

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ

Одлуком бр. 20/88 од 03.06.2021. године са 88. седнице Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду одржане 27.05.2021. године именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

„ПРОЦЕНА ФУНКЦИЈЕ НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ ПАЦИЈЕНАТА СА СЕПСОМ“

кандидата потпуковника асистента др мед. Горана Рондовића, запосленог на Клиници за анестезиологију и интензивну терапију Војномедицинске академије у Београду.

Ментор: пк проф. др сц. мед. Драган Ђорђевић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. ВС проф. др сц. мед. Маја Шурбатовић, редовни професор, Универзитет одбране у Београду, Медицински факултет Војномедицинске академије, председник
2. пп доц. др сц. мед. Иван Станојевић, доцент, Универзитет одбране у Београду, Медицински факултет Војномедицинске академије, члан
3. Проф. др сц. мед. Владислав Воларевић, ванредни професор, Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, члан

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршеног докторског рада једногласно подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација написана је на 209 страна и подељена на следећа поглавља: увод (64 стране), хипотеза и циљеви истраживања (1 страна), испитаници и методе истраживања (2 стране), резултати (74 стране), дискусија (29 страна), закључци (1 страна) и литература (27 страна). Увод је илустрован са 28 слика. Резултати су документовани са 76 табела и 36 графикона. У дисертацији су цитирани подаци из 253 референце. Рад по структури има све елементе докторске дисертације.

У приложеном докторском раду истраживање се фокусирало на процену функције неутрофила и моноцита код критично оболелих пацијената са секундарном сепсом. Упркос многим истраживањима, имунски одговор код критично оболелих је, највећим делом, недовољно разјашњен.

У поглављу **увод** др Рондовић пружа детаљан преглед досадашњих сазнања о имунском одговору код критично оболелих са секундарном сепсом. Сепса је у фокусу интензивне медицине јер представља важан клинички и истраживачки проблем у лечењу критично оболелих у јединицама интензивне медицине (ЖИМ) широм света. Још пре две деценије сепса је била водећи узрок смрти критично оболелих. Упркос савременим достигнућима у интензивној медицини, овај тренд се наставио до данашњег дана и представља велико оптерећење и за најразвијеније здравствене системе. Нова дефиниција сепсе, *SEPSIS-3*, приказује сепсу као животно угрожавајућу дисфункцију органа узроковану поремећеном регулацијом одговора домаћина на инфекцију. Тиме је стављен акценат на имуноинфламаторну каскаду сепсе. У имунопатогенези сепсе, прву линију одбране од микроорганизама, у виду урођене имуности чине, између осталог, активирани неутрофили и моноцити. Временски след и динамика имунских промена у сепси је предмет константног проучавања због тога што неадекватна имуноинфламаторна каскада доводи до оштећења различитих органских система код критично оболелих, што значајно повећава морталитет. Вредности пресепсина, прокалцитонина, Ц-реактивног протеина, лактата, средњег волумена тромбоцита као и међусобних односа неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита, су неки од параметара инфламаторног одговора који се могу користити за имуномониторинг. Експресија ЦД64 (*Cluster of Differentiation 64*), ЦД14 (*Cluster of Differentiation 14*), ПД-Л1 (*Programmed cell death-ligand 1-PD-L1; Cluster of Differentiation 274*) на неутрофилима и моноцитима може пружити увид у њихов активациони статус. Када се то употпуни експресијом ХЛА-ДР (*Human Leukocyte Antigen – D Related isotype*) на моноцитима и индексом дивергенције неутрофила (ИДН), могао би се добити бар делимични увид у имунопатогенезу секундарне сепсе код критично оболелих која је веома значајна за ток и исход болести. ИДН се односи на промене у карактеристикама расипања светлости гранулоцитне/неутрофилне популације на предњем (*FS – Forward Scatter*) и бочном детектору (*SS – Side Scatter*) током цитофлуориметријских анализа. Нема много података о појединим наведеним елементима имунског одговора код критично оболелих, а неки од наведених параметара су детаљније испитани. Повезаност параметара имуномониторинга са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе уопште није истраживано према доступној литератури; веома мали број публикација се бави корелацијом наведених параметара са врстом бактеријског проузроковача сепсе. Више је података везано за повезаност параметара имунског одговора и исхода болести, али и ту постоје контрадикторни резултати. Свакако, недостаје овако свеобухватан приступ проблему на којем др Рондовић базира своје истраживање.

На основу наведеног, др Рондовић је поставио следећу **хипотезу**:

Активациони статус неутрофила (експресија nCD64, nCD14, nPD-L1 и IDN) и моноцита (експресија XLA-DR, mCD64, mCD14, mPD-L1) као и међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита (МПВ/Тр, НЛ, МЛ, ТЛ) у крви критично оболелих са секундарном сепсом корелирају са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) и исходом (преживео, умро).

За проверу хипотезе дефинисани су следећи **циљеви истраживања**:

1. Испитати фенотипске карактеристике и активациони статус неутрофила и моноцита у крви критично оболелих од секундарне сепсе и здравих контролних добровољаца.
2. Испитати повезаност активационог статуса неутрофила и моноцита у крви критично оболелих од секундарне сепсе са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) и исходом (преживео, умро) првог (дан постављања дијагнозе) и петог дана.
3. Испитати повезаност међусобних односа неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита (МПВ/Тр, НЛ, МЛ, ТЛ) у крви критично оболелих од секундарне сепсе са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума), и исходом (преживео, умро) првог дана.
4. Испитати повезаност параметара инфламаторног одговора (пресепсин, прокалцитонин, Ц-реактивни протеин, МПВ) као и вредности лактата са исходом (преживео, умро) критично оболелих од секундарне сепсе првог, трећег и петог дана.

У поглављу **испитаници и методе** кандидат је на прецизан начин представио дизајн истраживања: проспективна, опсервациона студија. Такође је јасно и детаљно образложио методологију истраживања које је спроведено на Клиници за анестезиологију и интензивну терапију и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије. Студија је одобрена од Етичког комитета ВМА и спроведена у сагласности са Хелсиншком декларацијом и смерницама Добре Клиничке Праксе у клиничком испитивању. За све пацијенте укључене у ову студију добијена је лична сагласност или сагласност њихових најближих сродника. У клиничко испитивање укључено је 86 критично оболелих пацијентата са постављеном дијагнозом сепсе након испуњавања дијагностичких критеријума *SEPSIS* – 3 протокола. Критеријуми за искључење обухватили су малигне болести било ког порекла као и секундарну сепсу која није последица перитонитиса, панкреатитиса или трауме. Овим процесом искључена су 22 пацијента од првобитних 108 који су разматрани за укључење у студију.

Током периода лечења у ЈИТ, сви пацијенти су третирани према смерницама за лечење сепсе уз примену антибиотске терапије, надокнаде циркулаторног волумена, вазоактивне подршке, респираторне подршке применом разних видова неинвазивне и инвазивне механичке вентилације, контролу извора инфекције као и уз хируршке интервенције уколико се створила потреба за тим видом лечења. За меру исхода лечења коришћен је болнички морталитет, а пацијенти укључени у студију праћени су до отпуста из болнице (преживели) или смрти у болници (умрли).

Узорци крви за одређивање биомаркера сакупљани су у три временска интервала, првог дана пријема и/или постављања дијагнозе сепсе и укључивања у студију, а потом трећег и петог дана. Истовремено са узимањем узорака за одређивање биомаркера узимани су узорци за одређивање хемокултура. Током сва три временска интервала када је рађено узорковање праћени су скорови *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)* скор и *Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II* скор. *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II* скор одређиван само првог дана узорковања. Скорови *SOFA* и *SAPS II* су одређивани сваког дана током лечења у ЈИТ.

Контролни узорци су добијени од 22 здрава добровољца чији су узорци узети у Институту за трансфузиологију и хемобиологију крви ВМА након што су потписали пристанак.

Квалификовани медицински техничари су сакупљали узорке венске крви у *BD Vacutainer K2 EDTA* епрувете за сакупљање узорака. Сви узорци крви су анализирани у временском оквиру од 2 сата након венепункције. Комплетна крвна слика је одређивана на уређају *Siemens Advia 120 hematology system, Siemens Healthineers*, Немачка. За одређивање вредности Ц-реактивног протеина коришћен је уређај *ADVIA 1800, Siemens Healthineers*, Немачка а за мерење прокалцитонина уређај *CENTAUR Advia XP, Siemens Healthineers*, Немачка. За гасне анализе и одређивање нивоа лактата у артеријској крви коришћен је гасни анализатор *GEM3000 Premier, Instrumentation*

Laboratory Werden Company, Шпанија; за одређивање вредности пресепсина *Patfast compact immuno analyzer*, *Mitsubishi Chemical Europe*, Немачка. Имунофенотипске анализе (експресија nCD64, nCD14, nPD-L1 и ИДН на неутрофилима и експресија ХЛА-ДР, mCD64, mCD14, mPD-L1 на моноцитима) рађене су првог и петог дана након укључивања у⁴¹ студију путем проточног цитофлуориметра *Beckman Coulter FC 500*, САД, уз помоћ *CXP* аналитичког софтвера.

Статистичка обрада података је рађена уз помоћ статистичког софтвера из пакета *SPSS Statistics 18*. У случају континуираних података, варијабле су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација, медијана, минималне и максималне вредности. За испитивање нормалности дистрибуције континуираних података коришћен је Kolmogorov-Smirnov тест. Статистичка значајност разлике између испитиваних група тестирана је Mann-Whitney или Friedman тестом. Spearman коефицијент корелације ρ коришћен је да би се испитала повезаност између параметара. Да би се утврдила сензитивност и специфичност варијабли као предиктора леталног исхода, анализиране су ROC криве и површине испод њих (AUC) уз коришћење Youden индекса због објективности. Израчунати су односи шанси (OR) и кореспондирајући 95% интервали поверења да би се утврдила статистичка јачина повезаности између варијабли и исхода. Независне варијабле, које су највише обећавале као појединачни или комбиновани фактори ризика, подвргнуте су бинарној логистичкој регресионој анализи. Разлике су сматране статистички значајним ако је $p < 0.05$.

У поглављу **резултати**, аутор приказује детаљно обрађене податке и јасно представља све добијене резултате.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз упоредни приказ података из литературе и добијених резултата из докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада.

Литература садржи 253 референце.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Кандидат у овом поглављу детаљно представља и описује добијене резултате који показују:

1. Активациони статус неутрофила и моноцита корелира са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе код критично оболелих
2. Од свих параметара активационог статуса неутрофила једини независни предиктор исхода је ИДН, његове ниске вредности првог дана мерења су повезане са смртним исходом.

3. Од свих параметара активационог статуса моноцита, најбољи предиктори исхода су мХЛА-ДР првог дана мерења и мПД-Л1 и првог и петог дана мерења: ниске вредности мХЛА-ДР као и високе вредности мПД-Л1 су повезане са смртним исходом
4. Композитни биоскор креиран од три елемента (ИДН, мХЛА-ДР и мПД-Л1) је најбољи предиктор исхода првог дана мерења са AUC/ROC 0.73.
5. Активациони статус неутрофила и моноцита не корелира са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије).
6. Међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита првог дана мерења у крви критично оболелих са секундарном сепсом корелирају са основним обољењем, врстом бактеријског проузроковача и исходом.
7. Од испитиваних параметара инфламаторног одговора, независни предиктори исхода су били пресепсин првог дана мерења и МПВ трећег дана мерења: њихове високе вредности су повезане са смртним исходом.
8. Композитни биоскор креиран од три елемента (пресепсин, МПВ, лактати) је најбољи предиктор исхода трећег дана мерења са AUC/ROC 0.82.

В) Упоредна анализа резултата докторске дисертације са резултатима из литературе

У поглављу дискусија кандидат садржајно и критички сагледава резултате у складу са постојећим сазнањима добијеним анализом података из литературе из области имунског одговора код критично оболелих са секундарном сепсом. Начин писања дискусије и примењени аргументи јасно показују да др Рондовић у потпуности влада проблематиком којом се бави тема докторске дисертације. Овим истраживањем добијени су нови подаци о односу активационог статуса моноцита и неутрофила са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе код критично оболелих, о чему у литератури нема података. Такође, истраживања у склопу ове докторске дисертације допринела су бољем разумевању елемената комплексне имуноинфламаторне каскаде и њиховом односу са врстом бактеријског проузроковача и исходом секундарне сепсе. Од великог клиничког значаја су резултати добијени анализом имуноинфламаторних параметара као раних предиктора смртног исхода. Рана идентификација пацијената под високим ризиком од смртног исхода би могла побољшати индивидуализацију терапије. Као и код клиничких карактеристика сепсе, тако и код имунског одговора који се развија код те популације критично оболелих постоји изражена хетерогеност. Због тога би познавање есенцијалних имунских карактеристика сваког појединачног пацијента могло олакшати примену адекватне терапије и побољшати преживљавање.

Г) Објављени радови из докторске дисертације

1. Djordjevic D, **Rondovic G**, Surbatovic M, Stanojevic I, Udovicic I, Andjelic T, Zeba S, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, Jevdjic J, Vojvodic D. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Predict Outcome and Nature of Bacteremia? Mediators Inflamm 2018; 2018:3758068. <https://doi.org/10.1155/2018/3758068> **M22; IF=3.545**
2. **Rondovic G**, Surbatovic M, Djordjevic D, Stanojevic I, Zeba S, Udovicic I, Djukic S, Eric S, Sarac M, Vojvodic D. Composite bioscore is superior to routine biomarkers and established scoring systems in prediction of mortality in adult critically ill patients with secondary sepsis. Vojnosanitetski pregled, 2021 OnLine-First (00):44-44 <https://doi.org/10.2298/VSP200312044R> **M23; IF=0.152**

Д) Предлог ментора о допуни наслова докторске дисертације

Ментор пк проф. др Драган Ђорђевић је предложио да се се у наслов дисертације дода једна реч **СЕКУНДАРНОМ** због прецизности, па би наслов гласио: **„ПРОЦЕНА ФУНКЦИЈЕ НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ ПАЦИЈЕНАТА СА СЕКУНДАРНОМ СЕПСОМ“**. Комисија се у потпуности **СЛАЖЕ** са предлогом ментора, јер најновији подаци из литературе, као и клиничко искуство, указују на то да је популација критично оболелих са сепсом веома хетерогена. Зато се сада истражују различити подтипови сепсе, са веома различитим карактеристикама. Због тога што имунски одговор, ефикасност терапије и исход, између осталог, зависе од тога о којој се субпопулацији критично оболелих пацијената са сепсом ради, неопходно је што прецизније дефинисати карактеристике пацијената. Зато чланови комисије подржавају предлог ментора да се наслов докторске дисертације допуни термином **СЕКУНДАРНА** сепса.

Ђ) Закључак и предлог

Кандидат потпуковник асистент др мед. Горан Рондовић испуњава све услове који обухватају написану докторску дисертацију и објављене радове који су из ње проистекли: један у часопису из категорије М22 (истакнути међународни часопис) са IF=3.545 у којем је кандидат први коаутор, а ментор аутор; други прихваћен за објављивање у часопису из категорије М23 (међународни часопис) са IF=0.152 у којем је кандидат аутор.

Докторска дисертација са допуњеним насловом **„ПРОЦЕНА ФУНКЦИЈЕ НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ ПАЦИЈЕНАТА СА СЕКУНДАРНОМ СЕПСОМ“** представља оригиналан и актуелан научни рад из области молекуларне медицине. Истраживање је

спроведено према свим начелима етичког приступа и научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито. Добијени резултати представљају значајан и оригиналан допринос истраживању имунског одговора код критично оболелих са секундарном сепсом.

На основу изнетог, имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија закључује да докторска дисертација др Рондовића испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква, представља значајан допринос проучавању у датој области. Будући да кандидат испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске дисертације, комисија једногласно предлаже Одбору за специјалистичке и докторске студије Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране да извештај прихвати и предложи Настано-научном већу Медицинског факултета ВМА УО да овај рад прихвати као завршену докторску дисертацију кандидата потпуковника асистента др мед. Горана Рондовића и одобри јавну одбрану.

У Београду 07.06.2021.

ВС проф. др сц. мед. Маја Шурбатовић

Šurbatović Maја

пп доц. др сц. мед. Иван Станојевић

Stanojević Ivan

Проф. др сц. мед. Владислав Воларевић

Volarević Vladislav



РЕПУБЛИКА СРБИЈА
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
Медицински факултет ВМА

— Бр. 2392-1

09.06.2021. год
БЕОГРАД