

**UNIVERZITET U NIŠU
NASTAVNO NAUČNOM VEĆU
ODBORU ZA DOKTORSKE STUDIJE**

**PREDMET: Izveštaj komisije o izrađenoj doktorskoj disertaciji
Mr. sci. dr Miroslava Milića**

Odlukom Nastavno-naučno veće Medicinskog fakulteta u Nišu broj 10–4145-5 na sednici održanoj 25.04.2018. godine prihvaćen je izveštaj mentora Prof. dr Gorana Ilića o izrađenoj doktorskoj disertaciji mr.sci.dr. Miroslava Milića, doktora specijaliste sudske medicine, pod naslovom „**Histohemijska, imunohistohemijska i morfometrijska analiza promena na srčanom mišiću kod heroinskih zavisnika-autopsijska studija**“ i na predlog Odbora za doktorate, donelo je odluku o formiranju Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije u sastavu:

Prof.dr. Radovan Karadžić, predsednik komisije Medicinski fakultet Niš,
Prof.dr. Goran Ilić, mentor, Medicinski fakultet Niš
Prof.dr. Slobodan Savić, član, Medicinski fakultet Beograd

Nakon detaljnog pregleda izrađene doktorske disertacije, Komisija podnosi Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta u Nišu sledeći

IZVEŠTAJ O IZRAĐENOJ DOKTORSKOJ DISERTACIJI

1. Opšti podaci autora

Miroslav Milić, od oca Slavoljuba, rođen 06.09.1976. godine u Beloj Palanci. Osnovnu i srednju školu završio je u Nišu. Medicinski fakultet u Nišu, na studijskoj grupi medicina, upisao je 1995/96. godine i isti završio 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,05. Nakon obavljenog obaveznog lekarskog staža u Kliničkom centru u Nišu, 2004. godine zasnovao je radni odnos na neodređeno vreme u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu. Specijalistički staž iz sudske medicine započeo je novembra meseca 2006. godine, pri čemu je deo staža (3 meseca) obavio u Centru za patologiju i sudsku medicinu VMA u Beogradu. Specijalistički ispit položio je sa odličnom ocenom dana 30.11.2009. godine pred komisijom Medicinskog fakulteta u Nišu i time stekao stručni naziv specijaliste sudske medicine.

Magistarsku tezu iz oblasti sudske medicine pod nazivom „Sudsko-medicinski i pravni aspekti kvalifikacije povreda maksilofacijalne regije“ odbranio je 2010. godine na medicinskom fakultetu u Nišu i time stekao naučno zvanje magistra medicinskih nauka.

U periodu od 2012. do 2014. godine, kao i u periodu od 2016. do aprila meseca 2018. godine od strane Medicinskog fakulteta u Nišu bio je angažovan u izvodjenju praktične nastave na predmetu Sudska medicina u zvanju kliničkog asistenta, a od 01.04.2018. godine i kao asistent na predmetu Sudska medicina.

Autor je i koautor više od 30 radova publikovanih u domaćim i međunarodnim časopisima i prezentovanim na domaćim i međunarodnim kongresima i simpozijumima.

Član je Srpskog lekarskog društva i ekspertskog tima Zavoda za sudsku medicinu u Nišu u slučajevima identifikacije lica kod masovnih stradanja.

2. Odnos uradjene disertacije prema prijavi i odobrenje teme:

Na osnovu odluke Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu broj 04-802/11 od 10.06.2011. godine odobrena je tema za izradu doktorske disertacije mr sci. med. dr Miroslava Milića, pod naslovom „Histoheмиjska, imunohistoheмиjska i morfometrijska analiza promena na srčanom mišiću kod heroinskih zavisnika-autopsijska studija“. Nevedena tema je izradjena sa principima naučno istraživačkog rada.

Odobreni ciljevi istraživanja i metodologija rada su ostali nepromenjeni tokom izrade doktorske disertacije. Naslov doktorske disertacije se u potpunosti podudara sa sadržajem izrađene disertacije.

3. Karakteristike uradjene doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr. sci dr Miroslava Milića, pod naslovom „Histoheмиjska, imunohistoheмиjska i morfometrijska analiza promena na srčanom mišiću kod heroinskih zavisnika-autopsijska studija“ sadrži sledeća poglavlja: 1) Uvod, 2) Ciljevi istraživanja 3) Materijal i metode 4) Rezultati 5) Diskusija 6) Zaključci i 7) Literatura.

Disertacija je izradjena na 144 strana, bitne činjenice prikazane pomoću 16 slika, 33 grafikona i 8 tabela, uz 295 citata aktuelne literature.

Sveobuhvatni ciljevi predložene studije su bili da se evidentira postojenje, vrsta i obimnost morfoloških promena na srčanom mišiću heroinomana, te da se objasni mehanizam umiranja heroinomana.

4. Ciljevi istraživanja:

1. Da se morfometrijskom analizom utvrdi da li zloupotreba heroina utiče na umnožavanje vezivnog tkiva u miokardu;
2. Da se morfometrijskom analizom utvrdi da li kod osoba čija je smrt u vezi sa zloupotrebom heroina postoji hipertrofija miokardiocita;
3. Da se morfometrijskom analizom definiše vrsta i broj zapaljenjskih ćelija (leukocita, T limfocita, monocita i makrofaga) u miokardu osoba umrlih zbog zloupotrebe heroina u odnosu na lica iz kontrolne grupe;
4. Da se utvrdi da li broj i vrsta zapaljenjskih ćelija u miokardu heroinomana odgovara Dallas kriterijumima toksičnog miokarditisa;
5. Da se morfometrijskom analizom utvrdi broj i distribucija mastocita u miokardu heroinomana u odnosu na kontrolnu grupu;
6. Da se utvrdi korelacija svih napred navedenih parametara u odnosu na deo srca iz koga su isečci za mikroskopsku i morfometrijsku analizu uzeti;
7. Da se utvrdi korelacija svih navedenih parametara u odnosu na pol, starosnu strukturu i dužinu heroinomanskog staža;
8. Da se u odnosu na rezultate morfometrijske analize promena na srčanom mišiću heroinomana pokušaju da objasne mogući mehanizmi umiranja.

5. Materijali i metode rada

Istraživanje je sprovedeno na uzorcima 52 kadavera, odnosno 11 kadavera ženskog i 41 kadaver muškog pola, starosti od 18 do 47 godina, rutinski obdukovanih u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu u vremenskom period od 2009. do 2014. godine.

Ispitivana grupa lica čija se smrt dovodi u vezu sa upotrebom heroina obuhvatala je ukupno 42 kadavera. Prema toksikološkim analizama, u većini slučajeva smrt je bila uzrokovana kombinacijom štetnih supstanci, sa dominantno ulogom heroina. Za svaki od slučajeva u ispitivanoj grupi notirani su pol, starost i dužina heronomanskog staža.

U kontrolnoj grupi sagledavana su 10 kadavera čija smrt je bila posledica višestrukih povreda zadobijenih u saobraćajnim nezgodama. Za slučajeve iz kontrolne grupe nisu dobijeni bilo kakvi podaci o eventualnoj upotrebi opojnih sredstava, a toksikološkim analizama iskjučeno je prisustvo bilo kog leka ili neke druge štetne supstance u organizmu.

Sve obdukcije su izvršene unutar 48 sati od smrtnog ishoda.

U sklopu obdukcija po šest uzoraka tkiva miokarda sa standardizovanih lokacija (prednji, zadnji i bočni zid leve komore, prednji i zadnji zid desne komore i interventrikularni septum) uzorkovano je za histohemijsku i imunohistohemijsku analizu.

Rutinski vršene obdukcije podrazumevale su i uzorkovanje delova tkiva organa (mozak, pluća, srce, bubreg sa mokraćnom bešikom, jetra sa žučnom kesom, želudac i creva sa sadržajem), krvi i mokraće za toksikološku analizu.

U zavodu za sudsku medicinu u Nišu i na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Nišu izvršene su histohemijske, a u Zavodu za sudsku medicinu u Nišu i Centru za patologiju i patološku anatomiju Kliničkog centra u Nišu imunohistohemijske analize isečaka miokarda svih analiziranih slučajeva

Tkivni materijal je podvrgnut rutinskoj obradi do parafinskih kalupova upotrebom dehidratacione linije rastućih koncentracija etanola, prosvetljivanja ksilolom i infiltraciju formalinom, a potom su od svakog kalupa mikrotomom (*Leica RM2255, Leica Microsystems, Nussloch, GmbH, Germany*) sečeni tkivni uzorci debljine 5 μm , koji su za potrebe histohemijske analize dalje nanošeni na obična predmetna stakla, a za potrebe imunohistohemijske analize dalje nanošeni na imunohistohemijska predmetna stakla (*Isolab, Germany*).

Navedeni isecci tkiva su u okviru histohemijskih metoda tretirani hematoksilin eozinom (za morfometrijsku analizu) i modifikovanom Movatovom pentahromskom metodom (za morfometrijsku i deskriptivnu morfološku analizu).

Za imunohistohemijsku analizu svi isecci tkiva miokarda su tretirani standardizovanim postupcima za antitela *CD45R0, LCA (CD45)* i *CD68*.

Od svih histohemijskih i imunohistohemijskih preparata načinjena je fotodokumentacija pod uvećanjima od 40x do 400x za dalju morfometrijsku analizu fotografisanjem digitalnim kamerama *Olympus Pex Lite E-PL3* i *Leica DFC295 (Leica Microsystems, Germany)* koje su montirane na mikroskopu *Olympus BX50 (Olympus, Japan)* i kojima je upravljano programom *LAS Software verzija 4.4.0 (Leica Microsystems, Germany)*.

Tumačenje rezultata modifikovanog Movatovog pentahromskog bojenja:

Plavo do plavo-zelena (alcijan plavo) boje se neutralni i kiseli mukopolisaharidi ekstracelularnog matriksa. Jarko ljubičasto (aldehid fuksin) se boje elastična vlakna. Tamno ljubičasto (hematoksilin) prebojavaju se jedra. Crveno (kiseli fuksin) se boje mišićne ćelije i eritrociti. Svetlo do tamne nijanse žute (alkoholni rastvor šafrana) prebojeni su snopovi kolagenih vlakana. Tirkizno prebojavanje (alcijan plavo) boje se sulfatisane strukture glikozaminoglikana iz granula mastocita.

Tumačenje rezultata imunohistohemijske analize:

- *CD45R0*, klon *UCHL1*; monoklonalno mišje antitelo (*Dako, Denmark*), korišćeno je za obeležavanje T limfocita;

- *CD45*, klon *2B/11* и *PD/26*; monoklonalno mišje antitelo (*Dako, Denmark*), korišćeno je za obeležavanje leukocita;

- *CD68*, klon *PG-M1*; monoklonalno mišje antitelo (*Dako, Denmark*), korišćeno je za obeležavanje monocita i makrofaga, odnosno ćelija koje imaju poreklo mononuklearnih fagocita.

Morfometrijska analiza:

Vršena je u programu za analizu i obradu digitalnih fotografija *Image J* verzija 1.50 (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Spacijalna kalibracija *ImageJ* sistema vršena je pomoću digitalne fotografije objektnog mikrometra, koji je fotografisan pod identičnim uslovima i adekvatnim uvećanjima kao i histohemijski i imunohistohemijski preparati.

Kalibracija *ImageJ* sistema vršena je posebno za sve fotografije koje su nastale pod istim mikroskopskim uvećanjem. U program su otvarane digitalne fotografije objektnog mikrometra, histohemijskih i imunohistohemijskih preparata, koje su fotografisane pod istim uvećanjima i povezivane u adekvatni niz, a potom je vršena kalibracija *ImageJ* sistema. Obeležavanjem pojedinačnih parametara od interesa softver je proračunavao vrednosti od interesa u mikrometrima.

Na ova način na histohemijskim preparatima je merena debljina kardiomiocita i udeo vezivnog tkiva na površini preseka.

Debljina kardiomiocita označavana je pod pravim uglom u odnosu na dužinsku osu kardiomiocita i na sredini kardiomiocita. Nakon obeležavanja parametra, program je kroz ocije merenja izračunavao tačnu debljinu kardiomiocita u mikrometrima

Nakon unošenja testnog mrežnog sistema u program, za svako vidno polje na fotografisano pod uvećanjem od 40x, brojane su tačke preseka testnog sistema koje padaju na vezivno tkivo kako bi bio izračunat udeo veziva. Vrednosti su izračunavane po formuli za violumensku gustinu $V_{vf} = P_f / P_t$ i izražavane su kao procentualna zastupljenost vezivnog tkiva u miokardu.

Broj ćelija koje su obeležene histohemijskim i imunohistohemijskim bojenjem (mastociti, T-limfociti, leukociti, monociti sa makrofagima) brojani su u svakom ispitivanom vidnom polju na digitalni fotografijama snimljenim pod uvećanjem od 400x.

Hemijsko-toksikološka analiza izvršena je primenom tehnika *head space* gasne hromatografije sa plamenjonizujućim detektorom (*HS-GC/FID*) i *head space* gasne hromatografije sa masenim detektorom (*HS-GC/MS*), a identifikacija je izvršena poredjenjem masenog spektra uzorka sa masenim spektrima biblioteka *Willy 7* i *Pfleger Maurer Weber*. Kvantifikacija je vršena metodom internog standarda.

Statistička obrada podataka:

Analiza podataka dobijenih nakon merenja, vršena je u programu *IMB Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.*

Ispitivanje normalnosti raspodele vrednosti u okviru definisanih grupa izvršeno je upotrebom *Kolmogorov–Smirnov* testa za definisane grupe koje su male više od 50 slučajeva, odnosno *Shapiro–Wilk* testa za definisane grupe koje su male manje od 50 slučajeva. Normalnost raspodele je potvrđena ako je ispunjen uslov da je $p > 0,05$.

Neparametrijski testovi korišćeni su za analizu gde je barem jedna od vrednosti parametara odstupala od normalne raspodele.

Neparametrijski *Mann–Whitney* test koji poredi medijane grupa korišćen je i za ispitivanje dve nezavisne grupe na neprekidnoj skali. Statistički značajna veza postoji ako je $p < 0,05$. Statistički pokazatelj veličine uticaja (r) računat je kao $r = z / (N)^{1/2}$, gde je N ukupan broj slučajeva. Veličina uticaja je opisana na sledeći način: 0,1 – mali uticaj; 0,3 – srednji uticaj; 0,5 – veliki uticaj.

Neparametrijski *Kruskal–Wallis* test koji poredi medijane grupa, korišćen je za ispitivanje tri ili više nezavisnih grupa na neprekidnoj skali. Statistički značajna veza postoji ako je $p < 0,05$. Ako bi *Kruskal–Wallis* test definisao da postoji grupna statistički značajna razlika među pojedinim grupama, naknadno je radjen *Mann–Whitney* test za poredjenje pojedinačnih parova grupa.

Jednofaktorska analiza varijanse (*One Way ANOVA*) sa *Tukey post hoc* testom, korišćena je za poredjivanje varijansi između više od dve grupe koje su male normalan raspored analiziranih vrednosti, dok je za analizu dve grupe korišćen T-test.

Prikazane su F vrednost i p vrednost, pri čemu je smatrano da postoji statistički značajna razlika ako je $p < 0,05$. Za procenu jačine veze korišćen je *Cohen d* (eta kvadrat). Veličina njegovog uticaja tumačena je na sledeći način: 0,01 – mali uticaj; 0,06 – srednji; 0,14 – veliki uticaj.

Koeficijent *Pearson* linearne korelacije (r) korišćen je da bi se odredila jačina i smer linearne veze između dve neprekidne promenljive. Smer veze je odredjen na osnovu pozitivne ili negativne vrednosti koeficijenta *Pearson* linearne korelacije. Jačina korelacije tumačena je tako što je apsolutna vrednost r opisivana na sledeći način: $r = 0,1 - 0,29 \rightarrow$ mala korelacija; $r = 0,3 - 0,49 \rightarrow$ srednja korelacija; $r = 0,5 - 1 \rightarrow$ velika (jaka) korelacija. Kao grafički prikaz ove analize korišćen je dijagram rasturanja.

Svi rezultati morfološke, morfometrijske i statističke analize su prikazani kroz 16 slika, 33 grafikona i 8 tabelarnih prikaza u poglavlju delu teze koje se odnosi na rezultate rada.

6. Zaključak

Zaključci rada su prezentovani jasno, sažeto formulisani i predstavljaju potpune odgovore na postavljene ciljeve istraživanja.

Najvažniji zaključci istraživanja su:

1. Morfometrijskom analizom utvrđeno je da kod heroinomana postoji signifikantno uvećanje debljine kardiomiocita.

2. Paralelno sa hipertrofijom na srčanom mišiću mestimično se javlja i atrofija kardiomiocita, najverovatnije kao direktna posledica hipoksijskih epizoda u sklopu ponovnih akata uzimanja heroina.

3. Umnožavanje perivaskularnog i intersticijalnog vezivnog tkiva koje zamenjuje kardiomiocite u srčanom mišiću heroinomana je statistički signifikantno.

4. Umnožavanje vezivnog tkiva u srčanom mišiću heroinomana najverovatnije nastaje kao posledica ponavljanih i prolongiranih hipoksijskih epizoda srčanog mišića u sklopu zloupotrebe heroina.

5. Hemodinamski opterećeniji delovi srčanog mišića (desna komora i septum) verovatno su više izloženi hipokrijskim efektima, a oštećenja na kardiomiocitima nastala usled hipoksije predstavljaju signal za remodeliranje miokarda kiseonik manje zavisnim tkivom (vezivnim tkivom), što je praćeno prisustvom većeg broja zapaljenjskih ćelija i mastocita upravo u tim područjima.

6. Broj zapaljenjskih ćelija u srčanom mišiću heroinomana ne zadovoljava Dallas kriterijume na osnovu kojih bi mogli da dijagnostikujemo toksični miokarditis..

7. U septalnom delu miokarda heroinomana, morfometrijskom analizom je utvrđeno prisustvo statistički visoko signifikantno većeg broja mastocita, pre svega po obodu zona perivaskularne i/ili intersticijalne fibroze.

8. Umnoženo vezivno tkivo u srčanom mišiću, kao i hipertrofisani kardiomiociti, mogu predstavljati razlog pojave akutnih malignih poremećaja srčanog ritma kao mogućeg neposrednog uzroka smrti kod heroinomana.

9. Morfološke promene na srčanom mišiću heroinomana mogu predstavljati osnovu nastanka hronične kardiomiopatije koja, gledano u dužem vremenskom period, može biti razlog zatajivanja srčane funkcije i nastanka smrtnog ishoda.

7. Ocena naučnog doprinosa disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Miroslava Milića pod naslovom „Histochemijska, imunohistochemijska i morfometrijska analiza promena na srčanom mišiću kod heroinskih zavisnika-autopsijska studija“ ima nesumljiv doprinos koji se ogleda u sledećem:

Savremeno doba nosi svest o tome da se neprekidno menjaju načini zloupotrebe psihoaktivnih supstanci. Sami tim postoji potreba za postavljanje efikasne osnove za lečenje i prevenciju zavisnosti, ali samo ukoliko budemo bili u mogućnosti da razumemo mehanizme zavisnosti i patoloških procesa aktiviranih zloupotrebom psihoaktivnih supstanci.

Iznenadna smrt zbog upotrebe heroina je sve veći globalni zdravstveni problem koji prepoznaje i Svetska zdravstvena organizacija. Činjenica da heroinomani imaju 10 puta veći rizik od prevremene smrti, te da se smrtni slučajevi javljaju uglavnom među ljudima starosne dobi oko 30 godina, predstavljaju pored zdravstvenog i veliki socio-ekonomski problem, jer se na taj način gube mnoge godine produktivnog života.

Medju mogućim razlozima umiranja heroinomana u savremenoj literaturi veoma često je razmatrana patologija respiratornog sistema (edem pluća) i patologija CNS-a (centralna depresija disanja). Kardiovaskularna patologija je razmatrana uglavnom kroz funkcionalne srčane poremećaje na osnovu kliničkih parametara. Mali je broj studija i naučnih radova uopšte koji se odnose na morfološke promene na srčanom mišiću kod heroinomana i pokušaj da se kroz morfološki manifestne promene pokuša da objasni neposredni uzrok smrti heroinomana.

Rezultati aktuelnog istraživanja omogućili su da se na jedan neposredan način prikažu morfološke promene na srčanom mišiću heroinomana, te je na taj način potenciran problem pojave poremećaja rada i funkcije srca koji proističu iz tih promena. Istovremeno ukazano je na potrebu da se u budućnosti sa povećanom budnošću razmišlja o posledicama do kojih zloupotreba heroina dovodi na srčanom mišiću, pa samim tim i o mogućnosti da se preventivno deluje u situacijama kada je život heroinomana ugrožen zbog administracije ovog opojnog sredstva.

Takođe, rezultati aktuelne studije ukazuju na opravdanost sprovođenja budućih istraživanja u ovoj oblasti koja se odnose na proces imunog odgovora kod heroinomana, kao i na brzinu i stepen reparativnih procesa u postupku remodelacije miokarda, naročito unutar prvih 5 godina od početka zloupotrebe ovog opojnog sredstva. Na taj način bi se dodatno pojasnila brzina i intenzitet reparativnih procesa, mehanizmi umiranja heroinomana i postavio osnov za prevenciju štetnih efekata heroinomanije.

8. Zaključak komisije

Doktorska disertacija mr. sci. dr Miroslava Milića, specijaliste sudske medicine, pod naslovom „Histoheмиjska, imunohistoheмиjska i morfometrijska analiza promena na srčanom mišiću kod heroinskih zavisnika-autopsijska studija“ proizašla je iz samostalnog i originalnog naučnog rada iz multidisciplinarne oblasti, čija je suština izražena kroz postavljene zadatke u cilju istraživanja, pregledno izloženim rezultatima rada i detaljnom diskusijom koji su omogućili donošenje odgovarajućih i značajnih zaključaka, uz adekvatno korišćenje literature.

Istraživanje je uradjeno u skladu sa dobro postavljenim ciljevima. Korišćene su odgovarajuće statističke metode u sagledavanju i interpretaciji rezultata.

U svetu je sve veći broj lica koja koriste heroin i sve veći broj smrtnih ishoda zbog heroinomanije, zbog čega heroinomanija predstavlja globalni zdravstveni problem prepoznat i od WHO.

Izradjena disertacija predstavlja originalni i samostalni naučni rad sa značajnim doprinosom u sagledavanju morfoloških promena na srčanom mišiću kod heroinomana i objašnjenju razloga nastanka smrtnih ishoda kod heroinomana proisteklih iz patologije kardiovaskularnog sistema. Dobijeni rezultati ukazuju na opravdanost sprovođenja istraživanja u ovoj oblasti koja se odnose na proces imunog odgovora kod heroinomana, kao i na brzinu i stepen reparativnih procesa u postupku remodelacije miokarda, naročito unutar prvih 5 godina od početka zloprebe ovog opojnog sredstva, sve u cilju pojašnjavanja mehanizam umiranja heroinomana i postavljanja osnova za prevenciju štetnih efekata heroinomanije.

Komisija u navedenom sastavu prihvata i pozitivno ocenjuje izradjenu doktorsku disertaciju mr sci. dr Miroslava Milića pod naslovom „Histoheмиjska, imunohistoheмиjska i morfometrijska analiza promena na srčanom mišiću kod heroinskih zavisnika-autopsijska studija“ i predlaže Nastavno naučnom veću Medicinskog fakulteta u Nišu da ovu disertaciju prihvati i pokrene postupak za njenu javnu odbranu.

ČLANOVI KOMISIJE


Prof. dr Radovan Karadžić, predsednik komisije, Medicinski fakultet Niš


Prof. dr Goran Ilić, mentor, Medicinski fakultet Niš


Prof. dr Slobodan Savić, član, Medicinski fakultet Beograd

