

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА У ФОЧИ

Одлуком Наставно-научног већа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-150 од 14.05.2020. године, именована је Комисија за оцену и јавну одбрану урађене докторске дисертације кандидата, вишег асистента мр сц. Јелене Владичић Машић, под насловом: „ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ И МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЋЕЛИЈА ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ У ЈЕТРИ ХУМАНОГ ЕМБРИОНА И ФЕТУСА“ у следећем саставу:

1. **Проф. др Миодраг Вучић**, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Нишу, председник комисије;
2. **Проф. др Дејан Бокоњић**, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет у Фочи Универзитета у Источном Сарајеву, члан комисије;
3. **Доц. др Владимир Петровић**, ужа научна област Хистологија и ембриологија, Медицински факултет Универзитета у Нишу, члан комисије.

Комисија у наведеном саставу је детаљно прегледала и оценила докторску дисертацију, о којој Наставно-научном већу Медицинског факултета у Фочи Универзитета у Источном Сарајеву подноси

ИЗВЈЕШТАЈ о оцјени урађене докторске дисертације

1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

У научној области медицине, посебно у оквиру уже научне области Хистологије и ембриологије, годинама уназад влада велико интересовање за процесе цитодиференцијације различитих ћелијских линија у развијајућој јетри – хепатоцита, епителних ћелија интрахепатичних жучних путева, ендотелних, глаткомишићних и везивноткивних ћелија крвних судова, перисинусоидних ћелија и макрофага (Купферовић ћелија и макрофага портних простора). Када се овим подацима дода и чињеница да је јетра у пренаталном периоду и главни хематопоеТСки орган ембриона и фетуса, са великим бројем ћелија различитих лоза хематопоезе, онда је јасно да се ради о великом броју паралелно одвијајућих процеса диференцијације који су регулисани многобројним факторима раста и индукције, од којих су неки из микрооколине – паракрини, а други долазе из удаљених органа – ендокрини. Велики је број података који се односе на еритроцитопоезу у јетри људског ембриона и фетуса. Међу њима су контрадикторни подаци у вези маркера идентификације матичних ћелија хематопоезе и прогениторних ћелија еритроцитопоезе, како по питању њихове специфичности, тако и по питању њихове заступљености у различитим периодима развоја јетре. Досадашња истраживања су најчешће вршена на анималним моделима, док је заступљеност матичних ћелија и ћелија еритроцитопоезе вршена методом проточне цитометрије.

Истраживања у овој дисертацији су спроведена на хуманом, веома тешко доступном, материјалу. У јетри ембриона и фетуса су, употребом најсензитивнијих имунохистохемијских процедура доказане матичне ћелије хематопоезе (*PHSC*, *CFU-GEMM*), као и низ ћелија које ће се од њих диференцирати, у овом случају еритропоетска линија прогениторних (*CFU-E*, *BFU-E*) и прекурсорске ћелије. Описана је њихова локализација, морфолошке и имунохистохемијске карактеристике и квантификована заступљеност. На тај начин су добијени резултати који употпуњују и систематизују досадашња сазнања из ове области, што представља фундаментални допринос у сфери Хистологије, ембриологије и хематологије, који може послужити као квалитативна и квантитативна основа за будућа истраживања.

<p>2. Оцјену да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области</p>
<p>Колегиница Јелена Владичић Машић је више од 10 година сарадник на предмету Хистологија и ембриологија Медицинског факултета у Фочи. У том периоду, она је више пута боравила на семинарима континуиране медицинске едукације на хистолошком институту Медицинског факултета у Нишу и у Институту за медицинска истраживања у Београду, где се усавршавала у области морфолошких истраживања. На тај начин, после вишегодишњег рада, она је овладала методологијом истраживања у хистологији и ембриологији, од одабира теме, прикупљања и обраде ткивних узорака, до бојења класичним хистолошким и имунохистохемијским методама, примене метода квантификације, статистичке обраде и интерпретације резултата, што је материјализовала израдом своје магистарске тезе и докторске дисертације. Истовремено, колегиница Владичић Машић је познавањем материје, дефинисањем циљева истраживања, коришћењем хуманог ембрионалног и феталног материјала, применом сензитивних метода имунохистохемијских бојења и квантификације, добила изузетне резултате, чиме је доказала да је оспособљена за самостално решавање компликованих морфолошких истраживања.</p>
<p>3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области</p>
<p>Кандидат, др Јелена Владичић Машић је систематизовала резултате својих веома компликованих истраживања еритроцитопоезе у јетри хуманих ембриона и фетуса, у научној области медицине, као и у ужој научној области Хистологије и ембриологије, на тај начин што је применом адекватне – научно засноване методологије, поставила јасне и актуелне циљеве, применила адекватне методе обраде ткива и високо сензитивне методе бојења ткивних пресека, доказала постојање, и описала заступљеност, локализацију, морфолошке и имунохистохемијске карактеристике матичних ћелија хематопоезе и прогениторних и прекурсорских ћелија еритроцитопоезе. Поред тога, за одређивање броја ћелија користила је квантификациону морфометријску методу одређивања нумеричке ареалне густине, уз примену адекватне статистичке обраде.</p>
<p>4. Оцјену о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему (по поглављима)¹</p>
<p>Докторска дисертација садржи 7 поглавља: Увод, Предмет и циљ истраживања, Материјал и методе, Резултате, Дискусију, Закључке и Литературу. Написана је на 102 стране ћирилично куцаног текста и садржи 6 цртежа, једну шему, четири табеле, 6 дијаграма и 25 композитних слика у којима се налази 159 микрофотографија у колору.</p> <p>Увод. Увод је подељен на четири потпоглавља, у којима се, на дидактичан и систематизован начин, даје преглед о досадашњим сазнањима из области теме дисертације. У потпоглављу „Опште карактеристике хематопоезе човјека“ дају се основни подаци о хематопоези уопште, који обухватају поделу хематопоезе, органе у којима се одвија пренатална и постнатална хематопоеза и дилеме у вези иницијалних стадијума и органа укључених у ембрионалну хематопоезу. Друго потпоглавље „Хепатична фаза хематопоезе“ даје основне податке о грађи јетре, пренаталном развоју јетре и хематопоези у јетри фетуса. У наредном потпоглављу „Еритроцитопоеза“, наводе се чињенице везане за пролиферацију, диференцијацију и морфолошке карактеристике ћелија</p>

¹Испуњеност обима и квалитета у односу на пријављену тему, нарочито, треба да садржи: аналитички и системски прилаз у оцјењивању истраживачког постављеног предмета, циља и задатака у истраживању; испуњеност научног прилазу доказивања тврдњи или претпоставки у хипотезама, са обрадом података

еритроцитопоезе, пошевши од матичних ћелија (*PHSC, CFU-GEMM*), прогениторних ћелија (*CFU-E, BFU-E*) и морфолошки препознатљивих – прекурсорских ћелија (проеритробласта, базофлиних, полихроматофилних и ацидофилних еритробласта и ретикулоцита), до еритроцита. Посебна пажња је посвећена еритроцитопоези у јетри ембриона и фетуса, њеној регулацији и значају макрофага. У четвртом потпоглављу „Основни маркери хематопоетских матичних ћелија и ћелија еритроцитопоезе“ даје се преглед најважнијих имунохистохемијских маркера који се користе за идентификацију матичних (*CD34, CD117*), прогениторних (*EPO-R*) и прекурсорских (*CD71, CD235a*) ћелија еритроцитопоезе.

На осниву изнесених података, у уводном делу, запажа се низ неслагања, почевши од времена појављивања еритроцитопоезе у јетри човека, заступљености појединих имунофенотипова еритроцитопоеетских ћелија у одређеном периоду развоја, до нивоа специфичности имунохистохемијских маркера за идентификацију појединих ћелија еритроцитопоезе. Осим тога, веома су ретки подаци о примени квантификационих метода за утврђивање заступљености ћелија еритроцитопоезе на ткивним пресецима.

Хипотеза овог истраживања је да се еритроцитопоеза у јетри идентификује у ембрионалном периоду, средином феталног периода је најинтензивнија и опада до краја феталног периода; заступљеност прекурсорских ћелија еритроцитопоезе је сразмерна броју матичних и прогениторних хематопоетских ћелија и макрофага.

Предмет и циљ истраживања. Постављени су циљеви истраживања да се: у јетри хуманог ембриона и фетуса, у различитим периодима развоја, изврши идентификација хематопоетских стем (матичних), прогениторних и прекурсорских ћелија еритроцитопоезе, као и макрофага, да им се одреди заступљеност и топографска локализација, и опишу њихове морфолошке и имунохистохемијске карактеристике.

Материјал и методе. Материјал су чиниле јетре пет ембриона и 25 фетуса оба пола, узраста од 7 до 38 недеља, разврстаних по триместрима. Од парафинских калупа прављени су пресеци дебљине пет микрометара и бојени хематоксилин-еозиним и имунохистохемијским маркерима за идентификацију матичних (*CD34, CD117*), прогениторних (*EPO-R*), прекурсорских (*CD71, CD235a*) ћелија и макрофага (*CD68*). Хистолошки препарати су анализирани светлосним микроскопом и снимани дигиталном камером на различитим повећањима. Фотодокументација је сачувана у формату компјутерског фајла и подвргнута метричкој калибрацији у програму *Image J*. Квантификација одговарајућих ћелија је урађена применом морфометријске анализе којом је одређивана њихова нумеричка ареална густина. Статистичка анализа је подразумевала употребу метода дескриптивне и аналитичке (Хи-квадрат тест) статистике.

Резултати. У резултатима су најпре описане морфолошке карактеристике јетре током пренаталног развоја: однос паренхиматозно-стромалних и васкуларних структура, лобулисаност, трансформација синусоида, формирање портних простора и присуство хематопоезе. Резултати имунохистохемијске анализе су веома обимни, свеобухватни и приказани на 25 композитних слика у које је уклопљено 159 микроскопских фотографија. У јетри ембриона и фетуса су идентификоване *CD34, CD117, EPO-R, CD71, CD235a* и *CD68* имунореактивне ћелије. Матичне, прогениторне и прекурсорске ћелије су појединачне или у мањим групама, овалног су облика, различите величине и степена имунореактивности, локализоване у перисинусоидним просторима, синусоидима и, у феталном периоду, у портним просторима. *CD68* имунореактивне ћелије су локализоване у перисинусоидним просторима (Купферове ћелије), где показују изузетан степен полиморфизма, и у везиву портних простора (ткивни макрофаги). Морфометријском анализом нумеричке ареалне густине је показано да су *CD34* и *CD71* имунореактивне ћелије најбројније у другом триместру, док су *CD117* и *CD235a* имунореактивне ћелије најзаступљеније у првом триместру. Нумеричка ареална густина *CD68* позитивних ћелија у јетри је веома висока и

уједначена у свим триместрима, без обзира на мање или веће присуство ћелија хематопоезе.

Дискусија. У дискусији, аутор вешто упоређује и тумачи добијене резултате, са налазима других аутора. Посебна пажња је посвећена разликовању матичних ћелија хематопоезе од других ћелија (ендотелних ћелија, фибробласта, Кахалових ћелија, мастоцита) које показују заједничку имунореактивност. Разлике је могуће направити на основу карактеристика облика, величине и локализације ћелија у јетри. На исти начин се тумачи и разлика *CD68* имунореактивних ћелија, при чему ћелије у перисинусоидним просторима одговарају Купферовим ћелијама, док су ћелије у везиву портних простора ткивни макрофаги. У дисертацији се коментарише мања или већа удруженост матичних и Купферових ћелија са еритробласним острвцима. Посебно се дискутује промена имунореактивности матичних, прекурсорских и прогенитарних ћелија током њихове диференцијације.

Закључци. Формулисано је 9 закључака, у виду концизно уобличених резултата, који у потпуности одговарају постављеним циљевима истраживања.

Литература. Литература садржи 103 навода, међу којима се налазе уџбеници, докторати, магистеријуми, монографије, прегледни и оригинални научни чланци, од којих је 24 публиковано у последњих пет година.

5. Научни резултати докторске дисертације

Анализирајући резултате докторске дисертације, применом научних метода избора и обраде ткива, бојења ткивних пресека, класичним хематоксилин-еозин методом и имунохистохемијским методама за идентификацију антигена карактеристичних за одговарајући ћелијски фенотип, уз примену квантификационог морфометријског метода одређивања нумеричке ареалне густине и одговарајуће статистичке анализе, кандидат је, по први пут, на нивоу светлосне микроскопије, хронолошки, по периодима развоја јетре, и систематизовано, по типу маркера и по заступљености у јетри, изнео морфолошке, имунохистохемијске и морфометријске карактеристике *CD34*, *CD117*, *EPO-R*, *CD71*, *CD235a* и *CD68* имунореактивних ћелија, међу којима су идентификоване матичне (*PHSC*, *CFU-GEMM*), прогениторне (*CFU-E*, *BFU-E*), прекурсорске ћелије еритроцитопоезе и макрофаги.

6. Примјењивост и корисност резултата у теорији и пракси²

Добијени резултати имају велики значај у теоријском доприносу проучавању пренаталне хематопоезе, пре свега у јетри, с обзиром на то да се анализом ових резултата пружа увид у морфолошке карактеристике јетре у развоју, као и њену хематопоезу, посебно еритроцитопоезу, укључујући постојање матичних, прогениторних и прекурсорских ћелија, и њихов однос са Купферовим ћелијама, што заједно чини допуну досадашњим теоретским сазнањима.

Истовремено, у пракси, ова истраживања су повезана и са лечењем имунодефицијентних болести, леукемија и анемија, у пренаталном и раном постнаталном периоду живота, код којих је утврђена сличност гена између оболелих ћелија и ћелија хематопоезе у јетри. На тај начин, резултати који су приказани у овој дисертацији залазе не само у област хистологије и ембриологије, већ и у област хепатологије и хематологије, у склопу интерне медицине и педијатрије.

² Истаћи посебно примјењивост и корисност у односу на постојећа рејешења теорије и праксе

7. Начин презентовања резултата научној јавности ³
<p>Колегиница Јелена Владичић Машић, која се више година бавила питањем хематопоезе у јетри ембриона и фетуса човека, своје резултате је, поред магистарске тезе и докторске дисертације, објавила у два уџбеника хистологије и ембриологије, у једном међународном и једном домаћем часопису (наведени су у библиографији доктората). У наредним месецима, део резултата ће, у виду два рада, бити публикован у међународним часописима.</p>
8. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ ⁴
<p>На основу детаљне анализе докторске дисертације <u>вишег асистента мр сц. Јелене Владичић Машић</u>, под називом „Имунохистохемијске и морфометријске карактеристике хелија еритроцитопоезе у јетри хуманог ембриона и фетуса“, може се закључити да она представља самостално и оригинално научно дело, у којем је примењена научна методологија, одабрана је актуелна тема, дефинисани су јасни циљеви, коришћен је тешко доступан материјал – јетре ембриона и фетуса, примењене су најсензитивније имунохистохемијске методе бојења и квантификације ткивних пресека, уз адекватну статистичку анализу, на основу чега су добијени обимни, бројним микрофоторафијама и дијаграмима документовани резултати, из којих су изведени концизни закључци.</p> <p>На основу свега наведеног, Комисија сматра да је мр Јелена Владичић Машић у потпуности испунила услове за позитивну оцену и одбрану споменуте докторске дисертације. У том смислу, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета у Фочи Универзитета у Источном Сарајеву, да прихвати позитиван извјештај о урађеној докторској дисертацији мр Јелене Владичић Машић и одобри њену јавну одбрану, којом ће кандидат стећи звање доктора медицинских наука.</p>

Мјесто: Фоча

Датум: 18.05.2020. године

Комисија:

1. **Проф. др Миодраг Вучић**, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Нишу, председник комисије;

2. **Проф. др Дејан Бокоњић**, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет у Фочи Универзитета у Источном Сарајеву, члан комисије;

3. **Доц. др Владимир Петровић**, ужа научна област Хистологија и ембриологија, Медицински факултет Универзитета у Нишу, члан комисије.

³ Наводе се радови докторанта у зборницима и часописима у којима су објављени (истраживачки проблеми и резултати предмета истраживања докторске дисертације)

⁴У закључку се, поред осталог, наводи и назив квалификације коју докторант стиче одбраном тезе