

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-2798/3-2, од 26.03.2014. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата асистента мр сц. мед. др Зорана Јовића, под називом:

"Параметри агрегације тромбоцита и хемостазе током стрес ехокардиографије са добутамином у популацији пацијената који су лечени перкутаном коронарном интервенцијом"

Чланови комисије су:

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

2. проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

3. проф. др Радомир Матуновић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија кандидата

Асистент мр сц. мед. др Зоран Јовић је рођен 15.12.1970 године Власотинцу. Основну и средњу школу је завршио у месту рођења. Медицински факултет у Крагујевцу је завршио у року 1995. године са просечном оценом 8,27. Специјалистички испит из Интерне медицине положио је 10. маја 2006. године, одличном оценом. Од 1. августа 2006. год. стално је запослен у Клиници за кардиологију ВМА на радном месту лекара 1. одељења. Завршио је едукацију за инвазивну кардиолошку дијагностику у КЦС код проф. Миодрага Остојића 2007. године и имплантацију пацемакера у ВМА исте године. У времену од 8. октобра до 8. децембра 2008. године, завршио је стручну едукацију из области интервентне кардиологије у болници St. Luke's Episcopal Hospital у Хјустону, Тексас, САД. Завршио је дводневни курс за ПКИ у акутном инфаркту миокарда 2010. године у Швајцарској. Од 2009. године се активно бави перкутаном коронарним интервенцијама у Војномедицинској академији. Маја 2012. године је положио усмени испит на докторским студијама на Медицинском факултету у Крагујевцу. Марта 2013. године изабран у асистента за ужу научну област Интерна медицина на Медицинском факултету Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду. По националности је србин. До сада је активно учествовао у раду више конгреса и симпозијума у земљи и у иностранству. Члан је Српског Лекарског друштва, Српске Лекарске коморе и Удружења кардиолога Србије. Објавио је 7 ауторских и 30 коауторских радова који су публиковани у националним или страним часописима, зборницима у целини или у виду сажетака, а неки од њих су и саопштени на значајним скуповима у земљи и у иностранству. Говори, чита и пише енглески и француски језик. Поседује ЕЦДЛ сертификат за рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Параметри агрегације тромбоцита и хемостазе током стрес ехокардиографије са добутамином у популацији пацијената који су лечени перкутаном коронарном интервенцијом“

Предмет: Утицај физичког стреса током стрес ехокардиографије на агрегабилност тромбоцита и активност антикоагулантних протеина код пацијената након перкутане коронарне интервенције.

Хипотеза: Постоји позитивна корелација између агрегабилности тромбоцита, концентрације сП-селектина и sCD40L са једне стране и добутамином изазване исхемије са друге стране као и негативна корелација између активности антикоагулантних протеина и систолне функције ЛК.

2.3. Подобност кандидата

Кандидату су објављена четири рада у целини за штампу у рецензираном часопису са CC/SCI листе, у једном је први аутор и у три коаутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. Matunovic Radomir, Mijailovic Zdravko M, Tavciovski Dragan, Vucinic Z, Davicevic Zaklina, **Jovic Zoran**, Begovic Vesna, Samardzic Janko. Importance of cardiosurgery treatment in patients with infective endocarditis and heart failure (meeting abstract) *Circulation* 2008;118(12):E225-E225. **M34**
2. Gregoric ID, Loyalka P, Radovancevic R, **Jovic Z**, Frazier OH, Kar B. Tandemheart as a rescue therapy for patients with critical aortic valve stenosis. *Ann Thorac Surg.* 2009 Dec; 88(6):1822-6. **M21**
3. **Зоран Јовић**, Здравко Мијаиловић, Слободан Обрадовић, Драган Тавчиовски, Радомир Матуновић, Синиса Русовић, Предраг Ђурић. Successful implantation of a permanent pacemaker through a persistent left superior vena cava by using a right subclavian approach: a case report. *Војносанитетски Преглед* 2011;68(9):792-794. **M23**
4. Зорица Младеновић, Ана Ђорђевић-Дикић, Драган Тавчиовски, Анђелка Ристић, **Зоран Јовић**, Предраг Ђурић. The additive diagnostic role of coronary flow reserve in non invasive evaluation of coronary stenosis on left descending artery previously detected by multi-slice computed tomography. *Echocardiography* 2012;0:1-7. **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Исхемијска болест срца (ИБС) последњих неколико деценија представља најчешћи узрок морбидитета и mortalитета у развијеном свету. Иако је стопа mortalитета од ИБС опала последњих четири деценија свуда у свету, она је и даље одговорна за трећину свих смрти код болесника старијих од 35 година. Битан фактор у настанку болести и компликација током

перкутаних коронарних интервенција, представља агрегабилност тромбоцита, промене параметара хемостазе као и резистенција на антиагрегациону терапију. Агрегација тромбоцита и процес активације хемостазе током исхемије миокарда у склопу физичког или менталног стреса може бити важан фактор тромбозе стента након перкутане коронарне интервенције. Најзначајнија физиолошка функција тромбоцита јесте активно учествовање у свим фазама хемостазе и то како физичкохемијским процесима, тако и ослобађањем и активношћу посебних тромбоцитних чинилаца. Поред тога, они имају улогу и у процесима одржавања интегритета ендотела, фагоцитозе, детоксикације организма и транспорту материја. Тромбоцити играју кључну улогу у патофизиологији тромбозе после руптуре плака. Руптура плака настаје спонтано код пацијената са акутним коронарним синдромом, или може бити јатрогено изазвана код пацијената који иду на перкутану коронарну интервенцију (ПКИ). Међу мултиплим медијаторима активације тромбоцита, аденозин дифосфат (ADP) игра кључну улогу. Тиенопиридици су иререверзибилни инхибитори ADP P2Y₁₂ рецептора. Клопидогрел је друга генерација тиенопиридина, који се је, у комбинацији са аспирином, показао као супериорнији у односу на оралне антикоагулансе у превенцији тромботичких компликација након стентирања коронарних артерија. Протеин Ц (ПЦ) и антиромбин (АТ) представљају природне протеине плазме који играју битну улогу у процесу антикоагулације. Њихов недостатак доводи до развоја прокоагулантног стања, а једна од компликација може бити и тромбоза артерија. Солубилни П-селектин (sP-селектин) представља адхезиони молекул на активираним тромбоцитима и ендотелијалним ћелијама који се веже за свој рецептор на леукоцитима и на тај начин значајно утиче на развој и прогресију коронарне атеросклерозе. Сулубилни CD40 лиганд (sCD40L) је тромбоцитни рецептор који покреће инфламаторни одговор. Болесници са ИБС имају повећану концентрацију циркулишућег sCD40L због чега може имати предиктивну вредност. С обзиром да постоје докази о позитивном утицају антиагрегационе терапије на концентрацију sCD40L, његово одређивање може бити од значаја у даљем лечењу ИБС. Удруженост стресом узроковане исхемије, квантификоване добутамин стрес ехокардиографијом и промене у функцији тромбоцита и других параметара хемостазе, код пацијената након ПКИ, још није испитана до сада.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Битан фактор у настанку болести и компликација током перкутаних коронарних интервенција, представља агрегабилност тромбоцита, промене параметара хемостазе као и резистенција на антиагрегациону терапију. Агрегација тромбоцита и процес активације хемостазе током исхемије миокарда у склопу физичког или менталног стреса може бити важан фактор тромбозе стента након перкутане коронарне интервенције.

Циљеви и хипотезе студије

А. Главни циљеви испитивања

1. Одредити агрегабилност тромбоцита на ADP и епинефрин непосредно пре и након добутамина стрес ехокардиографског теста након 4 месеца од ПКИ код болесника на двојној антиагрегационој терапији.
2. Одредити активност антикоагулантног система протеина Ц и антитромбина непосредно пре и након добутамина стрес ехокардиографског теста након 4 месеца од ПКИ код болесника на двојној антиагрегационој терапији.
3. Одредити концентрације сП-селектина и sCD40L у плазми болесника непосредно пре и након добутамина стрес ехокардиографског теста након 4 месеца од ПКИ код болесника на двојној антиагрегационој терапији.
4. Регистровати и квантификовати регионални поремећај контрактилности миокарда - исхемију на максималној дози добутамина.
5. Утврдити хемостазне промене при максималној дози добутамина.

В. Радне хипотезе испитивања

1. Постоји позитивна корелација између агрегабилности тромбоцита, концентрације сП-селектина и sCD40L са једне стране и добутамином изазване исхемије са друге стране
2. Постоји негативна корелација између активности антикоагулантних протеина и систолне функције леве коморе.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Бројна досадашња испитивања и студије бавили су се проблемом агрегабилности тромбоцита и антиагрегационе терапије код пацијената са коронарном болешћу. Резултат истраживања су неколико генерација антиагрегационих лекова са циљем да дејство лека буде што брже, да су тромбоцити максимално супримирани и да након престанка терапије брзо и престане дејство лека. Најновији лекови добро контролишу процес агрегације тромбоцита али је и ризик за крварење већи код одређене популације пацијената. И поред многих студија које су учињене, нема препорука за стандардизацију тестова агрегабилности са једне стране док је број студија који се бави испитивањем агрегабилности тромбоцита током физичког стреса јако мали. Рађено је истраживање о агрегабилности тромбоцита током сцинтиграфијског испитивања срца у физичком стресу миокарда, али се до сада у литератури не помиње испитивање агрегабилности тромбоцита током стрес ехокардиографског теста са добутамином.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Клиничка проспективна, дијагностичко фундаментална студија

Популација која се истражује

Студијом ће бити обухваћено 130 болесника са клинике за кардиологију и ургентну интерну медицину, који иду на перкутану коронарну интервенцију и који ће најмање 5 дана пре интервенције бити на двојној антиагрегационој терапији (Аспирин 100 мг + Клопидогрел 75 мг). Сви пацијенти ће

12 сати пре интервенције добити ударну дозу Клопидогрела од 300 мг. Анамнестички ће бити узети подаци о годинама старости, полу, факторима ризика за ИБС рачунајући породичну анамнезу, хипертензију, хиперхолестеролемију, дијабетес меллитус и активно пушење. Објективним налазом пратиће се класа и тежина ангине пекторис по препоруци канадског кардиоваскуларног удружења (Canadian Cardiovascular Society – CCS).

Материјал и методе

Узорковање:

Ујутру на дан перкутане коронарне интервенције узеће се крв из брахијалне вене ради одређивања агрегације тромбоцита методом ЛТА. У случају резистенције на двојну антиагрегациону терапију, непосредно пред интервенцију ординираће се болус тирофибана интравенски (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесне тежине) и наставиће се континуирна примена тирофибана интравенски током процедуре у дози 0,125 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{мин}$ без прекидања интервенције. Месец дана након интервенције поновиће се узимање крви из брахијалне вене ради праћења хроничног одговора тромбоцита на антиагрегациону терапију. Четири месеца након ПКИ узеће се два узорка венске крви из брахијалне вене у епрувете које садрже 3,8% натријум цитрата под минималном стазом, 30 минута након мировања. 2-3 сата после узимања крви пласираће се канила у брахијалну вену и после 30 минута учиниће се добутамин стрес ехокардиографија.[14] У пику оптерећења са добутамином узеће се венска крв путем претходно пласиране каниле у две епрувете које садрже 3,8% натријум цитрата. Плазма богата тромбоцитима добиће се центрифугирањем на 150 x g током 10 минута на собној температури. Одговор агрегације тромбоцита на ADP (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) снимаће се 5 минута после додатка агониста користећи агрегометар БЦТ-система (Dade-Behring, Немачка). За одређивање активности протеина Ц и антитромбина узеће се плазма сиромашна тромбоцитима (platelet poor plasma-ППП), цитрирана и центрифугирана на 2000 x g током 15 минута на собној температури и замрзнута на $-80\text{ }^\circ\text{C}$ до завршног мерења.[4] Активност протеина Ц и антитромбина биће одређена колориметријским тестом (Berichrom, Dade-Behring, Немачка). Концентрација сП-селектина и sCD40L биће одређивана ЕЛИСА методом (R&D systems, Abingdon, UK).[16] Све процедуре ће бити спроведене по упутствима произвођача.

Баријабле које се мере у студији:

Главне варијабле у студији су: агрегабилност тромбоцита, присуство исхемије током ДСЕ, тј. позитиван стрес ехокардиографски тест, активност протеина Ц и антитромбина. Од помоћних варијабли биће праћени сП-селектин, sCD40L, Ц-реактивни протеин (CRP), мождани натриуретски пептид (BNP), гликемија, гликозирани хемоглобин (HbA1c) и холестерол. Код свих болесника биће праћена појава нежељених кардијалних догађаја и евентуално настале изненадне срчане смрти у наредних 6 месеци и годину дана. Нежељени кардијални догађаји су дефинисани као појава рекуренте ангине пекторис, рестенозе, инфаркта или реинфаркта миокарда и новонасталих поремећаја ритма.

Снага студије и величина узорка:

Код израчунавања величине узорка руководили смо се дизајном истраживања и карактеристикама основног скупа из којег се узорак формира. Ови захтеви обухваћени су:

- Варијабилитетом резултујућег обележја (агрегабилности тромбоцита)
- Идентификацијом истраживачког циља (повећање агрегабилности тромбоцита током стрес ехо теста)
- Одређивањем величине ефекта (повећање агрегабилности тромбоцита током стрес ехо теста за 5%).
- Дизајном студије (да ли су у питању поновљена мерења или не)

Узимајући у обзир очекивано повећање агрегабилности тромбоцита током стрес ехо теста од 5%, и вредности $\alpha=0,05$ и $\beta=0,2$ ($\alpha=0,05$ представља ниво значајности а $\beta=0,2$ показатељ је статистичке моћи теста), израчуната је потребна величина узорка од 130 испитаника.

Статистичка обрада података:

За статистичку одраду података биће коришћен Студентов Т-тест за понављана мерења као и за независне узорке. За упоређивање два повезана узорка, као и за популацију која нема нормалну расподелу, биће коришћен Wilcoxon-ов тест. За тестирање корелације између агрегабилности тромбоцита и протеина који утичу на агрегабилност биће употребљен Пирсонов тест. Mann-Whitney U тест биће коришћен за упоређење два независна узорка популације која немају нормалну

расподелу. За мерење статистичке значајности између варијабли биће коришћен Спearман-ов тест. За обраду података користиће се програм СПСС (Statistical Package for the Social Sciences 17.0 за РС, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Вредности $p < 0,05$ биће сматране значајним, док ће вредности $p < 0,01$ бити сматране високо статистички значајним.

Критеријуми за укључивање у студију:

1. Пацијенти са исхемијском болешћу срца којима је учињена ПКИ
2. Да су на двојној антиагрегационој терапији са Аспирином 100 мг и Клопидогрелом 75 мг дневно, најмање 5 дана пре ПКИ
3. Да су старости између 20 и 80 година
4. Потписан информисани пристанак за учествовање у студији

Критеријуми за искључивање из студије:

1. Било који облик наследне или стечене тромбофилије
2. Абнормално ниске базалне вредности протеина Ц и антитромбина
3. Вредност тромбоцита испод $150 \times 10^9/L$ и изнад $450 \times 10^9/L$
4. Било која малигна болест
5. Пацијенти млађи од 20 и старији од 80 година

Добутмин стрес ехокардиографија:

Код свих болесника 4 месеца након ПКИ биће урађена ниско-дозна добутамин стрес ехокардиографија. Добутаминска инфузија се отпочиње са $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ телесне тежине да би се постепено повећавала до $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, код извесног броја болесника је настављена до $15 \mu\text{g}/\text{kg}$. Просечно сваки стадијум траје 5 минута, са редовном контролом крвног притиска и пулса. Нежељена дејства током добутаминског теста биће праћена код свих пацијената. Регионалне абнормалности покретљивости зида леве коморе биће анализирани у складу са усвојеним шеснаестосегментним моделом поделе леве коморе Америчког Ехокардиографског Кардиолошког друштва. Регионална покретљивост зида леве коморе биће оцењивана на следећи начин: 1=нормокинезија, 2=хипокинезија, 3=акинезија и 4=дискинезија.

Сваки сегмент леве коморе биће појединачно оцењиван као вијабилан уколико је при ниским дозама

добутамина дошло до поправљања његове регионалне контрактилности од почетне акинезије, хипокинезије или дискинезије ка хипокинезији или нормокинезији, док се прелазак дискинезије у акинезију неће бити разматран као маркер вијабилности. Уколико будемо имали погоршање у односу на почетну очуваност покретљивости након апликације добутамина такви сегменти ће бити оцењивани као исхемијски одговори.

На основу добијених вредности биће посматрана глобална покретљивост леве коморе у базалним условима и након примене малих концентрација инотропног агенса добутамина. Глобална покретљивост биће преко Индекса покретљивости - Wall Motion Score Index (WMSI) представља меру просечног одступања покретљивости сегмента од идеално очуване покретљивости тј. нормокинезије свих 16 посматраних сегмената.

$$\text{WMSI} = \frac{\text{бр.нормокинезија} \times 1 + \text{бр.хипокинезија} \times 2 + \text{бр.акинезија} \times 3 + \text{бр.дискинезија} \times 4}{16}$$

те у физиолошким стањима WMSI износи 1, већа вредност WMSI указује на већи степен дисфункције леве коморе. WMSI ће бити израчунаван у базалним условима и при ниским дозама добутамина од 10 µg/kg. Вредност Индекса покретљивости након примене добутамина, WMSI пик, као и вредност разлике WMSI базално и WMSI пик, неће указати само на присуство вијабилног ткива, него и на величину присутне контрактилне резерве. Позитивним добутаминским ехокардиографским тестом на вијабилност ћемо сматрати тестове са вијабилношћу доказаном на претходни начин код 2 или више сегмената.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Активности антикоагулантних протеина је у негативној корелацији са систолном функцијом леве коморе и постоји позитивна корелација између концентрације солубилног сП-селектина, солубилног ЦД40 лиганда и добутамином изазване исхемије код пацијената 4 месеца након ПКИ

2.9. Оквирни садржај дисертације

Исхемија миокарда током добутамин стрес ехокардиографије значајно повећава агрегабилност

тромбоцита и смањује активност антикоагулантних протеина код стентираних пацијената, који су били на двојној антиагрегационој терапији, 4 месеца након ПКИ. Агрегабилност тромбоцита је од великог значаја за пацијенте са исхемијском болешћу срца јер представља фактор који може бити пресудан у развоју коронарног догађаја (изненадну срчану смрт и инфаркт миокард). С обзиром на нестандардизованост тестова којима се испитује агрегабилност тромбоцита и на разноликост фактора који утичу на агрегацију тромбоцита, додатна информација и податак о понашању тромбоцита и антикоагулантних протеина, током доказане исхемије миокарда, може бити од великог значаја за даљи развој контроле коагулационог процеса и тестова агрегабилности.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Слободан Обрадовић**, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Клиничка интерна медицина - кардиологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. проф. др Владимир Милорадовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. проф. др Радомир Матуновић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Асистента мр сц. мед. др Зорана Јовића 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 развије нов начин и приступу лечења пацијента са коронарном болешћу и спречи настанак озбиљних компликација.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза Асистента мр сц. мед. др Зорана Јовића бити од великог научног и практичног значаја у смислу потенцијалног спречавања озбиљних последица код пацијената након перкутане коронарне интервенције и имплантације стента.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата асистента мр сц. мед. др Зорана Јовића под називом **„Параметри агрегације тромбоцита и хемостазе током стрес ехокардиографије са добутамином у популацији пацијената који су лечени перкутаном коронарном интервенцијом“** и одобри њену израду.

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

Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

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

У Крагујевцу, 05.05.2014.