

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.09.2017.godine imenovana je Komisija u sastavu :

1. Dr sc Marina Stojanov, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet
2. Dr sc Aleksandra Stefanović, docent, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet
3. Dr sc Marina Ratković, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „ Biohemijski parametri oksidativnog, nutritivnog i inflamatornog statusa u predikciji mortaliteta kod pacijenata na hemodijalizi“ kandidata Tanje Antunović, specijaliste medicinske biohemije, zaposlene na Odeljenju za biohemiju, Centra za kliničko laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog Centra Crne Gore. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu sledeći:

IZVEŠTAJ

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 119 strana, ima 46 tabele,

55 slika i 321 literaturna navoda. Sadržaj doktotske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

Ciljevi ove doktorske disertacije su bili da se odrede biomarkeri oksidativnog, nutritivnog i inflamatornog statusa kod pacijenata na hemodijaliznom (HD) tretmanu. Kako je za razvoj kardiovaskularne bolesti (KVB) faktor rizika i sama hronična renalna insuficijencija (HRI) ovi biomarkeri su evaluirani u kontekstu veze sa tradicionalnim faktorima rizika za razvoj KVB. Osim toga procenjene su međusobne veze ovih biomarkera, njihova longitudinalna promena u razmaku od 1 godine, kao i značajnost u predikciji mortaliteta, kako ukupnog, tako i mortaliteta uslovljenog KVB. Nivoi sledećih biomarkera određeni su na početku studije:

- a) Nutritivni biomarkeri: prealbumin, albumin, RBP (retinol-vezujući protein), transferin, insulinu sličan hormona rasta (IGF), protein koji vezuje IGF (IGFBP-3) i butirilholin esteraza (BuChE).
- b) Markeri oksidativnog stresa (mokraćna kiselina, mijeloperoksidaza (MPO), superoksid dizmutaza (SOD), totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni status (TOS) i prooksidativno-antioksidativni balans (PAB).
- c) Inflamatorni markeri: hsCRP, IL-6**
- d) High-sensitivity troponina I (hsTnI), kao marker ishemijskog oštećenja miokarda.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U istraživanje je bilo uključeno 79 pacijenata (39 muškarca i 40 žena), prosečne starosti $57,6 \pm 10,4$ godina koji su bili na HD tretmanu najmanje 3 meseca. Nakon 2 godine utvrđen je stepen mortaliteta (opšteg i KVB). Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom i uz saglasnost Etičkog komiteta Kliničkog centra Crne Gore. U studiju nisu uključeni oni pacijenti koji su na HD tretmanu bili kraće od 3 meseca, kao i pacijenti sa dijagnostikovanim malignitetima, stečenom imunodeficijencijom, metaboličkim oboljenjima, cirozom jetre i oni na antiviralnoj terapiji.

Aktivnost butirilholin esteraze određena je spektrofotometrijski. Spektrofotometrijski su određene i koncentracije totalnog antioksidativnog statusa (TAS), totalnog oksidativnog statusa (TOS) i malondialdehida (MDA). Za razliku od ostalih parametara čija je koncentracija određivana u serumu/plazmi, koncentracija SOD je određena u eritrocitima spektrofotometrijskom metodom.

Koncentracije Apo AI, Apo B, prealbumina, RBP, transferina, feritina, hsCRP i homocisteina određene su nefelometrijskom metodom. Koncentracije IL-6, IGF i IGFBP-3 određene su hemiluminescentnom imunohemijskom metodom.

Ostali biohemijski parametri su određeni rutinskim laboratorijskim metodama :ukupan holesterol (total cholesterol, TC) i trigliceridi (TG) enzimskim metodama; HDL-holesterol (HDL-C) enzimskom metodom nakon precipitacije sa fosfovolframovom kiselinom u prisustvu jona Mg^{2+} ; LDL-holesterol (LDL-C) Friedwald-ovom formulom.

Nakon dve godine umrlo je 28 pacijenata (35,4%), od toga 11 od KVB (13,9%).

B. ANALIZA REZULTATA

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani osnovni demografski i biohemijski parametri za sve ispitanike : zastupljenost pola, starost, indeks telesne mase (BMI), sistolni i dijastolni pritisak, koncentracije transferina, RBP-a, Apo AI, Apo B, hsCRP-a, albumina, TC, TG, HDL-C, LDL-C, MPO, SOD, TAS, hsTnI, prealbumina, rezistina, PAB-a, MDA, TOS-a, BuChE, homocisteina, IGF1, IGFBP3 i IL-6. Uzrok nastanka HRI je u 29,1% slučajeva bila arterijska hipertenzija. Autozomalna dominantna policistična bolest bubrega je bila primarna kod 17,8% pacijenata a diabetes mellitus kod 12,8%. Na osnovu primarne bolesti pacijenti su podeljeni u dve grupe : KVB rizik (arterijska hipertenzija, diabetes mellitus i vaskulitis sa pozitivnim autoneutrofilnim citoplazmatskim antitelima (pANCA) sa 35 pacijenata (44,3%) i 42 (53,2%) bez KVB kao primarnog oboljenja.

Vrednosti BMI bile su više kod pacijenata sa rizikom od KVB u poređenju sa ostalim. Indeks telesne mase (BMI) u opštoj populaciji je povezan sa povećanim rizikom od KVB i mortalitetom, dok su kod HD pacijenata rizični oni sa niskim BMI, što se povezuje sa prevalencom proteinsko energetske gubitka (PEG). Kod pacijenata sa KVB rizikom bili su viši i obim struka i kukova. Sistolni i dijastolni pritisak i pre i posle hemodijalize bili su viši kod pacijenata sa rizikom od KVB. Ispitivanjem korelacije između ispitivanih laboratorijskih parametara i svih priznatih faktora rizika za KVB utvrđeno je da postoji pozitivna korelacija između TOS-a i MDA sa homocisteinom, zatim korelacija koncentracije mokraćne kiseline nakon HD; hsCRP, IL-6 i albumina sa koncentracijama TC i LDL-C. Prealbumin i IGF1 su korelirali sa LDL-C a RBP sa ApoB.

Cox regresiona hazard analiza pokazala je da nivoi mokraćne kiseline nakon HD, BuChE, hsCRP, IL-6, albumin, prealbumin, RBP, IGF1, PAB i hsTnI imaju statistički značajan uticaj na opšti mortalitet, dok su na mortalitet uzrokovan KVB uticali mokraćna kiselina nakon HD, IL-6, prealbumin, RBP i hsTnI.

hsCRP, IL-6 i rezistin su parametri inflamacije i ispitivani su kao potencijalni prediktori mortaliteta. hsCRP i IL-6 su bili značajno niži kod preživelih pacijenata, dok kod rezistina nije uočena značajna razlika. Koncentracija hsCRP iznad 5 mg/L ukazuje na neki inflamatorni proces u organizmu. U našem istraživanju 55,1% pacijenata je imalo koncentraciju hsCRP > 3 mg/L, a kod 41% koncentracija je ona bila > 5 mg/L. U grupi preživelih pacijenata srednja vrednost hsCRP je bila $3,2 \pm 2,6$ mg/L, što je više od preporučene cut-off vrednosti za rizik od nastanka KVB, ali niže od korišćene cut-off za infekciju.

Cox regresiona hazard analiza u ispitivanoj populaciji je pokazala da je hsCRP snažan prediktor mortaliteta kod pacijenata na HD, što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora koji su značaj ovog parametra ispitivali na daleko većem broju pacijenata.

Medijana IL-6 vrednosti kod preživelih pacijenata je bila 2,43 ng/mL, dok je referentni cut-off 3,4 ng/mL. U ovoj studiji Cox regresijom je pokazano da su

hsCRP i IL-6 biomarkeri sa približno istim značajem u predikciji opšteg mortaliteta. Za razliku od opšteg mortaliteta kod KVB mortaliteta IL-6 ima daleko veću prediktivnu značajnost. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima drugih naučnika. Postoji više objašnjenja ove razlike u osetljivosti predikcije u korist IL-6 s tim što bi za interpretaciju naših rezultata bila najrelevantnija ona da su efekti IL-6 na srce i periferne krvne sudove toksičniji od hsCRP.

Takođe je ispitana sposobnost predikcije mortaliteta kod pacijenata na HD za 6 biomarkera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Statistički značajnu razliku između grupe preživelih i preminulih od obe vrste mortaliteta pokazali su samo PAB i MPO. Oba biomarkera bila su niža kod preživelih. Nivoi TAS-a bili su niži u grupi opšteg i KVB mortaliteta, ali bez statistički značajne razlike između preživelih i preminulih. Jedan od razloga smanjenog antioksidativnog kapaciteta kod ovih pacijenata je gubitak antioksidanasa procesom hemodijalize. TOS je imao više vrednosti u obe grupe preminulih. Cox regresiona hazard analiza je pokazala da od svih ispitivanih parametara samo PAB ima prediktivnu moć i to kako za opšti, tako i za KVB mortalitet. U ovoj studiji PAB se pokazao kao najbolji marker povećanog oksidativnog stresa kod pacijenata na hemodijalizi. PAB može simultano da meri stvaranje prooksidanata i antioksidativni kapacitet, tako da se preko ovog testa može proceniti redox indeks uzorka.

Praćeni su i nivoi mokraćne kiseline nakon jednog HD tretmana. Na taj način je izbegnut uticaj renalne funkcije i značaj smanjene ekskrecije azotnih jedinjenja putem bubrega na koncentraciju ovog biomarkera i njegovu prediktivnu sposobnost mortaliteta. Cox regresiona hazard analiza je pokazala da je mokraćna kiselina odličan prediktor kako opšteg tako i mortaliteta od KVB. Nivoi RBP, BuChE i prealbumina značajno se razlikuju između preživelih i obe grupe preminulih. Koncentracije albumina i IGF1 su značajno više kod preživelih u odnosu na opšti mortalitet, dok ne postoji značajna razlika u odnosu na KVB mortalitet. Cox regresijom su se kao značajni prediktori opšteg mortaliteta nakon 2 godine pokazali : prealbumin, albumin, RBP, IGF1 i

BuChE. Poluživot prealbumina u serumu je samo 2 – 3 dana što je znatno kraće od poluživota albumina (15 – 20 dana). Ovim se može objasniti zašto je prealbumin osjetljiviji indikator nutritivnog statusa od albumina i transferina.

Longitudinalna serijska merenja nivoa biomarkera mogu imati veći značaj u predikciji kliničkih ishoda kod HD pacijenata, u odnosu na jedno bazno merenje. Stoga su za 48 pacijenta evaluirane promene nivoa nekih biomarkera nakon godinu dana u odnosu na bazne vrednosti. Tako su nakon godinu dana vrednosti TAS-a i BuChE bili znatno niže, dok su vrednosti hsCRP-a i IL-6 bile značajno povišene, kao i vrednosti RBP-a i IGF1. Snižene koncentracije TAS-a tokom godinu dana ukazuju na pogoršanje antioksidativnog statusa pacijenata, dok viši nivoi hsCRP i IL-6 ukazuju na pojačanu inflamaciju.

C. ZAKLJUČAK

Hemodijaliza kao terapijski pristup u lečenju hronične renalne insuficijencije primenjuje se više od 40 godina, ali je stopa mortaliteta i dalje visoka. Uzrok više od 45% letalnih ishoda su kardiovaskularne bolesti. Tradicionalni faktori rizika za nastanak KVB kao što su : starost, hipertenzija, pušenje, dislipidemija, dijabetes, hipertrofija leve komore i srčana insuficijencija izraženiji su kod pacijenata na HD u poređenju sa zdravom populacijom. Međutim, na povećanu prevalencu smrtnosti utiču i netradicionalni faktori rizika koji mogu biti promoteri endotelne disfunkcije i/ili aterogeneze.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivane su obe grupe faktora, grupisane kao biohemijski parametri oksidativnog, nutritivnog i inflamatornog statusa. Rezultati pokazuju da su pacijenti preminuli nakon dve godine HD tretmana bili izloženiji inflamaciji i oksidativnom stresu, kao i da je njihov nutritivni status bio lošiji. Takođe je došlo i do pogoršanja antioksidativnog statusa pacijenata. Dobijeni rezultati ukazuju da kombinacija bilo koja dva statistički značajna biomarkera imaju veći potencijal u predikciji mortaliteta od pojedinačnih markera.

Ova studija izvedena je u najvećem hemodijaliznom centru u Crnoj Gori (populacija 625000 stanovnika), tako da je njom obuhvaćeno skoro 70% pacijenata na nivou države.

Najveće ograničenje ove studije bio je mali broj pacijenata. Usled toga nije bilo moguće oformiti dve grupe pacijenata, jednu koja bi u sklopu terapijskih intervencija koristila antioksidanse i drugu koja ne bi bila na antioksidativnoj terapiji i bila bi kontrolna grupa. Na ovaj način bi bilo moguće ispitati značaj terapijskih intervencija na klinički status pacijenta i zavisnost ishoda HD od primenjene terapije. Stoga bi relevantnost dobijenih biohemijskih parametara, posebno PAB koji je do sada nedovoljno istražen, trebalo potvrditi na većem broju pacijenata u okviru nekog multicentričnog projekta.

D. OBJAVLJENI REZULTATI

Radovi koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Antunović T**, Stefanović A, Gligorović-Barhanović N, Miljković M, Radunović D, Ivanišević J, Prelević V, Bulatović N, Ratković M, Stojanov M. Prooxidant-antioxidant balance, hsTnI and hsCRP: mortality prediction in haemodialysis patients, two-year follow-up. *Renal Failure* 2017; 39:491-99 (IF 0,880, rang časopisa M23)
2. **Antunović T**, Stefanović A, Ratković M, Gledović B, Gligorović-Barhanović N, Božović D, Ivanišević J, Prostran M, Stojanov M. High uric acid and low superoxide dismutase as possible predictors of all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2013;45:1111-9 (IF 1,564, rang časopisa M23)

Ostali radovi:

1. Prelević V, Radunović D, **Antunović T**, Ratković M, Gligorović-Bahramović N, Gledović B, Vijošević S, Nedović-Vuković M, Bašić-Jukić N. Increased serum level of IGF-1 correlates with better cognitive status in End Stage Renal Disease (ESRD) patients undergoing hemodialysis. Therapeutic Apheresis and Dialysis doi: 10.1111/1744-9987.12610 (IF 1,529, rang časopisa M22)

E. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblasti medicinske biohemije. Usporedna analiza koncentracija parametara oksidativnog nutritivnog i inflamatornog statusa u predikciji mortaliteta kod pacijenata na hemodijaliznom tretmanu ima izuzetnu praktičnu primenu u kliničkoj praksi. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M23.

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „Biohemijski parametri oksidativnog, nutritivnog i inflamatornog statusa u predikciji mortaliteta kod pacijenata na hemodijalizi“ kandidata Tanje Antunović, specijaliste medicinske biohemije.

Beograd, 24.10. 2017.

1. Dr sc. Marina Stojanov (mentor), red.
profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski
fakultet

2. Dr sc. Aleksandra Stefanović, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski
fakultet

3. Dr sc. Marina Ratković, redovni profesor
Univerzitet Crne Gore, Medicinski
fakultet