

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.04.2022. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Značaj određivanja hepcidina-25 i odabranih genetskih varijanti u lečenju anemije kod pacijenata u terminalnoj bubrežnoj slabosti**“, kandidata diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Miljana Savkovića, u sastavu:

- Dr sc. Sanja Simić-Ogrizović, redovni profesor, Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet
- Dr sc. Aleksandra Topić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- Dr sc. Ivana Novaković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
- Dr sc. Svetlana Ignjatović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- Dr sc. Neda Milinković, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mentori:

- Dr sc. Violeta Dopsaj, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- Dr sc. Danica Čujić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije

Posle izvršene analize priložene doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu sledeći:

IZVEŠTAJ

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Miljana Savkovića pod nazivom „Značaj određivanja hepcidina-25 i odabranih genetskih varijanti u lečenju anemije kod pacijenata u terminalnoj bubrežnoj slabosti“ je napisana na 172 strane i sadrži 54 tabele, 26 slika i 306 bibliografskih jedinica. Sadržaj doktorske disertacije je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura.

Poglavlje **Uvod** usmereno je na ulogu hepcidina-25 u sistemske regulaciji homeostaze gvožđa i anemiji u hroničnoj bubrežnoj slabosti. Opisan je istorijski pregled istraživanja na polju metabolizma gvožđa sa aspekta otkrića i dovođenja hepcidina-25 u vezu sa metabolizmom gvožđa. S obzirom da je adekvatno snabdevanje gvožđem neophodno za efektivnu eritropoezu opisana je sistemska regulacije homeostaze gvožđa. U nastavku rada opisana je struktura i sinteza bioaktivne forme hepcidina-25, a potom su opisane molekularne osnove sistemske homeostaze gvožđa sa osvrtom na mehanizam dejstva hepcidina-25, kao i interakcija hepcidin-25 – feroportin. Takođe je opisana regulacija sinteze hepcidina-25 i njegova kinetika. U nastavku uvodnog dela opisana je hronična bubrežna slabost (HBS), navedena klasifikacija i faktori rizika. Poseban osvrt dat je na definiciju, karakteristike, patofiziologiju, evaluaciju i terapiju anemije u HBS. S obzirom da je otkriće strukture i funkcije hepcidina-25 podstaklo istraživanja koja se odnose na mogućnosti njegove kliničke primene analiziran je značaj rezultata dosadašnjih istraživanja sa aspekta odnosa koncentracije hepcidina-25 u cirkulaciji sa primenom terapije agensima stimulacije eritropoeze (ESAs) i intravenskog (*i.v.*) gvožđa, feritinom i markerima inflamacije kod bolesnika u krajnjem stadijumu hronične bubrežne slabosti (ESRD).

Imajući u vidu da primena hepcidina-25 kao dijagnostičkog parametra u proceni statusa gvožđa i stepena anemije, kao i predikcije neadekvatnog odgovora na ESAs terapiju u ESRD još uvek nije našla svoje mesto u rutinskoj kliničkoj praksi, i dalje je predmet istraživanja, **Cilj** ove doktorske disertacije bio je da se odredi koncentracija hepcidina-25 u serumu bolesnika u ESRD, ispitanica sa sideropenijskom anemijom (IDA) i kontrolnoj grupi (KG), kao i da se utvrdi uticaj

polimorfizma C282Y i H63D u genu *HFE* i A736V u genu *TMPRSS6* na koncentraciju hepcidina-25 i parametre statusa gvožđa. Takođe, ispitana je korelacija koncentracije hepcidina-25 sa hematološkim parametrima, markerima statusa gvožđa i inflamacije, utvrđen odnos sa terapijom koja se primenjuje u cilju korigovanja anemije kod bolesnika u ESRD, i ispitane dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije. Postavljeni cilj istraživanja jasno pokazuje obuhvatan i temeljan pristup problemu istraživanja.

U poglavlju **Materijali i metode** navedeni su mesto istraživanja, ispitivana populacija, kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja, protokol ispitivanja zajedno sa načinom dobijanja i obrade uzoraka krvi, karakteristike terapije anemije u ESRD, kao i primenjeni laboratorijski testovi.

U istraživanje je uključeno 126 ispitanika u ESRD koji su prema podeli hronične bubrežne slabosti predloženoj od strane Nacionalne fondacije za bubrege SAD prema vodiču KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative), bili stadijum 5 HBS (procenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR) < 15 mL/min/1,73 m²). Bolesnici u ESRD grupi su bili starosti od 28 – 89 godina, pri čemu je 103 bolesnika lečeno HD (ESRD-D) i 23 bolesnika su bila u predijaliznom stadijumu (ESRD-PD). Grupu ispitanica sa sideropenijskom anemijom (IDA) sačinjavala je 31 žena starosti od 23 – 67 godina. Kontrolna grupa (KG) je obuhvatila 30 zdravih dobrovoljaca u dobrom opštem zdravstvenom stanju i bez terapije, starosti od 26 – 83 godine.

Anamnestički podaci koji uključuju starost, prisustvo imunoloških, inflamatornih, hematoloških i malignih oboljenja, infekciju virusom hepatitisa i HIV-a i primeni lekova i suplemenata pribavljeni su popunjavanjem upitnika „Podaci o ispitanicima“. Podaci o lečenju hemodijalizom, uzroku renalnog oboljenja, prisustvu komorbiditeta i terapiji anemije ESAs i *i.v.* gvožđem dobijeni su analizom medicinske dokumentacije pacijenata. Laboratorijske analize su urađene u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije, Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu. Protokol studije je odobren od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije, u Beogradu. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa principima Helsinške deklaracije poštujući načela Dobre kliničke prakse. Ispitanici su uključeni u studiju nakon potpisivanja dobrovoljnog pristanka za učestvovanje u naučnom istraživanju.

Terapija hemodijalizom sprovedena je 3 puta nedeljno tokom najmanje 6 meseci, sa prosečnim trajanjem od 4h. Odluka o uvođenju terapije anemije primenom ESAs je zasnovana na proceni koristi i rizika za svakog bolesnika ponaosob, indikovana je kod bolesnika sa vrednostima Hgb ispod 100 g/L, a korigovanje terapije je razmatrano kada je koncentracija Hgb bila ispod 105 g/L ili iznad 115 g/L kako bi se održavao preporučeni opseg ciljnih vrednosti Hgb između 100 g/L i 120 g/L. Gvožđe je aplikovano *i.v.* putem kao Fe³⁺-hidroksid saharoza kompleks.

Uzorci krvi kod bolesnika na dijalizi prikupljeni su pre započinjanja dijalize u sredini nedelje, tri dana nakon poslednje terapije ESAs i najmanje jedne nedelje nakon *i.v.* terapije gvoždem. Uzorci krvi od ispitanika KG, pacijenata sa IDA i ESRD-PD bolesnika prikupljeni su prilikom redovnih kontrolnih pregleda kod ordinirajućeg lekara, nakon noćnog gladovanja.

U ovom delu doktorske disertacije fokus je usmeren na laboratorijske analize. Koncentracija hepcidina-25 u serumu određena je komercijalnim ELISA testom koji je specifičan za hepcidin-25 i namenjen za istraživački rad - Hepcidin-25 Chemiluminescent Direct ELISA (Hepcidin-25 Peptide Detection) For Research Use Only (Corgenix Inc., SAD). Naveden je sastav reagensa, analitičke karakteristike testa koje su određene od proizvođača, princip i postupak određivanja koncentracije hepcidina-25. Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom, uključujući broj i indekse retikulocita je određena iz K₂EDTA krvi odmah nakon uzorkovanja metodom protočne citometrije na automatskim hematološkim analizatorima Coulter® LH750 (Beckman Coulter, Inc., SAD) i Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Nemačka). Biohemijski parametri: kreatinin, ureja, mokraćna kiselina, ukupni proteini, albumin, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza, laktat dehidrogenaza, gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC), hsCRP, haptoglobin, transferin i feritin su određeni na automatskom biohemijском analizatoru Olympus AU2700 (Beckman Coulter Diagnostics Inc., SAD) komercijalnim setovima reagenasa istog proizvođača. Koncentracija sTfR određivana je u serumu komercijalnim esejom na analizatoru Siemens Dade Behring Nephelometer Analyzer II® (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Nemačka). U nastavku je opisana izolacija DNK i detekcija pojedinačnih polimorfizama *TMPRSS6* i *HFE* gena. Dat je prikaz korišćenih sekvenci proba, pozicija alelnih varijanti i kataloški broj korišćenih TaqMan® eseja, komponente smeše pojedinačne PCR reakcije kao i protokol PCR reakcija.

Značajnost razlike kontinuiranih podataka analizirana je primenom t-testa, jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), dvofaktorske ANOVA-e (za *post hoc* analizu primenjen je *Least*

significant difference test i *Sidak multiple comparison test*), analiza kovarijanse, Mann-Whitney *U* i Kruskal-Wallis testa, u zavisnosti od oblika raspodele. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim brojem i procentom, a upoređivani su *Chi*-kvadrat testom ili Fisher-ovim testom tačne verovatnoće. Međuzavisnost ispitivanih parametara analizirana je primenom *Spearman* i *Pearson* korelacione analize, a zatim i multiplom linearnom regresionom analizom. Analizom Receiver Operating Characteristic (ROC) krivih procenjene su dijagnostičke karakteristike parametara i određene optimalne granične vrednosti. *Post hoc* analiza statističke snage za polimorfizme pojedinačnih nukleotida sprovedena je korišćenjem softvera QUANTO, verzija 1.2. Analiza haplotipova dva pojedinačna polimorfizma *HFE* gena (H63D i C282Y) izvršena je Haplotype analysis softverom, verzija 1.05. Za statističku analizu primenjen je program SPSS® verzije 20.0 i 21.0 (IBM® Corp., SAD).

U okviru poglavlja **Rezultati** doktorand pregledno i sistematično izlaže rezultate istraživanja. U prvom delu poglavlja predstavljeni su opšti podaci o ispitanicima. Predstavljene su kliničke karakteristike, uzroci HBS i medikamentozna terapija bolesnika u ESRD. Zatim su prikazani rezultati poređenja biohemijskih, osnovnih i novih hematoloških parametara u ESRD, IDA i KG. Analitičke karakteristike testa za određivanje koncentracije hepcidina-25 ispitane su određivanjem granice detekcije, linearnosti i nepreciznosti.

Zatim su prikazani rezultati poređenja koncentracije hepcidina-25 između ESRD, IDA i KG, kao i raspodela u navedenim grupama. Prikazani su rezultati poređenja koncentracije hepcidina-25 kod ESRD-D i ESRD-PD i kod muškaraca i žena u ESRD grupi. Takođe, prikazani su rezultati poređenja zastupljenosti varijante A736V u genu *TMPRSS6* i varijanti C282Y i H63D u genu *HFE* u ESRD, IDA i KG.

U nastavku odeljka su prikazani rezultati hematoloških parametara, parametara statusa gvožđa i inflamacije bolesnika ESRD-D i ESRD-PD grupe. U delu „ Analiza anemije u grupi ESRD bolesnika“ prikazani su rezultati hematoloških parametara, parametara statusa gvožđa i inflamacije u grupi bolesnika u ESRD sa anemijom (Hgb < 110 g/L, ESRD-A) i grupi bez anemije (Hgb ≥ 110 g/L, ESRD-NA). U cilju ispitivanja deficita gvožđa kod anemije hronične bolesti, prikazani su rezultati klasifikacije bolesnika ESRD-A i ESRD-PD prema Thomasovom algoritmu, koncentracije hepcidina-25, CHr i sTfR/log feritin u dobijenim kvadrantima. Takođe je prikazana klasifikacija bolesnika sa anemijom hronične bolesti (ACD) bez deficita gvožđa i ACD sa

deficitom gvožđa (ID) prema primeni ESAs i *i.v.* gvožđa. U narednom odeljku ovog poglavlja prikazana je analiza uticaja terapije anemije sa ESAs i *i.v.* gvožđem.

Prema primeni ESAs grupa ESRD-D bolesnika je podeljena na bolesnike koji su na ESAs terapiji (ESAs-th grupa), i na bolesnike koji su bez suplementacije ESAs tokom prethodnih 6 meseci (ESAs-n grupa). U nastavku odeljka Rezultati prikazani su rezultati hematoloških parametara, markera statusa gvožđa i inflamacije ESRD-D grupe klasifikovanih na osnovu primene ESAs, kao i rezultati korelacione analize hepcidina-25 sa laboratorijskim parametrima u formiranim grupama. U cilju identifikacije nezavisnih determinanti koncentracije hepcidina-25 urađena je multipla linearna regresiona analiza koja je uključila varijable koje su statistički značajno korelirale sa koncentracijom hepcidina-25.

Zatim su prikazani rezultati ispitivanja povezanosti hepcidina-25 sa apsolutnim brojem retikulocita (RET) i retikulocitnim indeksima kod 80 anemičnih bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne bolesti (ESRD-A). Ispitivana grupa ESRD-A podeljena je prema prethodno procenjenom statusu gvožđa na bolesnike sa apsolutnim nedostatkom gvožđa (ID), bolesnike sa adekvatnim statusom gvožđa (IS) i grupu bolesnika sa pozitivnim balansom statusa gvožđa (PB) i prikazani rezultati koncentracija hepcidina-25, eritrocitni indeksi i retikulocitni parametri u formiranim grupama, a zatim i rezultati korelacione i multiple regresione analize. ROC analizom ispitane su dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 kao markera za razlikovanje anemičnih ESRD bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa u odnosu na ostale ESRD bolesnike.

Raspodela varijanti A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE* u grupi ESRD bolesnika klasifikovanih prema polu, a zatim i kombinovani uticaj pola i haplotipova dve *HFE* kao i *TMPRSS6* A736V varijante na markere statusa gvožđa prikazan je u nastavku odeljka Rezultati. Poslednji deo poglavlja je posvećen ispitivanju dijagnostičkih karakteristika hepcidina-25 i markera statusa gvožđa u razlikovanju anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije. Prikazani su rezultati ROC analize i dijagnostičke karakteristike za hepcidin-25, feritin, TSAT i MCV.

U poglavlju **Diskusija** prikazano je poređenje dobijenih rezultata sa relevantnim literaturnim podacima i iznesena su objašnjenja i implikacije rezultata ove studije.

Poglavlje **Zaključak** obuhvata najznačajnije zaključke koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

Na kraju doktorske disertacije nalazi se poglavlje **Literatura**, koje sadrži spisak od 306 literaturnih navoda korišćenih u doktorskoj disertaciji.

B. Opis dobijenih rezultata

Najzastupljeniji uzrok ESRD bila je arterijska hipertenzija, zatim slede glomerulonefritis, diabetes mellitus, hronični pijelonefritis i policistična bolest. U grupi ESRD uočene su statistički značajno više koncentracije ureje, kreatinina, mokraćne kiseline i hsCRP i značajno niže vrednosti AST, ALT, ukupnih proteina i albumina u odnosu na grupu IDA i KG. Pacijenti u ESRD i IDA grupi su imali približno iste nivoe hemoglobina i HCT, koji su bili statistički značajno niži od vrednosti u KG. Vrednosti RBC su bile značajno niže, a MCV značajno više u ESRD grupi u poređenju sa IDA i KG. Poređenjem sa ESRD i KG, parametri MCH i MCHC su bili značajno niži u IDA grupi. MCHC je bio značajno niži u ESRD u odnosu na KG. U pogledu vrednosti RDW, najviše vrednosti utvrđene u IDA grupi bile su značajno različite od vrednosti u ESRD i IDA grupi. Značajno više vrednosti RDW su utvrđene u ESRD u poređenju sa KG. Prema parametrima statusa gvožđa, koncentracija serumskog gvožđa je bila značajno niža u ESRD i IDA grupi u odnosu na KG i značajno niža u IDA u poređenju sa ESRD grupom. Zatim, utvrđene su značajno niže vrednosti TIBC i transferina u ESRD grupi u odnosu na IDA i KG, i značajno niže vrednosti u KG u odnosu na IDA grupu. Ispitanici u IDA grupi su imali značajno niže vrednosti TSAT i značajno više vrednosti sTfR u poređenju sa ESRD i KG. Koncentracija feritina je bila značajno viša u ESRD grupi u poređenju sa IDA i KG, i značajno viša u KG u odnosu na IDA grupu.

Sa aspekta novih hematoloških parametara utvrđene su statistički značajno više vrednosti parametara %HYPO i LHD% u IDA grupi u poređenju sa ESRD i KG, i značajno više u ESRD u odnosu na KG. Parametar Maf je bio značajno niži u ESRD i IDA grupi u poređenju sa KG, i značajno viši u ESRD u odnosu na IDA grupu. U pogledu IRF, značajno više vrednosti su utvrđene u ESRD i IDA grupi u poređenju sa KG, dok se grupe ESRD i IDA nisu značajno razlikovale. Utvrđene su značajno više vrednosti CHr u ESRD i KG u poređenju sa IDA, dok se ESRD i KG nisu značajno razlikovale.

Analitičke karakteristike testa za određivanje koncentracije hepcidina-25 ispitane su određivanjem granice detekcije, linearnosti i nepreciznosti u seriji, i iz dana u dan. Koeficijent varijacije svake tačke standardne krive čija je koncentracija veća od 20 µg/L bio je manji od 20%; a dobijene vrednosti kontrolnih uzoraka bile su u dozvoljenom opsegu određenih od strane

proizvođača. Dobijena vrednost granice detekcije je iznosila 7,93 µg/L i upućivala na zaključak da test zadovoljava karakteristike u pogledu osetljivosti, prikazanih od strane proizvođača. Prikazani rezultati ispitivanja linearnosti su upućivali na zaključak da su rezultati ispitivanja prihvatljivi i u skladu sa podacima proizvođača reagensa. Takođe je ispitana nepreciznost, a vrednosti dobijenog koeficijenta varijacije za nepreciznost u seriji (8%) i za nepreciznost iz dana u dan (17,8%) ukazuju da su dobijeni rezultati u skladu sa podacima proizvođača reagensa, tj. da se određivanje koncentracije hepcidina-25 može smatrati pouzdanim za ostvarenje ciljeva ovog istraživanja.

Rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji su pokazali statistički značajne razlike u koncentraciji hepcidina-25 između ESRD, IDA i KG. Bolesnici u ESRD grupi imali su oko 18 puta više koncentracije hepcidina-25 u odnosu na IDA grupu. Koncentracija hepcidina-25 u ESRD grupi bila je oko 6 puta viša u odnosu na KG i oko 3 puta viša u KG u poređenju sa IDA grupom. Najniža izmerena koncentracija hepcidina-25 u ESRD grupi bila je 3,00 µg/L, a najviša 299,31 µg/L. Najviša učestalost koncentracije hepcidina-25 u ESRD grupi utvrđena je u opsegu od 3 – 25 µg/L (29,4%), zatim u opsegu od 25 – 75 µg/L (35%) i od 75 – 125 µg/L (18,9%). U IDA grupi najveći procenat ispitanika je imao koncentraciju hepcidina-25 u opsegu od 2,52 – 4 µg/L (87,1%), dok su ispitanici u KG imali najvišu zastupljenost koncentracije u intervalu od 3 – 10 µg/L (53,4%) i od 10 do 20 µg/L (40%). Utvrđeno je da se koncentracija hepcidina-25 nije statistički značajno razlikovala između ESRD-D i ESRD-PD grupe, kao i između ESRD bolesnika muškog i ženskog pola.

Učestalost genskih varijanti *TMPRSS6* A736V, *HFE* C282Y i *HFE* H63D, kao i *HFE* haplotipova nije se statistički značajno razlikovala između grupe ESRD, IDA i KG. Frekvencije *TMPRSS6* A736V genotipova i alela u ispitivanim grupama bile su u Hardy–Weinbergovoj ravnoteži. Retka homozigotna varijanta G/G za *HFE* H63D i A/A za *HFE* C282Y nije detektovana u ispitivanim grupama.

ESRD grupa je podeljena na osnovu lečenja hemodijaliznim tretmanom na ESRD-D i ESRD-PD grupu i analizirane su razlike. Utvrđene su značajno više vrednosti feritina i značajno niže vrednosti TIBC, transferina i indeksa sTfR/log feritin u ESRD-D u poređenju sa ESRD-PD grupom. Sa aspekta novih hematoloških parametara utvrđene su značajno više vrednosti %HYPO, LHD%, IRF, RSf, MRV i HLR u ESRD-D u poređenju sa ESRD-PD grupom.

U cilju analize prisustva anemije grupa ESRD bolesnika je podeljena na osnovu koncentracije hemoglobina na grupu sa anemijom (Hgb < 110 g/L, ESRD-A) i grupu bez anemije (Hgb ≥ 110 g/L, ESRD-NA). Analizom nije bilo obuhvaćeno 7 bolesnika kod kojih je vrednost hsCRP bila viša od 50 mg/L. Bolesnici u ESRD-A grupi su imali značajno više vrednosti hepcidina-25 i feritina, i značajno niže vrednosti RBC, HCT, TIBC, sTfR i indeksa sTfR/log feritin u poređenju sa grupom ESRD-NA. Nakon eliminacije uticaja pola i starosti utvrđeno je da je razlika između ESRD-A i ESRD-NA grupe, za navedene parametre, zadržala statističku značajnost. Nakon uklanjanja uticaja koncentracije feritina, utvrđeno je da se koncentracija hepcidina-25 nije značajno razlikovala između ESRD-A i ESRD-NA grupe. Utvrđena je statistički značajno viša vrednost Maf u ESRD-NA u poređenju sa ESRD-A grupom.

U cilju ispitivanja deficita gvožđa u anemiji hronične bolesti, ESRD-A grupa je klasifikovana na osnovu Thomasovog algoritma. Anemija hronične bolesti (ACD) bez deficita gvožđa je utvrđena kod 72 bolesnika ESRD-A grupe, dok je deficit gvožđa (ID) bio prisutan kod 8 bolesnika. Od 72 bolesnika sa ACD, 42 (58%) su bila na terapiji *i.v.* gvožđem, dok je od 8 bolesnika sa ID dvoje (25%) bilo na terapiji *i.v.* gvožđem. Bolesnici sa ACD na terapiji ESAs su imali adekvatno popunjen depo gvožđa i odgovarajući TSAT. Jedan bolesnik u ACD-ID grupi na terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem je imao funkcionalni deficit gvožđa, tj. adekvatno popunjen depo i TSAT uz neodgovarajući efekat terapije, dok je ostalih 7 imalo nedovoljno popunjen depo uz TSAT < 30%. Takođe je analizirana i grupa predijaliznih bolesnika (ESRD-PD) Thomasovim algoritmom. Grupa ESRD-PD nije bila na terapiji ni ESAs ni *i.v.* gvožđem. Od ukupno 23 bolesnika ESRD-PD grupe 13 je imalo koncentraciju Hgb nižu od 110 g/L. ACD bez deficita gvožđa (I kvadrant) je imalo 10, a latentni deficit gvožđa (kvadrant II) 3 bolesnika ESRD-PD grupe.

Na osnovu primenjene terapije ESAs i *i.v.* gvožđa od 103 bolesnika ESRD-D grupe formirane su 4 podgrupe. Koncentracija hepcidina-25 i feritina je bila statistički značajno niža, a vrednosti parametara Hgb, HCT i Maf značajno više kod bolesnika bez terapije i kod bolesnika na terapiji *i.v.* gvožđem u odnosu na bolesnike na terapiji ESAs i kombinovanoj terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem. Bolesnici na terapiji *i.v.* gvožđem imali su statistički značajno niže vrednosti TSAT u poređenju sa ostalim grupama. Vrednosti parametra %HYPO su bile statistički značajno niže u grupi bolesnika bez terapije u odnosu na ostale grupe. Broj eritrocita je bio statistički značajno niži u grupi bolesnika na terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem u odnosu na bolesnike bez terapije i bolesnike

na terapiji *i.v.* gvožđem, kao i kod bolesnika na terapiji ESAs u odnosu na bolesnike na terapiji *i.v.* gvožđem. Parametar IRF je bio statistički značajno viši u grupi bolesnika na terapiji *i.v.* gvožđem u odnosu na bolesnike bez terapije i bolesnike na terapiji ESAs kao i kod bolesnika na terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem u odnosu na bolesnike na terapiji ESAs.

Prema primeni ESAs grupa ESRD-D bolesnika je podeljena na bolesnike koji su na ESAs terapiji: ESAs-th grupa, i na bolesnike koji su bez suplementacije ESAs tokom prethodnih 6 meseci: ESAs-n grupa. Bolesnici u grupi ESAs-th imali su statistički značajno više koncentracije hepcidina-25 i feritina, i značajno niže koncentracije Hgb, RBC i HCT u poređenju sa ESAs-n grupom. Nakon eliminacije uticaja koncentracije feritina, koncentracija hepcidina-25 nije se statistički značajno razlikovala između ESAs-n i ESAs-th grupe. Utvrđeno je da se stepen inflamacije, praćen preko hsCRP, kao i udeo bolesnika sa inflamacijom, definisan koncentracijom hsCRP > 5 mg/L, nije statistički značajno razlikovao između grupa. Statistički značajna razlika u koncentraciji hemoglobina između muškaraca i žena nije utvrđena u ESAs-th i ESAs-n, kao i u kompletnoj ESRD-D grupi. Koncentracija hepcidina-25 nije statistički značajno korelirala sa polom u ESAs-n i ESAs-th grupi kao i u kompletnoj ESRD-D grupi.

Utvrđena je statistički značajna povezanost koncentracije feritina i RET sa koncentracijom hepcidina-25 u obe ispitivane grupe (ESAs-n i ESAs-th) i ESRD-D grupi, dok je prisustvo inflamacije bilo značajno povezano sa koncentracijom hepcidina-25 u ESAs-th grupi kao i kod svih ESRD-D bolesnika. Rezultati multiple regresione analize su pokazali da modeli kod ESRD-D, ESAs-n i ESAs-th bolesnika opisuju ukupnu varijansu (72,6%, 74,6% i 60,6%, redom) u koncentraciji hepcidina-25 koja se može objasniti prediktorskim varijablama, feritinom, RET i hsCRP iznad 5 mg/L. Feritin i hsCRP iznad 5 mg/L su bili pozitivni, a RET negativni prediktori koncentracije hepcidina-25, pri čemu je feritin bio najznačajniji prediktor.

Koncentracija hepcidina-25 nije se statistički značajno razlikovala između ESAs rezistentnih bolesnika i bolesnika koji su adekvatno odgovorili na terapiju ESAs, ni između bolesnika koji su primali kratkododelujuće u odnosu na bolesnike na terapiji dugododelujućim ESAs. Nije utvrđena statistički značajna korelacija koncentracije hepcidina-25 sa dnevnom preporučenom dozom (DDD) ESAs i dozom *i.v.* primenjenog gvožđa, kao ni sa vrstom ESAs i ERI. Takođe, koncentracija hepcidina-25 nije statistički značajno korelirala sa primenom *i.v.* gvožđa u grupi ESAs-n, ESAs-th i ESRD-D. Utvrđena je statistički značajna korelacija DDD ESAs sa RET.

Ispitivana grupa ESRD-A podeljena je prema prethodno procenjenom statusu gvožđa na bolesnike sa apsolutnim nedostatkom gvožđa (ID), bolesnike sa adekvatnim statusom gvožđa (IS) i grupu bolesnika sa pozitivnim balansom statusa gvožđa (PB). Utvrđena je statistički značajno viša koncentracija hepcidina-25 kod bolesnika u PB grupi u poređenju sa IS i ID grupom. Grupe se nisu statistički značajno razlikovale prema vrednostima hsCRP, sTfR, RBC, Hgb i HCT. Koncentracija hepcidina-25 u grupi ID bila je približna koncentraciji hepcidina-25 u kontrolnoj grupi. Utvrđeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije koncentracije hepcidina-25 sa %HYPO, RET i IRF u ID grupi. Koncentracija hepcidina-25 bila je značajno povezana sa RET u PB grupi ispitanika. Jedino je u PB grupi nađen statistički značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na CHr i RSf. Optimalna granična vrednost hepcidina-25 za isključivanje pozitivnog balansa gvožđa utvrđena ROC analizom iznosila je 66,13 µg/L (osetljivost 61,3%, specifičnost 75,5%, AUC 0,808).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti varijanti gena *TMPRSS6* A736V, *HFE* H63D i *HFE* C282Y, kao i *HFE* haplotipova između muškaraca i žena u ESRD. Međutim, utvrđena je statistički značajna razlika u uticaju haplotipa *HFE* gena (H63D/C282Y) na koncentraciju hepcidina-25 i feritina kod muškaraca i žena u ESRD, pri čemu je veličina uticaja bila umerena. Naknadna poređenja su pokazala da muškarci sa haplotipom C282Y/wt imaju statistički značajno višu koncentraciju hepcidina-25 u poređenju sa muškarcima sa haplotipom H63D/wt, u poređenju sa muškarcima sa haplotipom wt/wt i u poređenju sa ženama istog haplotipa C282Y/wt. Takođe, je utvrđeno da su muškarci sa haplotipom C282Y/wt imali statistički značajno višu koncentraciju feritina u poređenju sa ženama istog haplotipa. Koncentracija transferina bila je pod zajedničkim uticajem pola i A736V varijante u genu *TMPRSS6* u grupi ESRD bolesnika, tj. žene nosioci rizičnog A alela su imale statistički značajno niže koncentracije transferina u odnosu na žene G/G homozigote i muškarce, bez obzira na varijantu u *TMPRSS6* genu (u poređenju sa muškarcima sa G/G i sa muškarcima nosiocima rizičnog A alela).

U poslednjem delu istraživanja rezultati ROC analize ukazali su na odlične dijagnostičke karakteristike hepcidina-25, feritina, TSAT i MCV za razlikovanje anemije hronične bolesti od sideropenijske anemije sa AUC većim od 0,9 za sve parametre. Optimalna granična vrednost za hepcidin-25 iznosila je 9,32 µg/L (AUC = 0,932, osetljivost 90%, specifičnost 100%). Najveća AUC je nađena za feritin i iznosila je 0,991, dok su za MCV i TSAT bile 0,988 i 0,958, redom.

B. Uporedna analiza dobijenih rezultata sa podacima iz literature

Anemija u ESRD ubraja se u anemiju hronične bolesti, tj. anemiju u inflamaciji. Pored relativnog nedostatka eritropoetina i smanjenog životnog veka eritrocita, poremećaj u homeostazi gvožđa predstavlja osnovnu odliku anemije u ESRD. Ushodna regulacija sinteze hepcidina-25 je predložena kao objašnjenje poremećaja metabolizma gvožđa i neadekvatnog odgovora na terapiju anemije. Anemija u sklopu ESRD je značajno povezana sa mortalitetom, smanjenim kvalitetom života, kognitivnim poremećajima, povećanom potrebom za transfuzijama, većom frekvencijom hospitalizacije i povećanim rizikom od neželjenih kardiovaskularnih događaja (1-4). Progresijom bubrežne bolesti i smanjenjem procenjene brzine glomerularne filtracije raste incidenca anemije i zahvata gotovo sve obolele u ESRD (3, 4).

Najzastupljeniji uzrok terminalne bubrežne slabosti u ispitivanoj grupi bolesnika bila je arterijska hipertenzija, a zatim glomerulonefritis i diabetes melitus. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji prate globalnu statistiku etiologije HBS u razvijenim zemljama (5) i slažu sa rezultatima epidemiološke studije na populaciji Srbije (6).

Koncentracija hepcidina-25 u grupi bolesnika u ESRD je bila značajno viša u odnosu na ispitanike KG, što je očekivano s obzirom na činjenicu da se ESRD smatra hroničnim inflamatornim stanjem sa povećanim telesnim rezervama gvožđa, koji su dobro poznati faktori indukcije sinteze hepcidina-25, i u skladu sa literaturnim podacima (7-12). U doktorskoj disertaciji, određena koncentracija hepcidina-25 u IDA grupi je iznosila 3,00 µg/L i bila je statistički značajno niža u odnosu na ESRD i kontrolnu grupu, što je očekivan rezultat imajući u vidu molekularni mehanizam kojim deficit gvožđa i hipoksija dovode do inhibicije ekspresije *HAMP* gena koji kodira sintezu hepcidina (7, 13-15). Sa druge strane, kod bolesnika u ESRD sistemska inflamacija dovodi do aktivacije imunskih ćelija i sinteze inflamatornih citokina koji su odgovorni za pojavu poremećaja i u ranom periodu eritropoeze, koji je zavisen od eritropoetina, i u kasnom, koji zavisi od gvožđa (16, 17). Interleukin 6 (IL-6) se smatra potentnim stimulatorom sinteze hepcidina-25, koji ovu funkciju ostvaruje indukovanjem JAK/STAT3 signalnog puta (7). Pored inflamacije, povišenoj koncentraciji ukupnog hepcidina kod bolesnika u ESRD dodatno doprinosi smanjeno izlučivanje zbog oštećenja bubrega (18).

Malo je literaturnih podataka o učestalosti i specifičnom uticaju polimorfizma gena *TMPRSS6* (A736V) i *HFE* (C282Y i H63D) na hepcidin-25 i parametre statusa gvožđa kod

bolesnika u ESRD. Rezultati doktorske disertacije nisu pokazali značajnu razliku u zastupljenosti genotipova pomenutih varijanti između ESRD, IDA i KG, što potkrepljuju nalazi Pelusi i sar. (19). Rezultati prikazani u ovom radu su pokazali zastupljenost rizičnog alela varijante A736V u genu *TMPRSS6* od 42% u KG i kod bolesnika u ESRD, što je u skladu sa rezultatima studije Nai i sar. (20) i Pelusi i sar. (19). Uočeno je da se utvrđena niska učestalost rizičnog alela varijante C282Y u grupama nije statistički značajno razlikovala između grupa, što je u saglasnosti sa niskom prevalencom rizičnog alela varijante C282Y na globalnom nivou i na području Evrope (21), sa podacima dobijenim na opštoj populaciji Srbije i Crne Gore (22) i sa podacima Pelusi i sar. (19) dobijenim na populaciji bolesnika sa HBS. Homozigotna varijanta A/A C282Y *HFE* nije detektovana u ovom radu, što se slaže sa niskom prevalencom za Južnu i Istočnu Evropu (21), kao i sa podacima Šarić i sar. (22) i Pelusi i sar. (19). Utvrđeno je da se učestalost rizičnog alela H63D nije razlikovala između grupa i da je iznosila 15% u KG, što se slaže sa rezultatima dobijenim na opštoj populaciji globalno (14%) (21) i sa podacima Šarić i sar. (15,7%) (22). Sa aspekta učestalosti rizičnog alela H63D u grupi ESRD, utvrđena je niža učestalost u poređenju sa rezultatima Pelusi i sar. (19), međutim, u doktorskoj disertaciji je uočena niža učestalost u KG u poređenju sa kontrolnom grupom Pelusi i sar. (19).

Prikazani rezultati ove disertacije su ukazali na postojanje klinički manifestne anemije u ESRD i IDA grupi sa približno istim koncentracijama Hgb i HCT, koje su bile značajno niže od koncentracije Hgb i HCT u KG. Dobijeni rezultati i razlike u pogledu osnovnih hematoloških parametara su očekivani i u saglasnosti sa karakteristikama i različitim patofiziološkim mehanizmima u nastanku inflamatorne i sideropenijske anemije (16, 23-25).

%HYPO i LHD% predstavljaju nove hematološke parametre određene na različitim platformama hematoloških analizatora, čije vrednosti daju informaciju o raspoloživosti gvožđa za potrebe eritropoeze u proteklih 90 – 120 dana (24, 26). Rezultati zabeleženi u ovom radu pokazali su statistički značajno više vrednosti %HYPO i LHD% u IDA grupi u poređenju sa ESRD i KG, i statistički značajno više u ESRD u odnosu na KG. Određene vrednosti %HYPO i LHD% kao i razlike između ispitivanih grupa slažu se sa rezultatima ispitivanja Urrechaga i sar. (23). Retikulocitni indeks IRF predstavlja nezrelu formu retikulocita u čijem sastavu se nalazi najveća količina RNK, a koja se smatra ranim indikatorom odgovora na terapiju anemije gvožđem ili ESAs (27). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali statistički značajno više vrednosti IRF u ESRD i IDA grupi u poređenju sa KG, dok se grupe ESRD i IDA nisu značajno razlikovale što

potvrđuje rezultate Schoorl i sar. (28). Literaturni podaci govore da CHr i RSf dobro koreliraju i obezbeđuju istu kliničku informaciju u realnom vremenu (48h) o nedavnoj funkcionalnoj raspoloživosti gvožđa za eritroidne prekurzore (29, 30). Dobijeni rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je sadržaj hemoglobina u retikulocitu (CHr, RSf) bio značajno viši u ESRD i KG grupi u poređenju sa IDA što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (23).

Dobro je poznata činjenica da primarni nedostatak gvožđa dovodi do sideropenijske anemije koju odlikuju niska koncentracija gvožđa u serumu i visok TIBC, snižena TSAT i veoma niska koncentracija feritina. Sa druge strane, kod anemije hronične bolesti je niska ili nisko normalna koncentracija serumskog gvožđa, snižen TIBC, normalna saturacija transferina i normalna ili povišena koncentracija feritina (16, 31, 32). Rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji i utvrđene razlike se slažu sa literaturnim podacima (16, 32).

U doktorskoj disertaciji je pokazano da su anemični bolesnici u ESRD grupi imali značajno više vrednosti hepcidina-25 i feritina, i značajno niže vrednosti RBC, HCT, TIBC i Maf u poređenju sa bolesnicima u ESRD bez anemije. Razlika u koncentraciji hepcidina-25 između ESRD-A i ESRD-NA bila je statistički značajna, međutim, utvrđeno je da je ona posledica interindividualnih varijacija u koncentraciji feritina u ESRD-A grupi. Iako se koncentracija feritina može objasniti ushodnom regulacijom koja je povezana sa količinom deponovanog gvožđa i inflamacijom, koji dovode do stimulacije sinteze hepcidina-25 (7), ta uzročno posledična veza se nije mogla se sa sigurnošću utvrditi imajući u vidu dizajn istraživanja. Rezultati Maf dobijeni u ovoj studiji se slažu sa podacima objavljenim od Urrechaga i sar. (33).

Koncentracije hepcidina-25 i feritina su bile značajno više, a vrednosti parametara Hgb, HCT i Maf značajno niže kod bolesnika na terapiji ESAs i kombinovanoj terapiji ESAs i *i.v.* gvožđem u odnosu na bolesnike bez terapije i bolesnike na terapiji *i.v.* gvožđem. Do sada se mali broj istraživača bavio povezanošću terapije ESAs i *i.v.* gvožđa sa koncentracijom hepcidina-25, vrednostima hematoloških parametara, statusom gvožđa i stepenom inflamacije (34). Na malom broju ispitanika, Weiss i sar. (34) su zaključili da između bolesnika koji su primali samo terapiju ESAs, samo terapiju *i.v.* gvožđa i udruženu terapiju ESAs i *i.v.* gvožđa ne postoji razlika u vrednostima hepcidina-25, feritina i CRP pre dijaliznog tretmana. Razlike u rezultatima dobijenih u istraživanju Weiss i sar. (34) i rezultata ove disertacije mogu biti delom objašnjene značajnom višom količinom deponovanog gvožđa kod bolesnika na izolovanoj terapiji *i.v.* gvožđem.

Rezultati prethodno objavljenih studija koje su imale za cilj utvrđivanje povezanosti ESAs i hepcidina-25 na populaciji bolesnika u ESRD su neusaglašeni kako zbog primene različitih metoda kojima se određuje ukupni hepcidin ili bioaktivna izoforma hepcidin-25, tako i zbog uticaja brze regulacije ekspresije hepcidina nakon započinjanja tretmana ESAs. (11, 18, 34-38). U doktorskoj disertaciji je korišćena hemiluminiscentna imunološka metoda koja omogućava specifično određivanje koncentracije bioaktivnog hepcidina-25.

Iako rezultati doktorske disertacije nisu pokazali značajnu povezanost između ESAs i koncentracije hepcidina-25, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između doze ESAs sa eritropoetskom aktivnošću što ukazuje da se ne može isključiti mogućnost da terapija ESAs utiče na koncentraciju hepcidina-25 na indirektan način putem „eritroidnih medijatora“ eritroferona i trombocitnog faktora rasta BB, koji su povezani sa stimulisanom eritropoezom i hipoksijom, a dovode do suprimiranja ekspresije *HAMP* gena (14, 39).

Rezultati ovog rada nisu ukazali na postojanje statistički značajne povezanosti koncentracije hepcidina-25 sa indeksom rezistencije na ESAs (ERI), a takođe nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji hepcidina-25 između ESAs rezistentnih bolesnika i bolesnika kod kojih je postignut terapijski efekat pri primeni ESAs. Mogući uzroci odsustva povezanosti hepcidina-25 i ERI u ovoj studiji mogu se objasniti na sledeći način: 1) ERI u velikoj meri zavisi od određenog vremenskog okvira tokom kojeg je procenjen i u tesnoj je vezi sa šemom doziranja ESAs, što može značajno uticati na vrednost ERI tokom perioda određivanja (40); 2) malog broja ispitanika, 3) ispitivani bolesnici su ispoljavali inflamaciju niskog stepena (40); i 4) ispitivanje u formi studije preseka može prikriti potencijalne uzročno-posledične veze između hepcidina-25, feritina, hsCRP, eritropoetske aktivnosti i preporučene dnevne doze ESAs.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajnu povezanost koncentracije hepcidina-25 sa vrstom (kratkodelujući ili dugodelujući) ESAs, što se razlikuje u odnosu na prethodno publikovane rezultate o većoj potentnosti darbepoetin- α (dugog dejstva) u odnosu na eritropoetin- β (kratkog dejstva) u sniženju koncentracije hepcidina-25 kod bolesnika na HD (41). Imajući na umu da deponovano gvožđe i inflamacija ushodno regulišu koncentraciju hepcidina-25 (7), niži nivoi feritina u studiji Shoji i sar. (41) u poređenju sa vrednostima u ovoj disertaciji, zatim odsustvo primene *i.v.* terapije gvoždem u studiji Shoji i sar. (41) i karakteristične kratkotrajne varijacije u koncentraciji hepcidina-25 nakon početka primene ESAs (vraćanje na početne vrednosti nakon 18h) mogu delom objasniti razliku u dobijenim rezultatima (38, 40). Takođe, razlika u rezultatima

disertacije i studije Shoji i sar. (41) može biti objašnjena sa aspekta molekularnog mehanizma kojim stimulirana eritropoeza i deponovano gvožđe unakrsno regulišu sintezu hepcidina-25 (7).

Rezultati ove disertacije nisu pokazali statistički značajnu povezanost koncentracije hepcidina-25 i primene *i.v.* gvožđa. Dobijeni rezultati se slažu sa publikovanim rezultatima nekoliko studija (34, 42) i sugerišu da kod bolesnika u ESRD sa popunjenim rezervama gvožđa i povišenom koncentracijom hepcidina-25, dodatna parenteralna primena gvožđa ne indukuje značajno povećanje koncentracije hepcidina-25 (34).

Značajna pozitivna korelacija hepcidina-25 sa feritinom je utvrđena u gotovo u svim studijama kod bolesnika sa HBS, pa se feritin smatra najjačim prediktorom koncentracije hepcidina-25 (11, 18, 34). U skladu sa navedenim istraživanjima su i nalazi dobijeni u doktorskoj disertaciji. U grupi bolesnika ESAs-n je pokazano da je koncentracija hepcidina-25 bila je u opsegu vrednosti zdravih osoba iste starosti (43) i približna koncentraciji u studiji Touzot i sar. (44), što sugeriše da ova specifična ESAn grupa pokazuje naizgled očuvanu homeostazu gvožđa sa nižim stepenom anemije (44).

Apsolutni broj retikulocita je hematološki parametar za procenu eritropoetske aktivnosti koštane srži (31). Rezultati doktorske disertacije su pokazali značajnu povezanost RET i koncentracije hepcidina-25 u ESAs-th, ESAs-n i ESRD-D grupi što je u saglasnosti literaturnim podacima (18) a koji sugerišu da bi visoke koncentracije hepcidina-25 mogle da indukuju blokadu apsorpcije gvožđa i izlazak gvožđa iz makrofaga i hepatocita, što dovodi do eritropoeze sa ograničenom količinom gvožđa.

Prisustvo inflamacije je karakteristika bolesnika u ESRD i ključna karika mehanizma nastanka inflamatorne anemije (16). Međutim, iako se smatra da je sinteza hepcidina-25 ushodno stimulirana u inflamaciji, literaturni podaci su neusaglašeni u pogledu odnosa koncentracije hepcidina-25 sa markerima inflamacije kod bolesnika lečenih HD (11, 18). U prilog povezanosti hepcidina-25 sa inflamacijom (7) govore rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji.

U ovom radu je utvrđeno da je koncentracija hepcidina-25 bila najviša u grupi anemičnih bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa (PB) i statistički značajno viša u odnosu na grupu sa adekvatnim statusom gvožđa (IS) i grupu sa negativnim balansom gvožđa (ID). Ovo je u saglasnosti sa literaturnim podacima o mehanizmu pozitivne povratne sprege kojim deponovano gvožđe BMP – SMAD, i inflamacija JAK – STAT putem, dovode do stimulacije, a deficit gvožđa inhibicijom BMP – SMAD puta do suprimiranja ekspresije *HAMP* gena (7, 45). Rezultati

doktorske disertacije ukazuju da je koncentracija hepcidina-25 dobijena u grupi ID bila u okviru referentnog opsega opšte populacije istih godina (43), a statistički značajna negativna korelacija hepcidina-25 sa deficitom gvožđa (%HYPO) i eritropoetske aktivnosti (RET i IRF) u grupi bolesnika sa ID su u skladu sa literaturnim podacima (7, 14). Sa druge strane, utvrđena značajna negativna korelacija između hepcidina-25 i apsolutnog broja RET u grupi bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa sugerise da povišene koncentracije hepcidina-25 posreduju u redukovanju raspoložive količine gvožđa, što bi moglo rezultirati suprimiranjem eritropoetske aktivnosti, a rezultati ove disertacije su u saglasnosti sa istraživanjem van der Weerd i sar. (18).

CHr (RSf) je sadržaj hemoglobina u retikulocitu koji se smatra osetljivim markerom za procenu funkcionalne raspoloživosti gvožđa za eritriodne prekurzore u prethodna 2 – 3 dana (29, 46). Rezultati doktorske studije su pokazali značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na vrednosti CHr i RSf, koji je nađen samo u grupi anemičnih pacijenata u ESRD sa PB. Dobijeni rezultati sugerisu da anemični pacijenti u ESRD sa PB mogu imati smanjenu bioraspoloživost gvožđa i povećani potencijal za eritropoezu sa ograničenom količinom gvožđa koja je posledica „zarobljenog“ gvožđa u skladištima usled povišene koncentracije hepcidina-25. Iako je samo u grupi bolesnika u ESRD sa PB nađen statistički značajan uticaj koncentracije hepcidina-25 na CHr i RSf, u kompletnoj grupi anemičnih ESRD nije nađena statistički značajna povezanost što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (13, 47). Značajne razlike u utvrđenoj povezanosti hepcidina-25 sa sadržajem hemoglobina u retikulocitima dobijenoj u PB grupi doktorske disertacije, i odsustvo ove veze opisane u studijama Thomas i sar. (13) i Eguchi i sar. (47), bi se u određenoj meri mogle pripisati različitom načinu odabira anemičnih pacijenata. U prilog rezultata studije Ogawa i sar. (30) govore rezultati doktorske disertacije, a koji upućuju na zaključak da povezanost hepcidina-25 i sadržaja hemoglobina u retikulocitima zavisi od balansa statusa gvožđa. Prikazani rezultati doktorske disertacije su pokazali da granična vrednost hepcidina-25 od 66,13 µg/L ima prihvatljive dijagnostičke karakteristike u isključivanju pozitivnog balansa gvožđa što je u saglasnosti sa nedavno publikovanom vrednosti od 70 µg/L u radu Ogawa i sar. (30) i graničnoj vrednosti od 66,81 µg/L u detekciji opterećenja gvožđem koju su nedavno objavili Rostoker i sar. (48).

Rezultati doktorske disertacije nisu pokazali značajnu razliku u zastupljenosti varijanti A736V u genu *TMPRSS6*, H63D i C282Y u genu *HFE* i haplotipova (H63D i C282Y) *HFE* gena između polova. Nijedna studija do sada nije analizirala postojanje razlike u distribuciji

polimorfizama *TMPRSS6* i *HFE* prema polu kod bolesnika u ESRD. Rezultati ovog istraživanja su ukazali na više koncentracije hepcidina-25 i feritina kod muškaraca nego kod žena u odnosu na *HFE* haplotipove. Muškarci sa haplotipom C282Y / wt su imali najviše koncentracije hepcidina i feritina što se slaže sa rezultatima Sørensen i sar. (49) a upućuje na zaključak da prisustvo haplotipa C282Y / wt kod muškaraca dovodi do povećane sinteze hepcidina, koji inhibira izlazak gvožđa iz makrofaga i utiče na razvoj anemije.

Utvrđene su značajno niže koncentracije transferina i posledično povećana saturacija transferina kod žena u ESRD koje su nosioci A alela (A/G i A/A) u odnosu na žene wild-type homozigote (G/G) u *TMPRSS6* genu. Nai i sar. (20) su uočili da su homozigoti varijante 736Val u genu *TMPRSS6* (genotip A/A prema SNP nomenklaturi) povezani sa značajno višim koncentracijama hepcidina-25, nižom saturacijom transferina i nižim serumskim gvožđem u odnosu na homozigote varijante 736Ala u genu *TMPRSS6* (genotip G/G prema SNP nomenklatura) kod zdravih individua. Ova grupa autora je takođe pokazala da G alel varijante rs855791 u genu *TMPRSS6* efikasnije inhibira hepcidin od A alela. Međutim, sa druge strane Galesloot i sar. (50) su u istraživanju na opštoj populaciji pokazali da uticaj varijanti rs855791 u genu *TMPRSS6* na feritin, serumsko gvožđe, saturaciju transferina i TIBC ne zavisi od koncentracije hepcidina, a da je saturacija transferina snižena i TIBC povišen kod osoba sa varijantama A/G i A/A gena *TMPRSS6*, u poređenju sa homozigotima G/G *TMPRSS6*, što se slaže sa rezultatima određenim kod žena u ESRD u doktorskoj disertaciji.

Rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji su ukazali na odlične dijagnostičke karakteristike hepcidina-25, feritina, TSAT i MCV za razlikovanje ACD od IDA. Najbolje dijagnostičke karakteristike za hepcidin-25 su određene pri koncentraciji od 9,32 µg/L, i za feritin pri koncentraciji od 48,2 µg/L što je u skladu sa literaturnim podacima (51, 52). Uprkos činjenici da se preporučena vrednost TSAT od $\geq 20\%$ uglavnom odnosi na zdravu populaciju, niži rezultat u ovom istraživanju ($\geq 16,8\%$) je očekivan u hroničnoj bubrežnoj slabosti. Određena granična vrednost MCV od 81 fL je očekivana imajući u vidu morfološke karakteristike eritrocita koji definišu ACD i IDA (16, 32).

Citirana literatura

1. Drüeke TB. Lessons from clinical trials with erythropoiesis-stimulating agents (ESAs). *Ren Replace Ther.* 2018;4(1):46.
2. Horl WH. Anaemia management and mortality risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(5):291-301.

3. KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) Anemia Work Group Clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2012;2:279–335.
4. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis : the official journal of the National Kidney Foundation.* 2006;47(5 Suppl 3):S11-145.
5. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2020;395(10225):709-33.
6. Djukanović L, Aksić-Miličević B, Antić M, Baković J, Varga Ž, Gojaković B, et al. Epidemiology of end-stage renal disease and hemodialysis treatment in Serbia at the turn of the millennium. *Hemodial Int.* 2012;16(4):517-25.
7. Wang C-Y, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood.* 2019;133(1):18-29.
8. Nemeth E, Ganz T. Heparin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6493.
9. Valenti L, Girelli D, Valenti GF, Castagna A, Como G, Campostrini N, et al. HFE mutations modulate the effect of iron on serum hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(8):1331-37.
10. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 2008;112(10):4292-7.
11. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* 2009;75(9):976-81.
12. Peters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(3):848-53.
13. Thomas C, Kobold U, Thomas L. Serum hepcidin-25 in comparison to biochemical markers and hematological indices for the differentiation of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(2):207-13.
14. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood.* 2014;124(4):479-82.
15. Wang C-Y, Xu Y, Traeger L, Dogan DY, Xiao X, Steinbicker AU, et al. Erythroferrone lowers hepcidin by sequestering BMP2/6 heterodimer from binding to the BMP type I receptor ALK3. *Blood.* 2020;135(6):453-56.
16. Ganz T. Anemia of Inflammation. *N Engl J Med.* 2019;381(12):1148-57.
17. Khalil S, Delehanty L, Grado S, Holy M, White Z, 3rd, Freeman K, et al. Iron modulation of erythropoiesis is associated with Scribble-mediated control of the erythropoietin receptor. *J Exp Med.* 2018;215(2):661-79.
18. van der Weerd NC, Grooteman MP, Bots ML, van den Dorpel MA, den Hoedt CH, Mazairac AH, et al. Heparin-25 in chronic hemodialysis patients is related to residual kidney function and not to treatment with erythropoiesis stimulating agents. *PLoS One.* 2012;7(7):e39783.
19. Pelusi S, Girelli D, Rametta R, Campostrini N, Alfieri C, Traglia M, et al. The A736V Tmprss6 polymorphism influences hepcidin and iron metabolism in chronic hemodialysis patients: Tmprss6 and hepcidin in hemodialysis. *BMC Nephrol.* 2013;14:48.
20. Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, et al. Tmprss6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood.* 2011;118(16):4459-62.
21. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* 2010;53(1):3-22.
22. Sarić M, Zamurović L, Keckarević-Marković M, Keckarević D, Stevanović M, Savić-Pavićević D, et al. Frequency of the hemochromatosis gene mutations in the population of Serbia and Montenegro. *Clin genet.* 2006;70(2):170-2.

23. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and Reticulocyte Indices on the LH 750 as Potential Markers of Functional Iron Deficiency. *Anemia*. 2010;2010:625919.
24. Macdougall IC. What is the most appropriate strategy to monitor functional iron deficiency in the dialysed patient on rhEPO therapy? Merits of percentage hypochromic red cells as a marker of functional iron deficiency. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(4):847-49.
25. Camaschella C. Iron-Deficiency Anemia. *N Engl J Med*. 2015;372(19):1832-43.
26. Urrechaga E, Unceta M, Borque L, Escanero JF. Low hemoglobin density potential marker of iron availability. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(1):47-51.
27. Davis BH, Ornvold K, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry*. 1995;22(1):35-39.
28. Schoorl M, Schoorl M, Nubé MJ, Bartels PC. Erythropoiesis activity, iron availability and reticulocyte hemoglobinization during treatment with hemodialysis and in subjects with uremia. *Clin lab*. 2006;52(11-12):621-29.
29. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol*. 2016;38 Suppl 1:123-32.
30. Ogawa C, Tsuchiya K, Nitta K, Maeda K. Significance of Content of the Reticulocyte Hemoglobin in the Management of Renal Anemia. *Blood Purif*. 2019;47 Suppl 2:70-73.
31. Dopsaj VB, Spasojević VK, Marisavljević D, Terzić B, Memon L. Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemija. Drugo dopunjeno izdanje. Beograd: Farmaceutski fakultet u Beogradu, 2012.
32. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med*. 2015;372(19):1832-43.
33. Urrechaga E. Microcytic Anemia factor (MAf) in the study of iron metabolism. 2010.10.13140/RG.2.2.28543.00167.
34. Weiss G, Theurl I, Eder S, Koppelstaetter C, Kurz K, Sonnweber T, et al. Serum hepcidin concentration in chronic haemodialysis patients: associations and effects of dialysis, iron and erythropoietin therapy. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(10):883-90.
35. Kuragano T, Shimonaka Y, Kida A, Furuta M, Nanami M, Otaki Y, et al. Determinants of Hepcidin in Patients on Maintenance Hemodialysis: Role of Inflammation. *Am J Nephrol*. 2010;31(6):534-40.
36. van der Putten K, Jie KE, van den Broek D, Kraaijenhagen RJ, Laarakkers C, Swinkels DW, et al. Hepcidin-25 is a marker of the response rather than resistance to exogenous erythropoietin in chronic kidney disease/chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(9):943-50.
37. El Sewefy DA, Farweez BA. El Sewefy DA, Farweez BA, Behairy MA, Yassin NR. Impact of serum hepcidin and inflammatory markers on resistance to erythropoiesis-stimulating therapy in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2019;51(2):325-34.
38. Takasawa K, Tomosugi N, Takaeda C, Maeda T, Ueda N. Regulation of Hepcidin-25 by Short- and Long-Acting rhEPO May Be Dependent on Ferritin and Predict the Response to rhEPO in Hemodialysis Patients. *Nephron Extra*. 2014;4(1):55-63.
39. Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut*. 2014;63(12):1951-59.
40. Chait Y, Kalim S, Horowitz J, Hollot CV, Ankers ED, Germain MJ, et al. The greatly misunderstood erythropoietin resistance index and the case for a new responsiveness measure. *Hemodial Int*. 2016;20(3):392-98.
41. Shoji S, Inaba M, Tomosugi N, Okuno S, Ichii M, Yamakawa T, et al. Greater potency of darbepoetin- α than erythropoietin in suppression of serum hepcidin-25 and utilization of iron for erythropoiesis in hemodialysis patients. *Eur J Haematol*. 2013;90(3):237-44.
42. Tessitore N, Girelli D, Campostrini N, Bedogna V, Pietro Solero G, Castagna A, et al. Hepcidin is not useful as a biomarker for iron needs in haemodialysis patients on maintenance erythropoiesis-stimulating agents. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(12):3996-4002.

43. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*. 2011;117(25):e218-25.
44. Touzot M, Lefebvre T, Roux A, Maheas C, Ridet C, Puy H, et al. Functional erythropoietin-hepcidin axis in recombinant human erythropoietin independent haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*. 2019;24(7):751-57.
45. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
46. Urrechaga E. Clinical utility of the new Beckman-Coulter parameter red blood cell size factor in the study of erythropoiesis. *Int J Lab Hematol*. 2009;31(6):623-9.
47. Eguchi A, Mochizuki T, Tsukada M, Kataoka K, Hamaguchi Y, Oguni S, et al. Serum hepcidin levels and reticulocyte hemoglobin concentrations as indicators of the iron status of peritoneal dialysis patients. *Int J Nephrol*. 2012;2012:239476.
48. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Magna T, Machado G, Drahi G, et al. Reassessment of Iron Biomarkers for Prediction of Dialysis Iron Overload: An MRI Study. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132006.
49. Sørensen E, Rigas AS, Thørrner LW, Burgdorf KS, Pedersen OB, Petersen MS, et al. Genetic factors influencing ferritin levels in 14,126 blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion*. 2016;56(3):622-27.
50. Galesloot TE, Geurts-Moespot AJ, den Heijer M, Sweep FC, Fleming RE, Kiemeny LA, et al. Associations of common variants in HFE and TMPRSS6 with iron parameters are independent of serum hepcidin in a general population: a replication study. *J Med Genet*. 2013;50(9):593-38.
51. Valenti L, Messa P, Pelusi S, Camprostrini N, Girelli D. Heparin levels in chronic hemodialysis patients: a critical evaluation. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(5):613-19.
52. Wish JB. What are the Considerations in Balancing Benefits and Risks in Iron Treatment?: The Benefits of Intravenous Iron. *Semin dial*. 2017;30(1):20-22.

D. Provera originalnosti doktorske disertacije

Provera originalnosti ove disertacije izvršena je na način koji je propisan Pravilnikom o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

Program *iThenticate* je registrovao ukupno 11% poklapanja sa 238 izvora. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je ovaj stepen podudarnosti posledica prethodno objavljenih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz ove disertacije (sa 2 publikovana naučna rada ustanovljeno je poklapanje 1%, dok je sa jednim radom poklapanje manje od 1%), korišćenja ličnih imena ili naziva stručnih organizacija i radnih grupa, naziva određivanih analita, reagenasa i primenjenih instrumentalnih i statističkih metoda, kao i navođenja opštih mesta i podataka, rečeničkih konstrukcija i formulacija karakterističnih za naučne i stručne pojmove u oblasti biohemije i medicine, i bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi. Preklapanje teksta sa jednom doktorskom disertacijom iz iste naučne oblasti je 1%, dok je sa svim ostalim izvorima manje od 1%.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Miljana Savkovića u potpunosti originalna, kao i da su poštovana akademska pravila citiranja.

E. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Anemija u sklopu ESRD je značajno povezana sa mortalitetom, smanjenim kvalitetom života, kognitivnim poremećajima, povećanom potrebom za transfuzijama, većom frekvencijom hospitalizacije i povećanim rizikom od neželjenih kardiovaskularnih događaja, i kao takva predstavlja uvek aktuelno teorijsko, kliničko i praktično pitanje u oblasti biohemije i medicine. Pored relativnog nedostatka eritropoetina i smanjenog životnog veka eritrocita, poremećaj u homeostazi gvožđa predstavlja osnovnu odliku anemije u ESRD. Otkriće hepcidina-25 je izmenilo razumevanje homeostaze gvožđa i patofiziologije anemije u ESRD, a ushodna regulacija sinteze hepcidina-25 je predložena kao objašnjenje poremećaja metabolizma gvožđa i neadekvatnog odgovora na terapiju anemije. Međutim, uprkos brojnim istraživanjima, još uvek postoje neslaganja o ulozi hepcidina-25 u nastanku anemije kod bolesnika u ESRD, te stoga ne postoji jasan osnov za primenu hepcidina-25 kao markera u ispitivanju anemije u sklopu ESRD.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali značajno više koncentracije hepcidina-25 kod bolesnika u ESRD u odnosu na ispitanike sa IDA i KG, i značajno više koncentracije hepcidina-25 u KG u odnosu na ispitanike sa IDA. Takođe, utvrđene su odlične dijagnostičke karakteristike hepcidina-25 pri koncentraciji od 9,32 µg/L u razlikovanju ACD od IDA i potvrđena je značajna povezanost koncentracije hepcidina-25 sa deponovanim gvožđem, inflamacijom, i aktivnom eritropoezom kod bolesnika u ESRD. U grupi anemičnih bolesnika u ESRD sa pozitivnim balansom gvožđa utvrđen je statistički značajan negativan uticaj koncentracije hepcidina-25 na funkcionalnu raspoloživost gvožđa za sintezu hemoglobina određenu novim hematološkim parametrima CHr (RSf), dok je koncentracija hepcidina-25 značajno negativno korelirala sa nedostatkom gvožđa (%HYPO) i aktivnom eritropoezom (RET i IRF), kod bolesnika u ESRD sa apsolutnim deficitom gvožđa. Pored toga, rezultati teze ukazuju da granična vrednost hepcidina-25 od 66,13 µg/L ima prihvatljive dijagnostičke karakteristike i negativnu prediktivnu vrednost u razlikovanju ESRD bolesnika sa pozitivnim balansom gvožđa. Uzimajući u obzir da je procena anemije u inflamaciji kompleksna, navedeni rezultati upućuju na zaključak da određivanje bioaktivne forme hepcidina-25, zajedno sa tradicionalnim biohemijskim i novim hematološkim

parametrima, može biti koristan dodatni dijagnostički alat u proceni anemije kod bolesnika u ESRD.

Kod bolesnika na hroničnom tretmanu dijalizom, u toku terapije održavanja ESAs, koncentracija hepcidina-25 nije značajno korelirala sa dozom ESAs i dozom *i.v.* gvožđa. Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija koncentracije hepcidina-25 sa vrstom ESAs i indeksom rezistencije na ESAs (ERI). Uzimajući u obzir navedene rezultate, klinička korisnost hepcidina-25 kao markera neadekvatnog odgovora na terapiju ESAs i *i.v.* gvožđa ostaje upitna. Prospektivna longitudinalna studija na većem broju dobro selektovanih ispitanika mogla bi pomoći u donošenju jasnijeg zaključka o odnosu između hepcidina-25 i primenjene doze ESAs i *i.v.* gvožđa.

U sprovedenom istraživanju nisu nađene razlike u zastupljenosti varijante A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE*, kao i *HFE* haplotipova između ESRD, IDA i KG. Međutim, utvrđene su više koncentracije hepcidina-25 i feritina kod muškaraca nego kod žena u odnosu na *HFE* haplotipove. Muškarci sa haplotipom C282Y / wt su imali najviše koncentracije hepcidina i feritina. Ovo zapažanje može biti klinički relevantno sa aspekta lečenja anemije bolesnika u krajnjem stadijumu bubrežne slabosti. Rezultati ove teze pokazuju da je varijanta 736Val u genu *TMPRSS6* povezana sa niskom koncentracijom transferina i visokom saturacijom transferina kod anemičnih žena u ESRD. Razlike između polova u nivoima transferina i saturaciji transferina, povezane sa varijantama rs855791 u genu *TMPRSS6* kod anemičnih bolesnika u ESRD su potencijalno klinički relevantne, međutim patofiziološki mehanizam treba razmotriti u okviru rezultata obimnijih studija.

F. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

- Dopsaj V, Topić A, **Savković M**, Milinković N, Novaković I, Čujić D, Simić-Ogrizović S. Associations of Common Variants in *HFE* and *TMPRSS6* Genes with Heparin-25 and Iron Status Parameters in Patients with End-Stage Renal Disease. *Dis Markers*. 2019;2019:4864370. doi: 10.1155/2019/4864370 **M22; IF 3,434 (2020); Rang časopisa 79/140 u kategoriji Medicine, Research & Experimental; Article (originalan naučno-istraživački rad)**

- **Savković M**, Simić-Ogrizović S, Dopsaj V. Factors associated with hepcidin-25 levels in maintenance hemodialysis patients. *Ther Apher Dial.* 2021;25:565-74. doi: 10.1111/1744-9987.13617 **M23; IF 1,762 (2020); Rang časopisa 71/90 u kategoriji Urology & Nephrology; Article (originalan naučno-istraživački rad)**
- **Savković M**, Simić-Ogrizović S, Dopsaj V. Assessment of positive iron balance in end-stage renal disease: Could hepcidin-25 be useful?. *Int J Lab Hematol.* 2021;43(5):1159-67. doi: 10.1111/ijlh.13539 **M23; IF 2,877 (2020); Rang časopisa 51/76 u kategoriji Hematology; Article (originalan naučno-istraživački rad)**

Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima

- **Savković M**, Simić-Ogrizović S, Čujić D, Dopsaj V. Serum hepcidin-25 levels correlation with hemoglobin, ferritin and iron in hemodialysis patients – a pilot study. 24th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, October 5-7, 2016. Tirana, Albania. Abstract in: *Balkan Journal of Clinical Laboratory* 2016; 24(1):28. **Poster presentation (posterska prezentacija)**
- **Savković M**, Čujić D, Simić-Ogrizović S, Dopsaj V. Analytical and clinical validation of chemiluminiscent assay for hepcidin-25 determination. IFCC WorldLab 2017, October 22-25, 2017. Durban, South Africa. Abstract in: *Clin Chem Lab Med* 2017; 55 (S2):1485. **Poster presentation (posterska prezentacija)**
- Čujić D, **Savković M**, Simić-Ogrizović S, Ignjatović S, Dopsaj V. Parameters of iron status in differential diagnosis of anemia. IFCC WorldLab 2017, October 22-25, 2017. Durban, South Africa. Abstract in: *Clin Chem Lab Med* 2017; 55 (S2):1503. **Poster presentation (posterska prezentacija)**

Saopštenje na domaćim naučnim skupovima sa međunarodnim učešćem

- **Miljan Savković**, Danica Čujić, Ivana Novaković, Sanja Simić-Ogrizović, Violeta Dopsaj. Association of polymorphism *TMPRSS6* A736V matriptase-2 and *HFE* mutations with hepcidin-25 and iron status in patients with preterminal and terminal renal failure. 14th EFLM Symposium for Balkan Region, Neighboring Countries: The Same Professional

Aim, May 23-25, 2018, Belgrade, Serbia. J Med Biochem 2018;37(2):249-50. **Plenary lecture (plenarno predavanje)**

G. Mišljenje i predlog

Na osnovu izloženog može se zaključiti da rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji kandidata diplomiranog farmaceuta medicinskog biohemičara Miljana Savkovića predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Rezultati su publikovani u vidu 3 rada u međunarodnim časopisima, 3 posterske prezentacije na međunarodnim naučnim skupovima i usmenog izlaganja na domaćem naučnom skupu sa međunarodnim učešćem.

Uzimajući u obzir da je procena anemije u inflamaciji kompleksna, navedeni rezultati upućuju na zaključak da određivanje bioaktivne forme hepcidina-25, zajedno sa tradicionalnim biohemijskim i novim hematološkim parametrima, može biti koristan dodatni dijagnostički alat u proceni anemije kod bolesnika u ESRD. Ovo se reflektuje kroz teorijsku utemeljenost, postavljene ciljeve i primenjene metode istraživanja, kao i kritičku analizu i interpretaciju dobijenih rezultata. Doktorska disertacija je ukazala na nove aspekte uticaja hepcidina-25 na bioraspoloživost gvožđa za eritroidne prekurzore kod ESRD bolesnika sa pozitivnim balansom statusa gvožđa. Rezultati značajnog kombinovanog uticaja pola i polimorfizma A736V u genu *TMPRSS6* i C282Y i H63D u genu *HFE* mogu biti podsticajni za buduća istraživanja na rasvetljavanju patofizioloških mehanizama u anemiji u ESRD.

Na osnovu izloženog, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju kandidata dipl. farm. – med. biohemičara Miljana Savkovića i predlaže 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 „Značaj određivanja hepcidina-25 i odabranih genetskih varijanti u lečenju anemije kod pacijenata u terminalnoj bubrežnoj slabosti“.

U Beogradu, 13.06.2022. godine

Članovi komisije:

Dr sc. Sanja Simić-Ogrizović, redovni profesor
Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet

Dr sc. Aleksandra Topić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ivana Novaković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Svetlana Ignjatović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Neda Milinković, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet