

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 19.03.2015. godine, broj 4600/13, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Neinvazivno ispitivanje arterijske splahnhične cirkulacije u cirozi jetre: povezanost sa serumskim azot monoksidom (NO) i amonijakom”**

kandidata Mr dr Tijane Glišić, zaposlene u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Mirjana Perišić i komentor je Prof. dr Vladimir Jurišić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof dr Miodrag Krstić, professor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Goran Janković, professor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragomir Damjanov, professor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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 Mr sc Tijane Glišić napisana je na 120 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metodologija rada, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze četiri slike, jedna shema, 32 tabele i 74 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisana ciroza jetre i osnovne patofiziološke posledice anatomskih promena u jetri - portna hipertenzija i hepatocelularna insuficijencija. Objasnjene su hemodinamske abnormalnosti koje dovode do retencije vode i soli, ascitesa i bubrežnog oštećenja. Detaljno su navedene vaskularne promene u vidu hiperdinamske cirkulacije i splanhnične vazodilatacije koje dovode do porasta intravaskularnog volumena, kao i arterijska vazodilatacija koja je regulisana kompleksnom interreakcijom različitih vazoaktivnih molekula i faktora.

Poseban akcenat je stavljen na objašnjenje uloge vaskularnog azot-monoksida u cirozi jetre, regulaciji intrahepatičke endotelne sintetaze u ovoj bolesti i uloge azot-monoksida u regulisanju splanhničnog krvotoka u cirozi jetre. Opisana je uloga vaskularnog endotela i vazoaktivnih supstanci koje se iz njega oslobađaju i utiču na hepatičku mikrocirkulaciju. Predstavljani su i značajni efekti azot-monoksida kao medijatora hemodinamskih abnormalnosti i retencije soli i vode u cirozi jetre.

Objašnjen je značaj amonijaka, produkta metabolizma proteina, kao potencijalnog vazoaktivnog medijatora u portnoj hipertenziji čiji je efekat na splanhnični krvotok relativno malo ispitan do sada.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se u merenju nivoa azotnih produkata metabolizma, serumskog azot-monoksida i serumskog amonijaka, kao potentnih vazo-aktivnih medijatora, ispitivanju povezanosti serumskih vrednosti NO i NH<sub>3</sub> sa vrednostima protoka krvi u visceralnim krvnim sudovima jetre, slezine, bubrega i creva metodom Doppler ultrasonografije kod bolesnika sa cirozom jetre, i ispitivanju splanhnične cirkulacije kod bolesnika sa cirozom jetre u različitim stadijumima ove bolesti.

U poglavlju **Materijal i metodologija rada** navedeno je da je ispitivanjem bilo obuhvaćeno 70 pacijenata sa prethodno dijagnostikovanom cirozom jetre, sa i bez ascitesa, koji su lečeni u Urgentnom centru Kliničkog centra Srbije, kao i ambulantno i stacionarno u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Svi učesnici ove studije su dali svoju saglasnost za primenu dijagnostičkih procedura, a ispitivanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije. U studiji su bile ispitane i zdrave kontrole, oba pola. Metode ispitivanja bile su neškodljive za ispitanike, a u vreme izvođenja dijagnostičkih procedura bolesnici nisu primali nikakvu vazoaktivnu terapiju. Mentalni status bolesnika bio je ocenjivan pri prijemu bolesnika u bolnicu korišćenjem modifikacije West Haven kriterijuma. Etiologija ciroze bila je alkoholna, virusna (HBV, HCV), kriptogena i metabolička (Wilsonova bolest). Dijagnostikovanje HBV i HCV bazirala se na HbsAg, HbcAg i HCVAg testovima koristeći ELISA tehnike DiaSorin kitova. Težina oštećenja jetre procenjavana je pomoću Child-Pugh skoring sistema koji je detaljno definisan. Takođe, korišćen je i MELD skor (Model za završni stepen bolesti jetre Mayo klinike), koji je poslednjih godina ustanovljen kao novi model za procenu rezervne funkcije jetre i bubrega, i pokazao je mnoge prednosti u kliničkoj upotrebi. Za detekciju variksa jednjaka, svi bolesnici su bili podvrgnuti ezofagogastroduodenoskopiji. Gradiranje ascitesa bilo je: odsustvo/prisustvo: blag – izražen. Vazodilatatorni fenomen se ispitivao na osnovu merenja lumena i protoka u splanhničnim arterijama (a.hepatica, a.lienalis, a.renalis, a.mesenterica superior) metodom ultrasonografije i kolor Doppler tehnikom. Precizno je naveden način određivanja azot-monoksida u serumu pomoću kolorimetrijskog detekcionog kita (DetectX® Nitric Oxide) dizajniranog da meri nitrat i nitrit prisutan u različitim uzorcima, kao i određivanje nivoa amonijaka u serumu pomoću AMON metode na Dimension® kliničkom hemijskom sistemu (Dimension RxLmax, Dimension R X<sub>PAND</sub>) za *in vitro* kvantitativno određivanje amonijaka u humanom serumu. Metoda ultrasonografije i kolor Doppler tehnika je obavljena u Odseku za abdominalnu ultrasonografiju Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu na aparatu Toshiba Xario SSA 660A (konveksna sonda PVT 375BT 3.5 MHz). Ultrasonografska merenja su obuhvatila: veličinu jetre i slezine, promere hepatičke arterije i vene, slezinske arterije i vene, obe bubrežne arterije, gornje mezenterične arterije, Doppler merenje sistolnih i dijastolnih brzina u arterijama jetre, slezine, bubrega i creva, kao i izračunavanje njihovih rezistivnih indeksa, zapreminskog protoka i Doppler perfuzionog

indeksa (DPI). Statističke metode korišćene za ispitivanje povezanosti parametara bile su: metode za procenu značajnosti razlike:  $\chi^2$  kvadrat test, Mann Whitney U test, analiza varijanse (ANOVA), test sume rangova (Kruskal – Wallis), Studentov t-test, I metode za procenu značajnosti povezanosti: *Pearson*-ova parametarska linearna i *Spearman*-ova korelacija progresije.

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** prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 68 referenci.

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

Polazeći od hipoteze da azotni molekuli (azot-monoksid i amonijak) utiču na protok krvi u splahnličnoj vaskularnoj mreži, jer se oni metabolišu u jetri, bubrezima i crevima u portnoj hipertenziji, ovo istraživanje je pokazalo da je dominirao nalaz visokih serumskih vrednosti amonijaka, ali i niskih vrednosti azot monoksida, što se odrazilo njihovim uticajem na hemodinamiku u ispitivanim visceralnim arterijama kod bolesnika sa portnom hipertenzijom.

Vrednost azot-monoksida je rasla sa porastom stadijuma ciroze (Child-Pugh skor), i sa prisustvom ascitesa. Serumski amonijak je bio značajno povećan kod bolesnika sa cirozom, uz velike varijacije. U odnosu na etiologiju, koncentracija amonijaka je bila znatno veća u alkoholnoj cirozi u odnosu na druge uzroke ciroze, a rasla je i sa vrednostima Child-Pugh skora. Vrednost amonijaka je značajno pozitivno korelisala i sa vrednostima MELD skora, što ukazuje na disfunkciju i jetre i bubrega.

Pokazano je i postojanje specifičnosti hemodinamike u renalnim arterijama u odnosu na ostale ispitivane splahnlične arterije, ali i u odnosu leve renalne arterije prema desnoj, kao i specifičnost korelacija protoka sa azot-monoksidom i amonijakom.

Potvrđena je kompleksna specifičnost hemodinamike u jetri i slezini kod bolesnika sa cirozom jetre, kako u arterijskom tako i u venskom protoku krvi. Visoki rezistivni indeksi u

renalnim arterijama, hepatičkoj, slezinskoj arteriji i gornjoj mezenteričnoj arteriji su značajni pokazatelji promena otpora protoku cirkulaciji u portnoj hipertenziji kod bolesnika sa cirozom, a njihova specifična korelacija sa serumskim azot-monoksidom i amonijakom ukazala je na različite vazoaktivne efekte ovih medijatora u različitim delovima splahnhičnog krvotoka.

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

U ispitivanju splahnhičnog krvotoka Doppler ultrasonografija, kao neinvazivna i pouzdana metoda, se koristi kod bolesnika sa cirozom jetre više od 20 godina (Sacerdoti i sar 1993, Platt i sar 1994, Maroto i sar 1994).

Ispitivanja vazodilatatornih fenomena u sistemskoj i splahnhičnoj cirkulaciji kod bolesnika

sa cirozom jetre su predmet brojnih istraživanja u novije vreme. Splahnhična arterijska vazodilatacija je glavni hemodinamski poremećaj u cirozi jetre, dok je patogeneza periferne (sistemske) vazodilatacije diskutabilna (Liu i sar 2006, Møller i sar 2011, Sacertodoti i sar 2012). Malobrojne studije ispitivale su renalni arterijski protok u cirozi jetre, (Sperandeo i sar 1993, Koda i sar 2000, Rendon Unceta i sar 2001, Foud i sar 2009, Glišić i sar 2014) u kojima je pokazano da postoji povezanost promena u renalnoj hemodinamici kod bolesnika sa cirozom jetre i endogenih vazoaktivnih supstanci.

Ispitivanja su pokazala da je azot-monoksid ključni medijator u hemodinamskim poremećajima u portnoj hipertenziji (Wiest i Groszmann 2002). Endotelne ćelije jetrinih sinusoida stvaraju i oslobađaju azot-monoksid, čime jetra kao organ reguliše vaskularni tonus i otpor u svojim krvnim sudovima i adaptira se na patološke promene u mikrocirkulaciji. Podaci iz literature pokazuju da u cirozi dolazi do endotelne disfunkcije u sinusoidima jetre pod dejstvom različitih faktora, zbog čega se smanjuje sinteza azot-monoksida u sinusoidima jetre, izostaje efekat vazodilatacije, a povećava se vaskularni otpor u jetri (Iwakiri 2012), što su i rezultati ove disertacije potvrdili. Nasuprot tome, u endotelu splahnhičnih i sistemskih arterija povećava se sinteza azot-monoksida, dovodeći do splahnhične vazodilatacije.

Nađene su značajne negativne korelacije samo između dijametra leve renalne arterije i serumskog azot-monoksida što se objašnjava intrarenalnom vazokonstrikcijom kao posledicom kompleksnih uticaja u portnoj i sistemske cirkulaciji. Ove promene opisane su u ranoj pre-ascitesnoj fazi ciroze jetre i prethode pojavi hepatorenalnog sindroma (Tublin i sar 2003, Gotzberger i sar 2008, Arroyo i sar 2008, Fouad i sar 2009).

Dijametar leve renalne arterije je značajno negativno korelisao sa serumskim azot-monoksidom, što ukazuje na vazokonstrikciju te arterije. Dijastolna brzina u levoj renalnoj arteriji je značajno negativno korelisala sa serumskim amonijakom, kao i sa brzinom krvi u slezinskoj veni kod bolesnika sa cirozom. Dijastolna brzina u levoj renalnoj arteriji se smanjivala sa porastom serumskog azot-monoksida i amonijaka kod bolesnika sa cirozom, a specifični protok samo u levoj (ali ne i u desnoj) renalnoj arteriji može se objasniti spleno-renalnim refleksom - postojanjem specifičnih neuronskih veza između slezine i levog bubrega, koje učestvuju u normalnoj regulaciji arterijskog krvnog pritiska i renalnog protoka krvi, dok u portnoj hipertenziji učestvuju u renalnoj i kardiovaskularnoj disfunkciji. Studija Jacobs-Kaufmann, Hamze i sar, u periodu od 2003-2012.g pokazala je da azot-monoksid, uz druge medijatore, povećava izlazak tečnosti iz slezinskog vaskularnog korita, povećanjem intraspleničnog mikro-vaskularnog pritiska, delovanjem medijatora na aferentne i eferentne krvne sudove slezine. Promene u intraspleničnom protoku i dejstvo azot-monoksida aktiviraju aferentna splenična i eferentna renalna nervna vlakna. Specifičnost slezinskog protoka u cirozi jetre bila je predmet istraživanja u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije (Perišić i sar 2005).

Interesantno je da su u ranom stadijumu ciroze (Child A) nađene manje vrednosti azot-monoksida a u odmakloj cirozi (Child C) veće vrednosti ovog medijatora, što se slaže sa rezultatima drugih autora (Battista i sar 1997 i 2001, Albornoz i sar 2001, Arkenau i sar 2002, Lluch i sar 2004, Papadopoulos i sar 2010, Bosch i sar 2010).

Amonijak je potencijalni vazoaktivni medijator u portnoj hipertenziji, ali je njegov efekat na splahnčni krvotok relativno malo ispitivan (Popescu i sar 2012, Glišić i sar 2014). Njegove vrednosti su bile u značajnoj korelaciji sa težinom oštećenja jetre procenjenoj po Child-Pugh skoru između grupa što je slično nalazima Trantina i sar.2009.god., kao i u odnosu sa prisustvo

kolateralne cirkulacije (Montasser i sar.2014.). Ovi rezultati korelacije amonijaka sa MELD skorom su publikovani od strane kandidata Mr sc med Tijane Glišić i sar. u Journal of clinical Ultrasound 2014.god.

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

1. **Tijana M. Glišić**, Mirjana D.Perišić, Sladjana Dimitrijević, Vladimir Jurišić. Doppler Assessment of Splanchnic Arterial Flow in Patients with Liver Cirrhosis: Correlation with Ammonia Plasma Levels and MELD Score. Journal of Clinical Ultrasound 2014;42(5):264-9.

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

Doktorska disertacija „**Neinvazivno ispitivanje arterijske splanhnične cirkulacije u cirozi jetre: povezanost sa serumskim azot monoksidom (NO) i amonijakom**” predstavlja originalni naučni doprinos u kliničkom ispitivanju, radu, kao i u terapijskom pristupu fenomenu arterijske vazodilatacije, jer se danas menjaju stavovi o primeni beta-blokatora, posebno kod rezistentnog ascitesa, ili beta-agonista u lečenju portne hipertenzije. Novo, neočekivano otkriće je specifičnost protoka u levoj renalnoj arteriji, koje potvrđuje hipotezu o postojanju spleno-renalnog refleksa.

Kompleksnost ovog istraživanja je u ispitivanju dva nezavisna vazoaktivna medijatora azotnog porekla (azot-monoksid i amonijak) koji su inače specifično promenjeni u cirozi jetre, ne samo u pogledu sinteze prema stadijumu bolesti, već i u odnosu na njihov uticaj na različite segmente splanhnične cirkulacije.

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 Tijane Glišić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.04.2015.

Članovi Komisije:

Prof. dr Miodrag Krstić

---

Prof. dr Goran Janković

---

Prof. dr Dragomir Damjanov

---

Mentor:

Prof. dr Mirjana Perišić

---

Komentor:

Prof. dr Vladimir Jurišić

---