

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.06.2021. godine, broj 9700/15-JKM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj koncentracije magnezijuma u dijaliznoj tečnosti na razvoj ateroskleroze bolesnika na hroničnom programu hemodijalize“

kandidata dr Jovane Kušić Miličević, zaposlene na Klinici za internu medicine Kliničko - bolničkog centra Zemun u Beogradu. Mentori su prof. dr Gordana Dragović Lukić i prof. dr Aleksandar N. Nešković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Sonja Vučković, redovni profesor na Katedri farmakologije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Silvio De Luka, redovni profesor na Katedri patofiziologije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dejan Petrović, redovni profesor na Katedri nefrologije Medicinskog fakulteta, Univerziteta 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 Jovane Kušić Miličević napisana je na ukupno 82 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela, 8 grafikona i 12 slika.

Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** disertacije detaljno je opisana regulacija homeostaze magnezijuma (Mg) u ljudskom telu, uticaj magnezijuma na biološke funkcije čoveka, klinička slika hipomagnezijemije i hipermagnezijemije, kao i metode određivanja koncentracije magnezijuma. Precizno je definisana hronična bubrežna slabost i prikazana aktuelna klasifikacija na osnovu jačine glomerulske filtracije. Takođe je na adekvatan način prikazana epidemiologija, patofiziologija, etiologija i klinička slika bubrežne slabosti. Detaljno je opisana hemodijaliza kao vid zamene bubrežne funkcije, sa posebnim osvrtom na značaj sastava dijalizne tečnosti. Mehanizam razvoja ateroskleroze kod bolesnika na hroničnom programu hemodijalize je detaljno opisan. Pored tradicionalnih faktora rizika za kardiovaskularno obolevanje i razvoj ateroskleroze, jasno je istaknut značaj poremećaja mineralnog/koštanog metabolizma u bubrežnoj slabosti na nastanak i progresiju vaskularnih kalcifikacija.

U daljem tekstu disertacije su predstavljena dosadašnja saznanja o povezanosti serumske koncentracije magnezijuma sa kardiovaskularnim morbiditetom u opštoj populaciji i među bolesnicima na hroničnom programu hemodijalize, nakon čega je prikazan mehanizam dejstva kojim magnezijum na ćelijskom nivou inhibira proces kalcifikacije. Veoma jasno je ukazano na mogući značaj koji različite koncentracije magnezijuma u dijaliznoj tečnosti mogu imati na promene serumskih koncentracija magnezijuma, te posledično na usporavanje ateroskleroze kod bolesnika na hroničnom programu hemodijalize.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja uticaja različitih koncentracija magnezijuma u dijaliznim rastvorima na intradijalizne promene koncentracije ukupnog serumskog i intraeritrocitnog magnezijuma, kao i na promenu koncentracije ukupnog serumskog magnezijuma nakon 12 meseci redovne hemodijalize. Takođe, kao cilj rada se navodi ispitivanje uticaja različitih koncentracija magnezijuma u dijaliznim rastvorima na promenu ukupnog kalcijumskog skora koronarnih arterija i na promenu intimo-medijalnog zadebljanja zajedničke karotidne arterije i zajedničke femoralne arterije nakon 12 meseci redovne hemodijalize.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o istraživanju po tipu opservacione prospektivne mešovane studije slučaja i kontrole. Uključeni su bolesnici koji su bili na hroničnom programu hemodijalize u Kliničko-bolničkom centru Zemun i Kliničko-

bolničkom centru „Dr Dragiša Mišović - Dedinje”. Detaljno su navedeni kriterijumi za uključenje u istraživanje, kao i kriterijumi za isključenje iz istraživanja. Adekvatno i informativno su prikazani demografski i klinički parametri koji su u okviru istraživanja ispitani. Prikazana je procedura istraživanja, metode uzorkovanja, a takođe su detaljno prikazane radiološke metode određivanja intimo-medijskog zadebljanja zajedničke karotidne arterije i zajedničke femoralne arterije, kao i određivanje kalcijumskog skora koronarnih arterija. Takođe su prikazane metode određivanja biohemijskih markera. Detaljno su opisane statističke metode korišćene pri obradi podataka. Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreno je od Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Etičkog komiteta Kliničko-bolničkog centra Zemun i Etičkog komiteta Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović - Dedinje”. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključanja u studiju.

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 143 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18; u daljem tekstu Pravilnik) i nalaza u izveštaju iz programa *iThenticate* kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije konstatovano je podudaranje teksta, koje iznosi 10 %, odnosno pojedinačno učešće svih referenci i drugih izvora (internet) u podudaranju teksta je ≤ 1 %. Ovaj stepen podudarnosti posledica je citata, ličnih imena bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz disertacije kandidata, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U istraživanje je uključeno 60 bolesnika, koji su bili raspoređeni u dve grupe po 30 bolesnika u zavisnosti od primenjene koncentracije magnezijuma u dijaliznoj tečnosti (0,5 mmol/L ili 1,0 mmol/L). Ispitivane grupe bolesnika se nisu značajno razlikovale po polu, starosti i dužini trajanja hemodijalize. Pozitivna porodična anamneza za kardiovaskularne bolesti i pušenje su bili podjednako zastupljeni među ispitivanim grupama, što je od značaja imajući u vidu da su navedeni parametri prepoznati kao tradicionalni faktori rizika za nastanak ateroskleroze. U skladu sa navedenim, vrednost sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska se nisu značajno razlikovale nezavisno od primenjene koncentracije Mg u dijaliznoj tečnosti. Poređenjem komorbiditeta među ispitivanim grupama, registrovana je statistički značajno veća zastupljenost hiperparatiroidizma među bolesnicima koji su tokom hemodijalize primenjivali koncentraciju 0,5 mmol/L Mg. Naime, 27 od 30 ispitanika kod kojih je primenjivana koncentracije Mg 0,5 mmol/L je imalo potvrđenu dijagnozu sekundarnog hiperparatiroidizma, u poređenju sa 14 ispitanika kod kojih je primenjivana koncentracija Mg iznosila 1,0 mmol/L. Nije registrovana značajna razlika između ispitivanih grupa bolesnika prilikom poređenja drugih komorbiditeta, kao ni u primenjenoj terapiji. Hipertenzija je prepoznata kao najčešće zastupljeno osnovno oboljenje uzročnik bubrežne slabosti među bolesnicima koji su dijalizirani rastvorima koncentracije 0,5 mmol/L Mg, dok je dijabetes bio najčešći uzročnik u grupi u kojoj je primenjivana koncentracija 1,0 mmol/L. Ipak, nije registrovana statistički značajna razlika u distribuciji osnovne bolesti među grupama.

Poređenjem laboratorijskih parametara na početku istraživanja, uočena je značajno veća koncentracija ukupnog serumskog magnezijuma u grupi bolesnika kod kojih je primenjivana koncentracija 1,0 mmol/L Mg ($p=0,000$), kao i značajno niže vrednosti paratiroidnog hormona (PTH) ($p=0,011$) i holesterola ($p=0,033$) u poređenju sa grupom bolesnika kod kojih je primenjivana koncentracija 0,5 mmol/L Mg. Nakon 12 meseci redovne hemodijalize, uočen je pad vrednosti serumskog Mg u obe grupe ispitanika, ali je koncentracija i dalje statistički značajno veća kod bolesnika koji su dijalizirani primenom rastvora koncentracije 1,0 mmol/ Mg ($p<0,001$). Takođe, održava se značajno manja koncentracija PTH među bolesnicima koji su tokom dijalize izloženi većim koncentracijama magnezijuma ($p=0,001$). Nije primećena razlika između ispitivanih grupa u serumskim vrednostima holesterola nakon godinu dana dijalize.

U ovom istraživanju pokazano je da se tokom jednog dijaliznog tretmana značajno smanjuje isključivo koncentracija serumskog Mg ukoliko je primenjivana koncentracija 0,5 mmol/L Mg ($p < 0,001$). Za razliku od navedenog, nije registrovana promena koncentracije ukupnog serumskog Mg niti intarieritocitnog Mg ukoliko je primenjivan rastvor koncentracije 1,0 mmol/L Mg, kao ni intraeritocitna koncentracija Mg ukoliko je primenjivan rastvor koncentracije 0,5 mmol/L Mg. Takođe, rezultati pokazuju da prilikom primene 1,0 mmol/L Mg u dijaliznom rastvoru, čak 80% bolesnika ima vrednosti serumskog Mg iznad referentnog opsega. Vrednost serumskog Mg se razlikuje između ispitivanih grupa i pre i nakon hemodijalize, dok se vrednosti intraeritocitnog Mg ne razlikuju značajno.

Poređenjem vrednosti kalcijumskog skora koronarnih arterija između ispitivanih grupa bolesnika nije uočena statistički značajna razlika na početku istraživanja ($p = 0,761$) niti nakon 12 meseci praćenja ($p = 0,581$). Zapravo, dobijeni rezultati ukazuju na značajan porast kalcijumskog skora ($p < 0,001$) u obe ispitivane grupe tokom 12 meseci redovne hemodijalize. Kod bolesnika koji su na početku perioda praćenja imali kalcijumski skor nula, nije primećena promena tokom 12 meseci dijalize sa primenom rastvora koncentracije 1,0 mmol/L Mg. Za razliku od navedenog, registrovana je tendencija porasta kalcijumskog skora u grupi dijaliziranoj rastvorima koncentracije 0,5 mmol/L, ali nije postignuta statistička značajnost.

Progresija intimo-medijalnog zadebljanja zajedničke karotidne arterije tokom 12 meseci hemodijalize se takođe nije statistički značajno razlikovala među grupama ($p = 0,868$), kao ni progresija intimo-medijalnog zadebljanja zajedničke femoralne arterije ($p = 0,531$).

Korelacija vrednosti intimo-medijalnog zadebljanja zajedničke karotidne arterije na početku istraživanja, nakon 12 meseci praćenja i prosečna promena intimo-medijalnog zadebljanja sa prosečnom promenom kalcijumskog skora koronarnih arterija tokom 12 meseci nije dokazana. Ipak, rezultati ovog istraživanja ukazuju na pozitivnu korelaciju intimo-medijalnog zadebljanja zajedničke femoralne arterije na početku istraživanja, nakon 12 meseci sa prosečnom promenom kalcijumskog skora, kao i na korelaciju prosečne promene intimo-medijalno zadebljanja femoralne arterije sa prosečnom promenom kalcijumskog skora.

U skladu sa prikazanim rezultatima vezanim za razvoj ateroskleroze kod ispitivanih bolesnika, nije registrovana značajna razlika među grupama u pojavi značajnog kardiovaskularnog događaja (atrijalna fibrilacija, nestabilna angina pectoris, akutni infarkt

miokarda, naprasna srčana smrt, smrt od bilo kog uzroka, cerebrovaskularni insult) tokom perioda praćenja.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju da primena dijaliznih rastvora različite koncentracije Mg dovodi do značajnih promena u koncentraciji ukupnog serumskog magnezijuma. Prikazani rezultati su u skladu sa prethodnim saznanjima, sa značajnom razlikom da je kao veća koncentracija primenjivan rastvor koncentracije 1,0 mmol/L Mg umesto 0,75 mmol/L, koja je primenjivana u drugim istraživanjima (Bressendorff i sar., 2018; Leenders i sar., 2018). U istraživanju u kom je primenjivan dijalizni rastvor koncentracije 0,75 mmol/L Mg u poređenju sa 0,5 mmol/L Mg tokom tri godine praćenja, registrovana je značajno veća koncentracija jonizovanog Mg u grupi bolesnika među kojima je primenjena veća koncentracija Mg (Schmaderer i sar., 2017). U drugom istraživanju u kom su bolesnici prvobitno dijalizirani primenom rastvora koncentracije 0,5 mmol/L Mg, te prevedeni na rastvore koncentracije 0,75 mmol/L Mg tokom 6 meseci, je takođe registrovan porast koncentracije ukupnog serumskog i jonizovanog Mg (Kuchle i sar., 2017). Dodatno, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da tokom 12 meseci dolazi do pada vrednosti serumskog Mg u obe grupe ispitanika, ali se ona održava iznad referentnih vrednosti u grupi u kojoj je primenjivana veća koncentracija Mg. Prikazani rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima (Kuchle i sar., 2017; Bressendorff i sar., 2018).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju i na intradijalizni pad vrednosti ukupnog serumskog Mg samo ukoliko se primenjuje niža koncentracija Mg u dijaliznim rastvorima. Dobijen rezultat je u saglasnosti sa radovima drugih autora koji su za merenje primenjivali vrednosti jonizovanog Mg umesto ukupnog serumskog Mg (Kuchle i sar., 2017). Slične rezultate nakon primene rastvora koncentracije 0,5 mmol/L Mg potvrđuju i drugi autori (Leenders i sar., 2018). Dobijeni rezultati ukazuju na neophodnost razmatranja primene 0,5 mmol/L kao niske za rutinsku primenu kod svih bolesnika na dijalizi (De Roij van Zuijdewuyn i sar., 2015; Leenders i sar., 2018; Floege i sar., 2018).

Uprkos nalazu hipermagnezijemije prilikom merenja ukupne serumske koncentracije Mg, rezultati intradijalizne promene intraeritrocitnog Mg daju bolji uvid u status magnezijemije bolesnika na dijalizi. Shodno navedenom, u ovom istraživanju su vrednosti

intraeritrocitnog Mg u referentnom opsegu u obe ispitivane grupe, što je u skladu sa prethodnim radovima u kojima nisu registrovani simptomi hipermagnezije među ispitanicima nezavisno od laboratorijskih rezultata koji su ukazivali na hipermagneziju (Sakaguchi i sar., 2014; Molnar i sar., 2017). Zapravo, simptomi hipermagnezije su povezani sa vrednostima serumskog Mg iznad 2,0 mmol/L, što u ovom istraživanju nije bilo zabeleženo ni kod jednog bolesnika.

Iako su rezultati ovog istraživanja potvrdili veće serumske koncentracije ukupnog serumskog Mg prilikom primene većih koncentracija Mg u dijaliznim rastvorima, nije uočena razlika u progresiji ateroskleroze među upoređenim grupama. Ovakav rezultat je u suprotnosti sa očekivanjima zasnovanim na prethodnim saznanjima dobijenim u *in vitro* istraživanjima i animalnim modelima (Massy i sar., 2012; Montezano i sar., 2010; Kircelli i sar., 2012; Louvet i sar., 2013; Montes de Oca i sar., 2014). Ipak, rastući broj istraživanja sprovedenih u kliničkim uslovima je u saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije. Naime, nedavno istraživanje sprovedeno na 353 bolesnika na hroničnom programu hemodijalize takođe ukazuje da nema razlike u vrednosti kalcijumskog skora koronarnih arterija u zavisnosti da li je koncentracija serumskog Mg manja ili veća od 1,0 mmol/L (Mizuiru i sar., 2019). *Atherosclerosis Risk In Communities* (ARIC) studija je ukazala da nema povezanosti između vrednosti serumskog Mg i ateroskleroze kod bolesnika sa jačinom glomerulske filtracije manjom od 60 ml/min/1,73 m² (Sun i sar., 2019; Menez i sar., 2020). Dodatno, prema skorašnjim istraživanjima, suplementacija Mg suprimira nastanak vaskularnih kalcifikacija inhibicijom tranzicije primarnih u sekundarne kalciproteinske partikule, te ukoliko su depoziti kalcijuma već formirani Mg nema veliki uticaj (Teer Brake i sar., 2020). I studije u kojima je merena vrednost intimo-medijalnog zadebljanja karotidne arterije nisu dokazale povezanost sa vrednostima serumskog Mg (Yorifuji i sar., 2019; Cambray i sar., 2020). Ipak, pojedine studije, doduše kratkog perioda praćenja od maksimum 24 nedelje, su ukazala na smanjenje intimo-medijalnog zadebljanja karotidne arterije prilikom peroralne suplementacije preparatima Mg (Turgut i sar., 2008; Talara i sar., 2019).

Shodno prethodno navedenom, u do sada objavljenoj literaturi ima vrlo malo podataka o razvoju ateroskleroze tokom dužeg vremenskog perioda (12 meseci ili više) redovne hemodijalize u zavisnosti od primenjene koncentracije Mg u dijaliznim rastvorima, a posebno kada je reč o primeni 1,0 mmol/L Mg u dijaliznim rastvorima. Zbog toga su od posebnog značaja dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji, gde je pokazano da iako su postignute veće serumske koncentracije Mg primenom dijaliznih rastvora koncentracije 1,0

mmol/L Mg nema značajne razlike u razvoju ateroskleroze tokom 12 meseci redovne hemodijalize u poređenju sa primenom 0,5 mmol/L Mg.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Kusic J, Markovic R, Andjelkovic Apostolovic M, Dragovic G. **Total serum and intraerythrocyte magnesium concentrations in hemodialysis patients using different dialysate solutions.** Magnes Res. 2020;33(2):28-36.

2. Kusic Milicevic J, Vidakovic R, Markovic R, Andjelkovic Apostolovic M, Korac M, Trbojevic Stankovic J, Jemcov T, Neskovic AN, Dragovic G. **Cardiovascular risk assessment and coronary artery calcification burden in asymptomatic patients in the initial years of hemodialysis.** Ther Apher Dial. 2021. doi: 10.1111/1744-9987.13641.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija pod nazivom „Uticaj koncentracije magnezijuma u dijaliznoj tečnosti na razvoj ateroskleroze bolesnika na hroničnom programu hemodijalize“ dr Jovane Kušić Miličević predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja različitih koncentracija magnezijuma u dijaliznoj tečnosti na promenu vrednosti ukupne serumske koncentracije magnezijuma i razvoj ateroskleroze tokom 12 meseci redovne hemodijalize. Rezultati istraživanja ukazuju da redovna dijaliza primenom dijaliznih rastvora koncentracije 1,0 mmol/L magnezijuma dovodi do značajnih razlika u vrednosti ukupnog serumskog magnezijuma u poređenju sa primenom dijaliznih rastvora koncentracije 0,5 mmol/L magnezijuma, dok ne postoji značajna razlika u vrednostima intraeritrocitnog magnezijuma. Primena većih koncentracija Mg u dijaliznoj tečnosti ne usporava proces ateroskleroze, odnosno razvoj vaskularnih kalcifikacija, u poređenju sa manjim koncentracijama Mg. Autor ističe značaj budućih analiza uticaja različitih koncentracija Mg u dijaliznim tečnostima na promenu kalcijumskog skora kod bolesnika koji su imali početne vrednosti kalcijumskog skora nula.

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, a imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jovane Kušić Miličević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 9.7.2021.

Članovi Komisije:

Prof. dr Sonja Vučković

Prof. dr Silvio De Luka

Prof. dr Dejan Petrović

Mentori:

Prof. dr Gordana Dragović Lukić

Prof. dr Aleksandar N. Nešković
