаљење слузнице дигестивног тракта, искључиво дебелог црева. Инциденца и преваленца болести расту из године у годину са највећом годишњом инциденцом од 23,3 на 100.000 становника и преваленцом од 505 на 100.000 становника, у Европи. У коморбидне болести пацијената са UC спадају многе болести као што су реуматоидни артритис, мултипла склероза, лупус, псоријаза, хипотиреоидизам и метаболички синдром. Међу овим болестима, метаболички синдром је најчешћи, а повезаност са UC има епидемиолошке, патогенетске, клиничке и терапијске импликације.

Метаболички синдром представља скуп метаболичких поремећаја са великим атерогеним и дијабетогеним ризиком. Карактеришу га:

- Инсулинска резистенција са компензаторном хиперинсулинемијом
- Накупљање масног ткива у абдомену – висцерални тип гојазности
- Хиперлипидемија
- Артеријска хипертензија

Метаболички синдром повезан је са великим бројем компликација. Епидемиолошке студије указују да УС и метаболички синдром имају заједничке етиолошке механизме и да генетска предиспозиција и фактори средине доприносе патогенези обе болести. Метаболички синдром је чест поремећај значајно повезан са УС. Многе студије су показале значајан коморбидитет ових поремећаја и генетску повезаност. Метаболички синдром и УС деле неуролошке, хепатобилијарне, остеоартикуларне, васкуларне и пост-оперативне компликације. Хроничан ток једне од болести може убрзати настанак друге. Иако специфичне студије које би се бавиле самим механизмом овог аспекта још увек нису спроведене, овај феномен заслужује пажњу.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Метаболички синдром је у експанзији. Процењује се да ће се број оболелих особа удвостручити у периоду од 2000. до 2030. године. Значај студије се огледа у томе што би требало да по први пут испита да ли и на који метаболички синдром утиче на имунопатогенезу и клиничко-патолошке карактеристике улцерозног колитиса.

Циљ студије

Основни циљ овог истраживања је да се испита повезаност развојних фаза метаболичког синдрома са тежином болести, те локалним и системским имунским одговором код пацијената са улцерозним колитисом.

У складу са основним циљем истраживања дефинисани су конкретни задаци:

1. Анализом степена резистенције на инсулин и степена толеранције гликозе одредити фазе метаболичког синдрома код болесника са улцерозном колитисом;

2. Анализирати повезаност појединих развојних фаза метаболичког синдрома са клиничким и патохистолошким скором улцерозног колитиса;
3. Анализирати повезаност појединих развојних фаза метаболичког синдрома са концентрацијом цитокина у периферној крви (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33, sST2, TGF- β) болесника са улцерозном колитисом;
4. Анализирати повезаност појединих развојних фаза метаболичког синдрома са процентуалном заступљеношћу и функционалним фенотипом леукоцитног инфилтрата *lamina propria*-е црева оболелих од улцерозног колитиса.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Ранијим истраживањима је показано да различит степен метаболичког синдрома утиче на активност компоненти урођене и стечене имуности: смањује број NK ћелија, експресију активационих рецептора, цитотоксичност и секрецију проинфламацијских цитокина. Метаболички синдром смањује активност мијелопероксидазе и дегранулацију неутрофила, умањује активацију, способност адхезије, миграције и трансмиграције моноцита/макрофага као и број Т лимфоцита, уједно мењајући и њихов фенотип.

Метаболички синдром индукује неензимску гликозилацију макромолекула (пре свега протеина) и подстиче продукцију кисеоничних слободних радикала, те тиме појачава оксидативни стрес (енгл. reactive oxygen species- ROS). Екстрацелуларни ROS дифундују кроз јонске канале у цитоплазму и мењају редокс потенцијал ћелије, што следствено модулише функције транскрипционих фактора (NF κ B, AP-1), протеин киназа (АКТ, JNK, p38) и MAP киназног пута. Ћелије имунског система су осетљиве на екстрацелуларне ROS због високог садржаја незасићених масних киселина. Следствена липидна пероксидација може да индукује имуносупресију.

У доступној литератури нема података о томе каква је патогенеза и клинички скор UC код пацијената са метаболичким синдромом. У овом истраживању испитиваће се корелација развојних фаза метаболичког синдрома са клиничким скором и тежином болести пацијената са UC. Анализираће се клиничке и патохистолошке карактеристике болести као и карактеристике локалног и системског имунског одговора.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Планирана је неинтервентна, клиничка, опсервациона студија пресека током које ће се упоређивати тестирани параметри у експерименталној и контролној групи испитаника. Истраживање ће бити спроведено у Центру за гастроентерологију и хепатологију Интерне клинике Клиничког центра Крагујевац и лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Популација која се истражује

У студији ће бити укључени болесници код којих је постављена клиничка сумња на улцерозни колитис, те који испуњавају све укључујуће и немају ниједан искључујући критеријум. Истраживачи ће се у потпуности придржавати принципа Добре клиничке праксе током истраживања, а истраживање је одобрио надлежни етички комитет.

Узорковање

У студију ће бити укључени испитаници по принципу згодног узорка, а који су са сумњом на улцерозни колитис упућени у Центар за гастроентерологију и хепатологију Интерне клинике КЦ Крагујевац.

Укључујући критеријуми су:

- потписан добровољни пристанак за учешће у студији
- а) *експериментална група*: постављена дијагноза улцерозног колитиса на основу ендоскопског прегледа колона и патохистолошког налаза биопсија узетих током ендоскопског прегледа колона, а у складу са критеријумима Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis из 2106. године (20-23).
- б) *контролна група*: нормалан или неспецифичан налаз на основу ендоскопског прегледа колона и патохистолошког налаза биопсија узетих током ендоскопског прегледа колона.

Искључујући критеријуми су:

1. испитаници млађи од 18 година, труднице, дојиље и особе са лимитираном правном одговорношћу и смањеним когнитивним способностима
2. испитаници са хроничним болестима и/или терапијом која може утицати на испитиване параметре: раније дијагностиковани дијабетес мелитус, болести панкреаса, урођене болести метаболизма, болести бубрега праћене смањеном реналном функцијом (клиренс креатинина испод 60 $\mu\text{mol/L}$), болести јетре, аутоимунске болести на терапији имуносупресивном, имуномодулаторном и кортикостероидном терапијом, малигне болести (сем базоцелуларног карцинома), коронарна болест у акутној фази, нерегулисана артеријска хипертензија, болести ендокриног система (хипер или хипокортицизам, феохромоцитом, акромегалија, неуроендокрини тумори).
3. инфекција и инфективни синдроми две недеље пре и у тренутку истраживања
4. примена лекова и/или медицинских процедура и поступака који могу утицати на испитиване параметре две недеље пре и у тренутку истраживања
5. испитаници са субклиничком или клиничком тироидном дисфункцијом

Испитивање ће бити обављено током три посете пацијента истраживачком центру, а у складу са следећим протоколом:

Посета 1. Временски оквир дан I. Током ове посете пацијентима који имају клиничку сумњу на улцерозни колитис биће обављене следеће процедуре:

- У складу са принципима Добре клиничке праксе, пре било каквих других процедура, биће обављен разговор о природи истраживања и биће објашењен образац Добровољног пристанка. Пацијенту и евентуално његовим пратиоцима биће достављен образац Добровољног пристанка, биће им омогућено довољно времена да га прочитају и у случају пристанка пацијент (или његов законски заступник) потписаће и датирати два примерка обрасца Добровољног пристанка, а исто ће учинити и главни истраживач.

- Затим ће бити обављен разговор са пацијентом и биће, у складу са стандардизованим упитником, прикупљени анамнестички подаци (лични административни подаци, медицинска лична и породична анамнеза).
- Биће обављен стандардни физикални преглед са одређивањем антропометријских параметера (телесна висина, телесна маса, израчунавање БМИ- енгл. Body Mass Index) и мерењем виталних параметара: артеријски крвни притисак у супин положају и пулс.
- Ехо горњег абдомена (присутна или не стеатоза јетре)
- Пацијенту ће бити урађен стандардни 12-канални електрокардиограм- ЕКГ
- Још једном ће бити размотрени укључујући и искључујући критеријуми и уколико пацијент има све укључујуће и нема ни један искључујући критеријум биће даље опсервиран у истраживању и биће му заказана Посета 2.
- Пацијенту ће бити објашњен начин живота (стандардна исхрана и умерена физичка активност) 3 дана пре заказане посете 2, те неопходност доласка наштину на ову посету.

Посета 2. Временски оквир 3.-7. дан истраживања. Током ове посете, пацијенти долазе наштину и до 9 сати, а биће спроведене следеће процедуре:

- Пласирање хепаринизоване пластичне каниле у кубиталну вену и узорковање узорака крви:
 - 3,5 ml пуне крви са антикоагулансом (левендер епрувета) за комплетну крву слику и одређивање HbA1c;
 - 3,5 ml пуне крви са антикоагулансом (левендер епрувета) за анализу леукоцита периферне крви;
 - 10 ml пуне крви за издвајање серума (ред епрувета) за одређивање биохемијских анализа: гликемија 0 мин, укупни, HDL, LDL холестерол, триглицериди, ацидум урицум, CRP, AST, ALT, GGT, уреја, креатинин, калијум, натријум, калцијум, фосфат, витамин D, укупни протеини, албумини, глобулини, алкална фосфатаза, LDH;

- 5 ml пуне крви за издвајање серума (ред епрувета) за одређивање fT4, TSH, АнтиТРО Аб, АнтиТГ Аб, Инсулинемија 0 мин;
 - 10 ml пуне крви за издвајање серума (ред епрувета) за одређивање концентрације цитокина у серуму.
- Извођење оралног глукоза толеранс теста (енгл. Oral Glucose Tolerance Test- OGTT) са 75g глукозе и одређивањем гликемије (5 ml крви ред епрувета) и инсулинемије (5 ml крви ред епрувета) у 30. мин, 60. мин, 90. мин, 120. мин и 180. мин теста. Током теста пацијент седи, нема физичку активност, не узима храну и не конзумира дуван.
 - Преглед столице на амебе, ламбилије, паразите, копрокултуру, *Clostridium difficile* (искључивање инфективних колитиса и псеудомембранозног колитиса).
 - Пацијенту ће бити заказана Посета 3 и биће објашњен начин припреме за еноскопски преглед колона.

Посета 3. Временски оквир 10.-14.дан. Пацијент долази адекватно припремљен за ендоскопски преглед колона у заказаном термину. Током ове посете изводе се следеће процедуре:

- Извођење ендоскопског прегледа колона и опис резултата у складу са стандардном медицинском праксом
- Узимање узорак ткива слузнице колона (најмање 5) током прегледа ради патохистолошке и имунохистохемијске анализе
- Узимање узорак столице ради одређивања вредности калпротектина

Варијабиле које се мере у студији

Независне варијабле: улцерозни колитис, фазе метаболичког синдрома

Зависне варијабле: тежина болести, клиничко-патохистолошки налаз, концентрације цитокина у серуму, функционални фенотип инфилтришућих ћелија имунског система.

Збуњујуће варијабле: старост и клиничке карактеристике испитаника.

Одређивање комплетне крвне слике, HbA1c, биохемијских анализа, инсулинемија и параметара тироидног статуса

Одређивање комплетне крвне слике, HbA1c и биохемијских анализа биће урађено у Централној биохемијској лабораторији КЦ Крагујевац стандардним методама, апаратом *Beckman Coulter AU 400 Unicel DXC 800 Synchron Clinical System*.

- Гликемија ће бити одређивана из пуне венске крви кинетичким *UV* тестом (метода са хексокиназом) за квантитативно одређивање глукозе у хуманом серуму, плазми, урину, хемодијализату, и ликвору, изражавана у *mmol/L*, (референтна вредност 4.4-6.1 *mmol/L*).
- *HbA1c* биће одређиван уз помоћ имуноинхибиционог комерцијалног реагенса, латекс аглутнационо инхибиционим поступком (мери се апсорбанција изазвана аглутинацијом на 700 *nm*), изражаван је у процентима (%), (референтна вредност ≤ 42 *mmol/mol*, $\leq 6,0\%$).
- ККС биће одређивана на апарату *Beckman Coulter AcT diff Analyzer*: одређиван је број леукоцита, еритроцита, тромбоцита (мерањем промене у електричном отпору када партикула-хелија у проводној течности пролази кроз мали отвор, изражавани у броју $\times 10^9/l$, $\times 10^{12}/l$), хемоглобин се одређује колориметријски, изражаван је у *g/L*, (референтна вредност 120-140).
- Протеини су одређивани фотометријским колор тестом за квантитативно одређивање укупних протеина у хуманом серуму и плазми, изражавани у *g/L*, (референтна вредност 64-83).
- Албумини су одређивани фотометријским колор тестом за квантитативно одређивање албумина у хуманом серуму и плазми, изражавани у *g/L*, (референтна вредност 35-52).
- Уреа биће одређивана кинетичким *UV* тестом за квантитативно одређивање урее у хуманом серуму, плазми и урину, изражавана је у *mmol/L*, (референтна вредност 3.0-8.0).
- Креатинин биће одређиван кинетичким колор тестом (*Jaffe* метода) за квантитативно одређивање креатинина у хуманом серуму, плазми и урину, изражаван је у *μmol/L*, (референтна вредност 49-106).

- Мокраћна киселина биће одређивана ензимским колор тестом за квантитативно одређивање мокраћне киселине у хуманом серуму, плазми и урину, изражавана је у $\mu\text{mol/L}$, (референтна вредност 154-428).
- *CRP* (C-реактивни протеин) биће одређиван имунотурбидиметријским тестом за квантитативно одређивање *CRP* у хуманом серуму и плазми, изражаван је у mg/L , (референтна вредност 0-5).
- *K* (калијум) и *Na* (натријум) су одређивани јон селективном електрода индиректним методом, изражаван је у mmol/L , (референтна вредност 3.5-5.3).
- *Ca* (калцијум) биће одређиван фотометријским колор тестом за квантитативно одређивање укупног калцијума у хуманом серуму, плазми и урину, изражаван је у mmol/L , (референтна вредност 2.02-2.65).
- *AST* (аспартат аминотрансфераза) биће одређивана кинетичким *UV* тестом за квантитативно одређивање АСТ у хуманом серуму и плазми, изражавана је у U/L , (референтна вредност 0-40).
- *ALT* (аланин аминотрансфераза) биће одређивана кинетичким *UV* тестом за квантитативно одређивање АСТ у хуманом серуму и плазми, изражавана је у U/L , (референтна вредност 0-40).
- Укупни холестерол (*tHol*), биће одређиван ензимским колор тестом за квантитативно одређивање холестерола у хуманом серуму и плазми, изражаван је у mmol/L , (референтна вредност 3.1-5.2).
- *HDL*-холестерол (*HDL*) биће одређиван ензимским колор тестом за квантитативно одређивање *HDL*-холестерола у хуманом серуму и плазми, изражаван је у mmol/L , (референтна вредност 1.1-2.5).
- Триглицериди (*TAG*) су одређивани ензимским колор тестом за квантитативно одређивање триглицерида у хуманом серуму и плазми, изражаван је у mmol/L , (референтна вредност 0.1-1.7).
- *LDL*-холестерол (*LDL*) је израчунаван по *Friedewald*-овој формули (уз услов да је ниво *TAG* $<4,5 \text{ mmol/L}$): $\text{LDL-холестерол} = t\text{Hol} - \text{HDL} - \text{TAG}/2,2$), изражаван је у mmol/L , (референтна вредност 0.1-3.5).

Одређивање инсулинемија и параметара тироидног статуса биће изведено у Центру за нуклеарну медицину, КЦ Крагујевац стандардним нуклеарно-медицинским методама. Инсулинемија биће одређивана *RIA* методом уз помоћ *radioimmunoassay INSULIN-CT* кита за квантитативно одређивање инсулина у хуманом серуму и плазми на гама цинтилационом бројачу, изражавана у *mU/mL*, (референтна вредност 4.3-19.9). Клинички тироидна дисфункција је сматрана уколико је абнормалан *TSH* уз абнормалан *fT4*, субклиничка тироидна дисфункција је сматрана уколико је абнормалан *TSH* а нормалан *fT4*.

- *fT3* биће одређиван *RIA* методом уз помоћ кита за радиоимунолошко одређивање концентрације *fT3* у хуманом серуму на гама сцинтилационом бројачу, изражаван у *pg/mL*, (референтна вредност 2-4.25).
- *fT4* биће одређиван *RIA* методом уз помоћ кита за радиоимунолошко одређивање концентрације *fT4* у хуманом серуму на гама сцинтилационом бројачу, изражаван у *pg/mL*, (референтна вредност 7-18).
- *TPOAb* су одређивана *RIA* методом уз помоћ *radioligand assay TPO-AB-CT* кита за мерење аутоантитела на тироидну пероксидазу (*TPO*) у хуманом серуму на гама сцинтилационом бројачу, концентрација од 70 *U/ml* је сматрана позитивном, (референтна вредност 0-70).
- *TSH* биће одређиван уз помоћ *IRMA TSH* дијагностичког комплекта за квантитативно одређивање *TSH* у хуманом серуму, имунорадиометријском методом на чврстој фази, у којој се користе два клона моноклонских антитела специфична за различите епитопе на молекулу хуманог *TSH*, изражаван је у *mIU/L*, (референтна вредност 0.3-5.5).
- Тиреоглобулинска *Ab* су одређивана уз помоћ *THYROGLOBULINE IRMA* кита, имунорадиометријског теста за одређивање тиреоглобулина у хуманом серуму, изражаван у *IU/ml*, (референтна вредност 0-30).

Одређивање концентрације калпротектина у фецесу

Издвојени фецес испитаника који учествују у истраживању ће се замрзнути на -20°C до извођења анализе. Концентрација калпротектина ће се мерити *ELISA* методом према утврђеном протоколу произвођача (*CALPROTECTIN ELISA TEST*).

Одређивање фаза у развоју метаболичког синдрома

Анализом прикупљених података биће постављена дијагноза метаболичког синдрома (критеријуми IDF, 2005), а на основу кретања гликемије и инсулинемије током OGTT-а, према критеријумима Америчке дијабетеске асоцијације (ADA) и Европске асоцијације за проучавање дијабетеса (EASD) биће одређена фаза у развоју метаболичког синдрома:

- Фаза 1: нормална толеранција гликозе и нормоинсулинемија
- Фаза 2: нормална толеранција гликозе и хиперинсулинемија
- Фаза 3: патолошка толеранција гликозе и хиперинсулинемија
- Фаза 4: патолошка толеранција гликозе и нормо или хипоинсулинемија

Под патолошком толеранцијом гликозе подразумеваће се повишена гликемија наштину, интолеранција гликозе, нарушена хомеостаза гликозе и дијабетес мелитус. Хиперинсулинемијом ће се сматрати вредности инсулина у 0., 120. и 180. мин. изнад референтних вредности. Биће израчунавани HOMA RI и HOMA Бета индекси.

Одређивање клиничког и патохистолошког скорa

Сваки пацијент ће засебно бити скориран, стандардном колоноскопијом ће бити потврђена болест, а хистолошком верификацијом оштећење колона, док ће степен тежине болести бити одређен Мајо ендоскопском подскалом. Све контроле ће имати нормалну слузницу колона, без макроскопских и микроскопских доказа о инфламацији или малигним променама. Хистолошки преглед ће обавити патолог, који неће имати увид у резултате ендоскопског скорирања инфламације.

Изолација ћелија из ламине проприје ткива колона

Фенотип ћелија које инфилтрирају колон ће се анализирати проточном цитометријом. Имунске ћелије ће се изоловати из колона пацијената са улцерозним колитисом, као и код контрола. Биопсије ће се опрати три пута у HBSS-у. Након испирања, инкубираће се у HBSS-у са 1 mM EDTA током 10 минута на 37°C, уз благо мешање да би се издвојиле епителне ћелије. Након инкубирања ћелије ће се поново испрати у HBSS-у и инкубирати током 20-30 минута у 2 ml RPMI са 1 mg/ml колагеназом типа I (=336 U/ml), 0.1 mg/ml DNase-ом и 1 mg/ml хијалоуронидазом без FCS на 37°C. Након инкубирања ћелије ће се двапут испрати PBS-ом и финално ресуспендовати са Ficoll градијентом. Тако

ресуспендоване ћелије ће се центрифугирати током 20 минута на 690 g без кочења. Интерфаза ће се полако уклонити и испрати PBS-ом. Једноћелијска суспензија из биопсије ће се испирати двапут са буфером за проточну цитометрију (0.05% NaN₃, 0.1% BSA, и 0.4% тринатријум цитрата у PBS-у). Ћелијска суспензија ће се инкубирати са антихуманим антителима (CD3, CD4, CD56, IFN- γ , IL-4, TNF- α , CD15, CD66b, CD33, CD44, CD11c, HLA-DR, CD9, CD125) током 30 минута на собној температури у мраку. Након финалног прања, ћелије ће се ресуспендовати у 300 μ L буфера за проточну цитометрију и анализирати. Анализираће се процентуална заступљеност Т лимфоцита, активираних макрофага, дендритских ћелија, неутрофила као и NK ћелија у колону.

Одређивање концентрације цитокина у серуму

Издвојени серум испитаника који учествују у истраживању ће се замрзнути на -20°C до извођења анализе. Концентрација цитокина укључених у патогенезу улцерозног колитиса (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33, sST2, TGF- β) ће се мерити ELISA методом према утврђеном протоколу произвођача.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима серумске концентрације про-инфламацијског цитокина TNF- α , публикованих у студији сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући α као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student's t* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. С обзиром да је за вредности серумске концентрације TNF- α нађена најмања разлика између група пацијената са различитим хистолошким стадијумом билести, ова вредност је коришћена за израчунавање величине узорка. Разлика у вредностима серумске концентрације TNF- α међу групама износила је 35.07 pg/ml, а стандардна девијација 20.14 и утврђени број узорака према групама износи 15 за сваку од група, али користимо по 20 узорака у свакој групи.

Статистичка обрада података

Подаци ће се анализирати коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). За поређење

средњих вредности променљиве двеју популација користиће се параметарски *Student's t* тест, уколико вредности буду имале правилну расподелу, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* теста. Испитивање зависности две описне променљиве испитиваће се помоћу χ^2 и *Fisher*-овог теста. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву помоћу мултиваријанте бинарне логистичке регресије. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да добијени резултати покажу да метаболички синдром мења имунски одговор утицајем на компоненте урођене и стечене имуности и на тај начин модификује и ток и скор улцерозног колитиса.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Ова студија ће представљати неинтервентну, клиничку, опсервациону студију пресека која треба да детерминише повезаност метаболичког синдрома са клиничким и патохистолошким скором, као и параметарима локалног и системског имунског одговора код пацијената са улцерозним колитисом. Циљ истраживања је испитати повезаност развојних фаза метаболичког синдрома са клиничко-патолошким карактеристикама и патогенезом улцерозног колитиса.

Ова студија би требало да по први пут испита да ли и на који начин метаболички синдром утиче на патогенезу и клиничко-патолошке карактеристике улцерозног колитиса. Очекује се да добијени резултати покажу да метаболички синдром мења имунски одговор утицајем на компоненте урођене имуности.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже доц. др Наташа Здравковић, доцент Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. **N Zdravkovic**, M Pavlovic , G Radosavljevic, M Jovanovic, A Arsenijevic, N Zdravkovic, V Maric, S Loncarevic, Z Srzentic, I Jovanovic. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. JBUON 2017; 22(5): 1-8
2. Vasovic M, Gajovic N, Brajkovic D, Jovanovic M, **Zdravkovic N**, Kanjevac T. The relationship between the immune system and oral manifestations of inflammatory bowel disease: a review. Cent Eur J Immunol 2016; 41(3):302-310
3. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, **Zdravkovic N**, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. Sci Rep 2016; 6:23348. doi: 10.1038/srep23348.
4. **N.D. Zdravkovic**, I.P. Jovanovic, G.D. Radosavljevic, A.N. Arsenijevic, N.D. Zdravkovic, S.Lj. Mitrovic, N.N. Arsenijevic. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. Int J Med Sci 2014; 11(9): 936-947
5. Simovic Markovic B, Jovanovic I, Volarevic V, Zdravkovic N, Jovanovic M, **Zdravkovic N**, Maric V, Arsenijevic N, Lukic ML. Potential inversely immunomodulatory roles of Galectin-1 and Galectin-3 in ulcerative colitis. Wulfenia 2016; 23(9):188-205.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка и експериментална интерна медицина

5. Научна област чланова комисије

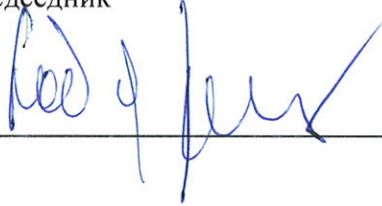
1. проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник
2. проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
3. проф. др Срђан Ђурановић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

Закључак и предлог комисије

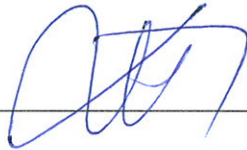
1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Марине Јовановић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита повезаност развојних фаза метаболичког синдрома са тежином болести, те локалним и системским имунским одговором код пацијената са улцерозним колитисом..
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Марине Јовановић под називом „Повезаност метаболичког синдрома и имунских параметара са клиничким и патохистолошким карактеристикама болесника са улцерозним колитисом“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. **проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник



2. **проф. др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан



3. **проф. др Срђан Ђурановић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан



У Крагујевцу, 07.07.2017.