

Naučno veće Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na sednici od 17.11.2011. godine donelo je odluku o imenovanju Komisije za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom: **"Značaj određivanja enzima MMP-9 u serumu dijabetičara kao ranog markera rupture ateromskog plaka u akutnom koronarnom sindromu "** kandidata Mr sci. med. dr Draška Gostiljca, zaposlenog u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS Beograd.

Mentor za izradu doktorske disertacije je Prof. Dr Predrag Đorđević.

Imenovana je Komisija u sastavu:

1. Prof. dr Srđan Popović, Medicinski fakultet Beograd
2. Prof. dr Jovan Peruničić, Medicinski fakultet Beograd
3. Prof. dr Vladimir Jakovljević, Medicinski fakultet Kragujevac

Članovi komisije su detaljno proučili priloženu doktorsku disertaciju, na osnovu čega podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći:

IZVEŠTAJ I PREDLOG

A. Prikaz sadržaja disertacije:

Doktorska disertacija **"Značaj određivanja enzima MMP-9 u serumu dijabetičara kao ranog markera rupture ateromskog plaka u akutnom koronarnom sindromu "**. Doktorska disertacija je napisana na 199 strana podeljenih u sedam poglavlja koji sadrže 7 shematskih prikaza, 1 prikaz slike, 34 tabelarna prikaza i 94 grafikona. Uvod je prezentiran na 34 strane, ciljevi rada sa hipotezom istraživanja prikazani su na 1 strani, metodologija rada prikazana je na 12 strana, rezultati rada prikazani su na 112 strana, a diskusija je izneta na 21 strani i izvedeno je 20 zaključaka prikazanih na 3 strane. Korišćena literatura se satojala od 262 navoda prikazanih na 16 strana.

U uvodnom delu predstavljeni su epidemiološki podaci koji ukazuju na trend povećanja broja dijabetičara u svetu i kod nas, odnosno na značaj kardiovaskularnih komplikacija kod dijabetičara, posebno ishemijske bolesti srca i ulogu akutnog koronarnog sindroma kao čestog neposrednog uzroka smrti dijabetičara. Dat je pregled faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih komplikacija u dijabetesu, zatim karakteristike koronarne bolesti u dijabetesu, od asimptomatskog oblika ishemije koja je česta kod dijabetičara, odnosno stabilne angine, do akutnog koronarnog sindroma sa detaljnijim opisom nestabilne angine pektoris i akutnog infarkta miokarda koji imaju istu patofiziološku osnovu, ali se razlikuju u kliničkom toku bolesti. Prikazani su

poznati patogenetski mehanizmi evolucije ateroskleroze koja je u dijabetesu prevremena, difuzna i progresivna, a uz to zahvata više koronarnih krvnih sudova u odnosu na nedijabetičare, kao i uticaj, značaj poznatih faktora rizika za razvoj ateroskleroze koronarnih arterija i nastanak nestabilnog aterosklerotskog plaka kao patofiziološkog supstrata akutnog koronarnog sindroma. Opisan je poremećaj regulacije matriksa, kao uzrok ruptуре ateromskog plaka i uloga proteolitičkih enzima koji kataliziraju degradaciju ekstracelularnog matriksa, predisponirajući rupturu plaka i nastanak tromba koji sužava ili zatvara lumen krvnog suda. Detaljno je opisana uloga enzima metaloproteinaze (MMP), posebno MMP-9, koji ima značajnu ulogu u razgradnji matriksa i nastanku ruptуре ateromskog plaka. Precizno je opisana struktura i regulacija aktivnosti MMP, njihiva klasifikacija i mogućnost inhibicije. Apostrofirano je značaj MMP-9, više ispitivan u "in vitro" uslovima, i koji je poznat kao komponenta seruma, gde se uobičajeno detektuje u malim koncentracijama. Kako je značaj određivanja enzima MMP-9 u serumu dijabetičara kao ranog markera ruptуре ateromskog plaka u akutnom koronarnom sindromu, posebno uloga u nastanku akutnog koronarnog sindroma nedovoljno poznata, to je predstavljalo polaznu osnovu za istraživanje. Ispitivanje promene vrednosti MMP-9 u serumu, kao i mogućnosti njihove promene pod uticajem novih lekova moglo bi da ima veliki značaj u primarnoj i sekundarnoj prevenciji koronarne srčane bolesti i posledičnog nastanka akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara.

Ciljevi istraživanja su bili da se ispita da li određivanje MMP-9 u serumu dijabetičara može biti siguran i rani marker stabilnosti, odnosno nestabilnosti i ruptуре ateromskih plakova, a time i nastajanja akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara; da se ispita uticaj dijabetesa i pratećih metaboličkih poremećaja na kretanje vrednosti MMP-9; da se ispita odnos MMP-9 i markera inflamacije, trombogeneze, homocisteina i oksidativnog stresa u nastajanju, stabilnosti i rupturi ateromskog plaka; kao i vreme pojave povećanih vrednosti i aktivnosti MMP-9 u serumu dijabetičara u odnosu na pojavu povećanih vrednosti markera nekroze miokarda.

U poglavlju koje se odnosi na metodologiju rada predstavljen je dizajn studije i kriterijumi koji se odnose na ispitanike koji su obuhvaćeni studijom. Jasno je definisano kako su formirane ispitivane grupe po osnovu postojanja i oblika akutnog koronarnog sindroma, odnosno po osnovu prisustva poremećaja glikoregulacije kao i način i kriterijumi formiranja kontrolne grupe. Dat je prikaz podataka iz lične i porodične anamneze ispitanika i detaljno opisan klinički pristup koji se odnosi na inicijalnu skrining procenu. Prikazane su laboratorijske metode kvantitativnog merenja dijagnostičkih parametara u akutnom koronarnom sindromu i ostalih biohemijskih markera koji su praćeni tokom studije. Poseban osvrt je dat na određivanje MMP-9, njegovog ukupnog i aktivnog oblika, i prema nama dostupnim podacima, definisan je i uveden potpuno novi parametar, tj. MMP-9 index kao relativni odnos aktivnog i ukupnog oblika MMP-9. Za ostale biohemijske parametre dat je, za svaki pojedinačno, kratak pregled koji se odnosi na njihov dijagnostički značaj sa posebnim osvrtom na proces ateroskleroze koronarnih krvnih sudova i nastanak akutnog koronarnog sindroma i poznati međusobni uticaji. Opisana je metodologija rada, aparatura i prikazane referentne vrednosti za sve praćene parametre. Prikazane su deskriptivne i analitičke statističke metode, metode

za prikaz povezanosti između posmatranih parametara i navedeni su statistički paketi koji su korišćeni za analizu podataka.

Rezultati rada su podeljeni u dvanaest celina, a za prikaz rezultata su korišćeni grafikoni i tabele sa tekstualnim opisom dobijenih vrednosti i opisom statističke značajnosti između ispitivanih grupa. U prvoj celini su predstavljene opšte karakteristike ispitanika, njihova distribucija po polu, distribucija ispitivanih podgrupa po osnovu postojanja poremećaja glikoregulacije, odnosno po osnovu postojanja i vrste koronarnog događaja, kao i distribucija ispitanika prema starosnim intervalima i srednje vrednosti godina starosti u ispitivanim grupama. U drugoj celini je dat pregled anamnestičkih podataka ispitanika, koji su se odnosili na postojanje cerebrovaskularne bolesti i cerebrovaskularnog insulta, zatim periferne vaskularne bolesti, prisustvo arterijske hipertenzije, postojanje mikroangiopatskih promena, tj. retinopatije, nefropatije i neuropatije, dati su podaci koji se odnose na pušenje cigareta, uključujući pušački staž i broj popušanih cigareta na dan, podaci o konzumiranju alkohola i na kraju je prikazano porodično opterećenje za mikroangiopatska i makroangiopatska oboljenja, odnosno koronarnu, cerebrovaskularnu i perifernu vaskularnu bolest. Treća celina se odnosi na analizu vrednosti arterijskog krvnog pritiska. Četvrta celina opisuje lipidni status i aterogene indekse u ispitivanim grupama, i to: ukupni holesterol, trigliceride, LDL holesterol, HDL holesterol, apolipoproteine A i B, Lp (a), kao i aterogene indekse: hol/hdl , ldl/hdl , $apoB/apoA$, dok je na kraju dat celokupan pregled srednjih vrednosti parametara lipidnog statusa i aterogenih indeksa po grupama. U petoj celini predstavljeni su parametri glikoregulacije i insulinske rezistencije, tj. glikemija, HbA1c, vrednosti insulinemije i HOMA IR koji je parametar insulinske rezistencije, sa pregledom srednjih vrednosti parametara po grupama. Šesta celina sadrži podatke o posmatranim parametrima bubrežne funkcije u ispitivanim grupama, sa nalazima kreatinina i mikroalbuminurije i njihovim srednjim vrednostima. Sedma celina analizira vrstu primenjene terapije u ispitivanim grupama za dijabetes, hiperlipoproteinemiju i kardiovaskularne terapije sa pregledom najčešće korišćenih terapijskih režima i lekova. U osmoj celini su opisani markeri inflamacije, koagulacije, fibrinolize i oksidativnog stresa, i to: C reaktivni protein, fibrinogen, PAI-1, D-dimer, superoksid dismutaza i glutation peroksidaza, kao i homocistein, dok je na kraju dat celokupan pregled srednjih vrednosti nabrojanih parametara po grupama. Deveta celina sadrži opis posmatranih markera nekroze miokarda u ispitivanim grupama sa prikazanom procentualnom distribucijom povišenih vrednosti i nalazima srednjih vrednosti po grupama za posmatrane parametre: CK, CKMB i troponin. Deseta celina analizira dužinu trajanja bola kod ispitanika sa akutnim koronarnim sindromom u grupi dijabetičara u odnosu na grupu nedijabetičara. Jedanaesta celina je posvećena rezultatima dobijenim analizom ukupnog i aktivnog oblika matriks metaloproteinaze-9 kod svih ispitanika sa i bez akutnog koronarnog sindroma, odnosno sa i bez prisustva dijabetesa, što je prikazano procentualnom distribucijom povišenih vrednosti, srednjim vrednostima po grupama i pregledom najznačajnijih korelacijskih povezanosti sa drugim značajnim parametrima i pokazateljima u akutnom koronarnom sindromu. Dvanaesta celina se takođe odnosi na MMP-9 i njegov sveukupni značaj zbog mogućnosti predikcije akutnog koronarnog sindroma, što je pokazano u grupi ispitanika sa akutnim koronarnim sindromom, a naročito kod dijabetičara,

nizom uporednih grafikona koji prikazuju ROC krivu za različite oblike MMP-9 i novodefinisani, izvedeni parametar MMP-9 index, a što je sumarno objedinjeno parametrima osetljivosti MMP-9 kao prediktora akutnog koronarnog sindroma.

U poglavlju koje se odnosi na diskusiju adekvatno su diskutovani rezultati istraživanja i upoređivani sa podacima iz literature. Diskutovani su poznati faktori rizika koji vode ubrzanoj progresiji ateroskleroze i nastanku akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara, koji su zbog prisustva poremećaja glikoregulacije naročito rizična grupa. Najpre su opisani gojaznost, dislipidemija, hipertenzija, pušenje cigareta, fizička neaktivnost, uticaj alkohola, genetski faktori, starost, pol, porodično opterećenje, a zatim su data i novija shvatanja koja ističu značaj insulinske rezistencije, disfunkcije endotela, poremećaja koagulacije i fibrinolize, hronične inflamacije, oksidativnog stresa, mikroalbuminurije, hiperhomocistinemije i postprandijalne hiperglikemije. Posebno su opisani markeri nekroze miokarda, CK, CK-MB i troponin, i dužina trajanja bola koji je patognomoničan znak miokardne ishemije. U diskusiji su rezultati na svebuhvatan način povezani sa rezultatima drugih autora koji ukazuju na značaj poznatih faktora rizika za nastanak akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara, kao i, mesto i ulogu raznih vrsta enzima u dijagnozi rane nekroze miokarda i rupture ateromskog plaka. Težište diskusije je bilo u delu koji se odnosio na aktivnost enzima metaloproteinaze 9 (MMP-9) i njegovu potencijalnu ulogu kao markera za stratifikaciju rizika za nastanak akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara, uz uporedni pregled sa najnovijim saznanjima iz dostupne literature. Pored značaja određivanja MMP-9 za postavljanje rane i sigurne dijagnoze akutnog koronarnog sindroma, od krucijalne važnosti je iznalaženje novih terapijskih mogućnosti koje će sprečiti, odložiti ili ublažiti nastajanje akutnog koronarnog sindroma, što je takođe diskutovano. U tom kontekstu istaknuti su MMP inhibitori koji su još u fazi ispitivanja. Na kraju, posebno je istaknut veliki značaj određivanja MMP-9 u serumu, u predikciji i primarnoj i sekundarnoj prevenciji koronarne srčane bolesti i akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara.

U skladu sa ciljevima i rezultatima rada, izneti su jasni i nedvosmisleni zaključci.

Literatura sadrži 262 literaturna navoda koji su citirani u radu.

B. Kratak opis postignutih rezultata:

Rezultati pokazuju da je u studiji bilo značajno više muškaraca nego žena, a da je najveći broj ispitanika bio strosne dobi 55-69 godina, dok je prosečna starost ispitanika bila 61.1 ± 10.3 godina.

Anamnestički podaci dobijeni od pacijenata pokazuju da su makrovaskularne komplikacije, cerebrovaskularna (cvb) i periferna vaskularna bolest (pvb), bile prisutne kod ispitanika sa infarktom miokarda, s tom razlikom što je cvb bila češća kod nedijabetičara, a pvb kod dijabetičara sa akutnim koronarnim sindromom. Podaci ukazuju na postojanje arterijske hipertenzije kod 2/3 nedijabetičara i kod više od 1/2 dijabetičara sa akutnim koronarnim sindromom (AKS), i kod 1/3 ispitanika bez AKS. Mikroangiopatske promene su bile prisutne samo kod dijabetičara, i to kod oko 2/5 ispitanika, pri

čemu je najčešće bila zastupljena retinopatija, kod $\frac{1}{4}$ ispitanika, neuropatija kod nešto više od $\frac{1}{6}$ ispitanika i nefropatija kod oko $\frac{1}{10}$ ispitanika, i svi ispitanici sa mikroangiopatijom su imali infarkt miokarda. Pušenje je češće bilo zastupljeno kod nedijabetičara sa AKS, dok su dijabetičari imali duži pušački staž, a broj popušanih cigareta tokom dana u obe grupe je bio približno isti. Nađen je samo jedan ispitanik koji je bio etiličar i pripadao je grupi nedijabetičara sa AKS. Podaci iz porodične anamneze ukazuju da je najveća porodična predispozicija kod ispitanika postojala za koronarnu bolest, i to kod preko 70% dijabetičara i preko 40% nedijabetičara, ali i kod $\frac{1}{7}$ ispitanika iz kontrolne grupe.

Pri prijemu u koronarnu jedinicu povišenu vrednost arterijskog krvnog pritiska imalo je oko 60% nedijabetičara i više od 50% dijabetičara sa AKS, s tim što su srednje vrednosti kako sistolnog tako i dijastolnog pritiska bile više kod nedijabetičara sa AKS u odnosu na dijabetičare.

Lipidni status ukazuje na povišene vrednosti holesterola kod 68.4% nedijabetičara i 60.7% dijabetičara, ali i kod 38.1% ispitanika iz kontrolne grupe, a najveći broj je bio u grupi IM ili reinfarkt, mada se srednje vrednosti nisu značajno razlikovale. Značajna razlika srednjih vrednosti, između grupa, nađena je za trigliceride, koji su bili povišeni kod 60.7% dijabetičara i kod 44.7% nedijabetičara sa AKS, dok je to bio slučaj sa polovinom ispitanika sa IM ili reinfarktom. Srednja vrednost HDL je takođe pokazala statistički značajnu razliku između grupa, a niske vrednosti HDL imalo je oko $\frac{3}{5}$ nedijabetičara i $\frac{1}{2}$ dijabetičara sa AKS, koji su inače imali najnižu srednju vrednost HDL. Samo 42.9% dijabetičara i 48.1% nedijabetičara sa AKS imalo je normalne vrednosti Lp (a), odnosno manje od $\frac{1}{2}$ ispitanika sa NAP i ispitanika sa IM ili reinfarktom imalo je normalne vrednosti Lp(a). Manje od $\frac{1}{4}$ dijabetičara kao i $\frac{2}{5}$ nedijabetičara sa AKS imalo je normalne vrednosti Apo B, dok je manje od $\frac{2}{5}$ dijabetičara i $\frac{1}{2}$ nedijabetičara imalo normalne vrednosti Apo A lipoproteina. Aterogeni indeksi su se razlikovali između grupa i značajno su povišeni u grupama ispitanika sa AKS u odnosu na kontrolnu grupu.

Parametri glikorgulacije pokazuju da je manje od $\frac{1}{5}$ dijabetičara sa AKS imalo normalne vrednosti glikoziliranog hemoglobina A1c (HbA1c), a oko $\frac{1}{10}$ normalne vrednosti glikemije pri prijemu, dok je kod nedijabetičara 60.5% ispitanika imalo normalne vrednosti HbA1c, a 57.9% normalnu vrednost glikemije pri prijemu. Normalne vrednosti HbA1c imalo je 43.4% ispitanika sa infarktom miokarda ili reinfarktom i 38.5% ispitanika sa nestabilnom anginom pectoris. Slično prethodnom, 38.5% ispitanika iz grupe sa NAP i 37.7% ispitanika iz grupe IM ili reinfarkt imalo je normalne vrednosti glikemije pri prijemu. Insulinska rezistencija (IR) je bila zastupljena kod 96.4% dijabetičara i kod 68.4% nedijabetičara sa AKS, dok su ispitanici sa NAP imali IR u 84.6% slučajeva, a ispitanici sa IM ili reinfarktom u 79.2%. Dijabetičari sa AKS imali su najveću vrednost HOMA IR, dok je najveća insulinemija bila u grupi nedijabetičara sa AKS. Srednja vrednost HOMA IR bila je približno ista kod ispitanika sa NAP i infarktom miokarda, s tim što je srednja vrednosti insulinemije u grupi NAP bila veća u odnosu na srednju vrednost insulinemije u grupi IM.

Kod 53.6% dijabetičara sa AKS zabeležen je povišen kreatinin u serumu, a kod nedijabetičara sa AKS u 44.7%, kao i kod 14.3% ispitanika iz

kontrolne grupe. Mikroalbuminurija je bila povišena kod 1/2 dijabetičara i kod 2/5 nedijabetičara sa sa AKS.

Od antihipertenziva najčešće su korišćeni beta blokera i ACE inhibitori. Za terapiju dislipidemije najčešće su upotrebljavani statini u obe grupe sa AKS. Pokazana je značajna korelacijska povezanost vrednosti aktivnog MMP-9 i upotrebe beta blokera, inhibitora agregacije trombocita i statinske terapije kod nedijabetičara, ali ne i kod dijabetičara.

Povišene vrednosti CRP bile su kod dijabetičara u 69.2% i kod nedijabetičara u 30.8% slučajeva, najčešće u grupi ispitanika sa IM ili reinfarktom, pri čemu je srednja vrednost CRP u grupi dijabetičara bila značajno iznad referentnih vrednosti. Povišene vrednosti fibrinogena imalo je značajno više dijabetičara u odnosu na nedijabetičare, kao i 1/2 ispitanika sa IM ili reinfarktom i 1/3 ispitanika iz grupe sa NAP. Povišene vrednosti PAI-1, imali su u visokom procentu i dijabetičari, i nedijabetičari, i 4/5 ispitanika sa IM ili reinfarktom, a slična distribucija je bila i za povišene vrednosti D-dimera. Kod 4/5 nedijabetičara nađene su smanjene vrednosti SOD, takođe kod 70.8% dijabetičara, kao i kod 44.4% ispitanika u kontrolnoj grupi, zatim u visokom procentu kod ispitanika sa NAP (92.3%) i kod 70.7% ispitanika sa IM ili reinfarktom. Paradoksalno, rezultati pokazuju da je u grupi dijabetičara sa AKS bio najmanji procenat ispitanika sa smanjenim vrednostima GPx. Povišene vrednosti homocisteina imala je 1/3 dijabetičara, kao i 35.5% nedijabetičara sa AKS, najčešće sa IM ili reinfarktom.

Povišene vrednosti CK su postojale kod više od polovine dijabetičara i preko 3/5 nedijabetičara, a u grupi sa IM ili reinfarktom kod 72.1% ispitanika. Izoenzim CK-MB je bio povišen kod 93.5% ispitanika sa IM ili reinfarktom. Povišen CK-MB imalo je 74.1% dijabetičara i skoro identično, 74.2% nedijabetičara. Troponin je bio povišen kod svih ispitanika sa IM ili reinfarktom, ali i kod 1 ispitanika sa NAP, i to granično. Markeri nekroze miokarda nisu bili povišeni u kontrolnoj grupi. Povišene vrednosti najsenzitivnijih markera nekroze miokarda pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa povišenim vrednostima aktivnog MMP-9 u celoj ispitivanoj grupi.

Nedijabetičari sa AKS su se javljali lekaru tokom prvih 6h od pojave bola u 52.6% slučajeva, dok su se dijabetičari prosečno za oko 3 sata kasnije javljali lekaru od nedijabetičara sa AKS.

Rezultati pokazuju da je 92.9% dijabetičara imalo povišene vrednosti ukupnog MMP-9, kao i 78.9% nedijabetičara, i 47.6% ispitanika iz kontrolne grupe. Povećanje ukupnog MMP-9 postojalo je kod 90.6% ispitanika sa infarktom miokarda ili reinfarktom, odnosno kod 61.5% ispitanika sa NAP. Aktivni MMP-9 bio povišen kod svih dijabetičara i kod 94.7% nedijabetičara sa AKS, i u 28.6% ispitanika kontrolne grupe. Povišen aktivni MMP-9 je imalo 92.3% ispitanika u grupi sa NAP i 98.1% ispitanika sa IM ili reinfarktom. Srednje vrednosti ukupnog MMP-9 su se značajno razlikovale između grupa, kao i srednje vrednosti aktivnog MMP-9 koje su pokazale statistički veću značajnost razlike. Povišene vrednosti ukupnog MMP-9 su pokazale korelacisku povezanost sa vrednostima parametra insulinske rezistencije (HOMA IR), dok je aktivni MMP-9 pokazivao korelacijsku povezanost sa hipertenzijom. Srednja vrednost MMP-9 indexa bila je najviša u grupi dijabetičara (70.6), nešto niža u grupi nedijabetičara sa AKS (68.8), i najniža u kontrolnoj grupi (42.9), uz postojanje visoke statističke značajnosti razlike, ali

nije postojala statistički značajna razlika između ispitanika sa IM ili reinfarktom (71.4) u odnosu na grupu sa NAP (66.7).

Ukupni MMP-9 kod dijabetičara sa AKS pokazivao je vrednost površine ispod ROC krive (ACU) koja je iznosila 0.774 i cut-off vrednost za akutni koronarni događaj od >27.6 ng/ml, dok je aktivni MMP-9 u istoj grupi imao ACU od 0.936 i cut-off vrednost >23.8 ng/ml. ACU je kod dijabetičara za MMP-9 index iznosila 0.914, a cut off vrednost je bila >58.2, uz najnižu standardnu grešku. Senzitivnost ukupnog MMP-9 kao testa za AKS kod dijabetičara je bila odlična, ali je specifičnost bila slaba. Aktivni MMP-9 je imao vrlo dobru senzitivnost i specifičnost. MMP-9 index je pokazao vrlo dobru senzitivnost i odličnu specifičnost.

C. Uporedna analiza rezultata sa rezultatima iz literature:

Poznato je da u odnosu na godine starosti i pol učestalost ishemijske bolesti srca raste sa godinama života kod muškaraca, dok se kod žena javlja nešto kasnije, oko pedesete godine života, a posle menopauze rizik kod žena progresivno raste, izjednačava se i u starijem životnom dobu čak i premašuje rizik kod muškaraca. Ovi podaci su u saglasnosti sa rezultatima rada.

Zastupljenost makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija, arterijske hipertenzije, uticaj pušenja cigareta, podaci o konzumiranju alkohola, porodično opterećenje za mikro i makroangiopatska oboljenja, dislipidemija, parametri bubrežne funkcije, kao i markeri inflamacije, koagulacije, fibrinolize i oksidativnog stresa su analizirani u velikim studijama, posebno kad su u pitanju dijabetičari koji pripadaju kategoriji najvećeg rizika. Poznata je udruženost centralne gojaznosti, hipertenzije, insulinske rezistencije, dislipidemije, mikroalbuminurije i poremećaja koagulacije se često opisuju u sastavu metaboličkog sindroma, koji je povezan sa disfunkcijom endotela, inflamacijom i poremećenom fibrinolizom što utiče na pojavu i progresiju kardiovaskularnih oboljenja sa povećanjem hiperglikemije i insulinske rezistencije mnogo ranije pre klinički ispoljenog dijabetesa. U ovoj studiji analizirani su podaci kod pacijenta kod kojih je već nastao akutni koronarni sindrom, uporednom analizom dijabetičara i nedijabetičara, a posebno po osnovu postojanja i vrste koronarnog događaja. U ovom istraživanju su, međutim, kod nedijabetičara u odnosu na dijabetičare sa AKS, nešto češće bili zastupljeni cerebrovaskularna bolest, arterijska hipertenzija, uključujući i više srednje vrednosti sistolnog i dijastolnog arterijskog krvnog pritiska, povišene vrednosti holesterola, povišene vrednosti hol/hdl i ldl/hdl indeksa i postojale su više srednje vrednosti ovih aterogenih indeksa. Nedijabetičari su češće pušili cigarete i konzumirali alkohol, imali su veću srednju vrednost insulinemije, s tim što su ispitanici sa NAP češće imali insulinsku rezistenciju od ispitanika sa IM ili reinfarktom. U ovoj grupi su takođe češće bili zastupljeni smanjen antioksidativni status i povišene vrednosti homocisteina.

Kako su CK, CK-MB i troponin potvrđeni markeri nekroze miokarda, a ispitivanu grupu su činili i ispitanici sa nestabilnom anginom pectoris, koji dokazano nemaju povišene vrednosti navedenih parametara u akutnom koronarnom sindromu, to je njihovo određivanje u grupama formiranim na osnovu postojanja i vrste koronarnog događaja samo potvrdilo već poznat

nivo senzitivnosti i specifičnosti za svaki parametar pojedinačno. Novitet predstavlja činjenica da je pokazano da nema korelacijske povezanosti između markera nekroze miokarda i MMP-9 u akutnom koronarnom sindromu dijabetičara. Ipak, povišene vrednosti najsenzitivnijih markera nekroze miokarda pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa povišenim vrednostima aktivnog MMP-9 u celoj ispitivanoj grupi.

Bol u akutnom infarktu miokarda je značajan i patognomoničan znak miokardne ishemije. U našoj studiji pratili smo dužinu trajanja bola kod ispitanika od njegove pojave do prijema u koronarnu jedinicu. U literaturi je dobro poznata korelacijska veza dužine trajanja bola u IM i markera nekroze miokarda. Interesantan je podatak koji smo dobili u našoj studiji, a koji se odnosi vreme javljanja lekaru od prve pojave simptoma bola u AKS. Nediabetičari sa AKS, najčešće se javljaju lekaru tokom prvih 6h od pojave bola, dok se dijabetičari sa AKS, najčešće javljaju lekaru nakon 6h od pojave bola. Ova pojava je povezana sa "silent" ishemijom miokarda kod dijabetičara, zbog postajanja disfunkcije autonomnog nervnog sistema, koja je pak česta komplikacija u diabetes mellitusu. Ovo objašnjava, zašto su se dijabetičari sa akutnim koronarnim sindromom, u našem ispitivanju, prosečno za oko 3 sata, kasnije javljali lekaru od nediabetičara sa AKS, što je u saglasnosti sa podacima iz literature.

Pregledom do sada objavljenih radova, zaključeno je ispitivanjima "in vitro", da aktivnost MMP-9 može da učestvuje u nastajanju ateroskleroze, destabilizacije i rupture plaka i agregaciji trombocita. U malom broju kliničkih ispitivanja jedino je ukazano da MMP-9 može da učestvuje u nastajanju akutnog koronarnog sindroma. Poseban naučni značaj ovoj oblasti daju rezultati kliničkih ispitivanja poslednjih godina zasnovani na integrisanom pristupu ispitivanja procesa ateroskleroze i ispitivanju pojedinačnih i međusobno uslovljenih efekata svih značajnih faktora rizika za nastajanje ateroskleroze i posebno za nastajanje, stabilnost i rupturu ateromskog plaka kao i za posledičnu trombozu i okluziju koronarnih krvnih sudova. Aktivnost enzima metaloproteinaze, a naročito MMP-9 više je ispitivana u uslovima "in vitro" i pružila je osnovu za dalja istraživanja kliničkog značaja određivanja MMP-9 u serumu dijabetičara.

Iako je naučni interes prema MMP porastao tokom poslednjih godina i dalje postoje ograničenja trenutno dostupnih kliničkih studija o povezanosti MMP-a i akutnih koronarnih događaja. Osim toga, postoje oskudni podaci o povezanosti MMP-9 sa akutnim koronarnim događajima kod ispitanika sa dijabetesom.

Centralni momenat ove studije bilo je određivanje vrednosti MMP-9, kako ukupnog tako i aktivnog, u akutnom koronarnom sindromu kod dijabetičara i nediabetičara kao i praćenje njihovih razlika u odnosu na zdravu kontrolu.

Posebno je bitna činjenica koja se odnosi na ulogu aktivnog MMP-9 i njegovu povezanost sa akutnim koronarnim događajem, imajući u vidu da su prethodna istraživanja bila usmerena isključivo na ukupni MMP-9. Za razliku od ukupnog MMP-9, prema rezultatima ovog istraživanja, aktivni oblik mnogo vernije odslikava postojanje akutnog koronarnog sindroma, jer je bio povišen kod svih ispitanika sa AKS. Kada se posmatraju povišene vrednosti aktivnog MMP-9, u grupama formiranim na osnovu vrste koronarnog događaja, dobija se dosta jasnija slika jer je, u dosta velikom i približno istom procentu,

postojala zastupljenost povišenih vrednosti aktivnog MMP-9 kod ispitanika sa NAP i kod onih sa IM.

U dostupnoj literaturi, nema podataka o korelacijskoj povezanosti insulinske rezistencije sa vrednostima ukupnog MMP-9, koja je nađena u ovom istraživanju. Pošto je insulinska rezistencija u tesnoj vezi sa nastankom i progresijom ateroskleroze, a ukupni MMP-9 odražava stepen postojećih aterosklerotskih promena, to bi moglo objasniti ovu korelacijsku vezu. Međutim, nije nađena korelacijska veza aktivnog MMP-9 sa parametrom insulinske rezistencije, ali je nađena sa hipertenzijom i pušenjem duvana. Navedeno se može objasniti činjenicom da je insulinska rezistencija odraz hroničnog stanja dok je aktivni MMP-9 parametar akutnog događaja. Dakle, njegov nagli skok možemo povezati sa akutnim događajem koji se dešava u kratkom vremenskom periodu. Nađena korelacija sa hipertenzijom, koja je takođe hronično stanje, može se objasniti time što hipertenzija može imati svoju akutizaciju izraženu u vidu hipertenzivne krize koja pak može biti inicijalna kapisla razvoja akutnog koronarnog događaja. Korelacijsku povezanost sa pušenjem duvana je moguće objasniti delovanjem ugljenmonoksida na nastanak vazokonstrikcije koronarnih krvnih sudova koja na terenu postojanja nestabilnog plaka i hipertenzije pojačava turbulentni tok krvi što pak doprinosi rupturi plaka.

Značaj određivanja MMP-9, kad su u pitanju dijabetičari, odnosi se na veliku prevalencu akutnog koronarnog događaja bez uobičajene simptomatologije, odnosno bez prisutva bola, koji je inače patognomoničan u AKS, zato što kod dijabetičara postoji disfunkcija autonomnog nervnog sistema. Upravo zbog te činjenice neophodno je blagovremeno učiniti predikciju mogućeg koronarnog događaja.

Kako je napred navedeno, a i potvrđeno rezultatima ispitivanja, vrednosti ukupnog MMP-9 su podložne uticaju životnog doba, a sledstveno i nivou aterosklerotskih promena te se apsolutna vrednost može značajno razlikovati i biti iznad gornjeg nivoa referentnih vrednosti i bez postojanja AKS. S druge strane, kako je aktivni MMP-9 direktni produkt ukupnog MMP-9, procesom katalize, tako će i apsolutna vrednost aktivnog MMP-9 biti direktno povezana sa nivoom ukupnog MMP-9, u datom slučaju. Na osnovu poznatih patofizioloških mehanizama rupture plaka, u radu je istaknuto, da je nivo aktivnog MMP-9 povezan i sa masivnošću rupturiranog plaka, a ne samo sa podatkom o postojanju rupture plaka. Neophodna su ispitivanja o genetskim polimorfizmima MMP-a povezanim sa promenama u distribuciji MMP-9 na individualnom nivou. Dakle, nivoi ukupnog i aktivnog MMP-9 su direktno povezani sa genskim polimorfizmom koji može rezultovati višim nivoima oba oblika MMP-9 bez postojanja AKS.

Apsolutna novina ovog istraživanja jeste, definisanje i izvođenje novog parametra, MMP-9 indexa. Bilo je potrebno eliminisati napred navedene uticaje i definisati izvedeni parametar koji će bolje i tačnije odražavati akutni koronarni događaj od apsolutnih vrednosti ukupnog i aktivnog MMP-9. Izvedeni parametar trebalo je da u potpunosti odražava sliku uticaja oba oblika MMP-9, a da se pri tom eliminišu napred navedeni uticaji na njihove apsolutne vrednosti, stoga je to morao biti neki relativni broj. Zbog toga je uveden MMP-9 index, kao relativni odnos aktivnog i ukupnog MMP-9. U cilju daljeg dokazivanja validnosti MMP-9 indexa, utvrđene su senzitivnost i specifičnost za svaki parametar pojedinačno, ukupni, aktivni i MMP-9 index. MMP-9 index

je pokazao vrlo dobru senzitivnost i odličnu specifičnost čime je u značajnoj meri zadovoljio uslove za dobar skrining test AKS-a kod dijabetičara. Kako je MMP-9 index relativni broj, eliminiše se napred navedeni mogući uticaj na varijabilnost vrednosti aktivnog MMP-9, kao apsolutne vrednosti.

Postavljanje rane i sigurne dijagnoze, pretećeg akutnog koronarnog sindroma, je od krucijalne vrednosti za primenu do sada poznate terapije i za pronalaženje novih lekova koji će sprečiti, odložiti ili ublažiti nastajanje akutnog koronarnog sindroma. Na taj način može biti značajno smanjena stopa mortaliteta u ovih bolesnika u ranom i odloženom periodu kao i nastajanje restenoze i ponovne pojave akutnog koronarnog sindroma, koji je praćen sa još većom stopom mortaliteta.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze:

Rad objavljen u časopisu međunarodnog značaja

Gostiljac D, Đorđević BP, Đurić D, Peruničić J, Lasica R, Čolak E, Obrenović R, Canovic F, Dimitrijević Srećković V, Ilić M. The importance of defining serum MMP-9 concentration in diabetics as an early marker of the rupture of atheromatous plaque in acute coronary syndrome. Acta Physiologica Hungarica, 2011; 98: 91-97

E. Zaključak

Doktorska disertacija **"Značaj određivanja enzima MMP-9 u serumu dijabetičara kao ranog markera rupture ateromskog plaka u akutnom koronarnom sindromu "** kandidata Mr sci med dr Draška Gostiljca, predstavlja jedinstveno istraživanje, prema našim saznanjima i u sveukupnoj do sada dostupnoj literaturi, uz primenu adekvatne metodologije na adekvatno odabranim ispitanicima.

Ovo istraživanje, na osnovu dobijenih rezultata i njihovim upoređivanjem sa podacima iz literature, eksplicitno rasvetljava značaj određivanja serumskog nivoa MMP-9 u akutnom koronarnom sindromu dijabetičara. Pokazano je, da je vreme prijema dijabetičara sa AKS u koronarnu jedinicu za oko 3 sata kasnije u odnosu na nedijabetičare sa AKS; da postoje povišene vrednosti serumskog nivoa MMP-9 kod dijabetičara u AKS; da su u serumu dijabetičara sa akutnim koronarnim sindromom, tj. nestabilnom anginom pectoris ili infarktom miokarda povišene vrednosti ukupnog MMP-9 i aktivnog MMP-9; da aktivni MMP-9 vernije odslikava postojanje akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara; da postoji korelacijska povezanost povišenih vrednosti ukupnog MMP-9 sa HOMA IR koji je pokazatelj insulinske rezistencije, a kako je insulinska rezistencija značajan patofiziološki činilac u nastanku i progresiji ateroskleroze, to se može zaključiti da je ukupni MMP-9 koristan pokazatelj stepena aterosklerotskih promena kod dijabetičara sa akutnim koronarnim sindromom; da postoji korelacijska povezanost ukupnog MMP-9 sa prisustvom hipertenzije i pušenjem duvana; da povišene vrednosti ukupnog MMP-9 pokazuju korelacijsku vezu sa povišenim vrednostima ukupnog holesterola u serumu

dijabetičara sa akutnim koronarnim sindromom, da za razliku od ukupnog MMP-9, aktivni MMP-9 ne pokazuje korelacijsku povezanost sa insulinskom rezistencijom kod dijabetičara, koja je odraz hroničnog stanja, dok je aktivni MMP-9 parametar akutnog događaja u akutnom koronarnom sindromu dijabetičara; da se korelacijska povezanost aktivnog MMP-9 sa hipertenzijom može dovesti u vezu sa akutizacijom hipertenzije i nastankom hipertenzivne krize; da se korelacijska veza aktivnog MMP-9 sa pušenjem duvana može dovesti u vezu sa delovanjem ugljenmonoksida na koronarne krvne sudove i nastankom vazokonstrikcije čime se narušava laminarni tok krvi, što doprinosi rupturi ateromskog plaka; da parametri nekroze miokarda nisu pokazali značajnu korelacijsku vezu sa nivoima MMP-9 u grupi dijabetičara sa AKS; da u grupi dijabetičara sa AKS nije nađena statistički značajna korelacijska povezanost između terapije statinima i nivoa MMP-9, što govori u prilog tezi da je u dijabetesu značajniji uticaj insulinske rezistencije od samog nominalnog nivoa lipida u nastanku AKS; da bi na osnovu prethodnog zaključka, terapijski pravci kod dijabetičara koji su usmereni ka smanjenju insulinske rezistencije imali veći benefit na smanjenje incidence AKS, od samog nominalnog smanjenja vrednosti lipida. Orginalno je pokazano da su vrednosti ukupnog MMP-9 podložne uticaju životnog doba, što je potvrđeno značajnošću korelacijske povezanosti životnog doba i nivoa ukupnog MMP-9 u celoj ispitivanoj grupi; da se apsolutne vrednosti ukupnog MMP-9 mogu značajno razlikovati i biti iznad gornjih nivoa apsolutnih vrednosti i bez postojanja akutnog koronarnog sindroma, a takođe i vrednosti koje su u okviru referentnih ne isključuju postojanje akutnog koronarnog sindroma, u prilog čemu govori slaba specifičnost ukupnog MMP-9 kao testa u AKS; da opseg apsolutnih vrednosti aktivnog MMP-9 jedne individue direktno zavisi od apsolutne vrednosti ukupnog MMP-9 koji katalizom prelazi u aktivnu formu, a kad se uzme u obzir i mogući uticaj masivnosti rupturiranog plaka i polimorfizma gena za MMP-9, same nominalne vrednosti aktivnog MMP-9 u serumu pokazuju disperziju vrednosti, što smanjuje predikciju akutnog koronarnog sindroma; da aktivni MMP-9 može predstavljati marker rane rupture ateromskog plaka kod dijabetičara sa akutnim koronarnim sindromom, sa cut-off vrednošću >23.8 ng/ml, koja pokazuje dobru senzitivnost i specifičnost; da MMP-9 index, kao relativni odnos obe ispitivane forme MMP-9 znatno bolje odražava značaj MMP-9 u akutnom koronarnom sindromu dijabetičara, smanjenjem uticaja fiziološke disperzije apsolutnih vrednosti obe forme MMP-9 u ispitivanoj grupi, da MMP-9 index pokazuje dosta dobru senzitivnost i odličnu specifičnost, uz cut-off vrednost >58.2 , kao marker AKS kod dijabetičara. Zaključeno je da određivanje enzima matriks metaloproteinaze – 9 (MMP-9), ukupne i aktivne forme u serumu dijabetičara, a naročito MMP-9 indexa može biti sigurni marker stabilnosti odnosno nestabilnosti i rupture ateromskog plaka, a time i nastajanja akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara.

Uvidom u nama dostupnu literaturu do sada nismo našli podatak da su drugi istraživači objavili slične rezultate vezane za aktivni MMP-9, a sigurno vezano za MMP-9 indeks koji je prvi put postuliran ovim istraživanjem. Dobijeni rezultati i podaci iz literature ukazuju na veliki potencijal upotrebe MMP-9 u kliničkoj praksi. Savremeni trendovi medicine su usmereni ka primarnoj i sekundarnoj prevenciji, kao i iznalaženju markera od značaja za ranu dijagnostiku bolesti.

Ispitivanje promena vrednosti MMP-9, kao i mogućnosti njihove promene pod uticajem novih lekova, MMP sintetičkih inhibitora, može da ima veliki značaj u primarnoj i sekundarnoj prevenciji koronarne srčane bolesti i nastajanju akutnog koronarnog sindroma.

Najvažnija klinička korist, u dijagnozi akutnog koronarnog sindroma kod dijabetičara, je zasnovana na utvrđivanju činjenice da pored održavanja markera nekroze miokarda značajnu ulogu ima i određivanje markera destabilizacije i rupture plaka. Kod dijabetičara, značajnije je održavanje markera rupture plaka, koji se u serumu pojavljuju ranije i mogu stratifikovati grupu kandidata sa povišenim rizikom za razvoj akutnog koronarnog sindroma.

Na osnovu uvida u bazu podataka koja je predstavljala polaznu osnovu za istraživanje i pregledanog rada doktorske disertacije Dr Draška Gostiljca, Komisija konstatuje, da je doktorska disertacija urađena na visokostručnom nivou i predstavlja originalnu studiju sa značajnim naučnim i kliničkim doprinosom iz oblasti kardiovaskularne patologije dijabetičara, sa ciljem rane dijagnoze, terapijske intervencije što dovodi do smanjenja stope mortaliteta ovih bolesnika.

Imajući u vidu aktuelnost i originalan doprinos doktorske disertacije koja se bavi jednim od najznačajnijih problema savremene medicine, primenjenu metodologiju rada, kao i dosadašnji stručni i naučni doprinos kandidata i uzevši u obzir prethodne navode, Komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati priloženu doktorsku disertaciju Dr Draška Gostiljca i odobri njenu javnu odbranu.

Beograd, 30.11.2011. godine

MENTOR:

KOMISIJA:

Prof. dr Predrag B. Đorđević

Prof. dr Srđan Popović

Prof. dr Jovan Peruničić

Prof. dr Vladimir Jakovljević