

NAU NOM VE U MEDICINSKG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 04.07.2017. godine, broj 5940/11, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj nivoa cirkulišu eg serumskog vaskularnog endotelnog faktora rasta i stepena angiogeneze aspiriranog tromba na angiografski i klini ki ishod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta le enih primarnom perkutanom koronarnom intervencijom“

kandidata dr Jelene Rako evi , zaposlene na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar .Kosti “ Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je doc. dr Milica Labudovi Borovi , komentor je doc. dr Dejan Orli .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vladimir Bumbaširevi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Emeritus prof. dr Miodrag Ostoji , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Branko Beleslin, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. VNS dr Snežana Koji , Institut za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Miloje Tomaševi , profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Rako evi napisana je na ukupno 140 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 49 tabela, 15 grafikona i 14 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** je definisan akutni infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta (STEMI), koji su savremeni modaliteti le enja STEMI pacijenata, kao i zna aj aspiracije koronarnog tromba

tokom primarne perkutane koronarne intervencije (PCI) uz osvrt na važeće preporuke za dijagnostikovanje i lečenje STEMI. Detaljno su prikazana dosadašnja patohistološka istraživanja aspiriranog koronarnog tromba kod STEMI pacijenata različitim dostupnim metodama (svetlosnom mikroskopijom, imunohistochemijskom analizom i elektronskom mikroskopijom).

Dat je detaljan opis najčešće korišćenih markera vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija, uz prikaz dosadašnjih saznanja o procesu angiogeneze u aspiriranom koronarnom trombu STEMI pacijenata.

Tako su definisane struktura i funkcija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i njegovih receptora (VEGFR), uz prikaz dosadašnjih ispitivanja uloge ovog faktora rasta u ishemiji miokarda i mogućem prognostikom značaju VEGF-a kod pacijenata sa koronarnom bolešću u srca.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od određivanja vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a, stepena angiogeneze aspiriranog koronarnog tromba i ispitivanja njihove povezanosti sa angiografskim i elektrokardiografskim znacima perfuzije miokarda, kao i sa kliničkim ishodima STEMI pacijenata.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj, opservacionoj studiji po tipu studije slučajeva, koja je vršena u tri centra: Klinici za kardiologiju Kliničkog centra Srbije, Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Detaljno su navedeni kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju i kriterijumi za isključivanje iz studije, prikupljeni podaci o ispitanicima, kao i način uključivanja pacijenata. Opisane su korišćene metode za analizu aspiriranog trombotičnog materijala (morfometrijska analiza, imunohistochemijska analiza i dvostruko imunofluorescentno bojenje) i metode merenja vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a. Precizno su definisani korišćeni angiografski i ehokardiografski parametri, kao i neželjeni kardiovaskularni događaji registrovani tokom šestomesečnog praćenja pacijenata. Ova studija je sprovedena u skladu sa preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima, i odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključivanja u studiju.

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 250 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Određivanje starosti aspiriranog koronarnog tromba kod STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI pokazalo je da je kod većine pacijenata aspirirani trombi bio histološki stariji od 24 h, dok je kod svih pacijenata vreme od pojave bola u grudima do primarne PCI iznosilo do 12 h. Registrovana je povezanost aspiriranih starijih trombova sa pojavom antecedentne angine, dok nije uočena povezanost starosti tromba sa pojavom angine pectoris 72 h pre STEMI prezentacije. Pacijenti sa aspiriranim starijim trombima imali su značajno duže ukupno ishemijsko vreme u odnosu na aspiraciju svežih trombova. Pokazalo se da se makroskopski izgled tromba (crveni i beli) ne odnosi na njihovu histološki procenjenu starost jer nije registrovana povezanost makroskopskog i mikroskopskog izgleda aspiriranog materijala.

Angiogeneza je bila prisutna u većini aspiriranih trombova STEMI pacijenata. Detektovane rane endotelne ćelije su najčešće bile u formi grupisanih CD34/CD31⁺ ćelija, ređe su bile prisutne kao pojedinačne ćelije, dok su najređe bile u formi kapilarnih petlji. CD34/CD31⁺ ćelije su značajno češće bile prisutne u aspiriranim trombima pacijenata sa prethodnom anginom pectoris, dok nije uočena povezanost prisustva angiogeneze tromba sa pojavom antecedentne angine. Analiza trajanja ukupnog ishemijskog vremena kod STEMI pacijenata pokazala je da ne postoji povezanost sa stepenom angiogeneze aspiriranog koronarnog tromba. Uočeno je da se stepen organizacije CD34/CD31⁺ ćelija povećavao sa starošću u tromba jer su svi organizovani trombi pokazivali znake angiogeneze, angiogeneza je registrovana kod 75% litičkih tromba, dok su sveži trombi imali prisutne rane endotelne ćelije u 50% slučajeva.

Registrovana je ko-ekspresija CD34/CD31 i D2-40, LYVE-1 i VEGFR3 molekula na ranim endotelnim ćelijama u trombotičnom tkivu. Ovo je prvi slučaj prisustva D2-40 imunoreaktivnosti na vaskularnim endotelnim ćelijama u netumorskim i nepatološkim uslovima. Prisustvo D2-40⁺ ćelija u trombotičnom materijalu se povećavalo sa starošću u

tromba, dok je organizaciju CD34/CD31⁺ elija u tromboti nom materijalu pratila organizacija D2-40⁺ elija.

Merenje vrednosti cirkulišu eg serumskog VEGF-a pokazalo je da su pacijenti sa ve im vrednostima VEGF-a imali duže ishemijsko vreme u odnosu na pacijente sa manjim vrednostima ovog angiogenog molekula. Uo ena je povezanost ve ih vrednosti serumskog VEGF-a sa aspiracijom organizovanih trombova u odnosu na aspiraciju svežeg i liti kog tromboti nog materijala. Nalaz angiogeneze u aspiriranom trombu pratio je nalaz ve ih vrednosti cirkulišu eg serumskog VEGF-a kod STEMI pacijenata u pore enju sa pacijentima bez CD34/CD31⁺ elija u trombu.

Kod aspiracije svežeg tromba eš e je postojao optimalni epikardni TIMI 3 protok nakon aspiracije u odnosu na aspiriran stariji tromboti ni materijal. Kod pacijenata sa znacima angiogeneze u aspiriranom trombu zna ajno eš e je registrovana suboptimalna miokardna perfuzija (MBG 0/1) u odnosu na trombe bez prisustva CD34/CD31⁺ elija, dok pojava angiografski vidljive distalne embolizacije nije bila povezana sa staroš u tromba i prisustvom angiogeneze u aspiriranom trombu.

Angiografske karakteristike pacijenata (infarktna arterija, prisustvo višesudovne bolesti, vrednost TIMI protoka, Rentrop razvijenost kolaterala, vrednost MBG i pojava angiografski vidljive distalne embolizacije) nisu se zna ajno razlikovale u odnosu na izmerene vrednosti cirkulišu eg serumskog VEGF-a. Uo ena je tendencija ka korelaciji izme u nižih vrednosti serumskog VEGF-a i ve ih vrednosti bazalnog SYNTAX skora. Nije uo ena povezanost izme u pristustva angiogeneze u trombu i stepena rezolucije ST-segmenta na elektrokardiogramu. Maksimalno oslobo ene vrednosti kardiospecifi nih enzima (CK, troponin I) nisu pokazivale povezanost sa makroskopskom bojom tromba, histološkom staroš u tromba, prisustvom angiogeneze i stepenom organizacije CD34/CD31⁺ elija, kao ni sa vrednostima cirkulišu eg serumskog VEGF-a.

Promene u vrednostima ehokardiografskih parametara (EDVI, ESVI, LVEF, WMSI), kao i pojava remodelovanja leve komore tokom perioda pra enja nisu se zna ajno razlikovale prema starosti aspiriranog tromba, kao ni prema prisustvu angiogeneze u aspiriranom materijalu. Postojala je tendencija ka boljem oporavku LVEF kod pacijenata sa pojedina nim ranim endotelnim elijama u aspiriranom trombu u odnosu na grupisane i kapilarne petlje CD34/CD31⁺ elija, dok se ostali ehokardiografski parametri (promena EDVI, ESVI i WMSI) nisu zna ajno razlikovali prema stepenu organizacije angiogeneze. Vrednosti serumskog

VEGF-a nisu pokazivale korelaciju sa promenom u vrednostima ehokardiografskih parametara tokom perioda praenja pacijenata (EDVI, ESVI, LVEF i WMSI). Nije uo ena razlika u pojavi remodelovanja leve komore kod pacijenata sa ve im, odnosno nižim vrednostima serumskog VEGF-a.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Aspirirani tromb iz koronarne arterije STEMI pacijenata le enih primarnom PCI se pokazao kao odli an model za *in vivo* ispitivanje angiogeneze i patofizioloških mehanizama u osnovi koronarne tromboze. Iako su pacijenti uklju eni u ovo istraživanje imali bol u grudima koji je trajao do 12 sati, kod više od polovine pacijenata aspirirani tromb imao je histološke karakteristike tromba starijeg od jednog dana, uz heterogenost tromboti nog materijala i polja razli ite histološke starosti, što se slaže sa prethodnim istraživanjima (Rittersma i sar., 2005; Kramer i sar., 2008; Cambuzzi i sar., 2012; Carol i sar., 2014). Ovi rezultati podržavaju hipotezu o koronarnoj trombozi kao dinami nom doga aju, gde nakon inicijalne rupture plaka i subokluzije koronarne arterije može do i do tranzitorne okluzije, organizacije tromba i zarastanja plaka. Tako e, nalaz histološki starijeg tromba bio je povezan sa dužim ishemijskim vremenom, što potvr uje rezultate nekoliko prethodnih studija (Kramer i sar., 2008; Kramer i sar., 2009; Verouden i sar., 2011). injenica da ve ina STEMI populacije nema predinfarktnu anginu podržava klini ki „nemi“ neokluzivni tromboti ni doga aj pre prezentacije okluzivne tromboze. Tako, u grupi pacijenata obuhva enih ovom disertacijom nije registrovana povezanost starosti aspiriranog tromba sa pojavom predinfarktne angine, što se slaže sa rezultatima Rittersma i saradnika (2005).

Kod ve ine pacijenata detektovane su rane endotelne elije u aspiriranom koronarnom trombu, dok su Li i sar. (2012) ove elije detektovali kod skoro svih svojih pacijenata. Razlika u stopi detekcije se može objasniti razli itim na inom odabira pacijenata, jer su u ovu disertaciju uklju eni konsekutivni STEMI pacijenti, dok su Li i saradnici iz postoje e baze nasumi no izdvojili 120 uzoraka tromba, po 40 iz svake starosne kategorije (svež, liti ki i organizovani). Me utim, izme u ova dva istraživanja postoji slaganje nalaza ve eg stepena organizacije ranih endotelnih elija (grupisane i kapilarne petlje CD34/CD31⁺ elija) kod histološki starijih trombova.

Važan rezultat ove doktorske disertacije je ko-ekspresija CD34, CD31, D2-40, LYVE-1 i VEGFR3 molekula na ranim endotelnim elijama što predstavlja po prvi put zabeleženu ko-ekspresiju ovih molekula na membrani iste elije u netumorskom tkivu. Mogu e objašnjenje

nalaza ko-ekspresije dva markera vaskularnih endotelnih elija (CD34 i CD31) i tri markera limfati nih endotelnih elija (D2-40, LYVE-1 i VEGFR3) na ranim endotelnim elijama aspiriranog koronarnog tromba jeste rekapitulacija procesa rane embriogeneze kada nezrele endotelne elije mogu eksprimirati dvojni fenotip vaskularnog i limfati nog endotela (Oliver i sar., 2002; Kang i sar., 2010). Drugo objašnjenje podrazumeva proces adultne vaskulogeneze poreklom od endotelnih progenitorskih elija (Asahara i sar., 1997) ili vaskularnih progenitorskih elija (Ferreira i sar., 2007).

Uo eno je da starost aspiriranog tromba ne uti e na u estalost MBG 2/3 i TIMI 3 protoka nakon intervencije, kao i da starost tromba nije bila povezana sa pojavom MBG 2/3 na angiogramu, što je u skladu sa rezultatima publikovanih studija (Silvain i sar., 2011; Cambuzzzi i sar., 2012). Uo eno je da je prisustvo CD34/CD31⁺ elija u aspiriranom tromboti nom materijalu povezano sa lošijom perfuzijom miokarda nakon primarne PCI (MBG 0/1). Mogu e objašnjenje podrazumeva ponavljane epizode subokluzije krvnog suda, organizaciju tromba sa urastanjem endotelnih i glatkomiši nih elija uz intemitentno smanjenje protoka krvi koje progresivno ošte uje perfuziju miokarda, a da urastanje CD34/CD31⁺ elija predstavlja marker ošte enja mikrocirkulacije. U prilog tome govori nalaz povezanosti prisustva CD34/CD31⁺ elija u trombu sa postojanjem predinfarktne angine. Druga, inflamatorna hipoteza se uklapa u prethodno publikovane rezultate (Arakawa i sar., 2009, Yunoki i sar., 2012), gde bi novoformirani krvni sudovi u trombu mogli poslužiti u dopremanju novih inflamatornih elija u tkivo tromba, pove avaju i oksidativni stres u trombu i voditi organizaciji i rekanalizaciji tromba, ali i smanjenoj perfuziji miokarda.

Kod pacijenata nije uo ena povezanost distalne embolizacije sa staroš u tromba, prisustvom angiogeneze i stepenom organizacije ranih endotelnih elija u trombu, što se razlikuje od literaturnih podataka gde je registrovana eš a pojava distalne embolizacije kod pacijenata sa starijim trombom (Verouden i sar., 2011), odnosno kod pacijenata sa liti kim trombom (Kramer i sar., 2009). Razlike se mogu objasniti manjim brojem pacijenata i manjim brojem registrovanih distalnih embolizacija u ovoj doktorskoj disertaciji. Aspirirani trombi razli ite histološke starosti nisu se zna ajno razlikovali prema vrednosti maksimalno oslobo enih kardiospecifi nih enzima, što se slaže sa prethodnim rezultatima na zna ajno ve em broju pacijenata (Kramer i sar., 2008).

Postojala je tendencija ka boljem oporavku LVEF kod pacijenata sa pojedina nim ranim endotelnim elijama u aspiriranom trombu u odnosu na grupisane i kapilarne petlje

CD34/CD31⁺ elija, dok se ostali ehokardiografski parametri (EDVI, ESVI i WMSI) nisu značajno razlikovali prema stepenu organizacije angiogeneze. Pregledom dosadašnje literature nisu pronađena istraživanja o povezanosti navedenih parametara, ali je moguće da je stepen organizacije angiogeneze u trombu još jedan faktor koji oslikava trajanje ishemijske i utiče na oporavak STEMI pacijenata.

Elektrokardiografska i angiografska procena reperfuzije miokarda nije pokazala povezanost sa vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a, što ukazuje da VEGF kao pokazatelj angiogeneze verovatno nije podesan indikator postproceduralne reperfuzije STEMI pacijenata. S druge strane, Kucukardali i sar. (2008) su pokazali da kod pacijenata sa angiografski kritičnim lezijama postoje više vrednosti VEGF-a u odnosu na manje izraženu koronarnu bolest, što čini VEGF potencijalnim indikatorom revaskularizacije kod pacijenata sa koronarnom bolešću u srcu. Vrednosti maksimalno oslobođenih kardiospecifičnih enzima nisu pokazale korelaciju sa vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a, što podržavaju prethodna istraživanja (Kranz i sar., 2002; Korybalska i sar., 2011; Kim i sar., 2012).

Vrednosti cirkulišućeg VEGF-a nisu pokazivale korelaciju sa procentualnom promenom u vrednostima ehokardiografskih parametara tokom perioda praćenja pacijenata (EDVI, ESVI, LVEF, WMSI), ali je poznato da se u kompleksne procese ishemijske i angiogeneze uključuju i drugi angiogeni faktori koji utiču na dinamiku nakon akutnog infarkta miokarda, i koji bi istovremeno mogli da utiču na promene u ehokardiografskom statusu STEMI pacijenata (Tamura i sar., 1999; Lee i sar., 2000; Heeschen i sar., 2003; Lee i sar., 2004).

Dosadašnje studije koje su ispitivale uticaj vrednosti cirkulišućeg VEGF-a na kliničke ishode STEMI pacijenata dale su kontradiktorne rezultate (Heeschen i sar., 2003; Matsudaira i sar., 2012), ali je ograničen broj neželjenih srčanih i cerebralnih neželjenih događaja među pacijentima ove doktorske disertacije onemogućio dobijanje ovih zaključaka.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. *Jelena Kostic*, Dejan Orlic, Milica Labudovic Borovic, Branko Beleslin, Dejan Milasinovic, Milan Dobric, Milorad Tesic, Miodrag Ostojic. **Coronary thrombi neovascularization in patients with ST-elevation myocardial infarction – clinical and angiographic implications**. *Thrombosis Research* 2014;134(5):1038-45.
2. *Jelena Rakocevic*, Snezana Kojic, Dejan Orlic, Goran Stankovic, Miodrag Ostojic, Olga Petrovic, Ivan Zaletel, Nela Puskas, Vera Todorovic, Milica Labudovic Borovic.

Co-expression of vascular and lymphatic endothelial cell markers on early endothelial cells present in aspirated coronary thrombi from patients with ST-elevation myocardial infarction. *Experimental and Molecular Pathology* 2016;100(1):31-8.

3. *Jelena Rakocevic, Dejan Orlic, Olivera Mitrovic Ajtic, Miloje Tomasevic, Milan Dobric, Natasa Zlatic, Dejan Milasinovic, Goran Stankovic, Miodrag Ostojic, Milica Labudovic Borovic. Endothelial cell markers from clinician's perspective* (revijski rad). *Experimental and Molecular Pathology* 2017;102(2):303-13.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj nivoa cirkulišućeg serumskog vaskularnog endotelnog faktora rasta i stepena angiogeneze aspiriranog tromba na angiografski i klinički ishod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta le enih primarnom perkutanom koronarnom intervencijom“ dr Jelene Rakocević, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju procesa angiogeneze, kao i uticaja angiogeneze, starosti tromba i vrednosti VEGF-a na ishode pacijenata sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta (STEMI). Aspirirani trombotični materijal kod STEMI pacijenata le enih primarnom PCI se pokazao kao odličan model za *in vivo* ispitivanje razvojne morfologije angiogeneze i patofizioloških mehanizama u osnovi koronarne tromboze. Takođe, analiza trombotičnog materijala STEMI pacijenata omogućava ispitivanje korelacije između tromba i trajanja koronarne tromboze sa brojnim angiografskim, ehokardiografskim, elektrokardiografskim, laboratorijskim i kliničkim parametrima uspešnosti njihovog lečenja. Posebno treba naglasiti nalaz ko-ekspresije vaskularnih endotelnih markera (CD34 i CD31) i limfatičnih endotelnih markera (D2-40, LYVE-1 i VEGFR3) na ranim endotelnim elijama aspiriranog tromba, koji predstavlja po prvi put zabeleženu ko-ekspresiju ovih molekula na membrani iste elije u netumorskom tkivu. Ovaj rezultat otvara put za dalja istraživanja procesa angiogeneze kako na bazisnom, eksperimentalnom nivou, tako i translacijom u klinički orijentisana istraživanja.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući i zaključci.

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 Jelene Rako evi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 23.08.2017. godine

lanovi Komisije:

Prof. dr Vladimir Bumbaširevi

Prof. dr Miodrag Ostoji

Prof. dr Branko Beleslin

VNS dr Snežana Koji

Prof. dr Miloje Tomaševi

Mentor:

Doc. dr Milica Labudovi Borovi

Komentor:

Doc. Dr Dejan Orli
