

Медицински факултет

Универзитет у Крагујевцу

ИЗБОРНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Оцена научне заснованости теме докторске дисертације

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета у Крагујевцу од 13.1.2010. године именована је Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације Др Игора Мељникова под називом:

ЕВАЛУАЦИЈА НЕУРОГЕНЕ АПЕНДИКОПАТИЈЕ КОД НЕГАТИВНЕ АПЕНДЕКТОМИЈЕ У РАЗВОЈНОМ ДОБУ

У саставу:

1. Проф Др Љубиша Аћимовић, Председник Комисије

Медицински факултет, Крагујевац, ужа научна област: општа хирургија

2. Проф Др Слободан Гребелдингер, члан Комисије- потенцијални ментор

Медицински факултет, Нови Сад, ужа научна област: дечја и васкуларна хирургија

3. Проф Др Славица Ђукић- Дејановић, члан Комисије

редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Психијатрија

На основу увида у документацију и препоруке Изборног већа, Комисија у наведеном саставу подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу

ИЗВЕШТАЈ

1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ

Кандидат Др Игор Мељников испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

1) ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Игор Мељников рођен је 3.8.1973 године у Сенти. Основну школу завршио је у Кањижи, а Средњу Медицинску школу „7.април“ у Новом Саду.

Дипломирао је на Медицинском факултету у Новом Саду 24.5.2007. године. Дипломски рад „Увођење лапароскопске хирургије у дечју хируршку праксу“ одбраћен је са оценом 10, а израћен је на Клиници за дечју хирургију у Новом Саду.

У току студија био је активан члан Научне секције и аутор је пет студентских радова из области дечје хирургије који су презентовани на конгресима студената медицине у земљи и иностранству. Такође, током студија био је коаутор у два рада испред Клинике за дечју хирургију који су презентовани у иностранству. У оквиру програма студентске размене боравио је месец дана на Клиници за дечју хирургију у Месини, Италија током 2006. године.

Приправнички стаж обавио је у Новом Саду према предвиђеном плану и програму. Стручни испит за доктора медицине положио је у Београду.

Докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу, смер Клиничка и експериментална хирургија, уписао је школске 2007/2008. године. У октобру 2009. године положио је усмени докторантски испит и уписао трећу годину докторских академских студија.

Члан је Друштва лекара Војводине и Удружења дечјих хирурга Србије

Запослен је на Клиници за дечју хирургију Института за здравствену заштиту деце и омладине Војводине у Новом Саду.

Говори руски, енглески, персијски и мађарски језик, који му је матерњи.

Поред медицинског образовања, завршио је основну, средњу и Вишу музичку школу, одсек класична гитара.

2) СПИСАК ПУБЛИКОВАНИХ РАДОВА

Рад у часопису са сци листе М 24

Мељников И, Радојчић Б, Гребелдингер С, Лучић-Простран Б, Радојчић Н. Историјат хируршког лечења апендицитиса. Војносанитетски преглед, 2009; 10: 845-851. (М24

2,0 бода)

Гребелдингер С, Радојчић Б, **Мељников И**, Баљ С. Модалитети лечења везикоуретералног рефлукса у развојном добу. Војносанитетски преглед, 2009; 66(5): 388-394. (М24; 2,0 бода)

Рад у међународном часопису М 51

Радојчић Б, Јокић Р, Гребелдингер С, **Мељников И**, Радојчић Н. Историјат минимално инвазивне хирургије. Медицински преглед (рад прихваћен за штампу, у штампи децембар 2009). (М51; 2,0 бода)

Мељников И, Радојчић Б, Гребелдингер С, Радојчић Н. Историјат хирургије црвуљка. Медицински преглед, 2009; LXII (9-10):489-492. (М51; 2,0 бода)

Рад саопштен на скупу међународног значаја, штампан у изводу М 30

Radojčić B, Jokić R, Korica M, Varga J, Borišev V, Škorić S, **Meljnikov I**. Laparoscopic surgery in children: The first results in medical treatment. World Congress of Pediatric Surgery, Zagreb, Croatia, 2004. (M34; 0,5 бода)

Radojčić B, Jokić R, Korica M, Tatić M, Škorić S, Jecković M, **Meljnikov I**. The first year experience with laparoscopic pediatric surgery. IPEG 2005, The 14th Annual Congress for Endosurgery in Children Venice, Italy, 2005. (M34; 0,5 бода)

УКУПНО: 9,0 бодова

2. ПОДАЦИ О ПРЕДЛОЖЕНОЈ ТЕМИ

Предложена тема је из дечје абдоминалне хирургије и третира актуелну, изузетно значајну проблематику у вези са проценом присуства неурогене апендикопатије у развојном добу. У свом извештају Комисија даје јасне смернице кандидату за корекцију уз прихватање примедби известиоца.

Комисија предлаже да се прихвати наслов теме докторске дисертације:

“ЕВАЛУАЦИЈА НЕУРОГЕНЕ АПЕНДИКОПАТИЈЕ КОД НЕГАТИВНЕ АПЕНДЕКТОМИЈЕ У РАЗВОЈНОМ ДОБУ”

Предмет рада

Акутни апендицитис најчешће је хируршко обољење абдомена у развојном добу, а сумња на његово постојање водећи је разлог ургентне лапаротомије у дечјем узрасту. Дијагноза акутног апендицитиса поставља се на основу анамнестичкох података,

клиничког прегледа, лабораторијских анализа, ултрасонографским прегледом и допунским претрагама: радиолошким (нативни снимак абдомена, компјутеризована томографија), перитонеалном аспирацијом и лапароскопском експлорацијом.

И поред постојања јасне клиничке слике, акутни апендицитис не може се хистолошки доказати у 10 до 40 % оперисаних пацијената. Удео нормалних хистолошких налаза црвуљка идентификује овај проблем као негативну апендектомију чија је учесталост у различитим серијама од 10% до 30% , док Birnbaum i Patrick наводе у одвојеним серијама удео негативних апендектомија око 20%.

Неурогена апендикопатија се дефинише као стање неурогене хиперплазије, нервне пролиферације и повећања броја ендокриних ћелија у зиду црвуљка. Хистолошки се презентује као повећање броја симпатичких нервних влакана, шваномских ћелија и увећање ганглија у субмукози и у спољашњем мишићном слоју и јавља се код 40% на изглед нормалних апендикса. То је чест налаз код пацијената који имају клиничке знаке акутног апендицитиса, а на хистолошком прегледу црвуљак је без патолошкох промена. Први опис овог клиничког и патохистолошког ентитета потиче од Maresch-а (Аустрија) i Masson-а (Француска) који су пре 90 година описали специфичне хистолошке неуроматозне лезије на црвуљку који је без знакова акутне инфламације. Независно један од другог, исти аутори су указали на везу између постојања неуроматозних лезија и клиничких знакова акутног апендицитиса.

Етиопатогенеза неурогене апендикопатије и даље је контраверзна. Новије студије потврдиле су да имунолошки и ентерични нервни систем регулишу физиолошке процесе на цревима, укључујући епител и глатке мишиће. Инфламаторна реакција може да оштети правилно функционисање локалних ендокриних ћелија доводећи до хиперплазије ентеричног нервног система. Са друге стране, експресија неуропептида поремећена је у стањима хроничне инфламације гастроинтестиналног тракта. Инфламаторна реакција која укључује локалне ендокрине ћелије и неуропролиферацију може довести до понављаних атака акутног бола. Најновија истраживања указују на могућу улогу неуроимуне реакције у патогенези хроничне и болне инфламације на анималном моделу. Студија Nemeth-а, Reen-а и Puri-ја потврдила је веома изражену експресију медијатора запаљења као индикатора присуства инфламаторног одговора код пацијената са неурогеном апендикопатијом. Singh и сарадници су испитали улогу еозинофила, маст ћелија и неуралне хиперплазије код апендицитиса. Установили су да

је број еозинофила и маст ћелија значајно повећан код пацијената презентованих клиничком сликом акутног апендицитиса уз нормалан хистолошки налаз црвуљка. Установили су да је бол код ових пацијената изазван медијаторима ослобођеним из дегранулисаних маст ћелија. Запажен је значајан пораст броја маст ћелија, нервних влакана и ганглијских ћелија у субмукози и *lamini muskularis propriae* код акутног апендицитиса. Coskun и сарадници су испитивали однос између ентеричног нервног система и маст ћелија у нормалним и патолошким стањима црвуљка. Истраживање Di Sebastiana и Buchlera потврдило је да 15-25% одстрањених црвуљака код пацијената оперисаних због сумње на акутни апендицитис на хистолошком прегледу изгледају нормални при чему је узрок бола у десном доњем квадранту абдомена код ових пацијената нејасан. Претпоставка о измењеном садржају неуропептида код хроничне инфламације навела је ауторе да испитују могућу промену у пептидергичној инервацији за супстанцу П (SP), вазоактивни интестинални пептид (VIP) и growth associated протеин 43 (GAP-43) применом имунохистохемијских метода. Неуропролиферација у зиду црвуљка у стању са повишеним нивоом SP и VIP може бити укључена у патофизиолошки механизам акутног бола у десном доњем квадранту у ситуацијама када нема хистолошке потврде акутне инфламације црвуљка. Исти аутори издвајају неуроимуни апендицитис као посебан патолошки ентитет. Xiong, Puri и сарадници анализирали су неуроналну хипертрофију и заступљеност маст ћелије код хистолошки верификованог акутног апендицитиса као и код хистолошки уредних налаза који су клинички презентовани као акутни апендицитис. Аутори су пронашли повећање броја нервних влакана, шваномских ћелија као и увећане ганглије у субмукози и у спољашњем мишићном слоју код 40% на изглед нормалних апендикса. Број и величина ганглија, број нервних влакана, шваномских и маст ћелија у сваком хистолошком компартману је квантитативно и семиквантитативно одређен. Неутрофилна инфилтрација *laminae muskularis propriae* је кључни моменат у настанку акутног апендицитиса. Guller и сарадници описују неурогену апендикопатију као стање које се клинички не може разликовати од акутног апендицитиса. Дијагноза се поставља хистолошки при чему су нервна пролиферација и повећање броја ендокриних ћелија у субмукози апендикса сигнификантне за овај ентитет. У наведеној студији неурогена апендикопатија била је присутна код 17,1% негативних апендектомија. Franke и сарадници су испитали да ли је једноставно хематоксилин-еозин бојење довољно за хистолошку потврду неурогене апендикопатије. Такође су покушали да јасно дефинишу клиничке знаке који преоперативно могу да издвоје неурогену

апендикопатију као посебан клинички ентитет. У претходној мултицентричној студији исти аутори су показали да је неурогена апендикопатија хистолошки ентитет. Потом су испитали њено постојање у дечјем и адолесцентном узрасту применом хематоксилин-еозин и/или имунохистохемијског бојења С100. Установили су присуство неурогене апендикопатије у само 4,8% апендектомираних пацијената млађих од 14 година, док је у адолесцената она присутна у 24,2%. Посебно анализирајући групу негативних апендектомија учесталост овог ентитета била је 16,7% у групи до 14 година, док је код старијих од 14 година учесталост 56,6%. Аутори закључују да је неурогена апендикопатија врло ретка у дечјем узрасту при чему на основу анамнестичких података и клиничким прегледом није могуће преоперативно препознати пацијенте са овим ентитетом.

Циљ рада је евалуација неурогене апендикопатије код негативних апендектомија у развојном добу. Потврђивањем присуства овог ентитета део хладних, негативних апендектомија учинио би се терапијски оправданим. Са друге стране, чак и негативни резултати ове студије, односно непотврђивање присуства неурогене апендикопатије, имали би значај јер би исказали потпуну неоправданост терапијског поступка.

Сваки допринос у правцу сигурније дијагнозе акутног апендицитиса у развојном добу научно и друштвено је оправдан.

РАДНА ХИПОТЕЗА

Хистолошки налаз неурогене апендикопатије присутан је код одређеног броја пацијената са негативном апендектомијом, што се може доказати стандардним методама бојења. Код истих пацијената присутна је јасна клиничка слика акутног апендицитиса, а без хистолошке потврде инфламације. Хистолошки налаз неурогене апендикопатије оправдава оперативну процедуру јер ослобађа пацијента преоперативних тегоба.

ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

1. Утврдити присуство неурогене апендикопатије код негативних апендектомија у развојном добу.
2. Утврдити валидност стандардног хематоксилин-еозин бојења у патохистолошкој верификацији неурогене апендикопатије у развојном добу.
3. Утврдити постојање неурогене апендикопатије у развојном добу применом имунохистохемијских метода бојења.
4. Утврдити корелацију анамнестичких, клиничких, психолошких, лабораторијских, ултрасонографских дијагностичких индиција са постојањем неурогене апендикопатије код пацијената са негативном апендектомијом.
5. Крајњи циљ истраживања је покушај потврђивања присуства овог ентитета чиме би се део хладних, негативних апендектомија учинио терапијски оправданим.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Комисија усвајајући примедбе известиоца налаже да се у склопу израде докторске тезе наведене примедбе коригују на следећи начин:

Истраживање је планирано у виду проспективне клиничке студије типа случај-контрола (case-control study) и биће изведено на Клиници за дечју хирургију Института за здравствену заштиту деце и омладине Војводине у Новом Саду.

Студија ће обухватити 50 пацијената узраста 4-18 година код којих је, након спроведеног стандардног дијагностичког алгорита постављена клиничка индикација у правцу акутног апендицитиса и учињена апендектомија, при чему макроскопски и патохистолошки налаз није потврдио инфламацију црвуљка тј. учињена је тзв. негативна апендектомија. Тиме је дефинисана негативна апендектомија као независна варијабла истраживања која је заједничка за цео узорак.

Анализирајући претходне сличне студије Franke i sar. 2002. на узорку од 96 негативних апендектомија неурогена апендикопатија је потврђена у 45 пацијената (46,8%), при чему је примењен χ^2 тест и мултиваријантна логистичка регресиона анализа. Наведено истраживање имало је снагу студије од 79 %, са новоом значајности од 5%. Студија Di Sebastiana и Buchler (1999) изведена на узорку од 31 пацијента са негативном апендектомијом потврдила је присуство неурогене апендекипатије код 15 пацијената. Примењен је Mann Whitney тест уз снагу студије од 80%. Nemeth, Puri и сарадници (2003) на узорку од 31 пацијента са негативном апендектомијом потврдили су неурогену апендикопатију код 41 % хистолошки нормалних налаза црвуљка, при чему је оглед имао моћ од 90% са новоом значајности од 5%.

Величина узорка одређена је применом формуле $n = z^2 \times \pi \times (1 - \pi) / E^2$, уз прецизност оцене од 1% и ниво поверења од 0,8. Са наведеним критеријумима снага планиране студије износи око 80%.

Оперисани пацијенти чији патохистолошки налаз црвуљка одговара дефиницији узорка, биће укључени у студију што ће подразумевати усмеравање пажње на додатно патохистолошко испитивање у правцу доказивања присуства неурогене апендикопатије методама хематоксилин-еозин бојења и имунохистохемијским методама. Тиме ће се у оквиру узорка пацијената са негативном апендектомијом издвојити две групе пацијената: са присутном неурогеном апендикопатијом и без неурогене апендикопатије.

У следећој фази извршиће се анализа података добијених из анамнезе, клиничког прегледа, психолошке евалуације и резултата дијагностичких процедура код пацијената који су укључени у узорак, те ће се покушаће направити корелација између присуства неурогене апендикопатије и клиничког налаза и дијагностичких резултата.

За спровођење истраживања предвиђен је и писмени информативни пристанак родитеља деце која су укључена у студију, као и самих пацијента уколико су старији од 10 година. Истраживање је одобрено од стране Етичког Комитета Института за здравствену заштиту деце и омладине Војводине у Новом Саду.

МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

Методолошки поступак једнак је за цео узорак.

Код сваког пацијента ће бити анализирани резултати спроведеног стандардног дијагностичког алгоритам у складу са савременом хируршком доктрином и стандардним протоколом дијагностике акутног апендицитиса Клинике за дечју хирургију.

Анализираће се подаци добијени из анамнезе, клиничког, лабораторијског, ултрасонографског прегледа као и психолошке процене пацијента и то:

1. Анамнестички подаци - пол, узраст, телесна маса, време почетка тегоба постојање бола у трбуху и његова локација, бол у десном доњем квадранту, трајање и миграција бола, претходне сличне тегобе, губитак апетита, мучнина, повраћање, тегобе при мокрењу, промена карактера столице, повишена температура.

2. Клинички преглед - присуство анталгичног положаја, обложеност језика, присуство слабих тачака на предњем трбушном зиду као и постоперативних ожиљака, илеоцекална болна осетљивост, дефанс трбушне мускулатуре.

3. Лабораторијске анализе - број леукоцита са леукоцитарном формулом као и преглед урина.

4. Ултрасонографски преглед црвуљка

- тест компресибилности (када је црвуљак некомпресибилан налаз је дефинисан као позитиван и обрнуто);
- ширина лумена (позитиван налаз је ширина лумена већа од 7 мм);
- дебљина зида црвуљка (позитиван налаз је дебљина зида црвуљка преко 2мм);
- ултразвучни градус (Канеко класификација),
- присуство хиперехогених садржаја у близини зида црвуљка (ангажован оментум, фибринске наслаге, масивне прираслице);
- анехогени ограничени садржај (течност) у близини црвуљка;
- налаз апендиколита у лумену црвуљка;
- неперисталтичност црвуљка;
- присуство гнојних колекција;

- присуство слободне течности у перитонеалној дупљи ретровезикално или у Морисоновом шпагу.

5. Кандидату се налаже да у оквиру истраживање обухвати и обраду података добијених из психолошке преоперативне припреме пацијената и родитеља (обављена од стране стручног лица- клиничког психолога), као и да добијене резултате корелира са присуством неурогене апендикопатије у испитиваној групи пацијената.

6. Патохистолошки преглед црвуљка спроведен је по стандардном протоколу. Хистолошка евалуација обухвата лонгитудинални пресек у дужини од 2cm дистално од врха црвуљка, као и и мултипле трансверзалне пресеке тела и базе црвуљка. Целокупан оперативни материјал је фиксиран 24 сата у 4%-тном неутралном пуферованом формалдехиду, ручно обрађиван, калупљен у парафин и исечен на резове дебљине 4 микрометра на којима ће се применити следеће микроморфолошке методе:

1) Стандардна хематоксилин-еозин метода бојења за патохистолошку верификацију апендицитиса. Минимални дијагностички критеријум за почетни акутни апендицитис је фокална ерозија демаркирана инфилтратом и трансмурална инфламација са формирањем микроабсцеса у каснијем стадијуму.

Неурогена апендикопатија је потврђена хематоксилин-еозин бојењем ако је:

1. присутна фокална колекција бледих вретенастих ћелија у *lamini propriae mucosae* (мукозни тип неурогене апендикопатије);
2. присутна фокална колекција бледих осовинских ћелија у облитерисаном црвуљку (аксијални неуроматозни тип неурогене апендикопатије).

2) Имунохистохемијска метода бојења за С-100 протеин омогућава приказивање перинеуралних шваномских ћелија којима се потврђује неурогена природа лезије. Имунохистохемијска високосензитивна и специфична техника DAKO LSAB+/HRP (DAKO Labelled StreptAvidin-Biotin, Horse Radish Peroxidase) обухвата блокирања активности ендогене пероксидазе. Ткивни пресеци се инкубирају са одговарајућим антителом, следи инкубација, прво са биотинизираним везујућим антителом, а затим са стрептавидином обележеном пероксидазом. Поступак се завршава инкубацијом пресека у мешавини супстрат-хромогена (H₂O₂ и 3-амино-9-етил карбазол и N.N-диметилформамиду: AEC + Substrate-Chromogen kit. Cat. No K 3469. DAKO Denmark), 5

минута на собној температури. Као општи испирач антисерума и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења користи се 0.1 М фосфатни пуфер рН 7.4. Ђелијска једра боје се са *Mayer*-овим хематоксилином.

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Прикупљени подаци анализирани су стандардним статистичким методама. Статистичка значајност је одређивана применом Studentovog Т теста, ПИ квадрат теста уз Yates корекцију, анализом варијансе и Фишеровим двостраним егзактним тестом.

Рад је писан у Microsoft Word 2007 програму, а статистичка обрада је рађена у SPSS 16.0.1 програму. Прикупљени подаци су груписани и биће приказани табеларно и графички.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ И ЗНАЧАЈ СТУДИЈЕ

Студија треба да утврди да ли је неурогена апендикопатија издвојен клинички ентитет у развојном добу. Такође, треба да утврди да ли је неурогена апендикопатија разлог тегоба пацијената код којих је због клиничке индикације начињена апендектомија, а патохистолошки налаз није потврдио инфламацију црвуљка. Студија треба да утврди корелацију анамнестичких, клиничких, психолошких, лабораторијских, ултрасонографских дијагностичких индикација са постојањем неурогене апендикопатије.

Планирана студија треба да пружи и одговор на питање да ли је стандардно хематоксилин-еозин бојење суфицијентно за постављање дијагнозе неурогене апендикопатије или потребно додатно имунохистохемијско испитивање.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу података презентованих у овом извештају Комисија доноси следећи

ЗАКЉУЧАК

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова Др Игор Мељников испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн студије је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитује неурогена апендикопатија као посебан клинички ентитет у развојном добу. Комисија усваја предлог известиоца да се у оквиру истраживања обухвати и психолошка процена пацијента и у оквиру овог извештаја прецизира начин на који ће то бити испоштовано.
3. Комисија сматра да ће докторска теза Др Игора Мељникова представљати темељну студију која ће резултирати побољшањем дијагностике акутног апендицитиса у развојном добу.

Комисија са задовољством предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Др Игора Мељникова под називом **“ЕВАЛУАЦИЈА НЕУРОГЕНЕ АПЕНДИКОПАТИЈЕ КОД НЕГАТИВНЕ АПЕНДЕКТОМИЈЕ У РАЗВОЈНОМ ДОБУ”** и одобри њену израду.

ПРЕДЛОГ МЕНТОРА

За ментора Комисија предлаже Проф Др Слободана Гребелдингера, специјалисту дечје и васкуларне хирургије, ванредног професора Медицинског факултета у Новом Саду, за уже научну област ХИРУРГИЈА.

КОМИСИЈА

Председник Комисије

Проф Др Љубиша Аћимовић

Ванредни професор Медицинског факултета у Крагујевцу

Научна област: ОПШТА ХИРУРГИЈА

ЧЛАН КОМИСИЈЕ

Проф Др Слободан Гребелдингер

Ванредни професор Медицинског факултета у Новом Саду

Научна област: ДЕЧЈА И ВАСКУЛАРНА ХИРУРГИЈА

ЧЛАН КОМИСИЈЕ

3. Проф Др Славица Ђукић- Дејановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија

У Крагујевцу, 12.2.2010

