

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog** veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 18.03.2024. godine, broj 19/XXII-3/3, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Biohemijske karakteristike, imunohistohemijska ispitivanja i digitalna analiza slika patohistoloških preparata uzoraka creva dece sa zapaljenskim bolestima creva“

kandidatkinje dr Vedrane Makević, zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Mentor je Prof. dr Silvio de Luka, a komentor dr Anđelija Ilić, VNS.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Zoran Bukumirić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Bojan Jorgačević, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Sanjin Kovačević, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. dr Predrag Kolarž, NSV, viši naučni saradnik Instituta za fiziku Beogradu
5. Prof. dr Zvezdan Milanović, redovni profesor, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Vedrane Makević napisana je na ukupno 85 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 31 tabela i 9 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o sastavu komisije

U **uvodu** su detaljno opisane zapaljenske bolesti creva (*Inflammatory Bowel Disease – IBD*), Kronova bolest i ulcerozni kolitis. Specifičnosti pedijatrijske forme ove bolesti posebno su pojašnjene. Etiologija i patogeneza IBD temeljno je opisana, sa posebnim osvrtom na značaj genetske podložnosti, mikrobioma, faktora sredine i imuniteta, glavnih faktora u njenom nastanku. Takođe, na adekvatan način su predstavljena dosadašnja saznanja o značaju

slobodnih kiseoničnih vrsta i oligoelemenata u patogenezi IBD. Dalje, u uvodu je definisana morfometrijska, fraktalna i *Gray-Level Co-Occurrence Matrix* (GLCM) teksturalna analiza.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se od određivanja vrednosti standardnih hematoloških i biohemijskih parametara u krvi dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i u kontrolnoj grupi dece; određivanja koncentracije 13 mikro- i makroelemenata: Na, K, Ca, Mg, Se, Fe, Zn, Cu, Mn, Cr, As, Cd, Al, u serumu i u tkivu creva dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i u kontrolnoj grupi dece, kao i njihovu povezanost sa ostalim ispitivanim parametrima; određivanja parametara morfometrijske, fraktalne i GLCM teksturalne analize jedara enterocita na mikrografijama histoloških preparata koje potiču sa sedam različitih segmenata tankog i debelog creva kod dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i kontrolne grupe dece i njihovu povezanost sa ostalim ispitivanim parametrima; određivanja ekspresije parametra oksidativnog stresa 4-HNE imunohistohemijskom metodom u tkivu creva dece obolele od Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i u kontrolnoj grupi i njegovu povezanost sa ostalim ispitivanim parametrima.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je uključivala pedijatrijske pacijente hospitalizovane u Univerzitetnoj dečijoj klinici u Beogradu i to 20 pacijenata obolelih od Kronove bolesti, 18 obolelih od ulceroznog kolitisa i 20 kontrola. Detaljno je opisan protokol istraživanja, u kome je objašnjen postupak uzimanja uzoraka i njihove dalje obrade. Svi predviđeni postupci u ovoj tezi odobreni su od strane Etičkog odbora Univerzitetske dečije klinike i od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i potpisani su informativni pristanci za učešće u studiji. Sve analize, korišćene za merenje parametara definisanih ciljevima istraživanja su detaljno i na razumljiv način opisane, a pojašnjen je i način skorovanja u sklopu histopatoloških i imunohistohemijskih ispitivanja.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 180 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate, kojim je izvršena

provera originalnosti doktorske disertacije „**Biohemijske karakteristike, imunohistohemijska ispitivanja i digitalna analiza slika patohistoloških preparata uzoraka creva dece sa zapaljenskim bolestima creva**“, autora **dr Vedrane Makević**, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 14%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je navođenja bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi i standardizovanih metodologija, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njene disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Parametri broj eritrocita i fekalni kalprotektin bili su statistički značajno viši, a albumini i ukupni holesterol u serumu statistički značajno niži kod obolelih od UK (ulceroznog kolitisa) i (Kronove bolesti) KB u odnosu na kontrolnu grupu. Parametar HDL holesterol bio je značajno niži, a parametri CRP, trombociti i apsolutni broj granulocita viši kod obolelih od KB u odnosu na kontrole. Sednja zapremina trombocita (mean platelet volume – MPV) je bio značajno viši kod obolelih od UK u odnosu na obolele od KB. Parametar kreatin kinaza značajno se razlikovao među ispitivanim grupama sa najvišim vrednostim kod obolelih od UK, a najnižim kod obolelih od KB. Gvožđe u serumu bilo je značajno niže kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole, a Mn u serumu bio je značajno viši kod obolelih od UK u odnosu na obolele od KB. Bakar u serumu se značajno razlikovao između ispitivanih grupa. U više crevnih segmenata Mg je bio niži kod pacijenata obolelih od zapaljenskih bolesti creva (Inflammatory bowel disease – IBD) nego u kontrolnoj grupi. U tankom crevu bakar, mangan i cink su bili značajno niži kod dece obolele od IBD u odnosu na kontrole, a Mn je bio značajno snižen kod dece obolele od KB u odnosu na kontrole. Kod obolelih od KB postojala je značajna negativna korelacija između serumskog Mn i Mn descendentnog kolona i pedijatrijskog indeksa aktivnosti KB (Pediatric Crohn's disease activity index – PCDAI). Nivo gvožđa u grupama obolelih u pojedinim segmentima creva korelirao je sa zapaljenjskim parametrima, aktivnošću bolesti i obimom ekspresije 4-HNE u epitelnim ćelijama i imunoskorom. Vrednosti toksičnih elemenata Al, As i Cd u debelom crevu bile su značajno snižene u IBD i UK grupi u poređenju sa kontrolama, dok je Cr u transverzalnom delu debelog creva bio značajno viši u obolelih od IBD i KB u odnosu na kontrolnu grupu. U završnom delu tankog creva jedra obolelih od KB značajno su se razlikovala po morfometrijskim karakteristikama od jedara obolelih od UK i jedara u kontrolnoj grupi. Po veličini jedra bilo je moguće izdvojiti obolele od UK od drugih ispitivanih grupa. Na osnovu

cirkularnosti jedara creva mogli su se razlikovati oboleli od KB od kontrole. Rektum je bio odličan segment za morfometrijsku dijagnostiku KB: cirkularnost jedara enterocita leve polovine debelog creva (descendentni, sigmoidni kolon i rektum) pokazala je značajnu negativnu korelaciju sa regionalnim Globalni skor histološke aktivnosti (Global Histology Activity Score – GHAS) u tom delu creva. Deca obolela od UK su imala statistički značajno višu fraktalnu dimenziju (FD) hromatina ćelijskih jedara debelog creva i nižu lakunarnost u odnosu na obolele od KB i kontrole. Mangan je u tankom crevu i ascendentnom kolonu obolelih od KB pozitivno korelirao sa FD i negativno sa lakunarnošću ćelijskog jedra. GLCM teksturalna analiza jedara završnog dela tankog creva pokazala je razliku između jedara obolelih od UK i drugih ispitivanih grupa. Uz par izuzetaka isto je pokazano i u sigmoidnom kolonu. Na osnovu GLCM teksturalnih karakteristika jedara creva rektum i ascendentni kolon pokazali su se kao značajni segmenti za razlikovanje obolelih od KB od kontrolne grupe. Nije bilo statistički značajne razlike u obimu ekspresije 4-HNE između obolelih od UK, KB i kontrolne grupe. Međutim, obim ekspresije 4-HNE (4-hidroksinonenal) u epitelnim ćelijama creva korelirao je sa GLCM teksturalnim parametrima jedara crevnih ćelija.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Uobičajeni laboratorijski nalazi prisutni kod dece obolele od zapaljenskih bolesti creva IBD uključuju anemiju, trombocitozu, hipoalbuminemiju i povećanje markera zapaljenja (Rosen et al., 2015). U ovoj studiji pokazana je razlika između ispitivanih grupa u broju trombocita, serumskim albuminima i CRP. Oboleli od KB imali su značajno niži MPV u odnosu na UK, a i podaci iz literature govore da trombociti kod IBD pacijenata imaju manji MPV nego kontrole (Giannotta et al., 2015). Pokazana je statistički značajno viša vrednost CRP kod KB u odnosu na kontrolnu grupu, ali i odsustvo značajne razlike između UK i kontrolne grupe. Bolesti kao što su KB i reumatoidni artritis dovode do izraženog porasta CRP, dok druge u koje spada i UK, pokazuju slabo izražen ili čak odsutan porast CRP (Vermeire et al., 2004). Visok nivo fekalnog kalprotektina je veoma senzitivan (97%), ali umereno specifičan (71%) za dijagnostiku IBD (Daniluk. et al., 2019). Ova studija potvrdila je odlične dijagnostičke karakteristike fekalnog kalprotektina pokazujući da i oboleli od KB i oboleli od UK imaju statistički značajno više vrednosti ovog biomarkera u fecesu. Ukupni holesterol u serumu bio je statistički značajno niži kod obolelih od UK i KB, a HDL holesterol kod obolelih od KB u odnosu na kontrolnu grupu. Studija sprovedena na deci oboleloj od IBD (Levy et al., 2000) bila je samo delimično u skladu sa ovom tezom, s obzirom da je detektovala smanjenje ukupnog holesterola kod dece obolele od KB, dok razlika u HDL holesterolu nije detektovana (Levy et al., 2000). Parametar kreatin kinaza značajno se razlikovao među ispitivanim grupama sa najvišim vrednostima kod obolelih od

UK, a najnižim kod obolelih od KB. U grupi dece obolele od IBD i KB u odnosu na kontrole došlo je do značajne redukcije serumskog gvožđa, slično kao u studijama drugih istraživačkih grupa (Stochel-Gaudyn et al., 2019, Cho and Yang, 2018, Sturniolo et al., 1998). Koncentracija mangana u serumu značajno se razlikovala u tri ispitivane grupe (KB, UK i kontrola). Nivo mangana u serumu bio je najviši kod obolelih od UK, a najniži kod obolelih od KB. Snižen Mn kod dece obolele od KB, pokazan u ovoj studiji [u serumu, ileumu (statistički značajno sniženje) i skoro svakom segmentu kolona (osim ascendentnog kolona)] u skladu je sa studijama koje sniženje koncentracije ovog metala povezuju sa patogeneom KB (Choi et al., 2020, Nakata et al., 2020). U ovoj tezi pokazane su statistički značajno različite koncentracije serumskog bakra između KB, UK i kontrolne grupe, sa najvišim vrednostima Cu u KB grupi. Više nivoe serumskog bakra kod dece obolele od KB potvrđuju dve studije (Stochel-Gaudyn et al., 2019, Ojuawo and Keith, 2002). U više segmenata creva Mg je bio niži kod IBD pacijenata nego u kontrolnoj grupi

Solidnost i površina jedra u kombinaciji dale su statistički značajnu razliku između KB i UK u čak pet od sedam crevnih segmenata, te njihovo zajedničko korišćenje ima potencijal da se koristi u razlikovanju dva glavna IBD fenotipa, među kojima u 10 do 20% (odnosi se na slučajeve bolesti samo debelog creva) ni kliničari ni patolozi ne mogu da naprave razliku (Farmer et al., 2000). Morfometrijska studija primenjena na ćelijsko jedro, uspešno je razlikovala IBD od granuloma, ali ne i od nespecifičnog kolitisa (Chakraborty et al., 2019). Ova teza pokazala je da jedra kolona dece obolele od UK imaju statistički značajno veću strukturnu i teksturalnu kompleksnost, merenu kroz povišenu fraktalnu dimenziju (FD) i smanjenu lakunarnost u odnosu na kontrole i decu obolelu od KB. Prema podacima iz ranijih istraživanja, povećanje lakunarnosti hromatina je često u kombinaciji sa smanjenjem njegove FD (Metze et al., 2019). Povećanje FD ukazuje na povećan eu/heterohromatin odnos. Smanjena aktivnost histon deacetilaza u kolonu obolelih od UK u odnosu na kolon obolelih od KB pokazana u studiji de Bruyn et al., (2015) mogla bi voditi većoj količini euhromatina u jedru ovih pacijenata. Pregledom literature nije pronađena ni jedna druga studija koja se u okviru istraživanja IBD bavila računanjem FD i lakunarnosti jedarnog hromatina crevnih ćelija. Kada je u pitanju IBD, postoji samo nekoliko slučajeva primene fraktalne analize. Tehnika je bila uspešna u identifikovanju ulcera, između ostalih i onih koji su posledica IBD, na slikama dobijenim pomoću endoskopije video kapsulom (Charisis et al., 2012), a korišćena je i za detektovanje crevnih zvukova kod UK i drugih crevnih poremećaja (Hadjileontiadis i Rekanos, 2003).

Uopšteno na mestima gde je postojala statistički značajna razlika GLCM teksturalnih parametara jedara creva između kontrolne i drugih grupa, jedra kontrola su bila manje uniformna i homogena i u njima je postojao veći kontrast, tj. jedra u kontrolnoj grupi su bila heterogenija i posedovala su kompleksniju teksturu sa većim varijacijama u odnosu na obolele. U našoj studiji se kontrast pokazao kao značajan u izdvajanju UK od kontrolne grupe dajući statistički značajne razlike u svim segmentima koji su se pokazali značajnim u IBD dijagnostici (terminalni ileum, cekum, ascendentni, sigmoidni kolon i rektum). Ova teza nije pokazala statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u obimu ekspresije (bez ekspresije, fokalna ili difuzna ekspresija) 4-HNE ni u epitelu, ni u zapaljenskom infiltratu. Imunohistohemijski skor se takođe nije razlikovao između grupa. Naprotiv, veći broj studija pokazao je povećanje lipidnih peroksida kako na eksperimentalnom modelu tako i kod pacijenata obolelih od IBD-a (Wang et al., 2019). Međutim, ova teza u skladu je sa studijom sprovedenom na pedijatrijskim IBD pacijentima koja nije pokazala različit nivo oksidativnog stresa u odnosu na funkcionalna oboljenja creva (Grzybowska-Chlebowczyk et al., 2018).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Makevic V, Milovanovich ID, Popovac N, Janković S, Janković V, Stefanović S, Bukumiric Z, de Luka SR. Oligoelements in serum and intestinal tissue of pediatric IBD patients. *J Trace Elem Med Biol.* 2023 Sep;79:127239. doi: 10.1016/j.jtemb.2023.127239 (M22, IF 3.5)

Makević V, Milovanovich ID, Popovac N, Janković R, Trajković J, Vuković A, Milosević B, Jevtić J, de Luka SR, Ilić AŽ. Fractal Parameters as Independent Biomarkers in the Early Diagnosis of Pediatric Onset Inflammatory Bowel Disease. *Fractal and Fractional.* 2023; 7(8):619. doi: 10.3390/fractalfract7080619 (M21a, IF 5.4)

Makević V, de Luka SR, Ilić AŽ. Essential trace metals in health and disease. *Medicinski podmladak.* 2023; 74(5):1-8. doi: 10.5937/mp74-43573

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Na osnovu analize priložene disertacije, članovi komisije smatraju da je doktorska disertacija „Biohemijske karakteristike, imunohistohemijska ispitivanja i digitalna analiza slika patohistoloških preparata uzoraka creva dece sa zapaljenskim bolestima creva“ kandidata dr Vedrane Makević, kao prvo ovakvo istraživanje, značajna i aktuelna i da u potpunosti ispunjava uslove za originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na biohemijske karakteristike, imunohistohemijsko ispitivanje i digitalnu analizu slika patohistoloških preparata uzoraka creva dece sa zapaljenskim bolestima creva. Navedena

disertacija predstavlja značajan doprinos u istraživanju patofiziologije zapaljenskih bolesti creva pokazujući promene u nivoima metala u serumu i crevu ovih pacijenata i pruža osnovu studijama koje bi mogle razviti kompjuterski potpomognutu dijagnostiku zasnovanu na morfometrijskim, fraktalnim i GLCM teksturalnim karakteristikama jedara crevnih ćelija.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Vedrane Makević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.03.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Zoran Bukumirić

Doc. dr Bojan Jorgačević

Doc. dr Sanjin Kovačević

NSV dr Predrag Kolarž

Prof. dr Zvezdan Milanović

Mentor:

Prof. dr Silvio de Luka

Komentor:

VNS dr Anđelija Ilić
