

Оцену готове докторске тезе

доставља. –

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ**

На 72. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, одржаној 27.06.2019. године, одлуком бр. 45/72 одређени смо у комисију за оцену готове докторске тезе мр. сц мед. Зорана ПАУНОВИЋА, специјалисте дечије хирургије и специјалисте ортопедије и трауматологије, запосленом на Институту за здравствену заштиту мајке и детета „Др Вукан Чупић“, у Београду, под насловом:

**„ ПОВЕЗАНОСТ СЕРУМСКИХ ВРЕДНОСТИ АДИПОКИНА СА ТЕЖИНОМ
ПОВРЕДЕ, КЛИНИЧКИМ ТОКОМ И ИСХОДОМ ЗАРАСТАЊА НАКОН
ФРАКТУРЕ ДУГИХ КОСТИЈУ У ДЕЦЕ“.**

Након темељног проучавања готове докторске тезе и увидом у научни и стручни рад докторанда, комисија у саставу: вс проф. др сц. мед. Данило ВОЈВОДИЋ (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду), пк доцент др сц. мед. Срђан СТАРЧЕВИЋ (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду) и проф. др сц. мед. Душан МАРИЋ (Медицински факултет Универзитета у Новом Саду), подноси Наставно-научном већу МФ ВМА УО следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторски рад потпуковника мр сц мед. Зорана ПАУНОВИЋА написан је на 92 стране текста и подељен на следећа поглавља: УВОД (32 стране), ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ (3 стране), РЕЗУЛТАТИ (25 страна), ДИСКУСИЈА (8 страна), ЗАКЉУЧАК (2 стране) и ЛИТЕРАТУРА (18 страна). Увод је илустрован са 7 слика, а резултати са 7 збирних слика и 19 табела. У дисертацији су цитирани подаци из 260 референци. Рад по структури има све елементе докторске дисертације. Истраживање у овом докторском раду припада областима молекулске медицине, ортопедије и хирургије у педијатрији, као и клиничке имунологије и односи се на испитивање серумских вредности адипокина, као и медијатора који учествују у процесима формирања и ремоделовања кости.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У поглављу **УВОД** кандидат даје опширан преглед досадашњих сазнања о значају медијатора, адипокина и цитокина у процесима зарастања и раста костију.

Кост представља кључну структуру потпорних ткива које даје ослонац целом телу, као и заштиту висцералних органа. Кост се данас сматра и ендокриним органом важним у регулацији минералне хомеостазе. Коштано ткиво нормално подлеже континуираном ремоделовању које се састоји од два истовремена и супротстављена, добро избалансирана процеса, коштане ресорпције и коштане изградње. У плазми и урину здравих особа детектују се многи протеини повезани са процесом нормалне коштане регенерације у количинама које углавном корелирају са релативним повећањем или смањењем активности коштаног метаболизма. Након прелома као врсте повреде костног ткива, велики број фактора раста, цитокина и медијатора који учествују у костном обнављању ослобађа се и/или продукује у првим сатима након повреде. Костно ткиво је главни извор ових протеина, док се неки ослобађају из ћелија које учествују у процесу инфламације на месту повреде.

Ремоделовање кости је строго контролисани процес, посредован различитим медијаторима. У физиолошким условима процеси костног ремоделовања могу да се поделе у неколико фаза, фазу мировања, активације, ресорпције, фаза преокрета, формације и минерализације. Улога *RANK* (рецепторски активатор за нуклеарни фактор κБ), *RANKL* (рецепторски активатор за нуклеарни фактор κБ лиганд) и *OPG* (остеопротегерин) добро је позната у физиологији ремоделовања костију. *RANKL* и макрофагни *CSF (M-CSF)* су два цитокина која су кључна у остеокластној формацији. Оба ова фактора углавном продукују стромалне ћелије костне сржи и остеобласти у солубилној и мембранској форми. Остеопротегерин је протеин који се ослобађа из остеобласта и служи као мамац да спречи везивање *RANK*-а за *RANKL* везујући се за *RANKL*.

Масно ткиво је по новим схватањима највећи ендокрини орган у нашем телу, са основном улогом у обнови и складиштењу енергије, односно процесима метаболизма и исхране. За разлику од остеокласта, адипобласти и остеобласти воде порекло од заједничке прекурсорске ћелије, мезенхималних стем ћелија. Диференцијација у пре-адипоците или пре-остеобласте је компетитивна и међусобно искључива. Откриће адипокина, цитокина које продукује масно ткиво, показало је да масно ткиво има комплексне регулаторне односе са костним ткивом. Раније студије показале су да су инфламаторни цитокини, *TNFα* и *IL6* укључени у регулацију метаболизма костног ткива било директно, било посредством индукције *TGFβ* и *RANKL/RANK* пута. Испитивања функције адипонектина показала су да индукује остеогенезу мезенхималних стем ћелија и сазревање остобласта, а инхибира остеокластогенезу и активност остеокласта. Други адипокин потентног деловања, лептин, стимулише остеогенезу и инхибира апсорпцију кости посредовану остеокластима, док ресистин значајно повећава број и активност

остеокласта. Масно ткиво продукује и бројне друге адипокине, висфатин, васпин, хемерин и оментин, за које се још увек не зна какав утицај испољавају на коштано ткиво.

Досадашње студије о вредностима адипокина код деце углавном се односе на гојазну децу или децу са метаболичким болестима, као што је дијабетес I типа. Како до сада нису објављени овакви подаци, као циљ нашег истраживања поставили смо испитивање повезаности адипокина у узорцима серума здраве деце са тежином повреде, клиничким параметрима и исходом зарастања дугих костију након акциденталних фрактура.

На основу свега наведеног кандидат је поставио следећу **ХИПОТЕЗУ**:

Серумска концентрација адипонектина и лептина позитивно корелира са тежином повреде, степеном формирања калуса и временом зарастања дугих костију након акциденталне повреде, док концентрација ресистина негативно корелира са степеном формирања калуса и временом потребним за комплетно зарастање костију.

У циљу провере хипотезе кандидат је дефинисао следеће **ЦИЉЕВЕ ИСТРАЖИВАЊА**:

1. *Измерити концентрације адипонектина, лептина и ресистина у узорцима серума деце са акциденталним повредама дугих костију, пре интервенције и након завршетка ортопедског лечења прелома,*

2. *Тестирати разлике у концентрацијама наведених адипокина између група деце према типу прелома, локализацији, топографији афектиране кости, тежини костне повреде и тежини повреде меких ткива,*

2. *Испитати повезаност концентрација наведених адипокина са степеном формирања калуса, исходом зарастања костију и временом потребним за комплетно зарастање костне повреде.*

У поглављу **ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ** кандидат је јасно и детаљно представио дизајн и методологију истраживања. Студија је дизајнирана и спроведена као клиничко испитивање – студија пресека, и одобрена је од стране Етичког комитета Војномедицинске академије. Истраживање је спроведено у Институту за мајку и дете др Вукан Чупић и Институту за медицинска истраживања ВМА. Истраживање је трајало је 2 године. Уз писмени пристанак родитеља пацијената, у студију је укључено 92 детета са преломима дугих костију руку и ногу, 10-оро деце са преломима костију шаке и 10-оро деце контролне групе, без прелома костију. Старост испитиване деце била је од 4 до 17 година.

У студију нису била укључена деца са малигним болестима, системским болестима везивног ткива, метаболичким болестима и деца са урођеним аномалијама коштано зглобног система.

Сваком пацијенту је учињен рентгенски снимак у две пројекције (АП и профилна пројекција), укупно 5 пута у различитим терминима (непосредно пре интервенције, непосредно после интервенције, потом у терминима контроле после 7 и 14 дана, и по скидању гипсане имобилизације). Преломи су бити класификовани према типу прелома (отворен, затворен, коси, попречни, спирални, епифизиолиза), анатомској локализацији (кости руку и ногу), топографији афектиране кости (фрактуре прокс. и дист. сегмента, фрактуре дијафизе), и тежини коштане повреде (0,1,2, или лак, тежак, компликован). Формирање калуса је квалификовано на основу рентгенских снимака (7, 14 дан, по скидању имобилизације). Исход зарастања је квалификован као добро – комплетно, некомплетно и лоше. Код сваког испитаника је мерено време неопходно за комплетно зарастање настале коштане повреде. Сваком испитанику је узет узорак венске крви у у два временска термина (непосредно пре интервенције и по завршетку ортопедског лечења), у којем су одређене вредности медијатора проточном цитометријом.

У дескриптивној статистици су коришћени уобичајени параметри за процену централне тенденције података (средња вредност, медијана) као и параметри за процену веријабилности група (стандардна девијација, распон, 95%-не границе поверења). Нормалност расподеле је пр оверена Colmogorov-Smirnov тестом. У зависности од ове процене, за поређење две групе користишћен је Студентов Т тест или Mann-Whitney тест. За процену значајности три или више група коришћен је *ANOVA* тест у једном правцу (*post hoc Bonferonni* тест) или непараметарски *Kruskal-Wallis* тест (*post hoc Dunn* тест). За процену значајности порезаности различитих параметара употребљен је *Pearson* или *Spearman* гест корелације. Разлике су сматране статистички значаним у случају $p \leq 0,05$, умерено статистички значајним у случају $p \leq 0,01$ и високо статистички значајним у случају $p \leq 0,001$. Сви статистички прорачуни су урађени коришћењем *GraphPadPrism 5.01* софтвера.

Добијени **РЕЗУЛТАТИ** показали су:

1. Формирање калуса.

У иницијалном узорку вредности ИЛ-1 β су биле највеће у групи контролне деце без прелома, веће у односу на све друге испитиване групе. Пацијенти са добро формираним калусом демонстрирали су значајно повећање концентрације адипсина, РБП-4, ИЛ-8, ИЛ-6 и ТНФ- α у иницијалном узорку у односу на контролну групу деце без прелома.

У иницијалном узорку пацијената са слабо формираним калусом детектовано је значајно повећање РБП-4 и ИЛ-8 у односу на контролну групу деце без прелома.

У иницијалном узорку деце са слабо формираним калусом лептин је индиректно корелирао вредностима адипонектина, док је у деце са добро формираним калусом адипонектин директно корелирао са вредностима адипсина и РБП4, као и резистин са лептином.

У контролној групи деце без прелома детектовали смо само значајну корелацију адипонектина и РБП4. У деце са преломима кратких костију нису детектоване значајне узајамне повезаности испитиваних медијатора

Добро формиран калус био је удружен са повећањем концентрације адипонектина и РБП4 након 21 дан, а са смањењем концентрације ИЛ-1 β , ТНФ- α и ИЛ-8. Насупрот томе, у пацијената са слабо формираним калусом након 21 дан детектовали смо значајан пораст резистина, пад конц лептина, ТНФ- α , ИЛ-8 и МЦП-1. Дакле, степен формирања калуса удружен је са специфичним профилем адипокина.

2. Анатомска локализација повређене кости.

Преломи дугих костију руку у деце удружени су са значајним повећањем концентрације ТНФ- α и ресистина, док су преломи костију ногу повезани са значајним повећањем концентрације адипокина, адипонектина и адипсина, као и повећањем концентрације ИФН- γ .

3. Врста прелома и вредности цитокина.

У односу на вредности утврђених у узорцима деце без прелома у пацијената са косим преломом детектовали смо значајан пораст вредности адипонектина, адипсина и ИЛ-8, у деце са попречним преломом пораст концентрације резистина, РБП-4, ИЛ-6 и ТНФ- α , док смо у узорцима деце са спиралним преломом утврдили значајан пораст ИЛ-6 и МЦП-1.

Деца са косим преломима имају значајно веће вредности адипонектина и МЦП-1 у односу на групу са спиралним преломом. Такође, група са попречним типом прелома имала је значајно веће просечне вредности адипонектина, ТНФ- α и МЦП-1 у односу на групу са спиралним типом прелома. Група са епифизиолизом имала је значајно веће просечне вредности МЦП-1 у односу на све испитиване групе. Коначно, група са спиралним типом прелома имала је значајно веће просечне вредности ИЛ-1 β у односу на групу са епифизиолизом и попречним типом прелома.

4. Ортопедска терапија.

Пацијенти који су лечени комбинацијом репозиције и фиксације имали су значајно веће вредности адипсина и лептина у односу на групу пацијената који су лечени репозицијом и остеосинтезом. Иста група пацијената (репозиција + фиксација) имала је иницијално значајно веће концентрације ИЛ-1 β , ТНФ- α , ИЛ-6, ИЛ-8 и МЦП-1 у односу на контролну групу.

Пацијенти који су лечени комбинацијом репозиције и остеосинтезе имали су значајно веће вредности адипонектина, адипсина, лептина и ИЛ-8 у иницијалном узорку у односу на контролну групу.

5. Дужина имобилизације.

У групи пацијената у којих је имобилзација трајала две недеље детектовали смо значајан пораст адипонектина и РБП-4, праћен значајним смањењем вредности ТНФ- α . У групи пацијената са дужим трајањем имобилизације детектовали смо значајан пораст резистина, уз значајно смањење вредности ИЛ-6 и МЦП-1.

3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу **ДИСКУСИЈА** докторанд коректно, садржајно и критички сагледава добијене резултате у светлу постојећих сазнања добијених прегледом литературе. Начин на који је дискусија написана указује на то да докторанд у потпуности влада материјом из области којој припада тема докторског рада. Др Пауновић указује на важност измене концентрација адипокина у системској циркулацији и њихове удружености са првенствено степеном формирања калуса, као клиничког параметра квалитета опоравка – репарације повређене кости. Вредности адипокина у иницијалном узорку представљају интересантан основ за евентуалну будућу студију којом би се могли користити као предиктори тока зарастања. Наравно, специфичну вредност у овој студији др Пауновића чине динамичка одређивања концентрације адипокина и значај удружености промене са клиничким параметрима, који показује да је повољни / неповољни исход опоравка кости повезан са посебним, специфичним профилем адипокина. Додатно, студија је нагласила полне разлике у пред-пубертетлијским годинама испитиваних пацијената, што је посебно драгоцено, јер се детектована полна разлика у продукцији адипокина мора узети као услов – критеријум за укључивање у будуће студије. На крају, као посебан допринос ове студије, подаци којих нема у литератури доступној из клиничких испитивања, треба издвојити налаз раног инфламаторног одговора који је удружен са повољним исходом зарастања повређене кости.

4. ОБЈАВЉЕНИ РАДОВИ ИЗ ОВЕ ДОКТОРСKE ТЕЗЕ

Zoran Paunovic, Sanja Milutinovic, Nikola Stankovic, Dzihan Abazovic, Ivan Stanojevic, Mia Rakic, Mirjana Djukic, Gordana Supic, Danilo Vojvodic, Dusan Maric, Wasim S Khan, Srdjan Starcevic. ASSOCIATION OF FRACTURE CONFIGURATION AND CALLUS FORMATION WITH CONCENTRATION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH LONG BONE FRACTURES. *Vojnosanitetski pregled* (2019); Online First Avg, 2019. ID 21892.

Zoran Paunovic, Ivan Stanojevic, Dzihan Abazovic, Mia Rakic, Nikola Stankovic, Mirjana Djukic, Sanja Milutinovic, Srdjan Starcevic, Gordana Supic, Danilo Vojvodic, Milena Jovic, Dusan Maric. ASSOCIATION OF BONE FRACTURE TYPE AND DEGREE OF CALLUS FORMATION WITH LEPTIN CONCENTRATION IN CHILDREN WITH LONG BONE FRACTURES. *Vojnosanitetski pregled* (2019); Online First May, 2019, DOI /10.2298/VSP190314062P.

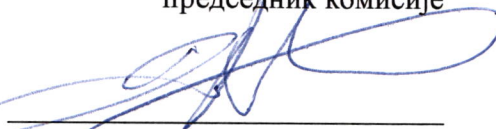
5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Кандидат мр сц мед. Зоран ПАУНОВИЋ испуњава све услове који су дефинисани Чланом 9. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука. Докторска теза под називом „**ПОВЕЗАНОСТ СЕРУМСКИХ ВРЕДНОСТИ АДИПОКИНА СА ТЕЖИНОМ ПОВРЕДЕ, КЛИНИЧКИМ ТОКОМ И ИСХОДОМ ЗАРАСТАЊА НАКОН ФРАКТУРЕ ДУГИХ КОСТИЈУ У ДЕЦЕ**“ представља оригиналан и актуелан научни рад из области молекуларске медицине, интензивне медицине и клиничке имунологије. Истраживање је спроведено по свим начелима научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито. Добијени резултати представљају значајан допринос сазнањима о значају профила медијатора продукованих из костију, масног ткива и системских извора на процес формирања и ремоделовања дугих костију деце након фрактуре. На основу изнетог, чланови Комисије једногласно закључују да докторска теза мр сц мед. Зорана Пауновића испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква, представља значајан допринос проучавању дате проблематике. Будући да кандидат испуњава све законом предвиђене услове за одбрану тезе, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду да овај рад прихвати као завршену докторску тезу и омогући његову јавну одбрану.

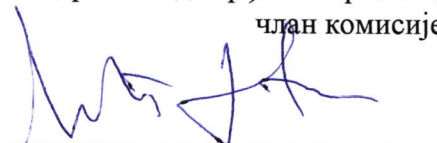
У Београду, 22.08.2019.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. ВС проф. др сц. мед. Данило Војводић,
председник комисије



2. пк доцент. др сц. мед. Срђан Старчевић,
члан комисије



3. Проф. др сц. мед. Душан Марић,
члан комисије

