

ИЗВЕШТАЈ

О НАУЧНОЈ ЗАСНОВАНОСТИ ЗА ИЗРАДУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и назив органа који је именовао комисију 21.12.2011. Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине, Београд
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, године избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: 1. Др Вања Крстић, редовни професор, Клиничка патологија и терапија животиња, 2011, Факултет ветеринарске медицине, Београд. 2. Др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор, Патолошка морфологија, 2005, Факултет ветеринарске медицине, Београд. 3. Др Оливера Лозанче, редовни професор, Анатомија домаћих животиња, 2011, Факултет ветеринарске медицине, Београд 4. Др Мирјана Лазаревић Мацановић, доцент, Радиолошка, ултразвучна и ендоскопска дијагностика животиња, 2008, Факултет ветеринарске медицине, Београд. 5. Др Миленко Угљешић, редовни професор, Интерна медицина, 2008, Медицински факултет, Београд
II. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Ђорђевић (Момчило) Милена
2. Датум и место рођења, општина, Република: 19. 03.1972. Београд, Савски венац, Србија
3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:
4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:
5. Приказ научних и стручних радова са оценом: <i>А. Рад у часопису индексираном у Current Contents</i> 1. Николић В, Благојевић З, Стијак Л, Радоњић В, Ђорђевић М , Ковачевић Д и Филиповић Б: Myocardial bridges over the ramus interventricularis anterior and its branches in cercopithecus aethiops sabeus. Acta Veterinaria (Beograd), 2009; 55: 2-3, 213 – 221. <i>Б. Рад у часопису индексираном у MEDLINE</i> 1. Спасојевић Г, Малобабић С, Стојановић З, Јандрић С, Ђорђевић М : Digitalna morfometrijska studija ekstrasulkusne površine girusa cinguli čovjeka. Медицински преглед (Нови Сад), 2010; 63, (1-2): 51-56. 2. Бабовић С С, Иванов Д, Мијатов-Укропина Љ, Тоуонага Т, Димитријевић И и Ђорђевић М : Citoarhitektura humanog paraventrikularnog jedra. Медицински преглед (Нови Сад), 2009; 62 (9-10): 417-420. <i>В. Цео рад у часопису који није индексиран у горе наведеним базама података</i> 1. Курељушић Б, Маринковић Д, Обрадовић Ј, Ђорђевић М , Кукољ В: Histopatološka procena najčešćih oboljenja jetre kod mačaka. Vet. Glasnik, 2009; 63 (1-2):103-112. 2. Крстић В, Крстић Н, Илић В, Ђорђевић М : Rendgenska,ultrazvučna i endoskopska dijagnostika

određenih oboljenja želuca kod pasa. Vet. Glasnik, 2008; 62 (3-4):197-206.

Г. Цео рад у зборнику међународног скупа

1. Ђорђевић Милена. „Anatomske specifičnosti digestivnog sistema konja i pojava kolika“. Drugo regionalno savetovanje „Uzgoj, reprodukcija i zdravstvena zaštita konja“ (HorseVille – Science and Profession). Зборник предавања, 2011; 2:28-32.

Д. Извод у зборнику међународног скупа

1. Благојевић М, Мрвић В, Зорић З, Нешић И, **Ђорђевић М**, Радисављевић Г: The splenic artery in small green monkey (*Cercopithecus aethiops sabeus*). XIV Annual conference of veterinarians of the Republic of srpska (Bosnia and Herzegovina) with international participation, Jahorina 2009, Book of Abstracts: 183-184.

2. Грујичић М, Филиповић Б, **Ђорђевић М**, Денц Х, Аксић М, Пушкаш Л: Morphometric study of neuropeptide у and substance p-immunopositive neurons in the inferior parietal lobule cortex in man. Morphology 2007, 41st International Congress of Slovak Anatomical Society, Bratislava 2007, Programme - Abstracts: 41-42.

III. ОБРАЗЛОЖЕНИ КРИТЕРИЈУМИ И РАЗЛОЗИ НА ОСНОВУ КОЈИХ СЕ ЗАСНИВА ПОЗИТИВНА ОЦЕНА ДА ЈЕ КАНДИДАТ ПОДОБАН ДА РАДИ ДИСЕРТАЦИЈУ

Кандидат Милена Ђорђевић, асистент, запослена је на Катедри за анатомију, Факултета ветеринарске медицине у Београду. Дипломирала је на Биолошком факултету на ПМФ-у, студијска група: Молекуларна биологија и физиологија, а потом и на Факултету ветеринарске медицине у Београду, што је условило да се научно-истраживачка делатност кандидата усмери између осталог, ка увођењу савремених молекуларних и клиничких метода дијагностике. Проучавање морфолошких особености дигестивног система и имунопатогенезе ентеропатија паса, представља најужу област интересовања кандидата у протеклом периоду. Свој рад верификовала је и кроз неколико наведених објављених радова, који представљају добру основу за даља истраживања и за одабир теме ове докторске дисертације.

IV. ОЦЕНА ПОДОБНОСТИ ПРЕДЛОЖЕНОГ МЕНТОРА

Ментор др Вања Крстић, редовни професор на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи, Факултета ветеринарске медицине, Београд, објавио је један помоћни уџбеник за студенте ветеринарске медицине и аутор је поглавља књиге за студенте ветеринарске медицине, објавио је 106 радова, од чега 6 у категорији M23. Листа 5 одабраних радова:

1. Траиловић Д., Поповић Н., Траиловић Ружица **Крстић В.**, Илић В. (1992): The doping of racehorses in Serbia from 1983 to 1989. Acta veterinaria, vol 42, No1, Pp 3-6.
2. Божић Татијана, Кнежевић Миљана, **Крстић В.**, Ковачевић Милица. (1999): Alterations of pancreatic acinar cells and biochemical changes in serum due to experimentally induced acute pancreatitis in dogs. Acta veterinaria, vol.49, No.1, Pp 38-50.
3. **Крстић В.**, Маринковић Д., Вакањац Слободанка, Лалошевић Д., Алексић-Ковачевић Сања (2006). Helicobacter spp. in gastroscopic biopsies of dog. Acta Veterinaria, Vol 56, No 4, Pp306-314.
4. Марковић Д., Живојиновић Весна, Јоксановић Весна, **Крстић В.** (2006) Biocompatibility of nanostructured carbonated calcium hydroxyapatite obtained by hydrothermal method. Acta Veterinaria, vol 56, no 5-6, Pp. 541-551.
5. Маринковић Д, Алексић-Ковачевић Сања, **Крстић В.**, Кнежевић Миљана (2009). Morfological findings in the cranial mesenteric artery of horses with verminous arteritis. Acta veterinaria, vol.59, no. 2-3, Pp 231-241

Био је члан комисије при изради и одбрани једне докторске дисертације, ментор при изради и одбрани 3 специјалистичка рада и 6 пута члан Комисије за оцену специјалистичких радова. Предавач је по позиву на више научних скупова у земљи и иностранству. Руководилац или сарадник на више пројеката МНТР Србије

Члан је Српског ветеринарског друштва, Удружења ветеринара мале праксе и Европског удружења имуниг дијагностике.

Од 2008. године је Шеф Катедре за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи, Факултета ветеринарске медицине, у Београду.

V. ОЦЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ:

1. Наслов дисертације

Морфолошке, имунофенотипске и клиничке карактеристике лимфоцитно-плазмоцитног дуоденитиса паса

2. Предмет истраживања

Хроничне ентеропатије чине више од половине свих дигестивних поремећаја код паса. Инфламаторна болест црева (*Inflammatory bowel disease* - IBD, енг.) паса је заједнички назив за низ хроничних ентеропатија које се примарно одликују запаљењем слузнице гастроинтестиналног система и често неспецифичним клиничким симптомима.

Лимфоцитно – плазмоцитни дуоденитис (ЛПД) паса је облик инфламаторне болести дуоденума, представља ентеропатију хроничног тока и често је праћен неспецифичним

клиничким симптомима. Најважнија морфолошка карактеристика имунског одговора, у овом типу инфламаторне болести црева, је налаз мононуклеарног инфилтрата у слузници дуоденума. До данас етиопатогенеза ове болести паса није у свему позната, а нису познате ни све имунофенотипске карактеристике ћелија у инфилтрату, које би биле значајне за разумевање етиопатогенезе. Такође нису установљени прецизни морфолошки критеријуми за постављање дијагнозе, а тек од 2010. године се званично у клиничкој пракси примењују индекси (CIBDAI и CCECAI) за процену тежине (клиничког градуса) болести. Стога, ближе дефинисање ћелијских популација са морфолошког и имунофенотипског аспекта, допринеће бољем разумевању патогенезе лимфоцитно–плазмоцитног дуоденитиса паса, што ће у корелацији са клиничким налазом омогућити постављање прецизне дијагнозе и примену адекватне терапије.

3. Подаци из изабране литературе

Познавање основних карактеристика имунског система слузнице црева као и нормалне морфологије дуоденума паса, неопходно је за разумевање патогенезе ЛПД паса. Високо специјализовани имунски систем мукоза штити мукозне површине од деловања различитих штетних нокси. Локално лимфатично ткиво црева (*Gut associated lymphoid tissue* – GALT, енг.), чини саставну компоненту лимфатичног ткива мукоза (*Mucosal associated lymphoid tissue* – MALT, енг.) и представља значајан резервоар имунских ћелија. Имуни систем црева супримира имунски одговор у већој мери него што га активира, користећи више механизма да заштити домаћина. Неки од механизма заштите подразумевају поуздану физичку баријеру, присуство ензима у лумену црева који мењају природу самих антигена, присуство специфичних регулаторних Т ћелија као и продукцију имуноглобулина А класе (Mayer, 2003; Nagler-Anderson, 2001; Untersmayr и сар., 2006, York и сар., 1999; Sakaguchi и сар., 2008; Nandakumar и сар., 2009). Поремећај на било ком нивоу заштите црева, може довести до запаљења црева или алергијских реакција (Mayer, 2003). Имушке ћелије гастроинтестиналног система су организоване у два, анатомски и функционално, одвојена одељка. У имунски-индуктивном одељку долази до препознавања антигена од стране лимфоцита, што је услов за њихово касније диферентовање у ефекторске ћелије. Овај одељак чине GALT (појединачни лимфни фоликули и удружени лимфни фоликули који су означени као Пејерове плоче) и мезентеријални лимфни чворови (Brandtzaeg и сар., 2008). Имушко - ефекторски одељак обухвата две ламине слузнице, а то су *lamina propria mucosae* и *lamina epithelialis mucosae*. У овом одељку диферентовани лимфоцити врше своју ефекторску улогу (Brandtzaeg и сар., 2005).

Утврђивање инфламаторних промена у узорцима добијеним ендоскопском биопсијом слузнице дуоденума паса, представља важан корак у постављању дијагнозе и лечењу пацијената оболелих од ЛПД. (Simpson и сар., 2011; Craven и сар., 2004). Дуги низ година, нису постојали стандардни критеријуми за интерпретацију хистопатолошких налаза код ЛПД паса. Тешко је било упоређивати резултате због различитих критеријума који су коришћени у току постављања дијагноза (Day и сар., 2008).

Светско удружење ветеринара мале праксе (*The World Small Animal Veterinary Association* – WSAVA, енг.) је увидело значај постојања стандардних критеријума за процену морфолошких промена које се уочавају на биоптатима слузнице црева паса оболелих од инфламаторне болести црева, укључујући и ЛПД паса, те је 2010. године предложена њихова стандардизација (Day и сар., 2008). Служница дуоденума је била предмет проучавања темељних студија у којима су особине дуоденума паса процењиване морфометријским и имунохистохемијским методама (German и сар., 1999; Waly и сар., 2001; Janeczko и сар., 2008). Описане су морфолошке и запаљенске промене које указују на степен инфламације и укључују: испитивање промена на цревним ресицама, утврђивање оштећења цревног епитела, проширења крипти, као и

праћење заступљености интраепителних лимфоцита (IEL), плазма ћелија, еозинофилних гранулоцита и неутрофилних гранулоцита (WSAVA *International Gastrointestinal standardization group*: Washabau и сар., 2010).

Утврђивање детаљних клиничких симптома паса који болују од ЛПД је веома значајно. Коришћењем клиничких индекса активности: CIBDAI (*Canine inflammatory bowel disease activity index*, енг.) и CCECAI (*Canine chronic enteropathy clinical activity index*, енг.) може се прецизније утврдити интензитет болести на основу клиничких симптома. (Jergins и сар., 2003; Allenspach, 2007). До сада није утврђена корелација наведених клиничких индекса са интензитетом морфолошких промена у дуоденуму паса са ЛПД.

4. Циљеви истраживања

Циљ ових истраживања је испитивање и корелација клиничких манифестација, морфолошких и имунофенотипских карактеристика лимфоцитно-плазмоцитног дуоденитиса паса.

У циљу изучавања клиничких манифестација, постављени су следећи задаци:

- Испитивање вредности клиничких, хематолошких и биохемијских параметара који указују на лимфоцитно-плазмоцитни дуоденитис паса.
- Радиолошка и ултразвучна дијагностика.
- Ендоскопска испитивања желуца и дуоденума и извођење ендоскопске биопсије.

У циљу разјашњења морфогенезе лимфоцитно-плазмоцитног дуоденитиса паса постављени су следећи задаци:

- Хистопатолошка испитивања ткивних узорака узетих ендоскопском биопсијом.
- Одређивање дистрибуције CD3+ (Т) и CD79+ (Б) лимфоцита у слузници дуоденума паса оболелих од лимфоцитно-плазмоцитног дуоденитиса.
- Статистичка корелација клиничких и морфолошких манифестација болести.

5. Очекивани резултати

Израчунавањем два наведена клиничка индекса активности: CIBDAI и CCECAI очекује се да ће се прецизно утврдити интензитет болести на основу клиничких симптома. Очекује се такође, да ће морфолошка анализа и имунофенотипизација инфламаторног инфилтрата допринети бољем разумевању морфогенезе и патогенезе лимфоцитно-плазмоцитног дуоденитиса паса. Такође би корелација резултата клиничких и морфолошких испитивања, могла бити посебно корисна за примену одговарајуће терапије код паса оболелих од ЛПД.

6. План рада

План рада обухвата следеће фазе:

- Анамнестичка и клиничка опсервација паса.
- Хематолошка, биохемијска и копролошка испитивања.
- Радиографска и ултразвучна дијагностика.
- Ендоскопски преглед желуца и дуоденума паса.
- Фотодокументација ендоскопских промена.
- Узимање ткивних узорака ендоскопском биопсијом.
- Процесовање биоптата за хистопатолошка испитивања.
- Хистопатолошка испитивања и имунофенотипизација ћелија у биопсијском узорку.

- Фотодокументација микроскопских промена.
- Статистичка обрада података.

7. Методе и материјал истраживања

Материјал: испитивања би обухватила укупно 60 одраслих паса, различите расе и оба пола: 54 пса са симптомима дијареје и повраћања које траје дуже од три недеље и шест клинички здравих паса који би служили као контрола.

Клиничка испитивања би укључила како општи тако и специјални преглед пацијента. На основу података добијених анамнезом, хематолошком и биохемијском анализом крви могли би се израчунати клинички индекси активности: CIBDAI и CCECAI.

Хематолошке анализе (крвна слика) биле би урађене на аутоматском хематолошком анализатору *Abacus Junior Vet Hematology Analyzer SN130612, Hungary*, у моду предвиђеном за псе.

Биохемијска анализа серума биле би урађене уз помоћ полуаутоматског биохемијског спектрофотометра (*Vet evolution - Biochemical System International VT00300, Italy*) и одредили би се следећи параметри: аспартат аминотрансфераза (АСТ), аланин трансаминаза (АЛТ), алкална фосфатаза (АП), уреа, креатинин, укупни протеини, серумски албумини и глукоза.

Копролошка испитивања би обухватила присуство нематода и протозоалних паразита. Микроскопска испитивања фецеса базирала би се на квалитативној методи флотације. Употребљено би се и *SensPERT Giardia Test Kit* (*IDEXX laboratories, USA*), за детектовање антигена *Giardia lamblia* у фецесу, који функционише на принципима имунохроматографије.

Радиолошка испитивања би укључила нативни рендгенски преглед абдомена и специјални рендгенски преглед дуоденума са позитивним контрастним средством (60% водена суспензија баријум-сулфата) апликованим перорално, у дози од 6 до 10 ml/kg телесне масе. Припрема пацијента за радиолошка испитивања би се састојала у једнодневном гладовању без ограничавања уношења течности, уз апликацију клизме 2 до 4 часа пре прегледа у циљу евакуације цревног садржаја. Рендгенска снимања би била обављана помоћу апарата марке SELENOS 4 (ЕИ Ниш), у стандардним пројекцијама (латеро–латералној и вентро–дорзалној), при фокус-филм растојању од 80 cm, а кондиције (KV и mAs) ће приликом снимања бити прилагођене величини сваке животиње.

Ултразвучна дијагностика би била извођена уз претходну припрему пацијента која би подразумевала ускраћивање хране 12 до 24 сата пре прегледа. За ултразвучни преглед био би коришћен ултразвучни апарат *ALOCA 2000* и сонда од 5MHz. За спровођење опште инхалационе анестезије, користио би се инхалациони апарат *Sulla 808 Drager*, а за мониторинг апарат *MINDRAY PM-9000 Vet*.

Ендоскопско испитивање би подразумевало претходну припрему пацијента која би значила ускраћивање хране 12 до 24 сата - и ускраћивање воде 4 сата пре прегледа. Након спровођења опште инхалационе анестезије, животиња се поставља у леви бочни положај, поставља се отварач за уста и приступа се прегледу уз мониторинг виталних функција. За ендоскопски преглед био би коришћен ендоскоп са видео камером *STORC*, који се састоји од ендоскопа (пречника 9 mm), радног канала (пречника 2,2 mm и дужине 140 mm) и извора светла. За извођење ендоскопски вођене биопсије употребио би се специјални биопсер „алигатор“.

Патохистолошка испитивања би укључила детаљан опис морфолошких промена на биопсираним узорцима слузнице дуоденума (промене на цревним ресицама, степен оштећења цревног епитела, постојање проширења крипти, присуство дилатираних лимфних судова и фиброзе) као и праћење заступљености интраепителних лимфоцита (ИЕЛ), лимфоцита, плазма ћелија, еозинофилних гранулоцита и неутрофилних

гранулоцита у инфилтрату слузнице. Ткивни узорци били би фиксирани у 10 % неутралном формалину у трајању од 48 - 72 сата. После фиксирања ткиво се процесује у аутоматском ткивном процесору и уклапа у парафинске блокове са мрежицом за биопсијске узорке. Парафински исечци дебљине 3 до 5µm бојили би се хематоксилин-еозин (ХЕ) и *Giemsa* методом. **Имунохистохемијска испитивања** би се извела у циљу изучавања дистрибуције CD3+ (Т лимфоцита) и CD79+ (Б лимфоцита) у инфилтрату слузнице, применом одговарајућих, комерцијално доступних примарних антитела у оквиру авидин-биотин (*LSAB2*) технике. За свако антитело употребиће се одговарајући предтретман (ензимски, топлотни или оба), за откривање антигена, маскираних фиксирањем у формалину.

У **статистичкој анализи** добијених резултата, као основне методе би користили дескриптивне статистичке параметре. Међусобну зависност промене посматраних параметара установили би на основу коефицијента корелације. Сви добијени резултати би били приказани табеларно и графички. Статистичка анализа добијених резултата би била урађена у статистичком пакету *Prisma Pad 4.00*.

8. Место, лабораторија и опрема за експериментални рад

- Рад би био изведен на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи, на Катедри за радиологију и радијациону хигијену и на Катедри за патолошку морфологију Факултета ветеринарске медицине у Београду.
- **Опрема за клиничка испитивања:** хематолошки анализатор *Abacus Junior Vet Hematology Analyzer SN130612, Hungary*, полуаутоматски биохемијски спектрофотометар (*Vet evolution - Biochemical System International VT00300, Italy*). За радиолошки преглед: апарат *SELENOS 4*. За ултразвучни преглед: апарат *ALOCA 2000* и сонда од 5MHz. За спровођење опште инхалационе анестезије: инхалациони апарат *Sulla 808 Drager*, за мониторинг апарат *MINDRAY PM-9000 Vet*. За ендоскопски преглед: ендоскоп са видео камером *STORC*.
- **Опрема за хистолошке методе испитивања:** аутоматски ткивни процесор, парафинатор, микротом, водено купатило, дигестор, микроталасна пећ и аутоматске пипете.

9. Методе статистичке обраде података и остали релевантни подаци

У статистичкој анализи добијених резултата изведеног експеримента, као основне методе би користили дескриптивне статистичке параметре. Ови параметри би омогућили описивање добијених резултата и њихово тумачење. Приликом тестирања и утврђивања статистички значајних разлика између испитиваних група, користили би два теста: *ANOVA* и *Tukey* тест. Сигнификантност разлика би била установљавана на нивоима значајности од 5% и 1%. Међусобну зависност промене посматраних параметара установили би на основу коефицијента корелације. Сви добијени резултати би били приказани табеларно и графички. Статистичка анализа добијених резултата би била урађена у статистичком пакету *Prisma Pad 4.00*.

ЗАКЉУЧАК СА ОБРАЗЛОЖЕНОМ ОЦЕНОМ О ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ И КАНДИДАТА

На основу приложене документације, Комисија сматра да **Милена Ђорђевић**, дипломирани молекуларни биолог и дипломирани ветеринар, испуњава све услове прописане Законом о високом школству, за израду докторске дисертације. Предложена тема је актуелна и научно заснована. Циљеви и задаци ове дисертације су прецизно дефинисани, а методе које би се користиле за њихову реализацију су валидне и правилно одабране.

Комисија предлаже Наставно-научном већу, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, да прихвати израду докторске дисертације, под насловом: **„Морфолошке, имунофенотипске и клиничке карактеристике лимфоцитно – плазмоцитног дуоденитиса паса“**

Комисија предлаже да се докторска дисертација ради на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи, на Катедри за радиологију и радијациону хигијену и на Катедри за патолошку морфологију, Факултета ветеринарске медицине у Београду. За ментора се предлаже др Вања Крстић, редовни професор Факултета ветеринарске медицине у Београду.

ДАТУМ
10.02.2012.

Чланови комисије

Др Вања Крстић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине

Др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине

Др Оливера Лозанче, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине

Др Мирјана Лазаревић Мацановић, доцент
Факултет ветеринарске медицине

Др Миленко Угљешић, редовни професор
Медицински факултет