

Оцену готове докторске тезе

доставља. –

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

На 65. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, одржаној 04.12.2018. године, одлуком бр. 18/65 одређени смо у комисију за оцену готове докторске тезе потпуковника асист. др мед. Иве Удовичића, специјалисте анестезиологије са реаниматологијом, запосленом на Клиници за анестезиологију и интензивну терапију ВМА, под насловом

„ЗНАЧАЈ СУПРЕСОРСКИХ ЋЕЛИЈА МИЈЕЛОИДНОГ ПРЕКЛА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ ПАЦИЈЕНАТА СА ПЕРИТОНИТИСОМ, ПАНКРЕАТИТИСОМ И ТРАУМОМ КОМПЛИКОВАНИХ СЕПСОМ“.

Након темељног проучавања готове докторске тезе и увидом у научни и стручни рад докторанда, комисија у саставу: вс проф. др Данило Војводић (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду), вс проф. Маја Шурбатовић (Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду) и проф. др Јасна Јевђић (Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу), подноси Наставно-научном већу МФ ВМА УО следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторски рад потпуковника асист. др мед. Иве Удовичића написан је на 117 страна текста и подељен на следећа поглавља: УВОД (33 стране), ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ (3 стране), РЕЗУЛТАТИ (30 страна), ДИСКУСИЈА (14 страна), ЗАКЉУЧАК (1 страна) и ЛИТЕРАТУРА (25 страна). Увод је илустрован са 5 слика и 6 табела, а резултати са 12 слика и 18 табела. У дисертацији су цитирани подаци из 305 референци. Рад по структури има све елементе докторске дисертације. Истраживање у докторском раду припада областима молекулске медицине, интензивне медицине и клиничке имунологије и односи се на испитивање супресорских ћелија мијелоидног порекла (MDSC) у секундарној сепси

код пацијената са панкреатитисом, перитонитисом и траумом, као и значај ових ћелија у предикцији смртног исхода и врсте бактеријског проузроковача секундарне сепсе.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У поглављу УВОД кандидат даје опширан преглед досадашњих сазнања о патобиологији сепсе. Сепса је огроман проблем јавног здравља широм света и један је од водећих узрока смрти у јединицама интензивног лечења, а још увек нису у потпуности расветљени патобиолошки механизми који доводе до појаве овог синдрома. Истраживачи су сагласни да се инциденца сепсе повећава, а иако је леталитет мањи, бележи се више случајева тежих облика болести.

Актуелна дефиниција сепсе, Сепса-3, истиче да се ради о „животно угрожавајућој дисфункцији органа изазваној поремећеном регулацијом одговора домаћина на инфекцију“. У сепси се покреће комплексан имунски одговор са раном активацијом и проинфламаторних и антиинфламаторних одговора. Производња и Th1 и Th2 цитокина је неконтролисана и долази до појаве различитих цитокинских профила са различитим утицајем на исход сепсе. Поремећени су и функција и број ћелија и урођене и стечене имуности, а имуносупресија је пре примарни него компензаторни одговор у сепси.

Данас већина пацијената преживи почетну фазу сепсе, и док један део пацијената има некомплицован клинички ток са потпуном рехабилитацијом, други део преживелих никад се не опорави у потпуности развијајући хроничну критичну болест. Предложен је посебан ентитет, синдром перзистентне инфламације, имуносупресије и катаболизма (PICS) који одговара фенотипу једног дела пацијената са хроничном критичном болешћу. Такође је предложена и патогенеза PICS-а према којој важну улогу у настанку овог синдрома имају MDSC.

MDSC представљају хетерогену популацију патолошки активираних ћелија која укључује мијелоидне прогениторе и незреле мијелоидне ћелије (макрофаге, гранулоците и дендритске ћелије) са снажним имуносупресивним дејством. MDSC су највише проучаване код пацијената са малигним болестима, док подаци о улози ових ћелија у сепси углавном потичу из студија на животињским моделима сепсе. Ове ћелије не експримирају или слабо експримирају маркере зрелих мијелоидних ћелија, производе велике количине реактивних врста кисеоника, показују појачану активност аргиназе 1 и индуцибилне синтазе азот монооксида и др. У студијама на мишјем моделу полимикробне сепсе показано је да долази до акумулирања и полиморфонуклеарних (PMN) и моноцитних (M) MDSC у костној сржи, слезини и лимфним чворовима, а да са трајањем сепсе долази до динамичних промена у броју и функцији MDSC. Обе подврсте, различитим механизмима, супримирају пролиферацију и функцију Т-лимфоцита и индукују Th2 поларизацију имунског одговора, међутим, адоптивни трансфер „касних“ MDSC имао је протективну улогу и побољшао је преживљавање септичних животиња.

Повећање броја MDSC нађено је и у људској сепси, како у акутној фази сепсе тако и у хроничној инфламацији и имуносупресији након тешке сепсе и септичног шока, а указано је и на могућност да Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије могу индуковати акумулацију различитих популација MDSC. С обзиром на малобројност студија које су испитивале MDSC код пацијената са сепсом као и на контрадикторне податке о њиховој улози који су добијени проучавањем мишјих модела сепсе, главни циљ ове студије био је испитивање значаја супресорских ћелија мијелоидног порекла у системској циркулацији критично оболелих пацијената са секундарном сепсом.

На основу свега наведеног кандидат је поставио следећу хипотезу:

Вредности MDSC повишене су у периферној крви пацијената са сепсом и корелирају са врстом бактеријског проузроковача, основним обољењем које је довело до сепсе и исходом.

У циљу провере хипотезе кандидат је дефинисао следеће циљеве истраживања:

1. Одредити учесталост и апсолутни број MDSC у периферној крви пацијената са сепсом.

2. Испитати повезаност учесталости и апсолутног броја MDSC у периферној крви септичних пацијената са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне бактерије, Грам-негативне бактерије, полимикробна инфекција), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) и исходом (преживео, умро).

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, и одобрена је од стране Етичког комитета Војномедицинске академије. Истраживање је спроведено у Клиници за анестезиологију и интензивну терапију и Институту за медицинска истраживања ВМА и трајало је 2 године и 1 месец. Уз писмени пристанак пацијената или најближих сродника, у студију је укључено 40 критично оболелих септичних пацијената примљених у хируршку јединицу интензивног лечења (ХЈИЛ) који су испунили актуелне дијагностичке критеријуме Сепсе-3 за сепсу (раније тешка сепса) и/или септични шок. Ексклузивни критеријуми били су: секундарна сепса и/или септични шок који није узрокован тешким перитонитисом, панкреатитисом или траумом, те малигне болести било ког порекла. Мера исхода био је болнички морталитет, а пацијенти су праћени до отпуста из болнице (преживели) или до смрти у болници (умрли).

SOFA скор, SAPS II и APACHE II скор рачунати су и забележени у прва 24 сата по пријему у ХЈИЛ (1. дан), а настављено је са дневним бележењем SOFA скорa током боравка пацијената у ХЈИЛ. Узорци крви за анализу MDSC прикупљани су 1. и 5. дана по укључивању у студију, а истовремено је узимана крв за хемокултуру. Имунофенотипска анализа ћелија вршена је у свежим, лизираним узорцима периферне крви и одређени су учесталост и апсолутни број ћелија које фенотипски кореспондирају са PMN-MDSC и M-MDSC.

Комплетна статистичка анализа урађена је у статистичком софтверском пакету *SPSS Statistics 18*. У случају континуираних података, приказане су средња вредност, стандардна девијација, медијана, минималне и максималне вредности варијабли. За испитивање нормалности дистрибуције континуираних података коришћен је Kolmogorov-Smirnov тест. Статистички значајне разлике између група тестиране су Mann-Whitney тестом. За испитивање повезаности између варијабли коришћен је Spearmanov коефицијент корелације рангова ρ . Да би се утврдила сензитивност и специфичност варијабли као предиктора леталног исхода, односно природе бактеријемije, анализирани су ROC криве и површина испод кривих (AUC). Да би се утврдила јачина статистичке повезаности између варијабли израчунати су односи шанси (OR) и кореспондирајући 95% интервали поузданости. Независне варијабле анализирани су бинарном логистичком регресијом. Подаци су представљени табеларно и графички, а разлике су сматране статистички значајним ако је $p < 0,05$.

Добијени резултати показали су:

1. Код пацијената са сепсом могу се детектовати и полиморфонуклеарна (PMN) и моноцитна (M) подврста MDSC. Обе подврсте су нађене унутар $\text{Lin}^+(\text{CD3}^+/\text{CD19}^-/\text{CD56}^-)/\text{HLA-DR}^{\text{low}}\text{CD11b}^+$ популације, с тим да су PMN-MDSC биле $\text{CD14}^-\text{CD15}^+$, а M-MDSC $\text{CD14}^+\text{CD15}^-$. PMN-MDSC су одвојене од зреле гранулоцитне популације на основу CD10 негативности, те ниже и нехомогене експресије практично свих позитивних маркера (CD11b, CD15, CD16).
2. Опсервирана је смањена експресија HLA-DR на моноцитима пацијената са сепсом што је маркер имунопарализе.
3. У обе групе пацијената, преживелих и умрлих, трајање сепсе од 1. до 5. дана било је праћено порастом вредности обе испитиване субпопулације MDSC. Учесталост PMN-MDSC била је значајно већа код умрлих и 1. и 5. дана праћења у односу на преживеле. Статистички значајно повећање апсолутног броја PMN-MDSC уочено је 5. дана код умрлих у односу на преживеле. Унутар група преживелих и умрлих учесталост M-MDSC била је значајно већа 5. дана у односу на 1. дан. Учесталост M-MDSC била је значајно већа 5. дана код умрлих у односу на преживеле. Апсолутни број M-MDSC био је значајно већи код преживелих 5. дана у односу на преживеле 1. дана.
4. SOFA скор и учесталост PMN-MDSC 5. дана независни су предиктори смртног исхода. Анализа ROC кривих је показала да су све испитиване варијабле 5. дана, осим апсолутног броја M-MDSC, са вредностима већим од граничних, биле умерено добри предиктори смртног исхода. Анализа Spearmanovog коефицијента корелације ρ показала је најјачу статистички значајну позитивну корелацију између учесталости PMN-MDSC 5. дана и смртног исхода.
5. Релативне и апсолутне вредности PMN-MDSC и M-MDSC 5. дана значајно су веће код пацијената са Грам-позитивном сепсом у односу на пацијенте са

полимикробном сепсом. Апсолутне вредности обе подврсте MDSC значајно су веће 5. дана код пацијената са Грам-позитивном у односу на Грам-негативну сепсу.

6. Статистичка анализа је показала да је апсолутни број M-MDSC 5. дана независни предиктор Грам-позитивне сепсе. Постојала је значајна позитивна корелација између свих испитиваних варијабли 5. дана и Грам-позитивне сепсе.
7. Пацијенти са Грам-позитивном хемокултуром имали су значајно ниже односе неутрофили/PMN-MDSC и моноцити/M-MDSC 5. дана у односу на пацијенте са полимикробном хемокултуром. Однос моноцити/M-MDSC био је значајно нижи 5. дана код пацијената са Грам-позитивном у односу на Грам-негативну хемокултуру.
8. Однос неутрофили/PMN-MDSC био је значајно нижи код умрлих и 1. и 5. дана.
9. Односи неутрофили/PMN-MDSC и моноцити/M-MDSC нижи од граничних вредности били су умерено добри предиктори Грам-позитивне хемокултуре и 1. и 5. дана, а највећу предиктивну вредност има однос моноцити/M-MDSC 5. дана (AUC ROC 0,793).
10. Односи неутрофили/PMN-MDSC и моноцити/M-MDSC 5. дана виши од граничних вредности умерено су добри предиктори полимикробне хемокултуре.
11. Однос неутрофили/PMN-MDSC нижи од граничних вредности умерен је предиктор смртног исхода и 1. и 5. дана праћења пацијената са сепсом.
12. Није нађена повезаност основних узрока секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) са акумулацијом MDSC.

3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу ДИСКУСИЈА докторанд коректно, садржајно и критички сагледава добијене резултате у светлу постојећих сазнања добијених прегледом литературе која се бави испитивањем супресорских ћелија мијелоидног порекла у експерименталним моделима сепсе и код пацијената са сепсом. Начин на који је дискусија написана указује на то да докторанд у потпуности влада материјом из области којој припада тема докторског рада. Др Удовичић указује на предности коришћења свежих лизираних узорака периферне крви за детекцију MDSC, а посебно PMN-MDSC. Аргументовано образлаже одабир комбинације маркера за имунофенотипизацију PMN-MDSC помоћу којих се ове ћелије могу разликовати од зрелих неутрофила у крви септичних пацијената, а каква до сада није коришћена у сличним студијама. Тамо где има смисла и где је могуће, с обзиром на малобројност студија о улози, функцији и значају MDSC у људској сепси, докторанд објашњава разлике између својих и до сада публикованих резултата, а које су настале због разлика у испитиваним кохортама, мерама исхода, времену узимања узорака, врстама спроведених анализа и избора различитих маркера за фенотипску карактеризацију MDSC, а нарочито PMN-MDSC. У студији је по први пут показано да је учесталост ћелија

које фенотипски кореспондирају са PMN-MDSC 5. дана сепсе независан предиктор смртног исхода, са добром дискриминативном моћи. Такође је показано да различите врсте бактеријских проузроковача (Грам-позитивни, Грам-негативни, полимикробни) индукују експанзију различитих подврста MDSC, с тим да је апсолутни број обе подврсте ових ћелија био значајно већи код пацијената са Грам-позитивном сепсом у односу на Грам-негативну и полимикробну сепсу. Анализе су показале да је апсолутни број M-MDSC независан предиктор Грам-позитивне сепсе. С обзиром на то да се повећане вредности MDSC у сепси не могу објаснити само „ургентном мијелопоезом“, те да је предложено да би до њихове експанзије могло доћи и репрограмирањем или алтернативном активацијом постојећих моноцита и гранулоцита, одређивани су и односи неутрофили/PMN-MDSC и моноцити/M-MDSC. Показано је да се ови односи мењају током трајања сепсе и да су умерено добри предиктори различитих врста хемокултура, при чему је однос моноцити/M-MDSC 5. дана, нижи од граничног, имао највећу вредност као добар предиктор Грам-позитивне сепсе (AUC ROC 0,793). С друге стране, нађено је да је однос неутрофили/PMN-MDSC нижи од граничних вредности био умерено добар предиктор смртног исхода у испитиваној популацији пацијената. Супротно очекивањима, истраживањем није показана повезаност основног обољења које је довело до сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) са експанзијом MDSC.

4. ОБЈАВЉЕНИ РАДОВИ ИЗ ОВЕ ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ

1. **Ivo Udovicic**, Maja Surbatovic, Goran Rondovic, Ivan Stanojevic, Snjezana Zeba, Dragan Djordjevic, Ana Popadic, Snezana Milosavljevic, Nikola Stankovic, Dzihan Abazovic, Danilo Vojvodic. **Myeloid-derived suppressor cells in secondary sepsis: is there association with lethal outcome?** Vojnosanitetski Pregled (2018); Online First September, 2018. DOI: 10.2298/VSP180706133U
2. **Ivo Udovicic**, Maja Surbatovic, Goran Rondovic, Ivan Stanojevic, Snjezana Zeba, Dragan Djordjevic, Aneta Peric, Snezana Milosavljevic, Nikola Stankovic, Dzihan Abazovic, Danilo Vojvodic. **Do nature of bacteremia and origin of secondary sepsis in critically ill patients determine subset of myeloid-derived suppressor cells expansion?** Vojnosanitetski pregled (2018); Online First October, 2018. DOI: 10.2298/VSP181008174U

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Кандидат потпуковник асист. др мед. Иво Удовичић испуњава све услове дефинисане Чланом 9. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука. Докторска теза под називом „**ЗНАЧАЈ СУПРЕСОРСКИХ ЋЕЛИЈА МИЈЕЛОИДНОГ ПРЕКЛА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ ПАЦИЈЕНАТА СА ПЕРИТОНИТИСОМ, ПАНКРЕАТИТИСОМ И ТРАУМОМ КОМПЛИКОВАНИХ СЕПСОМ**“ 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 фундаменталним сазнањима о значају супресорских ћелија мијелоидног порекла у патобиологији сепсе и отварају нове могућности у дијагностици, праћењу и терапијским приступима сепси код критично облелих пацијената у хируршким јединицама интензивног лечења. На основу изнетог, чланови Комисије једногласно закључују да докторска теза пп асист. др мед. Иве Удовичића 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, 13.12.2018.године

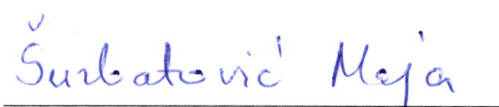
ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др сц. мед. Данило Војводић, председник комисије



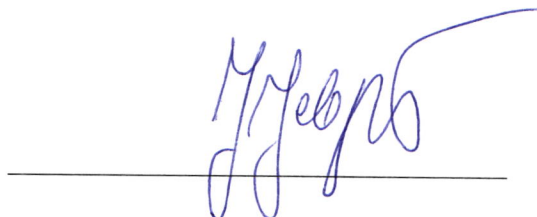
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'D. Vojvodić', written over a horizontal line.

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



A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Šurbatović Maja', written over a horizontal line.

3. Проф. др сц. мед. Јасна Јевђић, члан комисије



A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Jevđić', written over a horizontal line.