

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20.05.2021. godine, broj 9700/14-PĐ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutathion transferazu M1“**

kandidata dr Petra Đurića, zaposlenog u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje sa dijalizom “prof dr Vasilije Jovanović” KBC Zvezdara u Beogradu. Mentor je prof dr Nada Dimković i komentor je prof dr Tatjana Simić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dijana Jovanović, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Sonja Šuvakov, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Branka Mitić, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

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 Petra Đurića napisana je na ukupno 56 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 18 tabela i tri grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano šta je to oksidativni stres i zašto on predstavlja glavno obeležje terminalnog stadijuma bubrežne slabosti. Objasnjeno je kako povećana produkcija slobodnih radikala i smanjena aktivnost antioksidantnih enzima doprinosi nagomilavanju biopokazatelja

oksidativnog oštećenja proteina, lipida i DNK kod dijaliznih bolesnika. Takođe, definisano je na koji su način članovi superfamilije enzima glutation transferaze (GST) u stanju da detoksikuju nagomilane uremijske toksine kod hemodijaliznih (HD) bolesnika i kako poseduju snažnu antioksidantnu aktivnost prema reaktivnim kiseoničnim vrstama (ROS) i peroksidima. Naznačeno je da polovini populacije nedostaje aktivnost GSTM1 enzima usled homozigotne delecije glutation transferaze M1 (GSTM1) gena i da HD bolesnici kojima nedostaje GSTM1 aktivnost imaju povećana oksidativna oštećenja DNK i veću stopu mortaliteta nego oni koji imaju aktivan GSTM1 enzim. U uvodu je definisan i termin biokompatibilnost koji označava složene reakcije između ne-biološkog materijala i/ili uređaja i celavog organizma, te je ukazano da je membrana za dijalizu centralna komponenta dijaliznog sistema i kao takva ima značajnu ulogu u nastanku reakcija bioinkompatibilnosti. Upotreba membrana obloženih vitaminom E (VEM) se smatra kao način kojim se može smanjiti oksidativni stres i ova strategija je bazirana na činjenici da vitamin E deluje kao snažan hidrofobni čistač koji obezbeđuje zaštitu lipida plazme i ćelijskih membrana od lipidne peroksidacije, direktno smanjujući stvaranje ROS na mestu kontakta ćelija krvi i membrane.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Ciljevi ovog istraživanja bili su da se utvrdi genski polimorfizam za GSTM1 među hemodijaliznim bolesnicima i tako ustanovi učestalost bolesnika sa homozigotnom delecijom gena, kao i da se izvrši uporedna analiza kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa GSTM1 aktivnim i GSTM1 nultim genotipom. Takođe, cilj je bio da se ispita uticaj tromesečne primene dijaliznih membrana obloženih vitaminom E na parametre oksidativnog stresa i inflamacije kod bolesnika sa GSTM1 nultim genotipom u odnosu na bolesnike sa GSTM1 nultim genotipom lečenih standardnim polisulfonskim membranama, kao i da se ispitaju parametri anemije, uhranjenosti i mineralo-koštanog metabolizma kod bolesnika lečenih sa dve vrste dijaliznih membrana (VEM i polisulfonskim membranama).

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se studija sastojala iz dva dela. U prvi deo studije je uključeno 170 bolesnika koji su ispunili uključujuće kriterijume i bili su voljni da učestvuju u istraživanju. Genotipizacija GSTM1 je urađena kod svih 170 bolesnika i delecija gena GSTM1 je pronađena kod 110 bolesnika. Potom su prikupljeni podaci o kardiovaskularnom morbiditetu iz dijaliznih istorija i poređen je kardiovaskularni morbiditet između bolesnika sa aktivnim i nultim GSTM1 genotipom. Takođe, poređeni su parametri anemije, metabolizma minerala i nutricije. U drugom delu studije, od 110 bolesnika sa GSTM1 nultim genotipom, 80 ih je randomizovano i uključeno u interventni deo studije. Od

ukupno 80 bolesnika, 40 ih je dijalizirano u periodu od 3 meseca sa VEM, dok je preostalih 40 dijalizirano sa high-flux polisulfonskim membranama iste površine. Markeri oksidativnog oštećenja proteina, lipida i inflamacije (tiolne grupe, malondialdehid (MDA), interleukin-6 (IL-6), zajedno sa antioksidantnom aktivnošću plazme (glutation peroksidaza (GPX), superoksid dizmutaza (SOD)) određeni su pre i posle studije.

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 242 reference.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „**Uticaoj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutacion transferazu M1**”, autora dr Petra Đurića, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 16 %. 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 njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujemo da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

## **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Dve grupe bolesnika su se međusobno razlikovale u odnosu na osnovi uzrok terminalnog stadijuma bubrežne slabosti (TBS), gde su bolesnici sa homozigotnom delecijom GSTM1 gena ređe imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok TBS (39,1 % naspram 61,7%), dok se DM kao osnovni uzrok TBS češće javljao kod bolesnika sa nultim

GSTM1 genotipom (18,2 % naspram 8,3%). Što se tiče ostalih analiziranih demografskih karakteristika, osnovnih biohemijskih parametara i dijaliznih parametara, grupe bolesnika se nisu međusobno razlikovale. Pri poređenju prethodnog kardiovaskularnog morbiditeta između bolesnika, sa delecijom gena i sa aktivnim GSTM1 genom, nije pronađena razlika i zaključeno je da su bolesnici u obe grupe podjednako često oboljevali od infarkta miokarda (IM), cerebrovaskularnog insulta (CVI), angine pektoris (AP), periferne okluzivne arterijske bolesti (POAB) i srčane aritmije. Nije pronađena razlika u učestalosti primene agenasa stimulacije eritropoeze (ASE), prosečnoj nedeljnoj dozi ASE (kod onih što su ih imali u terapiji), rezistenciji na iste, vrednostima hemoglobina i feritina, saturaciju transferina i serumskog gvožđa između bolesnika sa GSTM1 aktivnim i nultim genotipom. U pogledu parametara nutricije, pronašli smo da su bolesnici sa GSTM1 aktivnim genotipom imali statistički značajno niže vrednosti LDL holesterola i serumskog fosfata, dok u pogledu drugih parametara nutricije i mineralo-koštanog metabolizma između dve grupe bolesnika nije bilo statistički značajne razlike.

Nakon tri meseca dijaliziranja sa VEM membranama, vrednosti GPX, MDA i tiolnih grupa su porasle u obe grupe, ali bez statistički značajne razlike između grupa. Vrednosti SOD i C reaktivnog proteina (CRP) se nisu značajno promenenile nakon perioda lečenja od tri meseca. IL-6 je porastao u kontrolnoj grupi, istovremeno se smanjio u VEM grupi, ali bez statistički značajnosti. Vrednosti hemoglobina, eritrocita, indeksa rezistencije na eritropoetin, vrednosti serumskog gvožđa i feritina se nisu statistički značajno razlikovale nakon tri meseca kako unutar grupa, tako ni između grupa. U pogledu drugih laboratorijskih parametara, proteina, albumina, triglicerida, fosfora i Kt/V došlo je do značajnog poboljšanja unutar grupa, ali bez statistički značajne razlike između grupa.

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

U prvom delu teze analizirana je distribucija delecionog polimorfizma gena za GSTM1 kod 170 hemodijaliziranih bolesnika i homozigotna delecija je pronađena kod 110 bolesnika (65 %), dok je aktivni gen imalo 60 bolesnika (35%). Ispitivanje polimorfizma GSTM1 gena među hemodijaliziranim bolesnicima do sad je rađeno u nekoliko studija i u jednoj od njih, kod *Suvakov* i sar. homozigotna delecija *GSTM1* gena nađena kod 59,8% hemodijaliziranih bolesnika, što je slično rezultatu zabeleženom u ovoj tezi.

Nakon analiziranja GSTM1 genotipa, bolesnici su podeljeni u dve grupe u zavisnosti od prisustva GSTM1 aktivnog ili nultog genotipa, a potom su i analizirani osnovni demografski i biohemijski parametri. Dve grupe bolesnika su se međusobno razlikovale u

odnosu na osnovni uzrok TBS, gde su bolesnici sa homozigotnom delecijom GSTM1 gena ređe imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok TBS (39,1 % naspram 61,7%), dok se DM kao osnovni uzrok TBS češće javljao kod bolesnika sa nultim GSTM1 genotipom (18,2 % naspram 8,3%). U studiji *Petrović i sar.* pronađeno je da je GSTM1 nulti genotip nezavisan faktor rizika za razvoj esencijalne arterijske hipertenzije kod bolesnika sa DM tip 2. U pogledu prisustva dijabetesa, bilo kao komorbiteta ili osnovnog uzroka TBS, nije bilo razlike između grupa. Sličan rezultat u pogledu prisustva DM, zabeležen je i u studiji *Lin i sar.* U odnosu na prisustvo GSTM1 gena, grupe se međusobno nisu razlikovale po polu, životnoj dobi, telesnoj težini, vaskularnom pristupu, dijaliznom stažu, adekvatnosti dijalize, kao i u vrednostima CRP-a. Rezultati slične ovima viđeni su kod *Lin i sar.*

U ovoj tezi poređen je prethodni kardiovaskularni morbiditet između dve grupe hemodijaliznih bolesnika i zaključeno je da su bolesnici u obe grupe imali sličnu učestalost IM, CVI, AP, POAB i srčane aritmije. Pregledom literature nismo uspeli da pronađemo druge studije koje su poredile na isti ili sličan način kardiovaskularni morbiditet između ove dve grupe bolesnika. Međutim, uloga GSTM1 genotipa je do sada ispitivana u kontekstu preživljavanja dijaliziranih bolesnika uključujući i kardiovaskularni mortalitet u nekoliko radova. Tako su *Šuvakov i sar.* pokazali da GSTM1 nulti genotip ima prediktivnu ulogu kako u ukupnom mortalitetu, tako i kardiovaskularnom mortalitetu. Iako je bilo očekivano da su patofiziološki mehanizmi koji kod dijaliziranih bolesnika sa nultim GSTM1 genotipom dovode do povećanog kardiovaskularnog mortaliteta slični kao i u patogenezi kardiovaskularnih događaja, naši rezultati koji se odnose na kardiovaskularni morbiditet nisu to pokazali. Kao jedan od mogućih razloga za neusaglašenost ovih rezultata uticaja GSTM1 nultog genotipa na kardiovaskularni mortalitet i morbiditet može biti pomenuti dizajn studije preseka. Poredeći parametre anemije, između grupe bolesnika sa GSTM1 nultim i aktivnim genotipom između analiziranih parametara anemije nije bilo statistički značajne razlike (učestalosti primene ASE, prosečnoj nedeljnoj dozi ASE, vrednostima Hb i ERI). Jedina studija u kojoj su poređeni parametri anemije između dijaliznih bolesnika sa GSTM1 nultim i aktivnim genotipom bila je studija *Lin i sar.* i u njoj, za razliku od naših rezultata, bolesnici sa GSTM1 nultim genotipom su imali niže prosečne vrednosti hemoglobina (Hb) i zahtevali su veće doze ASE. U rezultatima ove teze, poredeći status gvožđa, nije bilo razlike između dve grupe bolesnika u pogledu feritina, serumskog gvožđa i saturacije transferin. Studija *Lin i sar.* zabeležila je slične rezultate. Rezultati određivanja antioksidantne aktivnosti u ovom istraživanju nisu pokazali prednosti VEM nad standardnim polisulfonskim membranama. Naime, posle tri meseca lečenja, aktivnost GPX porasla je značajno u obe grupe, ali bez

statistički značajne razlike između grupa. U skorašnjoj meta analizi *D'Arrigo* i sar. poređeni su efekti VEM nad konvecionalnim HD membranama i zaključak navedene studije je bio da primena VEM nije uticala na aktivnost GPX u plazmi. Pored toga, aktivnost SOD nije se statistički značajno promenila nakon tri meseca. Takođe u saglasju sa rezultatima ove teze, *D'Arrigo* i sar. nisu pronašli da terapija VEM pravi značajne razlike u SOD aktivnosti. U ovom istraživanju nije pronađeno da VEM utiču na promenu nivoa markera oksidativnog oštećenja lipida i proteina s obzirom da su koncentracije MDA i tiol grupa značajno porasle u obe grupe, bez obzira na vrstu membrana koje su korišćene. Nasuprot ovim rezultatima, *D'Arrigo* i sar. su pronašli da lečenje sa VEM smanjuje nivo MDA. Takođe, meta analiza *Yang* i sar. je pronašla značajno smanjenje nivoa MDA pri lečenju sa VEM, što je u suprotnosti sa podacima ove teze. Ipak u studiji *Bargnoux* i sar, zabeležen je porast nivoa MDA nakon tromesečnog dijaliziranja sa VEM, što je u skladu sa rezultatima ove teze. Marker zapaljenja CRP ostao je nepromenjen u obe ispitivane grupe, dok je IL-6 porastao u kontrolnoj grupi i istovremeno se smanjio u VEM grupi nakon tromesečnog lečenja, ali razlika između grupa nije dostigla statističku značajnost. Meta analiza *D'Arrigo* i sar. pokazala je rezultate slične rezultatima ove teze, tj da je primena VEM dovela do smanjenja nivola IL-6. S druge strane, studija *Mandolfo* i sar. nije potvrdile takve rezultate. Takođe slično rezultatima ove teze, meta analiza *D'Arrigo* i sar. nije pronašla da primena VEM dovodi do smanjenja nivoa CRP-a. Nasuprot ovome u studiji *Yang* i sar. zabeleženo značajno smanjenje nivoa CRP-a uz primenu VEM. U pogledu parametara anemije i gvožđa, lečenje sa VEM uticalo je samo na saturaciju transferina, koja se smanjila (ali ostala unutar referentnog opsega), za istu količinu ordiniranog gvožđa, istu prosečnu dozu ASE i isti nivo feritina. Ostali parametri anemije ostali su nepromenjeni. Rezultati *D'Arrigo* i sar. ukazuju da primena VEM ne utiče značajno na broj eritrocita, nivo Hb kao ni na prosečnu dozu ASE. Za razliku od rezultata ove teze, oni su pronašli da primena VEM dovodi do smanjenja ERI, ali ovo nije viđeno u drugim randomizovanoj kontrolisanoj studiji *Lines* i sar. Slično rezultatima ovog istraživanja, nisu pronašli razlike u vrednostima serumskog gvožđa i feritina između grupa, dok je postojalo značajno smanjenje saturacije transferina u VEM grupi. Uprkos izuzetnom tehnološkom napretku dijaliznog lečenja i dalje postoje brojni problemi koji su povezani sa prolongiranim lečenjem, kao što je proteinska malnutricija i ateroskleroza. Ovom tezom nije utvrđeno da se nutritivni status menja tokom primene VEM. Iako je u ovoj tezi zabeleženo značajno poboljšanje u vrednostima HDL, triglicerida, serumskih albumina, proteina i vrednostima Kt/V unutar grupa, statistički značajna razlika između grupa nije pronađena. Slični rezultati su zabeleženi u prethodno pomenutoj meta-analizi *D'Arrigo* i sar. Takođe u

meta analizi *Huang* i sar. nije pokazan uticaj primene VEM na lipide i nivo albumina. Nasuprot tome, nivoi LDL i HDL su opali kod bolesnika lečenih kako VEM tako i standardnim membranama u jednoj drugoj nerandomizovanoj studiji *Tanaka* i sar. Prema podacima *Tsuruoka* i sar. zabeleženo je smanjenje nivoa LDL kod bolesnika lečenih VEM. Rezultati te studije ukazuju da primena VEM ne utiče dovoljno značajno na aterosklerozu indukovanu hemodijalizom i dislipidemiju. Meta analiza *D'Arrigo* i sar. slično rezultatima ove teze, nije pronašla razlika u vrednostima mokraćne kiseline sa primenom VEM.

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

**Djuric P**, Suvakov S, Simic T, Markovic D, Jerotic D, Jankovic A, Bulatovic A, Tomic Dragovic J, Damjanovic T, Marinkovic J, Naumovic R, Dimkovic N. Vitamin E-Bonded Membranes Do Not Influence Markers of Oxidative Stress in Hemodialysis Patients with Homozygous Glutathione Transferase M1 Gene Deletion. *Toxins (Basel)*. 2020 May 27;12(6):352. doi: 10.3390/toxins12060352.

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

Doktorska disertacija „Uticaj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutathion transferazu“ dr Petra Đurića, kao prva randomizovana studija koja je sprovedena sa visokorizičnim bolesnicima (sa GSTM1 delecijom), predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju pre svega uticaja VEM na pokazatelje oksidativnog stresa kod bolesnika na hemodijalizi. Takođe u tezi je pokazano da bolesnici lečeni HD češće imaju GSTM1 nulti genotip u odnosu na GSTM1 aktivni genotip. Između bolesnika sa GSTM1 aktivnim i nultim genotipom nije pronađena razlika u pogledu kardiovaskularnog morbiditeta i prethodnih kardiovaskularnih događaja. Kao poseban naučni doprinos, značajno je istaći da nakon tromesečnog perioda dijaliziranja bolesnika sa VEM nisu viđeni dodatni korisni efekti u odnosu na standardne polisulfonske membranama u smanjenju bioprodukata oksidativnog stresa kod bolesnika sa GSTM1 nultim genotipom. Marker zapaljenja IL-6 porastao u kontrolnoj grupi i istovremeno se smanjio u VEM grupi, ali razlika između grupa nije dostigla statističku značajnost, ali ovaj rezultat naročito treba istaknuti kao mogući uticaj primene VEM na smanjenje nivoa zapaljenja, koji bi možda dostigao statističku značajnost pri dužoj primeni VEM. Uvid u dugoročne efekte VEM kod rizičnih grupa, poput dijaliznih bolesnika sa delecionim polimorfizmom GSTM1, pružiće buduća longitudinalna istraživanja na većom broju bolesnika.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Petra Đurića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.06.2021. g.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dijana Jovanović

---

Doc. dr Sonja Šuvakov

---

Doc. dr Branka Mitić

---

Mentor:

Prof. dr Nada Dimković

---

Komentor:

Prof. dr Tatjana Simić

---