

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО: 31. 07. 2019			
Оријед	Број	Примљено	Вредност
05	9069/1-1		

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 10.07.2019. године, одлуком бр. IV-03-584/27 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса” кандидата Александре Вранић, у следећем саставу:

1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. Проф. др Небојша Анђелковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;
3. Проф. др Милан Петронијевић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата Александре Вранић 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 Александре Вранић под називом „**Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса**“, урађена под менторством доц. др Мирјане Веселиновић, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина и проф. др Александре Антовић, ванредног професора Каролинска Института (Стокхолм, Шведска) за ужу научну област Реуматологија, представља оригиналну научну студију која се бави испитивањем концентрације микропартикула, праћењем параметара хемостазе и редокс статуса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса.

Општа карактеристика активираних ћелија је њихова способност одвајања фрагмената са њихове плазма мембране. Ови фрагменти представљају хетерогену популацију малих, мембраном-обложених везикула, пречника 0,1 и 1,0  $\mu\text{m}$  које се називају микропартикуле (МП). Првобитно су сматране остацима ћелија али су данас препознате као мултифункционалне структуре које имају улогу у интрацелуларној комуникацији, транспорту компоненти молекула и индукцији ћелијских сигнала што указује на присуство микропартикула на великом броју биолошки активних молекула. Микропартикуле се ослобађају са мембране ћелија током процеса активације, механичког стреса или апоптозе. Будући да МП експримирају различите маркере на својој површини у зависности од њиховог порекла, могу се користити за проучавање ћелијских процеса и патогенезе болести. Микропартикуле могу ослободити све ћелије при чему оне које се најчешће налазе у крви потичу од тромбоцита, леукоцита и ендотелних ћелија а могу потицати и од гранулоцита, моноцита, лимфоцита. Поседују јаку биолошку активност и учествују у патогенези многих аутоимунских болест. Повишен број циркулишућих микропартикула, посебно ендотелних микропартикула, је заједничка карактеристика кардиоваскуларних болести. Микропартикуле које потичу од тромбоцита су најрапрострањенији тип честица у крви и резултат су пре свега активације тромбоцита иако је порекло од мегакариоцита такође могуће. Оне су одавно идентификовани као транспортни систем за многе

прокоагулантне молекуле, као што је ткивни фактор. Транспорт и испорука ових молекула може довести до тромбозе а има улогу и у кардиоваскуларним болестима укључујући кардиоваскуларне поремећаје који убрзано настају код аутоимунских болести. Поред микропартикула које потичу од тромбоцита, у крви се налази велики број микропартикула које потичу од леукоцита и који могу довести до запаљења и потенцијално до аутоимуности. Ниво циркулишућих микропартикула који потичу од тромбоцита се мења током различитих болести као што су поремећаји циркулације, реуматоидни артритис, системски еритемски лупус, карцином, кардиоваскуларне болести и инфекције, указујући на њихово могуће учешће у прогресији болести.

Реуматоидни артритис (РА) је хронична, инфламаторна, аутоимунска болест која узрокује бол у зглобовима, деформитете и системске манифестације, са убрзаним развојем атеросклерозе и повећаним морталитетом. У овој болести, генетске, епигенетске модификације и фактори спољашње средине као што је пушење интерагују и кулминирају доводећи до продукције специфичних аутоантитела (*antibodies to citrullinated proteins or ACPAs*), запаљења зглобова и деструкције костију. Овај процес је снажно посредован цитокинима као што су фактор некрозе тумора  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), интерлеукин – 1 (*IL-1*) и интерлеукин – 6 (*IL-6*). С обзиром на повезаност цитокина и продукције МП од стране имунских ћелија и важној улози тромбоцита у имунском одговору, многи истраживачи су фокусирани на МП као важне медијаторе који локално доводе до синовитиса и системски до васкуларних сметњи. У зависности од стадијума болести, МП могу послужити као биомаркери за груписање пацијената и евалуацију информација о активацији хемостазе. Микропартикуле које потичу од тромбоцита су присутне у синовијалној течности пацијената са реуматоидним артритисом као и у другим формама инфламаторног артритиса али не и у синовијалној течности пацијената који имају остеоартритис. Микропартикуле које потичу од тромбоцита представљају проинфламаторни фактор који преко *IL-1* индукује одговор цитокина.

Хронична системска инфламација у РА мења хемостатске механизме у корист тромбозе, активацијом коагулационог система, инхибицијом фибринолизе и смањењем физиолошких антикоагулационих путева. Инфламација и коагулација су повезани процеси при чему се интеракција између ова два система одвија на неколико нивоа, као што су активација тромбоцита, стварање фибрина као и као и на нивоу физиолошких

антикоагулационих путава тј. инфламација мења тромботички одговор повећавајући прокоагуланте и смањујући антикоагулансе. Тако, присуство протромботичких стања делују синергистички са традиционалним факторима ризика и доприносе повећаном кардиоваскуларном ризику. Ово је од посебног значаја, знајући са се РА чешће јавља код жена и то код жена у репродуктивној доби. Међутим, повезаност са традиционалним факторима ризика за настанак кардиоваскуларних болести не објашњава у потпуности прерану атеросклерозу код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса.

У последњих неколико година, примећено је да су оксидациони стрес и смањена антиоксидативна заштита главне карактеристике пацијената оболелих од реуматоидног артритиса. Као одговор на запаљење у РА, прекомерна продукција реактивних кисеоничних врста се обично генерише из ендемог извора као што је митохондријални ланац транспорта електрона, процесом оксидативне фосфорилације. Кисеоничне врсте у РА имају различито порекло и могу настати активирањем макрофага у синовијалној мембрани, хондроцитима, али и путем активираних неутрофила у синовијалној шупљини. Компоненте хрскавице и екстрацелуларног матрикса оштећене су или директно или индиректно супероксидним анион радикалом, заједно са другим кисеоничним и азотним врстама, смањујући синтезу компоненти матрикса као што су колаген и протеоглици. Осим тога,  $H_2O_2$ -зависна инхибиција синтезе протеогликана доприноси оштећењу хрскавице у РА услед интеракције са механизмима обнављања протеолитичких и оксидационих оштећења.

Резултати овог истраживања показали су да је укупна концентрација микропартикула, концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита и П-селектина, повишена код пацијената са РА у односу на здраве испитанике. Глобалне методе хемостазе указују да је коагулација снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са РА, и менопаузом код здравих жена. Електронском микроскопијом показано је да пацијенти са реуматоидним артритисом као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибриноског угрушка са мањим порима, који је мање осетљив на фибринолизу. Про-оксидациони и антиоксидациони параметри праћени у студији указују на постојање оксидационог стреса и смањење активности антиоксидационог система заштите код пацијената. Сви неспецифични параметри инфламације били су повишени код пацијената са РА.

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

Претрагом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „*Medline*“ и „*KoBSON*“, уз коришћење одговарајућих кључних речи: „*Rheumatoid arthritis*“, „*hemostasis*“, „*microparticles*“, „*global hemostatic methods*“ и „*oxidative stress*“, нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Александре Вранић под називом „**Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса**“ представља резултат оригиналног научног рада.

## **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

### **А. Лични подаци**

Александра Вранић рођена је 29.07.1990. године у Крагујевцу. Основну школу „Мирко Јовановић“ и средњу Медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“, смер – фармацевтски техничар, завршила је у Крагујевцу, као носилац дипломе „Вук Караџић“. Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2009/2010. године и дипломирала у септембру 2014. године, са просечном оценом 9,59 (девет и 59/100). Стручни испит за магистра фармације положила је у јуну 2016. године пред комисијом Министарства здравља Републике Србије.

Докторске академске студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином, уписала је школске 2014/2015. године. Усмени докторски испит положила је у септембру 2016. године, са оценом 10 (десет). Запослена је на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу од 2016. године. Тренутно је у звању асистента за ужу научну област Клиничка фармација, на студијском програму интегрисаних академских студија фармације.

Од 2011. године активно се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Тренутно је учесник пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја бр. 175043 под називом „Ефекти хомоцистеина и хомоцистеину-сродних супстанци на кардиоваскуларни систем: улога гасних трансмитера НО, Х2С и ЦО“. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

Кандидат је аутор више оригиналних научних радова објављених у часописима индексираним на SCI листи: 4 публикације категорије M23 (у 2 први аутор) и 6 публикација категорије M51 (у 1 први аутор).

Кандидат је први аутор у два рада објављена у часописима индексираном на SCI листи. Резултати рада наведени под редним бројем 1 и 3 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану докторске дисертације.

У истраживању под називом „Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis“ у коме је кандидат први аутор представљен је део резултата саме докторске дисертације. Ова студија је имала за циљ да процени хемостатске поремећаје код пацијената са реуматоидним артритисом праћеним у односу на менопаузални статус и активност болести. Главни закључак студије је да код жена у пременопаузи са установљеним реуматоидним артритисом долази до активација коагулације. Такође, постменопаузалне контроле као и пацијенткиње у пре- и постменопаузи, имале су гушћу структуру фибрина и мање поре. У таквим угрушцима, фибринска влакна су чврсто упакована и мање склона фибринолизи. Резултати овог истраживања су публиковани у часопису категорије **M23** (Clin Rheumatol, 2019. doi: 10.1007/s10067-019-04629-8).

У истраживању под називом „Redox Status in Women with Rheumatoid Arthritis “ у коме је кандидат први аутор, представљен је део резултата саме докторске дисертације. Циљ истраживања је био одређивање оксидационог стреса код пацијената са реуматоидним артритисом. Главни закључак студије је да је код пацијента са реуматоидним артритисом показано значајно повећање концентрације реактивних врста кисеоника и пероксидације липида, као и смањење активности антиоксидационог система заштите који доводи до настанка оксидационог стреса који даље може допринети оштећењу ткива и хрскавице, а тиме и хроничном току болести. Резултати овог

истраживања су публиковани у часопису категорије **M51** (Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0047).

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

1. **Vranic A**, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019. doi: 10.1007/s10067-019-04629-8 **M23**
2. Smigic J, Sabo T, **Vranic A**, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, Krivokapic M, Bolevich S, Jakovljevic VLj. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. Mol Cell Biochem. 2019; 458(1-2): 89-98 **M23**
3. **Vranic A**, Antovic A, Draginic N, Andjic M, Ravic M, Jakovljevic V, Veselinovic M. Redox Status in Women with Rheumatoid Arthritis. Ser J Exp Clin Res 2017; doi: 10.2478/SJECR-2018-0047 **M51**

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

Сprovedено истраживање у потпуности је усклађено са пријављеном темом докторске дисертације. Циљеви истраживања и примењена методологија идентични су са одобреним у пријави тезе. Наслов докторске дисертације и спроведеног истраживања се поклапају. Докторска дисертација Александре Вранић садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Написана је на 184 страна и има 51 табелу, 44 графикана и 9 слика. Поглавље Литература садржи 220 цитираних библиографских јединица из иностраних и домаћих стручних публикација.

У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је на свеобухватан, јасан и прецизан начин и цитирајући релевантну литературу изложио актуелна сазнања о микропартикулама, хемостази и редокс статусу код пацијената са реуматоидним артритисом. Такође, предочен је значај испитивања концентрације микропартикула, глобалних метода хемостазе и параметара оксидационог стреса код пацијената са реуматоидним артритисом.

Циљеви истраживања јасно су изложени и дефинисани у складу са одобреним приликом пријаве тезе. Кандидат је у свом раду испитао концентрацију микропартикула, параметре хемостазе и редокс статус код пацијената са реуматоидним артритисом.

Материјал и методологија рада су детаљно и прецизно формулисани и подударају се са одобреним приликом пријаве тезе. Истраживање је дизајнирано као опсервациона студија пресека.

Концентрација микропартикула испитивана је проточном цитометријом при чему су праћене микропартикуле које потичу од тромбоцита, леукоцита, моноцита, ендотелне микропартикуле, микропартикуле које експримирају П-селектин и Е-селектин и ткивни фактор. Хемостаза и појава прокоагулабилног стања праћена је глобалним методама, ендогеним тромбин потенцијалом и укупним хемостатским потенцијалом. Електронском микроскопијом испитан је утицај реуматоидног артритиса на фибринску мрежу и морфологију влакана фибриноског угрушка. Редокс статус је одређиван спектрофотометријски. Комплетне биохемијске, хематолошке и хемостатске анализе су урађене у Централној лабораторији Клиничког центра Крагујевац. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора КЦ Крагујевац.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани табелама (укупно 51), графиконима (укупно 44) и сликама (укупно 9). Приказ резултата је прегледан и разумљив.

Укупна концентрација микропартикула, концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита и П-селектина, биле су повишене код пацијената са РА у односу на здраве испитанике. Микропартикуле које потичу од тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за реуматоидни артритиса. Глобалне методе хемостазе указују да је коагулација снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са РА, и менопаузом код здравих жена. Електронском микроскопијом показано је да пацијенти са реуматоидним артритисом као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибриноског угрушка са мањим порима, који је мање осетљив на фибринолизу. Про-оксидациони и антиоксидациони параметри праћени у студији указују на постојање оксидационог стреса и смањење активности антиоксидационог система заштите код пацијената. Сви неспецифични параметри инфламације били су повишени код пацијената са РА. Резултати истраживања указују да параметри глобалних хемостатских метода могу бити корисни у



дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања код пацијената са реуматоидним артритисом као и да код ових пацијената постоји потреба за суплементацијом антиоксидансима.

У поглављу „Дискусија“ детаљно су анализирани и објашњени резултати добијеног истраживања и упоређивани са доступним литературним подацима из исте области.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата Александре Вранић под називом „**Циркулишуће микронартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса**“, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## **2.5. Научни резултати докторске дисертације**

1. Анализирајући резултате глобалних метода хемостазе, ово истраживање указује да је коагулација снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са реуматоидним артритисом, и менопаузом код здравих жена.
2. Параметри глобалних хемостатских метода могу бити корисни у дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања код пацијената са РА. Нивои укупног коагулационог потенцијала (*OCP*) и укупног хемостатског потенцијала (*OHP*) су у корелацији са активношћу болести код пацијената са РА, мереним параметром *DAS28*.
3. Свеобухватна процена хемостазе указује на перзистентну активацију коагулације код пременопаузалних жена са установљеним РА. Пацијенти су добро описани и за присуство традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика, лекова коришћених у току узорковања крви и присуства умерене до високе активности болести, што је омогућило процену у реалном животном окружењу.
4. Посматрајући структуру фибриноског угрушка, код пацијената са РА у пременопаузи и у менопаузи, као и код здравих контрола у менопаузи, постоји неповољно измењена фибринска мрежа и морфологија влакана фибриноског угрушка. Пацијенти са РА као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибриноског угрушка са мањим порама, која је мање осетљива на фибринолизу.

5. Укупни фибринолитички потенцијал (*OFFP*) је у негативној корелацији са  $\Delta CLT$  код пацијената са РА, показујући да је поремећена фибринолиза повезана са повећаном *TAFI* активношћу.
6. Резултати глобалних метода хемостазе иду у прилог хипотези студије, да су и инфламаторна болест и менопауза активатори хемостазе. Код особа са РА затвара се "gap", односно потпуно смањује разлика између параметара хемостазе пре и након менопаузе у односу на разлике ових параметара код здравих жене пре и након менопаузе, које остају значајно различите.
7. Укупна концентрација микропартикула била је значајно већа код жена оболелих од РА као и концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита. Микропартикуле које потичу од тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за РА.
8. Редокс статус код пацијенткиња са РА је промењен и огледа се у повећању вредности прооксидационих параметара и смањењу активности параметара антиоксидационе заштите. Примећено повећање реактивних кисеоничних врста и индекса липидне пероксидације као и смањење активности антиоксидационог система заштите, доводи до настанка оксидационог стреса који може допринети оштећењу ткива и хрскавице код пацијената са РА и до хроничног тока болести. Ови резултати могу да укажу на потребу и бенефит примене антиоксиданаса у виду суплемената код жена са реуматоидним артритисом.
9. Неспецифични параметри инфламације, седиментација, Ц-реактивни протеин и фибриноген су значајно повишени код пацијената са РА. Значајна корелације је примећена у вредностима, Ц-реактивног протеина и седиментације нивоима укупног коагулационог потенцијала (*OCP*) и укупног хемостатског потенцијала (*ONP*) што додатно говори у прилог могуће употребе глобалних метода хемостазе за праћење терапије и дијагностиковања хиперкоагулационог стања код пацијента са реуматоидном артритисом.

## 2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригиналан и битан допринос у сагледавању утицаја реуматоидног артритиса на концентрацију микропартикула, параметре хемостазе и редокс статус имајући у виду инциденцу и преваленцу реуматоидног артритиса као и велики удео пацијената оболелих од реуматоидног артритиса у односу на укупни број оболелих од свих аутоимуних болести.

## 2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати ове студије публиковани су као оригинално истраживање у часопису индексираном на SCI листи као и у часопису од националног значаја.

1. **Vranic A**, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019. doi: 10.1007/s10067-019-04629-8 **M23**
2. **Vranic A**, Antovic A, Dragicin N, Andjic M, Ravic M, Jakovljevic V, Veselinovic M. Redox Status in Women with Rheumatoid Arthritis. Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0047 **M51**

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Александре Вранић под називом „Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса” сматра да је истраживање у оквиру тезе базирано на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Александре Вранић, под менторством доц. др Мирјане Веселиновић и проф. др Александре Антовић, представља оригинални научни допринос у испитивању утицаја реуматоидног артритиса на концентрацију микропартикула, параметре хемостазе и оксидациони стрес.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса“, кандидата Александре Вранић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

**Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник

*Владимир Јаковљевић*

**Проф. др Небојша Анђелковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан

*Небојша Анђелковић*  
PROF. DR. MED. SCI.  
Nebojsa Andjelkovic  
spec. med. intern. 1200523

**Проф. др Милан Петронијевић**, редовни професор Медицинског факултета  
Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област

*Милан Петронијевић*  
Интерна медицина, члан

У Крагујевцу, 15.07.2019. године