

Оцена готове докторске тезе,
доставља-

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МФ
ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ

На 17. седници Наставно-научног већа ВМА, одржаној 27.02.2014.г. одређена је комисија за оцену готове докторске тезе ппук.асист.мр сц.мед. Зорана Трифуновића из Клинике за кардиохирургију ВМА чија тема гласи:

„ИНТРАМИОКАРДНА ИМПЛАНТАЦИЈА АУТОЛОГНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЂЕЛИЈА КОСТНЕ СРЖИ У ПЕРИИНФАРКТНУ ЗОНУ У ТОКУ ХИРУРШКЕ РЕВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ МИОКАРДА У ЦИЉУ ПОБОЉШАЊА СРЧАНЕ ФУНКЦИЈЕ“

Након увида у достављени материјал и разговора са кандидатом, комисија у саставу:

ВС проф. др Анђелка Ристић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; ВС доц. др Гордана Остојић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду; Доц. др Иван Стојановић, Институт за кардиоваскуларне болести Дедиње, Медицински факултет Универзитета у Београду, подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација је написана на 89 страна текста и подељена је на следећа поглавља: УВОД (33 стране), ХИПОТЕЗА ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЧКОГ РАДА (13 страна), РЕЗУЛТАТИ (12 страна), ДИСКУСИЈА (8 страна), ЗАКЉУЧЦИ (2 стране) и ЛИТЕРАТУРА (16 страна). Документована је са 32 слике, 14 табела, 6 графикона, 1 дијаграмом. У раду је цитирано 168 литературних података.

2. Увод, хипотеза и циљеви истраживања

У овом раду **тема** истраживања припада области регенеративне медицине: употребе стем ћелијске терапије у току хируршке реваскуларизације миокарда код пацијената са исхемијском кардиомиопатијом у циљу поправљања функције миокарда и успоравања процеса ремоделовања леве коморе.

У циљу дефинисања научног проблема, кандидат у **уводу** представља проблем срчане слабости као последице исхемијских удара, објашњава појмове, дијагностику, патофизиологију настанка исхемијске кардиомиопатије и савремене медикаментозне и хируршке терапијске могућности. Даље детаљно разматра досадашња сазнања и резултате преклиничких испитивања и ретких клиничких покушаја употребе различитих ћелијских типова у циљу регенерације исхемијом оштећене функције миокарда. Анализом ретких клиничких студија запажа различит начин и пут примене ћелијске терапије. Доминира интракоронарни начин примене у акутном инфаркту миокарда. Врло ретко интрамиокардни приступ, и то чешће трансендокардни као самосталан начин терапије код постојања хроничне исхемије, а знатно ређе трансепикардно у комбинацији са хируршком реваскуларизацијом код исхемијске кардиомиопатије. Кандидат указује на неконзистентност резултата, хетерогеност примењене ћелијске популације, ограничене могућности евалуације резултата и врло ретко праћење дуже од 6 до 12 месеци након примењене терапије, као и чест губитак иницијалних ефеката терапије у дугорочном праћењу.

Из свега наведеног кандидат је поставио **хипотезу** да:

Интрамиокардна имплантација аутологних моноклеарних ћелија костне сржи у периинфарктну зону, у току хируршке реваскуларизације миокарда аорткоронарним премошћивањем (бајпас хирургијом), код пацијената са ослабљеном функцијом леве коморе (исхемијском кардиомиопатијом) због претходних исхемијских удара, доводи до: значајног побољшања функције леве коморе, побољшања перфузије миокарда и унапређења клиничких и биохемијских параметара који указују на тежину срчане инсуфицијенције у односу на контролну групу пацијената којима је рађена само класична хируршка реваскуларизација миокарда без примене ћелијске терапије.

За проверу ове хипотезе кандидат је дефинисао **циљеве истраживања**:

Упоредити ехокардиографски добијене вредности ејекционе фракције леве коморе мерене Симпсоновом методом пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити ехокардиографски индексе сегментне покретљивости леве коморе (WMSI - 16 segment wall motion score index) пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити ехокардиографски измерене вредности ендсистолног волумена леве коморе (ЕСВЛК) (LVESV - left ventricular endsistolic volume) и енддијастолног волумена леве коморе (ЕДВЛК) (LVEDV - left ventricular enddiastolic volume) пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити ехокардиографски израчунате вредности ендсистолног индекса волумена леве коморе (ЕСВИЛК) (LVESVI - left ventricular endsistolic volume index) као значајног предиктора за развој срчане слабости, динамику ремоделовања леве коморе и прогностичког фактора преживљавања, пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити пространост зоне дефекта перфузије (defect extent) добијених помоћу SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) анализе пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити вредности серумског BNP-а (Brain Natriuretic Peptide) пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити припадност NYHA функционалној групи пре процедуре (базална вредност) и шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

Упоредити функционално кондиционо стање пацијената мерењем пређене дистанце у току шестоминутног теста хода (6-Minute Walk Test) шест месеци, годину дана и приликом последње контроле после процедуре код пацијената у обе групе.

3. Кратак опис постигнутих резултата

У поглављу **Испитаници и методе истраживачког рада** представљен је дизајн истраживања-тип студије: Проспективна клиничка интервентна отворена рандомизована студија једног центра са адекватно упареном контролном групом пацијената.

Ова докторска дисертација је израђена у Клиници за кардиохирургију ВМА у Београду у оквиру НИ пројекта Матичне ћелије костне сржи у лечењу исхемијске болести срца (ВМА/07-09/Б.12). Клиничку студију је одобрио етички комитет ВМА, на мајској седници 2005.г. и поново на мајској седници 2012.г. Приказан је профил и групе испитаника: испитивањем је обухваћено 30 кардиохируршких болесника са постинфарктном исхемијском кардиомиопатијом подељених у две групе: Прву групу од 15 пацијената

којима је поред комплетне хируршке реваскуларизације миокарда аортокоронарним премошћивањем рађена и пероперативна интрамиокардна имплантација аутологних моноклеарних ћелија костне сржи, и Другу групу, контролну, од 15 пацијената којима је рађена комплетна хируршка реваскуларизација миокарда аортокоронарним премошћивањем без имплантације ћелија. Бирани су пацијенти истих улазних карактеристика-критеријума за групу. Стручно и у складу са расположивим могућностима ВМА, а ради адекватне евалуације добијених резултата одређена су одговарајућа обележја посматрања: припадност NYHA функционалној класи; вредност серумског BNP-а; ехокардиографски преглед са мерењем: ЕФЛК - ејекционе фракције леве коморе модификованом Симпсоновом методом, WMSI - индекса сегментне покретљивости леве коморе – (16 segment wall motion score index), LVESV - ендсistolног волумена леве коморе (LVESV-left ventricular endsistolic volume), LVEDV - енддијастолног волумена леве коморе (LVEDV-left ventricular enddiastolic volume), LVESVI - вредности ендсistolног индекса волумена леве коморе (LVESVI - left ventricular endsistolic volume index); СРЕСТ перфузиона сцинтиграфија миокарда ^{99m}Tc MIBI са мерењем дефекта у перфузији миокарда; и 6-Minute Walk Test- мерење пређене дистанце у току шестоминутног теста хода (због тежине болести преоперативно није рађен тест већ само постоперативно после 6 месеци, годину дана и касније на годишњим контролама). Испланирана је методологија испитивања у оквиру које је и потпуно оригинално осмишљен и спроведен оперативни поступак интрамиокардне имплантације моноклеарних ћелија аутологне костне сржи студијској групи испитаника.

У **статистичкој обради података** вредности нумеричких обележја посматрања изражене су као средња вредност \pm стандардна девијација, док су категоријална обележја изражена њиховим апсолутним и релативним учесталостима. Нормалност расподеле нумеричких обележја тестирана је Kolmogorov-Smirnovljev-им тестом.

Од аналитичких статистичких метода коришћени су: Fisher-ов тест тачне вероватноће, Student-ов t-тест за независне узорке, ANOVA за дизајн поновљених мерења („mixed-design ANOVA“), Pearson-ова корелациона анализа, непараметријска ANOVA за понављана мерења (Friedman test), и Mann-Whitney тест. Ниво значајности за одбацивање нулте хипотезе дефинисан је као $p < 0,05$. Сви статистички прорачуни рађени су у софтверском пакету SPSS 17.0.

Добијени **резултати** показују да између болесника у групи 1 (МНЋКС и АКБП) и групи 2 (само АКБП) није било статистички значајне разлике у вредностима континуираних обележја посматрања нити у учесталостима категоријалних обележја ($p > 0,05$), изузев у учесталости хиперлипопротеинемике која је била учесталија у групи 1 ($p = 0,035$). Сви испитивани болесници су имали бар један претходни инфаркт миокарда предње

локализације, док су пет испитаника групе 1 (МНЋКС и АКБП) и један испитаник из групе 2 (само АКБП) имали два претходна инфаркта.

Код свих болесника у обе групе просечно су имплантирана $3,4 \pm 1,0$ коронарна графта, а између испитиваних група није нађена статистички значајна разлика у броју графтова ($3,3 \pm 1,1$ у групи 1 и $3,5 \pm 0,9$ у групи 2; $p=0,476$). У групи болесника који су добили матичне ћелије (група 1), просечно је учињено $17,5 \pm 3,8$ ињекција суспензије матичних ћелија уз просечан убризгани број моноклеарних ћелија костне сржи од $70,7 \pm 32,4 \times 10^6$ у волумену од $5,7 \pm 1,5$ ml. У овом волумену одређен је просечан број CD 34+ ћелија ($3,96 \pm 2,77 \times 10^6$), и CD 133+ ћелија ($2,65 \pm 1,71 \times 10^6$).

Праћењем клиничких карактеристика болесника у моменту последњег клиничког праћења болесника (период од 3 до 7 година након операције у групи 1 и 2 до 7 година након операције у групи 2), статистички значајно више болесника било је у NYHA класи I у групи 1 у односу на исту категорију болесника у групи 2 (14 према 5; $p=0,002$). Растојање пређено током бМWT-а се статистички значајно разликовало између група већ после 6 месеци од интервенције (435 метара у групи 1; 315 метара у групи 2; $p=0,001$), да би се ова разлика одржавала и у периоду након 12 месеци (499 метара према 338 метара; $p<0,001$), и закључно до тренутка последњег клиничког праћења (520 метара према 343 метра; $p<0,001$). Кардиоваскуларни морталитет такође је био статистички значајно мањи у групи болесника лечених применом матичних ћелија у односу на контролну групу (0 од 15 према 4 од 15, $p=0,049$).

Ејекциона фракција леве коморе била је статистички значајно већа у групи леченој матичним ћелијама, у поређењу са контролном групом, већ након 6 месеци од операције (44,8% према 37,7%; $p=0,006$), и ова разлика се одржавала и након годину дана (47,0% према 37,1%; $p<0,001$), закључно са последњим клиничким праћењем болесника (45,3% према 33,9%; $p<0,001$). Статистички значајне разлике добијене су и регистравањем ехокардиографских параметара (WMSI, LVEDV, LVESV и LVESVI) који су такође постали значајно различити код испитиваних група након 6 месеци од интервенције и одржавали се кроз читав период праћења (графикони 2 и 3). Ове чињенице указују на постојање боље систолне функције леве коморе и знатно мање изражен, односно успорен и заустављен процес ремоделовања леве коморе код болесника који су добили ћелијску терапију.

Величина скинтиграфски измереног перфузионог дефекта била је статистички значајно мања код групе лечене матичним ћелијама, а ова разлика је уочена након 6 месеци од интервенције (19% према 27%; $p=0,022$) и одржавала се након годину дана (19% према 27%; $p=0,016$) и све до последњег праћења болесника (19% према 27%; $p=0,016$).

Вредности серумског BNP-а показивале су тренд ка нумерички нижим концентрацијама код болесника лечених матичним ћелијама након 6 месеци од интервенције ($p=0,052$), али овај тренд није резултирао статистички значајним разликама током периода праћења болесника ($p>0,05$). Ипак уколико знамо да је гранична вредност (cut-off value) BNP-а која се узима као показатељ срчане слабости 150pg/mL , онда се из табеле и графикона види да су средње вредности BNP-а пацијентима којима је рађена процедура имплантације МНЋКС и АКБП све време праћења постоперативно испод ове границе.

4. Оцена резултата истраживања

У поглављу дискусија кандидат је детаљно и критички коментарисао добијене резултате у светлу постојећих доступних литературних података и објављених резултата ретких сличних клиничких студија које су користиле сличну методологију са различитим врстама примењених ћелија и различитим начинима примене. Упадљива разлика постоји у дужини праћења пацијената у корист актуелне кандидатове студије, које је вишеструко дуже од било које друге објављене сличне студије. У поређењу са другим методама примене, интрамиокардна примена омогућује поуздану имплантацију већег броја ћелија и прецизније одређивање циљног места у оквиру региона хроничног инфаркта и његових граничних зона. Детаљном анализом добијених резултата пратећи параметре који указују на функцију леве коморе и процес њеног ремоделовања, указано је на значајну предност лечења пацијената са исхемијском кардиомиопатијом, који су кандидати за хируршку реваскуларизацију миокарда и симултаном применом имплантације моноклеарних ћелија аутологне костне сржи. Резултати врло брзо постоперативно указују на постојање значајне позитивне разлике у односу на пацијенте који су лечени само класичном хируршком реваскуларизацијом миокарда аорткоронарним премошћењем. Ови резултати нису привремени већ се у даљем дугорочном праћењу одржавају и доводе до још већих разлика што се на крају одражава и у мањем кардиогеном морталитету код групе пацијената са примењеном ћелијском терапијом. Резултати даље указују на значајно бољи функционални, вежбовни капацитет ових пацијената у односу на пацијенте из контролне групе.

5. Објављени радови и саопштења који чине део тезе

1. **Zoran Trifunović, Slobodan Obradović, Bela Balint, Radoje Ilić, Zoran Vukić, Marija Dopuđa, Jelena Kostić, Siniša Rusović, Milan Dobrić, Gordana Ostojić. Safety and Feasibility in Long Term Follow-up Study of Patients with Ischemic Cardiomyopathy Treated with Coronary Artery Bypass Surgery and Concomitant Intramyocardial Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation.**

Рад је под ИД бројем 5296 рецензиран и прихваћен за објављивање и штампу у Војносанитетском прегледу.

2. **Obradovic S, Balint B, Trifunovic Z. Stem Cell Therapy in Myocardial Infarction Clinical Point of View** and the Results of the REANIMA Study (REgenerAtion of Myocardium with boNe Marrow Mononuclear Cells in MyocAr dial Infarction), In **Stem Cells in Clinic and Research**, Edited by Gholamrezanezhad, John Hopkins University, InTech 2011, 233-58.
3. **Trifunović Z., Ilić R., Obradović S, Balint B. Peroperative Intramyocardial Implantation of Autologus Bone Marrow Stem Cells During Coronary Artery Bypass Grafting Surgery-Initial Observations and Experience.** The Journal of Cardiovascular Surgery. 2012;53(Suppl.1):35.
4. **Trifunović Z., Ilić R., Obradović S., Dopudja M., Mandarić V., Marković Z., Tišma S. Peroperative Intramyocardial Implantation of Autologus Bone Marrow Stem Cells During Coronary Artery Bypass Grafting Surgery-Initial Observations and Experience** The 1st Heart Surgery Forum Meeting, How to manage unsolvable cases and major disasters in cardiac surgery- Abstract Book,2010;str.57.
5. **Trifunović Z., Ilić R., Balint B., Obradović S., Dopudja M., Mandarić V., Marković Z., Tišma S. STEM CELLS IMPLANTATION IN PERIINFARCT ZONE DURING CABG** -Third International Branislav Brano Radovancevic Heart Failure Forum. 2010. Predavanje po pozivu.

6. Закључно мишљење и предлог

Докторска теза ппук.асист.мр сц.мед. Зорана Трифуновића из Клинике за кардиохирургију ВМА под насловом: „ИНТРАМИОКАРДНА ИМПЛАНТАЦИЈА АУТОЛОГНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА КОСТНЕ СРЖИ У ПЕРИИНФАРКТНУ ЗОНУ У ТОКУ ХИРУРШКЕ РЕВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ МИОКАРДА У ЦИЉУ ПОБОЉШАЊА СРЧАНЕ ФУНКЦИЈЕ“ представља оригиналан актуелан рад, клиничку студију из области кардиохирургије и регенеративне медицине. Истраживање у овој студији је спроведено систематично, студиозно и целовито. Кандидат је показао опширно и детаљно познавање проблематике коју је изабрао за своје изучавање. Студију је започео 2006.године у време када је она била апсолутно савремена и актуелна и једна од пар ретких оригиналних клиничких истраживања у области регенеративне медицине и примене ћелијске терапије код пацијената са исхемијском кардиомиопатијом. Студија и данас представља врло актуелну проблематику и доноси драгоцене врло добро документоване резултате, са дугорочним студиозним праћењем испитаника, који охрабрују и дају нову димензију у лечењу хроничне исхемијске болести срца представљене исхемијском кардиомиопатијом. На основу резултата добијених спроведеном студијом, имајући у виду и њена ограничења, можемо закључити да примена имплантације МНТКС у току хируршке ревакуларизације миокарда аортокоронарним премошћивањем, код пацијената са исхемијском кардиомиопатијом, постоперативно доводи до значајног побољшања функције леве коморе, побољшања перфузије миокарда и унапређења клиничких и биохемијских параметара који указују на тежину срчане инсуфицијенције у односу на контролну групу пацијената којима је рађена само класична хируршка ревакуларизација миокарда без примене ћелијске терапије. Имајући у виду да је број болесника са исхемијском болешћу срца у сталном порасту, да су компликације инфаркта миокарда у смислу развоја срчане инсуфицијенције у јако високом проценту и да је све већи број младих људи са овим обољењем, значај ћелијске терапије, као опције регенеративне медицине, заокупља све већу пажњу стручних кругова који се баве овом проблематиком, а добијени резултати представљају значајан допринос у изналажењу нових модалитета њиховог лечења. Имплантација мононуклеарних ћелија порекла аутологне костне сржи у срчани мишић током планиране хируршке ревакуларизације миокарда нуди обећавајуће резултате у смислу смањења величине фиброзе унутар постинфарктног ожиљка, смањења глобалне дилатације срчаног мишића, повећања дебљине зидова коморе и поправљања еластичитета, регионалне и глобалне контрактилности срца и успоравања процеса ремоделовања леве коморе. Враћањем пацијената из функционалне NYHA III-IV класе пре операције, у NYHA I-II класу после операције, унапређењем кондиционог стања, успоравањем и спречавањем ремоделовања срчаног мишића побољшава се функционални

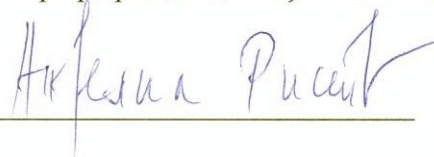
капацитет, радна способност и квалитет живота пацијената и продужава њихов животни век.

Чланови комисије сагласни су у закључку да докторска теза ппук.асист.мр сц.мед. Зорана Трифуновића испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева и представља значајан и оригиналан допринос у проучавању и лечењу исхемијске болести срца. Комисија једногласно предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, с обзиром да су испуњени сви законски услови за јавну одбрану докторске тезе, да извештај прихвати и одобри јавну одбрану докторске дисертације под насловом „ИНТРАМИОКАРДНА ИМПЛАНТАЦИЈА АУТОЛОГНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА КОСТНЕ СРЖИ У ПЕРИИНФАРКТНУ ЗОНУ У ТОКУ ХИРУРШКЕ РЕВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ МИОКАРДА У ЦИЉУ ПОБОЉШАЊА СРЧАНЕ ФУНКЦИЈЕ“ .


У Београду, 03.03.2014.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

ВС проф.др сц.мед. Анђелка Ристић



ВС доц.др сц.мед. Гордана Остојић



Доц.др сц.мед. Иван Стојановић

