

На 22. седници Наставно-научног већа ВМА, одржаној 25. 09. 2014. год. одређена је комисија за оцену готове докторске тезе пп. асист. мр сц. мед. **Данета Ненадића** из Центра за гинекологију и хуману репродукцију ВМА чија тема гласи:

„БРОЈ И ВИЈАБИЛНОСТ ВАГИНАЛНИХ ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРА КАО ПОКАЗАТЕЉ РИЗИКА ЗА ПРЕВРЕМЕНИ ПОРОЂАЈ”

После увида у достављени материјал и разговора са кандидатом, комисија у саставу: проф. др сц. мед. Жељко Миковић, Медицински факултет Универзитета у Београду; Бригадни генерал академик Миодраг Чолић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; проф. др сц. мед. Дарко Плећаш, Медицински факултет Универзитета у Београду; проф. др сц. мед. Слободанка Ђукић, Медицински факултет Универзитета у Београду; проф. др сц. мед. Жељка Татомировић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација је написана на 413 страна текста и подељена је на следећа поглавља: УВОД (34 стране), ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (2 стране), МЕТОД РАДА И ИСПИТАНИЦИ (50 страна), РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА СА ПРИЛОЗИМА (250+30 страна), ЗАКЉУЧАК (2 стране) и ЛИТЕРАТУРА (45 страна). Документована је са 149 оригиналних микроскопских фотографија, 107 табела и 43 графикона. У раду је цитирано 566 литературних података.

2. Увод, хипотеза и циљеви истраживања

Тема истраживања је употребљивост метода одређивања броја и вијабилности вагиналних полиморфонуклеара (ПМН) као показатеља ризика за превремени порођај (ПП), а у контексту микроскопске процене квантитативних и квалитативних промена вагиналне флоре, концентрација Th1 (IL-2, IFN- γ и IL-12p70), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), Th17 (IL-17A, IL-22), Th9 (IL-9), имунорегулаторних (IL-10) и проинфламацијских цитокина (IL-1 β и TNF α) и мерења дужине грлића материце.

У Уводу др Ненадић дефинише појам ПП који представља највећи проблем савремене перинатологије јер се његова учесталост није променила задњих 40 година тако да ПП и даље остаје главни узрок перинаталног морбидитета и морталитета. Етиологија ПП је мултифакторијална али је инфекција/запаљење једини фактор за који је утврђена каузална повезаност са ПП, што је потврђено клиничким и експерименталним испитивањима. Квантитативне и квалитативне промене вагиналне микрофлоре су почетни и најважнији догађај у етиопатогенези ПП удруженог с инфекцијом. Зато кандидат прво указује да на основу тренутних клиничких, микроскопских, микробиолошких и молекуларнобиолошких налаза и дијагностичких критеријума код значајног броја трудница још увек не можемо повући јасну границу између физиолошке и патолошке микрофлоре вагине. Сматрајући промене у вагиналној микрофлори примарним, (узрочним) фактором, а друге испитиване параметре као што су број, вијабилност и апоптоза вагиналних ПМН и концентрације цитокина секундарним (последичним) факторима, кандидат велики део ове докторске тезе у методолошком, теоретском и клиничком приступу усмерава на покушаје да се микроскопским прегледом препарата вагиналног секрета бојеног по Gramu прецизније дефинишу квалитативни и квантитативни односи вагиналне микробне заједнице. Образлажући недостатке тренутних дијагностичких критеријума (Nugent, Amsel, Ison/Hay, Clays) кандидат указује на потребу за преиспитивањем вредности тренутних дијагностичких критеријума као и потребу за успостављањем нових који би могли прецизније да дефинишу број, однос и врсте различитих бактеријских и небактеријских ћелијских морфотипова на микроскопском препарату вагиналног секрета. Такав став подржавају резултати молекуларнобиолошких студија који су показали да је вагинални микробиом много сложенији него што се то претпостављало, тренутни дијагностички златни стандард (критеријуми по Nugent) разликује само три бактеријска морфотипа (*Lactobacilli*, *Bacteroides*, *Mobiluncus*), а поремећаји вагиналне флоре су сведени на бактеријску вагинозу (БВ), вагиналну кандидозу и трихомонозу. Квантитативни односи између појединих чланова вагиналне флоре кључни су фактор у разликовању нормалне од патолошке флоре. Нажалост, ниједан од постојећих критеријума не одражава квантитет и односе између различитих бактеријских морфотипова.

Промене вагиналне микрофлоре могу да доведу до активације ПМН, а они даље утичу на започињање, ток, тип и исход инфекције и запаљењског одговора. Препознавање патогена и везивање за „узбуњивачке“ рецепторе (TLR, engl. *toll-like receptors*) који препознају молекуларне обрасце типичне за микроорганизме, доводи до активације

унутарћелијских сигналних путева, експресије група гена и ослобађање бројних прозапаљењских медијатора, међу којима цитокини имају веома важну улогу. Th1 цитокини би могли да буду један од предиктивних фактора ПП удруженог са инфекцијом, док би Th2 цитокини и имунорегулаторни IL-10 требало да имају повољне ефекте на ток и исход трудноће. Подаци о улози Th9 и Th17 цитокина у патогенези вагиналних инфекција и утицају на исход трудноће су веома оскудни. Цитокини, поред стимулације локалног имунског система, ангажују и системске имунске ћелије и покрећу запаљење у којем долази до повећане продукције простагландина који могу довести до промена у цервиксу, активације феталних мембрана, утериних контракција и последичног ПП. Кандидат нам даље представља факторе и комплексне сигнале који контролишу програмирану ћелијску смрт неутрофила. Поред оних који зависе од домаћина и околине (генетски, епигенетски), локалних концентрација цитокина и других проинфламацијских и антиинфламацијских медијатора, односно проапоптотских и антиапоптотских протеина, кандидат посебно истиче способност различитих микроорганизама и њихових метаболитских продуката да утичу на животни век ПМН. Тако преминација лактобацила има проапоптогене ефекте, док у условима инфекције/запаљења долази не само до повећања броја ПМН него и продужења њиховог животног века јер је то од кључног значаја за ефикасан исход у борби против патогена. Међутим прекомерно продужавање века ПМН одлагањем апоптозе узроковано неким микроорганизмом довешће до продуженог и прекомерног запаљенског одговора и оштећења ткива, односно покретања ПП.

У делу који се односи на број ПМН указује се на изненађујуће мали број студија у којима се помиње број вагиналних ПМН, а који се односе на вагиналне инфекције и/или ПП. Зато већ и летимичан поглед на студије које се баве квантификацијом или семиквантификацијом вагиналних ПМН указују на велике разлике у дефинисању нормалног и патолошког броја ПМН на микроскопским увећањима x400 и x1000. Зато кандидат указује на потребу упоредних семиквантитативних и квантитативних метода, стандардизацију методолошких критеријум који би обезбедили упоредивост будућих студија и прецизнију границу између нормалног и патолошког броја ПМН у вагиналном секрету, што би омогућило бољу процену њиховог значаја и улоге у збивањима везаним како за термински тако и за претермински порођај. Један од објективних параметара за предвиђање ПП је ултразвучно одређивање дужине грлића материце и кандидат нам у завршном делу Увода представља податке везане за трансвагиналну сонографију и однос

података добијених ултразвучним прегледом и броја ПМН у сврху прецизнијег предвиђања ПП.

Из свега наведеног кандидат је поставио **хипотезе**:

1. Нови метод микроскопског прегледа препарата вагиналног секрета бојеног по Gramu на увећању x200 омогућава прецизније одређивање броја и врста ћелијских морфотипова у односу на тренутне методе на микроскопским увећањима x400 (Amsel) и x1000 (Nugent, Ison/Hay и Claeys), а тиме боље резултате у процени стања вагиналне флоре и ризика од ПП.
2. Повећано преживљавање вагиналних ПМН, због смањене апоптозе код трудница између 24. и 28. недеље трудноће, позитивно корелише са присуством вагиналне инфекције и/или запаљења, концентрацијама прозапаљењских цитокина (IL-1 β и TNF α) и локалног Th17 (IL-17A, IL-22) и Th9 (IL-9) имунског одговора, а у негативној је корелацији са нивоом имунорегулаторног цитокина IL-10.
3. Методологија семиквантитативног одређивање броја ПМН на препарату бојеном по Gramu и микроскопском увећању x200 је бољи метод у процени броја ПМН у брису вагиналног секрета од семиквантитативних метода на увећањима x400 и x1000 и две квантитативне методе.
4. Број и вијабилност вагиналних ПМН бољи су показатељи ризика за ПП од дијагностикованих поремећаја вагиналне флоре, концентрације испитиваних цитокина и дужине грлића материце

За проверу хипотеза кандидат је дефинисао **циљеве истраживања**:

1. На основу налаза новог метода микроскопског прегледа препарата вагиналног секрета бојеног по Gramu на увећању x200 и семиквантитативне процене присуства, броја и односа различитих бактеријских морфотипова, предложити нову класификацију вагиналне микрофлоре и упоредити је са постојећим дијагностичким критеријумима и поделама по Amsel-у, Nugent-у, Ison/Hay-у и Claeys-у.
2. Утврдити и упоредити број ПМН у вагиналном секрету трудница између 24. и 28. недеље трудноће помоћу семиквантитативних метода на микроскопским увећањима x200, x400 и x1000 и две квантитативне методе.

3. Утврдити и упоредити вијабилност, апоптозу и број вагиналних ПМН добијен различитим квантитативним и семиквантитативним методама.
4. Утврдити повезаност између степена апоптозе вагиналних ПМН и група пацијенткиња са различитим стањима вагиналне микрофлоре дефинисаних на основу стандардних и новопредложених критеријума.
5. Измерити концентрације Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-12p70), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), Th17 (IL-17A, IL-22), Th9 (IL-9), проинфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF α) и имунорегулаторног IL-10.
6. Утврдити међусобну повезаност броја, вијабилности и апоптозе вагиналних ПМН са концентрацијама испитиваних цитокина и резултатима микроскопских испитивања препарата вагиналног секрета и ултразвучног мерења дужине грлића материце.
7. Утврдити међусобну повезаност броја, вијабилности и апоптозе вагиналних ПМН, концентрација испитиваних цитокина, резултата микроскопских испитивања препарата вагиналног секрета и ултразвучног мерења дужине грлића материце са учесталашћу ПП у испитиваној популацији трудница.

У поглављу **Метод рада и испитанице** представљен је дизајн истраживања-тип студије: Проспективна клиничка студија у оквиру једног центра.

Ова докторска дисертација је израђена у Центру за гинекологију и хуману репродукцију ВМА, а анализом су обухваћене 732 труднице између 24. и 28. недеље трудноће. Свим пацијенткињама преглед је био заказиван 1-2 месеца унапред и све труднице су биле без знакова и симптома ПП или других тегоба. Нису биле укључене труднице млађе од 18 и старије од 40 година, труднице са вишеструком трудноћом, анормалијама материце, претходном конизацијом, као ни оне које су већ имале један или више ПП. Испитанице нису користиле било какву терапију 2 недеље, нити су имале сексуалних односа 7 дана пре узимања узорка. Одређиван је рН вагиналног секрета, а учињена је проба са 10% КОН. Узорак за одређивање концентрације цитокина узиман је тако што је дакронски штапић остављан у цервикалном каналу око 1 минут. Брис на културу узиман је истим штапићем из грлића и вагине а култивација и идентификација обављена је на култури крвног агра. Рађен је и цервикални брис за одређивање присуства *M. hominis*, *U. urealyticum* и *C. trachomatis*. Из брисева са бочног вагиналног зида су прављени размази на микроскопској плочици за нативни препарат и препарате бојене по Gramу, а један узорак је стављан у 1 ml физиолошког раствора и достављан у цитолошку лабораторију

ради квантификације ПМН у хематолошкој комори (метод Б). У вагину је убризгано 20 ml стерилног физиолошког раствора који је остављан 5-10 секунди и затим усисан делом инфузионог сета, стављен у епрувету и достављан у имунолошку лабораторију ради квантификације ПМН (метод А) и процене апоптозе, односно вијабилности ПМН. Ћелије су бројане у 1% раствору Турка, а укупан број вијабилних ћелија је одређен помоћу раствора Трипан плавог. У оквиру испитивања апоптозе вагиналних ПМН поређене су следеће методе: морфолошка анализа ћелија у суспензији након бојења 1% раствором Турка, детекција ћелија са хиподиплоидним једрима након бојења пермеабелизованих ћелија са пропидијум јодидом и додатном морфолошким анализом на конфокланом микроскопу, детекција апоптотичних / секундарно некротичних ћелија након бојења са Aneksin-FITC-ом и пропидијум јодидом. Како су све методе показале упоредиве резултате морфолошка метода је одабрана као најјефтинија и поуздана за квантификацију апоптозе. По завршеном прегледу код свих испитаница је рађен ултразвучни преглед ради одређивања гестационе старости као и преглед вагиналном сондом ради мерења дужине грлића материце. Присуство »clue cells« на нативном препарату вагиналног секрета и клинички налаз појачане хомогена сивобеличаста секреције нису били део дијагностичког скорa за дијагнозу БВ. Дијагноза БВ је постављана у случајевима кад су ситне бактеријске форме бројније и/или подједнаке са лактобациларним формама као и у случајевима када је препарат био хипоцелуларан (мали број или потпуно одсутни лактобацили и ситне бактеријске форме) при чему су оба теста позитивна, вагинални рН>4,5 и КОН тест. Микроскопски преглед препарата вагиналног секрета бојеног по Gramи анализиран је у литератури већ описаним методима (увећање x1000) по Nugent-у, Ison/Нау-у и Claeys-у.

Морфометријским микроскопском анализом и упоредним испитивањима 50 препарата бојених по на микроскопским увећањима x1000 и x200 утврђено је да најмања дужина која се на микроскопском увећању x200 још може распознати као штапићаста форма (ШФ) износи око 1,5 μm , док се краће форме на увећању x200 не виде као штапићи и назване су нештапићастим формама (НШФ). Такође је утврђено да је просечна дужина бактеријских форми код пацијенткиња са нормалним налазом око 3 μm , док је код пацијенткиња са БВ дужина мања од 1-1,5 μm . Ради провере објективности добијених резултата коришћењем софтвера GSA Image Analyser (GSA Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Germany) компјутерски су анализиране микроскопске фотографије пацијенткиња са нормалним налазом (n=10) и БВ (n=10). Резултати компјутерске анализе микроскопских фотографија показали су да је просечна

дужина бактеријских форми код пацијенткиња са нормалним налазом увек преко 2µm, док код пацијенткиња са БВ никада није била већа од 1,3 µm. На основу ових резултата дужина бактеријских морфотипова (без обзира на бојење по Gramu) је узета као једини релевантан параметар у разликовању лактобациларне (ШФ) од флоре удружене са БВ (eng. *bacterial vaginosis associated bacteria*, BVAB) која се приказује као нештапићасте форме (НШФ). Број ШФ и НШФ је процењиван семиквантитативно на следећи начин: узорци са бројним бактеријским морфотиповима који прекривају већи део површине препарата (између, око и на епителним ћелијама) означене су као хиперцелуларни (енгл. "full"); ретке бактерије између епителних ћелија али присутне око и на овим ћелијама означени су као средње целуларни (енгл. "mid"); препарате са готово потпуно одсутним бактеријским формама око и на епителним означени су као хипоцелуларне (енгл. "null"). Зависно од односа ШФ:НШФ, ове три категорије су даље разврстане у подгрупе "нормално" и "бактеријска вагиноза". На овај начин утврђена је нова подела на 6 група (НП-6Г): 3 нормалне (normal full, NF; normal mid NM; i normal null, NN) и 3 бактеријске вагинозе (BV full, BVF; BV mid, BVM, i BV null, BVN). Однос ШФ (лактобацили) и НШФ (BVAB) и ових 6 микроскопских слика су схваћени као позадина или језгро вагиналне микрофлоре на коју су „надграђивани“ остали ћелијски морфотипови као што су ПМН, кваснице, трихомонас, сперматозоиди итд. Током испитивања својом учесталашћу и/или карактеристичном микроскопском сликом издвојила су се још три бактеријска морфотипа који су у овом испитивању дефинисани као КОКЕ, ВИДИО и ЛЕРТО форме. КОКЕ су начелно изразито Gram-позитивне, овалне, пречника 0,2 до 2 µm, али могу да буду и Gram-негативне, неправилног облика, крупније али их готово увек могуће увек разликовати од флоре удружене са БВ. У групу КОКЕ сврстани су налази трудница с бројним, изразито Gram-позитивним, овалним и обично ситним бактеријама које подсећају на тачке, а лако се разликују од флоре удружене са БВ. ВИДИО форме су идентификоване као Gram-позитивне, неравномерно обојене, краће или дуже, често неправилног облика са склоношћу ка гранању и закривљеним или маљичастим крајевима. Све форме дуже од 20 µm без обзира на бојење по Gramu разврстане су у ЛЕРТО форме. Број ПМН одређен је и семиквантитативно на препарату бојеном по Gramu и микроскопском увећањима x200 и x1000, као и на нативном препарату вагиналног секрета и микроскопском увећању x400. Сви налази су по истој методологији подељени у 4 групе:

0 – нема ПМН или их је мање од епителних ћелија (Ећ); 1 – ПМН нађени на > 50% видних поља али су и даље мање бројни од Ећ; 2 – ПМН виђени на већини видних поља у броју

једнаком или већем од броја Ећ; 3 – ПМН виђени на већини видних поља у броју знатно већем од броја Ећ. Групе 0 и 1 су сматране нормалним. Концентрације цитокина су одређиване стандардном методологијом применом микрокулица обложених анти-цитокинским антителима и проточном цитофлуориметријом .

Статистичка анализа података извршена је помоћу комерцијалног статистичког софтвера SPSS Statistics 17. Велики број варијабли представљен је у виду фреквенција појединих обележја (категорија), а статистичка значајност разлика проверавана је применом χ^2 квадрат теста. Степен слагања између категоријских параметара (скала мерења) утврђиван је путем индекса капа. У случају континуираних варијабли, подаци су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (СД). Нормалност дистрибуције података утврђивана је применом Kolmogorov-Smirnov теста. У зависности од резултата овог теста, поређења између група су вршена применом анализе варијансе у 1. правцу (ANOVA) или путем Kruskal-Walis теста. Накнадна пост хоц поређења изведена су одговарајућим тестовима за поређење парова. За процену јачине повезаности ризик фактора и клинички значајних исхода као зависних варијабли, коришћена је бинарна логистичка регресија. Јачина повезаности појединачних ризик фактора и клиничког исхода приказана је у виду odds односа и њихових 95%-них граница поверења. Сензитивност и специфичност појединих параметара у дискриминацији клиничких исхода одређивана је применом ROC (receiver operating characteristic) криве. Међусобна корелација појединих битних параметара утврђивана је применом Spearmanове корелационе анализе. Статистички значајна разлика процењивана је на минималном нивоу $p < 0,05$

3. Кратак опис постигнутих резултата

У поглављу **Резултати и дискусија** кандидат је детаљно и критички коментарисао добијене резултате у односу на постојеће литературне податке. Нова методологија микроскопског прегледа (НММП) препарата вагиналног секрета по Gramи на увећању $\times 200$ заснива се на чињеници да је вероватноћа детекције одређених ћелијских морфотипова и процена њиховог броја и односа на микроскопском препарату управо сразмерна прегледаној површини препарата и времену прегледа, а обрнуто сразмерна хомогености препарата. Кандидат је израчунао да се на основу НММП у истом времену посматра неупоредиво већа површина: на увећању $\times 1000$ и површини од 600 mm^2 може се анализирати 5-50 од 15-20 000 видних поља ($\approx 0,001\%$), док на увећању $\times 200$ од укупно 600-800 видних поља може се анализирати 150-250 (0,28%) што је дакле од 200

до 300 пута већа површина. У овом испитивању НММП примењена је и у случају анализе вагиналне микрофлоре и семиквантитативном одређивању броја ПМН.

Зато је кандидат прво проверавао вредност и употребљивост НП-6Г у односу на постојеће дијагностичке критеријуме (Nugent, Amsel, Ison/Нау и Claeys). Упоредна статистичка анализа показала је добру асоцијацију (χ^2) и слагање (к индекс) при чему кандидат уочава да су овако добри резултати последица високе подударности код хиперцелуларних и средње целуларних налаза (NF, NM, BVF, BVM) 80-95%, док је ова подударност значајно мања (30%) у групама са хипоцелуларним налазом (NN+BVN). Један од најважнијих недостатака Nugent-ових критеријума као златног стандарда, а и критеријума по Ison/Нау-у и Claeys-у је постојање такозване интермедијарне групе која је не само слабо дефинисана у дијагностичком и клиничком него и у терапијском и прогностичком смислу. Зато кандидат веома важним сматра чињеницу да је НП-6Г омогућила да покаже да највећи број интермедијарних налаза (70-90%) припада групама са хипоцелуларним налазом («null») на основу НП-6Г. Уопштено, број бактерија треба да је већи од 10^4 - 10^5 да би се виделе на препарату по Gramу, због чега кандидат верује да је у оваквим случајевима (због значајног смањења квантитативног биодиверзитета вагиналне микрофлоре) микроскопски налаз практично неупотребљив у разликовању «нормалног» и «патолошког». Овакав закључак је у сагласности са резултатима испитивања у којем су поређени различити дијагностички критеријуми (Nugent, Amsel, Ison/Нау): највећа неслагања су нађена код препарата са малим бројем лактобацила. Зато кандидат сматра да би у оваквим случајевима рН вагине и КОН тест имали већу вредност. Добијени резултата и податак да је 17,2% (n=121) пацијенткиња припадало овој групи главни су разлог су што је највећи број ових трудница добијао пребиотик са ацидификантом. Зато наглашава да би овој групи пацијенткиња у будућим испитивањима требало посветити посебну пажњу. Како су резултати најновијих молекуларних студија показали да се вагинална флора и здравих и пацијенткиња са БВ суштински разликује само у квантитативном односу њених елемената, кандидат истиче да је НП-6Г једина која уважава значај квантификативних односа различитих бактеријских форми разликујући поменуте три категорије целуларности.

Узимајући у обзир најновије резултате о великом квалитативном биодиверзитету вагиналног микробиома, кандидат поред поменутог квантитативног односа ШФ (лактобацили)/НШФ (BVAB), који је суштински за све поменуте дијагностичке критеријуме, у анализу уводи и друге ћелијске морфотипове: ПМН, кваснице, КОКЕ, BIFIDO и LEPTO форме, које «надграђује» на позадину коју чини 6 микроскопских слика

(NF, NM, NN, BVF, BVM, BVN), наглашавајући да и број ПМН треба да постане саставни део микроскопског налаза у разликовању »нормалног« од »патолошког«. Податак да су на увећању x200 споре и хифе квасница детектоване у двоструко, а коке у шестоструко већем броју у односу на увећања x400 и x1000 кандидат користи за потврду веће вредности микроскопског увећања X200 у детекцији појединих ћелијских морфотипова. Изразиту индивидуалну варијабилност налаза микроскопског прегледа кандидат илуструје оригиналним фотографијама и резултатима добијеним на различитим микроскопским увећањима и на основу различитих дијагностичких критеријума. Новом методологијом добијени су следећи резултати: патолошки број ПМН (36,4%), кваснице (34 %), КОКЕ (36,6%), BIFIDO (7,1%) и LEPTO (6%) пацијенткиња; Око 80% пацијенткиња са микроскопским налазом квасница су имале и патолошки број ПМН, као и преко половине пацијенткиња са БВ, КОКАМА, BIFIDO и LEPTO формама и око четвртине пацијенткиња са нормалним налазом. Квасница су детектоване код скоро половине пацијенткиња са БВ и 30% пацијенткиња са нормалним налазом. Код пацијенткиња са БВ и патолошким бројем ПМН кваснице су микроскопски детектована у 84% случајева. КОКЕ су чешће детектоване код пацијенткиња са БВ (78%) у односу на нормалне (23%), а у високом проценту КОКЕ су нађене и код пацијенткиње са микроскопским налазом BIFIDO, квасница, повећаним бројем ПМН и LEPTO формама (64%, 61%, 56% и 55%). Посматрајући ПМН, кваснице, КОКЕ, BIFIDO и LEPTO форме као ометајуће факторе кандидат истиче да би они могли, појединачно или заједно, у различитим квалитативним и квантитативним односима, битно утицати на остале испитиване параметре као што су: вијабилност и апоптоза вагиналних ПМН, концентрације испитиваних цитокина, резултате рН или КОН теста. Кандидат упозорава да је концепт биолошке мреже (енг. *biological network*) једна од најактуелнијих тема савремене биологије и да се мора имати на уму када се тумаче резултати оваквих испитивања, указујући да у овом испитивању постоје најмање три међусобно испреплетене мреже (микробна, цитокинска, апоптотска). Такође наглашава да су промене вагиналне флоре у овом испитивању посматране као примарни и каузални фактор у односу на све друге испитиване параметре: број, вијабилност и процената апоптозе вагиналних ПМН, концентрације цитокина и дужина грлића материце.

Дискутујући резултате који се односе на налаз културе цервико-вагиналног бриса кандидат истиче чињеницу да упркос великом броју података који указују на врло малу вредност овог налаза у клиничкој пракси, овај поступак је у Србији још најчешћа процедура за процену стање вагиналне флоре. Резултати овог испитивања

недвосмислено показују да култура вагиналног и/или цервикалног бриса представља скуп и неупотребљив налаз у клиничкој пракси, и да два једноставна, брза и јевтина теста (рН, КОН) дају боље резултате у процени стања вагиналне флоре и да би их требало користити као скрининг методе јер код највећег броја пацијенткиња могу искључити постојање инфекције или указати на потребу за даљим испитивањима.

Дискусију о ПМН кандидат почиње поредећи резултате семиквантитативног одређивања броја ПМН на различитим микроскопским увећањима (x200, x400 и x1000) и закључује да између њих постоји добра асоцијација (χ^2), али наглашава да је она јача између x200 и x400 у односу на x1000 што доводи у везу са површином прегледаног препарата. Такође упозорава да су и овде добри резултати последица пре свега велике подударности у групи ПМНО. Ако се НММП (x200) узме као »златни стандард« онда 100 пацијенткиња са патолошким налазом (ПМН2+ПМН3) на увећању x200 има нормалан налаз на x1000 (лажно негативне), а 32 пацијенткиње би биле лажно позитивне. Могућност да семиквантитативно одређивање ПМН на увећању x200 у будућности постане златни стандард, кандидат подупире резултатима у којима је само овај метод показао статистичку значајност (Spermanов тест; $p < 0,05$) у односу на све друге испитиване параметре: проценат апоптозе, дужину грлића материце, две квантитативне методе (Q-PMNA i Q-PMNB) и два семиквантитативна метода (x400 и x1000). Очекивано, најбољи резултати су нађени међусобним поређењем семиквантитативних метода (x200/x400, x200/x1000 и x400/x1000; $p < 0,001$; ρ 0,74, ρ 0,73 и ρ 0,81), док су резултати у односу на две квантитативне методе били слабији и таква повезаност или није нађена или је била слабија. Још један налаз кандидат користи да укаже на већу вредност нове методологије семиквантитативног одређивања броја ПМН на увећању x200 зато што је значајна негативна корелација нађена само између броја ПМН одређеног семиквантитативно на увећању x200 и дужине грлића материце (Sperman, ρ -0.094, $p=0.014$ и т-тест, Leven $p < 0,05$), док таква корелација није нађена за увећања x400 и x1000. Повећан број ПМН би могао да буде индикација за цервикометрију. Квантитативно одређивање броја ПМН показало је изразиту индивидуалну варијабилност (вероватно због природе узорковања) што је имало за последицу слабију корелацију са резултатима добијеном одређивањем броја ПМН семиквантитативним методима, а и међусобно, што није неочекивано с обзиром да је један узорак из вагиналног испирка, а други из вагиналног бриса. Sperman-овим тестом нађена је значајна негативна корелација ($\rho = -0.4939$; $p < 0.001$) између укупног броја вагиналних ПМН и процента апоптозе ових ћелија, а још израженија негативна корелација уочава се

када се упоређује укупан број вијабилних ПМН са степеном апоптозе ($p=0.5378$, $p<0.001$). ANOVA и *post hoc* анализа (Tamhane) су показали да за проценат апоптозе постоји значајна разлика између групе ПМН0 и ПМН2 (увеличања $\times 200$ и $\times 1000$) и ПМН0 и ПМН3 (увеличање $\times 400$) ($p<0,05$), што значи да су труднице са мањим бројем ПМН имале већи проценат апоптозе. Такође, прегледом на увећању $\times 200$ нађена је статистичка значајна разлика (t-тест) у односу на проценат апоптозе, обе квантитативне методе и дужину грлића материце, док је на увећању $\times 400$ таква значајност нађена за проценат апоптозе и квантитативне методе Б, а на увећању $\times 1000$ само за квантитативну методу Б. Пацијенткиње са већим бројем ПМН имале су мањи проценат апоптозе и краћи грлић материце. И ови налази индиректно указују да мања увећања дају боље резултате и да би се новопредложена методологија могла користити као златни стандард у односу на тренутне. Добијени резултати су у складу са познатим чињеницама да у условима инфекције/запаљења долази не само до повећања броја ПМН већ и продужења њиховог животног века. Указујући да микроорганизми могу значајно утицати на апоптозу ПМН кандидат нас поново упућује на податке о разликама у броју ПМН у зависности од микроскопског налаза. Познато је да лактобацили имају проапоптогене ефекте, као и да пацијенткиње са БВ карактерише смањен број или још чешће потпуно одсуство лактобацила и 100-1000X већи број различитих анаероба. Дакле очекиван резултат би био да је у оваквим условима значајно смањен проценат апоптозе, али је у овом испитивању показано (ROC крива) да су пацијенткиње са БВ имале већи проценат апоптозе вагиналних ПМН за шта су вероватно одговорне високе концентрације масних киселина кратких ланаца које продукују анаеробне бактерије (BVAB).

Kruskal–Wallis анализом варијансе и *post hoc* анализом (Mann–Whitney-U test) испитивана је повезаност резултата добијених микроскопским прегледом препарата вагиналног секрета и локалних концентрација цитокина. Статистичка значајност ($p<0.05$) између различитих група пацијенткиња и на основу различитих дијагностичких критеријума нађена је за IL-1 β , IL-6, IL-12p70. Статистички значајне разлике за IL-1 β , IL-6 и IL-12p70 нађене су применом све четири методологије (Nugent, Ison/Hay, Clayes, НП-6Г) изузев за IL-12p70 у подели по Clayes-у, док је на основу НП-6Г нађена значајност и за IFN- γ . На основу Amsel-ових критеријума који разликују само две групе пацијенткиња (нормалне и БВ) значајност је нађена само за IL-1 β . Такође, IL-1 β је једини цитокин за кога је нађена значајност ($p<0.05$) на основу свих дијагностичких критеријума. Имајући у виду значајне варијације у концентрацијам цитокина између појединих група на основу различитих подела, кандидат закључује да су концентрације

IL-1 β и IL-6 биле значајно веће код пацијенткиња са БВ у односу на нормалан налаз, а супротни резултати су добијени за IL-12p70. Кандидат веома важним сматра резултате који су великом броју случајева показали подједнаке концентрације цитокина код пацијенткиња са хиперцелуларним (NF, BVF), средње целуларним (NM, BVM) или хилоцелуларним налазом (NN, BVN), што указује да број бактерија није фактор који одлучујуће утиче на концентрације цитокина у грлићу материце. Кандидат затим показује како се концентрације и статистичка значајност појединих цитокина мењају у зависности од дијагностичких критеријума, наглашавајући да горе поменути резултати одражавају концентрације цитокина само у односу на микроскопску процену односа лакотобацила и BVAB, дакле да потпуно искључују могући утицај ометајућих фактора (ПМН, квасница, КОКА, BIFIDO, LEPTO). Податак да су значајно ниже концентрације IL-10 ($p < 0,05$) нађене само у групи BIFIDO истиче значај ометајућих фактора. Кандидат закључује да ови резултати објашњавају зашто у последњих тридесетак година упркос огромном броју студија ниједан од преко 100 различитих запаљењских медијатора није уведен у клиничку праксу као предиктор ПП. Вероватно из истих разлога у овом испитивању није показана статистички значајна повезаност између вијабилности и апоптозе вагиналних ПМН и концентрација испитиваних цитокина.

Као што је познато из ранијих испитивања, пацијенткиње са краћим грлићем материце измереним трансвагиналним ултразвуком имале су повећан ризик за ПП, што су потврдили и резултати овог испитивања. Пацијенткиње са ПП ($n=21$) имале су значајно ($p < 0,001$; т-тест) краћи грлић ($30,85 \pm 9,02$) од пацијенткиња ($n=597$) које су се породиле у термину ($40,82 \pm 6,53$). У циљу утврђивања сензитивности и специфичности мерења дужине грлића трансвагиналним ултразвуком за детекцију ПП учињена је анализа резултата применом ROC криве и за граничну вредност 36,5 mm сензитивност је била 71,4%, а специфичност 75,7%, док је за граничну вредност 30,5 mm сензитивност 42,9% а специфичност 93,1%. Грлић краћи од 30 mm имало је 6,9% пацијенткиња које су се породиле у термину и 42,9% пацијенткиња које су се породиле пре термина. Све пацијенткиње са грлићем краћим од 30 mm добијале су терапију прогестероном, а код пацијенткиња са грлићем краћим од 15 mm апликован је серклаж. Верујемо да је овакав приступ разлог што су се пре времена породиле само 4 од 13 пацијенткиња са грлићем краћим од 25 mm. Старије пацијенткиње имају повећан ризик за ПП ($p < 0,05$; т-тест), док χ^2 тестом показано постојање међусобне повезаности између ПП и паритета ($p=0,009$).

Логистичком мултиваријантном анализом утврђиван је значај сваког од испитиваних параметара у предвиђању ПП: Труднице код којих је НММП откривено

присуство BIFIDO форми (n=47) имале су 9,8 пута већи релативни ризик (RR=9,8; 95% CI 2,7-34,6) за ПП у односу на труднице са нормалним налазом или БВ, као и труднице код којих је трансвагиналним ултразвуком измерен краћи грлић материце (RR=1,2; 95% CI 0,7-0,9).

Посебно корисним кандидат сматра резултате (ROC крива) који се односе на вредности вагиналног рН, који се у овом испитивању показао као највреднији појединачни маркер у дијагнози БВ (сензитивност 87,3%; специфичност 79,5%) за граничну вредност рН од 4.5. Вреднијим од овог, по мишљењу кандидата је налаз рН >4,5 код пацијенткиња са BIFIDO формама (9,6 пута већи ризик од ПП!) зато што се ове форме микроскопски могу често погрешно идентификовати као лактобацили, микроскопски налаз прогласити нормалним, а рН >4,5 лажно позитивним. Посебан значај овог налаза кандидат види у чињеници да је до сада објављено свега неколико радова који испитује значај овог бактеријског морфотипа а кога они сврставају у посебну групу под називом »I-like« (сличан нормалном). Сличност са нормалним (лактобацилима) је разлог што ни у овом испитивању микроскопским прегледом нативног препарата ова група пацијенткиња није препозната, па тако ни лечена, за разлику од пацијенткиња са БВ, квасницама и оних са хипоцелуларним налазом које су лечене метронидазолом, антимицотицима пребиотицима и ацидификацијом вагине. Кандидат наглашава резултате великог броја ранијих студија који указују на ниску специфичност и сензитивност вагиналног рН у дијагнози поремећаја вагиналне флоре, као и резултате новијих молекуларнобиолошких студија по којима око 50% жена са нормалном вагиналном флором има рН >4,5, док код ¼ лактобацили нису доминантна флора! На основу резултата добијених у овом испитивању кандидат доказује супротно. Прво, у већини ових студија Nugent-ови и/или Amsel-ови критеријуми су златни стандард за дијагнозу БВ, нормалног или интермедијарног (15-30%) налаза, и на основу те дијагнозе се процењује вредност клиничких параметара (изглед секрета, рН, КОН тест), а микроорганизми детектовани молекуларно-биолошким методама разврставају у једну од поменутих група. Друго, највећи број (преко 90%) молекуларнобиолошких студија бави се квалитативном, а не квантитативном анализом вагиналног микробиома, а резултати битно зависе од коришћених молекуларних метода, тако да значај појединих чланова може бити прецењен, а других потцењен. На основу резултата добијених у овој студији и литературних података, кандидат закључује да вредности вагиналног рН преко 4,5 са великом вероватноћом указују на поремећај вагиналне флоре (не само БВ). Основни узрок неслагања је што оба »златна стандарда« не могу микроскопским

прегледом утврдити стање вагиналне флоре због малог броја бактерија (хипоцелуларан налаз), или не препознају бактеријски морфотипове као што је то показано за BIFIDO форме у овом испитивању. Подсећајући на још два поремећаја вагиналне флоре, вагиналну трихомонозу и аеробни вагинитис, које такође карактерише $pH > 4,5$, кандидат закључује да вредности $pH > 4,5$ са готово апсолутном вероватноћом указују на поремећај вагиналне флоре (искључујући инфекцију квасницама). Кандидат указује да би проценат апоптозе вагиналних ПМН (код трудница без БВ) могао бити бољи маркер запаљења (не и инфекције!). На основу резултата овог испитивања асимптоматске труднице између 24-28 недеље гестације са вредностима $pH > 4,5$, микроскопским налазом »сличном нормалном«, патолошким бројем ПМН, нижим степеном апоптозе и концентрација IL-10, а грлићем краћим од 25 mm имале преко 10X већи ризик за ПП.

Свакако највреднијим резултатом овог испитивања кандидат сматра значајно нижу учесталост ПП у испитиваној популацији (3,1%), у односу на популацију у Србије (6-9%). Како је у овом испитивању рађен скрининг на асимптоматске вагиналне инфекције и дужину грлића материце вагиналним ултразвуком и код свих спроводена стандардна терапије антимицотичком, антибиотичком или пребиотичком терапијом, односно прогестероном и стављањем серклажа, кандидат сматра да би овакав приступ требао да постане рутински део антенаталне праксе и да би се тако број ПП могао значајно смањити. Посебно вредност овог рада представља чињеница да су све поделе и методологије илустроване оригиналним микроскопским фотографијама одабраним из базе која садржи око 10 000 микроскопских фотографија и око 1000 видео записа. Због тога је веома интересан део у коме кандидат на основу добро проучених фенотипских карактеристика најважнијих чланова вагиналног микробиома овим фотографијама илуструје тешкоће у микроскопском разликовању Gram варијабилних (*L. inersa*, *G. vaginalis*), Gram позитивних ШФ (*Lactobacilli*, *Corynebacteria*, *Bifidobacteria*), Gram негативних (*Prevotella*, *Megasphaerae*) или спекулише о могућем микроскопском разликовању различитих облика БВ у зависности од преминације одређених бактерија (*G. vaginalis*, *A. vagine*, *Prevotella*), на шта указују и резултати неколико најновијих молекуларних студија. На крају као највећи проблем у микроскопском разликовању нормалне или патолошке вагиналне флоре (независно од методологије која се користи) кандидат истиче тешкоће у микроскопском разликовању *L. iners* и *G. vaginalis*, указујући да то највише оптерећује Nugent-ов бодовни скор што доводи у питање вредност Nugent-ових критеријума као златног стандарда. Додатни проблем представљају најновији подаци по којима су ове две бактерије најчешћи чланови вагиналног микробиома који

се са великом учесталашћу налазе (60-90%) и код пацијенткиња са нормалним налазом и БВ. У истом смислу је посебно значајна идентификација равних или благо закривљених Gram позитивних штапића са крајевима који се сужавају или су понекад маљичасти, а за које кандидат верује да у већем броју случајева одговарају коринебактеријама, а које су у овом испитивању повезане са повећаним ризиком за ПП. На крају кандидат закључује да се и код BIFIDO групе пре ради о микробиолошкој заједници («дисбиоза»), него о појединачном узрочнику (*Corynebacteria*, *Bifidobacteria*), која онда доводи до појачаног и продуженог запаљењског одговора и ПП.

4. Оцена резултата истраживања

Комисија високо оцењује обим и квалитет овог научноистраживачког пројекта. Нова методологија микроскопског прегледа препарата бојеног по Gramу, поред семиквантитативне процене бактеријских морфотипова и ПМН, омогућава разврставање и оних вагиналних препарата које друге методе или не узимају у обзир или их групишу у класу неодређених налаза. У складу са савременим налазима, који уместо вагиналних инфекција све чешће наводе вагиналну „дисбиозу“ и у којој је значајна квантификација и релативни однос различитих бактерија, новопредложена класификација омогућава управо примену овог принципа. Нова методологија микроскопског прегледа даје боље резултате у процени стања вагиналне флоре и одређивању броја ПМН у односу на стандардне и квантитативне методе. У том смислу је посебно значајна идентификација BIFIDO форми које су повезане са повећаним ризиком за ПП, а само су пацијенткиње са повећаним бројем ПМН на увећању $\times 200$ имале значајно краћи грлић ($p < 0,05$), а краћи грлић је био повезан са повећаним ризиком за ПП. Процент апоптозе вагиналних ПМН, код пацијенткиња без БВ, могао да буде бољи предиктор степена инфламације (не и инфекције) што би могло да буде од значаја у предвиђању ПП који је првенствено запаљењски догађај. Резултати ове дисертације указују да број, вијабилност и апоптоза вагиналних ПМН треба да буду саставни део испитивања која би у будућности заједно са клиничким, микроскопским, молекуларнобиолошким и ултразвучним налазима дала бољи увид у етиопатогенетска збивања везана за ПП удружен са инфекцијом, а самим тим и омогућила да се сигурније препознају и успешно лече ове пацијенткиње. Нова подела на шест група (НП-6Г) је омогућила да кандидат недвосмислено покаже да број и врста бактерија немају већег утицаја на концентрације цитокина у грлићу материце, а исти закључак односио би се на концентрације цитокина и број ПМН. По мишљењу

кандидата концентрације неког цитокина у датом тренутку су крајња резултанта великог броја фактора (генетских, епигенетских) и међусобно зависних и испреплетених позитивних и негативних сигнала које одашиље велики број јединица из најмање три биолошке мреже микробне, цитокинске и апоптотске, што је по мишљењу чланова комисије такође оригинална хипотеза. Кандидат је показао да култура вагиналног и/или цервикалног бриса представља скуп и неупотребљив налаз у свакодневној клиничкој пракси, и да два једноставна, брза и јевтина теста (рН, КОН) дају много боље резултате. Цервикометрија треба да буде обавезан део сваког ултразвучног прегледа између 24-34 недеље трудноће, јер се тако у популацији асимптоматских трудница може открити значајан број пацијенткиња са великим ризиком за ПП. Свакако најважнији аспект овог истраживања је онај који се односи на свакодневну клиничку праксу. Кандидат је недвосмислено показао да би увођење једноставног и брзог метода микроскопског прегледа вагиналног секрета (НММП) омогућило детекцију микроскопских параметара корисних за предвиђање ризика за ПП (бактеријски морфотипови, број ПМН, целуларност). Тако би НММП, заједно са два једноставна, брза и јевтина теста (рН, КОН; као скрининг тестови) и мерењем дужине грлића материце, омогућила да се из популације асимптоматских трудница издвоји највећи број оних са повећаним ризиком за ПП и да се правовременим и адекватним лечењем значајно смањи учесталост ПП, као што су то показали и резултати овог испитивања у коме је број ПП био најмање за 50% мањи од очекиваног.

5. Објављени радови и саопштења који чине део тезе:

1. Nenadić DB, Pavlović MD, Motrenko T. A novel microscopic method for analyzing Gram-stained vaginal smears in the diagnosis of disorders of vaginal microflora. (Vojnosanit Pregl. Prihvaćeno za štampu; DOI: 10.2298/VSP140612065N).
2. Nenadić DB, Pavlović MD. Value of bacterial culture of vaginal swabs in diagnosis of vaginal infections. (Vojnosanit Pregl. Prihvaćeno za štampu; DOI: 10.2298/VSP140602061N).

5. Закључно мишљење и предлог

Докторска теза пп. асист. мр сц. мед. Данета Ненадића из Центра за гинекологију и хуману репродукцију ВМА под насловом: „БРОЈ И ВИЈАБИЛНОСТ ВАГИНАЛНИХ

ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРА КАО ПОКАЗАТЕЉ РИЗИКА ЗА ПРЕВРЕМЕНИ ПОРОЂАЈ” представља оригиналну и занимљиву клиничку студију из области гинекологије и перинатологије, која за свој циљ има унапређење дијагностике односно предвиђања ризика за ПП. Истраживање у овој студији је спроведено систематично, опсежно и целовито уз примену научног метода. Број прегледаних и фотографисаних микроскопских препарата вагиналног секрета броји неколико хиљада, а неки од њих су јединствени. Кандидат је показао изузетно познавање проблематике коју је изабрао за свој научно истраживачки рад. Кључни допринос његовог истраживања је модификација микроскопског прегледа вагиналног секрета бојеног по Gramu која може одмах да се примени у свакодневной пракси, а нуди низ предности у односу на постојеће методе. Не само да је бржа и једноставнија него унапређује класификацију вагиналне дисбиозе и представља корисну полазну тачку за будућа молекуларнобиолошка испитивања вагиналне микрофлоре. Кандидат је употребом новог метода први јасно описао значај ВIFIDO форми за повећање ризика за ПП. С обзиром да најновија молекуларна испитивања јасно показују да су квантитативне промене у вагиналном микробиому суштинске за разликовање нормалног стања од дисбиоза, описана методологија и њен семиквантитативни аспект сигурно би много боље корелирали са налазима квантитативних молекуларнобиолошких испитивања. То би са једне стране довела до прецизнијег утврђивање праве клиничке вредности микроскопских налаза (посебно хипоцелуларних) и једноставних тестова као што су рН и КОН, док би с друге стране овакав приступ био кориснији молекуларним биолозима у њиховим покушајима да на основу квантитативне ланчане реакције полимеразе (енг. Polymerase Chain Reaction, QPCR) дођу до молекуларне „формуле” за дијагностику бактеријске вагинозе.

Чланови комисије сагласни су у закључку да докторска теза пп. асист. мр сц. мед. Данета Ненадића испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева и представља значајан и оригиналан допринос у проучавању вагиналне микрофлоре, броја, вијабилности и апоптозе вагиналних ПМН и ризика за превремени порођај. Комисија једногласно предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, с обзиром да су испуњени сви законски услови за јавну одбрану докторске тезе, да извештај прихвати и одобри јавну одбрану докторске дисертације под насловом „БРОЈ И ВИЈАБИЛНОСТ ВАГИНАЛНИХ ПОЛИМОРФОНУКЛЕАРА КАО ПОКАЗАТЕЉ РИЗИКА ЗА ПРЕВРЕМЕНИ ПОРОЂАЈ”.

У Београду, дана 18.11.2014. године

проф. др. сц. мед. Жељко Миковић

Бригадни генерал, академик. Миодраг Чолић

проф. др. сц. мед. Дарко Плећаш

проф. др. сц. мед. Слободанка Ђукић

проф. др. сц. мед. Жељка Татомировић