

Vijeću Medicinskog fakulteta

Na osnovu Odluke Vijeća Medicinskog fakulteta o formiranju Komisije za doktorske studije, broj:1457 od 16.06.2015.godine, a u skladu sa tačkom 3.9 stava 11 Vodiča za doktorske studije UCG-Centra za doktorske studije, nakon razmatranja ispunjavanja formalnih uslova za ocjenu doktorske disertacije i poštujući princip kompetentnosti, Komisija za doktorske studije dostavlja Vijeću Medicinskog fakulteta

INICIJALNI PREDLOG

Sastava Komisije za odbranu doktorske disertacije

I. DOKTORAND: Dr med Tijana Vukadinović

Naziv doktorske disertacije: "Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom"

II. Komisija za odbranu doktorske disertacije:

- **Prof. dr Miroslav Radunović**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore - predsjednik
- **Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić**, redovna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore - mentor
- **Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević**, vanredna profesorica Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu – komentor, član
- **Prof. dr Elvir Zvrko**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član
- **Prof. dr Aleksandar Perić**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu – član

KOMISIJA ZA DOKTORSKE STUDIJE

Prof. dr Filip Vukmirović



**VIJEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA U PODGORICI
SENATU UNIVERZITETA CRNE GORE**

Predmet: Ocjena doktorske disertacije kandidatkinje dr Tijane Vukadinović

Senat Univerziteta Crne Gore je na sjednici održanoj 10.07.2024. godine prihvatio prijedlog Vijeća Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore i donio Odluku broj 03-3582/3 o ispunjenosti uslova iz Člana 38 Pravila doktorskih studija kojom nas je imenovao za članove Komisije za ocjenu doktorske disertacije pod nazivom „Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom“ kandidatkinje dr Tijane Vukadinović.

Nakon detaljnog izučavanja priložene doktorske disertacije podnosimo sljedeći

IZVJEŠTAJ

1. Pregled disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom“ kandidatkinje dr Tijane Vukadinović izložena je kroz devet poglavlja.

Disertacija ima 93 stranice i 157 literaturnih referenci. U uvodu je ilustrovana sa 7 slika. Rezultati su prikazani kroz 1 tabelu, 1 sliku i 4 grafikona. Doktorska disertacija ima sljedeću strukturu: uvod, ciljevi istraživanja i hipoteze, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i reference.

2. Vrednovanje disertacije

2.1. Problem

Hronični rinosinuzitis se definiše kao inflamacija sluzokože nosa i paranazalnih sinusa, karakterisano sa dva ili više simptoma, među kojima su osjećaj zapušenosti nosa i sekrecija iz nosa, osjećaj bola ili pritiska u predjelu lica, smanjenje ili gubitak osjećaja mirisa, i / ili endoskopski nalaz polipa u nosu sa ili bez prisustva sluzavo-gnojnog sekreta u srednjem nosnom hodniku i / ili promjene na nalazu kompjuterizovane tomografije, koje prikazuju otok sluzokože ostiomeatalnog kompleksa i / ili zasenčenja šupljina paranazalnih sinusa, u periodu dužem od dvanaest nedelja.

U okviru hroničnog rinosinuzitisa, pod pojmom „polip“ podrazumijeva se benigni, negranulomski, inflamatorni izraštaj, obložen respiratornom sluznicom, prisutan u

šupljini nosa, odnosno paranazalnih sinusa. Ovakve benigne promjene najčešće vode porijeklo od hronično inflamirane sluznice prednjeg etmoida.

Nosno-sinusna polipoza je prisutna kod oko 20% oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa. Bolesti koje su često udružene sa nosnom polipozom su alergijski rinitis, astma udružena sa preosetljivošću na nesteroidne antiinflamatorne lijekove, cistična fibroza, primarna cilijarna diskinezija. Nosna polipoza je rijetka u pedijatrijskoj populaciji. Ukoliko je prisutna, uglavnom je udružena sa drugim komorbiditetima kao što je slučaj kod Kartadženerovog sindroma.

Inflamatorne nosne polipe karakterišu strukturne promjene epitela i lamine proprije, podsluznice, a ponekad i koštanog tkiva na koje naliježe sluznica, kao i prisustvo zapaljenskog ćelijskog infiltrata. Na osnovu histoloških karakteristika, nosni polipi se mogu klasifikovati kao eozinofilni ili polipi "alergijskog tipa", hronični inflamatorni polipi i sero-mukozni - žljezdani polipi.

Standardna histopatološka verifikacija Hematoksilin-Eozin obojenim presjecima biopsija (H&E), predstavlja osnovni metod za dijagnostiku nosne polipoze i hroničnog rinosinuzitisa nakon sprovedenog hirurškog liječenja. Promjene na sluznici se verifikuju kako na epitelu, tako i u stromi. Laminu propriju inflamatornih nosnih polipa karakteriše edem, izraženo prisustvo eozinofila, ekstenzivna limfocitoza, prisustvo cistično izmijenjenih žlijezda ispunjenih mukusom. U oko 10% nosnih inflamatornih polipa, hronično zapaljenje nije dominantno uzrokovano eozinofilima, već limfocitima i neutrofilima.

Imunohistohemijske analize predstavljaju značajnu kategoriju analiza inflamatornog odgovora u nosnoj polipozi i hroničnom rinosinuzitisu. Primjena specifičnih imunohistohemijskih markera, čija je ekspresija vezana za specifične tkivne i ćelijske promjene u okviru nosne polipoze definiše stepen i fazu patofiziološkog procesa. Standardizacija histopatoloških procedura i analiza svjetlosnim mikroskopom čine ove metode korisnim za interpretaciju mehanizma i faze bolesti. Dostupnost rezultata daje mogućnost interdisciplinarnog planiranja tretmana bolesti.

CD 31 je član superfamilije imunoglobulina. Ima važnu ulogu u transendotelnoj migraciji leukocita. Uključen je u endotelne ćelijsko-ćelijske i ćelijsko-matriksne interakcije. Značajan je u inflamaciji, ektravazaciji leukocita, kao i u angiogenezi. Imunohistohemijski marker CD31 je pan-endotelni marker.

CD 34 je međućelijski adhezivni protein i glikoprotein na površini ćelije. Ekspirira se na endotelu, hematopoetskim progenitornim ćelijama, na fibroblastima. Smatra se da CD34+ćelije imaju ulogu u tkivnim imunološkim procesima, uključujući i patofiziološke procese u nosnim polipima.

Građa eozinofila podrazumijeva prethodno formirane enzimske i neenzimske katjonske proteine, koji se nalaze i selektivno izlučuju iz njihovih velikih sekundarnih (specifičnih) granula. Ovi proteini doprinose efektu eozinofila na sluznicu kod inflamacije disajnih puteva, oštećenja tkiva i remodelovanja sluznice disajnih puteva uključujući hiperplaziju glatkih mišića i subepitelnu fibrozu. Glavni osnovni protein granula eozinofila (MBP / BMK-13) je protein bogat argininom. Studije MBP mRNA su pokazale da se MBP sintetiše iz proforme. Glavni osnovni protein granula eozinofila (MBP1) čini jezgro sekundarnih granula eozinofila. Nedavno je otkriven manje katjonski homolog MBP, nazvan MBPH ili MBP2. Imunofluorescijom je dokazano da je MBP1 prisutan u eozinofilima, bazofilima i liniji humanih mastocita (HMC1), dok se MBP2 detektuje samo u eozinofilima. Ni MBP1 ni MBP2 se ne mogu otkriti ni u jednoj drugoj ćeliji bijele krvne loze periferne krvi. Nivoi MBP2 izmereni u plazmi i serumu su u suštini identični. Ovi rezultati ukazuju da je MBP2

prisutan samo u eozinofilima i da može biti koristan biomarker za patološka stanja uzrokovana eozinofilima.

Poznato je da major basic protein, specifičan za eozinofilne, kao i eozinofilni katjonski protein uzrokuju promjene epitela disajnih puteva. Major basic protein uzrokuje nakupljanje jona natrijuma i hlora, što za posljedicu ima akumulaciju molekula vode u epitelnim ćelijama kao i u međućelijskom prostoru i nastanak edema. Koncentracija eozinofilnog katjanskog proteina korelira sa intenzitetom simptoma oboljelih zbog hiperreaktivnosti disajnih puteva. Prisustvo aktiviranih eozinofila za posljedicu ima oštećenje epitela disajnih puteva, međutim nije dovoljno ispitan njihov uticaj na subepitelijalne strukture, prvenstveno na krvne sudove.

Do sada je poznato da su koncentracije medijatora rasta, poput VEGF (vascular endothelial growth factor), angiopoetin-1, angiopoetin-2 značajno uvećane u tkivu nosnih polipa. Inflamacija koja je posredovana eozinofilima podrazumijeva prisustvo i oslobađanje katjonskih granula iz citoplazme eozinofila. Kao posljedica dejstva specifičnih proteina prisutno je oštećenje i deskvamacija epitela disajnih puteva, uz posljedični edem tkiva. Aktivirani eozinofili oslobađaju jake medijatore zapaljenske reakcije, što uzrokuje dalje napredovanje inflamatornog procesa.

Suština istraživanja je dokazati da u okviru remodelovanja sluznice tokom hroničnog zapaljenja posredovanog eozinofilima, dolazi i do promjene na nivou vaskularizacije strome, u smislu izražene angiogeneze. Za razliku od prethodnih studija, koje su bile uglavnom bile fokusirane na intenzitet inflamatorne infiltracije epitela i lamine proprije, ovde je akcenat stavljen na procjenu stepena vaskularizacije u subepitelu, kao i na moguće korelacije stepena vaskularizacije i kliničkih pokazatelja stepena težine hroničnog rinosinuzitisa. Na taj način studija, koja je predmet ove doktorske disertacije, predstavlja značajan doprinos rezultatima dosadašnjih studija koje su bile usmjerene na ispitivanje morfoloških promjena nosne sluznice tokom hroničnog zapaljenja.

2.2. Ciljevi i hipoteze disertacije

2.2.1. Ciljevi

U skladu sa svim prethodno izloženim ciljevi disertacije su bili:

1. Na osnovu rezultata patohistološke i imunohistohemijske analize procijeniti i uporediti intenzitet vaskularizacije subepitela (lamine proprije) kod četiri grupe ispitanika, koje čine pacijenti oboljeli od različitih formi hroničnog rinosinuzitisa kao i zdravi ispitanici.
2. Na osnovu rezultata patohistološke i imunohistohemijske analize procijeniti i uporediti intenzitet inflamatorne infiltracije epitela i subepitela kod sve četiri grupe ispitanika.
3. Procijeniti nivo korelacije između imunohistohemijskom analizom procijenjenog intenziteta vaskularizacije i intenziteta inflamatorne infiltracije u lamini propriji u okviru četiri grupe ispitanika.
4. Procijeniti nivo korelacije inflamatorne infiltracije i stepena hiperplazije respiratornog epitela u okviru četiri grupe ispitanika.
5. Procijeniti nivo korelacije imunohistohemijskih i kliničkih parametara.

2.2.2. Hipoteze

1. Pacijenti oboljeli od sinonazalne polipoze udružene sa preosjetljivošću na nesteroidne antiinflamatorne lijekove imaju izraženiji stepen vaskularizacije lamine proprije i intenzivniju inflamatornu infiltraciju epitela i subepitela u odnosu na ostale grupe ispitanika.

Hronična inflamacija i angiogeneza su dva procesa koji teku paralelno tokom remodelovanja tkiva u hroničnom rinosinuzitisu, uz brojne međusobne interakcije. Mnogi medijatori upale, koji se akumuliraju na mjestu hronične inflamacije stimulišu proangiogene signalne molekule, uključujući faktore rasta, adhezione molekule, citokine i hemokine. Ovi proangiogeni medijatori stimulišu endotelne ćelije da proliferišu i formiraju nove krvne sudove. Izražena eozinofilna infiltracija je obilježje hroničnog rinosinuzitisa sa sinonazlanom polipozom (CRSwNP), dok pacijenti sa hroničnim rinosinuzitisom bez sinonazalne polipoze (CRSSNP) mogu u okviru inflamatornog infiltrata imati prisutne eozinofile, ali u značajno manjem broju u odnosu na oboljele od CRSwNP. Poseban entitet u kontekstu stepena inflamatorne reakcije i posljedične neoangiogeneze predstavljaju pacijenti oboljeli od hroničnog rinosinuzitisa sa sinonazlanom polipozom uz preosjetljivost na nesteroidne antiinflamatorne lijekove (AERD).

2. Postoji pozitivna korelacija između stepena vaskularizacije i inflamatorne infiltracije u lamini propriji.

Angiogeneza koja je posljedica inflamacije karakteriše se neoangiogenezom i povećanjem vaskularne permeabilnosti. Poznata je povećana ekspresiju proangiogenih gena koji definišu neoangiogenezu, izražene morfološke promjene i povećanu vaskularnu permeabilnost u sinonazalnom tkivu kod pacijenata sa CRS u poređenju sa kontrolnom populacijom. Kvantifikacija mikrosudova je pokazala veću ekspresiju CD34 markera kod inflamacije tip 2 u okviru CRSwNP u odnosu na CRS bez inflamatorog odgovora tip 2 (CRSSNP).

3. Postoji pozitivna korelacija između intenziteta inflamatorne infiltracije i stepena hiperplazije respiratornog epitela.

Pacijenti sa AERD i CRSwNP bez preosetljivosti na nesteroidne antiinflamatorne lijekove, imaju više izražene simptome i značajnije narušen kvalitet života u poređenju sa pacijentima sa CRSSNP i ispitanicima bez inflamacije nosne sluznice. Kod pacijenta sa AERD prisutna je intenzivnija inflamacija sluznice paranazalnih šupljina, evidentirana na snimku kompjuterske tomografije u sve tri ravni, u poređenju sa pacijentima sa CRSwNP i CRSSNP.

4. Postoji pozitivna korelacija između intenziteta inflamatorne infiltracije epitela i subepitela i kliničkih pokazatelja težine bolesti.

Korelacija BMK13 sa kliničkim parametrima najbolje se manifestuje u grupi pacijenata sa CRSwNP, što sugerise da je intenzitet eozinofilne infiltracije sinonazalne sluznice direktno povezan sa intenzitetom inflamacije i progresijom bolesti. Monoklonsko antitijelo [BMK-13] prepoznaje glavni osnovni protein eozinofila (MBP), protein od 117 aminokiselina, kao izoformu specifičnu za eozinofile, prisutnih u okviru inflamatornog infiltrata.

Vrijednost SNOT 22 je u značajnoj statističkoj korelaciji sa vrijednostima VAS kod kod pacijenta sa sinonazalnom polipozom i preosjetljivosti na NSAIL što ukazuje da je nivo ispoljenosti simptoma bolesti odgovarajući patološkom supstratu, odnosno indikaciji za učinjeno hirurško liječenje.

5. Postoji pozitivna korelacija između stepena vaskularizacije lamine proprije i kliničkih pokazatelja težine bolesti.

Korelacija između BMK13, kao markera infiltracije nazalne sluzokože aktiviranim eozinofilima i CD31 i CD34 kao markera angiogeneze kod pacijenata sa nazalnom polipozom je odraz , rezultata infklatamatornog procesa na krvne sudove/ proces neoangiogeneze. Mada CD31 i CD34 imaju ulogu molekula adhezije, važnih u procesu transendotelne migracije eozinofila, oni nisu glavni adhezivni molekuli u toj fazi života eozinofila. Osim što su molekuli adhezije za eozinofile, važni su i za migraciju leukocita između endotelnih ćelija . Imunohiostohemijske karakteristike sva tri fenotipa hroničnog rinosinuzitisa , posebno AERD ukazuju na mogućnost novih modaliteta liječenja, osim već primjenjenog konzervativnog i hirurškog liječenja. Imunohistohemijske karakteristike AERD ukazuju na nove mogućnosti imunoterapije, osim već primjenjivanih monoklonskih antitijela.

2.3. Bitne metode koje su primijenjene u disertaciji i njihova primjerenost

Istraživanje predstavlja prospektivnu studiju presjeka, kojom su obuhvaćena devedeset i četiri ispitanika, sprovedenu u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je sprovedeno je u Klinici za otorinolaringologiju i Institutu za patologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, u periodu od marta 2020. do oktobra 2022. godine. Protokol i metode studije su odobreni odlukom Etičkog komiteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu (IRB odobrenje br. 21/2022), kao i odlukom Komiteta za medicinsku etiku i bioetiku Medicinskog fakulteta Univerzita Crne Gore (odluka broj 381/2 od 04.03.2022. godine). Svi ispitanici koji su studijom obuhvaćeni su prethodno dali pisani informativni pristanak. Istraživanjem su obuhvaćeni pacijenti kod kojih je dijagnostikovao hronični rinosinuzitis u skladu sa evropskim pozicionim dokumentom o rinosinusitisu i nazalnim polipima (EPOS) 2020.

Svi ispitanici su hirurški liječeni u Klinici za otorinolaringologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu u periodu trajanja studije. Pacijenti oboljeli od hroničnog rinosinuzitisa (CRS) su podijeljeni u tri grupe u zavisnosti od kliničke manifestacije bolesti. Dvije osnovne grupe pacijenta su pacijenati koji su bili bez sinonazalne polipoze (CRSsNP) i ispitanici sa polipozom (CRSwNP). Među pacijentima sa polipozom izdvojili smo grupu pacijenata sa AERD. Kriterijumi za uključivanje pacijenata sa AERD bili su dijagnoza CRSwNP, blaga perzistentna astma, potvrđena od strane pulmologa i podaci iz istorije bolesti o pogoršanju respiratornih simptoma nakon uzimanja nekog od NSAIL. Ostali pacijenti sa CRS su bili bez astme i bez preosetljivosti na NSAIL. Kontrolnu grupu činili su ispitanici bez simptoma i znakova inflamacije nazalne sluznice, kod kojih je indikovano hirurško liječenje nazalne opstrukcije uzrokovane pneumatizacijom srednje nosne školjke (concha bullosa).

Svi pacijenti su preoperativno bodovani prema intenzitetu nazalnih/sinusnih simptoma i procjeni kvaliteta života, dok su pacijenti sa CRS dodatno bodovani prema stepenu bolesti evidentiranom radiološki, kompjuterizovanom tomografijom (CT) paranazalnih šupljina, prema Lund-Mackay skor (LMS) .

Radiološka dijagnostika u vidu CT pregleda je neophodna u cilju planiranja hirurškog liječenja, utvrđivanja anatomskih varijacija, postavljanja dijagnoze akutnog ili hroničnog oboljenja. Odnos između nalaza evidentiranog CT skenom i simptoma koje pacijent navodi je različit, samim tim nalaz CT pregleda neophodan je u cilju postoperativnog praćenja ili objektivnog ocjenjivanja stadijuma bolesti. Lund-Mackay skor predstavlja vrijednost koja je rezultat sistema bodovanja nalaza dobijenog CT pregledom paranazalnih šupljina. CT pregled paranazalnih šupljina je učinjen u aksijalnoj, koronalnoj i sagitalnoj ravni.

Za procjenu intenziteta simptoma korišćen je Visual Analogue Score (VAS). Pacijenti su procjenjivali simptome postavljanjem vertikalne oznake na skali od 0 do 10 cm u zavisnosti od težine navedenih simptoma. Vrijednost 0 označava da nema simptoma, gradacijski do vrijednosti 10 koja ukazuje na maksimalni intenzitet simptoma. Upitnik sadrži odgovore za 18 simptoma: glavobolja, začepljenje nosa, nazalni iscjedak, postnazalni iscjedak, oštećeno čulo mirisa, punoća lica, zubobolja, bol u licu/pritisak, epifora, kašalj, krvarenje iz nosa, zadržavanje suvog sekreta u nosu, opšte zdravstveno stanje, umor, groznica, mučnina, povraćanje, tečne stolice. Sedam simptoma od navedenih je uključeno u konačni rezultat, koji je evaluiran u okviru ove studije: nazalna opstrukcija, sekrecija iz nosa, postnazalni sekret, osjećaj punoće u predjelu paranazalnih šupljina, oslabljeno čulo mirisa, glavobolja.

Da bismo procijenili kvalitet života, korišćen je upitnik sino-nazalnog ishoda 22 (SNOT-22). SNOT-22 obuhvata širok spektar tegoba i simptoma koje se odnose na kvalitet života, uključujući fizičke tegobe, funkcionalna ograničenja i emocionalne posljedice. Upitnik nudi odgovore za 22 simptoma: potreba za izduvavanjem nosa, kijanje, sekrecija iz nosa, začepljenost nosa, gubitak mirisa ili ukusa, kašalj, postnazalno slivanje sekreta, gusti iscjedak iz nosa, punoća uva, vrtoglavica, bol u uhu, bol/pritisak u predjelu lica, teškoće prilikom spavanja, buđenje noću, nedostatak dobrog sna, osjećaj umora nakon buđenja, umor, smanjena produktivnost, smanjena koncentracija, frustracija/nemir/iritacija, tuga, stid. Pacijenti daju odgovor birajući vrijednost u zavisnosti od težine simptoma: 0 – tegoba/ problem ne postoji, 1 – veoma blaga tegoba, 2 – blaga tegoba, 3 – umjerena tegoba, 4 – ozbiljna tegoba i 5 – izuzetno ozbiljna tegoba. Upitnik podrazumijeva subjektivnu ocjenu navedenih simptoma u ukupnoj vrijednosti od 0-110, sa većim rezultatima kod izraženijeg uticaja tegoba na kvalitet života.

Svi pacijenti su hirurški liječeni u uslovima opšte endotrahealne anestezije. Uzorci tkiva polipa kod pacijenata sa CRSwNP/AERD, kao i hipertrofične sluznice pacijenata sa CRSsNP, uzeti su iz etmoidalnog labirinta tokom endoskopske operacije sinusa (FESS). Uzorci tkiva nazalne sluzokože kontrolnih subjekata uzeti su lateralnom resekcijom pneumatizovane srednje nosne školjke (concha bullosa). Uzorci tkiva su fiksirani 24 sata u 4% puferovanom rastvoru formaldehida. Zatim su isprani vodom i dehidrirani koncentrovanim etanolom (70% do apsolutnog), a potom tretirani ksilelom i kalupljeni u parafinu. Parafinski blokovi su isječeni na debljinu od 3-5 mikrometara. Sekcije su obojene hematoksilinom i eozinom (H&E). Imunohistohemijsko bojenje je uključivalo deparafinizaciju nakon sječenja djelova od 3-4 mikrometra od parafinskog kalupa i sušenje nakon potapanja u ksilenu, alkoholu i destilovanoj vodi. Deparafinirani djelovi su zagrijevani dva puta po pet minuta u mikrotalasnoj pećnici u kivetu sa 250 mL rastvora citratnog pufera (10 mmol/L). Nakon toga su hlađeni u citratnom puferisanom rastvoru na sobnoj temperaturi 30 minuta i dva puta isprani destilovanom vodom po 30 sekundi. Slijedeća faza uključuje blokiranje endogene peroksidaze: djelovi tkiva su natopljeni 3% vodonik peroksidom u trajanju od pet minuta; zatim isprani destilovanom vodom, prekriven fosfatnim puferom tri puta u trajanju od po dva minuta.

Imunohistohemijsko bojenje za MBP izvršeno je humanim BMK13 antitijelima (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Teksas, SAD), dok je bojenje za CD31 i CD34 izvršeno humanim anti-CD31 i anti-CD34 antitijelima (Elabscience, Houston, Teksas, SAD). Analiza imunohistohemijskih nalaza urađena je digitalnim svjetlosnim mikroskopom. Dobijeni skor imunološke reaktivnosti je upoređen u odnosu na grupe pacijenata sa CRS i u odnosu na kontrolnu grupu.

Dobijeni podaci su analizirani pomoću Shapiro-Vilkovog testa. Studentov t-test za nezavisne uzorke i One-way ANOVA test je korišćen za procjenu razlika u starosnoj dobi pacijenata. One-way ANOVA je korišćena za istraživanje razlika između grupa pacijenata u odnosu na vrijednosti njihovih rezultata kliničkih parametara, nakon čega je uslijedilo post-hoc testiranje korišćenjem Tukey's testa. Da bi se testirale razlike u distribuciji intenziteta bojenja tkiva između grupa pacijenata, korišćeni su Hi-kvadrat test i Fišerov egzaktni test. Testiranje korelacije između ovih parametara je urađeno korišćenjem Spearmanov koeficijenta korelacije (Spearman's rank correlation coefficient) p vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom. Rezultati koji se odnose na kliničke parametre na slikama i tabelama su predstavljeni kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

2.4. Rezultati disertacije i njihovo tumačenje

Pacijenti muškog pola su bili dominantni u grupi CRSwNP (n = 23; 69,7%) kao i u kontrolnoj grupi (n = 18; 58,1%), dok su pacijentkinje bile dominantan pol u grupi sa AERD (n = 14; 70%).

U nazalnoj polipozi mastociti eksprimiraju estrogenske i progesteronske receptore (ER/PR). To može upućivati na odnos između hormonalnog statusa pacijenata i nazalne polipoze. Estradiol utiče na aktivnost eozinofila, uključujući njihovu preživljavanje, obzirom da eozinofili izražavaju ER-alfa receptore. Takođe ispoljava antiinflamatorni efekat inhibicijom TNF-alfa, interferona- γ i NK ćelija, sprečavajući ćelijsku apoptozu

Poređenje kliničkih parametara (VAS, SNOT-22 i LMS), između eksperimentalnih grupa pacijenata i kontrolne grupe, pokazalo je značajnu razliku za sva tri ispitivana parametra koja je određena One-way ANOVA [VAS: $F(3, 90) = 9,495$, $p < 0,001$; SNOT-22: $F(3, 90) = 5,471$, $p < 0,01$; LMS: $F(2, 60) = 12,603$, $p < 0,001$]

Skor za VAS i SNOT-22 je bio značajno veći u grupama CRSwNP i AERD, u poređenju sa pacijentima iz C grupe. Što se tiče LMS-a, uočena je statistička razlika između AERD i CRSwNP/CRSsNP grupa. Pacijenti iz grupe AERD imali su najveći rezultat za sva tri klinička parametra, što ukazuje na očekivan veći stepen ispoljenosti tegoba i simptoma bolesti kod pacijenata oboljelih od AERD u odnosu na druge forme hroničnog sinuzitisa, kao i na objektivno izraženiji patološki supstrat prisutan i dokazan kompjuterizovanom tomografijom kod iste grupe pacijenata.

Post-hoc testiranje je bilo urađeno za svaki od tri testirana parametra. U slučaju VAS detektovana je značajna statistička razlika između C i CRSwNP ($p < 0,01$), C i AERD ($p < 0,001$), C i CRSsNP ($p < 0,05$). U slučaju SNOT-22, otkrivena je značajna statistička razlika između C i CRSwNP ($p < 0,01$), C i AERD ($p < 0,01$). U slučaju LMS-a, otkrivena je značajna statistička razlika između CRSwNP i AERD ($p < 0,01$) i CRSsNP i AERD ($p < 0,001$). Vrijednost LMS ima značajnu statističku korelaciju sa vrijednostima SNOT 22 i VAS skora kod pacijenta sa sinonazalnom polipozom i kod pacijenta sa preosjetljivosti sa NSAIL što ukazuje da stepen u kojem su ispoljeni simptomi, verifikovan kroz vrijednost

skale/ testa korelira na objektivnim nalazom/ patološkim supstratom evidentiranim u okviru CT pregleda paranazalnih šuplina. Vrijednost SNOT 22 je u značajnoj statističkoj korelaciji sa vrijenostima VAS kod kontrolne grupe ispitanika kao i kod pacijenta sa sinonazalnom polipozom i preosjetljivosti na NSAIL što ukazuje da je nivo ispoljenosti simptoma bolesti/ anatomske varijacije odgovarajući anatomske / patološke supstratu, odnosno indikaciji za učinjeno hirurško liječenje.

Imunoreaktivnost za CD31 i CD34 nije bila u potpunosti odsutna ni kod jednog ispitanika. Najveća učestalost najjačeg bojenja za CD 31 je primjećena u uzorcima tkiva dobijenim od pacijenata sa CRSwNP, dok je najjači obrazac bojenja CD34 pronađen kod pacijenata sa AERD. Ekspresija BMK13 je skoro u potpunosti izostala u C grupi pacijenata, što je u potpunoj suprotnosti sa pacijentima iz grupe CRSwNP, koji su pokazali različite nivoe bojenja BMK13. Najviši nivo ekspresije BMK13 (skor 4) je otkriven kod pacijenata sa AERD.

Odnos između imunohistohemijskih markera i rezultata kliničkih parametara pacijenata uključenih u ovu studiju pokazao je umjerenu pozitivnu korelaciju između BMK13 i SNOT-22 ($rs = 0,46$) i između BMK13 i LMS ($rs = 0,58$) u grupi CRSwNP. U grupi CRSsNP, granična statistička značajnost u korelaciji je prikazana samo za CD31 i BMK13, koji su pokazali umerenu pozitivnu korelaciju ($rs = 0,65$). Pokazano je da LMS korelira sa VAS i SNOT-22 u grupama pacijenata sa CRSwNP ($rs = 0,53$; $rs = 0,58$) i AERD ($rs = 0,55$; $rs = 0,6$). Kod kontrolnih ispitanika smo pronašli pozitivnu korelaciju između SNOT-22 i VAS ($rs = 0,77$) i između CD31 i CD34 ($rs = 0,47$) što ukazuje na stepen tegoba i simptoma uzrokovanih anatomske varijacijama i posljedičnom indikacijom za hirurško liječenje. Pozitivna korelacija markera angiogeneze CD31 i CD34 manifestovana u sluzokoži pacijenata koji su činili kontrolu grupu ukazuje na činjenicu da u nosnoj sluzokoži gdje eozinofilna inflamacija nije značajno izražena i proces remodelovanja tkiva nije tako intenzivan, proces fiziološke angiogeneze nije značajno izmijenjen.

2.5. Zaključci

Rezultati su pokazali gotovo potpuno odsustvo aktiviranih eozinofila u sluznici ispitanika koji nisu imali inflamaciju nosne sluznice. Prevenstveno su to ispitanici koji su hirurški liječeni zbog anatomske varijacije stuktura nosne šupljine koje se uzrokovale nazalnu opstrukciju.

Imunoekspresija BMK13 kao markera eozinofilne infiltracije je ekstremno visoka u sinusnoj sluznici oboljelih od nosne polipoze, a naročito u grupi pacijenata sa AERD. Osnovna karakteristika AERD je prisustvo eozinofilnih infiltrata u respiratornom traktu. Hronični rinitis se manifestuje kao hronični hiperplastični eozinofilni sinusitis. Klinička manifestacija astme se obično javlja dvije godine nakon pojave rinitisa, a netolerancija na NSAIL se može ispoljiti u bilo kom stadijumu bolesti. Sinonazalnoj polipozi prethodi hronični rinosinuzitis. Promjene u metabolizmu arahidonske kiseline dovode do neravnoteže između proinflammatoryh i antiinflammatoryh supstanci, a manifestuju se kao prekomjerna proizvodnja cisteinil leukotriena (CysLTs) i nedovoljna proizvodnja prostaglandina E2 (PGE2).

Markeri angiogeneze CD31 i CD34 su značajno više ispoljeni u sluznici pacijenata sa AERD i CRSwNP u odnosu na pacijente sa CRSsNP i zdrave ispitanike. Imunohistohemijska analiza sluznice nazalnih polipa, kod različitog stepena sinonazalne polipoze, ukazala je na veću ekspresiju VEGF i osnovnog fibroblastnog faktora rasta (bFGF) kod masivnije polipoze. U smislu patogeneze VEGF dovodi do edema i angiogeneze. Prisustvo VEGF proteina i VEGFR-1,2 receptora je izraženo u vaskularnom

endotelu polipa, oko inflamatornih ćelija, u mukoznim žlijezdama i vaskularnom endotelu nazalne sluznice.

Mada priroda istraživanja to nije omogućila, s obzirom da se radilo o studiji presjeka, povećani markeri angiogeneze kod pacijenata sa nosnim polipima bi mogli da nagovjeste brže širenje bolesti i veću učestalost recidiva CRS.

Među različitim fenotipima CRS, intenzitet eozinofilne infiltracije bolje korelira sa kliničkim parametrima (radiološki procenjen stepen proširenosti bolesti, narušavanje kvaliteta života) nego intenzitet vaskularizacije lamine proprije, što ukazuje na ekstenzivnost patološkog procesa i supstrata.

Nalaz gušće eozinofilne infiltracije u tkivu sluznice paranazalnih sinusa tokom patohistološke analize može ukazati na težu kliničku sliku bolesti.

Rezultati nisu pokazali postojanje korelacije između markera eozinofilne infiltracije i vaskularne proliferacije u lamini propriji pacijenata sa nosnom polipozom, kako kod onih sa, tako i kod onih bez preosjetljivosti na NSAID. Samo pacijenti sa AERD i blagim oblikom astme su uključeni u ovu studiju, obzirom da teži oblici astme zahtijevaju upotrebu sistemskih kortikosteroida u okviru terapije, koja može uticati na manifestaciju bolesti i modifikovati inflamatorni proces u sluzokoži nosa i paranazalnih šupljina kod tih pacijenata. To znači da bi intenzitet BMK13, CD31 i CD34 imunoekspresije kod pacijenata sa težim oblikom AERD bi bio čak i veći od onoga što je primjećeno kod naših pacijenata.

3. Konačna ocjena disertacije

3.1. Usaglašenost sa obrazloženjem teme

Doktorska disertacija dr Tijane Vukadinović je usaglašena sa obrazloženjem teme.

3.2. Mogućnost ponovljivosti

Ponovljivost rezultata dobijenih u ovoj disertaciji je moguća primjenom navedenog metodološkog pristupa.

3.3. Buduća istraživanja

Juna 2019. odobrena je prva biološka terapija za liječenje CRSwNP u Sjedinjenim Državama. To je omogućilo proučavanje kliničkih efekata bioloških terapija kod pacijenata oboljelih od AERD. Dalja istraživanja su potrebna da bi se jasnije definisale T2 ćelije, bazofili, makrofagi i mastociti kao i T2 medijatori koji doprinose težini kliničke slike bolesti. Karakteristike oboljelog, prvenstveno mikrobiom i faktori životne sredine nisu dovoljno ispitani u okviru AERD-a. Klinička heterogenost AERD-a zahtijeva multidisciplinarni pristup ovom patološkom entitetu radi što duže remisije bolesti.

3.4. Ograničenja disertacije i njihov uticaj na vrijednost disertacije

Kriterijumi za isključivanje iz studije su bili osobe mlađe od 18 i starije od 65 godina, trudnice, dojilje, pacijenti sa sistemskim bolestima koje zahvataju nosnu šupljinu i paranazalne sinuse (Wegenerova granulomatoza sa poliangiitisom, Churg-Strauss-ov sindrom, Young sindrom), pacijenti sa hoanalnim polipima i hamartomima nosne šupljine, oboljeli od hroničnog gljivičnog rinosinuzitisa, pacijenti sa urođenim

poremećajem mukocilijarnog transporta (cistična fibroza, primarna cilijarna diskinezija), pušači, pacijenti sa prethodnim operacijama paranazalnih sinusa, ispitanici koji su uzimali topikalne i/ili sistemske kortikosteroide, antihistaminike i antibiotike unutar mjesec dana prije početka istraživanja.

Broj pacijenata sa CRSsNP i AERD je bio relativno mali. Svakako, taj broj je odražavao stvarni priliv pacijenata koji su indikovani i hospitalizovani za hirurško liječenje. Pacijenti sa CRSsNP se ređe upućuju na hirurško liječenje obzirom da se u većini slučajeva dobri rezultati postižu konzervativnim liječenjem. Samo pacijenti sa AERD i blagim oblikom astme su uključeni u našu studiju, obzirom da teži oblici astme zahtijevaju upotrebu sistemskih kortikosteroida u okviru terapije, koja može uticati na manifestaciju bolesti i modifikovati inflamatorni proces u sluzokoži nosa i paranazalnih šupljina kod tih pacijenata. To znači da bi intenzitet BMK13, CD31 i CD34 imunoekspresije kod pacijenata sa težim oblikom AERD bio čak i veći od onoga što je primjećeno kod naših pacijenata.

3.5. Originalni naučni doprinos

Originalni naučni doprinos ove doktorske disertacije proističe iz postavljenih ciljeva.

U istraživanju kandidatkinje Tijane Vukadinović analiziran je značaj epitelno-stromalnog odnosa u okviru hroničnog rinosinuzitisa. Do sada je spovedeno malo istraživanja koje su analizirala neovasakularizaciju u polipima kao posljedicu inflamacije, kao i njihovu međusobnu korelaciju i uticaj na težinu kliničke slike, liječenje i tretman.

Suština istraživanja je remodelovanja sluznice tokom hroničnog zapaljenja posredovanog eozinofilima, dolazi pri čemu su posebno ispitane promjene na nivou vaskularizacije strome, u smislu stepena neoangiogeneze. Za razliku od prethodnih studija, koje su bile uglavnom bile fokusirane na intenzitet inflamatorne infiltracije epitela i lamine proprije, ovde je akcenat biti stavljen na procjenu stepena vaskularizacije u subepitelu, kao i na moguće korelacije stepena vaskularizacije i kliničkih pokazatelja stepena težine hroničnog rinosinuzitisa. Na taj način ova studija predstavljati značajan doprinos rezultatima dosadašnjih studija koje su usmjerene na ispitivanje morfoloških promena nosne sluznice tokom hroničnog zapaljenja, a na osnovu čega se planiraju modaliteti liječenja različitih formi hroničnog rinosinuzitisa. Posebno je ispitivana aspirinom pogoršana respiratorna bolest (AERD), kao heterogeni entitet u okviru hroničnog rinosinuzitisa sa sinonazalnom polipozom, prema njegovim histološkim karakteristikama vezanim za angiogenezu i eozinofilnu infiltraciju, koji se karakteriše različitim kliničkim prezentacijama i terapijskim odgovorom.

MIŠLJENJE I PRIJEDLOG KOMISIJE

Doktorska disertacija kandidatkinje dr Tijane Vukadinović, koja je nastala nakon višegodišnjeg istraživanja, dala je doprinos razumijevanju neovaskularizacije kao procesa koji je prisutna u okviru različitih formi hroničnog rinosinuzitisa i aspirinom pogoršane respiratorne bolesti (AERD), kao posebnog entiteta u okviru ispitivane patologije.

Dobro odabranim uzorkom i metodama, imunohistohemijski je ispitan i praćen proces remodelovanja submukoze u okviru hronične inflamacije. Takođe je ispitan i proces angiogeneze kod pacijenata bez inflamatornog procesa. Poseban značaj predstavlja odnos parametara vaskularizacije i inflamacije u okviru sinonazalne polipoze, koji ukazuje na prostor za dalje usavršavanje protokola liječenja. Pokazatelji neoangiogeneze

u okviru AERD-a dopunjavaju razumijevanje patogeneze ovog heterogenog stanja sa kompleksnim inflamatornim odgovorom. Neoangiogeneza je proces koji do sada nije primarno ispitan u okviru inflamatornih stanja sinonazalne sluznice. Veća pažnja u dosadašnjim studijama je posvećena inflamatornom procesu, dok je u okviru ovog istraživanja ispitan međusobni odnos inflamacije i vaskularizacije.

O značaju svega navedenog najbolje svjedoči publikacija dijela rezultata iz ove doktorske disertacije koja je objavljena u evropskom naučnom SCI/SCIE časopisu:

Vukadinović T, Vuksanović Božarić A, Vukomanović Đurđević B, Radunović M, Perić A. Angiogenesis and eosinophilia in the nasal mucosa of patients with different clinical phenotypes of chronic rhinosinusitis. J Infect Dev Ctries. 2023 Oct 31;17(10):1480-1488. doi: 10.3855/jidc.18166. PMID: 37956383.

Članovi komisije su detaljno proučili priloženi materijal o podobnosti kandidatkinje i teme i utvrdili da aktuelnost teme, metodološki i analitički pristup, sveobuhvatna statistička obrada, prikazani rezultati, iscrpna diskusija i jasno izvedeni zaključci, nedvosmisleno ukazuju da je kandidatkinja pokazala posvećenost i smisao za naučno-istraživački rad.

Imajući sve navedeno u vidu, Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore da prihvati doktorsku disertaciju kandidatkinje dr Tijane Vukadinović, pod nazivom „Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom“, kao i da predloži Senatu Univerziteta Crne Gore da imenuje Komisiju za odbranu ove doktorske disertacije i da nakon sprovedene procedure na organima Univerziteta Crne Gore odobri javnu odbranu iste.

U Podgorici, 26.08.2024.godine

KOMISIJA:

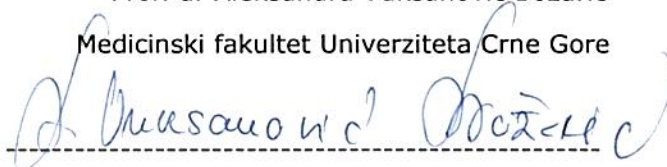
Prof. dr Miroslav Radunović

Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore



Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić

Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore



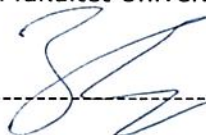
Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević

Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu



Prof. dr Elvir Zvrko

Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore



Prof. dr Aleksandar Perić

Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu





Univerzitet Crne Gore
Medicinski fakultet
Adresa: Cetinjska br. 2
81000 Podgorica, Crna Gora
Telefon: 020 414 245
Fax: 00382 20 414 259
Email: cub@ucg.ac.me
Web: www.ucg.ac.me

01/6-1-6-3582/5
03.10.24

UNIVERZITET CRNE GORE	
MEDICINSKI FAKULTET	
Primjeno:	03.10.2024
Org. jed.	
med	1057/2-3

UNIVERZITET CRNE GORE

MEDICINSKI FAKULTET

N/r šefu studenstke službe

Gospođi Sonji Vukičević

Predmet: Vraćanje doktorske disertacije doktorantkinje dr med Tijane Vukadinović sa uvida javnosti

Poštovana gospođo Vukičević,

U prilogu akta dostavljamo Vam doktorsku disertaciju pod nazivom: „Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom“, i Izvještaj o ocjeni doktorske disertacije doktorantkinje dr med **Tijane Vukadinović** koja je u skladu sa članom 42 stav 3 Pravila doktorskih studija dostavljena **Centralnoj univerzitetskoj biblioteci** 16. 09. 2024. godine, na uvid i ocjenu javnosti.

Na navedeni rad nije bilo primjedbi javnosti u predviđenom roku od 15 dana.

Molimo Vas da nam nakon odbrane, a u skladu sa članom 47 Pravila doktorskih studija, dostavite konačnu verziju doktorske disertacije.

S poštovanjem,

Pripremila:

Milica Barac
Administrativna asistentkinja
Tel: 020 414 245
e-mail: cub@ucg.ac.me



DIREKTOR

mr Bosiljka Cicmil

Pr.	11.07.2024	
Or.		Vrijednost
med	1057	

Na osnovu člana 32 stav 1 tačka 14 Statuta Univerziteta Crne Gore, u vezi sa članom 41 Pravila doktorskih studija, Senat Univerziteta Crne Gore, u postupku razmatranja predloga Vijeća Medicinskog fakulteta i utvrđivanja ispunjenosti uslova iz Pravila doktorskih studija za ocjenu doktorske disertacije i dalji rad na disertaciji kandidatkinje Tijane Vukadinović, na predlog Odbora za doktorske studije, na sjednici održanoj 10.7.2024. godine, donio je sljedeću

ODLUKU

I

Utvrđuje se da su ispunjeni uslovi iz člana 38 Pravila doktorskih studija za ocjenu doktorske teze i dalji rad na disertaciji „Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom“, kandidatkinje Tijane Vukadinović.

II

Imenuje se Komisija za ocjenu navedene doktorske disertacije, u sastavu:

1. Dr Miroslav Radunović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore,
2. Dr Aleksandra Vuksanović Božarić, redovna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore,
3. Dr Biserka Vukomanović Đurđević, vanredna profesorica Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu,
4. Dr Elvir Zvrko, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore,
5. Dr Aleksandar Perić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

III

Zadatak Komisije je da, u roku od 45 dana od dana imenovanja podnese Vijeću organizacione jedinice izvještaj koji sadrži ocjenu doktorske disertacije i poseban izvještaj o procjeni originalnosti navedene doktorske disertacije.

IV

Odluka stupa na snagu danom donošenja.

Broj: 03- 358213
Podgorica, 10.7.2024. godine

PREDSJEDNIK SENATA

Prof. dr Vladimir Božović, rektor