

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-14219/3-6, од 24.12.2014. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Неде Огњановић, под називом:

“Утицај пола на морфологију неурона предњег хуманог хипоталамуса“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Ивана Живановић Мачужић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија, председник;
2. **Проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
3. **Проф. др Александар Маликовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Анатомија, члан;

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија кандидата

Огњановић (Милош) Неда је рођена у Крагујевцу 14.06.1981. године. Уписала је Медицински факултет у Крагујевцу 2000. године, где је и дипломирала 2009. године (просечна оцена 8.67). Обавила је обавезни лекарски стаж и положила стручни испит 25.01.2010. године. Након завршених основних студија уписала је академске докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу у октобру 2010. године, изборно подручје Неуронауке. Усмени докторски испит је положила 25. 06. 2012. године оценом 10 (десет). Проглашена за најбољег сарадника претклиничких предмета на интегрисаним академским студијама медицине 2011.године. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару. Едукована за методе бојења (Голци и имунохистохемија) на Катедри за анатомију и институту центра за патологију у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: “Утицај пола на морфологију неурона предњег хуманог хипоталамуса“

Предмет: Испитивање 40 хемисфера хуманог мозга (20 мушких и 20 женских), имунохистохемијски и Голџи методом импрегнације ради одређивања базичне морфологије и типизације неурона супраоптичког и паравентрикуларног једра, карактеристика тела неурона, дендрита и аксона, као и испитивање полних разлика у неуронској морфологији.

Хипотеза:

1. Не постоје полне разлике у базичној морфологији неурона предњег хуманог хипоталамуса
2. Полне разлике у квантитативним карактеристикама ова два нуклеуса не постоје
3. Поједини нуклеуси показују полне разлике у дендритским особинама, рамификацији, густини спина
4. Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора неурона супраоптичког и паравентрикуларног једра је полно условљена

2.3. Подобност кандидата:

Кандидат има 4 публикована рада из области претклиничких и клиничких истраживања. Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у рецензираном часопису, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

Neda Ognjanović, D. Jeremić, Ivana Živanović-Mačužić, Maja Sazdanović, P. Sazdanović, Irena Tanasković, J. Jovanović, R. Popović, R. Vojinović, B. Milošević, M. Milosavljević, D. Stojadinović, J. Toševski and Maja Vulović. MDCT Angiography of anatomical variations of the celiac trunk and superior mesenteric artery. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 66 (1), 233-240, 2014 **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Неуроморфологија супраоптичког и паравентрикуларног једра је истраживана различитим техникама визуелизација. На основу тих техника дошло се до података о базичној морфологији неурона хипоталамуса, као што су дијаметри, запремине неурона, дужина дендритске мреже, типови и густина спина. На основу ових параметара су извршене типологизације неурона и описане једарне везе. Већина истраживања је базирана на анималним моделима који су дали основну информацију о морфологији.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај студије је, пре свега, у обради хуманог материјала. Оно што знамо о морфологији и цитоархитектоници ове структуре, највећим делом је базирано на истраживању анималних модела, док је хумани материјал био готово изостављен. Боље познавање морфолошке основе функционалних својстава нуклеуса супраоптикуса и нуклеуса паравентрикулариса човека неопходно је ради потврде њиховог предложеног

функционалног концепта, којим се претпоставља да су структуре предњег хипоталамуса укључене у многобројне функције регулације хомеостазе и неуровегетативног система. У нашим пилот истраживањима постоје јасне назнаке, да је разлика у морфологији неурона медијалног хипоталамуса полно условљена и да ћемо даљим истраживањем доћи до значајних резултата.

Циљ и хипотезе студије

Примарни циљ ове студије је да се истражи базична морфологија, као и постојање полних разлике неурона предњег хуманог хипоталамуса. На основу примарног циља дефинисани су остали циљеви истраживања:

-Дефинисати Голџи типизацију неурона нуклеуса супраоптикуса и нуклеуса паравентрикулариса

-Истраживање квантитативних карактеристика тела неурона - максимални дијаметар неурона (Дмах), минимални дијаметар неурона (Дмин), запремина соме (В) , карактеристика дендрита – тотална дендритска дужина (ТДЛ) и карактеристика аксона.

-Одредити одлике дендрита, дендритске арборизације, организације, рамификације, присуство спине и типове спина.

-Дефинисати одлике аксона, аксонске организације, рамификације, арборизације.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Супраоптичко и паравентрикуларно једро хуманог хипоталамуса су део лимбичког система и својим усходним и нисходним конекцијама дају свој значајан допринос рада целокупног система. Досадашња истраживања су се базирала на анималним моделима дајући информације о функционалности лимбичког система.

Будући да анимални модел, иако представља фундаментални принцип рада, он ипак није у потпуности применљив на хуманом материјалу. Досадашња испитивања су се базирала на испитивању анималних модела, испитујући неуроморфологију супраоптичког и паравентрикуларног једра. Истраживање ће користити технике и методе које су примењене на анималним моделима, али за разлику од њих, бавиће се хуманим материјалом.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Спроводиће се експериментална *in vitro* студија на материјалу хуманог порекла у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Популација која се истражује

Истраживање ће бити спроведено тако да се изврши испитивање на 10 женских и 10 мушких хуманих мозгова (40 хемисфера) старости од 20 до 75 година, без патолошких знакова, видљивих малформација и психијатријске анамнезе. Будући да испитивани

хумани материјали припадају постојећем фондусу Центра за патологију, Клиничког Центра Крагујевац, који је обрађен у периоду пре 2010. године, немогуће је доставити писани, добровољни пристанак уз пуну обавештеност. Такав материјал је узоркован за истраживање базичне морфологије неурона хуманог хипоталамуса. Мозгови су, након дисекције, фиксирани унутар десет часова од тренутка смрти. За фиксирање је коришћен фосфатно-пуферизовани раствори 10% формалина, а мозгови су у овим растворима били фиксирани у периоду од најмање три месеца. Након фиксације, мозгови су били сечени у калупе који су потребни за одговарајућа бојења, у периоду од 2007. до 2010. године у Центру за патологију. У студији ће бити примењиване методе које се користе у рутинској истраживачкој пракси Катедре за анатомију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Материјал и методе

Истраживање обухвата неколико хистолошких метода ради утврђивања цитоархитектонику и морфологије једара и ћелија. У циљу разликовања једра од околних структура користи се метод бојења неурона по Голцију. Голци техника је једна од најинтересантнијих и најкориснијих техника, због тога што приказује облик неурона у целини. Осим тога, ова техника даје велики број информација о дендритској арборизацији, аксонској рамификацији, присуству и броју спина, синапсама итд.

За Голци технику користе се блокови ткива димензија 2 X 2 X 1 cm. Фиксација се врши у 10% формалину 6-12 месеци, након чега се препарати стављају у 2,5% K_2CrO_5 на температури од 37⁰ Ц у мраку, уз често мењање раствора у трајању од 2 до 4 дана. Блок ткива се испира у 2,5% раствору $AgNO_3$. Следећи корак у бојењу подразумева импрегнацију блока у 2,5% раствору $AgNO_3$ током 4 дана у мраку на собној температури. После низа растућих концентрација алкохола (од 60% до 100%), блок ткива се калупи у парафину. Блок се сече на исечке дебљине од 80 до 100 μm , на микротому. Након депарафинизације ткиво се покрива ДПХ-ом и покровном љуспицом. Имунохистохемијске методе указују на неуротрансмитерску и модулаторну активност појединих неурона, као и морфолошке одлике појединих неурона указујући на типове неурона, облик и морфологију соме, дендрита и аксона (Голци лајк метода). Парафински блокови се секу на ткивне исечке дебљине 8-10 μm , затим се препарати депарафинишу применом ксилола и сукцесивном изменом алкохола доводе до најблажег раствора (100%, 96%, 70%). Депарафинисани препарати се обрађују раствором којим се разоткривају епитопи, који се након имунохистохемијског бојења могу детектовати. Потом се препарати испирају ПБС-ом (фосфатно-пуферизованим раствор NaH_2PO_4 и KH_2PO_4) чији је ПХ=7,2. Даља процедура подразумева примену 3%-ог хидрогена у циљу блокирања ендogene пероксидазе и поновно испирање ПБС-ом (14).

За имунохистохемијско бојење користе се примарна моноклонска анти-хумана мишја антитела, специфична за естрогенске и прогестеронске рецепторе, која се везују за рецепторе садржане у соми или наставцима неурона. Након укапавања примарног антитела, препарати се инкубирају 60 минута у воденом купатилу, а потом се испирају ПБС-ом. За даљу процедуру користе се секундарно бионтинисано анти-мишје антитело, стрептавидин-ХРП (хорсерадисх перокидазе) и ДАБ (3,3 – диаминобензидине), који се сукцесивно наносе на препарате, који се после примене сваке од наведених супстанци, испирају у ПБС-у. После ових поступака, препарати се испирају дестилованом водом,

боје раствором хематоксилина и поново испирају водом. Даља процедура подразумева дехидратацију препарата растућим концентрацијама алкохола (70%-им, 96%-им и 100 % алкохолем). После низа растућих концентрација алкохола, класичне дехидратације (просветљавање) препарата ксилолом, препарати се прекривају ДПХ -ом и покровном љуспицом. Светлосна микроскопија се обавља на Leica DMLV 2 микроскопу.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

С обзиром да се у истраживању користи неколико хистолошких метода ради утврђивања цитоархитектонике и морфологије једара и субједарне организације неурона, очекује се висока морфолошка комплексност структура предњег хипоталамуса, која би била у складу са његовом веома важном улогом у метаболичким процесима. Очекује се да се полне разлике појаве на функционално најактивнијим деловима нуклеуса супраоптикуса и нуклеуса паравентрикулариса, као што су дендритска арборизација и густина спина.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Хипоталамус је структура диенцефалона која интегрише важне неуроендокрине, неуровегетативне и лимбичке функције, и хијерархијски има велики значај у хомеостази људског организма. Примарни циљ ове студије је да се истражи базична морфологија, као и постојање полних разлике неурона предњег хуманог хипоталамуса. Истраживање ће бити дизајнирано на начин да се у оквиру експеримента који ће се обавити на узорку од 20 хуманих мозгова (10 мушких и 10 женских) утврде карактеристике неуронске морфологије нуклеуса супраоптикуса и нуклеуса паравентрикулариса (карактеристике соме, дендрита и аксона). Очекује се да се полне разлике појаве на функционално најактивнијим деловима нуклеуса супраоптикуса и нуклеуса паравентрикулариса као што су дендритска арборизација и густина спина и да ће разлике у неуронској морфологији једара предњег хипоталамуса бити полно условљене.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **проф. др Саздановић Предраг**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Анатомија.

2.12. Научна област чланова комисије

- 1. Проф. др Ивана Живановић Мачужић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија, председник;
- 2. Проф. др Ирена Танасковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
- 3. Проф. др Александар Маликовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Анатомија, члан;

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Неде Огњановић комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да донесе нове и до сада мало познате податке о базичној морфологији, као и постојање полних разлике неурона предњег хуманог хипоталамуса.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Неде Огњановић бити од великог научног и практичног значаја у смислу бољег познавања морфолошких основа функционалних својстава нуклеуса супраоптикуса и нуклеуса паравентрикулариса предњег хуманог хипоталамуса.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Неде Огњановић под називом **“Утицај пола на морфологију неурона предњег хуманог хипоталамуса”** и одобри њену израду.

1.Проф. др Ивана Живановић Мачужић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија

2.Проф. др Ирена Танасковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија

3. Проф. др Александар Маликовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Анатомија
