

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04. 2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj terapije gvož em i eritropoetinom i polimorfizma ACE D/I na suzbijanje anemije kod bolesnika na hroni noj hemodijalizi”**

kandidata mr dr Edvin B. Hadžibuli a, zaposlenog u Opštoj bolnici u Novom Pazaru, kao lekar specijalista interne medicine i subspecijalista nefrologije. Mentor je Prof. dr Marina Savin.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr Biljana Stojimirovi , redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Slobodan Risti , redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N. Sar. dr sci Sanja Stankovi , Centar za medicinsku biohemiju Klini kog centra Srbije u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

## **IZVEŠTAJ**

### **A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija mr sci Edvina B. Hadž ibuli a napisana je na 262 strane i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija,

zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 65 grafikona, 86 tabele i 11 shema. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

U **uvodu** je definisan značaj hronične bolesti bubrega (CKD), njenih komplikacija, anemije kao jedne od najznačajnijih. Tako je definisana terminalna bolest bubrega (ESRD), anemija i značaj anemije kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi. Istaknuti su epidemiološki podaci o oboljevanju, ishodima i smrtnosti kod ovih bolesnika. Prikazana su aktuelna saznanja o anemiji kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi, uloga nedostatka endogenog eritropoietina (Epo), deficijencije gvožđa (Fe) u nastanku i progresiji anemije na hroničnoj hemodijalizi. Podrobno je opisan poremećaj ravnoteže prometa gvožđa kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi. Date su osobenosti metabolizam gvožđa, njegove apsorpcije, prometa na nivou organizma i same elije, mehanizmi regulacija prometa gvožđa u organizmu i uskladištenja. Posebno je objašnjen nedostatak gvožđa kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi. U daljem tekstu uvoda data su saopštenja o markerima prometa gvožđa i testovima za procenu poremećaja prometa gvožđa, kao i novi markeri prometa gvožđa, obzirom na ključno pitanje koje se postavlja tokom primene rHu Epo pravilnog dijagnostikovanja nedostatka gvožđa praćenjem statusa feremije i pravilna primena, odnosno, nadoknada gvožđa. U tekstu su date specifičnosti i razlike sistema biohemijskih parametara koji su potencijalno korisni u otkrivanju i tretiranju nedostatka gvožđa kod bolesnika koji su na programu lečenja ponavljanim hemodijalizama. Data su aktuelna saopštenja o kardiovaskularnim bolestima kod bolesnika sa CKD i na hemodijalizi, epidemiološki podaci o morbiditetu i mortalitetu ovih bolesnika. Dat je prikaz faktora rizika za nastajanje kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika sa ESRD. Kao i kratak opis najčešćih bolesti koje prate ovu populaciju. Na kraju su data saopštenja literature o polimorfizmu ACE D/I, njegovom uticaju na kardiovaskularni komorbiditet bolesnika sa CKD i na hroničnoj hemodijalizi, uticaj na eritropoiesu i anemiju kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi, kao i uticaj modaliteta nadoknade gvožđa u terapiji eritropoetinom i I/D polimorfizma ACE na suzbijanje anemije kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Ciljevi rada su bili da se ispita uticaj modaliteta supstitucije gvoža (per os prema IV) i ACE polimorfizama I/D na anemiju i kardijalni komorbiditet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi, na osnovu: 1. Razlika usled nedavanja gvoža (per os prema IV) u postizanju referentne feremije, u nivoima raspoloživog i rezervnog gvoža i u postizanju referentne hemoglobinemije tokom 9 meseci terapije rHuEpo beta kod bolesnika na hemodijalizi; 2. Potrebne doze rHuEpo beta tokom 9 meseci u suzbijanju anemije kod bolesnika na terapiji Fe (per os prema IV) na hemodijalizi sa genotipom ACE DD prema genotipu ACE II/DI; 3. Uticaja nivoa raspoloživog i rezervnog Fe na kardijalni komorbiditet kod bolesnika na hemodijalizi.

U poglavlju **Materijal i metode** dat je kompletan opis bolesnika koji su bili uključeni u prospektivno i randomizirano istraživanje, koje je trajalo 9 meseci i bilo je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno su istaknuti glavni kriterijumi za uključivanje bolesnika u istraživanje su nivo feritina u serumu  $<800$  ng/ml i nivo saturacije transferina gvožem (TSAT= $sFe/TIBC \times 100$ )  $>15\%$  aproksimativno. Njihovo svrstavanje metodom proste randomizacije u dve terapijske grupe - grupa Per os FE (na peroralnom preparatu gvože glukonata) i grupa IV FE (bolesnici koji su dobijali parenteralno preparat gvože glukonata). Parametar za procenu pravilne randomizacije bio je dostizanje količine hemoglobina u retikulocitu (CHR)  $>26$  pgr/ eliji. Navedeni su ostali kriterijumi za uključivanje bolesnika u istraživanje, kriterijumi za isključivanje bolesnika iz istraživanja, te kriterijumi za privremeno obustavljanje terapije gvožem. Dat je protokol terapije peroralnim i intravenskim gvožem glukonom, protokol terapije epoietinom beta. Dat je opis biohemijskog ispitivanja, uzorkovanja krvi, biohemijskih parametara i principa metoda njihovog određivanja. Opisan je metod procene kardiovaskularnog statusa bolesnika, molekularno-genetičkog ispitivanja koje je podrazumevalo izolaciju ukupne genomske DNK, analizu polimorfizama gena za ACE primenom reakcije lančane polimerizacije (PCR). Pri radu je upotrebljena DNK izolovana iz limfocita periferne krvi bolesnika. Za izolaciju je primenjena metoda isoljavanja ("salting out") po Milleru.

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 295 reference.

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

Ovo istraživanje je pokazalo da oba modaliteta supstitucije gvožđa (per os prema IV) podjednako efikasna u kontroli anemije rHu Epo beta kod bolesnika na hemodijalizi u postizanju referentne hemoglobinemije (105 gr/l) tokom 9 meseci praćenja. Vrednosti hematoloških parametara (RBC, HGB, HCT, MCV i MCHC, % retikulocita) su bile slične između dve terapijske grupe supstitucije Fe u tačkama preseka 1, 3, 6 i 9ti mesec. Kod bolesnika na IV supstituciji gvožđa (Fe) i kod nosilaca ACE genotipa DD značajno je veći porast hemoglobinemije u trećem mesecu terapije rHu Epo, modalitet terapije gvožđem i genotip ACE I/D su dva nezavisna faktora koja pomažu u ranoj stimulaciji eritropoieze. Ukupna doza rHuEpo koju su primali bolesnici tokom devet meseci praćenja se nije razlikovala između dve grupe bolesnika prema načinu davanja terapije gvožđem, niti je povezana sa I/D polimorfizmom genotipa ACE, odnosno prema udruženim subgrupama za oba kriterijuma – modalitet supstitucije Fe glukonata i polimorfizam I/D ACE genotip. Analiza ukupnog broja 92 bolesnika ukazuje na značajno smanjenje vrednosti EF posle 9 meseci terapije  $p=0.020$ . EF nije bila značajno promenjena posle 9 meseci u grupi na IV terapije Fe ( $p=0.235$ ), a opada na peroralnom Fe ( $p=0.038$ ). Blizu 13% bolesnika iz obe grupe Fe povećava EF posle 9 meseci. Promene u kategorijama LVMI od prvog do devetog meseca kod bolesnika na oralnom Fe nisu bile statistički značajne ( $p=0.152$ ), dok su u grupi bolesnika na IV Fe promene bile u prilog pogoršanja LVMI ( $p=0.002$ ). Manji relativni broj poboljšanja geometrije srca je kod teških srčanih bolesnika (ekscentrična hipertrofija srca) na peroralnom Fe (33.3%), nego na IV Fe (38.46%) i manji relativni broj bolesnika zadržava normalan nalaz na peroralnom Fe (44.4%), nego na IV Fe (50%). Koncentričnu hipertrofiju zadržava 94.11% bolesnika na IV Fe, a samo 64.70% bolesnika na peroralnom Fe. U grupi 67 bolesnika sa ACE genotipom II ili DI nije bilo značajne promene u RWT, dok je EF leve komore značajno promenjena posle 9 meseci terapije. Kod 56.71% nalaz je isti, kod 14.92%, je uočen

poboljšanje i kod 28.36% opadanje EF prema nalazu u prvom mesecu ( $p=0.038$ ). Prosečne vrednosti sistolnog, dijastolnog i srednjeg krvnog pritiska (MAP) su se slično kretale u dve terapijske grupe Fe (peroralna i IV Fe), dok su bile veće u grupi genotipa ACE II,DI nego ACE DD, što ukazuje na bolju kontrolu krvnog pritiska u nosilaca ACE DD genotipa primenjenom terapijom ACE inhibitorom.

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

U populaciji bolesnika sa odmaklom CKD i u predijaliznom periodu u literaturi se saopštavaju slični rezultati kao i kod bolesnika u istraživanju, o podjednakoj efikasnosti oba modaliteta nadoknade gvožđa u cilju dostizanja ciljnih vrednosti hemoglobina, redukcije potrebne doze rHu Epo (Stoves i sar 2001; Charytan i sar 2005). U drugim saopštenjima data je prednost parenteralnoj nadoknadi gvožđa, uz zaključak značajnog porasta hematoloških parametara u grupi na intravenskom Fe, te značajnog opadanja parametara kinetike gvožđa (serumsko gvožđe, saturacije transferina, feritin) na oralnom Fe (Aggarwal i sar 2005). Studije o primeni Fe na hemodijalizi pretežno su ispitivale IV nadoknadu Fe na hemodijalizi, a relativno mali broj studija poredio je efikasnost peroralne prema IV nadoknadi gvožđa. U najvećem broju studija saopštava se zadovoljavajuća efikasnost IV Fe i bolja efikasnost parenteralne prema oralnoj nadoknadi Fe kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi, te se IV obliku suplementacije gvožđa daje prednost u svetskim vodičima dobre kliničke prakse a peroralna terapija Fe se navodi kao moguća (K/DIGO 2012; K/DOQI 2007; ERBP 2008). 2012. godine objavljen je Cochrane meta analiza efikasnosti supstitucije Fe u CKD, koja je uključila 29 randomiziranih kontrolisanih studija na ukupno 2098 bolesnika u kojoj je analizirana razlika u efikasnosti peroralne prema intravenskoj nadoknadi gvožđa pretežno kod odraslih bolesnika. Ova meta analiza saopštava da su hematološki parametri, kao i parametri feremije bili veće vrednosti u grupi bolesnika na parenteralnoj nadoknadi Fe u poređenju sa peroralnom nadoknadom Fe (Albaramki i sar 2012). U devet studija koje su obuhvatile 487 bolesnika na hemodijalizi ili peritonealnoj dijalizi, pokazana je značajna redukciju doze eritropoietina u grupi bolesnika na parenteralnoj u odnosu na peroralnu terapiju gvožđem, to nije uočeno u grupi predijaliznih bolesnika sa odmaklom CKD. Rezultati istraživanja su

saglasni sa studijama analiziranim u Cochrane meta analizi (Macdougall i sar 1996; Fishbane i sar 1995; Fishbane i sar 1995; Svara i sar 1996; Lia i sar 2008) da je tokom prva 3 meseca efikasnost IV Fe je bila odli na i hemoglobin u krvi zna ajno raste, dok na peroralnom Fe opada. U daljem toku terapije bolesnika uklju enih u prikazano istraživanje do kraja 9 meseca ne uo avaju se razlike u hematološkim efektima izme u peroralne i IV nadoknade Fe u protokolu primene rHu Epo na hemodijalizi. U ve ine pojedina nih studija iz Cochranove meta analize zna ajno je kra e vreme pra enja efekata terapije Fe i rHuEpo (1 do 4 meseca) nego kod prikazanih rezultata bolesnika (9 meseci) i ove studije jasno pokazuju prednost IV Fe prema peroralnom Fe, dok u studijama koje su trajale 6 meseci i duže te razlike nisu prime ene ili su manje naglašene. Veoma je mali broj studija koji su u dužem periodu pratile razlike u efikasnosti intravenskog i peroralnog Fe na hemodijalizi. Rezultati u ovom istraživanju su saglasni ranim studijama, s obzirom da je uo eno da je zna ajno bolji hematološki odgovor kod bolesnika na IV Fe prva 3 meseca terapije u odnosu na primenu peroralnog Fe. Kod bolesnika u ovom istraživanju koji su bili nosioci ACE genotipa DD ili su na parenteralnoj supstituciji gvož e glukonom nastao je zna ajno ve i porast hemoglobina u krvi u tre em mesecu terapije rHu Epo i to je izazvalo redukciju naredne doze rHu Epo. Ukupna doza rHu Epo beta koju su dobijali bolesnici u ovom istraživanju tokom devet meseci istraživanja se nije razlikovala u odnosu na polimorfizam genotipa ACE I/D. To zna i da se pri istoj dozi rHu Epo postiže zna ajno ve i porast hemoglobina u prva 3 meseca kod nosioca genotipa DD, odnosno da je za odre en ciljni hemoglobin u prva 3 meseca efektivna eritropoeza postignuta manjom dozom eritropoietina kod DD genotipa ACE. Niži nivoi hemoglobina u krvi u grupi bolesnika s genotipom ACE DD u odnosu na bolesnike II/ID mogu da budu povezani sa ve om inhibicijom procesa eritropoeze usled primenjene terapije ACE inhibitorima u cilju kontrole krvnog pritiska, a hipertenzija se upravo o ekuje zbog ve eg stimulatornog efekta genotipa DD na eritropoezu i inicijalnog porast hemoglobina i hematokrita u prva 3 meseca terapije rHuEpo i supstitucije Fe, kao što su pokazale I druge studije (Kiss i sar 2015; Hatano i sar 2000; Varagunama i sar 2003). S druge strane jedan broj novijih studija saopštava povezanost parenteralnog gvož a sa više neželjenih dejstava iz grupe glavnih neželjenih kardiovaskularnih doga aja (MACE) i nosi ve i rizik od infekcija (Agarwal i sar 2015; Bailie i sar 2015; Weiss i Kronenberg 2015; Kuragano i sar 2014). To je

otvarilo poglavlje novih modaliteta supstitucije Fe na hemodijalizi, preko dijalizne te nosti, ali aktuelizuje se i peroralnu supstituciju Fe samostalno ili u kombinaciji sa IV supstitucijom Fe ili oralnim eritropoietinom. Jedan broj studija pokazao je da korekcija anemije na hemodijalizi primenom rHu Epo i gvož a dovodi oporavka kardiološkog statusa bolesnika (Kirkpantur i sar 2005; Tagawa i sar 1991; Pascual i sar 1991). Neke studije nisu pokazale povezanost korekcije anemije i oporavka kardiološkog statusa kod bolesnika na hemodijalizi (Foley i sar 2000), a neke su sli no rezultatima ovog istraživanja pokazali delimi no uspešne rezultate (London i sar 2001). Velika studija na 603 bolesnika pokazaka je sli ne rezultate ovog istraživanja u vezi prelaska bolesnika izme u pojedinih kategorija poreme aja geometrije leve komore (Eckardt i sar 2009).

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

1. Savin M, Hadzibulic E, Damjanovi T, Santric Z, Stankovic S. Assosiation of I/D ACE genotype with erythropoietin stimulation in kidney failure. Archive Biolog Sciencies 2016. on LINE-FIRST (00): 51-51. DOI:10.2298/ABS160303051S.

#### **E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Uticaj terapije gvož em i eritropoetinom i polimorfizma ACE D/I na suzbijanje anemije kod bolesnika na hroni noj hemodijalizi**” dr Edvina Hadžibuli a predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju mehanizama nastanka anemije kod bolesnika na hroni noj hemodijalizi. Daje egzaktne smernice u pravilnom prepoznavanju i dijagnostici eritropoeze u deficijenciji gvož a, savremene dijagnosti ke parametre za deficijenciju gvož a, preporuke i modalitete le enja. Uticaj, prednosti i potencijalne rizike terapije rHu Epo beta i nadoknade gvož a u le enju anemije kod ovih bolesnika. Ovim istraživanjem je ukazano na uticaj polimorfizma ACE gena D/I na eritropoiezu, anemiju i kardiovaskularni satus kod bolesnika na hroni noj hemodijalizi. Dat je

aktuelni osvrt potrebe novih istraživanja i pažljivije kontrole bolesnika na parenteralnoj nadoknadi gvožđ a. Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju doprinos novim strategijama u (dugotrajnom) le enju anemije, koji obezbe uju ve u sigurnost za bolesnika na hemodijalizi.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Edvin B. Hadžibuli a i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.



U Beogradu, 20.05. 2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Biljana Stojimirovi

---

Prof. dr Slobodan Risti

---

N. Sar. dr Sanja Stankovi

---

Mentor:

Prof. dr Marina Savin

---