

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 25.12.2014. godine, broj 4600/12, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Oksidativni stres i hemodinamski parametri kod bolesnika sa hroni nom sr anom insuficijencijom“

kandidata mr dr Dejana Simeunovi a, zaposlenog na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao aistenta na katedri za internu medicinu i u Klini kom Centru Srbije u Beogradu na klinici za kardiologiju. Mentor je Prof. dr Petar Seferovi , komentor je Prof. dr Milica Baj eti . Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Siniša Pavlovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Arsen Risti , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Jovan Peruni i , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Dejana Simeunovi a napisana je na 105 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 26 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na

srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

U **uvodu** je detaljno i jasno istaknut značaj srčane insuficijencije (SI) kod bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom, kao i činjenica da je ovaj sindrom osnovni element u postavljanju dijagnoze ovog oboljenja. Ukazano je na moguće faktore rizika za nastanak SI, uticaj genetske predispozicije, kao i uloga oksidativnog stresa kao jednog od potencijalnih uzroka ove bolesti. Prikazane su epidemiološke karakteristike SI i posebno je naznačeno da je incidencija u porastu, što je rezultat pada stope smrtnosti od akutnih srčanih epizoda, poboljšanja prognoze svih hroničnih kardiovaskularnih oboljenja kao i povećanja broja starijeg stanovništva u društvu. Opisana je simptomatologija ove bolesti, kao i moderna klasifikacija i dijagnostika koja podrazumeva korišćenje savremenih dijagnostičkih metoda kao što su elektrokardiografija, radiografija, ehokardiografija, ergospirometrija i kateterizacija srca. Poseban osvrt je dat na ulogu oksidativnog stresa u patogenezi hronične srčane insuficijencije (HSI) i u progresiji ove bolesti. Takođe, pokazano je da kod bolesnika sa HSI tokom fizičkog opterećenja dolazi do promena enzimskih i neenzimskih parametara antioksidacione zaštite i nivoa kateholamina. Istovremeno, pokazano je da tokom fizičkog opterećenja, dolazi i do značajnih promena u vrednostima hemodinamskih parametara, kao što su plućni kapilarni pritisak, pritisak u plućnoj arteriji, desnoj pretkomori i komori. Istaknuto je da ovakve promene parametara oksidativne zaštite, nivoa kateholamina i hemodinamskih parametara, pre i nakon testa fizičkog opterećenja, su klinički veoma važni jer mogu da odrede težinu oboljenja i dugotrajnu prognozu bolesnika sa HSI. Dat je i dosadašnji pregled literature koji nedvosmisleno ukazuje da oksidativni stres učestvuje u patogenezi HSI, i da slobodni kiseonici i radikali stvoreni u srčanoj insuficijenciji uzrokuju oštećenja kardiomiocita.

Ciljevi rada su precizno i jasno definisani. Sastoje se u utvrđivanju promena u aktivnosti enzimskih i neenzimskih parametara antioksidativne zaštite u eritrocitima i plazmi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom pre i nakon testa fizičkog opterećenja, zatim u utvrđivanju promena u aktivnosti kateholamina u plazmi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom pre i nakon testa fizičkog opterećenja. Takođe, sledeći cilj rada je bio da se ustanovi korelacija između pomenutih promena u aktivnosti parametara antioksidacione zaštite i nivoa kateholamina kod bolesnika sa

dilatativnom kardiomiopatijom pre i nakon testa fizi kim optere enjem. Na kraju, kao cilj je postavljeno da se utvrdi korelacija izmedju klini kih, elektrokardiografskih, ehokardiografskih, hemodinamskih parametara i aktivnosti parametara antioksidativne zaštite bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom pre i nakon testa fizi kim optere enjem.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je klini ka studija uklju ivala 82 bolesnika sa primarnom dilatativnom kardiomiopatijom i kontrolnu grupu koju je inilo 45 zdravih ispitanika. Bolesnici su regrutovani uzastopno, tokom ambulantnih pregleda na Odeljenju za sr anu slabost Klinike za kardiologiju Klini kog Centra Srbije. Svim bolesnicima uklju enim u studiju prethodno je postavljena dijagnoza primarne dilatativne kardiomiopatije na osnovu klini ke slike, ehokardiografskog nalaza i nalaza normalnog angiograma na koronarografiji. U Poliklinici KCS bolesnicima je radjena dvodimenzionalna doppler ehokardiografija kojom su izmereni end-sistolni i end-dijastolni dijametri leve komore i njena ejectiona frakcija. Takodje, svim bolesnicima je pre uklju enja u studiju u Poliklinici KCS u sali za kateterizacije srca uradjena selektivna koronarografija sa levom i desnom kateterizacijom srca, a hemodinamski parametri mereni su standardnom metodom pomo u Swan-Ganz katetera. Na taj na in odredjene su vrednosti plu nog kapilarnog pritiska, pritiska u plu noj arteriji, pritiska u desnoj pretkomori i komori. Pošto je utvrdjeno da ispunjavaju kriterijume za uklju ivanje u studiju, bolesnicima je u Poliklinici KCS, u kabinetu za ergospiometriju, radjen test fizi kim optere enjem na ergobiciklu po standardnom protokolu za bolesnike sa DCM. Uzorci iz krvi uzimani su bolesnicima u leže em položaju, pre po etka i nakon maksimalnog kardiopulmonalog testa. Iz izdvojenih opranih eritrocita odre ivane su enzimske komponente: superoksid dismutaza (SOD) (po metodi *McCord i Fridovich*), katalaza (CAT) (po m. *Beutlera*), glutathion reduktaza (GR)(po m. *Glatzle*), glutathion (GSH) i glutathion peroksidaza (GSH-Px) (po m. *Paglia i Valentine*). U izdvojenoj plazmi odre ivane su neenzimske komponente: vitamin C (po m. *Okamure*) i mokra na kiselina (po m. *Fossati i sar.*). U serumu su odre ene koncentracija glukoze (po m. *Barham iTrinder*) i ukupnog (po m. *Malloy-Evelyn*) i direktnog bilirubina (metoda diazo sa sulfanilnom kiselinom)-neenzimskih komponenti sistema antioksidacione zaštite. Rezultati parametara oksidativnog stresa su obradjeni u laboratoriji Instituta za farmakologiju, klini ku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 190 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da su vrednosti sledećih enzimskih parametara oksidativnog stresa: **superoksid dismutaza**, **glutation reduktaza**, **glutation peroksidaza** bile statistički značajno veće kod bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom u odnosu na ispitivanu kontrolnu grupu zdravih volontera kako pre tako i nakon testa fizičkog opterećenja. Jedino su vrednosti **katalaze** više porasle nakon testa fizičkog opterećenja u grupi zdravih nego u grupi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom. Takođe, dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima ne-enzimskog parametra oksidativnog stresa **vitamina C** između ispitivanih grupa pre i posle testa fizičkog opterećenja. Prosečne vrednosti vitamina C su bile niže u grupi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom nego u grupi zdravih ispitanika pre i nakon testa fizičkog opterećenja, ali nema veštih promena prosečnih vrednosti vitamina C nakon testa fizičkog opterećenja ni u jednoj od ispitivanih grupa. Što se tiče ispitivanih kateholamina, prosečne vrednosti **adrenalina** pre testa su bile slične u grupi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom i u grupi zdravih. Dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima adrenalina posle testa i u grupi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom i u grupi zdravih ispitanika. Što se tiče **noradrenalina** vrednosti pre merenja su bile slične u grupi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom i u grupi zdravih. Nakon testa izmerene su veće vrednosti noradrenalina u obe ispitivane grupe. Takođe, dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima **dopamina** pre i posle testa i u grupi bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom i u grupi zdravih.

Što se ti e klini kih parametara koji su poredjeni sa parametrima oksidativnog stresa studentovim t-testom dobijena je visoko statisti ki zna ajna razlika u vrednostima superoksid dismutaza koja je bila je ve a u grupi bolesnika koji su imali **komorske ekstrasistole** u odnosu na bolesnike koji nisu imali komorske ekstrasistole. Kod bolesnika koji su imali **otežano disanje i gušenje** nadjene su niže vrednosti superoksid dismutaze i glutacion peroksidaze, a povišene vrednosti katalaze u odnosu na bolesnike koji nisu imali pomenute tegobe. Takodje, kod bolesnika sa **preležanim miokarditisom** nadjene su niže vrednosti katalaze i povišene vrednosti adrenalina u odnosu na bolesnike koji nisu preležali miokarditis. Kod bolesnika koji su imali **ascites** nadjene su niže vrednosti nordrenalina u odnosu na bolesnike koji nisu imali ascites. Bolesnici sa patološkim nalazom **glikemije u krvi** imali su niže vrednosti dopamina u odnosu na bolesnike koji su imali normalnu glikemiju u krvi. Takodje, bolesnici sa **uve anom dimenzijom leve pretkomore** imali su ve e vrednosti adrenalina u odnosu na bolesnmike sa normalnom dimenzijom leve pretkomore. Bolesnici koji su imali **ejekcionu frakciju leve komore** manju od 30% imali su povišene vrednosti glutacion reduktaze u odnosu na bolesnike sa ejakcionom frakcijom leve komore ve om od 40%. Što se ti e hemodinamskih parametara koji su poredjeni sa enzimskim i neenzimskim parametrima oksidativnog stresa kao i sa vrednostima kateholamina, jednofaktorskom analizom varijanse nije dobijena statisti ki zna ajna razlika ni u jednom od ispitivanih obeležja.

Navedeni podaci mogu biti od klini kog zna aja u smislu koriš enja navedenih parametara oksidativnog stresa i kateholamina u proceni težine oboljenja i dugotrajne prognoze bolesnika sa hroni nom sr anom insuficijencijom.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prisustvo slobodnih radikala (SR) u biološkom materijalu otkriveno je još 1950 godine, a kasnija hipoteza Denhama Harmana bila je da kiseoni ni radikali verovatno nastaju kao sporedni produkti u enzimski kontrolisanim reakcijama i nazvao ih "Pandorinom kutijom zla" smatraju i da su odgovorni za velika elijska ošte enje, mutagenezu, degenerativne procese, ak i razvoj karcinoma razli itih organa. Unazad više decenija zapo elo se sa prou avanjem uloge slobodnih radikala kao

finalnih medijatora oštećenja elijske morfologije i funkcije, brojnih patofizioloških zbivanja, kao i starenja organizma (Paglia DE i sar. 1967, Misra HIF i sar 1972, Okamura M i sar. 1980). Upravo ta narušena ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i antioksidantnih odbrambenih mehanizama se definiše kao oksidativni stres. Kiseoni ni slobodni radikali i reaktivne kiseoni ne vrste se u biološkim tkivima formiraju putem velikog broja specifičnih molekularnih i elijskih mehanizama a dalje se transformišu iz jednog oblika u drugi putem antioksidantnih enzima. Neuspeh u eliminisanju ovih aktivnih vrsta dovodi do oštećenja elija. U toku evolucije aerobni organizmi su razvili enzimski i ne-enzimski antioksidantni sistem, kao i mehanizme za popravku oksidativno oštećenih makromolekula (Gopal DM i sar. 2001, Korantzopoulos P i sar. 2003).

Progresija hronične srčane insuficijencije (HSI) je kompleksan proces u kome se remodelovanje miokarda smatra najvažnijom determinantom u tom procesu a pretpostavlja se da slobodni radikali preko direktnog štetnog efekta na metabolizam miocita i /ili na ekstracelularni matriks i aktivnost fibroblasta, učestvuju u patogenezi remodelovanja (Kono Y i sar. 2006). S druge strane uz miokardni odgovor u HSI, remodelovanje krvnih sudova, odnosno endotelna disfunkcija, koja predhodi tom vidljivom remodelovanju, koje menjaju i regionalnu preraspodelu ionako nedovoljnog minutnog volumena koje je oslabljeno srce u stanju da obezbedi, predstavlja važnu odrednicu intolerancije na napor kod bolesnika sa HSI. Sve to zajedno podstiče hroničnu aktivaciju kompenzatornih, neurohumoralnih mehanizama (adrenergičku aktivaciju, aktivaciju renin-angiotenzin-aldosteronskog sistema-RAAS, endotelina, citokina) koji sada pored kompenzatornih efekata imaju i prooksidativne, kojim doprinose još veći produkciji slobodnih radikala. Povećana produkcija slobodnih radikala dalje pogoršava endotel zavisnu vazodilataciju, smanjenjem količine azot oksida. To može biti posledica smanjene sinteze ovog jedinjenja u endotelnim elijama ili smanjena antioksidativne aktivnosti ekstracelularnih enzima, superoksid dismutaze (SOD) i glutacion peroksidaze (GPX) koji svojim sinhronizovanim delovanjem, indirektno, sprečavaju prevođenje NO u toksične metabolite. Naime, kliničkim studijama je pokazano da se SOD takmiči sa NO za vezivanje sa superoksid anjonom. Tako narušena ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i antioksidantnih odbrambenih mehanizama dovodi do oksidativnog stresa (Agarwal AK i sar., Wijeyesundera HC i sar. 2003).

Superoksid dismutaza je prvi u kaskadi antioksidantnih enzima i zajedno sa glutacion peroksidazom i katalazom čini prvu liniju odbrane u estvuju i u eliminaciji primarnih proizvoda parcijalne redukcije molekularnog kiseonika. Superoksid dismutaza prevodi superoksid anjon u

vodonik peroksid, dok se vodonik peroksid kataliti kom aktivnoš u glutation peroksidaze ili katalaze redukuje u vodu. S obzirom da superoksid dizmutaza redukuje superoksid anjon u vodonik peroksid, koji može biti preveden u toksi ni hidrosil radikal, neophodno je da superoksid dizmutaza, s jedne strane i glutation peroksidaza ili katalaza, s druge strane deluju sinhronizovano. U slu aju da je pove ana aktivnost superoksid dizmutaze u odnosu na aktivnost glutation peroksidaze i/ili katalaze dolazi do nagomilavanja vodonik peroksida. Posledica smanjene aktivnost superoksid dizmutaze u odnosu na aktivnost glutation peroksidaze i/ili katalaze je nagomilavanje superoksid anjona. Ova smanjena aktivnost superoksid dizmutaze pokazana je i u rezultatima naše studije što je u jasnoj komparaciji sa rezultatima iz literature. Ina e, svaki poreme aj ravnoteže izmedju ovih antioksidantnih enzima je opasan i nepoželjan (Castro PF i sar.2003, Sam F i sar. 2013), Aktivnost enzimskih komponenti antioksidantnog kapaciteta kod bolesnika sa hroni nom sr anom insuficijencijom je do sada vema retko odre ivan a sti e se utisak da je zna aj enzimske antioksidativne zaštite od neprocenjivog zna aja za o uvanje endotelne funkcije i prognozu bolesnika sa sr anom insuficijencijom.

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

Dejan Simeunovic, Petar M. Seferovic, Arsen D. Ristic, Dejan Nikolic, Dijana Risimic, Jelena Seferovic, Ruzica Maksimovic, Ivana Nedeljkovic, Radmila Karan, Milica Bajcetic. Evaluation of oxidative stress markers and catecholamines changes in patients with dilated cardiomyopathy before and after cardiopulmonary exercise tests. (rad je prihva en za publikovanje dana 07.01.2015 u **Hellenic J Cardiol**).

E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „ **Oksidativni stres i hemodinamski parametri kod bolesnika sa hroni nom sr anom insuficijencijom**“ dr Dejana Simeunovi a predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju mehanizama koji u estvuju u patogenezi hroni ne sr ane insuficijencije. Ovim istraživanjem pokazano je da promene parametara oksidativne zaštite,

nivoa kateholamina i hemodinamskih parametara, pre i nakon testa fizi kim optere enjem, su klini ki veoma važni jer mogu da odrede težinu oboljenja i dugotrajnu prognozu bolesnika sa hroni nom sr anom insuficijencijom.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Dejana Simeunovi a i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 04.03.2015.

lanovi Komisije:

Prof. dr Siniša Pavlovi

Doc. dr Arsen Risti

Prof. dr Jovan Peruni i

Mentor:

Prof. dr Petar Seferovi

Komentor:

Prof. dr Milica Baj eti
