

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 08.07.2018. godine, broj 5940-17-BM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj protekcije miokarda etapnom reperfuzijom u toku operativnog lečenja urođenih srčanih mana“

kandidata dr Branka Mimića

Mentor je Prof. dr Slobodan Ilić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vojislav Parezanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Mila Stajević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Petar Stojanov, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Branka Mimića napisana je na ukupno 136 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 32 tabele, 23 grafikona i 2 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su detaljno objašnjeni principi i značaj protekcije miokarda tokom kardiohirurških intervencija. Prikazan je istorijski razvoj kardioprotekcije od hipotermije, preko razvoja i primene rastvora za kardioplegiju, do strategija postkondicioniranja. Objasnjena je patofiziologija ishemijsko-reperfuzionog oštećenja miokarda. Takođe su do detalja opisane

dve dominantne grupe kardioplegičnih rastvora: krvna i kristaloidna, njihovi sastavi, kao i prednosti i mane njihove upotrebe u pedijatrijskoj kardiohirurgiji. Zatim su obrađene metode "kondicioniranja": prekondicioniranje, udaljeno postkondicioniranje i ishemijsko postkondicioniranje. Opisani su nalazi brojnih eksperimentalnih i kliničkih studija koje su se bavile ovom tematikom. Među svim pomenutim tehnikama jasno je apostrofirana značajna etapna reperfuzija kao protektivne strategije u dečjoj kardiohirurgiji. Ona predstavlja jednu od primenjenih modifikacija reperfuzije miokarda a čini je etapna primena (postkondicioniranje) tople krvne kardioplegije (*hot shot*). *Hot shot* se odnosi na reperfuziju miokarda toplom krvnom kardioplegijom neposredno pre skidanja aortne klemice, a postkondicioniranje na ponavljane kratke periode reperfuzije miokarda koji se smenjuju kratkim periodima ishemije.

Ciljevi istraživanja

1. Procena efekta postkondicioniranja u formi etapne kardioplegične reperfuzije na: brzinu metaboličkog i funkcionalnog oporavka miokarda, intenzitet ishemijsko-reperfuzionog oštećenja miokarda i postoperativne kliničke i ehokardiografske rezultate.
2. Utvrđivanje uticaja etapne reperfuzije na transkardijalne razlike serumskih laktata, Ph krvi, koncentracije glukoze, postrošnju kiseonika i sekvestraciju leukocita od strane miokarda u ranoj fazi reperfuzije

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je:

Tip studije i selekcija ispitanika:

Istraživanje je dizajnirano kao prospektivna kohortna studija. U studiju su uključeni svi pacijenti kod kojih je urađena korekcija urođene srčane mane uz primenu kardiopulmonalnog bajpasa (KPB) i srčanog aresta. Studija je izvedena na Odeljenju kardiohirurgije Univerzitetske dečje klinike u periodu od godinu dana (Januar-Decembar 2015 godine). Detaljno su opisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije kao i procedura dobijanja informisanog pristanka. Takođe je objašnjena tehnika anestezije kao i vođenja kardio-pulmonalnog bajpasa, koje su izvedene prema protokolima službe. Prikazan i

postoperativni monitoring u Jedinici intenzivnog lečenja (JIL) kao i kriterijumi za uspostavljanje inotropne potpore.

Protokol studije: Objašnjena je randomizacija i kriterijumi podele u grupe kao i protokol administriranja anterogradne krvne kardioplegične reperfuzije (*hot shot*) kao i algoritma za postkondicioniranje. Takođe su detaljno predstavljene sve ispitivane varijable (preoperativne, intraoperativne i postoperativne)

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Univerzitetske Dečje Klinike kao i Medicinskog Fakulteta . Svi ispitanici, u ovom slučaju roditelji/staratelji dali su pisani informisani pristanak.

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 252 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Studijom je obuhvaćen 71 ispitanik od čega 36 muškog (51%) i 35 ženskog pola (49%). Pacijenti su podeljeni u dve grupe u odnosu na primenu etapne reperfuzije. Grupa HS obuhvatala je 34 pacijenta (48%), dok je u grupi PostK bilo 37 pacijenata (52%). Medijana uzrasta na operaciji iznosila je 15,2 (1,6-124) meseca, medijana telesne mase bila 8,8 (3.3-30.0) kg. Dve grupe ispitanike nisu se međusobno statistički razlikovale u odnosu na prosečan uzrast na operaciji kao i u odnosu na demografske i preoperativne karakteristike. Najveći broj pacijenata (60/71, 84%) bio je podvrgnut korekciji urođene srčane mane sa levo-desnim šantom. Obe grupe ispitanika imale su gotovo identično prosečno trajanje kardio-pulmonarnog bajpasa (CBP), aortne kleme i prosečno vreme reperfuzije. Kod dva ispitanika je došlo do smrtnog ishoda, ukupni rani mortalitet iznosio je (2.8%). Tip reperfuzije nije uticao na rani mortalitet i morbiditet. Od pet pacijenata koji su zahtevali reintubaciju, dvoje su imali prolongiranu respiratornu potporu više od 48 sati. Pet pacijenata zahtevalo je privremeni pejsmejker zbog bradiaritmije, a dvoje terapiju amjodaronom zbog tahiaritmije.

Pacijenti iz grupe sa postkondicioniranjem imali su veći prosečni inotropni skor unutar prva 24 postoperativna sata, ali bez postojanja statistički značajne razlike ($p=0.58$). Nije

zabeležena razlika između dve grupe ispitanika u dužini trajanja mehaničke ventilacije i boravka u Jedinici intenzivnog lečenja. Dužina trajanja mehaničke ventilacije i vreme boravka u JIL snažno pozitivno korelira sa dužinom trajanja ishemije, (MV:rho=0.582, $p < 0.001$; JIN.rho=0.697, $p < 0.001$).

Primenjena više-faktorska ANOVA ponavljanih merenja pokazuje statističku značajnost uticaja vremena na porast srednjeg arterijskog pritiska u obe ispitivane grupe ($F=35,97$, $p=0,00$) ali nije pokazala pozitivan efekat postkondicioniranja ($F=1,19$, $p=0,32$). Nakon primene više-faktorske ANOVA-e ponavljanih merenja detektovana je statistički značajna promena vrednosti CVP-a u odnosu na vreme od prestanka ishemije u obe grupe ($F=26,65$; $p=0,00$). Primenom iste statističke metode u cilju procene međugrupnog varijabiliteta, statistička značajnost nije detektovana ($F=0,13$; $p=0,94$). Vrednosti inotropnog skora više su u PostK grupi nego u HS grupi tokom celog ispitivanog perioda ali ta razlika nema statističku značajnost ($F=0,83$, $p=0,43$). Uticaj faktora vremena pokazao je visoko statističku značajnost promene inotropnog skora u obe grupe u odnosu na nastanak ishemije-uklanjanje aortne kleme ($F=6,31$; $p=0,00$ ANOVA ponavljanih merenja). Primena multifaktorske ANOVA-e ponavljanih merenja pokazuje da efekat vremena na promenu vrednosti CI statistički nije značajan ($F=1,28$; $p=0,28$) kao ni uticaj postkondicioniranja na vrednosti srčanog indeksa (CI) ($F=0,30$; $p=0,68$, ANOVA ponavljanih merenja). Efekat vremena nakon ishemije na SvO₂ statistički je značajan ($F=4,21$; $p=0,002$; ANOVA ponavljanih merenja). U obe grupe dolazi do pada saturacije mešane venske krvi sa najnižom izmerenom vrednošću nakon 1 sata od uklanjanja aortne kleme na vrednosti od $61,94\% \pm 11,26$ u HS grupi i $64,03 \pm 11,90\%$ u PostK grupi. Rezultati Pearson-ove parametarske korelacije pokazuju visoko statistički značajnu povezanost između vrednosti srčanog indeksa (CI) i centralne venske saturacije (SvO₂) u svim tačkama merenja. Uticaj vremena nakon ishemije na promenu u koncentraciji laktata visok je statistički značajan ($F=83,17$; $p=0,00$ ANOVA ponavljanih merenja). Primenom post-hoc analize sa Bonferoni korekcijom, detektuje se visoko statistički značajna ukupna međugrupna razlika u koncentraciji laktata ($F=5,65$; $p=0,02$).

Na transkardijalnu razliku pH krvi, nasuprot efektu vremena, efekat postkondicioniranja ostvario je statističko neznačajni efekat ($F=0,38$; $p=0,67$). Na osnovu vrednosti Studentovog t testa nisu pokazane statistički značajne promene u vrednostima razlike u aciditetu između uzoraka krvi iz aortnog korena i koronarnog sinusa u sve tri tačke merenja. Multifaktorska ANOVA ponavljanih merenja pokazuju da je efekat vremena na transkardijalnu koncentraciju glukoze u celoj kohorti statistički visoko značajan ($F=7,29$; $p < 0,001$). Nasuprot tome ista

analitička metoda nije detektovala statistički značajan efekat postkondicioniranja na transkardijalnu koncentraciju glukoze ($F=0,15; p=0,45$). Takođe ni t test nije pokazao statistički značajnu razliku u transkardijalnim koncentracijama šećera u krvi. Studentov t test primenjen je u cilju ispitivanja značajnosti razlike u vrednostima transkardijalne ekstrakcije kiseonika u sve tri tačke merenje. Statsitički značajna razlika nije zabeležena ni nakon 5, 10 niti 20 minuta.

Transkardijalna razlika koncentracije laktata pokazuje negativne vrednosti tokom čitavog vremenskog perioda i to u obe ispitivane grupe, što govori u prilog otpuštanja laktata od strane miokarda. Izmerene vrednosti transkardijalne razlike laktata u 5 minutu negativnije su nego u kasnijim tačkama merenja ali sveukupno uticaj postkondicioniranja na vrednosti transkardijalne razlike laktata statistički nije bio značajan ($F=0,68; p=0,48$). Nasuprot tome, efekat vremena na promene transkardijalne vrednosti laktata statistički je visoko značajan ($F=14,11; p<0,001$ ANOVA ponavljanih merenja). Vrednosti miokardne sekvestracije leukocita bile su konstantno niže u PostK grupi u odnosu na HS grupu u svim tačkama merenja. Primenom post-hoc analize sa Bonferoni korekcijom, detektuje se visoko statistički značajna ukupna međugrupne razlika u sekvestraciji leukocita ($F=8,25; p=0,005$).

Promena vrednosti troponina T u odnosu na vreme od uklanjanja aortne kleme visoko je statitički značajna ($F=90,36; p<0,001; ANOVA$ ponavljanih merenja). Primena multifaktorske ANOVA ponavljanih merenja pokazala je da se grupe međusobno ne razlikuju u odnosu na promenu vrednosti troponina T ($F=0,99; p=0,87$). Pearson-ova korelacija pokazuje statistički značajnu povezanost između vremena trajanja kardio-pulmonalnog bajpasa (CPB), trajanja aortne kleme, vrednosti inotropnog skora i vrednosti troponina T u svim tačkama merenja. Ehokardiografski parametri procene funkcije miokarda ("eyeballing", MAPSE i FS(%)) nisu se značajno razlikovali nultog i prvog post-operativnog dana.

Vrednosti glikemije u celoj kohorti naglo rastu dostižući svoj maksimum 4 sata nakon uklanjanja aortne kleme. Promene vrednosti šećera u krvi u odnosu na vreme od nastanka ishemije statistički su visoko značajne ($F=62,5; p<0,001$). Sa druge strane, multifaktorska ANOVA ponavljanih merenja nije detektovala statistički značajnu međugrupnu razliku u efektu postkondicioniranja na izmerene vrednosti sistemske glikemije ($F=0,897; p=0,46$). Nakon primene t testa u svakoj tački merenja prikazana je statistički značajna razlika u vrednostima hemoglobina u 24 satu i vrednostima hematokrita u 12 i 24 satu između dve grupe sa zabeleženim višim vrednostima u PostK grupi. Izmerene vrednosti saturacije

arterijske krvi kisonikom nakon 24 sata (HS=97,7±1,8; PK=97,9±1,8) niže su od početnih vrednosti (HS=98,9±2,8; PK=98,1±4,1) i ta razlika je statistički visoko značajna (F=4,51;p=0,00 ANOVA ponavljanih merenja).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dosadašnje kliničke studije koje su ispitivale efekat postkondicioniranja u formi ponavljanih klemovanja aorte, nagovestile su veliki značaj primene postkondicioniranja i u dečjoj kardiohirurgiji (Luo i sar. 2007 i 2008). Hemodinamski parametri koje su se merili u studiji nisu pokazali značajan pozitivan efekat etapne reperfuzije. Jedini izuzetak su ukupne vrednosti serumskog laktata unutar prvih 24 časa nakon ishemije čije koje su značajno niže u grupi pacijenata kod kojih je primenjeno postkondicioniranjem. Iako su mnoge studije pokazala da su povišene vrednosti laktata prediktor povišenog mortaliteta i morbiditeta (Maillet i sar. 2003, Zante i sar. 2010) u studiji Dr Mimića nije pokazana takva veza.

Tip reperfuzije i primena postkondicioniranja nije uticala kako na rani mortalitet, tako i na učestalost postoperativnih komplikacija.

Takođe nije registrovana statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u odnosu na trajanje mehaničke ventilacije i dužinu boravka u jedinici intenzivnog lečenja. Takvi rezultati su u skladu sa drugim objavljenim studijama (Luo i sar. 2007,2008) koje su ispitivale efekat postkondicioniranja kod pacijenata operisanih od urođenih srčanih mana slične kompleksnosti.

Za razliku od studije Dr Mimića koja nije pokazala pozitivan uticaj postkondicioniranja na intenzitet inotropne potpore u ranom (24 sata) postoperativnom periodu i inotropni skor Luo i sar. su u svoje dve studije na pedijatrijskim pacijentima registrovali statistički značajno niži inotropni skor.

Hemodinamski parametri koji su se merili u studiji Dr Mimića nisu pokazali značajan pozitivan efekat etapne reperfuzije. Jedini izuzetak su ukupne vrednosti serumskog laktata unutar prvih 24 časa nakon ishemije. U studiji Durdu i sar. pokazane su veće vrednosti kardiak indeksa u prva dva sata nakon operacije u grupi pacijenta kod koga je primenjeno postkondicioniranje, ali u istoj studiji nije registrovana razlika u odnosu na druge hemodinamske parametre (srednji pritisak u plućnoj arteriji, centralni venski pritisak i PCWP-plućni kapilarni "wedge" pritisak).

U studiji Dr Mimića merena je transkardijalna razlika leukocita, Ph krvi, glukoze, laktata i sadržaja kiseonika u 5. 10. i 20. minutu od uklanjanja aortne kleme. Ovi parametri su korišćeni kao surogati metabolizma miokarda i posredni pokazatelji funkcije endotela u najranijoj fazi reperfuzije. U mnogim do sada ranije objavljenim eksperimentalnim studijama (Nakanishi i sar. 1992, Sato i sar 1996), redukcija postishemijske lezije miokarda je dovođenu u vezu sa smanjenom akumulacijom neutrofila i inhibicijom produkcije slobodnih kiseoničnih radikala. U studiji Dr Mimića sekvestracija leukocita od strane miokarda je niža u postK grupi nego u kontrolnoj grupi u sve tri tačke merenja sa postojanjem statistički značajne razlike u ukupnoj sekvestraciji leukocita od strane miokarda. U brojnim drugim eksperimentalnim studijama je takođe pokazano da postkondicioniranje smanjuje akumulaciju neutrofila u fazi reperfuzije. Ova smanjena akumulacija leukocita može potencijalno da atenuira oštećenje endotela na nivou mikrocirkulacije što je opisano u studiji Quillen i sar.

Nivo oslobođenog kardiospecifičnog cTnT u studiji Dr Mimića nije zavisila od primenjene reperfuzine tehnike. Nasuprot tome, u svim kliničkim studijama koje su ispitivale uticaj postkondicioniranja je pokazano smanjeno oslobađanje kardiospecifičnih enzima u ranom postoperativnom periodu (Durdu i sar. 2012, Luo i sar 2007, Staat i sar. 2005). Studija Dr Mimića je potvrdila postojanje snažne korelaciju između nivoa kardiospecifičnih enzima i ranih kliničkih ishoda.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Mimić B, Ilić S, Vulićević I, Milovanović V, Tomić D, Mimić A, Stanković S, Zečević T, Davies B, Djordjević M. Comparison of high glucose concentration blood and crystalloid cardioplegia in paediatric cardiac surgery: a randomized clinical trial. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. 2016 May;22(5):553-60.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija “Značaj protekcije miokarda etapnom reperfuzijom u toku operativnog lečenja urođenih srčaniha mana ” kandidata dr Branka Mimića predstavlja značajno i aktuelno originalno kliničko istraživanje. Ispitivanja različitih kardioprotektivnih strategija, a koje se pri tome odnose na primenu postkondicioniranja u formi etapne reperfuzije toplom krvnom kardioplegijom, do sada nisu rađena u našoj zemlji. Primenom sistema za kardioplegiju dr Mimić na jednostavan i siguran način ispituje značaj postkondicioniranja na

funkcionalni i metabolički oporavak miokarda nakon operacija urođenih srčanih mana. Rezultati studije kandidata Dr Mimića nisu pokazali superiornost etapne reperfuzije miokarda toplom krvnom kardioplegijom u odnosu na standardnu kontinuiranu toplu krvnu kardioplegičnu reperfuziju. Brzina funkcionalnog i metaboličkog oporavka miokarda, kao i rani klinički rezultati nisu zavisili od primenjene reperfuzione tehnike. Postkondicioniranje je dovelo da značajnog smanjenja sekvestracije leukocita od stane miokarda u prvih 20 minuta nakon reperfuzije što potencijalno može da ima značajan uticaj na atenuaciju neutrofilima indukovano oštećenja vaskularnog endotela i miocita. Ova doktorska disertacija urađena je prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Dr Branka Mimića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu 12.07.2018.

Članovi komisije

Prof dr Vojislav Parezanović

Prof dr Mila Stajević

Prof dr Petar Stojanov

Mentor

Prof dr Slobodan Ilić