

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije mr sci med Ljiljane Milić pod naslovom: „**Prognostički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu**”.

Etički komitet je dao saglasnost za izradu ove disertacije dana 14.05.2012. pod brojem 29/V-5.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

Prof. dr Aleksandar Karamarković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu;

Prof. dr Ana Šijački, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu;

Dr Desanka Bogojević, naučni savetnik u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

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 mr sci med Ljiljane Milić pod naslovom: „Prognostički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu” napisana je na 122 strane i podeljena je na sledeća poglavlja sa pripadajućim potpoglavljima: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno pet grafikona, 19 tabela i jedna slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i tri priloga.

U **Uvodu** je dat pregled peritonitisa (etiologije i patogeneze, kliničkih oblika i podela), načini dijagnostike intraabdominalne sepse, terapijski koncept lečenja intraabdominalne sepse, hirurško lečenje peritonitisa i njegovih uzroka, načela antimikrobne terapije kao i principi intenzivne terapije ovih bolesnika. Navedeni su i opisani patofiziološki skorovi koji se koriste u jednicama intenzivnog lečenja i prilikom odlučivanja o operativnom lečenju (APACHE II i ASA skor). Detaljno je opisana imunopatogeneza sepse: početni imunski odgovor, reakcije endotela i epitela, proinflamatorni i antiinflamatorni odgovor i sistem koagulacije/koagulopatija u sepsi. Posebno su obrađeni inflamatorni markeri sepse (proteini akutne faze i to C-reaktivni protein, serumski amiloid A, prokalcitonin) sa posebnim naglaskom na HMGB1 (High Mobility Group Box 1) protein, njegovu strukturu, ulogu kao proinflamatornog medijatora, njegovog regenerativnog efekta i istaknuta je uloga HMGB1 proteina kao terapijske mete u zapaljenskom procesu.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u proceni prognostičkog značaja određivanja postoperativnog nivoa HMGB1 proteina u serumu pacijenata sa difuznim sekundarnim peritonitisom i ispitivanju uloge HMGB1 u predikciji mortaliteta u uslovima razvijenog septičnog sindroma.

Takođe je kao cilj definisana i komparativna analiza kinetike HMGB1 proteina sa drugim serumskim markerima inflamacije – prokalcitoninom, C-reaktivnim proteinom, serum amiloidom A u uslovima razvijenog septičnog sindroma.

U poglavlju **Materijal i metode** navodi se da je **studija** kohortna, izvedena na Klinici za Urgentnu hirurgiju Urgentnog Centra, Kliničkog Centra Srbije i Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu.

Navedeno je koliko je pacijenata bilo uključeno u studiju, kao i uključni i isključni kriterijumi. Opisane su i kontrolna i studijska grupa, sa pripadajućim parametrima.

Metodološki je definisan način dijagnostike abdominalne sepse. Takođe je definisan i difuzni peritonitis.

Navodi se način stratifikacije stanja i težine fiziološkog odstupanja od normale kod ispitivanih pacijenata, na prijemu i tokom bolničkog lečenja, pomoću APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) skor i ASA (American Society of Anesthesiologist) skor. Takođe su definisane indikacije za operativno lečenje.

Takođe, metodološki su obrađene **laboratorijske metode** za određivanje praćenih parametara, pored standardnih, vrednosti D-dimera, plasminogena, antitrombina III (AT III), C-reaktivnog proteina (CRP), prokalcitonina (PCT), serum amiloida A (SAA) i HMGB 1 u serumu ispitivanih pacijenata. D-dimer je određivan turbidimetrijski pomoću lateks turbidimetrik D-dimer PLUS testa. Berihrom (Berichrom) plazminogen test i Berihrom (Berichrom) antitrombin III test su korišćeni za spektrometrijska merenja biološke aktivnosti plazminogena i antitrombina III. CRP je određivan imunoturbidimetrijski, a PCT pomoću kombinovane imonosaj sendvič metode sa finalnom fluorescentnom detekcijom (ELFA). Nivo HMGB1 proteina u serumu pacijenata određivan je kvantitativnom Western imunoblot analizom korišćenjem poliklonskog anti-HMGB1 antitela.

Statistički su obrađeni demografski, etiopatološki, laboratorijski, mikrobiološki, klinički i podaci o hirurškim intervencijama kao i postoperativni morbiditet.

U statističkoj analizi srednjih vrednosti ispitivanih obeležja koristi se *t*-test za male uzorke a za atributivna obeležja i razliku u učestalosti Fisherov *t*-test. Korišćene su i oblik zavisnosti, regresione statističke metode, Pearsonov koeficijent korelacije i multivarijantna analiza.

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 345 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ova studija pokazuje da vrednosti CRP-a, PCT-a, SAA i HMGB1 su bile statistički značajno više kod pacijenata sa peritonitisom preoperativno u odnosu na pacijente sa kilama (kao kontrolnom grupom). PCT, CRP i HMGB1 su pri tom, takođe imali statistički značajno više vrednosti kod pacijenata u grupi bolesnika sa sepsom u odnosu na pacijente u grupi SIRS.

Sva četiri markera inflamacije su pokazala značajne promene tokom vremena praćenja. Pri tome su se vrednosti CRP-a, SSA i HMGB1 statistički visoko značajno razlikovale među pacijentima u grupi SIRS u odnosu na grupu sa sepsom; samo za SSA i HMGB1 se pokazalo da su obrasci promene u toku vremena različiti u pomenute dve grupe. Najosetljiviji parametri u grupi markera inflamacije na uticaj operativnog lečenja ingvinalne kile, bili su HMGB1 i SSA, oba pokazavši statistički visoko značajan skok neposredno postoperativno.

Vrednosti HMGB1 su se statistički vrlo značajno razlikovale u grupi septičnih bolesnika u odnosu na grupu SIRS tokom perioda praćenja. Kod pacijenata sa sepsom vrednosti HMGB1 blago opadaju prvih dana posle operacije, dosežući najnižu tačku trećeg dana praćenja. Potom rastu sa varijabilnim nagibom do sedmog postoperativnog dana, da bi nakon toga opet gubili na visini vrednosti. S druge strane, u grupi SIRS najniže vrednosti se registruju već prvog postoperativnog dana praćenja, da bi potom postepeno porasle sa maksimumom u trećem postoperativnom danu i oscilirale potom između te dve vrednosti do kraja perioda praćenja.

SAA nivoi su se statistički visoko značajno razlikovali u grupi sa sepsom u odnosu na grupu SIRS tokom perioda praćenja. Koncentracija SSA je statistički visoko značajno rasla nakon prvog postoperativnog dana, a zatim kontinuirano opadala do kraja perioda hospitalizacije kod septičnih bolesnika. Nasuprot tome, kod grupe SIRS je vrednost nakon prvog postoperativnog dana prolazno snižena u odnosu na preoperativnu vrednost i zatim je nastavila da opada tokom perioda hospitalizacije.

Vrednosti PCT-a su se statistički značajno menjale tokom vremena praćenja. Postojao je jasan skok u vrednostima prvog postoperativnog dana, a nakon toga PCT pokazuje stalan opadajući trend do kraja perioda praćenja, kako u grupi SIRS tako i u grupi bolesnika sa sepsom.

CRP vrednosti su bile statistički značajno više u grupi septičnih pacijenata u odnosu na grupu SIRS tokom celog perioda praćenja. Koncentracija CRP-a se statistički visoko značajno menjala tokom vremena: evidentan je postoperativni porast tako da je dostigla maksimalnu vrednost drugog postoperativnog dana, zatim je vrednost padala u kontinuitetu do kraja hospitalizacije. Ovakav obrazac promene koncentracije CRP-a je bio prisutan u obe grupe.

Shodno intraoperativnom nalazu, u grupi bolesnika sa sepsom najviše je rađena apendektomija a u grupi SIRS sutura ulkusa. Distribucija po tipu operativne intervencije se statistički značajno razlikuje u grupama pacijenata sa sepsom i SIRS-om.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Intraabdominalna infekcija dovodi do aktiviranja inflamatornog odgovora koji generiše stvaranje brojnih medijatora odgovornih za zbivanja u peritonitisu, što sugerira da bi se neki od ovih medijatora mogli koristiti kao markeri težine novonastale sepsa (Enguix i sar, 2001), ali pre svega da bi identifikovali ili isključili novonastalu sepsu. Gustot i sar. konstatuju da od mnogobrojnih markera koji se koriste u sepsi, nijedan nema dovoljnu specifičnost i senzitivnost da bi se rutinski koristio u kliničkoj praksi. Takođe, zaključuju da je malo verovatno, s obzirom na kompleksnost inflamatornog odgovora u sepsi da će biti pronađen jedan idealan biomarker. Smatraju da bi kombinacija nekoliko markera bila efikasnija u identifikovanju sepsa.

Analizirana studija pretpostavlja da bi i HMGB1 kao kasni marker sepsa, mogao biti značajan prognostički marker u sekundarnom peritonitisu.

U studiji su ispitivani i akutni markeri sepsa kao što su CRP, PCT i SAA kod pacijenata sa peritonitisom i kod pacijenata sa kila. Došlo se do zaključka da su vrednosti CRP-a bile značajno više u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS na prijemu, što je objašnjeno intenzivnijim inflamatornim odgovorom u grupi SEPSA.

Slične rezultate je pokazala skorašnja studija sprovedena od strane Gucyetmeza-a i Atalana, u kojoj su vrednosti CRP-a bile više kod pacijenata sa sepsom u odnosu na one sa SIRS-om. U studiji Reith i sar. (2000) vrednosti CRP-a su bile više kod pacijenata sa postoperativnom infekcijom i sepsom u odnosu na pacijente koji su imali postoperativni tok bez komplikacija, te takođe konstatuju da su vrednosti CRP-a značajne u predviđanju prognoze kod pacijenata sa abdominalnom sepsom.

Činjenica da nije bilo razlike među grupama sa peritonitisom, u nekoj meri limitira upotrebu PCT-a u razlikovanju SIRS-a od sepsa. Takođe je i istraživanje Zheng Wao i sar. pokazalo da PCT nije idealan biomarker u diskriminaciji SIRS-a od sepsa.

Yang i sar. (2014) konstatuju da se PCT ne može koristiti samostalno kao zlatni standard za dijagnozu peritonitisa. Analizirajući rezultate studije i publikovane rezultate drugih studija, dolazi se do zaključka da bi bilo poželjno u istraživanje uključiti merenje i SAA kao proteina akutne faze u sekundarnom peritonitisu i analizirati njegovo ponašanje. Uvidom u literaturu, zapaženo je da su se studije koje su ispitivale ponašanje SAA u sepsi, uglavnom odnosile na neonatalni period.

S obzirom da je koncentracija SAA obično paralelna sa koncentracijom CRP-a u serumu, neki autori smatraju da je SAA pored CRP-a, koristan klinički marker inflamacije ili virusne infekcije. U ispitivanoj grupi sa peritonitisom u analiziranoj studiji, vrednosti HMGB1 su bile značajno više kod pacijenata u grupi SEPSA u odnosu na pacijente u grupi SIRS, što je objašnjeno razvijanjem intenzivnijeg inflamatornog odgovora zbog prisustva infektivnih mikroorganizama u grupi SEPSA i ekcesivnijim oslobađanjem HMGB1.

Van Zoelen i sar. (2007) su istraživali nivo HMGB1 kod pacijenata sa sepsom. Pacijenti sa peritonitisom su imali povišene vrednosti nultog dana ali ne i trećeg postoperativnog dana, dok su se kod pacijenata sa cistitisom povišene vrednosti HMGB1 pojavile tek trećeg dana. Pokazali su da je kinetika oslobađanja HMGB1 zavisila od izvora infekcije, ali nije uticala na mortalitet i ozbiljnost bolesti

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, zaključeno je da bi pronalaženje specifičnog markera za dijagnozu sepse, markera koji bi napravio razliku između SIRS-a i sepse i predočio prognozu u peritonitisu, svakakao bio od izuzetnog značaja u lečenju peritonitisa. Na osnovu analiziranog istraživanja zaključuje se da bi HMGB1 protein kao kasni parametar inflamacije, mogao da bude prognostički marker u sekundarnom peritonitisu.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Milić Lj, Grigorov I, Krstić S, Čeranić MS, Jovanović B, Stevanović J, Peško P. Serum level of HMGB1 protein and inflammatory markers in patients with secondary peritonitis: time course and the association with clinical status. J Med Biochem. 2016; DOI:10.15151/jomb-2016-0016

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Postoji veliki interes da se otkrije optimalni marker za rano, neinvazivno i pouzdano dijagnostikovanje sistemskih komplikacija kod razvijenog sekundarnog peritonitisa. HMGB1 protein kao kasni medijator sistemskog inflamatornog odgovora, čija koncentracija u cirkulaciji koreliše sa jačinom inflamatornog odgovora i organskim oštećenjima, mogao bi da ukaže na pojavu i intenzitet sistemskih komplikacija i omogući blagovremeno korigovanje primenjene terapije. Pored toga, uporednim praćenjem koncentracija HMGB1 i drugih markera inflamacije, moguće je preciznije definisati mesto ovog molekula u patofiziologiji SIRS-a. S tim u vezi, ovaj rad sugerše da više postoperativne vrednosti HMGB1 proteina u serumu pacijenata sa difuznim sekundarnim peritonitisom, mogu poslužiti kao potencijalni prognostički marker sepse. Studijom je takođe pokazano da su preoperativne vrednosti CRP-a, PCT-a i HMGB1 bile više u grupi septičnih pacijenata. Međutim, postoperativna kinetika promene ispitivanih markera inflamacije ukazuje da su SAA i HMGB1 markeri koji su se razlikovali u SIRS-u u odnosu na sepsu.

Doktorska disertacija „Prognostički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu” dr Ljiljane Milić predstavlja originalni naučni doprinos. 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 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 Ljiljane Milić „**Prognostički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu**“ i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Mentor

Akademik Prof. dr Predrag Peško, MF UB

Komentor

Dr Ilijana Grigorov, naučni savetnik, IBISS UB

Komisija

Prof. dr Aleksandar Karamarković, MF UB

Prof. dr Ana Šijački, MF UB

Dr Desanka Bogojević, naučni savetnik, IBISS, UB

U Beogradu, 19.05. 2016.