

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.11.2017. godine, broj 5940/13, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj hipoksije na koncentracije elektrolita i lipida terminske novorođenčadi“**

kandidata dr Miljane Jovandarić, zaposlene u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, Mentor je Prof. dr Miloš Ješić, Komentor je Prof. dr Petar Ivanovski

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Silvija Sajić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Dragana Bogičević, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Slobodan Obradović, Fakultet Medicinskih Nauka, Univerzitet u Kragujevcu

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

## **IZVEŠTAJ**

### **A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija dr Miljane Jovandarić napisana je na ukupno 91-oj strani i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 24 tabele i 9 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisan pojam asfiksije, hipoksije i ishemije i istaknut njihov značaj u patogenezi poremećaja funkcionisanja organa, sistema i ćelija. Detaljno je izložen mehanizam nastanka multiorganskog postasfiktičnog oštećenja. Izvesno je da gubitak funkcije ćelijske

membrane predstavlja primarni događaj u nastanku ćelijskih oštećenja u uslovima hipoksije, ali definitivna osnova mehanizama zbog kojih nastaje membranska disfunkcija ostaje još uvek nejasna. Potrebno je naglasiti postojanje sledećih potencijalnih mehanizama: poremećaj jonske homeostaze, peroksidacija membranskih lipida, unakrsno povezivanje membranskih proteina i povećana razgradnja fosfolipida.

Poseban akcenat je stavljen na povezanost hipoksije i lipidne peroksidacije. Pretpostavlja se da i cirkulišući lipidi plazme, odnosno serumski lipidi podležu procesima oksidacije, peroksidacije i uklanjanju iz cirkulacije.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Ciljevi istraživanja su bili da se utvrdi uticaj hipoksije na koncentracije elektrolita  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , jonizovanog  $\text{Ca}^{++}$ , u prvom i drugom satu života u arterijalizovanoj kapilarnoj krvi., uticaj hipoksije na koncentracije elektrolita:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  u plazmi novorođenčadi u drugom danu života, uticaj hipoksije na koncentracije ukupnog holesterola, lipoproteina niske gustine (LDL), lipoproteina visoke gustine lipoproteini (HDL) u plazmi novorođenčadi u drugom danu života, kao i uticaj hipoksije na koncentracije triglicerida u plazmi novorođenčadi u drugom danu života.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj studiji koja je sprovedena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog Centra Srbije. Detaljno je opisan način formiranja grupa novorođenčadi koja su ispitivana, a radilo se o studijskoj grupi koja se sastojala od 50 novorođenčadi sa hipoksijom, rođenih u terminu, prirodnim putem ili carskim rezom koja su izložena terapiji kiseonikom nakon rođenja. Kontrolna grupa se sastojala od 50 zdrave novorođenčadi, rođene u terminu, prirodnim putem ili carskim rezom bez potrebe za primenom kiseonične terapije. Jasno su naznačeni kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja. Uzorci krvi su uzimani u prvom i drugom satu života zbog određivanja acido baznog statusa i elektrolita iz arterijalizovane kapilarne krvi kod obe grupe novorođenčadi, dok je u drugom danu života uzimana venska krv kod obe grupe novorođenčadi radi određivanja serumskih elektrolita i lipida. Uzorci krvi su zatim centrifugirani a iz seruma određivani lipidi i elektroliti. Ova studija odobrena je od strane Etičkog komiteta Klinike za ginekologiju i akušerstvo, Etičkog komiteta Kliničkog Centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve majke čija su novorođenčad bila uključena u istraživanje su detaljno informisane o ciljevima studije i dale su pisani pristanak pre uključivanja u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati tabelarno, grafički i tekstualno.

**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 177 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati ove studije su pokazali da se grupe novorođenčadi nisu razlikovale po gestacijskoj zrelosti, polu i načinu zaršetka porođaja  $p > 0,05$ . Analizom AS u prvom i petom minutu života nađena je visoko statistički značajna razlika između grupa  $p < 0,01$ . Poređenjem vrednosti pH,  $pCO_2$ ,  $pO_2$ ,  $HCO_3$  i BE u prvom satu života kod novorođenčadi sa hipoksijom dobijene su niže vrednosti pH, više  $pCO_2$ , niže  $pO_2$ , niže  $HCO_3$ , i više BE  $p < 0,01$ . U drugom satu života kod novorođenčadi sa hipoksijom dobijene su niže vrednosti pH, više  $pCO_2$ , niže  $pO_2$ , i više BE  $p < 0,01$ , kao i niže vrednosti  $HCO_3$  bez statistički značajne razlike  $p > 0,05$ .

Poređenjem koncentracije  $Na^+$  u prvom satu života iz arterijalizovane kapilarne krvi kod hipoksične novorođenčadi dobijene su niže vrednosti  $p < 0,01$ ; u drugom satu života nađene su niže koncentracije  $Na^+$ , ali bez statistički značajne razlike  $p > 0,05$ . Poređenjem koncentracije  $K^+$  u prvom satu i drugom danu života dobijena je viša vrednost  $p < 0,01$ ; u drugom satu života nađena je viša vrednost  $K^+$ , ali bez statistički značajne razlike  $p > 0,05$ . Poređenjem koncentracije jonizovanog  $Ca^{++}$  u prvom i drugom satu posle rođenja (arterijalizovana kapilarna krv), kao i koncentracije  $Na^+$ , ukupnog  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$  u plazmi drugog dana života, dobijene su niže koncentracije  $p < 0,01$ . Ispitivanjem koncentracije TC, LDL, TG u plazmi u drugom danu života dobijene su niže vrednosti u grupi novorođenčadi sa hipoksijom na oksigenoterapiji  $p < 0,01$ , kao i HDL  $p < 0,05$ .

## **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Postoji nedostatak podataka o učestalosti perinatalne asfiksije/hipoksije. U razvijenim zemljama sa dobro organizovanom perinatalnom službom incidenca je 1-6/1000 terminske novorođenčadi, do 5,4/1000 u Švedskoj kasnih osamdesetih godina, gde su istraživanjem obuhvaćena novorođenčad sa AS  $< 7$  u 5. om minutu života ili u regiji Stokholma 2,56/1000,

studija je obuhvatala novorođenčad sa AS <3 u 5. om minutu života. Preciznih podataka o incidenci perinatalne asfiksije/hipoksije u našoj zemlji za sada nema.

Metabolička acidoza je sistemski poremećaj uzrokovan smanjenjem pH (odnosno povećanjem  $H^+$ ) zbog primarnog smanjenja  $HCO_3$  u plazmi. Kao posledica acidemije, medularni hemoreceptori su stimulisani i izazivaju hiperventilaciju. Kao rezultat hiperventilacije smanjuje se  $pCO_2$ , pa se  $HCO_3$ , pH i BE vraćaju na normalne vrednosti.

Novorođenčad sa perinatalnom asfiksijom su pod velikim rizikom da razviju akutnu bubrežnu insuficijenciju (ABI), koja se definiše kao nagli pad u funkciji bubrega što dovodi do poremećaja u balansu tečnosti i elektrolita. U prerenalnoj fazi sposobnost tubula da očuva reapsorpciju natrijuma je očuvana. Kao odgovor na hipovolemiju tubuli maksimalno reapsorbuju natrijum iz glomerularnog filtrata, uslovljavajući nisku ekskreciju natrijuma, dok je kod akutne tubulske nekroze frakciona renalna ekskrecija natrijuma povećana izlučivanjem natrijuma urinom. Težina oštećenja bubrežne funkcije korelira sa stepenom asfiksije. Niže koncentracije natrijuma u prvom satu i drugom danu života se mogu objasniti radovima (Aperia i sar.,2016; Nyblom Mi sar.,2013), koji su dokazali da je akumulacija natrijuma u ćeliji tokom ishemije neposredan uzrok intracelularnog nagomilavanja vode. Kao zamena za kalijum,  $Na^+$  ulazi u ćeliju, što dovodi do intracelularnog edema. Povećava se permeabilnost ćelijske membrane kapilara pa dolazi do nagomilavanja tečnosti u intersticijumu. Odsustvo statistički značajne razlike u drugom satu života, uz niže koncentracije natrijuma u grupi novorođenčadi sa hipoksijom na oksigenoterapiji se mogu objasniti natriuretskim dejstvom atrijskog natriuretskog hormona kao i prolaznim poremećajem bubrežne funkcije praćene povećanim gubitkom natrijuma urinom.

Shimoda i sar., 2011. navode u svom istraživanju da hipoksija sprečava protok kalijuma kroz ćelijsku membranu redukujući njegov neto fluks, a takođe menja funkciju nekoliko tipova  $K^+$  kanala naročito u nervnim ćelijama. Više koncentracije  $K^+$  u prvom satu života i drugom danu života se mogu objasniti smanjenjem glomerulske filtracije i oligurije koje ograničavaju izlučivanje kalijuma urinom. Aldosteron ima važnu ulogu u regulaciji volumena i osmolalnosti ekstraćelijske tečnosti na nivou bubrega. Najverovatnije mesto delovanja aldosterona su kortikalni sabirni kanalići bubrega. Glavni stimulans za sekreciju aldosterona je porast koncentracije kalijuma u ekstracelularnoj tečnosti. Izlučeni aldosteron stimuliše ekskreciju kalijuma stimulišući  $Na^+ - K^+$  pumpu i vraća nivo plazmatskog kalijuma na referentne vrednosti, što može objasniti više vrednosti  $K^+$  u drugom satu života ali bez statistički značajne razlike.

Mogući mehanizam sniženja koncentracije  $\text{Ca}^{++}$  je aktivacija lipolitičkog enzima fosfolipaze  $\text{A}_2$ , mitohondrijalne membrane, koji zajedno sa lipidnom peroksidacijom dovodi do oštećenja transportnih i energetske sistema, što izaziva insuficijenciju ćelije, poremećaj tubulske funkcije, koja vodi akutnoj bubrežnoj insuficijenciji praćenoj povećanjem kalciurije što se slaže sa nižim vrednostima jon.  $\text{Ca}^{++}$  u prvom i drugom satu života iz arterijalizovane kapilarne krvi kao i nižim vrednostima ukupnog serumskog  $\text{Ca}^{++}$  u drugom danu života u grupi novorođenčadi sa hipoksijom na oksigenoterapiji u odnosu na grupu zdrave novorođenčadi.

Transport  $\text{Cl}^-$  se odvija preko  $\text{Cl}^-$  stimulisane ATP-aze. Joni hlora pasivno slede jone natrijuma, a zbog osmotskog gradijenta ulazi voda dovodeći do ćelijskog edema. U uslovima hipoksije dolazi do pada energije fosfata i otkazivanja  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  pumpe zavisne od ATP-a. Navedenim se mogu objasniti niže vrednosti jona hlora u drugom danu života kod novorođenčadi sa hipoksijom na oksigenoterapiji.

U našem istraživanju koncentracije ukupnog holesterola u drugom danu života nađene su niže vrednosti ukupnog holesterola u grupi novorođenčadi sa hipoksijom na oksigenoterapiji, koje se mogu objasniti radovima (Girotti et al., 2017; Sharpe et al., 2014; Yoshida et al., 2003). U plazmatskoj membrani gde se nalazi većina ćelijskog holesterola, peroksidacija dovodi do strukturnog i funkcionalnog oštećenja membrane. Peroksidacijom holesterola dolazi do razlaganja masno-kiselinskih ostataka i oslobađanja malondialdehida i drugih produkata, ali i lizolecitina koji je hemotoksički agens za monocite i T- limfocite. Monociti "uzimaju" lipoproteine i postupno se pretvaraju u penaste ćelije. Dolazi do aktivacije komplementa i inflamacijske reakcije na intimi krvnog suda.

Lipoproteini niske gustoće (LDL) sadrže isključivo Apo B-100 i najčešće su oksidisani lipidi. Ova osetljivost na oksidaciju može se pripisati osobinama membrane i spoljne površine jezgra, gde se nalaze dva lipidna omotača. Ćelijska membrana je najpodložnija peroksidaciji kao posledica visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, dovodeći do niže koncentracije LDL holesterola u drugom danu života.

Lipoproteini velike gustine (HDL), u svom sastavu imaju najveći procenat Apo A-I, koji omogućava esterifikaciju slobodnog holesterola na površini čestice. U nešto manjem procentu je zastupljen Apo A – II. Lipidna peroksidacija zahvata lipide, holesterol i apolipoproteine HDL čestice, smanjujući koncentraciju HDL holesterola u plazmi drugog dana života.

Snižene koncentracije triglicerida u plazmi drugog dana života nastaju kao rezultat dejstva lecitin holesterol-aciltransferaze koja u uslovima intraportalne acidoze dovodi do oksidacije masnih kiselina triglicerida masnog tkiva.

Svi mogući pobrojani mehanizmi treba da budu dokazani odgovarajućim naučnim studijama u novorođenačkoj populaciji sa i bez perinatalnehipoksije.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

Jovandaric MZ, Nikolic TV, Milenkovic SJ, Otašević BS, Bankovic VV, Ivanovski PI, Jesic MM. Lipids on the Second Day in Ischemic and normoxemic Term Neonates. Fetal Pediatr Pathol. 2017 ;36(4):276-281.

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Uticaj hipoksije na koncentracije elektrolita i lipida terminske novorođenčadi“ dr Miljane Jovandarić, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama ćelijskog oštećenja nastalog kao posledica hipoksije. Rezultati studije su pokazali da kod hipoksične novorođenčadi dolazi do promene koncentracije elektrolita, nižih vrednosti  $\text{Na}^+$  u prvom i drugom satu života iz arterijalizovane kapilarne krvi, povišenih vrednosti  $\text{K}^+$  u prvom i drugom satu života (arterijalizovana kapilarna krv) kao i drugom danu života iz plazme. Koncentracije jonizovanog  $\text{Ca}^{++}$  u prvom i drugom satu posle rođenja (arterijalizovana kapilarna krv), kao i koncentracije  $\text{Na}^+$ , ukupnog  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Cl}^-$  u plazmi drugog dana života su bile sniženih vrednosti.

Ispitivanjem koncentracije TC, LDL, HDL, TG u plazmi u drugom danu života dobijene su niže vrednosti u grupi hipoksične novorođenčadi.

Statistički značajno odstupanje koncentracije elektrolita i lipida kod novorođenčadi sa hipoksijom otvara mogućnost upotrebe novih markera perinatalne asfiksije.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, 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 Miljane Jovandarić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 28.11.2017. god.

Članovi Komisije:

Prof. dr Silvija Sajić

---

Doc. dr Dragana Bogićević

---

Prof. dr Slobodan Obradović

---

Mentor:

Prof dr Miloš Ješić

---

Komentor

Prof. dr Petar Ivanovski

---