

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/32, од 13. 07. 2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Зорице Савовић, под називом:

„Клинички значај мерења оксидативно-нитрозног статуса у периферној крви код болесника са акутним инфарктом миокарда”

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Милорадовић**, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина,
3. **Доц. др Владимир Живковић**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Зорица Савовић (Поповић), рођена 18.10.1966. године у Крагујевцу. Медицински факултет у Београду је уписала 1985. године, а завршила 1991. године са просечном оценом 9.29. Специјализацију интерне медицине је уписала 1993. године а завршила 1997. године у Београду са одличном оценом. Ужу специјализацију из Кардиологије је уписала 2005. године у Београду, усмени испит је одбранила 2007. године са оценом десет, а рад из уже специјализације за стручну област Кардиологија (Клиничке карактеристике и коронарографски налаз у болесника са нестабилном ангином пекторис лечених у КЦ Крагујевац) одбранила 2011. године на Медицинском факултету у Београду. Положила је усмени докторски испит на докторским студијама из Кардиологије на Медицинском факултету у Крагујевцу 2008. године са оценом десет. Стално је запослена у КЦ

Крагујевац, најпре у Центру за ургентну медицину а потом на Клиници за кардиологију (Одсек за исхемијске болести) као интерниста-кардиолог. Радила је на Медицинском факултету као сарадник-истраживач на истраживачким пројектима из области Интерна медицина. Укључена волонтерски као научни сарадник у наставу на Катедри Интерна медицина од 2000. до 2003. и од 2007. до 2011. године. Посебно едукована за ехокардиографију и рад у интензивној нези. 2010 и 2011. године била један од предавача на КМЕ са темом Тровање корозивним материјама.

Говори енглески језик. Удата, мајка двоје деце.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Клинички значај мерења оксидативно-нитрозног статуса у периферној крви код болесника са акутним инфарктом миокарда”

Предмет: Утврђивање вредности параметара оксидативно-нитрозног стреса и антиоксидативног система заштите, као потенцијално нових прогностичких маркера исхемије у акутном коронарном синдрому (АКС).

Хипотеза: У истраживању се очекује висок степен корелације између биохемијских параметара који потврђују оксидативно-нитрозни стрес и конвенционалних биохемијских параметара некрозе у АКС, што може имати предиктивну вредност, корелација параметара оксидативно-нитрозног стреса са врстом, величином и локализацијом инфаркта (процењених на основу ЕКГ еволутивности, тропонина - TnI, ејекционе фракције - EF, индекса скорa сегментне покретљивости - WMSI) као и са величином и локализацијом лезије на коронарографском налазу.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио један рад у целини за штампу у рецензираном часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је испуњен услов за пријаву докторске тезе:

Savovic Z, Iric-Cupic V, Davidovic G. Correlation between TIMI risk score and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. Ser J Exp Clin Res 2016; DOI: 10.1515/SJECR-2016-0007 (M52=1.5 бод)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Акутни коронарни синдром (АКС) представља акутни облик коронарне болести који се, првих сати од почетка тегоба до постављања дефинитивне дијагнозе, манифестује болом у грудима и динамичким ЕКГ променама. АКС се дели на STEMI (инфаркт са ST елевацијом) који захтева реперфузиону терапију што пре и APns/NSTEMI (нестабилна ангина пекторис или инфаркт без ST елевације), који не захтевају реперфузиону терапију

већ брзу и тачну процену ризика за нови коронарни догађај што опредељује даље дијагностичке и терапијске мере. NSTEMI се од APns разликује, пре свега, по позитивним серумским маркерима некрозе миокардних ћелија (СКМВ и TnI). Патолошко супстрат је исти у свим облицима АКС: представљен је акутним, нестабилним атеросклеротичним плаком компликованим неоклузивном (смањење протока крви у нестабилној ангини), или оклузивном тромбозом (потпуни прекид протока крви у инфаркту миокарда). Код STEMI оклузија је дуготрајна а некроза трансмурална – захвата цео зид, а код NSTEMI оклузија је краћег трајања, са мањом некрозом која не захвата цео зид.

Оксидативни стрес изазван реактивним кисеоничним врстама (Reactive oxygen species - ROS), пре свега супероксид анјон радикал и водоник пероксид, а кога продукују активирани тромбоцити, глатке мишићне и инфламаторне ћелије у условима ткивне хипоксије, може озбиљно да наруши ћелијску хомеостазу и утиче на ћелијску пролиферацију и диференцијацију због модификације DNK, липидне пероксидације и оштећења структуре ћелије услед стварања нерадикалских производа. Претпоставке о улози ROS-а у оштећењу миокарда услед исхемије-реперфузије су испитиване у многобројним истраживањима. Миокардна исхемија-реперфузија доводи до контрактилне дисфункције, аритмија, губитка адренергичне активности, промене генске експресије, апоптозе и ћелијске смрти. Оксидативни стрес игра значајну улогу у нестабилности атеросклеротичног плака. Студије потврђују да је ниво оксидативног стреса значајно повишен код пацијената са АКС у поређењу са пацијентима са стабилном ангином пекторис. Антиоксидативни заштитни систем (Antioxydant defence system - AOS, као супероксид дизмутаза, каталаза, глутатион редуктаза) спречава, ограничава оштећења настала деловањем реактивних врста кисеоника.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Утврђивање вредности параметара оксидативно-нитрозног стреса и антиоксидативног система заштите могло би имати прогностички значај због дефинисања и праћења динамике нових маркера исхемије у АКС. У корелацији са степеном оштећења миоцита могао би се процењивати клинички бенефит у односу на избор терапије.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је је утврдити повезаност оксидативно-нитрозног стреса и антиоксидативног система одбране са општим и демографским карактеристикама пацијената, факторима ризика, физикалним налазом, CRP, рBNP.

Основна хипотеза студије је да постоји висок степен корелације између биохемијских параметара који потврђују оксидативно-нитрозни стрес и конвенционалних

биохемијских параметара некрозе у АКС, што може имати предиктивну вредност. Такође се очекује и корелација параметара оксидативно-нитрозног стреса са врстом, величином и локализацијом инфаркта, као и са величином и локализацијом лезије на коронарографском налазу. Пацијенти са значајним вредностима параметара антиоксидативног система одбране могли би имати мањи обим оштећења срчаног мишића процењен EF, WMSI и TnI.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Акутни коронарни синдром (АКС) представља акутни облик коронарне болести који се, првих сати од почетка тегоба до постављања дефинитивне дијагнозе, манифестује болом у грудима и динамичким ЕКГ променама. АКС се дели на STEMI (инфаркт са ST елевацијом) који захтева реперфузиону терапију што пре и APns/NSTEMI (нестабилна ангина пекторис или инфаркт без ST елевације), који не захтевају реперфузиону терапију већ брзу и тачну процену ризика за нови коронарни догађај што опредељује даље дијагностичке и терапијске мере. NSTEMI се од APns разликује, пре свега, по позитивним серумским маркерима некрозе миокардних ћелија (СКМВ и TnI). Патофизиолошки супстрат је исти у свим облицима АКС: представљен је акутним, нестабилним атеросклеротичним плаком компликованим неоклузивном (смањење протока крви у нестабилној ангини), или оклузивном тромбозом (потпуни прекид протока крви у инфаркту миокарда). Код STEMI оклузија је дуготрајна а некроза трансмурална – захвата цео зид, а код NSTEMI оклузија је краћег трајања, са мањом некрозом која не захвата цео зид.

Оксидативни стрес изазван реактивним кисеоничним врстама (Reactive oxygen species - ROS), пре свега супероксид анијон радикал и водоник пероксид, а кога продукују активирани тромбоцити, глатке мишићне и инфламаторне ћелије у условима ткивне хипоксије, може озбиљно да наруши ћелијску хомеостазу и утиче на ћелијску пролиферацију и диференцијацију због модификације ДНК, липидне пероксидације и оштећења структуре ћелије услед стварања нерадикалских производа. Претпоставке о улози ROS-а у оштећењу миокарда услед исхемије-реперфузије су испитиване у многобројним истраживањима. Миокардна исхемија-реперфузија доводи до контрактилне дисфункције, аритмија, губитка адренергичне активности, промене генске експресије, апоптозе и ћелијске смрти. Оксидативни стрес игра значајну улогу у нестабилности атеросклеротичног плака. Студије потврђују да је ниво оксидативног стреса значајно повишен код пацијената са АКС у поређењу са пацијентима са стабилном ангином пекторис. Антиоксидативни заштитни систем (Antioxydant defence system - AOS, као супероксид дизмутаза, каталаза, глутатион редуктаза) спречава, ограничава оштећења настала деловањем реактивних врста кисеоника.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Студија ће бити дизајнирана као проспективно, нетерапијско, интервентно клиничко истраживање, усмерено на проучавање прогностичких фактора. Истраживање ће трајати 6 месеци а сва испитивања ће се спровести у току актуелне хоспитализације.

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживање ће представљати опсервациону студију у коју ће бити укључено 84 пацијента хоспитализована у Коронарној јединици Клинике за кардиологију КЦ Крагујевац са дијагнозом акутни коронарни синдром (АКС) и најмање 42 пацијента сличне старосне и полне дистрибуције, код којих је искључен АКС (клинички без бола у грудима, без ЕКГ еволутивности и са негативним ензимским профилем некрозе) који ће чинити контролну групу.

Пацијенти са АКС биће подељени у две групе: пацијенти са оклузивном лезијом и реперфузијом (STEMI инфаркт) и пацијенти са неоклузивном лезијом (NSTEMI инфаркт).

2.7.3. Узорковање

Узорковање болесника ће се обављати из целокупне популације пацијената који се хоспитализују у Центру за кардиологију КЦ Крагујевац који испуњавају укључујуће критеријуме. Сваки пацијент ће бити прегледан од стране истраживача ради утврђивања укључујућих и искључујућих критеријума. Пацијенти који задовољавају критеријуме ће бити укључени у студију до броја који је прерачунат за укупну величину узорка.

Критеријуми за укључивање испитаника: потписан формулар информисаног пристанка, постављање дијагнозе АКС по пријему у Коронарну јединицу. Критеријуми за искључивање испитаника: пацијенти млађи од 18 и старији од 80 година, труднице, испитаници од којих се не могу добити поуздани подаци (особе са значајним когнитивним дефицитом), испитаници са перипроцедуралним инфарктима, тромбозом стента, инфарктом тип 2, пацијенти на терапији Небивололом.

На основу вредности СКМВ и TnI накнадно ће се из групе NSTEMI искључити пацијенти са APns.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Након укључивања испитаника у студију, првог дана после пријема болесника, биће утврђене базалне вредности студијских варијабли и обављено анкетирање и комплетан клинички преглед пацијента. По пријему, у првом сату, на основу клиничке

презентације и ЕКГ налаза одредиће се даља стратегија лечења: примарна перкутана коронарна интервенција (рРСИ), тромболитичка терапија (Актилиза), одложена (rescue) РСИ или конзервативна терапија (двојна антиагрегациона и терапија нискомолекуларним хепаринима).

По пријему у Коронарну јединицу свим пацијентима ће се радити ЕКГ ради процене пространости инфаркта према броју одвода, ехокардиографски преглед са утврђивањем индекса скорa сегментне покретљивости (WMSI) и ејекционе фракције (EF %) и коронарографија ради дефинисања *culprit* лезије и процене распрострањености коронарне болести (једно или вишесудовна болест, анатомска локализација лезије).

По пријему пацијента, истраживач ће након узимања анамнезе попуњавати анкету са следећим подацима о пацијенту: године и пол, време од почетка бола до хоспитализације, учесталост тегоба (новонастали или понављани бол у грудима у предходних 24 сата), прва манифестација коронарне болести, фактори ризика: хипертензија, хиперлипидемија, дијабетес, пушење, хередитет; предходна коронарна, цереброваскуларна или периферна васкуларна болест и Killip класификација.

Пацијентима ће се узорак од 5 мл крви узимати: у тренутку пријема, при реперфузији (најдуже 15 минута после примарне перкутане интервенције или после тромболизе кад се региструју клинички и ЕКГ знаци реперфузије), после 6 и после 12 сати од пријема за STEMI са реперфузијом, односно у тренутку пријема, после 6 и 12 сати од пријема код NSTEMI и STEMI без реперфузије.

Из узорака крви одређиваће се следећи биохемијски параметри: ADMA, NO, оксидовани LDL, простаглицин, тромбоксан, хомоцистеин, O₂- (супероксид анион радикал), H₂O₂ (водоник пероксид), NO₂- (нитрити), ONOO- (пероксид нитрит), GSSC (оксидовани глутатион), TBARS (индекс липидне пероксидације), SOD (супероксид дизмутаза), CAT (каталаза), GSH (редуковани глутатион).

Одређиваће се и рутински биохемијски параметри: СКМВ, TnI (на пријему и после 12 сати), креатинин, холестерол, триглицериди, LDL, HDL, Hgb, Fe²⁺, CRP, рBNP.

Процену WMSI вршиће истраживач на основу 16-сегментног модела препорученог од стране ASE (American Society for Echocardiography).

АНКЕТА

Године	
Пол	<input type="checkbox"/> Мушки <input type="checkbox"/> Женски
Време од почетка бола до хоспитализације	
Учесталост тегоба	<input type="checkbox"/> Новонастали <input type="checkbox"/> Понављани бол
Прва манифестација коронарне болести	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не
Фактори ризика	<input type="checkbox"/> Хипертензија <input type="checkbox"/> Хиперлипидемија <input type="checkbox"/> Дијабетес <input type="checkbox"/> Пушење <input type="checkbox"/> Хередитет
Предходне кардиоваскуларне болести	<input type="checkbox"/> Ангина пекторис <input type="checkbox"/> Инфаркт без ревакуларизације <input type="checkbox"/> PCI <input type="checkbox"/> CABG <input type="checkbox"/> Цереброваскуларна болест <input type="checkbox"/> Периферна васкуларна болест
Killip класификација	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун величине узрока је извршен на основу резултата претходно објављене студије код кардиолошких болесника у којој су одређивани параметри оксидационог стреса. При томе је коришћен компјутерски програм и статистички тест за примарну варијаблу, Т-тест за два независна узорка, уз $\alpha=0.05$, $\beta=0.2$ (Снага студије 80 %) и расподеле испитаника бар 1:1. Сходно подацима поменутог истраживања претпостављена средња вредност TBARS у експерименталној групи је 3.2 (nmol TBARS/ml плазме) а стандардна девијација 2.5 док су те вредности у контроли 1.5 и 0.5. На основу наведеног прорачунато је да је у групи са AKS STEMI потребно најмање 42 пацијента а у групи AKS NSTEMI 42 пацијента. Контролну групу представљаће 42 пацијента сличне старосне и полне дистрибуције. Студијски узорак ће тако имати најмање 126 испитаника.

2.7.6. Статистичка обрада података

Резултати истраживања ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE) и анализирати након одређивања нормалности дистрибуције помоћу Студентовог t теста и ANOVA теста. За упоређивање STEMI и NSTEMI користићемо Mann-Whitney U тест. Корелације између испитиваних варијабли ће бити одређиване Спирмановим тестом. Вредност $p < 0.05$ ће бити сматрана статистички значајном.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати добијени у овој студији могли би да допринесу бољем разумевању молекулских механизма исхемијско-реперфузионог оштећења у АКС, које се процењује вредностима параметара оксидативно-нитрозног стреса. Корелација ових маркера са врстом инфаркта, локализацијом и величином лезије могла би да истакне њихов предиктивни значај у идентификацији и даљој стратегији високоризичних пацијената. Вредности параметара оксидативно-нитрозног стреса у условима постигнуте реперфузије могла би да предвиди ефикасност терапије. Повезаност вредности параметара антиоксидативног система заштите са степеном оштећења срчаног мишића могла би да укаже на оправданост опсежнијег терапијског приступа и потребе за дугорочним праћењем пацијената са АКС.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Утврђивање нивоа оксидативно-нитрозног стреса одређивањем концентрације следећих параметара: асиметрични диметиларгинин (ADMA), азот моноксид (NO), оксидовани LDL, простациклин, тромбоксан, хомоцистеин, $O_2^{\cdot -}$ (супероксид анјон радикал), H_2O_2 (водоник пероксид), NO_2^- (нитрити), $ONOO^-$ (пероксид нитрит), GSSC (оксидовани глутатион), TBARS (индекс липидне пероксидације) неинвазивним биохемијским методама. Утврђивање вредности параметара оксидативно-нитрозног стреса и антиоксидативног система заштите могло би имати прогностички значај због дефинисања и праћења динамике нових маркера исхемије у АКС. У корелацији са степеном оштећења миоцита могао би се процењивати клинички бенефит у односу на избор терапије

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Виолета Ирић-Ћупић**, ванредни професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Интерна медицина. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Ignjatovic V, Pavlovic S, Miloradovic V, Andjelkovic N, Davidovic G, Djurdjevic P, Stolic R, **Iric-Cupic V**, Simic I, Ignjatovic VD, Petrovic N, Smiljanic Z, Zdravkovic V, Simovic S, Jovanovic D, Nesic J. Influence of Different β -Blockers on Platelet Aggregation in Patients With Coronary Artery Disease on Dual Antiplatelet Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016;21(1):44-52.
2. Davidovic G, **Iric-Cupic V**, Milanov S, Dimitijevic A, Petrovic-Janicijevic M. When heart goes "BOOM" to fast. Heart rate greater than 80 as mortality predictor in acute myocardial infarction. *Am J Cardiovasc Dis.* 2013 Aug 16;3(3):120-8.
3. Davidovic G, **Iric-Cupic V**, Milanov S. Associated influence of hypertension and heart rate greater than 80 beats per minute on mortality rate in patients with anterior wall STEMI. *Int J Clin Exp Med.* 2013 May 22;6(5):358-66.
4. Vucić R, Knezević S, Lazić Z, Andrejić O, Dincić D, **Irić-Cupić V**, Zdravković V. Elevation of troponin values in differential diagnosis of chest pain in view of pulmonary thromboembolism. *Vojnosanit Pregl.* 2012 Oct;69(10):913-6.
5. Vučković Filipović J, Davidović G, **Irić Ćupić V**, Dukić S, Kovačević Z. Takotsubo cardiomyopathy - the broken heart syndrome. *Med Glas (Zenica).* 2012 Aug;9(2):400-2.
6. Koprivica Z, Djordjevic D, Vuletic M, Zivkovic V, Barudzic N, Andjelkovic N, Djuric D, **Iric-Cupic V**, Krkeljic J, Jakovljevic V. Von Willebrand factor and oxidative stress parameters in acute coronary syndromes. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011:918312. doi: 10.1155/2011/918312.
7. Mladenović V, Zdravković V, Jović M, Vucić R, **Irić-Cupić V**, Rosić M. Influence of admission plasma glucose level on short- and long-term prognosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Vojnosanit Pregl.* 2010 Apr;67(4):291-5.

4. Научна област дисертације

Научна област: Медицина. Ужа научна област: Клиничка и експериментална интерна медицина.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Милорадовић**, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина,
3. **Доц. др Владимир Живковић**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Зорице Савовић, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да утврди повезаност оксидативно-нитрозног стреса и антиоксидативног система одбране са општим и демографским карактеристикама пацијената, факторима ризика, физикалним налазом, CRP, рBNP.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Зорице Савовић бити од великог научног и практичног значаја у смислу испитавања потенцијалних нових маркера оштећења миокарда у АКС.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Зорице Савовић под називом „**Клинички значај мерења оксидативно-нитрозног статуса у периферној крви код болесника са акутним инфарктом миокарда**” и одобри њену израву.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Владимир Милорадовић, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина

Проф. др Слободан Обрадовић, члан, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина

Доц. др Владимир Живковић, члан, доцент Факултета физичке културе Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

Крагујевац, 22. 08. 2016.