

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

Број:	28. 10. 2022	Датум:	
Српска:		Државна:	
05	12208		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-651/44 од 13.09.2022. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата **др Весне Росић** и предложеног ментора за израду докторске дисертације под називом:

„Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са узрапредовалим формама атеросклерозе”

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Зоран Милосављевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник;
2. **Проф. др Маја Саздановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. **Проф. др Милица Лабудовић Боровић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Весна Росић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Атеросклероза представља комплексну болест чија патогенеза може да се дефинише као ремоделовање артеријског зида у условима повећаног притиска, удружено са хиперхолестеролемијом и последичним запаљењем.

У иницијалној фази ремоделовања, новосинтетисани ткивни фактори утичу на васкуларне глатке мишићне ћелије, промовишу њихову фенотипску модулацију из контрактилног у синтетски фенотип, њихову миграцију у субендотел интима, са последичном синтезом екстрацелуларног матрикса, преодминантно протеогликанског састава, услед чега долази до хипертрофије као следеће фазе васкуларног ремоделовања.

Уколико је хипертензија удружена са хиперхолестеролемијом, упоредо са повећаном синтезом протеогликана, долази до инсудације LDL-а у субендотел. Липидне капљице се високим афинитетом везују за протеогликане у субендотелу, што је предуслов за њихову оксидацију. Оксидисани LDL (ox-LDL) активира ендотелне ћелије које почињу да експримирају адхезионе протеине из породице имуноглобулина и селектина, као и специфичне цитокине-хемокине карактеристичне за иницијалну фазу атеросклерозе или тип I лезије.

Адхерирани моноцити и T лимфоцити мигрирају у субендотел. Моноцити се модификују у макрофаге, путем *scavenger* рецептора преузимају ox-LDL и трансформишу се у „пенасте” ћелије (енгл. *foam cells*) које формирају масне пруге (траке), односно тип II лезије.

У стадијуму преатерома – интермедијарне лезије (тип III лезије), липидне акумулације превазилазе капацитете пенастих ћелија, па се у субендотелном везивном ткиву липиди накупљају и екстрацелуларно у виду малих, изолованих акумулација.

Тип IV атеросклеротичне лезије или атером карактерише акумулација велике количине липида у субендотелу интима у форми екстензивног липидног језгра, са мало фиброзног везива и без дефеката на површини плака.

Атеросклеротична лезија која садржи проминентно новостворено фиброзно везивно ткиво класификује се као тип V лезије. Уколико настало фиброзно везиво прекрива липидно језгро, лезија се класификује као фиброатером или тип Va лезије. Тип V лезије код кога липидно језгро садржи калцификате, класификује се као тип Vb лезије. Уколико у лезији није присутно липидно језгро, већ је интима састављена из дебелих колагених влакана, лезија се класификује као тип Vc.

Као компликована лезија (тип VI лезије), класификује се лезија на стадијуму атерома (тип IV) или фиброатерома (тип V) која је компликована руптуром (подтип VIa), хеморагијом (подтип VIb) или тромбозом (подтип VIc). Уколико су истовремено присутне све три врсте компликација, лезија се класификује као подтип VIa,b,c.

Адекватно познавање патогенезе, али и верификација до сада недовољно анализираних потенцијалних фактора који узрокују настанак и развој ове патоморфолошке лезије могу бити од посебног значаја у повезивању морфолошког супстрата са клиничким манифестацијама овог обољења.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Резултати предложене студије допринели би бољем разумевању улоге и функције глатких мишићних ћелија, идентификацији њиховог фенотипа (синтетски или контрактилни) и одређивању њиховог потенцијала за фенотипску модификацију у пенасте ћелије у раним и узнапредовалим формама атеросклерозе. Осим тога, резултати имунохистохемијских анализа ове студије потврдили би повезаност клиничке слике коронарне болести са цитолошким карактеристикама, односно, стадијумима атеросклерозе.

2.3. Наслов, циљ(еви) и хипотеза(е) докторске дисертације

Наслов: “Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са узнапредовалим формама атеросклерозе”

Циљеви:

- Утврђивање фенотипских карактеристика глатких мишићних ћелија у коронарним артеријама са узнапредовалим стадијумима атеросклерозе.
- Утврђивање клиничких и лабораторијских карактеристика које су чешће удружене са узнапредовалим стадијумима атеросклерозе него са раним лезијама.

Хипотезе:

- У узнапредовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне су глатке мишићне ћелије које испољавају виментин и S-100

протеин у већој мери него глатке мишићне ћелије у раним стадијумима атеросклерозе.

- У узнапредовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне су глатке мишићне ћелије које испољавају дезмин у мањој мери него глатке мишићне ћелије у раним формама атеросклерозе.
- Узнапредовали стадијуми атеросклерозе имају различите клиничке и лабораторијске манифестације у односу на исте карактеристике у раним формама атеросклерозе.
- Одређене комбинације фенотипа глатких мишићних ћелија, клиничких и лабораторијских манифестација су чешће су у узнапредовалим формама атеросклерозе.
- Неуроектодермално порекло глатких мишићних ћелија у зиду коронарних артерија представља предилекциони фактор у развоју коронарне атеросклерозе.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Планирана је ретроспективна клиничко-хистопатолошка студија типа случај-контрола. Групу случајева чине узорци коронарних артерија умрлих, са узнапредовалим формама атеросклерозе. Групу контрола чине узорци коронарних артерија умрлих, са раним лезијама атеросклерозе.

2.4.2. Популација која се истражује

Студија ће обухватити узорке коронарних артерија кадавера оба пола добијене током аутопсија рађених у Служби за патолошко-анатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2007-2010. године. Студија ће бити спроведена уз одобрење Етичког одбора Клиничког центра Крагујевац под бројем 01-4988 од 04.05.2012. године. За сваки анализирани случај користиће се једна - две контроле истих година.

2.4.3. Узорковање

Студија ће обухватити попречне пресеке десних коронарних артерија са тешким атеросклеротичним променама урађених у Служби за патолошку анатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2007-2010. године. За контроле ће се користити попречни пресеци десних коронарних артерија у раним стадијумима лезије. Уколико буде постојао већи број адекватних контрола за један случај, контроле ће бити

изабране методом случајног узорка (биће нумерисане, а затим ће се случајним поступком изабрати две контроле за дати случај).

У студији ће бити анализирани цитохистолошке карактеристике стадијума атеросклерозе према класификацији *American Heart Association Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis*, а имунохистохемијске карактеристике коришћењем четири имунохистохемијска маркера – α -глаткомишићни актин, S-100 протеин, дезмин и виментин, као и већи број варијабла добијених из историја болести.

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Пратиће се следећа зависна варијабла (исход):

1. Тип лезије атеросклерозе:

- за контроле користиће се ране фазе атеросклерозе (иницијална лезија, стадијум масне траке и стадијум преатерома)
- за случајеве користиће се узнапредовале лезије атеросклерозе (стадијум атерома, стадијум фиброатерома и компликоване лезије).

За сваки узорак у студији биће анализирани следеће независне варијабле (узроци):

1. Имунохистохемијски профил глатких мишићних ћелија у различитим стадијумима атеросклерозе одредиће експресија четири маркера:

- α -глаткомишићни актин (за глатке мишићне ћелије)
- S-100 протеин (за глатке мишићне ћелије неуроектодермалног порекла)
- дезмин (за проучавање оријентације и дистрибуције формираних, диференцираних васкуларних глатких мишићних ћелија)
- виментин (за испитивање дистрибуције глатких мишићних ћелија и праћење очуваности ендотелног омотача).

Степен експресије имунохистохемијских маркера одређиваће се семиквантитативно, методом двоструке контроле, под великим увеличањем, на десет видних поља дуж артеријске циркумференције, узимајући у обзир само популацију глатких мишићних ћелија.

Процент имунореактивних ћелија у популацији глатких мишићних ћелија биће означавањем на следећи начин:

0 – изостанак имунореактивности
+ до 35% имунореактивних ћелија
++ до 70% имунореактивних ћелија
+++ до 100% имунореактивних ћелија

Збуњујуће варијабле

Анализираће се следеће „збуњујуће“ варијабле добијене из историја болести пацијента: Hb, E_r, Le, Ht, Tr, CRP, SE, LDH, D-dimer, Na, Mg, Ca, Fe, K, креатинин, уреа, старост пацијента, наслеђе (породична анамнеза), телесна маса, претходни инфаркт миокарда, ангина пекторис, коронарографија, подаци о ЕКГ-у. Факторском анализом би се овај број редуковао на оне које имају највећи значај.

Независне и зависне варијабле одређиваће се микроскопском евалуацијом имунохистохемијских и ХЕ обојених препарата. У рутинској обради препарата, добијени узорци биће фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24h, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци коронарних артерија биће дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласту. Попречни серијски пресеци, дебљине 5 μm , биће сечени микротомом *Leica SM 2000R*. Након депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци ће бити бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и монтирани на плочице са *Canada* балзамом.

За потребе имунохистохемијске анализе ткиво ће бити фиксирано у 4 %-тном неутралном пуферованом формалдехиду у току 24 часа и калупљено у парапласту. Резови дебљине 5 μm , биће монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost* и сушени на температури од 56°C у току 1 сата.

Након депарафинизације и рехидратије ткивних пресека вршиће се демаскирање антигена у микроталасној пећници у 0,1 М цитратном пуферу, рН 6,0 на 800W, у трајању 21 минут, а затим блокирање ендogene пероксидазе, 3 %-тним воденим раствором H_2O_2 у трајању од 15 минута.

Након блокирања ендogene пероксидазе, следи наношење примарног антитела и инкубација у трајању од 1h на собној температури у влажној комори.

Примениће се 4 примарна антитела: α -глаткомишићни актин, S-100 протеин, виментин и дезмин према стандардном протоколу.

Након инкубације ткивних пресека са примарним антителим следи инкубација, прво са биотинизираним везујућим антителим, а затим са стрептавидином обележеним пероксидазом. Поступак се завршава инкубацијом пресека у мешавини супстрат-хромогена (H_2O_2 и 3-амино-9-етил карбазол у N,N -диметилформамиду, АЕС + Substrate-Chromogen kit, Cat. No K 3469, ДАКО-Denmark), 5 минута на собној температури.

Као општи испирач и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења биће коришћен 0,1 М фосфатни пуфер рН 7,4. Телијска једра биће бојена *Mayer*-овим хематоксилином.

2.4.5. Снага студије и величина узорка

Величина група је одређена на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 80%, вероватноће грешке првог типа (α) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе и разлике у вредностима процентуалне заступљености виментина на хистолошким препаратима коронарних артерија; очекује се разлика од 35%, при чему је заступљеност код особа са раном атеросклерозом око 15%. Уз такве параметре и употребу Хи-квадрат теста, потребан је 21 пацијент за групу случајева и 41 пацијент за групу контрола. Величина група израчуната је на основу програма *G power*. Пацијенти ће бити дистрибуирани међу групама у односу 1 : 2 (на сваког пацијента који спада у групу случајева долази још два пацијента који су контроле).

2.4.6. Статистичка анализа

У статистичкој обради података, континуалне варијабле ће бити презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација (SD) у тексту и табелама, а категоријске као пропорција испитаника са одређеним исходом. За поређење средњих вредности континуалних варијабли користиће се Студентов *t*-тест за мале независне узорке, односно алтернативним непараметријским тестом уколико резултати не прате нормалну расподелу, што ће бити утврђено помоћу Колмогоров-Смирнов теста. Хи-квадрат (χ^2) тест ће бити коришћен за упоређивање разлика у учесталости категоријских варијабли, односно Фишеров тест ако је учесталост појединих категорија мала. Утицај већег броја независних и збуњујућих варијабли на испитивани дихотомни исход као и међусобна интеракција предикторских варијабли, биће испитани бинарном логистичком регресијом, а резултати приказани као кориговани однос могућности (*Adjusted Odds ratio*). Статистички значајним сматраће се сви резултати где је вероватноћа хипотезе мања од 5% ($p < 0.05$). Добијени резултати истраживања биће приказани табеларно и графички. Сви статистички прорачуни биће урађени помоћу комерцијалног, стандардног програмског пакета SPSS, верзија 18.0.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Као најзначајнији резултат ове студије очекује се потврда цитохистолошких фактора који доприносе развоју атеросклерозе коронарних артерија, а резултати имунохистохемијске анализе би указали на повезаност клиничке слике коронарне болести и цитохистолошких стадијума атеросклерозе.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Атеросклероза као комплексна болест већ деценијама је предмет истраживања базичних и клиничких дисциплина, али још увек постоје недоумице у савременој литератури о патогенетским механизмима настанка и тока, као и улоге различитих ћелијских популација васкуларног зида током иницијације и развоја овог процеса. Због тога би евалуација функције глатких мишићних ћелија, идентификација њиховог фенотипа, а посебно одређивање њиховог потенцијала за фенотипску модификацију у пенасте ћелије, допринело разумевању комплексних механизма у патогенези атеросклерозе.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Др Весна Росић рођена је 02.05.1983. године у Крагујевцу. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2002/2003. године, а дипломирала 31.10.2008. године са просечном оценом 9,62.

Докторске академске студије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за изборно поручје Клиничка и експериментална интерна медицина - Кардиологија, уписала је школске 2008/2009. године. Усмени докторски испит положила је 2011. године. Од 06.03.2009. године запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као сарадник у настави, а затим и асистент за ужу научну област Хистологија и ембриологија.

Кандидат др Весна Росић објавила је рад у целини у часопису категорије M21 који се публикује на једном од водећих светских језика, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву теме докторске дисертације.

- Silconi BZ*, Rosic V*, Benazic S, Radosavljevic G, Mijajlovic M, Pantic J, Ratkovic RZ, Radic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Arsenijevic N and Milovanovic J. The Pt(S-pr-thiosal)₂ and BCL1 Leukemia Lymphoma: Antitumor Activity In Vitro and In Vivo. Int J Mol Sci 2022 Jul 24;23(15):8161. M21

3. Предлог ментора

За менторе ове докторске дисертације предлажу се проф. др Ирена Танасковић, редовни професор за ужу научну област Хистологија и ембриологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и проф. др Весна Станковић, ванредни професор за ужу научну област Патолошка анатомија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Предложени наставници испуњавају услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Проф. др Ирена Танасковић поседује стручне и научне квалификације у складу са предметом истраживања и планираним методолошким приступом.

1. Rosic V, **Tanaskovic I**, Milosavljevic Z, Sazdanovic M, Rosic M, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T, Zornic N, Nestic J, Aleksic A, Stankovic V. Function of S100 protein in coronary atherosclerosis. *Int J Morph* 2022; 40(3): 760-767.
2. **Tanaskovic I**, Ilic S, Jurisic V, Lackovic M, Milosavljevic Z, Stankovic V, Aleksic A, Sazdanovic M. Histochemical, immunohistochemical and ultrastructural analysis of aortic wall in neonatal coarctation. *Rom J Morphol Embryol* 2019; 60(4):1291-1298.
3. Nogo-Živanović D, Kanjevac T, Bjelović Lj, Ristić V, **Tanasković I**. The effect of final irrigation with MTAD, QMix, and EDTA on smear layer removal and mineral content of root canal dentin. *Microsc Res Tech*. 2019; 923–930. DOI: 10.1002/jemt23239
4. Tanaskovic-Stankovic S, **Tanaskovic I**, Jovicic N, Miletic-Kovacevic M, Kanjevac T, Milosavljevic Z. The mineral content of the hard dental tissue of mesiodens. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2018; 162(2): 149-153.
5. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, **Tanaskovic I**, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus infection induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. *Front Immunol* 2017; 8:192. doi: 10.3389/fimmu.2017.00192. eCollection 2017.
6. Filipovic N, Saveljic I, Jovicic N, **Tanaskovic I**, Zdravkovic N. Computational and experimental model of electroporation for human aorta. *Acta Bioeng Biomech* 2016; 18(4):15-20.

Проф. др Весна Станковић поседује стручне и научне квалификације у складу са предметом истраживања и планираним методолошким приступом.

1. Rosic V, Tanaskovic I, Milosavljevic Z, Sazdanovic M, Rosic M, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T, Zornic N, Nestic J, Aleksic A, **Stankovic V**. Function of S100 protein in coronary atherosclerosis. *Int J Morph* 2022; 40(3): 760-767.
2. Milošević M, Mašković P, **Stankovic V**, Paunovic M, Mitic M, Matic M, Ognjanovic B. Protective effects of *Viscum album L.* leaf extract on chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Journal of King Saud University – Science* 2022; 34(4): 101957
3. Vulović D, Stanković V, Šarenac Vulović T, Milošević B, Vulović M, Radovanović D, Spasić M. Giant exophytic Marjolin's ulcer of the lower leg after the gunshot wound. *Vojnosanit Pregl* 2022; 79(7): 730-733.
4. Paunović M, Matić M, **Stanković V**, Milošević M, Jevtić V, Trifunović S, Ognjanović B. Evaluation of Toxic Effects of Novel Platinum (IV) Complexes in Female Rat Liver: Potential Protective Role of Resveratrol. *Cell Biochem and Biophys* 2021; 79(1):141-152.
5. Jovanovic D, Mitrovic S, Milosavljevic Z, Ilic M, **Stankovic V**, Vuletic M, Dimitrijevic Stojanovic M, Milosev D, Azanjac G, Nedeljkovic V, Radovanovic D. Breast Cancer and p16: Role in proliferation, malignant transformation and progression. *Healthcare* 2021; 9:1240.
6. Andrić K, Kozarski J, **Stanković V**, Spasić M, Rakić V, Vulović D. Large hemangiopericytoma of the shoulder: a case report. *Vojnosanit Pregl* 2020; 79(1): 94-98.
7. Savic M, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, **Stankovic V**, Rilak Simovic A, Lazic D, Arsenijevic N, Milovanovic M. Antitumor Activity of Ruthenium(II) Terpyridine Complexes towards Colon Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Molecules* 2020; 25: 4699

4. Научна област дисертације

Медицина. Уже научне област: Хистологија и ембриологија и Патолошка анатомија.

Докторска дисертација је мултидисциплинарна по свом карактеру и укључује две уже научне области.

Предмет истраживања предложене докторске дисертације представља утврђивање фенотипских карактеристика глатких мишићних ћелија у коронарним артеријама особа са узнапредовалим формама атеросклерозе. Предмет истраживања, циљ, постављене хипотезе и методологија истраживања су међусобно усклађени, а предложени ментори имају научне компетенције које су у сагласности са предметом истраживања.

5. Научна област чланова комисије

- 1. Проф. др Зоран Милосављевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник;
- 2. Проф. др Маја Саздановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
- 3. Проф. др Милица Лабудовић Боровић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.

Сви предложени чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др Весне Росић** имају стручне и научне компетенције које су у сагласности са предметом истраживања.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

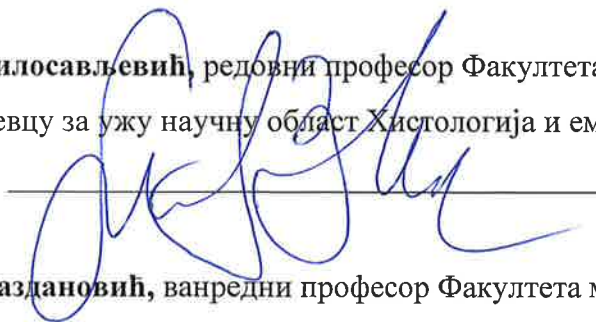
На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, кандидат испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је прецизна и јасна.

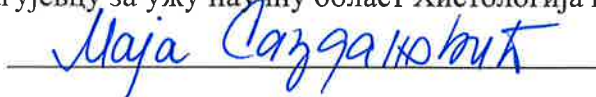
Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Весне Росић под називом **“Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са узнапредовалим формама атеросклерозе”** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

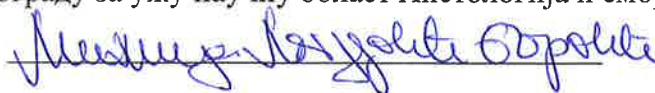
Проф. др Зоран Милосављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник



Проф. др Маја Саздановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан



Проф. др Милица Лабудовић Боровић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан



У Крагујевцу, септембар 2022. године