

**NAU NOG VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

IZVEŠTAJ KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.09.2015. godine, broj 4600/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: **„Evaluacija metode indukcije sinonazalnog sekreta za dokazivanje gljivica u sinusima u fiziološkim i patološkim stanjima kod pacijenata sa hroni nim rinosinuzitisima“** kandidata dr Aleksandre Bara , zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao istraživa na nau no- istraživa kom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Zna aj dokazivanja ranih laboratorijskih biomarkera za ishod invazivnih gljivi nih infekcija kod nas” (OI 175034). Mentor je Prof. dr Valentina Arsi Arsenijevi , a komentor Prof. dr Vesna Tomi Spiri , Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragana Jani , Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. Prof. dr Predrag Mini , Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. Prof. dr Sandra Peki ur evi , Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
4. Prof. dr Zoran Rako evi , Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet
5. Prof. dr Suzana Otaševi , Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Aleksandre Bara napisana je na 170 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U

disertaciji se nalazi ukupno 27 slika, 48 tabela i 11 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i priloge.

U **uvodu** je definisan problem gljiva kao jednog od vodećih uzroka bolesti kod ljudi poslednjih decenija. Objasnjeno je značaj ubikvitarnosti gljiva za razvoj oboljenja gornjih i donjih putova respiratornog trakta (RT) kod ljudi. Objasnjeno je značaj prisustva gljiva u gornjim putovima RT za razvoj hroničnog rinosinuzitisa (HRS) sa i bez nazalne polipoze (NP) i gljivičnog rinosinuzitisa (GRS). Opisan je problem dokazivanja prisustva gljiva u donjim i gornjim putovima RT u mikološkoj dijagnostici, i dato obrazloženje zašto je pravovremena i tačna dijagnoza prisustva gljiva u RT veoma važna za rano započinjanje lečenja, skraćivanje trajanja bolesti, snižavanje procenta nastanka komplikacija i sprečavanje razvoja invazivnih gljivičnih infekcija. Objasnjene su nedostaci dostupnih mikoloških dijagnostičkih metoda za detekciju gljiva u gornjim putovima RT kao i problem uzorkovanja.

Ciljevi rada su precizno definisani. Imaju u vidu naučnu osnovu problema i radnu hipotezu, definisan je osnovni cilj istraživanja da se kod pacijenata sa HRS, dokaže prisustvo gljiva u sinonazalnom sekretu, nakon indukcije, lavaže i aspiracije sekreta i u tkivu NP, nakon funkcionalne endoskopske hirurgije sinusa (FESS), i interpretira značaj njihovog prisustva u fiziološkim i patološkim stanjima. Ostali ciljevi istraživanja su: (i) razvijanje protokola za indukciju sinonazalnog sekreta (ISNS) kod pacijenata sa HRS i detekcija gljiva; (ii) razvijanje protokola za uzorkovanje sekreta iz sinusa putem lavaže (ISNS_L) i aspiracije (ISNS_A) i dokazivanje gljiva; (iii) razvijanje protokola za primenu ultrazvuka (ultrazvučne kade) u cilju obrade ISNS_A i detekcije gljiva; (iv) razvijanje protokola za obradu NP do jednostrane suspenzije i detekciju gljiva; (v) uporediti razvijene metode i ispitati senzitivnosti i specifičnosti u odnosu na "bris metod", kao i u odnosu na klinički dijagnostikovani GRS; (vi) utvrditi prevalenciju GRS kod HRS i odrediti prediktivne vrednosti razvijenih dijagnostičkih metoda i (vii) razviti algoritam za interpretaciju nalaza gljiva u fiziološkim (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološkim stanjima (infekcija/alergija) u korelaciji sa faktorima rizika, kliničkim i sociodemografskim karakteristikama i kvalitetom života pacijenata sa GRS.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je studija sprovedena: (i) na Klinici za ORL i MFH KCS; (ii) na Klinici za Alergologiju KCS; (iii) u Centru za radiološku dijagnostiku Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu i (iv) u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za uzročnike mikoza, Instituta za Mikrobiologiju, Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Detaljno su opisani inkluzioni i ekskluzioni kriterijumi za ulazak pacijenata u studiju. Opisana je metodologija studije, korišćene podloge, reagensi i aparatura za uzorkovanje i obradu uzoraka ISNS. Vrlo detaljno su navedene sve korišćene i novo-formirane laboratorijske dijagnostičke procedure, kao i korišćene kliničke dijagnostičke procedure. Opisan je dizajn metoda uzorkovanja i vrste korišćenih uzoraka. Navedeni su korišćeni instrumenti merenja i prikazani su pojedinačno na kraju disertacije kao prilozi. Objasnjena je korišćena statistička analiza podataka. U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati (prikazani su u 32 tabele, 5 slika i 10 grafikona). Detaljno su opisani najvažniji rezultati: (i) sociodemografske karakteristike i grupe HRS pacijenata; (ii) prikaz mikrobiološkog nalaza po uzorku iz sinusa pacijenata sa HRS korišćenjem metoda jedno elijske suspenzije NP, ISNS i brisa nosnog kavuma; (iii) kliničke karakteristike pacijenata sa HRS i određivanje težine bolesti i (iv) evaluacija metode za ISNS u cilju detekcije gljiva.

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 212 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Aktuelno istraživanje je imalo cilj da evaluiira nove metode ISNS i ulogu pretretmana (PT) za dokazivanje gljiva kod pacijenata sa HRS. Ispitane su sledeće metode za dokazivanje gljiva: (i) jedno elijska suspenzija tkiva NP dobijenih putem FESS, (ii) mucin/sekret iz sinusa dobijen ISNS i aspiracijom (ISNS_A), ISNS i lavažom (ISNS_L) ili kombinacijom A i L (ISNS_komb) i (iii) bris sluznice nosa (BSN).

Ključni naučni doprinos doktorske disertacije je definisanje kriterijuma koji vrše predikciju GRS (GRS_{indeks2}) kod pacijenata sa HRS i optimizacija protokola za uzorkovanje i obradu tkiva NP i sekreta/mucina iz sinusa koji imaju visoku senzitivnost i specifičnost za dokazivanje gljiva u sinusima u patološkim stanjima, a što podržavaju sledeći rezultati:

1. Primenom i evaluacijom kliničkih i alergološko-rinoloških kriterijuma izvršena je selekcija HRS pacijenata i određena težina HRS, a na osnovu kriterijuma „dokazane“ gljive u sinusima, i izvršene statističke analize dobijeno je 10 kriterijuma koji vrše predikciju GRS (GRS_{indeks2}):

(i) težak HRS prema "Sinonasal outcome" testu (SNOT-22), (ii) težak HRS prema rinoskopsko-kliničkom nalazu, (iii) dugotrajan HRS (5 godina), (iv) odsustvo povoljnog efekta lokalne kortikosteroidne terapije primenjene 3 meseca, (v) rekalcitrantni NP i/ili više od 1 prethodni FESS (reFESS), (vi) izražene CT promene u sinusima (2/3 zadebljanja sluznice ili 2/3 ispunjenost sinusa), (vii) pozitivna kožna reakcija na najmanje 3 standardna inhalatorna alergena, od toga za 1 gljivici, (viii) visoko pozitivna specifična anti-gljivica na IgE antitela klase 3-6 (>3.5 IU/ml), (ix) visoko pozitivna ukupna IgE antitela (>1000 IU/ml) i (x) visoko pozitivan broj eozinofila (Eo) u krvi (>500 mm³). Za svaki kriterijum je oformljen sistem bodovanja (indeks₀; indeks₁; indeks₂) za definisanje „major“ (GRS_{indeks2}) i „minor“ kriterijuma (GRS_{indeks1}).

2. Optimizovan je protokol za uzorkovanje i obradu tkiva (metoda obrade tkiva NP do jedno elijske suspenzije) i sekreta/mucina (ISNS_A, ISNS_L i ISNS_komb). Visok procenat nalaza gljiva je utvrđen primenom obrade NP do jedno elijske suspenzije kod reFESS pacijenata (42.1%), ISNS_L sa PT kod neoperisanih pacijenata (24.5%) i obrade NP do jedno elijske suspenzije kod pFESS pacijenata (23.2%), a nizak kod neoperisanih pacijenata primenom ISNS_A sa PT (10%) i kod neoperisanih pacijenata promenom BSN sa PT (5.3%).

3. Izvršena je evaluacija ISNS metoda. Najviše vrednosti senzitivnosti i specifičnosti su pokazane za ISNS_komb metod kada je primenjen PT (89%; 96%), a najviše pozitivne/negativne prediktivne vrednosti (PPV/NPV) su pokazane za ISNS_komb metod (94%; 93%) i ISNS-L metod (93%; 87%) kada je primenjen PT.

4. Izvršena je klasifikacija nalaza gljiva u sinusima na fiziološki nalaz (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološki nalaz, a na osnovu: (i) pozitivnih nalaza gljiva u sinusima primenom metoda BSN, ISNS_L, ISNS_A i/ili ISNS_komb i (ii) definisanog GRS_{indeks2}:

(i) fiziološko stanje (kolonizacija/mikrobiom): jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima štetem BSN metode;

(ii) patološko stanje: jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima primenom metoda jedno elijske suspenzije NP, ISNS_A, ISNS_komb ili dva uzastopna pozitivna nalaza gljiva u sinusima ISNS_L metodom.

5. U vazduhu životnog prostora pacijenata je dokazano 224 izolata gljiva iz 9 rodova. Najzastupljeniji su bili *Aspergillus niger* (62/224) i *Penicillium* spp. (29/224).

6. Pokazane su sledeće prevalencije za Republiku Srbiju: HRS (13.8%), NP (4.2%), FRS (2.8%), alergijski GRS (1.5%), nealergijski GRS (1.3%) i invazivni GRS (0%) kod grupe HRS pacijenata

od kojih je formirana *online* baza sa programom za automatsku kategorizaciju GRS, personalizovanu dijagnostiku i praćenje (e-SINONAZAL-LabNet).

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dokazivanje prisustva gljiva u sinusima predstavlja veliki laboratorijski i klinički izazov, a posebno tumačenje značaja izolacije gljiva u fiziološkim i patološkim stanjima. Godinama su objavljivani kontradiktorni rezultati o zastupljenosti gljiva u sinusima pacijenata sa HRS. Međutim, mogućnost komparacije ovih rezultata se dovodi u pitanje s obzirom na razlike u korištenim tehnikama za detekciju gljiva. Standardna mikrobiološka analiza sadržaja sluznice nosa i sinusa u cilju detekcije gljiva i bakterija podrazumeva: (i) uzimanje brisa sluznice nosa, (ii) zasejavanje na hranljive podloge i (iii) makroskopska i mikroskopska identifikacija izolovanog mikroorganizma (Rogers i sar., 2003). Bris, kao nesenzitivna i nespecifična metoda za detekciju gljiva u sinusima, a ujedno "zlatni standard", je vodeći problem u dijagnostici, a time i terapiji GRS. Detekcija gljiva ovom metodom u cilju dijagnostike GRS je pokazala lošu korelaciju sa kliničkim i radiološkim nalazima, kao i nizak procenat izolovanih sojeva (Rogers i sar., 2003). Bris nosnog kavuma ima mogućnost uzorkovanja samo sadržaja sa površine sluznice nosa, što je bez dijagnostičkog značaja, što su pokazali i rezultati doktorske disertacije. Kako je pokazano da je bris sluznice nosa nerelevantna metoda za dijagnostiku GRS, patohistološki preparati esto lošeg kvaliteta zbog neadekvatnog uzorka, rinoskopski i CT znaci nespecifični, od velikog kliničkog značaja je svaki napredak u razvijanju novih metoda za detekciju gljiva u sinusima. Do 1999. godine prisustvo gljiva u sinusima se smatralo retkim, međutim rezultati Ponikau i sar., su dali drugačije podatke u kojima je prisustvo gljiva u sinusima pacijenata sa HRS bilo 96% i 100% u zdravim kontrolama koristeći i novo-formirani metod i protokol za lavažu sinusa, uzorkovanje i kultivisanje lavata (Ponikau i sar., 1999). Korištenjem iste tehnike za nazalnu lavažu, slično, visoka prevalencija prisustva gljiva u sinusima je pokazana u dve evropske studije (Kennedy i sar., 1995; Braun i sar., 2003). Može se reći da je Ponikau sa saradnicima napravio značajan napredak u odnosu na prethodne tehnike (brisa) uzorkovanja kliničkog materijala pri sumnji na GRS kao i u odnosu na prethodne metode za detekciju gljiva i obradu kliničkog materijala (Ponikau i sar., 1999). Međutim, rezultati zahtevaju diskusiju, s obzirom da je pozitivan nalaz gljiva otkriven kod 96% ispitanika i čak 100% zdravih kontrola (Ponikau i sar., 1999). Ovakav nalaz kod zdravih kontrola bez HRS, bi mogao da ukaže na

propuste ove dijagnostike, s obzirom da se ispiranjem sluznice sinusa „pokupe“ gljive koje kolonizuju nos i sinuse, te je njihov klinički značaj diskutabilan. Prisustvo gljiva u ovakvom ispirku nosa i sinusa ukazuje na prisustvo „udahnutih“ spora gljiva, koje su se trepljaste elije zadržale, odnosno na fiziološko stanje. Međutim, s druge strane, hronično prisustvo gljiva u nosu/sinusima može biti faktor rizika za razvoj patološkog stanja - HRS i GRS (Bara i sar., 2015). Ipak, ovo je i dalje na nivou pretpostavke i potrebne su dodatne studije na ovu temu, obzirom da prisustvo gljiva u ispirku ne ukazuje da je pokrenut imunopatološki proces njihovim prisustvom, šta više, nalaz može da ukaže na spore gljiva udahnute iz vazduha i zadržane na trepljastom epitelu nosa/sinusa. Prethodna „priprema“ kavuma nosa za lavažu, kao i ponavljanje postupka lavaže, smanjuje mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata i donošenja pogrešnih zaključaka. Stoga je u studiji ove doktorske disertacije ispitan značaj korišćenja PT i toaleta nosa pre uzorkovanja brisa, ISNS_L i ISNS_A. Osim toga, ISNS_L je smatran pozitivnim ukoliko je na dva puta uzastopno ponovljenom nalazu u razmaku od 7 dana izolovan isti uzročnik. Takođe, evaluiran je i ISNS_komb, koji predstavlja istovremenu primenu ISNS_A i ISNS_L, te je smatran pozitivnim samo ukoliko je dobijen isti izolat na obe vrste uzoraka. Pokazano je i da je korišćenje novo-primenjene metode za obradu tkiva NP do jedno elijske suspenzije pokazalo visok "recovery rate", posebno kod pacijenata sa reFESS-om, obzirom da je ovom metodom pokazano prisustvo gljiva kod 42.1% reFESS pacijenata, što je bilo statistički značajno više nego kod pacijenata sa pFESS-om (8.3%). Poređenjem senzitivnosti i specifičnosti metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (zlatni standard) pokazana je najbolja senzitivnost (89%) i specifičnost (96%) za ISNS_komb, uz primenu prethodnog PT sluznice nosa. Poređenjem PPV i NPV metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (zlatni standard) pokazana je najbolja kumulativna PPV (94%) i NPV (93%) za ISNS_komb, uz primenu prethodnog PT sluznice nosa. Poređenjem razlika senzitivnosti i specifičnosti kliničke i laboratorijskih metoda za dijagnozu GRS pokazano je da statistički značajna razlika postoji između kliničke dijagnoze GRS i (i) BSN bez PT ($p=0.007$), (ii) BSN sa PT ($p=0.000$) i (iii) ISNS_A sa PT ($p=0.02$), što ukazuje na nisku PPV ovih metoda. Najmanja statistički značajna razlika u dijagnostici GRS je pokazana između kliničke dijagnoze GRS i ISNS_komb sa PT. Na procenat gljivih izolata iz sinusa utiče kako metod uzorkovanja, o kome govore prethodno navedene studije, tako i metod za obradu uzoraka. Kao „zlatni standard“, do sada su korišćeni uzorci brisa nosa koji su direktno zasejavani na hranljive podloge, a u ovom studiji je korišćen novo-formirani protokol za indukciju i obradu

sinonazalnog sekreta i tkiva NP do jedno elijske suspenzije. Visok procenat izolacije gljiva iz obra enog ISNS_A u ultrazvu noj kadi i iz jedno elijske suspenzije NP govori u prilog zna aja obrade uzoraka pre mikrobioloških analiza.

Primarni korak ka le enju GRS je pravilna dijagnostika, a novo-formirane metode u ovoj studiji su korak ka pravovremenoj, jeftinoj i jednostavnoj detekciji gljiva u sinusima.

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

1. Barac A, Pekmezovic M, Tomic Spiric V, Trivic A, Marinkovic J, Pekic Djurdjevic S, Arsic Arsenijevic V. Chronic rhinosinusitis: association of recalcitrant nasal polyposis and fungal finding in polyp's single-cell suspension. European Archives of Oto-rhino-laryngology 29 Jan 2015, doi 10.1007/s00405-015-3511-2 M22 IF=1.6

2. Arsic Arsenijevic V, Barac A, Pekmezovic M, Stošovi R, Pen er I. Alergijski fungalni sinuzitis – novi aspekti klini kih odlika, laboratorijske dijagnoze i le enja. Srp Arh 2013, 141(9-10):698-704 M23 IF=0.3

E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Evaluacija metode indukcije sinonazalnog sekreta za dokazivanje gljivica u sinusima u fiziološkim i patološkim stanjima kod pacijenata sa hroni nim rinosinuzitisima**“ dr Aleksandre Bara predstavlja originalni nau ni doprinos u ispitivanju novih dijagnosti kih mog nosti za dokazivanje gljivica u sinusima u fiziološkim i patološkim stanjima kod pacijenata sa hroni nim rinosinuzitisima. Ovim istraživanjem ukazano je na potencijalni zna aj primene ovih metoda za indukciju sinonazalnog sekreta u cilju dokazivanja prisustva gljivica u sinusima. Rezultati predloženih istraživanja mogli bi doprineti razvoju bolje, preciznije i ta ne dijagnoze prisustva gljivica u sinusima što bi moglo dovesti do pravovremenog zapo injanja le enja, skra enje trajanja bolesti, snižavanja procenta nastanka komplikacija i spre avanje razvoja invazivnih gljivi nih infekcija. Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže
Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju
dr Aleksandre Bara i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora
medicinskih nauka.

U Beogradu, 30.09.2015.

lanovi Komisije:

Prof. dr Dragana Jani

Prof. dr Predrag Mini

Prof. dr Sandra Peki ur evi

Prof. dr Zoran Rako evi

Prof. dr Suzana Otaševi

Mentor:

Prof. dr Valentina Arsi Arsenijevi

Komentor:

Prof. dr Vesna Tomi Spiri
