

Оцену готове докторске тезе

доставља.-

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

На 59. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, одржаној 29.03.2018. године, одлуком бр. 20/59 одређени смо у комисију за оцену готове докторске тезе асист. мр сц. мед. др Николе Станковића, специјалисте анестезиологије са реаниматологијом, запосленом на Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије, под насловом „ПРОФИЛ И АКТИВНОСТ ЦИТОКИНА КОД ДЕЦЕ СА НЕПЕРФОРАТИВНИМ И ПЕРФОРАТИВНИМ АКУТНИМ АПЕНДИЦИТИСОМ“.

Након темељног проучавања готове докторске тезе и увидом у научни и стручни рад докторанта, комисија у саставу: доц. др сц. мед. Драган Ђорђевић (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду), проф. др сц. мед. Маја Шурбатовић (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду), проф. др сц. мед. Данило Војводић (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду), доц. др сц. мед. Зоран Костић (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду) и виши научни сарадник и проф. др сц. мед. Славиша Ђуричић (Медицински факултет Универзитета у Београду; Медицински факултет у Бањалуци), подноси Наставно-научном већу МФ ВМА УО следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ТЕЗЕ**

Докторски рад асист. мр сц. мед. др Николе Станковића је написан на 137 страна текста и подељен је на следећа поглавља: УВОД (19 страна), ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ (4 стране), ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), РЕЗУЛТАТИ (57 страна), ДИСКУСИЈА (30 страна), ЗАКЉУЧЦИ (2 стране) и ЛИТЕРАТУРА (23 стране). Увод је илустрован са 6 слика, 2 табеле и 1 шемом, резултати са 4 табеле и 166 графикана. У раду су цитирани подаци из 302 референце. Рад по структури има све елементе докторског рада. Истраживање у докторском раду припада областима имунологије и дечје хирургије и односи се на испитивање рутинских лабораторијских

параметара и концентрација серумских и перитонеумских цитокина и њиховог значаја у дијагнози и праћењу акутног апендицитиса код деце.

## 2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У поглављу УВОД, докторант износи опште податке и даје преглед анатомско-хистолошких и етио-патогенетских карактеристика акутног апендицитиса са нагласком на имунолошки аспект и медијаторе запаљења. Надаље, у тексту увода се приказују клиничка слика и савремени приступ акутном апендицитису код деце, уз преглед дијагностичких метода и лабораторијских параметара праћења.

Акутни апендицитис представља најчешће хитно стање а апендектомија најчешћу хитну интервенцију у педијатријској хирургији. Дијагноза овог обољења се у педијатријским болницама поставља код приближно једне трећине свих пацијената примљених са акутним болом у трбуху. Недијагностиковани и одложено дијагностиковани случајеви су и даље чести, повећавајући ризик од компликација. Са друге стране, бројна гастроентеролошка, гинеколошка и инфламаторна обољења имају сличну клиничку презентацију са акутним апендицитисом, што доводи до негативних хируршких експлорација које саме по себи носе ризик компликација у току и након интервенција.

Поуздана дијагноза акутног апендицитиса и правилно индиковање апендектомије и даље представљају изазов у свакодневној педијатријској медицинској пракси. Ризик од развијања компликоване форме болести и перфорације је код деце значајно већи него код одраслих, са инциденцом од 20% до 50% и тежим последицама. Различита клиничка презентација и недовољна сарадљивост деце током анкетирања и клиничког прегледа, као и страх медицинског тима од последица перфорације, сврставају акутни апендицитис у једно од најчешће погрешно дијагностикованих хируршких стања код деце. Непостојање јасне границе између одлуке о конзервативном лечењу и индиковања хируршког захвата, резултује непотребним апендектомијама у великом броју, по неким испитивањима чак до 40%, носећи са собом ризик периоперативних и постоперативних компликација.

Увођење сликовних дигиталних радиолошких метода довело је до унапређења дијагностичких могућности али не и до значајног смањења непотребних хируршких интервенција. Ултрасонографија је често недовољно информативна, док је компјутеризована томографија везана за високе дозе јонизујућег зрачења, што доводи у питање оправданост њене употребе. Технолошки лабораторијски напредак и развој имунологије омогућују праћење инфламаторног одговора и упућују на трагање за специфичним биомаркерима у циљу поузданије дијагнозе акутног апендицитиса. Запаљењски механизми у акутном апендицитису укључују динамичке промене са ангажовањем великог броја имунских ћелија, попут неутрофила, моноцита, ткивних макрофага, Т-лимфоцита, и њиховом комплексном интеракцијом посредованом бројним

солубилним протеинским факторима, медијаторима попут Ц-реактивног протеина, цитокина, хемокина, адхезивних молекула, протеиназа.

Праћење специфичности имунског одговора и цитокинских профила код акутног апендицитиса, може бити од значаја у постављању дијагнозе, иако је мало оваквих студија спроведено на педијатријској популацији. Ово потврђују испитивања у којима су симултано праћене концентрације већег броја цитокина у серуму пацијената. Компарација цитокинских профила у перитонеалној течности и серуму пацијената може пружити додатне информације о карактеристикама инфламаторног процеса.

На основу сагледаног клиничког проблема, расположивих литературних података и свог претходног искуства у овој области, кандидат формулише следеће радне хипотезе:

1. Нивои серумских и перитонеумских концентрација цитокина: *sE-selektin*, *G-CSF*, *ICAM-1*, *IFN-alpha*, *IFN-gamma*, *IL-1alpha*, *IL-1beta*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p70*, *IL-13*, *IL-17A*, *IP-10*, *MCP-1*, *MIP-1alpha*, *MIP-1beta*, *LAP* и *TNF-alpha*, значајно корелирају са клиничким, лабораторијским и патохистолошким налазима код деце подвргнуте апендектомији.

2. Постоји значајна корелација између вредности наведених цитокина у перитонеалној течности (локална инфламација) и серуму (системска инфламација).

У циљу провере хипотезе постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Одредити концентрације цитокина: *sE-selektin*, *G-CSF*, *ICAM-1*, *IFN-alpha*, *IFN-gamma*, *IL-1alpha*, *IL-1beta*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p70*, *IL-13*, *IL-17A*, *IP-10*, *MCP-1*, *MIP-1alpha*, *MIP-1beta*, *LAP* и *TNF-alpha* из узорак перитонеумске течности узетих непосредно по лапаротомiji и узорак венске крви узетих непосредно пре увода у анестезију, првог и трећег дана након операције и извршити поређење концентрација серумских и перитонеумских цитокина код деце подвргнуте апендектомији са различитим клиничким, лабораторијским и патохистолошким налазима.

2. Извршити анализу демографских и анамнестичких података као и анализу патохистолошких налаза препарата ресецираних апендикса код пацијената обухваћених овим испитивањем, ради корелације са осталим параметрима праћења.

3. Извршити анализу крвне слике и биохемијских анализа маркера инфламације као и скорирање клиничких налаза у испитиваној групи, ради корелације са осталим параметрима праћења

У поглављу ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ, кандидат је јасно и детаљно представио дизајн и методологију истраживања. Студија је дизајнирана и спроведена као проспективно опсервационо клиничко испитивање, а одобрена је од стране локалног Етичког одбора Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије (08.04.2015). Уз писмени пристанак родитеља за учешће у истраживању, у студију је укључено 129 пацијената оба пола, старости 3 до 16 година, код којих је планирана апендектомија због сумње на акутни апендицитис, уз јасне критеријуме за искључивање из студије: деца млађа од 3 године, деца старија од 16 година, присуство других акутних обољења, пацијенти са другим интраоперативним налазима.

Укључивање пацијената, прикупљање узорака и биохемијска и патохистолошка обрада узорака су спроведени на Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије у периоду април – децембар 2015. Имунолошка обрада узорака је извршена на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Пацијенти су на основу патохистолошког налаза подељени у три групе испитаника:

- Прву групу су чинили пацијенти са налазом нормалног апендикса или раног (катаралног) апендицитиса.
- Другу групу су чинили пацијенти са налазом флегмонозног (супуративног) апендицитиса.
- Трећу групу су чинили пацијенти са налазом гангренозног (некротичног) и/или перфоративног апендицитиса.

Код свих пацијената су непосредним увидом у постојећу медицинску документацију, кроз социо-епидемиолошку анкету и анамнезу родитеља и пацијената, прикупљени подаци о демографским карактеристикама, социо-епидемиолошким, хередитарним, коморбидитетним параметрима и преоперативном присуству симптома апендицитиса.

Преоперативна детекција клиничких знакова апендицитиса вршена је објективним физикалним прегледом. Узорак периферне венске крви за утврђивање апсолуног броја леукоцита и леукоцитарне формуле као и одређивање серумских концентрација Ц-реактивног протеина вршени су у биохемијској лабораторији Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије у Београду.

За клиничку оцену налаза код сумње на акутни апендицитис коришћен је *PAS (Pediatric Appendicitis Score)*, систем којим су бодовани поједини клинички параметри.

Концентрација цитокина у серуму и перитонеумској течности одређивана је методом проточне цитометрије на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Патолошка обрада препарата ресецираних апендикса на основу које су формиране групе пацијената, вршена је на Одељењу за клиничку патологију Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије у Београду.

На основу резултата извршена је анализа и корелација клиничких, биохемијских и имунолошких параметара са циљем идентификације разлика између формираних група. Статистички прорачуни урађени су коришћењем *GraphPad Prism 5 version 5.01* софтвера. У дескриптивној статистици коришћени су уобичајени параметри за процену централне тенденције података (средња вредност, медијана) као и параметри за процену варијабилности група (стандардна девијација, распон, 95%-не границе поверења). Нормалност расподеле проверавана је *Колмогоров-Смирнов* тестом. У зависности од ове процене, за поређење две групе коришћени су *Mann-Whitney* тест или *Student T* тест. За процену значајности три или више група коришћени су непараметарски *Kruskal-Wallis* тест или *АНОВА* тест у једном правцу. За процену јачине повезаности различитих параметара коришћени су *Spearman* или *Pearson* тест корелације. Сензитивност и специфичност варијабли анализирани су уз помоћ *ROC curve* процедуре. Статистички значајним сматране су разлике у случају  $p \leq 0,05$ , умерено статистички значајним у случају  $p \leq 0,01$  и високо статистички значајним у случају  $p \leq 0,001$ .

Добијени резултати су показали:

1. Уз расположививе дијагностичке приступе, инциденца негативне апендектомије и инциденца компликованог апендицитиса код деце су и даље високе и не могу се довести у везу са преоперативним трајањем симптома.
2. Поузданост интраоперативне дијагнозе акутног апендицитиса код деце је још увек недовољно висока, превасходно због немогућности адекватне процене микроперфоративних лезија.
3. Неутрофилно-лимфоцитни однос са високом поузданошћу диференцира негативан од позитивног налаза акутног апендицитиса код деце али не и стадијум болести.
4. Ц-реактивни протеин показује високу поузданост у дијагнози инфламаторне перфорације али не и почетне инфламације апендикса код педијатријских пацијената.
5. Неутрофилни мијелопероксидазни индекс, због ширеког референтног опсега и индивидуално зависних базалних вредности, не може бити поуздан у иницијалној дијагнози акутног апендицитиса код деце.
6. Концентрације перитонеумских цитокина боље од њихових серумских концентрација диференцирају присуство и стадијум акутног апендицитиса код деце.

7. У све три групе пацијената утврђена је значајна корелација између перитонеумских и серумских вредности MIP-1 $\alpha$ , IL-4, IL-17 и IFN- $\gamma$ . У групама са NEAA и UAA показана је значајна корелација око 45% испитиваних цитокина. Међутим, у групи САА значајна корелација је утврђена у 17/20 одређиваних цитокина (85%). Посебност ове групе у односу на NEAA и UAA је постојање значајне корелације MIP-1 $\beta$ , IL10, TNF- $\alpha$ , IL12 и IL13.
8. Преоперативне серумске концентрације инерлеукина 10 (IL-10) и макрофагног инфламаторног протеина 1 алфа (MIP-1 $\alpha$ ) дискриминишу флегмонозни од гангренозног и перфоративног апендицитиса код деце.
9. Преоперативне серумске концентрације интерфероном индуцибилног протеина 10 (IP-10) дискриминишу инфламирани од неинфламираног апендикса код деце.
10. Разлике у серумским концентрацијама IL-10, MIP-1 $\alpha$  и IP-10 се код деце оперисане у различитим стадијумима акутног апендицитиса одржавају и након операције и могу бити коришћене за постоперативно праћење пацијената.
11. IL-10, MIP-1 $\alpha$  и IP-10 могу представљати тројни биомаркерски сет у дијагностици и праћењу акутног апендицитиса код деце.

### 3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу ДИСКУСИЈА докторант коректно, садржајно и критички сагледава добијене резултате у светлу постојећих сазнања добијених прегледом литературе која се бави клиничком и лабораторијском дијагностиком и праћењем акутног апендицитиса код деце. Начин на који је дискусија написана указује на то, да докторант у потпуности влада материјом из области којој припада тема докторског рада. Др Станковић указује на могућу дијагностичку вредност појединих варијабли у складу са добијеним резултатима истраживања. Аргументовано објашњава разлике између својих резултата и оних из сличних истраживања, најпре за рутинске лабораторијске параметре а потом и за специфичне медијаторе запаљења. Добијене корелације између тестираних варијабли тумачи у контексту доказаних механизма урођеног и стеченог имунског одговора. Већина цитираних радова се на сличан начин бави тумачењем вредности појединих хематолошких биомаркера у серуму и цитокина у перитонеумској течности и серуму деце са акутним апендицитисом, али са знатно мањим бројем тестираних цитокина. Такође, постојале су разлике са поређеним студијама и у дизајну истраживања, броју испитаника, старосној структури и временима када су узимани узорци за биохемијске и имунолошке анализе. Кандидат је, у овом истраживању, кроз добијене резултате, доказао вредност појединих

рутинских лабораторијских параметара у дијагнози и праћењу деце са акутним апендицитисом, као и постојање значајне рефлексије локалних збивања у акутном апендицитису на системски ниво код узрапредовалих форми болести. На основу добијених серумских вредности цитокинских варијабли и њихових потенцијала за дискриминацију присуства и одсуства, односно стадијума акутног апендицитиса, кандидат предлаже троструки биомаркерски цитокински сет као ново лабораторијско оруђе. Највећи допринос овог истраживања се огледа у томе што добијени резултати отварају могућност увођења нових лабораторијских метода за унапређење дијагнозе акутног апендицитиса код деце.

#### 4. ОБЈАВЉЕНИ РЕЗУЛТАТИ

1. Nikola Stanković, Ivan Stanojević, Dragan Đorđević, Zoran Kostić, Ivo Udovičić, Maja Miličković et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in pediatric acute appendicitis. Vojnosanitetski pregled. DOI: 10.2298/VSP160510210S
2. Nikola Stankovic, Dragan Djordjevic, Goran Rondovic, Zoran Kostic, Snjezana Zeba, Snezana Milosavljevic et al. Neutrophil Myeloperoxidase Index In Pediatric Acute Appendicitis. Vojnosanitetski pregled. DOI: 10.2298/VSP171218012S
3. Stanković N, Ilić J, Rebac V, Mirčetić M, Milojković-Marinović V, Vukadin M, et al. Neutrophil-to-lymphocyte Ratio and Neutrophil Myeloperoxidase Index in Pediatric Acute Appendicitis. ESPA Congress Belgrade 2016, 29.Sep-01.Oct.
4. Stankovic N, Stanojevic I, Surbatovic M, Lekic D, Stevanovic V, Mojsic B, et al. Cytokine discrimination of inflammation degree in pediatric acute appendicitis. ESPA Congress Glasgow 2017, 28.-30. Sep.

#### 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Кандидат асист. мр сц. мед. др Никола Станковић испуњава све услове дефинисане Чланом 9. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука. Докторска теза под називом „ПРОФИЛ И АКТИВНОСТ ЦИТОКИНА КОД ДЕЦЕ СА НЕПЕРФОРАТИВНИМ И ПЕРФОРАТИВНИМ АКУТНИМ АПЕНДИЦИТИСОМ“ представља оригинални научни рад из области дечје хирургије и имунологије. Истраживање је спроведено по свим начелима научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито. Добијени резултати доприносе сазнањима о локалном и системском имунском одговору у акутном апендицитису код деце и пружају увид у рефлексију локалних збивања на системски ниво. Такође, резултати указују на апликабилна сазнања у сфери унапређења лабораторијске

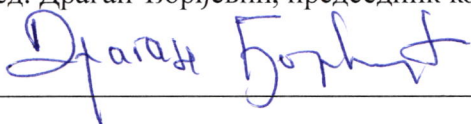


дијагностике акутног апендицитиса код деце. На основу изнетог, чланови Комисије једногласно закључују да докторска теза асист. мр сц. мед. др Николе Станковића испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева и као таква представља значајан допринос проучавању дате проблематике. С обзиром да кандидат испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске 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 одбрану.

У Београду, 16.04.2018. године

#### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

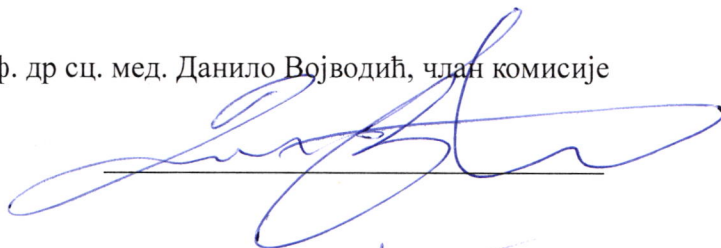
1. Доц. др сц. мед. Драган Ђорђевић, председник комисије

  
\_\_\_\_\_

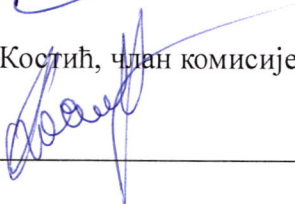
2. Проф. др сц. мед. Маја Шурбатовић, члан комисије

  
\_\_\_\_\_

3. Проф. др сц. мед. Данило Војводић, члан комисије

  
\_\_\_\_\_

4. Доц. др сц. мед. Зоран Костић, члан комисије

  
\_\_\_\_\_

5. Виши научни сарадник др сц. мед. Славиша Ђуричић, члан комисије

  
\_\_\_\_\_