

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 11.06.2020. godine, određeni smo u Komisiju za ocenu završene doktorske teze pod nazivom „**Ispitivanje markera inflamacije pentraksina 3, ciklofilina A i heparin-vezujućeg epidermalnog faktora rasta kod bolesnika sa akutnim infarktom miokarda sa ST elevacijom**” kandidata prim. mr sci farm. Vesne Vuković-Dejanović, specijaliste medicinske biohemije, te posle pregledane teze podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

### IZVEŠTAJ

#### A. SADRŽAJ DOKTORSKE TEZE

Doktorska teza je napisana na 95 strana, ima 34 tabele, 42 slike i 211 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske teze izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (22 strane), Ciljevi rada (1 strana), Ispitanici i metode (7 strana), Rezultati (40 strana), Diskusija (11 strana), Zaključci (1 strana) i Literatura (13 strana).

Ciljevi ove doktorske teze bili su: poređenje koncentracija pentraksina 3 [*pentraxin 3* (PTX3)], heparin-vezujućeg epidermalnog faktora rasta [*heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF)] i ciklofilina A [*cyclophilin A* (CyPA)] između bolesnika sa akutnim infarktom miokarda sa ST-elevacijom [*ST-elevation myocardial infarction* (STEMI)] pre izvođenja primarne perkutane koronarne intervencije [*primary percutaneous coronary intervention* (pPCI)], bolesnika sa stabilnom anginom pektorisa (SAP) i zdravih osoba; utvrđivanje razlike u koncentracijama PTX3, HB-EGF i CyPA između bolesnika sa značajnom okluzivnom koronarnom arterijskom bolešću (STEMI-KAB) pre izvođenja pPCI i bolesnika sa dijagnozom infarkta miokarda bez opstrukcije koronarnih arterija [*myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries* (MINOCA)]; poređenje koncentracija PTX3, HB-EGF i CyPA kod STEMI bolesnika neposredno nakon i pre pPCI; ispitivanje povezanosti određivanih markera sa lipidnim parametrima i parametrima oksidativnog i antioksidativnog statusa, i dijagnostičke vrednosti određivanja koncentracija PTX3, HB-EGF i CyPA u detekciji STEMI bolesnika za razlikovanje od MINOCA bolesnika.

U poglavlju **Ispitanici i metode** navedene su karakteristike ispitivanih grupa uključenih u studiju i opisane su primenjene analitičke metode. U istraživanje je uključeno 87 STEMI bolesnika, od kojih je 52 lečeno u Kliničko-bolničkom centru "Bezanijska kosa", a 35 bolesnika u Kliničko-bolničkom centru Zemun od maja 2016. do

jula 2017. godine. STEMI bolesnici su na osnovu angiografskog nalaza svrstani u grupu STEMI-KAB ako su imali angiografski potvrđenu značajnu okluzivnu KAB i koji su podvrgnuti pPCI sa ugradnjom stenta, ili MINOCA grupu, ako su imali KAB bez okluzije i kojima nije rađena pPCI intervencija. Težina KAB procenjena je korišćenjem SYNTAX skora, a STEMI-KAB grupa je dodatno podeljena prema SCORE indeksu na bolesnike sa niskim do umerenim SCORE rizikom (<5%) i sa visokim do veoma visokim SCORE rizikom ( $\geq 5\%$ ). U studiju je uključeno i 15 bolesnika sa SAP čiji su uzorci sakupljeni u Kliničko-bolničkom centru Zemun. Kontrolna grupa je sačinjena od 193 zdravih dobrovoljaca, i to od lica zaposlenih na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu kao i osoba koje obavljaju redovan sistematski pregled u Opštoj bolnici "Medigroup" u Beogradu. Kriterijumi za izbor kontrolne grupe bili su starost > 50 godina, bez istorije nedavnih infekcija, oboljenja bubrega, jetre ili maligne bolesti, ili operacija ili velikih povreda unutar mesec dana pre uključivanja u studiju. Kontrolna grupa je prošla detaljan kardiološki pregled (elektrokardiogram, stres test i transtorakalni ultrazvuk) radi isključivanja KVB. Informacije o zdravstvenom stanju ispitanika dobijene su iz njihove medicinske dokumentacije. Zdravi dobrovoljci su popunjavali upitnik o lekovima koje trenutno koriste i navikama vezanim za pušenje. Svi bolesnici i dobrovoljci uključeni u studiju dali su informisani pristanak pre uvođenja u studiju. Uključene studijske grupe bile su podudarne prema godinama. Studija je sprovedena u skladu sa etičkim načelima Helsinške deklaracije i načelima Etičkih komiteta Kliničko-bolničkih centara "Bežanijska kosa" i Zemun, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta i Opšte bolnice „Medigroup“.

Osobama iz kontrolne grupe uzoci krvi uzeti su nakon noćnog gladovanja, dok su uzorci krvi bolesnika uzeti odmah po prijemu u hitnu službu, kao i neposredno nakon završetka pPCI ako su podvrgnuti intervenciji. Uzorci za analize koje se nisu radile odmah po uzorkovanju su alikvotirani i čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Parametri oksidativnog stresa su određivani u serumu, a svi ostali parametri u EDTA plazmi. Svim ispitanicima su rutinskim metodama određene biohemijske analize [glukoza, mokraćna kiselina, ukupni holesterol (TH), trigliceridi (TG), HDL-holesterol (HDL-h), laktat dehidrogenaza (LDH)], dok je koncentracija LDL-holesterola (LDL-h) izračunata pomoću Friedewald formule (1). hsCRP određen je imunoturbidimetrijski, a ostali parametri inflamacije (PTX3, HB-EGF i CyPA) ELISA "sendvič" metodom komercijalnim testovima prema odgovarajućim protokolima. Troponin I (TnI) je meren samo kod bolesnika sa STEMI elektrohemiluminiscenentnom metodom. Parametri oksidativnog stresa [uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) i koncentracija ukupnih oksidanasa (TOS)] kao i antioksidativne zaštite [superoksid dismutaza (SOD), ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa (SH) i koncentracija ukupnih antioksidanasa (TAS)] određivani su spektrofotometrijskim metodama ustanovljenim na Katedri za medicinsku biohemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta i aplikovanim na analizator ILAB 300+.

Za statističku analizu korišćen je PASW® Statistic v. 25 (Chicago, Illinois, USA). U zavisnosti od distribucije podataka, za analizu dve grupe podataka korišćeni su *Mann Whitney* test ili *Student's t-test* za dve nezavisne populacije. Za analizu malog broja podataka korišćen je *Mann Whitney exact* test. ANOVA sa *Tukey's post hoc* testom i *Kruskall Wallis* test sa *Mann Whitney U* testom kao post hoc testom uz *Bonferroni* korekciju korišćeni su za poređenje tri nezavisne grupe (kontrolna grupa, STEMI i SAP).

Kategoričke varijable su analizirane Chi-kvadrat testom. *Wilcoxon* test ili *Student's t-test* za dve zavisne populacije korišćeni su za poređenje parametara pre i nakon sprovođenja pPCI procedure. Korelacije između varijabli analizirane su Spearman-ovom korelacionom analizom. Referentni interval definisan je prema preporukama IFCC (2). *Receiver operation curve* (ROC) analizom ispitana je dijagnostička tačnost analiziranih parametara u razdvajanju MINOCA od STEMI-KAB bolesnika. *Principal component faktorska* analiza (PCA) je primenjena da bi se parametri sa sličnim karakteristikama svrstali u manji broj nezavisnih grupa. Prediktivna sposobnost tako grupisanih parametara (klastera/faktora) procenjena je logističkom regresionom analizom.

U poglavlju **Rezultati** za tri ispitivane studijske grupe (kontrolnu grupu, STEMI i SAP) najpre su prikazane demografske karakteristike i uporedna analiza koncentracija ispitivanih biohemijskih parametara, dok su za STEMI i SAP grupu prikazani i klinički parametri. Potom je dat i uporedni prikaz vrednosti ispitivanih inflamatornih markera (hsCRP, PTX3, HB-EGF i CyPA), kao i parametara oksidativnog stresa (AOPP, PAB, TOS) i antioksidativne zaštite (SOD, SH, TAS) u tri ispitivane grupe. Ispitivani inflamatorni parametri kod kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika su zatim upoređivani prema polu i starosti; na osnovu vrednosti ovih parametara kod kontrolnih ispitanika određeni su referentni intervali. Primenom *Spearman* korelacione analize ispitivana je povezanost između inflamatornih markera i drugih ispitivanih biohemijskih parametara, demografskih i kliničkih karakteristika, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite unutar kontrolne, kao i STEMI grupe ispitanika. Pomoću ROC analize određene su optimalne cut off vrednosti za PTX3 i HB-EGF u cilju diferencijacije STEMI bolesnika od zdravih osoba. Na osnovu optimalne cut off vrednosti za PTX3, STEMI bolesnici podeljeni su u dve grupe, koje su zatim upoređene prema demografskim i kliničkim karakteristikama, ispitivanim biohemijskim i inflamatornim parametrima, i markerima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Na isti način izvršena su poređenja između grupa dobijenih na osnovu cut off vrednosti za HB-EGF. Primenom PCA analize, 11 ispitivanih parametara je na osnovu zajedničkih karakteristika svrstano u 4 klastera/faktora kako bi se ispitala njihova uloga u predikciji visokih koncentracija (iznad cut off vrednosti) PTX3 i HB-EGF kod bolesnika sa STEMI. Kako su inflamatorni markeri kod STEMI-KAB bolesnika određivani i odmah nakon pPCI procedure i implantiranja stenta, vrednosti ovih markera pre i nakon intervencije su upoređene *Wilcoxon* testom za dve zavisne populacije, a prethodno je iz analize isključeno 6 bolesnika kojima zbog lošeg stanja krvnih sudova nije bilo moguće ugraditi stent i 6 bolesnika sa dijagnozom MINOCA. Dodatno je analizirano da li promene koncentracija inflamatornih parametara pre i nakon pPCI intervencije kod STEMI-KAB bolesnika zavise od pola. Potom je izvršeno poređenje demografskih, kliničkih, biohemijskih i inflamatornih parametara između STEMI-KAB i MINOCA grupe bolesnika, dok je korišćenjem ROC analize ispitana sposobnost inflamatornih parametara za razlikovanje MINOCA od STEMI-KAB bolesnika. Osim toga, inflamatorni parametri kod MINOCA i STEMI-KAB bolesnika upoređeni su na osnovu SCORE rizika.

Posle **Diskusije** na kraju rada izvedeni su **Zaključci** na osnovu rezultata i analize istraživanja sprovedenog u radu.

## B. ANALIZA REZULTATA

Sve tri ispitivane grupe (kontrolna grupa, STEMI i SAP) bile su ujednačene po starosti i BMI. Zastupljenost muškaraca i pušača bila je veća kod STEMI i SAP bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu, i SAP bolesnici imali su manji broj okludiranih krvnih sudova u odnosu na STEMI bolesnike, što su očekivani rezultati. Svi ispitivani biokemijski parametri razlikovali su se između STEMI bolesnika i kontrolne grupe, i vrednosti svih parametara osim TH i HDL-h bile su više kod STEMI bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu. SAP grupa se razlikovala od kontrolne u koncentracijama TH, HDL-h i mokraćne kiseline. Razlika između SAP i STEMI grupe nađena je za vrednosti glukoze, TH, LDL-h i LDH, i svi ovi parametri bili viši kod STEMI nego kod SAP bolesnika.

Poređenjem inflamatornih markera između ispitivanih grupa pokazano je da su koncentracije PTX3 i hsCRP više kod STEMI i SAP grupe bolesnika u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, dok su koncentracije HB-EGF više u STEMI grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Analiza markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite pokazala je da su bolesnici sa STEMI imali više vrednosti PAB u odnosu na kontrolnu i SAP grupu. Vrednosti AOPP, SH i TAS bile su niže a aktivnost SOD viša kod STEMI bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu. SAP grupa imala je više vrednosti SH-grupa i TAS i u odnosu na kontrolnu grupu i STEMI grupu.

Pošto nije nađena razlika u vrednostima ispitivanih inflamatornih parametara između STEMI i SAP bolesnika, iz daljeg toka analiziranja rezultata isključena je SAP grupa. Da bi se utvrdilo da li pol i starost utiču na ispitivane inflamatorne parametre ispitana je promena ovih parametara u odnosu na pol i godine u STEMI i kontrolnoj grupi posebno. Zastupljenost muškaraca bila je veća u STEMI grupi u odnosu na kontrolnu grupu dok su ove dve grupe bile ujednačene u odnosu na starost. U grupi kontrolnih ispitanika, muškarci su imali višu koncentraciju HB-EGF od žena, vrednosti HB-EGF su značajno opadale sa starenjem, a osobe preko 65 godina starosti imale su najviše vrednosti PTX3. Za ispitivane inflamatorne parametre u kontrolnoj grupi su izračunati referentni intervali određivanjem 2,5. i 97,5. percentila. U STEMI grupi nije bilo razlike između muškaraca i žena, kao ni u odnosu na starost bolesnika ni za jedan od ispitivanih inflamatornih parametara.

*Spearman* korelacionom analizom ispitana je povezanost inflamatornih markera i drugih ispitivanih biokemijskih parametara, demografskih i kliničkih karakteristika, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u grupi kontrolnih i STEMI ispitanika. U kontrolnoj grupi utvrđena je negativna korelacija između HB-EGF i starosti, kao i između PTX3 i BMI, dok je hsCRP pozitivno korelirao sa BMI i TG. Nije uočena značajna povezanost između ispitivanih inflamatornih parametara kod kontrolnih ispitanika. Pri ispitivanju zavisnosti inflamatornih markera i ostalih ispitivanih parametara kod STEMI bolesnika utvrđena je pozitivna povezanost hsCRP sa vrednostima BMI i SYNTAX skora kao i sa koncentracijama HB-EGF i TOS, a negativna sa TAS. HB-EGF pozitivno korelira sa BMI dok CyPA sa SH-grupama. PTX3 pozitivno korelira sa aktivnošću LDH i koncentracijom HB-EGF i negativno sa CyPA i sadržajem SH-grupa.

ROC analizom određene su cut off vrednosti PTX3, HB-EGF i CypA sa optimalnom sposobnošću razlikovanja bolesnika sa STEMI od zdravih osoba. Za CypA dobijene vrednosti nisu imale zadovoljavajuće dijagnostičke karakteristike. STEMI bolesnici su naknadno podeljeni u grupe na osnovu definisanih cut off vrednosti za PTX3 i HB-EGF, pa je izvršeno poređenje ispitivanih parametara između bolesnika sa koncentracijama nižim i višim od definisanih vrednosti. Među STEMI bolesnicima sa koncentracijama PTX3 iznad cut off vrednosti bila je veća zastupljenost muškaraca od žena i imali su niže vrednosti HDL-h, CyPA i TAS u odnosu na osobe koje imaju PTX3 ispod cut off vrednosti. Među bolesnicima sa vrednostima HB-EGF iznad cut off vrednosti bila je veća zastupljenost pušača i imali su više vrednosti PTX3 u odnosu na osobe sa HB-EGF ispod ove vrednosti.

Primenom PCA analize parametri koji su u značajnoj korelaciji, grupisani su u faktore, a zatim su dobijeni faktori i pojedinačni inflamatorni parametri analizirani univarijantnom logističkom regresionom analizom da bi se utvrdili prediktori visokih vrednosti PTX3 i HB-EGF. Kao značajni prediktori visokih vrednosti PTX3 izdvojeni su faktor metaboličko-oksidativnog stresa odnosno glukoza i PAB, kao i CyPA, dok je PTX3 značajan prediktor visokih vrednosti HB-EGF. U multivarijantnom modelu, nezavisan prediktor visokih vrednosti PTX3 ostao je faktor metaboličko-oksidativnog stresa.

Inflamatorni markeri testirani su kod STEMI-KAB bolesnika i odmah nakon pPCI procedure i implantiranja stenta. Po završetku pPCI došlo je do porasta koncentracija HB-EGF i CyPA, kao i smanjenja koncentracije PTX3 u odnosu na vrednosti pre pPCI. Dodatno je ispitana promena koncentracija inflamatornih parametara pre i nakon pPCI intervencije kod STEMI-KAB bolesnika podeljenih prema polu, i nađeno je da se vrednosti PTX3 smanjuju, a CyPA i HB-EGF povećavaju nakon izvođenja pPCI kod oba pola.

Zatim su ispitane razlike u demografskim, kliničkim, lipidnim i inflamatornim parametrima između STEMI-KAB (pre izvođenja pPCI) i MINOCA bolesnika. U grupi STEMI-KAB bolesnika bio je veći procenat pušača, zabeležen je veći broj okludiranih krvnih sudova i veće vrednosti SYNTAX skora i  $TnI_{max}$ , a niže vrednosti TH, LDL-h i LDH u odnosu na MINOCA bolesnike. MINOCA bolesnici imali su značajno više vrednosti PTX3 nego STEMI-KAB bolesnici. Pomoću ROC analize ispitana je sposobnost PTX3, hs-CRP, CyPA i HB-EGF za razlikovanje MINOCA od STEMI-KAB bolesnika; PTX3 je pokazao dobru sposobnost, a još bolji potencijal za diferenciranje ove dve grupe bolesnika pokazali su modeli koji su uključili istovremeno određivanje CyPA sa TnI i HB-EGF sa TnI.

Na kraju su STEMI-KAB bolesnici na osnovu izračunatog SCORE rizika podeljeni na grupu bolesnika sa niskim do umerenim SCORE rizikom i grupu sa visokim do veoma visokim SCORE rizikom. Grupe su usklađene prema polu, starosti i broju ispitanika po principu slučajnosti, a poređene su međusobno, kao i sa grupom MINOCA bolesnika. MINOCA bolesnici su imali nizak 10-godišnji fatalni rizik od KVB izražen kao SCORE, i ta vrednost je slična SCORE riziku u grupi STEMI-KAB bolesnika sa niskim do umerenim rizikom, a niža u odnosu na grupu sa visokim SCORE rizikom. Koncentracija PTX3 bila je viša kod MINOCA bolesnika u odnosu na STEMI-KAB grupu niskog do umerenog rizika.

### C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKOG RADA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Poznato je da inflamacija, imunološki procesi i oksidativni stres imaju važne uloge u patogenezi KVB, posebno tokom akutne faze AIM, kao i u fazi oporavka (3). Decenijama unazad postoji potreba za specifičnim biomarkerima kako bi se dobila što potpunija slika o pojavi i ishodima kardiovaskularnih događaja, a koji bi mogli biti korisni i u klasifikaciji bolesnika prema težini bolesti, zbog čega se neprekidno analiziraju novi inflamatorni parametri. Troponin je koprstan pri postavljanju dijagnoze AIM, ali još uvek nema specifičnog markera za diferencijalnu dijagnostiku pacijenata sa teškom KAB ili nestabilnim plakovima koji bi ukazali na mogući razvoj AIM u bliskoj budućnosti (4). hsCRP se koristi za predviđanje budućih kardiovaskularnih događaja, ali nije od koristi za diferencijalnu dijagnozu postojeće KVB jer ima nedovoljnu sposobnost predviđanja težine koronarne stenoze, kao i malu specifičnosti (5). PTX3, CyPA i HB-EGF uključeni su različite faze razvoja AIM, ali se mehanizmi njihove aktivacije međusobno delimično preklapaju. Visoke koncentracije sva tri biomarkera zabeležene su nakon AIM; u većini studija povezani su sa lošijim ishodom AIM (6-8).

STEMI bolesnici u ovoj studiji imali su više koncentracije PTX3 od zdravih osoba, što je u skladu sa rezultatima Helseth i sar. (9), Tomadlove i sar. (3), Peri i sar. (10). SAP bolesnici su takođe imali više vrednosti PTX3 u odnosu na zdrave osobe, što je u skladu sa rezultatima studija Karakas i sar. (11), i Soeki i sar. (12). U više studija je pokazano da su visoke vrednosti PTX3 kod STEMI bolesnika povezane sa lošijom prognozom kao i da povišen PTX3 nosi rizik za veći mortalitet (3,13), ali do sada nisu poznati tačni mehanizmi učešća PTX3 u razvoju AIM i KVB (9). Veći broj studija izneo je dokaze koji idu u prilog kardioprotektivnoj ulozi ovog markera (14,15), ali je pokazano i da PTX3 učestvuje u ishemijskom oštećenju tkiva posredstvom sistema komplementa (16), odnosno da može imati i patološku ulogu.

Mali broj studija do sada bavio se ispitivanjem vrednosti HB-EGF kod bolesnika sa AIM, u kojima su pokazane povećane vrednosti ovog markera nakon AIM (8,17). Ova studija je potvrdila da STEMI bolesnici imaju značajno više vrednosti HB-EGF od zdravih osoba, što se slaže sa studijama Ushikoshi i sar. (8), kao i Tanaka i sar. (17). Još uvek ne postoji konsenzus o tome da li povišena koncentracija HB-EGF nakon AIM, do koje dolazi usled prekomerne ekspresije ovog faktora rasta, povećava stabilnost plaka i tako štiti od KVB, kako smatraju Rattik i sar. (18), ili ima patološku ulogu koja pogoršava remodelovanje srca nakon AIM, prema studijama Ushikoshi i sar. (8), kao i Tanaka i sar. (17).

Dosadašnje studije su pokazale da je CyPA protein koji se produkuje i sekretuje kao odgovor na oksidativni stres i inflamatorne stimuluse (19), kao i da je eksprimiran u koronarnim plakovima bolesnika sa AIM (6,20). U ovom radu nije dobijena značajna razlika u koncentracijama CyPA između tri ispitivane grupe, što nije u skladu sa studijom Nigro i sar. koji su pokazali da je koncentracija CyPA kod bolesnika sa AIM i NSAP značajno veća nego kod SAP i kontrola (20).

Brojne studije su pokazale povećanje koncentracije hsCRP kod bolesnika sa AIM, kao i to da je povišena vrednost hsCRP tokom AIM odgovorna za oštećenje miokarda posredstvom sistema komplementa (21,22). STEMI i SAP bolesnici u ovoj studiji imali su značajno više koncentracije hsCRP u odnosu na kontrolnu grupu, što je u skladu sa studijama Nijmeijer i Badimon (21,22).

Poznato je da cirkulacija sadrži različite antioksidanse, a da proteini predstavljaju glavnu antioksidativnu komponentu čije su slobodne SH-grupe velikim delom odgovorne za antioksidativni kapacitet. Ispitivanje antioksidativnog statusa kod ispitanika uključenih u ovu studiju pokazalo je da dolazi do značajnog pada u sadržaja SH-grupa nakon STEMI događaja u odnosu na zdrave ispitanike, što je u skladu sa rezultatima Tanriverdi i sar. (23) i Kotur-Stevuljević i sar. (24), pošto SH-grupe svoj antioksidativni potencijal ispoljavaju tako što učestvuju u formiranju disulfidnih veza, a same se oksiduju i ukupan sadržaj im se snižava (25). Pogoršanje antioksidativnog kapaciteta kod STEMI bolesnika u ovom radu dodatno je potvrđeno smanjenjem TAS kao mere ukupnog antioksidativnog kapaciteta u odnosu na zdrave osobe, što je u skladu sa rezultatima studija LoPresti i sar. (26) i Surekha i sar. (27). Aktivnost antioksidativnog enzima SOD bila je povišena kod STEMI bolesnika u poređenju sa zdravim ispitanicima i u skladu je sa rezultatima Lavall i sar. (28) i Dulce Bagatini i sar. (29).

Vrednosti PAB kao markera oksidativnog stresa kod STEMI bolesnika bile su više nego kod od zdravih osoba, što je u skladu sa rezultatima Alamdari i sar (30) i Ghayour-Mobarhan i sar. (31), dok je sadržaj AOPP bio snižen kod STEMI bolesnika u poređenju sa ispitanicima iz kontrolne grupe. Kako AOPP nastaju tokom oksidativnog stresa reakcijom tiol grupa cirkulišućih proteina sa oksidansima, a albumin je najzastupljeniji protein u humanoj krvi ali i negativan reaktant akutne faze koji opada tokom STEMI (32), očekivano je smanjenje sinteze AOPP kod STEMI bolesnika što može biti pokazatelj težine akutne faze.

U skladu sa IFCC preporukama (2) definisani su opsezi referentnih vrednosti PTX3, CyPA i HB-EGF u zdravoj populaciji, pri čemu su referentne vrednosti za HB-EGF definisane posebno za muškarce i žene, dok su za PTX3 i CyPA definisane za celu populaciju. Vrednosti HB-EGF i CyPA kod bolesnika sa STEMI pokazuju delimično preklapanje sa vrednostima ovih parametara kod zdravih osoba, što znači da HB-EGF i CyPA nisu najbolji parametri za dijagnostikovanje STEMI. Nasuprot ovome, PTX3 se pokazao kao veoma dobar dijagnostički parametar za detekciju STEMI, jer STEMI bolesnici u ovom radu nisu imali vrednosti PTX3 koje pripadaju referentnom intervalu.

Rezultati korelacione analize kod zdravih osoba pokazali su postojanje značajne pozitivne povezanosti hsCRP sa BMI, što je u skladu sa rezultatima Ogawa i sar. (33), i negativne korelacija između PTX3 i BMI koja je u skladu sa rezultatima Knoflach i sar. u Bruneck studiji (34). Pokazano je i da dolazi do smanjenja vrednosti HB-EGF sa porastom starosne dobi zdravih ispitanika, što je u skladu sa studijom Nakata i sar. (35), a u skladu sa tim dobijena je značajna negativna korelacija HB-EGF sa starošću ispitanika.

Kod STEMI bolesnika povećanje koncentracije PTX3 praćeno je povećanjem vrednosti HB-EGF. PTX3 pozitivno korelira sa HB-EGF u grupi bolesnika, ali negativno sa CyPA, a smatra se da se veza između PTX3 i CyPA ostvaruje preko proinflatornog

puta posredovanog nukleusnim faktorom NF-kB (36). Nije nađena korelacija između vrednosti PTX3 i hsCRP nakon STEMI, što je u skladu sa rezultatima Peri i sar. a može se tumačiti različitim vremenom poluživota ova dva pentraksina (10). Nađena je negativna korelacija između PTX3 i SH-grupa kao parametra antioksidantne zaštite.

Na osnovu rezultata uočeno je postojanje veze između pojačanog oksidativnog stresa, povišenih koncentracija glukoze i visokih vrednosti PTX3. Studija Akgul i sar. (7) pokazala je da visoke vrednosti PTX3 ukazuju i na veću verovatnoću lošijeg ishoda, posebno i zbog pojačanog oksidativnog stresa i visokih vrednosti glukoze.

I pored svih prednosti koje pPCI ima za bolesnike sa STEMI, poznato je da se često javlja ishemijsko-reperfuziona povreda izazvana oksidativnim stresom odnosno prekomernim stvaranjem ROS usled prekida perfuzije miokarda. Kod bolesnika sa STEMI-KAB nakon izvođenja pPCI, vrednosti PTX3 u ovoj studiji bile su niže nego pre intervencije, dok su koncentracije CyPA i HB-EGF bile više. Smatra se da smanjenje koncentracije PTX3 nakon izvođenja pPCI može ukazivati na zaštitnu ulogu PTX3 koji, prema studiji Salio i sar., učestvuje u ublažavanju posledica oštećenja krvnog suda, i odbrani od oštećenja koja izaziva reperfuzija (37).

#### ***Literatura:***

1. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
2. Solberg HE. The IFCC recommendattion on estimationon reference intervals. The RefVal Program. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(7):710-714.
3. Tomandlova M, Jarkovsky J, Tomandl J, et al. Prognostic value of pentraxin-3 level in patients with STEMI and its relationship with heart failure and markers of oxidative stress. *Disease Markers* 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/159051>
4. Benedek T, Maurovich-Horvath P, Ferdinandy P, Merkely B. The use of biomarkers for the early detection of vulnerable patients. A review. *J Cardiovasc Emerg* 2016;2(3):106-113. doi:10.1515/jce-2016-0017
5. Satoh K, Shimokawa H. High-sensitivity C-reactive protein: still need for next-generation biomarkers for remote future cardiovascular events. *Eur Heart J* 2014;35(27):1776–1778. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu115>
6. Seizer P, Ochmann C, Schönberger T, et al. Disrupting the EMMPRIN (CD147)-cyclophilin A interaction reduces infarct size and preserves systolic function after myocardial ischemia and reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1377-1386.
7. Akgul O, Baycan OF, Bulut U, et al. Long-term prognostic value of elevated pentraxin 3 in patients undergoing primary angioplasty for ST-elevation myocardial infarction. *Cor Art Dis* 2015;26(7):592-597.
8. Ushikoshi H, Takahashi T, Chen X, et al. Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodelling following myocardial infarction by activating noncardiomyocytes. *Lab Invest* 2005;85:862-873. doi:10.1038/labinvest.3700282



9. Helseth R, Solheim S, Opstad T, et al. The time profile of pentraxin 3 in patients with acute ST-elevation myocardial infarction and stable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Med Inflamm* 2014. doi:10.1155/2014/608414
10. Peri G, Inrona M, Corradi D, et al. PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circ* 2000;102:636-641. doi:10.1371/journal.pone.003147
11. Karakas MF, Buyukkaya E, Kurt M, Motor S, et al. Serum Pentraxin 3 Levels Are Associated With the Complexity and Severity of Coronary Artery Disease in Patients With Stable Angina Pectoris. *J Invest Med* 2013;61:278-285. doi:10.2310/JIM.0b013e31827c2971
12. Soeki T, Niki T, Kusunose K, et al. Elevated concentrations of pentraxin 3 are associated with coronary plaque vulnerability. *J Cardiol* 2011;58:151-157.
13. Hudzik B, Danikiewicz A, Szkodzinski J, et al. Pentraxin-3 concentrations in stable coronary artery disease depend on the clinical presentation. *Eur Cytokine Netw* 2014;25(3):41-45. doi: 10.1684/ecn.2014.0354
14. Takashi Y, Koga M, Matsuzawa Y, et al. Circulating pentraxin 3 is positively associated with chronic hyperglycemia but negatively associated with plasma aldosterone concentration. *PloS ONE* 2018;13(5):e0196526. doi:10.1371/journal.pone.0196526
15. Garlanda C, Maina V, Cotena A, Moalli F. The soluble pattern recognition receptor pentraxin-3 in innate immunity, inflammation and fertility. *J Rep Immunol* 2009; 83:128-133. doi:10.1016/j.jri.2009.05.006
16. Lidani KC, Beltrame MH, Luz PR, et al. Is pentraxin 3 a cardiovascular marker in patients with chronic Chagas disease? *Int J Card* 2015;190:233-235.
17. Tanaka N, Masamura K, Yoshida M, et al. A role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in cardiac remodelling after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Comm*2002;297(2):375-381.
18. Rattik S, Wigren M, Björkbacka H, et al. High plasma levels of heparin-binding epidermal growth factor are associated with a more stable plaque phenotype and reduced incidence of coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:222-228. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304369
19. Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, et al. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2006;98:811–817.
20. Nigro P, Pompilio G, Campogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* 2013;4:e888. doi: 10.1038/cddis.2013.410
21. Nijmeijer R, Lagrand WK, Lubbers YT, et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Path* 2003;163(1):269-275.
22. Badimon L, Peña E, Arderiu G, et al. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis. *Front Immunol* 2018;9:430. doi: 10.3389/fimmu.2018.00430
23. Tanriverdi F, Kavakh H, Celik G, et al. Evaluation of serum thiol levels in patients with non ST elevation acute coronary syndrome. *J Exp Clin Med* 2013;30:295-299.
24. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, et al. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atheroscl* 2015;241:192-198.

25. Kundi H, Erel Ö, Balun A, et al. Association of Thiol/Disulphide Ratio with Syntax score in Patients with NSTEMI. *Scand Cardiovasc J* 2015. doi: 10.3109/14017431.2015.1013153
26. LoPresti R, Catania A, D'Amico T, et al. Oxidative stress in young subjects with acute myocardial infarction: Evaluation at the initial stage and after 12 months. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14(4):421-427.
27. Surekha R, Srikanth B, Jharna P, et al. Oxidative stress and total antioxidant status in myocardial infarction. *Singapore Med J* 2007;48(2):137-142.
28. Lavall MC, Bonfanti G, et al. Oxidative profile of patients with ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *Clin Lab* 2016;62(5):971-973.
29. Dulce Bagatini M, Curry Martins C, Battisti V. et al. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels* 2011;26:55–63. doi:10.1007/s00380-010-0029-9
30. Alamdari D, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, et al. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:375-380.
31. Ghayour-Mobarhan M, Alamdari D, Moohebat M, et al. Determination of Prooxidant–Antioxidant Balance After Acute Coronary Syndrome Using a Rapid Assay: A Pilot Study. *Angiology* 2009;60(6):657-662. doi:10.1177/0003319709333868
32. Sitar ME, Aydin S, Çataky U. Human Serum Albumin and Its Relation with Oxidative Stress. *Clin Lab* 2013;59(9-10):945-952. doi: 10.7754/Clin.Lab.2012.121115
33. Ogawa T, Kawano Y, Imamura T, et al. Reciprocal contribution of pentraxin 3 and C-reactive protein to obesity and metabolic syndrome. *Obesity* 2010;18:1871-1874. doi: 10.1038/oby.2009.507
34. Knoflach M, Kiechl S, Mantovani A, et al. Pentraxin as a marker of advanced atherosclerosis. Results from Bruneck, ARMY and ARFY studies. *PLoS ONE* 2012;7(2):e31474. doi:10.1371/journal.pone.0031474
35. Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, et al. Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circ* 1996;94(11):2778-2786.
36. Kumar A, Takada Y, Borick A, Aggarwal B. Nuclear factor-κB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82:434-448. doi: 10.1007/s00109-004-0555-y
37. Salio M, Chimenti S, De Angelis N, et al. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circ* 2008;117(8):1055-1064 doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.749234

#### **D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE TEZE**

Epidemiološki podaci govore da su KVB vodeći uzrok smrtnosti u većini razvijenih zemalja i zemalja u razvoju i da su odgovorne za oko polovinu svih smrtnih ishoda godišnje, a prema podacima Instituta za javno zdravlje „Milan Jovanović Batut“, u Srbiji su je taj procenat i nešto veći. Laboratorijska dijagnostika u KVB ima veliki značaj,

ali upotreba različitih i nedovoljno specifičnih biomarkera može u kliničkoj praksi da oteža postavljanje pravovremene dijagnoze što predstavlja gubitak dragocenog vremena za bolesnika, uz neefikasno trošenje materijalnih resursa. Rana dijagnostika STEMI, uz kliničke parametre, zahteva pouzdan test visoke specifičnosti i osetljivosti. Zbog toga se već dugo traga za novim i specifičnim biomarkerima koji bi bili od pomoći u postavljanju dijagnoze kao i predviđanju ishoda kardiovaskularnih događaja.

Analizom i evaluacijom novih inflamatornih biomarkera uz standardne parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, metaboličke i lipidne biomarkere kod bolesnika sa STEMI, SAP i zdravih osoba u ovoj studiji, dat je uporedni prikaz ispitivanih parametara u sve tri grupe ispitanika. Pokazano je da su inflamatorni biomarkeri PTX3 i HB-EGF povišeni kod bolesnika sa STEMI i da se značajno menjaju posle pPCI u odnosu na vrednosti pre procedure. Rezultati ovog rada ukazali su i na postojanje veze između pojačanog oksidativnog stresa, povišenih koncentracija glukoze i visokih vrednosti PTX3. Dobijeni rezultati dali su nove podatke o inflamatornom odgovoru kod MINOCA bolesnika što može doprineti identifikaciji pacijenata sa ovim tipom AIM. Ukazano je na to da pri dijagnostikovanju bolesnika sa MINOCA, pored standardnih procedura, određivanje PTX3 može biti korisno. Ovaj rad bi mogao da posluži kao osnova za buduća istraživanja na većem broju ispitanika a sa ciljem da se razmotri uvođenje novih biomarkera ili kombinacije biomarkera koji bi se mogli koristiti za efikasniju diferencijalnu dijagnozu bolesnika sa značajnom okluzivnom KAB i MINOCA bolesnika. Ova doktorska teza predstavlja originalan naučni doprinos u proceni inflamatornog, antioksidativnog i oksidativnog statusa kod pacijenta sa STEMI pre izvođenja pPCI i odmah nakon završene intervencije, i daje nove informacije o patofiziološkim ulogama ispitivanih parametara kod STEMI bolesnika sa značajnom okluzivnom bolešću, kao i kod MINOCA bolesnika.

## **E. Objavljeni rezultati koji čine sastavni deo doktorske teze**

1. **Vuković-Dejanović V**, Bogavac-Stanojević N, Kotur Stevuljević J, Vukašinić A, Stefanović A, Kafedžić S, Zdravković M, Ilić I, Hinić S, Cerović M, Stefanović M, Spasojević-Kalimanovska V, Memon L, Nešković A. Circulating levels of inflammatory parameters pentraxin-3, cyclophilin and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 2020; 80 (1): 66-72, DOI: 10.1080/00365513.2019.1698058 (IF<sub>2019</sub> 1,42, rang časopisa M22 u kategorijama *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology-Clinical Biochemistry* i *Medicine miscellaneous*)
2. **Vuković-Dejanović V**, Kotur Stevuljević J, Vukasinić A, Miljković M, Kafedžić S, Zdravković M, Ilić I, Hinić S, Cerović M, Stefanović M, Spasojević-Kalimanovska V, Memon L, Nesković A, Bogavac-Stanojević N. Oxidative Stress and Inflammatory Markers PTX3, CypA, and HB-EGF: How Are They Linked in Patients With STEMI? *Angiology* 2020; 1-8, DOI: 10.1177/0003319720921724 (IF<sub>2019</sub> 2,38, rang časopisa M22 u kategoriji *Medicine-Cardiology and Cardiovascular Medicine*)

## **F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE**

Na osnovu svega što je izloženo u doktorkoj tezi smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Rezultati iz ove doktorske teze publikovani su u dva naučna rada u časopisima međunarodnog značaja (oba rada u časopisima kategorije M22). Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu prim. mr sci farm. Vesni Vuković-Dejanović javnu odbranu doktorske teze pod nazivom „**Ispitivanje markera inflamacije pentraksina 3, ciklofilina A i heparin-vezujućeg epidermalnog faktora rasta kod bolesnika sa akutnim infarktom miokarda sa ST elevacijom**”.

Beograd, 07.07.2020.

*Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:*

---

*dr Nataša Bogavac-Stanojević, redovni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet*

---

*dr Aleksandar N. Nešković, redovni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet*

---

***dr Marija Zdravković, docent***  
*Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet*

---

***dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor***  
*Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet*