

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.04.2022. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Ispitivanje značaja markera hiperkoagulabilnosti i globalnih hemostatskih testova u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom**“, kandidata diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Sanje Lalić-Ćosić, u sastavu:

- Dr sc. Mirjana Kovač, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet
- Dr sc. Aleksandra Antović, vanredni profesor, Karolinska Institut - Odsek za medicinu, Štokholm, Švedska
- Dr sc. Željko Miković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet
- Dr Dragomir Marisavljević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
- Dr sc. Neda Milinković, docent, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Mentor: Dr Violeta Dopsaj, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Posle izvršene analize priložene doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu sledeći:

IZVEŠTAJ

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Sanje Lalić-Ćosić pod nazivom „Ispitivanje značaja markera hiperkoagulabilnosti i globalnih hemostatskih testova u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom“ je napisana na 142 strane i sadrži 31 tabelu, 15 slika i 338 bibliografskih jedinica. Sadržaj doktorske disertacije je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak, Literatura i Prilozi.

Poglavlje **Uvod** usmereno je na pojmovno-terminološka određenja preeklampsije sa prikazanom klasifikacijom i definicijom hipertenzivnih poremećaja u trudnoći. Opisan je značaj i učestalost ovih poremećaja uključujući i preeklampsiju, navedeni su faktori rizika za razvoj preeklampsije, kliničke karakteristike preeklampsije, maternalne i fetalne, odnosno neonatalne komplikacije, kao i dugoročne posledice preeklampsije. S obzirom na to da su uzrok i patogeneza preeklampsije i dalje nerazjašnjeni, u odeljku „Etiologija i patogeneza preeklampsije” opisane su predložene teorije i hipoteze o nastanku preeklampsije i faktorima koji potencijalno mogu da dovedu do ispoljavanja maternalnog sindroma. U nastavku rada razmatraju se promene u hemostatskom statusu u normalnoj i trudnoći sa preeklampsijom, a potom je opisano laboratorijsko ispitivanje hemostaze u normalnoj trudnoći i preeklampsiji sa posebnim osvrtom na globalne testove hemostaze. U poslednjem odeljku uvodnog dela doktorske disertacije analizirane su ekstracelularne vezikule, način njihovog nastanka, karakteristike, prokoagulantno i proinflamatorno dejstvo, kao i značaj rezultata dosadašnjih istraživanja ekstracelularnih vezikula u normalnoj trudnoći i preeklampsiji.

S obzirom na to da je preeklampsija okarakterisana prokoagulabilnim stanjem i povezana sa rizikom od venskog tromboembolizma (VTE), koji je najveći posle porođaja, kao i razvojem kardiovaskularnih bolesti (KVB) kasnije tokom života, **Cilj** ove doktorske disertacije bio je da se ispituju parametri dva globalna hemostatska testa, endogenog trombinskog potencijala i ukupnog hemostatskog potencijala, i njihova primenjivost u proceni hiperkoagulabilnog stanja kod trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja, kao i da se analiziraju rezultati ovih testova u odnosu na kliničke ishode majke i ploda. Pored toga, proučavane su karakteristike i kvalitet fibrinskih ugrušaka i vizuelizovana je struktura fibrinske mreže kod zdravih trudnica i trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Takođe, ispitane su razlike u koncentraciji markera aktivirane hemostaze i inflamacije između

trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja, u poređenju sa zdravim trudnicama, a zatim je analizirana međusobna povezanost parametara globalnih testova hemostaze, parametara fibrinskog ugruška, markera aktivirane hemostaze i inflamacije. U skladu sa ovim, cilj doktorske disertacije obuhvatio je i merenje nivoa ekstracelularnih vezikula (EV) i određenih fenotipova EV u uzorcima plazme zdravih trudnica i žena sa preeklampsijom, kao i ispitivanje povezanosti ovih nivoa sa parametrima globalnih hemostatskih testova, parametrima fibrinskog ugruška i markerima aktivirane koagulacije i inflamacije. Dodatno, analizirane su promene u ispitivanim subpopulacijama EV u uzorcima plazme trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Postavljeni cilj istraživanja jasno pokazuje obuhvatan i temeljan pristup problemu istraživanja.

U poglavlju **Materijali i metode** navedeni su mesto i faze istraživanja, ispitivana populacija, kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja, protokol ispitivanja zajedno sa načinom dobijanja i obrade uzoraka krvi, kao i primenjeni laboratorijski testovi.

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 127 trudnica gestacijske starosti 25 – 40 nedelja i starosne dobi 18 – 47 godina, odnosno 47 trudnica sa preeklampsijom i 80 zdravih trudnica. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze preeklampsije bili su u skladu sa smernicama koje je 2014. godine definisalo Međunarodno udruženje za proučavanje hipertenzije u trudnoći (*engl.* International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy – ISSHP). Zdrave trudnice sa jednoplođnom trudnoćom u periodu drugog i trećeg trimestra trudnoće su uključene u istraživanje u toku svojih redovnih kontrola koje su obavljane u Institutu za transfuziju krvi, a bez daljeg praćenja ishoda trudnoće.

Korišćenjem standardizovanih upitnika svim trudnicama su prilikom uključivanja u istraživanje uzeti anamnestički podaci, dok su za trudnice sa preeklampsijom zabeleženi i klinički podaci u toku hospitalizacije. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost svih ispitanica i uz odobrenja Etičkih odbora Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ i Instituta za transfuziju krvi Srbije, a u skladu sa principima Dobre kliničke prakse i uz poštovanje Helsinške deklaracije i nacionalnih zakona i propisa.

U ovom delu doktorske disertacije fokus je usmeren na ispitivanje uzoraka plazme siromašne trombocitima (*engl.* Platelet Poor Plasma – PPP), pri čemu su određivani globalni testovi hemostaze: endogeni trombinski potencijal (*engl.* Endogenous Thrombin Potential – ETP), primenom komercijalnog testa Innovance ETP (Siemens Healthcare Diagnostics), i ukupni hemostatski potencijal (*engl.* Overall Haemostatic Potential – OHP) za čije određivanje je korišćena modifikacija metode razvijene na Karolinska Institutu. Za indirektnu

procenu aktivnosti trombinom aktiviranog fibrinolitičkog inhibitora (TAFI) iz krivih agregacije fibrina koje su dobijene pomoću OHP testa izvedenog sa i bez dodatka specifičnog inhibitora karboksipeptidaze (*engl.* Potato Tuber Carboxy-peptidase Inhibitor – PTCI) određivano je vreme lize fibrinskog ugruška (*engl.* Clot Lysis Time – CLT). Parametri fibrinskog ugruška, lag vreme, brzina polimerizacije (Vmax) i maksimalna apsorbancija (Max Abs), dobijeni su analizom krivih agregacije ukupnog koagulacionog potencijala (*engl.* Overall Coagulation Potential – OCP), dok su struktura i gustina fibrinskih ugrušaka analizirani skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na reprezentativnim ugrušcima formiranim tokom određivanja OCP. PPP je takođe korišćena za određivanje koncentracije antitrombina, D-dimera, FVIII, fibrinogena sa komercijalnim testovima na automatskom koagulometru (Siemens Healthcare Diagnostics), dok je i trombin-antitrombin kompleks (TAT) određivan pomoću ELISA testa (Siemens Healthcare Diagnostics). U uzorcima seruma su određivani: CRP (nefelometrijskom metodom na aparatu BN ProSpec, Siemens Healthcare Diagnostics), parametri lipidnog statusa: ukupan holesterol, HDL holesterol, LDL holesterol, trigliceridi i lipoprotein (a) (rutinskim metodama na analizatoru Cobas 6000, Roche Diagnostics), kao i IgA, IgG i IgM anti- β 2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinska antitela (korišćenjem komercijalnih IgA, IgG i IgM antifosfolipidnih panela na automatskom analizatoru BioPlex 2200, Bio-Rad Laboratories).

Pored toga, na protočnom citometru Beckman Gallios (Beckman Coulter) u PPP uzorcima 36 zdravih trudnica i 30 trudnica sa preeklampsijom, pre i posle porođaja, određivana je koncentracija ekstracelularnih vezikula (EV) i njihov fenotip. Za identifikaciju inicijalne populacije EV koje na svojoj površini ispoljavaju fosfatidilserin (*engl.* phosphatidylserine – PS) korišćen je laktadherin, dok su za fenotipizaciju PS+ subpopulacija EV korišćena odgovarajuća monoklonalna antitela: anti-CD42a antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (CD42a-PE; Beckman Coulter), koje je specifično za glikoprotein IX i marker je trombocita; anti-CD62E antitelo konjugovano sa alofikocijaninom (CD62E-APC; AH diagnostics), koje je specifično za E-selektin i marker je endotelnih ćelija; anti-CD142 antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (CD142-PE; BD), koje je specifično za tkivni faktor (TF) i predstavlja marker TF; anti-CD106 antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (CD106-PE; AH diagnostics), koje je specifično za adhezivni molekul vaskularnih ćelija 1 (*engl.* Vascular Cell Adhesion Molecule 1 – VCAM-1) i marker je aktiviranih endotelnih ćelija. Dodatno, određivana je i koncentracija EV koje na svojoj površini ispoljavaju placentalni faktor rasta (*engl.* Placental Growth Factor – PIGF) korišćenjem anti-PIGF antitela konjugovanih sa fluorescein-izotiocijanatom (Anti-PIGF-FITC; Abcam). Prethodno je pomoću smeše čestica

prečnika 0,1, 0,3, 0,5 i 0,9 μm (Megamix-Plus FSC, Biocytex) određen opseg EV (*engl.* EV gate), a EV su definisane kao partikule veličine $< 1 \mu\text{m}$ i pozitivne na navedena antitela.

Standardni statistički parametarski testovi su korišćeni za analizu promenljivih sa normalnom raspodelom, a neparametarski za promenljive kod kojih je ustanovljeno da nemaju normalnu raspodelu. Da bi se utvrdilo postojanje povezanosti između ispitivanih parametara izvršena je Pearson-ova korelaciona analiza za promenljive sa normalnom raspodelom, a za promenljive koje odstupaju od normalne raspodele, Spearman-ova korelaciona analiza. Multivarijatna logistička regresiona analiza je korišćena za ispitivanje mogućih interakcija, a u grupi pacijentkinja sa renalnim komplikacijama ispitan je prediktivni potencijal pojedinačnih ETP parametara upotrebom ROC (*engl.* Receiver operating characteristics) krive. Za statističku obradu i analizu podataka su korišćeni statistički programi SPSS 20.0 (IBM Corporation) i R 3.4.2. Q18 (R Foundation for Statistical Computing).

U okviru poglavlja **Rezultati** doktorand pregledno i sistematično izlaže rezultate istraživanja. U prvom delu poglavlja predstavljene su opšte i kliničke karakteristike ispitanica studijske i kontrolne grupe, maternalne komplikacije zabeležene u toku hospitalizacije kod trudnica sa preeklampsijom, kao i ishodi trudnoće i fetalne komplikacije u ovoj grupi. Zatim su prikazani rezultati poređenja parametara globalnih testova hemostaze u kontrolnoj grupi i grupi trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Takođe su prikazane reprezentativne krive agregacije fibrina za ukupni koagulacioni i hemostatski potencijal kod zdravih trudnica i trudnica sa preeklampsijom, pre i posle porođaja, kao i komercijalni normalni pool plazme (Cryocheck Pooled Normal Plasma, Precision Biologic). Pored toga, prikazani su rezultati poređenja globalnih testova hemostaze posle statističke analize sa kontrolisanjem uticaja gestacijske starosti i indeksa telesne mase (ITM), kao i rezultati posle isključivanja trudnica sa preeklampsijom na profilaksi sa niskomolekularnim heparinom (*engl.* Low Molecular Weight Heparin – LMWH).

Rezultati vremena liziranja ugruška, bez i posle dodatka inhibitora karboksipeptidaze (PTCI), prikazani su za zdrave trudnice i trudnice sa preeklampsijom, pre i posle porođaja, uključujući i rezultate poređenja ispitivanih grupa, kao i rezultate parametara povezanih sa lizom ugruška posle isključivanja trudnica sa preeklampsijom na LMWH. Takođe, dat je i uporedni prikaz reprezentativnih krivih vremena liziranja ugruška sa i bez dodatka PTCI za uzorak zdravih trudnica, trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja, i komercijalni normalni pool plazme. Parametri dobijeni analizom krive agregacije ukupnog koagulacionog potencijala (vremena lag faze, brzine polimerizacije (V_{max}) i maksimalne apsorbancije (Max

Abs)) prikazani su za kontrolnu grupu i grupu trudnica sa preeklampsijom, pre i posle porođaja. Takođe, prikazani su i rezultati poređenja ovih parametara pre i posle isključivanja trudnica sa preeklampsijom na profilaksi sa LMWH. Struktura fibrinskih ugrušaka ispitana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) prikazana je na snimcima elektronske mikroskopije reprezentativnih fibrinskih ugrušaka zajedno sa gustom fibrinske mreže za komercijalni normalan pool plazme, zdrave trudnice i trudnice sa preeklampsijom. Ostali laboratorijski parametri određivani u PPP uzorcima i uzorcima seruma i rezultati poređenja između ispitivanih grupa navedeni su takođe pre i posle isključivanja ispitanica na terapiji LMWH.

U delu „Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom“ prikazani su rezultati analiziranih parametara u grupi trudnica sa preeklampsijom u odnosu na gestacijsku nedelju razvoja preeklampsije, prisustvo komorbiditeta i infertiliteta, prisustvo maternalnih komplikacija u toku hospitalizacije, ishode trudnoće i prisustvo fetalnih komplikacija. U podgrupi preeklamptičnih trudnica kod kojih je došlo do razvoja renalnih komplikacija izvršena je uporedna analiza ispitivanih parametara čiji su rezultati prikazani za trudnice sa preeklampsijom, sa i bez renalnih komplikacija. Za trudnice sa preeklampsijom i renalnim komplikacijama dati su i rezultati ROC analize kojom su procenjene dijagnostičke i prognostičke vrednosti pojedinačnih ETP parametara (ETP AUC i visine pika), kao i odgovarajuće ROC krive.

U narednim odeljcima ovog poglavlja prikazani su rezultati korelacione analize između ispitivanih globalnih testova hemostaze, njihova korelacija sa ostalim ispitivanim parametrima, ishodom trudnoće i vrednostima Apgar skora.

Poslednji deo poglavlja Rezultati je posvećen analizi ekstracelularnih vezikula. Prikazane su opšte karakteristike kontrolne podgrupe i podgrupe trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja, a zatim koncentracije i zastupljenost ispitivanih subpopulacija EV u ispitivanim podgrupama, pre i posle isključivanja trudnica sa preeklampsijom na profilaksi sa LMWH. Pored toga, dati su i dot plot prikazi rezultata protočne citometrije za PS⁺ CD42a⁺, PS⁺ VCAM-1⁺ i PIGF⁺ subpopulacije EV za reprezentativne uzorke zdrave trudnice i trudnice sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Za ispitivane podgrupe data je distribucija ispitivanih parametara hemostaze, CRP-a i parametara lipidnog statusa, kao i rezultati Spearman-ove korelacione analize između ovih parametara i pojedinih subpopulacija EV. S obzirom da na količinu produkovanih EV utiču vrednosti krvnog pritiska, starosne dobi i ITM, posle logaritamske transformacije parametara koji odstupaju od normalne raspodele, urađena je Pearson-ova korelaciona analiza, kao i parcijalna korelacija koja omogućava

kvantifikovanje linearne asocijacije između varijabli uz kontrolu uticaja jednog ili više faktora, čiji su rezultati takođe prikazani.

U poglavlju **Diskusija** prikazano je poređenje dobijenih rezultata sa relevantnim literaturnim podacima i iznesena su objašnjenja i implikacije rezultata ove studije.

Poglavlje **Zaključak** obuhvata najznačajnije zaključke koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

Na kraju doktorske disertacije nalaze se poglavlje **Literatura**, koje sadrži spisak od 338 literaturnih navoda korišćenih u doktorskoj disertaciji i poglavlje **Prilozi** koje sadrži prikaz formulara za dobrovoljni pristanak za učestvovanje u istraživanju sa kratkim obaveštenjem o ispitivanju, kao i korišćene standardizovane upitnike.

B. Opis dobijenih rezultata

S obzirom na to da su za jednu trudnicu sa preeklampsijom i višeploidnom trudnoćom podaci dobijeni u istraživanju naknadno isključeni iz statističke obrade, ispitivanu populaciju je činilo 46 pacijentkinja sa preeklampsijom i 80 zdravih trudnica. Statistički značajna razlika između ispitivanih grupa nije utvrđena u pogledu starosne dobi, pariteta, pušačkog statusa i porodične istorije komplikacija u trudnoći, ali su trudnice sa preeklampsijom imale veću gestacijsku starost i ITM prilikom uključivanja u studiju, kao i veći procenat zastupljenosti komplikacija u prethodnoj trudnoći. Takođe, u grupi sa trudnicama sa preeklampsijom zabeležen je značajno veći broj trudnica sa pridruženim komorbiditetima i prisustvom infertiliteta (47,8%) u odnosu na zdrave trudnice (3,8%). Posle isključivanja 4 trudnice kod kojih je primenjivan LMWH, između ispitivanih grupa i dalje je postojala statistički značajna razlika u pogledu gestacijske starosti i ITM, kao i u procentu zastupljenosti komplikacija u prethodnoj trudnoći. Maternalne komplikacije u toku hospitalizacije javile su se kod 33% trudnica sa preeklampsijom, pri čemu su kod najvećeg broja zabeležene renalne komplikacije, neurološki poremećaji, HELLP sindrom, trombocitopenija i abrupcija placente, a jedna trudnica je imala i renalne komplikacije i neurološki poremećaj. Fetalne komplikacije, intrauterusni zastoje u rastu ploda (*engl.* Intrauterine Growth Restriction – IUGR), oligohidramnion i fetalna asfiksija, zabeležene su kod 78% trudnica sa preeklampsijom, od čega se IUGR javio u najvećem broju, samostalno ili udružen sa ostalim fetalnim komplikacijama.

Analiza rezultata globalnih testova hemostaze pokazala je značajno više vrednosti parametara ETP testa (ETP, visine pika i vremena lag faze) i vrednosti ukupnog hemostatskog potencijala (OHP), dok su vrednosti ukupnog fibrinolitičkog potencijala (*engl.* Overall

Fibrinolysis Potential – OFP) bile niže u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolnu grupu. Kod trudnica sa preeklampsijom posle porođaja utvrđene su značajno povišene vrednosti visine pika i vremena dostizanja pika, kao i značajno sniženje OFP vrednosti u odnosu na vrednosti pre porođaja. Na grafičkom prikazu reprezentativnih krivih agregacije fibrina za ukupni koagulacioni potencijal i ukupni hemostatski potencijal jasno se uočava produženo vreme fibrinolize u preeklampsiji sa dodatnim produženjem posle porođaja. Posle kontrolisanja uticaja gestacijske starosti pri uzokovanju krvi i ITM, svi ispitivani parametri, izuzev tlag i OHP, su se i dalje statistički značajno razlikovali između ispitivanih grupa. Za sve navedene parametre nađena je statistički značajna razlika i posle isključivanja pacijentkinja na terapiji LMWH.

Kod trudnica sa preeklampsijom utvrđeno je značajno produženje vremena liziranja ugruška (CLT) u odnosu na zdrave trudnice, pri čemu je posle dodatka inhibitora karboksipeptidaze (PTCI) uočeno značajno skraćanje vremena liziranja ugruška (CLT PTCI) u obe grupe, ali je CLT PTCI ostalo duže u grupi sa preeklampsijom. Parametar Δ CLT, koji ukazuje na izmenjenu aktivnost TAFI, bio je značajno povećan u preeklampsiji. Na uporednom prikazu reprezentativnih krivih vremena liziranja ugruška sa i bez dodatka PTCI uočava se produženje CLT i CLT PTCI u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom posle porođaja, ali razlike u odnosu na vrednosti pre porođaja nisu bile statističke značajne. Razlika nije postojala ni za Δ CLT. Posle kontrolisanja uticaja gestacijske starosti pri uzokovanju krvi i ITM, kao i posle isključivanja pacijentkinja na profilaktičkoj terapiji sa LMWH, nije bilo promene u rezultatima statističke analize.

Analizom parametara dobijenih sa krive agregacije ukupnog koagulacionog potencijala utvrđeno je da trudnice sa preeklampsijom imaju nepovoljne karakteristike fibrinskih ugrušaka, odnosno da je u ovoj grupi povećana brzina stvaranja fibrina i da se fibrinski ugrušci sastoje od tanjih vlakana. Između trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja nije postojala statistički značajna razlika u pogledu karakteristika fibrinskih ugrušaka, osim produženja lag faze u grupi posle porođaja. Posle isključivanja trudnica na terapiji LMWH, statistički značajna razlika između ispitivanih grupa i dalje je postojala za sve navedene parametre. SEM analizom strukture fibrinskih ugrušaka utvrđena je veća gustina fibrinske mreže u reprezentativnim uzorcima trudnica sa preeklampsijom u odnosu na uzorke zdravih trudnica i normalnog pool-a plazme. Na uporednom prikazu reprezentativnih fibrinskih ugrušaka snimljenih elektronskom mikroskopijom pod uvećanjem od 1 μ m i 200 nm jasno se uočava gušća fibrinska struktura u uzorku trudnice sa preeklampsijom.

U grupi trudnica sa preeklampsijom utvrđena je niža aktivnost AT u odnosu na zdrave trudnice, pri čemu je kod trudnica sa preeklampsijom posle porođaja aktivnost AT porasla na nivo vrednosti izmerenih u kontrolnoj grupi. Vrednosti D-dimera i fibrinogena nisu se razlikovale između preeklampsije i zdrave trudnoće, ali su statistički značajne razlike uočene između trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Trudnice sa preeklampsijom su imale i značajno više vrednosti FVIII i CRP u poređenju sa kontrolnom grupom, a posle porođaja uočeno je dodatno povećanje vrednosti ovih parametara. Značajno snižene vrednosti HDL holesterola i povišene vrednosti triglicerida uočene su u grupi sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice, dok je posle porođaja zabeleženo statistički značajno sniženje vrednosti ovih parametara, kao i ukupnog holesterola. Posle kontrolisanja uticaja gestacijske starosti pri uzokovanju krvi i ITM, između ispitivanih grupa su se zadržale pomenute razlike za sve ispitivane parametre osim za CRP, dok se posle isključivanja ispitanica na terapiji LMWH rezultati statističke analize nisu značajno promenili.

Prisustvo antifosfolipidnih antitela, IgA, IgG i IgM anti- β 2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinskih antitela, nije utvrđeno u grupi trudnica sa preeklampsijom. Međutim, u kontrolnoj grupi kod jedne trudnice je utvrđen nizak titar anti- β 2 glikoprotein I IgG antitela i kod jedne trudnice srednji titar antikardiolipinskih IgG antitela, ali se nijedan od ostalih ispitivanih parametara nije se razlikovao kod ove dve trudnice u poređenju sa ostalim zdravim trudnicama. Isto tako, kod ovih trudnica nije bilo kliničkih manifestacija povezanih sa antifosfolipidnim sindromom (AFS). Lupus antikoagulans (LA) nije određivan u ispitivanim grupama, tako da nije urađen celokupan AFS skrining.

U grupi ispitanica sa preeklampsijom izvršena je analiza ispitivanih parametara u odnosu na gestacijsku nedelju razvoja preeklampsije, prisustvo pridruženih bolesti i infertiliteta, prisustvo maternalnih komplikacija u toku hospitalizacije i ishode trudnoće. U odnosu na nedelju gestacije kada je preeklampsija dijagnostikovana izvršena je podela na 2 podgrupe. U prvoj podgrupi je dijagnostikovano 27 trudnica sa ranom formom, kod kojih je pre 34. nedelje gestacije došlo do razvoja preeklampsije, dok je u drugoj grupi bilo 19 trudnica sa kasnom formom, kod kojih se preeklampsija javila tokom ili posle 34. nedelje gestacije. Između ove 2 podgrupe statistički značajna razlika uočena je samo za ETP čije su vrednosti bile niže u podgrupi ispitanica sa kasnom formom preeklampsije. Sa druge strane, poređenjem ispitivanih parametara nisu uočene statistički značajne razlike između trudnica sa preeklampsijom, sa i bez prisustva infertiliteta i pridruženih komorbiditeta. Međutim, u grupi trudnica čija je trudnoća bila praćena pojavom komplikacija u toku hospitalizacije uočene su statistički značajno niže vrednosti AT u odnosu na grupu bez komplikacija. Kod trudnica sa

renalnim komplikacijama utvrđene su statistički značajno povišene vrednosti ETP i visine pika, kao i D-dimer, Δ CLT, ukupni holesterol i trigliceridi u odnosu na trudnice bez renalnih komplikacija u toku hospitalizacije. ROC analizom je pokazano da je visina pika bolji prognostički marker renalnih komplikacija u odnosu na ETP. U pogledu fetalnih komplikacija uočene su značajno snižene vrednosti D-dimera u odnosu na trudnice sa preeklampsijom kod kojih nije došlo do pojave fetalnih komplikacija, pri čemu su analizom pojedinačnih fetalnih komplikacija značajno snižene vrednosti D-dimera nađene u grupi sa IUGR, a značajno snižene vrednosti OFP u grupi sa oligohidramnionom.

Korelacionom analizom između ispitivanih globalnih testova hemostaze utvrđeno je postojanje statistički značajne povezanosti parametara generacije trombina, ETP i visine pika, sa CLT i Δ CLT. Značajna inverzna korelacija uočena je između visine pika i OFP vrednosti, kao i između tlag i OCP i OHP vrednosti. Sva tri parametra generacije trombina, ETP, tlag i visina pika, su bila u značajnoj korelaciji i sa vrednostima Lag vremena. Statistički značajna korelacija nađena je između parametara OHP testa i CLT, kao i parametara fibrinskog ugruška, Vmax i Max Abs.

Korelaciona analiza između globalnih testova hemostaze i ostalih ispitivanih parametara pokazala je statistički značajnu korelaciju između tlag i koncentracije triglicerida, zatim visine pika i koncentracije ukupnog holesterola, kao i tmax i koncentracije HDL holesterola. Statistički značajne vrednosti Pearson-ovih koeficijenata korelacije nađene su između parametara ukupnog hemostatskog potencijala, OCP i OHP, i fibrinogena, dok su ovi parametri pokazali inverznu korelaciju sa koncentracijom triglicerida. Pored toga, za OHP vrednosti je utvrđena korelacija i sa koncentracijom LDL holesterola. Statistički značajna inverzna korelacija je uočena između OFP vrednosti i koncentracije antitrombina, aktivnosti FVIII, koncentracije ukupnog holesterola i LDL holesterola. CLT je bio u korelaciji sa koncentracijom antitrombina i ukupnog holesterola, a Δ CLT sa koncentracijom ukupnog holesterola. Za parametre fibrinskog ugruška utvrđena je korelacija između Max Abs i koncentracije fibrinogena i triglicerida, dok je brzina polimerizacije bila u korelaciji sa FVIII.

Statistički značajne vrednosti Spearman-ovih koeficijenata korelacije su utvrđene između proteinurije i visine pika, aktivnosti FVIII, koncentracije ukupnog holesterola, LDL holesterola i Lp(a).

Rezultati korelacione analize između ispitivanih parametara hemostaze i ishoda trudnoće pokazali su statistički značajnu korelaciju između vrednosti Apgar skora u 1. minutu i koncentracije antitrombina, CRP, ukupnog holesterola i LDL holesterola. Značajna

korelacija je utvrđena i između vrednosti Apgar skora u 5. minutu i ETP vrednosti, kao i koncentracije antitrombina, CRP i LDL holesterola.

U poslednjem delu istraživanja analizirana je koncentracija EV i njihova povezanost sa prethodno ispitivanim parametrima u podgrupi od 36 zdravih trudnica i 30 ispitanica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Statistički značajna razlika nije postojala između ispitivanih podgrupa u pogledu starosne dobi, pariteta, gestacijske starosti u momentu uključivanja u studiju, pušačkog statusa i porodične istorije KVB, ali je u podgrupi pacijentkinja sa preeklampsijom zabeležen značajno veći procenat komplikacija u prethodnoj trudnoći, kao i pozitivne porodične istorije komplikacija u trudnoći. Trudnice sa preeklampsijom su takođe imale veći ITM u odnosu na podgrupu zdravih trudnica.

U PPP uzorcima su protočnom citometrijom izmerene koncentracije ukupnih PS+ EV i ukupno 5 fenotipova EV: PS+ CD42a+, PS+ CD62E+, PS+ CD142+, PS+ CD106+ i PIGF+. Utvrđeno je da najveći udeo PS+ EV u svim ispitivanim grupama potiče od trombocita i to 36,9% u kontrolnoj grupi, a 51,5% i 29,5% u grupi trudnica sa preeklampsijom pre, odnosno posle porođaja.

Između zdravih i trudnica sa preeklampsijom nije uočena razlika u koncentraciji PS+ EV, ali su poređenjem različitih fenotipova EV koje ekspimiraju PS na svojoj površini utvrđene značajno više koncentracije CD42a+ trombocitnih EV i VCAM-1+ EV u grupi trudnica sa preeklampsijom, koje su se zadržale posle isključivanja 2 ispitanice kod kojih je primenjivan LMWH u profilaktičkoj dozi.

Poređenjem uparenih rezultata dobijenih kod trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja uočeno je povećanje koncentracije PS+ EV posle porođaja (~ 2,5 puta), koje je praćeno i značajnim porastom koncentracije svih ispitivanih subpopulacija EV, izuzev za PIGF+ EV. Pomenute razlike su se zadržale i posle isključivanja ispitanica na terapiji LMWH.

Između ispitivanih podgrupa izvršeno je poređenje i prethodno određivanih parametara globalnih testova hemostaze, vrednosti CRP i lipidnih parametara. U podgrupi ispitanica sa preeklampsijom su uočene značajno povišene vrednosti ETP, visine pika, OHP, Δ CLT, FVIII, CRP i koncentracije triglicerida, zatim značajno produžene vrednosti CLT, sa i bez dodatka PTCl, kao i veća brzina polimerizacije fibrina, dok su OFP vrednosti, AT koncentracija i debljina fibrinskih vlakana bile značajno niže u odnosu na podgrupu zdravih trudnica. U podgrupi trudnica sa preeklampsijom posle porođaja uočen je značajan porast visine pika, koncentracije AT, D-dimera, FVIII, CRP i Lp(a), snižene OFP vrednosti sa izraženijim produženjem CLT PTCl, kao i sniženje koncentracije ukupnog i HDL holesterola i triglicerida.

Korelacionom analizom utvrđene su značajne inverzne korelacije ukupne koncentracije PS+ EV i koncentracije PS+ TF+ EV sa vrednostima OCP, OHP, Max Abs i brzine polimerizacije. Statistički značajna direktna korelacija utvrđena je između ukupne koncentracije PS+ EV i TAT, kao i koncentracije triglicerida, dok je koncentracija PS+ TF+ EV bila u korelaciji sa koncentracijom triglicerida. Takođe, utvrđeno je postojanje značajne inverzne korelacije koncentracije PIGF+ EV sa Max Abs i Vmax. Koncentracija PS+ VCAM-1+ EV je bila u korelaciji sa FVIII. Korelacionom analizom nije utvrđeno postojanje statistički značajne povezanosti koncentracija PS+ trombocitnih i PS+ endotelnih EV sa ispitivanim parametrima. Posle logaritamske transformacije parametara koji su odstupali od normalne raspodele izvršena je Pearson-ova korelaciona analiza i potvrđene su sve značajne asocijacije prethodno utvrđene Spearman-ovom korelacionom analizom, osim za PIGF+ EV i Max Abs. Rezultati parcijalne korelacione analize između pojedinih subpopulacija EV i ispitivanih parametara hemostaze posle prilagođenog uticaja maternalne starosti i ITM pokazali su postojanje korelacije između PS+ CD62E+ endotelnih EV i ETP, ali korelacija između koncentracije PS+ CD106+ EV i aktivnosti FVIII više nije bila značajna. Uključivanje kontrole uticaja krvnog pritiska nije značajno uticalo na rezultate parcijalne korelacije.

C. Uporedna analiza dobijenih rezultata sa podacima iz literature

Preeklampsija je kompleksan poremećaj koji nastaje kao komplikacija trudnoće i predstavlja vodeći uzrok maternalnog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta, a istovremeno je povezan i sa značajnim dugoročnim posledicama po majku i njeno potomstvo. Pored toga, etiologija i patogeneza preeklampsije nisu u potpunosti razjašnjene. U osnovi ovog poremećaja je nepotpuno remodelovanje spiralnih arterija koje dovodi do insuficijencije placente i oslobađanja placentalnih faktora odgovornih za aktivaciju maternalnog vaskularnog endotela. Posledično dolazi do generalizovane vazokonstrikcije, povećane aktivacije koagulacije i inflamatornog odgovora i disfunkcije endotela, odnosno maternalnog odgovora koji se klinički ispoljava u vidu hipertenzije udružene sa proteinurijom, disfunkcijom drugih organa ili zaostajanjem u rastu ploda (IUGR). Zbog svega navedenog postoji nedostatak jasnih preventivnih i terapijskih strategija, te tretman preeklampsije predstavlja klinički izazov (1). Normalna trudnoća je okarakterisana hiperkoagulabilnim stanjem, koje je u preeklampsiji dodatno izraženo. Pospešena aktivacija koagulacije i supresija fibrinolize u preeklampsiji praćene su povećanim intra- i perivaskularnim stvaranjem fibrinskih depozita, naročito u placenti i glomerulima bubrega što dalje doprinosi poremećaju endotelne funkcije (2).

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su globalni testovi hemostaze uzimajući u obzir ograničenu sposobnost rutinskih testova hemostaze u proceni aktivnosti kompleksnog hemostatskog sistema u preeklampsiji. U skladu sa literaturnim podacima primenom globalnih testova, endogenog trombinskog potencijala (ETP) i ukupnog hemostatskog potencijala (OHP), potvrđeno je prisustvo hiperkoagulabilnog stanja u preeklampsiji. Pored toga, parametri globalnih testova hemostaze pokazali su postojanje aktivirane koagulacije i smanjenu fibrinolitičku aktivnost i posle prekida preeklamptične trudnoće. U ETP testu meri se kinetika i ukupna količina stvorenog trombina u vremenu, pri čemu povećano stvaranje trombina ukazuje na sklonost ka trombozi (3). Rezultati ETP testa određivanog u ovom radu ukazuju na stvaranje značajno većih količina trombina i postizanje većih maksimalnih koncentracija trombina u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću, što predstavlja potvrdu pomeranja hemostatske ravnoteže ka prokoagulabilnom stanju i postojanja dodatnog trombotičkog rizika u preeklampsiji, naročito kod trudnica sa preeklampsijom posle porođaja kod kojih su izmerene značajno povišene vrednosti visine pika, tj. maksimalnih koncentracija trombina u odnosu na vrednosti pre porođaja. Dobijeni rezultati su u skladu sa drugim studijama, ali nijedna studija nije određivala ETP neposredno, odnosno u periodu od 2. do 10. dana posle porođaja kao što je to slučaj u doktorskoj disertaciji (4,5). Sa druge strane, OHP test omogućava procenu hemostaze uključujući i proces fibrinolize, odnosno omogućava uvid i u stvaranje i u razgradnju fibrina. Pored toga, u OHP testu sa dodatkom specifičnog TAFI-inhibitora (PTCI) omogućena je indirektna procena aktivnosti TAFI (6). Nalaz značajno povišenih OHP i sniženih OFP vrednosti prikazanih u doktorskoj disertaciji, kao i značajno produženje vremena lize ugruška (CLT) u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću potvrda su postojanja hipofibrinolitičkog stanja u preeklampsiji i rezultata prethodnih istraživanja (7). U grupi preeklamptičnih trudnica posle porođaja utvrđena je dodatna supresija fibrinolize okarakterisana značajnim sniženjem OFP u odnosu na vrednosti kod istih trudnica pre porođaja. Po dodatku PTCI uočeno je skraćivanje CLT vrednosti koje je bilo statistički značajno između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica, ali ne i između preeklamptičnih trudnica pre i posle porođaja. Ograničen broj studija koje su ispitivale ulogu TAFI u preeklampsiji pokazao je kontradiktorne rezultate. Međutim, jedino u studiji Martinez-Zamora i saradnika CLT i TAFI Ag su mereni kod pacijentkinja sa preeklampsijom u toku trudnoće i 6 nedelja posle porođaja, pri čemu nije bilo razlika u odnosu na kontrolnu grupu tokom trudnoće, ali su nađeni znatno produžen CLT i povišeni nivoi TAFI Ag posle porođaja (8).

Rezultati ispitivanja karakteristika i strukture fibrinskih ugrušaka prikazani u doktorskoj disertaciji ukazuju na nepovoljnu strukturu fibrinskih ugrušaka u preeklampsiji. Brže formiranje fibrinskih ugrušaka sastavljenih od tanjih vlakana svojstvo je čvrstih fibrinskih ugrušaka veće gustine koji su relativno otporni na fibrinolizu. Ove protrombotičke strukturne promene fibrinskih ugrušaka opisane su u različitim tromboembolijskim oboljenjima (9), ali ne i u preeklampsiji. Jedina slična studija koja je ispitivala parametre stvaranja fibrina u preeklampsiji nije utvrdila razlike u vrednostima lag faze i maksimalnoj brzini formiranja fibrina između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica, ali su u ovoj studiji umesto trombina korišćene visoke koncentracije TF (10). Međutim, u doktorskoj disertaciji primenom SEM i merenjem srednje vrednosti gustine fibrinske mreže na fotografijama reprezentativnih fibrinskih ugrušaka pokazana je gušća struktura fibrinskih ugrušaka u preeklampsiji.

U doktorskoj disertaciji takođe su prikazani rezultati određivanja markera aktivirane hemostaze i inflamacije, parametara lipidnog statusa i antifosfolipidnih antitela, koji reflektuju kompleksnost i heterogenost ovog poremećaja. Povećana aktivacija intra-vaskularnog sistema koagulacije u preeklampsiji okarakterisana je povišenim nivoima faktora koagulacije, fibrinogena, tkivnog faktora (TF) i vWF Ag, a hiperkoagulabilnom stanju doprinosi i smanjenje koncentracije antikoagulantnih proteina, naročito antitrombina (AT) (11). U doktorskoj disertaciji, u skladu sa prethodnim istraživanjima, potvrđena je značajno snižena aktivnost AT u preeklampsiji u poređenju sa normalnom trudnoćom, kao i porast aktivnosti AT posle porođaja preeklamptičnih trudnica. Snižena aktivnost AT u preeklampsiji povezuje se sa povećanim stvaranjem TAT kompleksa, koji se smatra *in vivo* markerom stvaranja trombina. Povišene vrednosti TAT u preeklampsiji opisane su ranije, ali u pojedinim studijama, uključujući i doktorsku disertaciju, nisu nađene razlike u vrednostima TAT između preeklamptičnih i zdravih trudnica (11,12). Prikazani rezultati su u skladu sa nalazima Hayashi i saradnika koji su merili TAT kod trudnica sa preeklampsijom pre porođaja, 1. i 10. dana posle porođaja carskim rezom i nisu našli razliku između vrednosti TAT u preeklampsiji i normalnoj trudnoći, ali su uočili značajno sniženje TAT posle porođaja (13). Međutim, rezultati doktorske disertacije su, posle isključivanja trudnica na terapiji LMWH, pokazali statistički značajno veće vrednosti TAT u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću, ali nije bilo promena u analizi rezultata posle porođaja. Koncentracije D-dimera i fibrinogena nisu se razlikovale između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica, ali je kod preeklamptičnih trudnica posle porođaja uočen značajan porast koncentracije za oba parametra, što je utvrđeno i u ranijim istraživanjima (14). Pojačan inflamatorni odgovor, koji

je isto tako odlika normalne trudnoće, u preeklampsiji je dodatno povećan. Reaktanti akutne faze, FVIII i CRP, povišeni su u preeklampsiji, pri čemu posle porođaja dolazi do dodatnog porasta aktivnosti FVIII i koncentracije CRP (15). Rezultati doktorske disertacije potvrđuju prethodne nalaze.

U normalnoj trudnoći kao posledica povećanih metaboličkih zahteva prisutna je i hiperlipidemija u kojoj dolazi do povećanja svih parametara lipidnog statusa, uključujući i HDL holesterol za koji se smatra da ima ateroprotektivnu ulogu (16). Međutim, u preeklampsiji izmenjen lipidni profil okarakterisan je dodatnim povećanjem koncentracije triglicerida, ali i sniženom koncentracijom HDL holesterola u poređenju sa normalnom trudnoćom. Kod preeklamptičnih trudnica posle porođaja prisutne su značajno snižene vrednosti HDL i ukupnog holesterola i triglicerida (17). U pogledu vrednosti parametara lipidnog statusa rezultati doktorske disertacije potvrđuju ranije objavljene nalaze. Osim toga, značajna povezanost ukupnog i LDL holesterola, kao i triglicerida sa proteinurijom u preeklampsiji u skladu je sa ranijim nalazima da su glomerularne lezije, odnosno prisustvo akutne ateroze, povezani sa proteinurijom koja je prediktivni indikator težine poremećaja (18). Studije, koje su se bavile određivanjem koncentracije Lp(a) u preeklampsiji, pokazale su različite rezultate. Povećane koncentracije Lp(a) povezane su sa procesom ateroskleroze, a utvrđeno je i da Lp(a), zbog sličnosti u strukturi sa plazminogenom, deluje protrombotički. Takođe, Lp(a) je reaktant akutne faze (19). U doktorskoj disertaciji nije uočena razlika između vrednosti Lp(a) u preeklampsiji i normalnoj trudnoći, ali su posle isključivanja trudnica sa preeklampsijom na profilaksi sa LMWH nađene značajno povišene vrednosti kod preeklamptičnih trudnica u odnosu na zdrave trudnice. Kod trudnica sa preeklampsijom posle porođaja utvrđeno je značajno povećanje koncentracije Lp(a), koje je ostalo značajno i posle isključivanja trudnica na profilaktičkoj dozi LMWH. Ovi rezultati zajedno sa nađenom direktnom korelacijom između koncentracije Lp(a) i proteinurije sugerišu povezanost povišenih koncentracija Lp(a) sa povećanim inflamatornim odgovorom i oštećenjem endotela, supresijom fibrinolize, kao i postojanjem aterosklerotskih lezija.

Povećan titar antifosfolipidnih antitela u preeklampsiji, pre svega antikardiolipinskih antitela, prethodno je utvrđen u preeklampsiji, mada povezanost antifosfolipidnih antitela sa preeklampsijom nije pokazana u pojedinim studijama (20). U većini pomenutih studija lupus antikoagulans nije određivan, kao što je to slučaj i u doktorskoj disertaciji. Prikazani rezultati, u skladu sa nalazima Lee i saradnika koji takođe nisu određivali lupus antikoagulans, nisu pokazali povezanost između prisustva antifosfolipidnih antitela i preeklampsije, mada su

primenjeni striktniji kriterijumi za evaluaciju rezultata određivanja antifosfolipidnih antitela u odnosu na studiju pomenutih autora (21).

U doktorskoj disertaciji ispitivana je i povezanost prethodno navedenih parametara sa karakteristikama i ishodima preeklampitične trudnoće. S obzirom da se rana forma preeklampsije, kod koje se sindrom manifestuje pre 34. nedelje gestacije, povezuje sa težim kliničkim manifestacijama, većim rizikom od nastanka maternalnih i perinatalnih komplikacija, lošijim ishodima trudnoće, kao i većim rizikom od nastanka KVB kasnije tokom života, u doktorskoj disertaciji poređene su vrednosti ispitivanih parametara između rane i kasne forme preeklampsije (22). Statistički značajne razlike uočene su samo u vrednostima ETP, koje su bile više u grupi sa ranom formom, što može da sugeriše nepovoljan kardiovaskularni fenotip kod ovih žena. U grupi preeklampitičnih trudnica sa komplikacijama nađene su niže vrednosti AT u odnosu na grupu kod koje nije došlo do razvoja komplikacija u toku hospitalizacije. Značajan pad nivoa AT povezan je sa pojavom maternalnih komplikacija u preeklampsiji i može da ukaže na pogoršanje koje zahteva prekid trudnoće, kao i na razvoj teškog oblika HELLP sindroma ukoliko je snižavanje nivoa AT udruženo sa smanjenjem broja trombocita (23,24). Daljom analizom kod preeklampitičnih trudnica sa renalnim komplikacijama, odnosno proteinurijom i edemima koji su povezani sa nefrotskim sindromom, uočeno je povećano stvaranje, kao i postizanje maksimalnih koncentracija trombina, praćeno i povećanjem vrednosti D-dimera. ROC analizom pokazano je da je visina pika bolji marker renalnih komplikacija od vrednosti ETP. Nefrotski sindrom je praćen hiperkoagulabilnim stanjem, te se njegova pojava u trudnoći smatra indikacijom za antenatalnu tromboprolifaktičku terapiju (25). He i saradnici su utvrdili snižene nivoe D-dimera kod preeklampitičnih trudnica sa težinom novorođenčeta manjom za gestacionu starost (*engl.* Small for Gestational Age – SGA) i sugerisali da su one posledica smanjene fibrinolitičke aktivnosti uzrokovane placentalnom insuficijencijom (26). U skladu sa pomenutim nalazima u doktorskoj disertaciji pokazane su snižene vrednosti D-dimera u grupi trudnica sa fetalnim komplikacijama, kao i u podgrupi sa zastojem u rastu ploda. U podgrupi sa oligohidramnionom uočene su smanjene vrednosti OFP, koje se takođe mogu povezati sa placentalnom insuficijencijom. Za razliku od studije Erez i saradnika koji su pokazali povezanost oligohidramniona sa trombotičkom vaskulopatijom i povećanim stvaranjem trombina *in vivo*, u doktorskoj disertaciji nisu utvrđene razlike u vrednostima ETP parametara, niti parametara fibrinskog ugruška između preeklampitičnih trudnoća sa i bez prisustva oligohidramniona (27). Međutim, u doktorskoj disertaciji ispitanice su bile trudnice

sa dijagnostikovanom preeklampsijom, dok su u pomenutoj studiji ispitivanu populaciju činile sve trudnice kod kojih je došlo do prevremenog porođaja.

Korelacionom analizom utvrđena je povezanost između vrednosti AT i Apgar skora u 1. i 5. minutu što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja koja su pokazala da koncentracija AT korelira sa težinom maternalnih komplikacija, kao i da primena AT koncentrata kod preeklampsičnih trudnica dovodi do poboljšanja kliničkih simptoma, produženja trajanja trudnoće i smanjenja broja novorođenčadi sa veoma malom telesnom masom (23,28). S druge strane direktna korelacija između koncentracije ukupnog i LDL holesterola i Apgar skora u 1. i 5. minutu može se smatrati potvrdom da je izmenjen lipidni profil neophodan za normalan ishod trudnoće i rast fetusa, dok inverzna korelacija koncentracije CRP sa vrednostima Apgar skora u 1. i 5. minutu sugerise da stepen inflamacije utiče na ishod trudnoće. Inverzna korelacija između vrednosti ETP i Apgar skora u 5. minutu je u skladu sa nalazom o značajno povišenim vrednostima ETP u podgrupi trudnica sa ranom formom preeklampsije, koja je okarakterisana težim kliničkim simptomima, većim rizikom od nastanka maternalnih i perinatalnih komplikacija i lošijim ishodima trudnoće, što može da rezultuje nižim vrednostima Apgar skora (22).

Ekstracelularne vezikule predmet su istraživanja brojnih studija, kako zbog ispitivanja njihovih fizioloških funkcija, tako i uloge u različitim poremećajima. Pokazano je da EV ispoljavaju prokoagulantni i proinflamatorni efekat, kao i da dejstvom na endotelne ćelije i ćelije glatkih mišića utiču na vazomotornu reaktivnost i angiogenezu (29). Zbog značajne uloge u aktivaciji sistema koagulacije i inflamaciji, u doktorskoj disertaciji ispitivane su subpopulacije EV koje na svojoj površini ekspimiraju fosfatidilserin (PS) i njihova povezanost sa prethodno opisanim parametrima. Iako je u najvećem broju prethodnih studija za detekciju PS korišćen aneksin V, u doktorskoj disertaciji primenjen je laktadherin koji je osetljiviji i efikasnije vezuje PS nezavisno od koncentracije kalcijuma (30).

Rezultati prethodnih studija koje su ispitivale koncentraciju i prisustvo različitih fenotipova EV u normalnoj trudnoći i preeklampsiji pokazuju veliku heterogenost kako zbog razlike u primenjenoj metodologiji tako i zbog neusaglašenih kriterijuma za postavljanje dijagnoze preeklampsije (31,32). Povezanost različitih subpopulacija EV sa preeklampsijom i njenim karakteristikama i dalje predstavlja predmet debate. U studijama u kojima je kao marker ekspresije PS korišćen aneksin V pokazane su snižene, nepromenjene i povišene koncentracije ukupnih PS+ EV (32). U doktorskoj disertaciji nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji PS+ EV između trudnica sa preeklampsijom i kontrolne grupe, ali je kod preeklampsičnih trudnica posle porođaja pokazano značajno povećanje koncentracije PS+

EV. S obzirom da je aneksin V korišćen kao marker ekspresije PS u svim studijama koje nisu našle razliku u PS+ EV između preeklampsične i normalne trudnoće, a u nekim od njih ni između trudnoće komplikovane zastojem u rastu ploda i normalne trudnoće, u prilog nalaza doktorske disertacije prikazani su i rezultati Freeman i saradnika (33,34). Za određivanje ukupnih PS+ EV autori su koristili aneksin V u testu protrombinaze, kojim se EV detektuju preko njihove sposobnosti da stimulišu prevođenje protrombina u trombin, čime se pruža uvid i u prokoagulantna svojstva PS+ EV. U doktorskoj disertaciji uočena je inverzna korelacija PS+ EV sa OHP, OCP i parametrima fibrinskog ugruška što je neočekivan nalaz, ali su prikazani rezultati u skladu sa rezultatima Mobarezz i saradnika, koji su utvrdili inverznu korelaciju koncentracije EV sa čvrstinom fibrinskog ugruška i sugerisali da se EV ugrađuju u strukturu fibrinskog ugruška (35). Međutim, kod preeklampsičnih trudnica posle porođaja zabeležen je značajan porast koncentracije EV, bez promena u vrednostima OHP, OCP, Vmax i Max Abs, te je ukazano na mogući dodatni antikoagulantni efekat visokih nivoa PS+ TF+ EV preko aktivacije proteina C (APC) trombomodulinom (TM). TM, čiji nivo značajno raste u preeklampsiji usled oštećenja endotela, inhibira prokoagulantno dejstvo trombina i ubrzava aktivaciju proteina C (36).

I u pogledu EV koje su poreklom od trombocita u literaturi postoje oprečni podaci. Povišeni nivoi trombocitnih EV, koje su i najbrojnija subpopulacija EV u plazmi, opisani su u patološkim stanjima povezanim sa povećanim rizikom od nastanka tromboembolijskih događaja, uključujući i preeklampsiju (37). U doktorskoj disertaciji utvrđene su značajno povišene koncentracije PS+ CD42a+ EV u preeklampsiji, i pre i posle porođaja, ali bez značajnih korelacija sa parametrima globalnih testova hemostaze i fibrinskog ugruška. Aleman i saradnici su pokazali da trombocitne EV značajno doprinose generaciji trombina i formiranju fibrina, odnosno ispoljavaju protrombotički efekat posle prethodne inicijacije koagulacije, ali ne utiču na strukturu i gustinu fibrinske mreže (38). CD42a kao marker trombocita nije korišćen u prethodnim studijama u kojima je vršena fenotipizacija EV u preeklampsiji.

Iako je diseminovana endotelna disfunkcija glavno obeležje preeklampsije i očekivane su povišene vrednosti endotelnih EV, u literaturi takođe postoje velike varijacije u rezultatima studija koje su ispitivale zastupljenost ovih EV u preeklampsiji (32). U doktorskoj disertaciji koncentracije PS+ CD62E+ EV nisu se razlikovale između preeklampsične i zdrave trudnoće, ali je kod trudnica sa preeklampsijom posle porođaja zabeležena značajno veća koncentracija u poređenju sa koncentracijom pre porođaja. Korelaciona analiza pokazala je povezanost PS+ CD62E+ EV i ETP, ali tek posle kontrole uticaja maternalne starosti i ITM. Sa druge strane,

koncentracija PS+ EV koje na svojoj površini ispoljavaju VCAM-1 (engl. vascular cell adhesion molecule-1), marker aktiviranih endotelnih ćelija, značajno je povišena u preeklampsiji i pre i posle porođaja. PS+ VCAM-1+ EV nađene su u vaskularnim i inflamatornim oboljenjima, ali do sada nisu određivane u preeklampsiji (39,40). Povećane koncentracije solubilne forme VCAM-1 u preeklampsiji dovode se u vezu i sa akutnom aterosom koja je prisutna kod nekih trudnica sa preeklampsijom (41). Posle kontrole uticaja maternalne starosti i ITM, prethodno utvrđena korelacija PS+ VCAM-1+ EV i aktivnosti FVIII nije više bila značajna.

Prethodna istraživanja pokazala su da EV koje istovremeno ispoljavaju PS i TF imaju najveću prokoagulantnu aktivnost, ali i da njihova koncentracija nije povišena u preeklampsiji (42,43). Rezultati doktorske disertacije potvrđuju ove nalaze, međutim posle porođaja zabeležen je značajan porast PS+ TF+ EV. Takođe, utvrđena je i povezanost PS+ TF+ EV sa parametrima OHP testa i fibrinskog ugruška što se može dovesti u vezu sa ranije potvrđenim trombogenim dejstvom TF ispoljenog na EV (44).

Dalja fenotipizacija EV u doktorskoj disertaciji uključila je određivanje PIGF+ EV koje do sada nisu proučavane u preeklampsiji. Poremećaj ravnoteže angiogenih faktora, koji se smatra i uzrokom maternalnog sindroma u preeklampsiji, okarakterisan je sniženom koncentracijom sPIGF usled vezivanja za solubilnu formu fms-sličnih tirozin kinaza receptora 1 (engl. Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 – sFlt-1) čija je koncentracija povišena (45). U doktorskoj disertaciji pokazano je da ne postoje razlike u koncentraciji PIGF+ EV između ispitivanih grupa, ali je utvrđena inverzna korelacija sa brzinom polimerizacije fibrinskog ugruška koja može da sugeriše vezu između oslobađanja placentalnih EV i stvaranja fibrinskih depozita. Nedavni rezultati istraživanja Mitilid-Mork i saradnika, koji su ispitivali povezanost angiogenih faktora i histomorfološkog nalaza placenti, su pokazali postojanje veze između sniženih vrednosti PIGF i povišenih vrednosti sFlt-1 i odnosa sFlt-1/PIGF i prisustva intravilusnih fibrinskih depozita u placenti (46).

Citirana literatura

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005 Feb;365(9461):785–99.
2. Khadijah Ismail S, Higgins J. Hemostasis in Pre-Eclampsia. *Semin Thromb Hemost*. 2011 Mar;37(02):111–7.
3. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006 Nov;96(5):553–61.
4. Rosenkranz A, Hiden M, Leschnik B, Weiss EC, Schlembach D, Lang U, et al. Thrombin generation in women with preeclampsia. *Hamostaseologie*. 2008 Jan;28(S 01):S81-s82.

5. Macey MG, Bevan S, Alam S, Verghese L, Agrawal S, Beski S, et al. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb Res.* 2010 Mar;125(3):e76–81
6. Antovic A. The Overall Hemostasis Potential: A Laboratory Tool for the Investigation of Global Hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Oct;36(07):772–9.
7. Antovic JP, Rafik Hamad R, Antovic A, Blombäck M, Bremme K. Does thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) contribute to impairment of fibrinolysis in patients with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation? *Thromb Haemost.* 2002 Oct;88(4):644–7.
8. Martínez-Zamora MA, Tassies D, Carmona F, Espinosa G, Cervera R, Reverter JC, et al. Clot lysis time and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in severe preeclampsia with or without associated antiphospholipid antibodies. *J Reprod Immunol.* 2010 Nov;86(2):133–40.
9. Undas A. Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders. *Thromb Haemost.* 2014 Jul;112(1):32–42.
10. Haire G, Egan K, Parmar K, McKinnon T, Monteith C, O'Connor H, et al. Alterations in fibrin formation and fibrinolysis in early onset-preeclampsia: Association with disease severity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019 Oct;241:19–23.
11. de Boer K, ten Cate JW, Sturk A, Borm JJJ, Treffers PE. Enhanced thrombin generation in normal and hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Jan;160(1):95–100.
12. Higgins JR, Walshe JJ, Darling MRN, Norris L, Bonnar J. Hemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Aug;179(2):520–6.
13. Hayashi M, Hamada Y, Ohkura T. Thrombin-antithrombin complex and α 2-plasmin inhibitor-plasmin complex levels after cesarean section in normal pregnancies and pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003 Aug;82(2):213–6.
14. Hale SA, Sobel B, Benvenuto A, Schonberg A, Badger GJ, Bernstein IM. Coagulation and fibrinolytic system protein profiles in women with normal pregnancies and pregnancies complicated by hypertension. *Pregnancy Hypertens.* 2012 Apr;2(2):152–7.
15. Dusse LM, Rios DRA, Pinheiro MB, Cooper AJ, Lwaleed BA. Pre-eclampsia: Relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Clin Chim Acta.* 2011 Jan;412(1–2):17–21.
16. Lippi G, Albiero A, Montagnana M, Salvagno GL, Scevarolli S, Franchi M, et al. Lipid and lipoprotein profile in physiological pregnancy. *Clin Lab.* 2007;53(3–4):173–7.
17. Kaaja R. Lipid abnormalities in pre-eclampsia: implications for vascular health. *Clinical Lipidology.* 2011 Feb;6(1):71–8.
18. Airoldi J, Weinstein L. Clinical Significance of Proteinuria in Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2007 Feb;62(2):117–24.
19. Fanshawe AE, Ibrahim M. The current status of lipoprotein (a) in pregnancy: A literature review. *J Cardiol.* 2013 Feb;61(2):99–106.
20. Heilmann L, Schorsch M, Hahn T, Fareed J. Antiphospholipid Syndrome and Pre-Eclampsia. *Semin Thromb Hemost.* 2011 Mar;37(02):141–5.
21. Lee R. Anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein-I antibodies in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003 Aug;102(2):294–300.
22. Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2000 Jan;19(2):221–31.
23. Marietta M, Simoni L, Pedrazzi P, Facchini L, D'Amico R, Facchinetti F. Antithrombin plasma levels decrease is associated with preeclampsia worsening. *Int J Lab Hematol.* 2009 Apr;31(2):227–32.

24. Minakami H, Watanabe T, Izumi A, Matsubara S, Koike T, Sayama M, et al. Association of a decrease in antithrombin III activity with a perinatal elevation in aspartate aminotransferase in women with twin pregnancies: relevance to the HELLP syndrome. *J Hepatol.* 1999 Apr;30(4):603–11.
25. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension.* 2018 Jul;72(1):24–43.
26. He S, Bremme K, Blombäck M. Fibrin d-Dimer Levels in Preeclamptic Pregnancies with Birth of Small-for-Gestational-Age Neonates. *Hypertens Pregnancy.* 1998 Jan;17(2):217–26.
27. Erez O, Romer R, Vaisbuch E, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, et al. Changes in amniotic fluid concentration of thrombin–antithrombin III complexes in patients with preterm labor: Evidence of an increased thrombin generation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 Nov;22(11):971–82.
28. Maki M, Kobayashi T, Terao T, Ikenoue T, Satoh K, Nakabayashi M, et al. Antithrombin therapy for severe preeclampsia: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. BI51.017 Study Group. *Thromb Haemost.* 2000 Oct;84(4):583–90.
29. Aharon A, Brenner B. Microparticles and pregnancy complications. *Thromb Res.* 2011 Feb;127 Suppl 3:S67-71.
30. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-l-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov;1667(1):82–90.
31. Lok CAR, Van der Post JAM, Sturk A, Sargent IL, Nieuwland R. The functions of microparticles in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2011 Jan;1(1):59–65.
32. Alijotas-Reig J, Palacio-Garcia C, Llurba E, Vilardell-Tarres M. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertil Steril.* 2013 Feb;99(2):441–9.
33. Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangesteen R, Schneider F, et al. Shed Membrane Particles from Preeclamptic Women Generate Vascular Wall Inflammation and Blunt Vascular Contractility. *Am J Pathol.* 2006 Oct;169(4):1473–83.
34. Freeman DJ, Tham K, Brown EA, Rumley A, Lowe GD, Greer IA. Fetal corticotrophin-releasing hormone mRNA, but not phosphatidylserine-exposing microparticles, in maternal plasma are associated with factor VII activity in pre-eclampsia. *J Thromb Haemost.* 2008 Mar;6(3):421–7.
35. Mobarrez F, Mikovic D, Antovic A, Antovic JP. Is a decrease of microparticles related to improvement of hemostasis after FVIII injection in hemophilia A patients treated on demand? *J Thromb Haemost.* 2013 Apr;11(4):697–703.
36. Berckmans R, Nieuwland R, Böing A, Romijn F, Hack CE, Sturk A. Cell-derived Microparticles Circulate in Healthy Humans and Support Low Grade Thrombin Generation. *Thromb Haemost.* 2001 Apr;85(4):639–46.
37. Simak J, Gelderman MP. Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially Pathogenic Agents and Diagnostic Markers. *Transfus Med Rev.* 2006 Jan;20(1):1–26.
38. Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability: Differential MP procoagulant activity. *J Thromb Haemost.* 2011 Nov;9(11):2251–61.
39. Radecke C, Warrick A, Singh G, Rogers J, Simon S, Armstrong E. Coronary artery endothelial cells and microparticles increase expression of VCAM-1 in myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2015 May;113(03):605–16.

40. Mobarrez F, Vikerfors A, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Zickert A, Larsson A, et al. Microparticles in the blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE): phenotypic characterization and clinical associations. *Sci Rep*. 2016 Dec;6(1):36025.
41. Chaiworapongsa T, Romero R, Yoshimatsu J, Espinoza J, Kim YM, Park K, et al. Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2002 Jan;12(1):19–27.
42. VanWijk MJ, Boer K, Berckmans RJ, Meijers JCM, van der Post JAM, Sturk A, et al. Enhanced coagulation activation in preeclampsia: the role of APC resistance, microparticles and other plasma constituents. *Thromb Haemost*. 2002 Sep;88(3):415–20.
43. Aharon A, Katzenell S, Tamari T, Brenner B. Microparticles bearing tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in gestational vascular complications. *J Thromb Haemost*. 2009 Jun;7(6):1047–50.
44. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GMT, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost*. 2003 Dec;1(12):2561–8.
45. Staff AC, Benton SJ, von Dadelszen P, Roberts JM, Taylor RN, Powers RW, et al. Redefining Preeclampsia Using Placenta-Derived Biomarkers. *Hypertension*. 2013 May;61(5):932–42.
46. Mitlid-Mork B, Turowski G, Bowe S, Staff AC, Sugulle M. Circulating angiogenic profiles and histo-morphological placental characteristics of uncomplicated post-date pregnancies. *Placenta*. 2021 Jun;109:55–63.

D. Provera originalnosti doktorske disertacije

Provera originalnosti ove disertacije izvršena je na način koji je propisan Pravilnikom o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

Program *iThenticate* je registrovao ukupno 14% poklapanja sa 207 izvora. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je ovaj stepen podudarnosti posledica prethodno objavljenih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz ove disertacije (sa 2 publikovana naučna rada ustanovljeno je poklapanje 1%), korišćenja ličnih imena ili naziva stručnih organizacija i radnih grupa, naziva određivanih analita, reagenasa i primenjenih instrumentalnih i statističkih metoda, kao i navođenja opštih mesta i podataka, rečeničkih konstrukcija i formulacija karakterističnih za naučne i stručne pojmove u oblasti biohemije i medicine i bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi. Preklapanje teksta sa tri doktorske disertacije iz iste naučne oblasti je 1%, dok je sa svim ostalim izvorima manje od 1%.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Sanje Lalić-Ćosić u potpunosti originalna, kao i da su poštovana akademska pravila citiranja.

E. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Preeklampsija je naučestaliya komplikacija trudnoće udružena sa ozbiljnim i dalekosežnim posledicama, kako po majku tako i po plod, i kao takva predstavlja uvek aktuelno teorijsko, kliničko i praktično pitanje u oblasti biohemije i medicine. Iako je preeklampsija jedinstvena za humanu trudnoću, etiologija i patogeneza bolesti su i dalje nerazjašnjene. Kompleksnost i heterogenost poremećaja, nedostatak adekvatnih preventivnih i terapijskih mera, kao i prethodno navedene karakteristike, predstavljaju razloge zbog kojih se preeklampsija već dugi niz godina nalazi u žiži interesovanja naučne zajednice.

Hiperkoagulabilnost u normalnoj trudnoći predstavlja fiziološku adaptaciju, ali se u preeklampsiji hemostatska ravnoteža dodatno pomera ka prokoagulabilnom stanju. S obzirom na ograničenu sposobnost rutinskih skrining testova, kao i pojedinačnih testova hemostaze, u doktorskoj disertaciji primenom globalnih testova hemostaze, endogenog trombinskog potencijala (ETP) i ukupnog hemostatskog potencijala (OHP), potvrđeno je prisustvo aktivirane koagulacije i smanjene fibrinolize, čak i posle porođaja i uprkos završetku trudnoće i pokazano da ovi testovi mogu da se koriste za procenu hemostatskog statusa trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Hiperkoagulabilno stanje u preeklampsiji je okarakterisano značajno povećanim stvaranjem trombina i postizanjem maksimalnih koncentracija trombina, pri čemu posle porođaja dolazi do dodatnog povećanja maksimalnih koncentracija trombina. Kako je rizik od nastanka tromboze u periodu posle porođaja povećan i do 5 puta u odnosu na period trudnoće, naročito ukoliko je trudnoća završena carskim rezom, nalaz značajno povećanih vrednosti visine pika kod preeklamptičnih trudnica posle porođaja navodi na zaključak da je visina pika, odnosno maksimalna koncentracija trombina stvorena u ETP testu, bolji pokazatelj hiperkoagulabilnog stanja u odnosu na ETP vrednosti. Tome značajno doprinosi i smanjena fibrinolitička aktivnost potvrđena u OHP testu. Supresija fibrinolize okarakterisana je značajno sniženim OFP vrednostima i produženim vremenom lize ugruška (CLT) u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću, a dodatno sniženje OFP vrednosti kod preeklamptičnih trudnica posle porođaja sugerise da je postpartalni poremećaj fibrinolize u preeklampsiji najmanje u istom obimu kao i pre porođaja, ako ne i izraženiji. Dodatkom specifičnog TAFI-inhibitora (PTCI) utvrđeno je značajno skraćivanje CLT vrednosti kod trudnica sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice, što se zajedno sa značajnom korelacijom između Δ CLT i OFP može smatrati implikacijom da je dodatno smanjenje fibrinolize u preeklampsiji bar delimično posledica dejstva TAFI, pogotovo u svetlu prethodno opisanih rezultata o prekomernom stvaranju trombina u

preeklampsiji koje može da rezultuje aktivacijom TAFI. Pored toga, nepovoljna struktura i karakteristike fibrinskih ugrušaka koji se mogu dovesti u vezu sa povećanom otpornošću na fibrinolizu posebno doprinose poremećaju i favorizuju poremećaj hemostaze u preeklampsiji. Poremećena struktura fibrinskih ugrušaka kod trudnica sa preeklampsijom, kao i povezanost parametara koji je karakterišu sa ostalim ispitivanim parametrima je nov i značajan nalaz s obzirom da povećano intra- i perivaskularno formiranje fibrinskih depozita, posebno na nivou placente i bubrega, predstavlja značajno obeležje preeklampsije. Povećano stvaranje trombina, inhibirana fibrinoliza i izmenjena svojstva fibrinskih ugrušaka sigurno predstavljaju opterećenje koje doprinosi riziku od razvoja tromboze i kardiovaskularnih bolesti (KVB), kasnije u toku života. Kako ETP odražava kapacitet za stvaranje trombina i povećane ETP vrednosti ukazuju na tendenciju ka trombozi, nalaz značajno povišenih vrednosti ETP kod preeklampsijom trudnica kod kojih je došlo do razvoja rane forme preeklampsije koja se povezuje sa težim kliničkim simptomima, većim rizikom od nastanka maternalnih i perinatalnih komplikacija, kao i lošijim ishodima trudnoće, sugerišu na mogućnost da nađene razlike predstavljaju stratifikaciju rizika (rana forma PEK > kasna forma PEK > normalna trudnoća), što svakako zahteva dalje izučavanje.

U pogledu maternalnih komplikacija u preeklampsiji nalaz povišenih vrednosti ETP, visine pika i D-dimera kod preeklampsijom trudnica sa renalnim komplikacijama može se dovesti u vezu sa povećanim rizikom od tromboze u ovoj podgrupi, mada precizne kliničke implikacije ovih razmatranja tek treba da se ispituju. Kod ovih trudnica primenom ROC analize pokazano je i da je visina pika bolji marker renalnih komplikacija u odnosu na ETP.

Značajan nalaz ove doktorske disertacije svakako predstavlja i nalaz povećanih koncentracija trombocitnih PS+ CD42a+ EV i endotelnih PS+ VCAM-1+ EV koje dosada nisu ispitivane u preeklampsiji. Da bi se potpuno ispitala potencijalna uloga ovih EV u preeklampsiji svakako će biti potrebna dalja istraživanja. Iako nisu utvrđene razlike u koncentraciji PS+ EV i PS+ TF+ EV između preeklampsijom i zdravih trudnica njihova inverzna povezanost sa OHP parametrima i karakteristikama fibrinskog ugruška može da sugerise uključivanje EV u intravaskularno taloženje fibrina, što zajedno sa nepovoljnom strukturom fibrinskih ugrušaka u preeklampsiji i povećanom koncentracijom PS+ VCAM-1+ EV koja zaostaje i posle porođaja može da poveća kardiovaskularni rizik. Osim toga pomenute korelacije mogu se smatrati dodatnom potvrdom da TF ispoljen na EV, a koji predstavlja funkcionalni TF u krvi, ima trombogeno dejstvo i doprinosi propagaciji tromba na mestu vakularne povrede. S obzirom da se PIGF smatra najosetljivijim prediktorom preeklampsije i intrauterusnog zastoja u rastu od bilo kog drugog pojedinačnog biomarkera u

doktorskoj studiji ispitivane su i PIGF+ EV koje nisu proučavane ni u jednoj do sada objavljenoj studiji. Iako nije bilo razlike u koncentraciji PIGF+ EV između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica, kao ni između vrednosti pre i posle porođaja preeklamptičnih trudnica, PIGF+ EV su pokazale značajnu inverznu korelaciju sa parametrima fibrinskog ugruška, tj. moguć doprinos snižene koncentracije ovih EV formiranju fibrinskih depozita. Jasan zaključak o navedenim nalazima i moguće implikacije tek treba da se utvrde u budućim istraživanjima.

F. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

- **Lalic-Cosic S, Dopsaj V, Kovac M, Mandić-Marković V, Mikovic Z, Mobarrez F, Antovic A. Phosphatidylserine Exposing Extracellular Vesicles in Pre-eclamptic Patients. Front Med. 2021;8:761453. doi:10.3389/fmed.2021.761453 M21; IF 5,093 (2020); Rang časopisa 28/169 u kategoriji Medicine, General & Internal; Article (originalan naučno-istraživački rad)**
- **Lalic-Cosic S, Dopsaj V, Kovac M, Pruner I, Littmann K, Mandic-Markovic V, Mikovic Z, Antovic A. Evaluation of global haemostatic assays and fibrin structure in patients with pre-eclampsia. Int J Lab Hem. 2020;42:322–30. doi: 10.1111/ijlh.13183. M23; IF 2,877 (2020); Rang časopisa 51/76 u kategoriji Hematology; Article (originalan naučno-istraživački rad)**

Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima

- **Lalic-Cosic S, Antovic A, Kovac M, Pruner I, Mandic V, Mikovic Z, Dopsaj V. Assessment of hypercoagulable state in patients with preeclampsia using global haemostatic assays. Book of abstracts p 269; P247. European congress of thrombosis and hemostasis ECTH, 2018; 24.-26.10.2018. Marseille, France. **Poster presentation (posterska prezentacija)****
- **Lalic-Cosic S, Dopsaj V, Kovac M, Pruner I, Mandic V, Mikovic Z, Antovic A. Two global haemostatic assays in assessing hypercoagulable state in patients with preeclampsia. P 1803. 51th Nordic Coagulation Meeting, 2018; 06.-08.09.2018. Stockholm, Sweden. **Poster presentation (posterska prezentacija)****

Saopštenje na domaćim naučnim skupovima sa međunarodnim učešćem

- **Sanja Lalić-Ćosić**, Violeta Dopsaj, Aleksandra Antović. Assessment of hypercoagulable state in normal pregnancy and preeclampsia using global haemostatic assays. 15th Belgrade Symposium for Balkan Region, Neighboring Countries: The Same Professional Aim, 2019; 11.-12.04.2019. Belgrade, Serbia. J Med Biochem 2019;38(2):219. **Plenary lecture (plenarno predavanje)**

G. Mišljenje i predlog

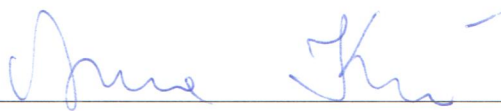
Na osnovu izloženog može se zaključiti da rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji kandidata dipl.farm.-med.biohemičara Sanje Lalić-Ćosić predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Rezultati su publikovani u vidu 2 rada u međunarodnim časopisima, 2 posterske prezentacije na međunarodnim naučnim skupovima i usmenog izlaganja na domaćem naučnom skupu sa međunarodnim učešćem.

S obzirom na ograničenu sposobnost rutinskih skrining testova, kao i pojedinačnih testova hemostaze, u doktorskoj disertaciji empirijski je potvrđena pretpostavka o mogućnostima unapređivanja različitih metoda za ispitivanje hiperkoagulabilnosti čime se otvara prostor za novi i drugačiji pogled na različite mogućnosti ispitivanja ovog problema u preeklampsiji. U ovakvom pristupu istraživanju ogleđa se najznačajniji doprinos ove doktorske disertacije, koja prepoznaje i naglašava složenost problema ispitivanja markera hiperkoagulabilnosti i globalnih hemostatskih testova u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom. Ovo se reflektuje kroz teorijsku utemeljenost, postavljene ciljeve i primenjene metode istraživanja, kao i kritičku analizu i interpretaciju dobijenih rezultata. Disertacija je ukazala na nove aspekte sagledavanja problema preeklampsije i primene dijagnostičkih metoda i procedura i veoma je podsticajna za buduća empirijska istraživanja.

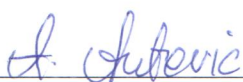
Na osnovu izloženog, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju kandidata dipl.farm.-med.biohemičara Sanje Lalić-Ćosić i predlaže Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „Ispitivanje značaja markera hiperkoagulabilnosti i globalnih hemostatskih testova u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom“.

U Beogradu, 10.05.2022. godine

Članovi komisije:



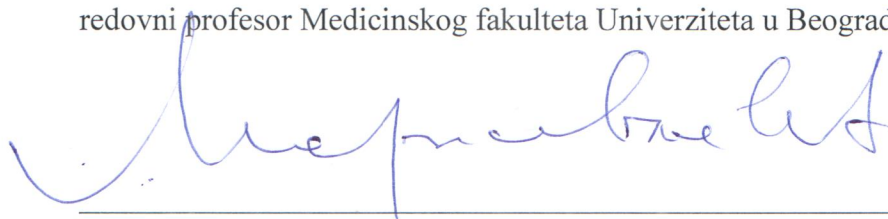
Dr sc. Mirjana Kovač,
viši naučni saradnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



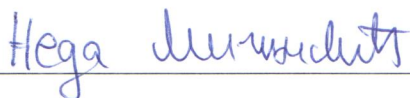
Dr sc. Aleksandra Antović,
vanredni profesor na odseku za medicinu Karolinska Instituta u
Štokholmu, Švedska



Dr sc. Željko Miković,
redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Dr sc. Dragomir Marisavljević,
redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Dr sc. Neda Milinković,
docent Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu