

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Milica M. Miljković

**OKSIDATIVNO-STRESNI STATUS U KRV I
LIPOPOTEINSKIM FRAKCIJAMA
PACIJENATA SA HRONIČNOM BOLEŠĆU
BUBREGA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Milica M. Miljkovic

**OXIDATIVE STRESS STATUS IN BLOOD
AND LIPOPROTEIN FRACTIONS IN
PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY
DISEASE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević, mentor

redovni profesor

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Darko Černe

redovni profesor

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Ljubljani

Prof. dr Aleksandra Stefanović

vanredni profesor

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Jelena Vekić

docent

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Beograd, 2018.

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Jelene Kotur-Stevuljević. Deo disertacije je urađen na Katedri za kliničku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani i na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Uzroci su sakupljani na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu i u Opštoj bolnici „Sveti Luka“ u Smederevu.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorki prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević koja me je uvela u svet nauke. Hvala na svim savetima i sugestijama, stručnoj i organizacionoj podršci, kao i na poverenju i strpljenju koje je iskazala tokom izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandri Stefanović na razumevanju, bezrezervnoj podršci i pomoći tokom svih ovih godina našeg zajedničkog rada.

Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Jeleni Vekić za sve korisne savete i značajne ideje koje je nesebično delila sa mnom tokom izrade doktorske disertacije, a posebno za veliku podršku tokom svih prethodnih godina.

Najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Darku Černeu na ukazanom poverenju i ostvarenoj saradnji.

Prof. dr Sanji Simić-Ogrizović se zahvaljujem na pomoći prilikom odabira ispitivanih pacijenata i sakupljanja uzoraka, kao i na svim savetima i sugestijama pri izradi ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Aleksandri Zeljković koja je svojim stručnim savetima, podsticajem i uložnim trudom značajno doprinela izradi ove disertacije.

Na velikoj podršci i pomoći pri statističkoj obradi i tumačenju rezultata iskreno se zahvaljujem prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević.

Posebno se zahvaljujem prof. emeritusu Slavici Spasić na svim stručnim idejama i savetima, kao i na svemu što sam od nje naučila o statistici i naučnom radu.

Prof. emeritusu dr Zorani Jelić-Ivanović dugujem veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, velikoj podršci na putu mog naučnog usavršavanja.

Iskreno se zahvaljujem i prof. dr Vesni Spasojević- Kalimanovskoj na velikoj podršci i razumevanju koje mi je ukazala tokom svih ovih godina.

Koristim priliku da se zahvalim doc. dr Petri Kocbek sa Katedre za farmaceutske tehnologije, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani na stručnoj pomoći u savladavanju metode ultracentrifugiranja. Takođe, hvala svima profesorima, asistentima i prijateljima koji su me toplo prihvatili tokom hladnih zimskih dana u Sloveniji i učinili moj boravak nezaboravnim.

Zahvaljujem se i doc. dr Milanu Nikoliću sa Katedre za biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na korisnim sugestijama i pomoći u realizaciji dela eksperimentalnog rada vezanog za određivanje holesterola iz membrane eritrocita i hemoglobin-holesterol kompleksa.

Hvala svim zaposlenim na Katedri za medicinsku biohemiju, a posebno kolegama Mironu Sopiću, Jeleni Munjas, Sandri Vladimirov i Jasmini Ivanišević koji nisu direktno učestvovali u izradi ove doktorske disertacije, ali su mi svojim savetima i podrškom pomogli da prevaziđem prepreke i izazove sa kojima sam se susretala. Hvala i “novim nadama” Jeleni, Mariji, Tamari i Sanji čiji entuzijazam i želja za novim saznanjima predstavljaju stalnu inspiraciju. Sa velikim zadovoljstvom se zahvaljujem kolegici Tamari Gojković na iskrenoj podršci i divnom prijateljstvu.

Veliko hvala mojim prijateljima, jer su imali mnogo razumevanja poslednjih godina. Neizmernu zahvalnost dugujem svim članovima moje porodice i onim najstarijim i onom najmlađem, a posebno mojim roditeljima, bratu Marku i sestri Mileni. Zahvaljujem se i mom Miroslavu. Ne postoje reči... Ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama, mojim najmilijima.

Izvod

Hronična bolest bubrega (HBB) predstavlja stanje koje se karakteriše brojnim tradicionalnim i netradicionalnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). Dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija zahvaljujući međusobnim interakcijama predstavljaju faktore koji značajno doprinose patogenezi i progresiji ateroskleroze kod bolesnika sa HBB. Paraoksonaza 1 (PON1) je glavni antioksidativni enzim na HDL česticama, koji svoj antiaterogeni potencijal ostvaruje mehanizmima koji sprečavaju oksidaciju lipoproteina niske gustine (LDL). Prema *in vitro* studijama u reverznom transportu holesterola mogu učestvovati i membrane eritrocita koje razmenjuju holesterol (RBC-Mh) sa drugim lipoproteinima, kao i hemoglobin koji privremeno uklanja višak holesterola tako što gradi Hb-holesterol kompleks (Hb-h). Brojne studije su pokazale da inflamacija ima važnu ulogu u inicijaciji i progresiji ateroskleroze. Takođe, remodelovanje ekstracelularnog matriksa (ECM) i neadekvatna aktivnost matriks metaloproteinaza (MMP) i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP), kao i galektin-3 doprinose napredovanju hronične bolesti bubrega i razvoju ateroskleroze kod ovih bolesnika. Cilj ove studije je bio ispitivanje parametara dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u krvi bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika. Takođe, ova studija je imala za cilj i ispitivanje uticaja pomenutih faktora rizika na redoks status u glavnim lipoproteinskim frakcijama i na remodelovanje ECM. Cilj je bio i izračunati odgovarajuće skorove dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije kako bi se procenio sinergistički efekat ovih procesa kao i efekat koji zajedno ostvaruju na oksidativno-stresni status u lipoproteinskim frakcijama kod bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja.

U istraživanju je učestvovalo 77 bolesnika sa različitim stepenom oštećenja funkcije bubrega i 40 zdravih ispitanika. Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom.

Svi parametri oksidativnog stresa, totalni oksidativni status ($p < 0,01$), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP) ($p < 0,01$) i tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance ($p < 0,05$) su bili značajno viši kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega u odnosu na zdrave ispitanike. Vrednosti Hb-h u obe grupe bolesnika su bile niže u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$), dok je s druge strane RBC-Mh bio povišen kod bolesnika na hemodijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,01$). Zdravi ispitanici su imali značajno viši relativni udeo HDL2 subfrakcija u odnosu na bubrežne bolesnike ($p < 0,05$). Koncentracija i aktivnost PON1 u serumu su bile značajno niže u obe grupe bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike

($p < 0,001$). Arilesterazna aktivnost PON1 je bila statistički značajno niža kod bubrežnih bolesnika i na HDL2 i na HDL3 subklasama ($p < 0,001$). Utvrđeno je da nakon hemodijalize dolazi do značajnog povećanja paraoksonazne aktivnosti PON1 ($p < 0,01$), dok je arilesterazna aktivnost PON1 bila niža posle hemodijalize ($p < 0,01$). Značajno niža koncentracija PON1 izmerena je kod bubrežnih bolesnika u izolovanoj HDL lipoproteinskoj frakciji u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$), dok se vrednosti izmerene u ostalim lipoproteinskim frakcijama nisu razlikovale između bolesnika i zdravih. Poređenjem lipoproteinskih frakcija, koncentracija AOPP je bila najviša u VLDL česticama u odnosu na ostale lipoproteinske čestice u svim analiziranim grupama ($p < 0,001$). Koncentracija inflamatornog markera-pentraksina-3 je značajno viša kod bolesnika sa HBB ($p < 0,01$) i bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,001$) u poređenju sa zdravim ispitanicima. Takođe, koncentracije MMP-9 i TIMP-1 su bile više kod bubrežnih bolesnika ($p < 0,01$ i $p < 0,001$, redom) u odnosu na zdrave ispitanike, dok je koncentracija galektina-3 bila značajno viša u kontrolnoj grupi nego kod bubrežnih bolesnika ($p < 0,05$). Nakon statističke analize uočeno je da su vrednosti pojedinačnih skorova i zbirnog DOI skora bile povišene kod bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$). ROC analiza je pokazala da DOI skor ima izvanrednu sposobnost ($AUC = 0,920$, $p < 0,001$) u razdvajanju bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega od zdravih ispitanika.

Detaljnijom analizom dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije, kao i sagledavanjem kompleksnih interakcija između različitih faktora rizika kod bolesnika sa HBB, pruža se bolji uvid u mehanizam nastanka i progresije KVB kod ovih bolesnika. Izračunavanje skora dislipidemije, oksidativno-strsnog skora i skora inflamacije može biti korisno u proceni koji proces je dominantno prisutan u različitim grupama pacijenata i samim tim može služiti kao vodič za dalje preventivne mere koje treba primeniti kako bi se smanjili dominantno prisutni kardiovaskularni faktori rizika.

Ključne reči: Dislipidemija, oksidativni stres, inflamacija, lipoproteinske čestice.

Naučna oblast: Medicinske nauke- Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 615:577.115:616.61-008.6(043.3)

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) presents condition that is characterized by numerous traditional and non-traditional risk factors for developing cardiovascular disease (CVD).

Dyslipidemia, oxidative stress and inflammation due to mutual interaction are factors that significantly contribute to the pathogenesis and progression of atherosclerosis in patients with CKD. Paraoxonase 1 (PON1) is the main antioxidant enzyme on HDL particles, which has antiatherogenic potential by mechanisms that inhibit oxidation of low density lipoprotein particles (LDL). In accordance to *in vitro* studies reverse cholesterol transport could involve erythrocyte membranes that exchange free cholesterol (RBC-Mc) with other lipoproteins, as well as hemoglobin that temporarily removes excess of cholesterol by building Hb-cholesterol complex (Hb-c). Numerous studies have shown that inflammation plays an important role in initiation and progression of atherosclerosis. Also, extracellular matrix (ECM) remodeling and inadequate activity of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue matrix metalloproteinase inhibitors (TIMP) as well as galectin-3 also contribute to the progression of chronic kidney disease and atherosclerosis in these patients. The aim of this study was to examine the parameters of dyslipidemia, oxidative stress and inflammation in serum of patients with CKD, dialysis patients and healthy subjects. Also, this study was aimed at examining the influence of the mentioned risk factors on redox status in major lipoprotein fractions and on ECM remodeling. The aim was to calculate summary score of dyslipidemia, oxidative stress and inflammation to evaluate the synergistic effect of these processes as well as the effect on oxidative stress status in lipoprotein fractions in patients with different degrees of renal impairment.

The study included 77 patients with different stage of renal function impairment and 40 healthy subjects. The research is planned and implemented according to ethical principles in accordance with the Helsinki Declaration.

Healthy subjects had a significantly higher percentage of HDL2 subfractions compared to renal patients ($p < 0.05$). The values of Hb-c in both patients groups were lower than in control group ($p < 0.001$), while values of RBC-Mc were elevated in dialysis patients compared to the control group ($p < 0.01$). All parameters of oxidative stress, total oxidative status ($p < 0.01$), advanced oxidation protein products (AOPP) ($p < 0.01$) and thiobarbituric acid reactive substances ($p < 0.05$) were significantly higher in patients with impaired renal function compared to healthy subjects. Concentration and activity of PON1 in serum were significantly lower in both groups of patients compared to healthy subjects ($p < 0.001$). Arylesterase activity of PON1 was significantly lower in renal patients on HDL2 and HDL3 subclasses ($p < 0.001$). It was found that after hemodialysis there was a significant increase in paraoxonase activity of PON1 ($p < 0.01$), while arylesterase activity of PON1 was lower after

dialysis ($p < 0.01$). A significantly lower concentration of PON1 was observed in renal patients in the isolated HDL lipoprotein fraction compared to the control group ($p < 0.001$), whereas the values found in other lipoprotein fractions were not different between patients and healthy subjects. Comparison of lipoprotein fractions, have shown that concentration of AOPP was highest in VLDL particles compared to other lipoprotein particles in all analyzed groups ($p < 0.001$). Concentration of inflammatory marker-pentraxin-3 was significantly higher in patients with CKD ($p < 0.01$) and dialysis patients ($p < 0.001$) compared to healthy subjects. Also, concentrations of MMP-9 and TIMP-1 were significantly higher in renal patients ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) compared to healthy subjects, whereas galectin-3 concentration was significantly higher in the control group than in renal patients ($p < 0.05$). After the statistical analysis, the values of the single scores and the DOI score were significantly elevated in the renal patients compared to the healthy subjects ($p < 0.001$). ROC analysis showed that the DOI score showed a significant ability ($AUC = 0.920$, $p < 0.001$) in the separation patients with impaired renal function from healthy subjects.

Detailed analysis of dyslipidemia, oxidative stress and inflammation, as well as the examination of complex interactions between different risk factors in patients with CKD provides a better insight into the mechanism of development and progression of CVD in these patients. Estimation of dyslipidemia score, oxy score, and inflammation score could be useful in evaluation process that is dominantly presented in patient group and consequently as a guide for further preventive measures in order to minimize distinct cardiovascular risk factors.

Key words: Dyslipidemia, oxidative stress, inflammation, lipoprotein particles

Scientific field: Medical sciences- Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC N°: 615:577.115:616.61-008.6(043.3)

Skrećenice u tekstu:

HBB- Hronična bolest bubrega

TBB- Terminalna bubrežna bolest

HIV- Virus humane imunodeficijencije (*eng. human immunodeficiency virus*)

SAD- Sjedinjene Američke države

KDOQI- Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

JGF- Jačina glomerularne filtracije

KVB- Kardiovaskularne bolesti

AHA- American Heart Association

LDL-h- Holesterol u lipoproteinima niske gustine

HDL-h- Holesterol u lipoproteinima visoke gustine

ApoC- Apolipoprotein C

ApoE- Apolipoprotein E

VLDL- Lipoprotein veoma niske gustine

LDL- Lipoprotein niske gustine

HDL- Lipoprotein visoke gustine

HMG-CoA reduktaza- Hidroksi-3-metil glutaril-CoA reduktaze

sdLDL- Male guste LDL čestice (*eng. small dense LDL*)

CETP- Holesterol ester transferni protein

oxLDL- Oksidovani lipoprotein niske gustine

apoA-I- Apolipoprotein A-I

mRNK- Informaciona RNK (*eng. Messenger RNA*)

ABCA-1- ATP-vezujući kasetni transporter klase A1 (*eng. ATP-binding cassette transporter-A1*)

ACAT- Acetil-koenzim A acetiltransferaze

LCAT- Lecitin-holesterol aciltransferaza

ABCG-1- ATP-vezujući kasetni transporter klase G1 (*eng. ATP-binding cassette transporter-G1*)

MCP-1- Monocit hemotaksni protein (*eng. Monocyte chemoattractant protein-1*)

LRP- LDL povezan protein (*eng. Lipoprotein receptor-related proteins*)

SR-B1- Skevindžer receptori klase B1 (*eng. scavenger receptor class B1*)

PON1- Paraoksonaza-1

PAF-AH- Acetilhidrolaza faktora aktivacije trombocita

PON2- Paraoksonaza-2

PON3- Paraoksonaza-3

FC- Slobodan holesterol (*eng. Free cholesterol*)

CE- Ester holesterola (*eng. Cholesterol ester*)

RBC- Eritrociti (*eng. Red blood cell*)

LDL-R- Receptori za LDL

ABCG5/8- ATP-vezujući kasetni transporter klase G5/8 (*eng. ATP-binding cassette transporter-G5/8*)

UV zračenje- Ultravioletno zračenje

ROS- Reaktivna kiseonična jedinjenja (*eng. Reactive oxygen species*)

$O_2^{\cdot -}$ - Superoksidni anjon

H_2O_2 -Vodonik peroksid

HO^{\cdot} - Hidroksi radikal

HOO^{\cdot} - Hidroperoksil radikal

OCl^- - Hipohloritni anjon

NO^{\cdot} - Azotmonoksidni radikal

NO_2^{\cdot} - Azotdioksidni radikal

$ONOO^-$ - Peroksinitritni anjon

NO- Azot-monoksid

DNK- Dezoksiribonukleinska kislina

IL-1- Interleukin-1

IL-6- Interleukin-6

TNF- α - Faktor nekroze tumora α

hsCRP- Visoko osetljivi C reaktivni protein (*eng. High sensitive C reactive protein*)

ECM- Ekstracelularni matriks

MMP- Matriks metaloproteinaze

TIMP- Tkivni inhibitor matriksmetaloproteinaza

AGE- Uznappedovali krajnji produkti glikacije (*eng. Advanced Glycation End-products*)

RAGE- Receptori za uznappedovale krajnje produkte glikacije (*eng. Receptor for Advanced Glycation End-products*)

ITM- Indeks telesne mase

EDTA- Etilendiaminotetrasirćetna kiselina

UH- Ukupan holesterol

apoB-100- Apolipoprotein B-100

MDRD- Modification of Diet in Renal Disease

metHb- Methemoglobin

Hb- Hemoglobin

RBC-Mh- Holesterol iz membrane eritrocita

Hb-h- Holesterol vezan za hemoglobin

FRS- Framingamski skor rizika

ABTS- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

TAS- Totalni antioksidativni status (*eng. Total antioxidative status*)

TOS- Totalni oksidativni status (*eng. Total oxidative status*)

AOPP - Uznappedovali produkti oksidacije proteina (*eng. Advanced oxidation protein products*)

SH-grupe- Sulfhidrilne grupe (*eng. Sulfhydryl groups*)

DTNB- 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojevom kiselinom

TBARS- Tiobarbituratna kiselina reagujuće supstance (*eng. Thiobarbituric acid reactive substances*)

PAB- Prooksidativno-antioksidativni balans

TMB- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

HKU- Hidrogen-peroksid komplementarne jedinice

ELISA- Enzimski imunoesej (*eng. Enzyme-linked immunosorbent assay*)

d- Gustina uzorka (reagensa)

DOI- Skor dislipidemije-oksidativno-stresnog statusa-Inflamacije (*eng. Dyslipidemia score-Oxidative stress score-Inflammation score*)

CI- Interval pouzdanosti (*eng. Confidence interval*)

χ^2 - Chi-kvadrat

ANOVA- Analiza varijanse

ANCOVA- Analiza kovarijanse

ROC- Receiver Operating Characteristics

AUC- Površina ispod ROC krive (*eng. Area under the curve*)

Sadržaj:

1. Uvod	4
1.1 Epidemiologija hronične bolesti bubrega	4
1.2. Faktori rizika za nastanak hronične bolesti bubrega.....	5
1.3. Definicija i klasifikacije hronične bolesti bubrega	7
1.4. Kardiovaskularne bolesti kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega	8
1.5. Dislipidemija u hroničnoj bolesti bubrega.....	10
1.5.1. Promene na nivou VLDL čestica	11
1.5.2. Promene na nivou LDL čestica	12
1.5.3. Promene na nivou HDL čestica.....	13
1.6. Reverzni transport holesterola posredovan eritrocitima	17
1.7. Oksidativni stres kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega	19
1.8. Inflamacija kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega	23
1.9. Remodelovanje ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega	24
2. Ciljevi	26
3. Materijal i metode.....	28
3.1. Ispitanici.....	28
3.2. Osnovne biohemijske analize	30
3.3. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija korišćenjem gradijent gel elektroforeze	31
3.4. Određivanje eritrocitnih parametara	33
3.4.1. Priprema uzorka hemolizata.....	33
3.4.2. Određivanje ukupnog hemoglobina	34
3.4.3. Određivanje koncentracije methemoglobina.....	34
3.4.4. Određivanje koncentracije holesterola u eritrocitima	35
3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	36
3.5.1. Totalni antioksidativni status	36
3.5.2. Totalni oksidativni status	37
3.5.3. Uznapredovali produkti oksidacije proteina	38
3.5.4. Ukupne sulfhidrilne grupe.....	39
3.5.5. Tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance	40
3.5.6. Prooksidativno-antioksidativni balans	41
3.6. Određivanje statusa enzima paraoksonaze-1	42

3.6.1. Određivanje paraoksonazne aktivnosti enzima paraoksonaze-1 (PON1) u serumu	42
3.6.2. Određivanje arilesterazne aktivnosti enzima PON1 u serumu	42
3.6.3. Određivanje masene koncentracije enzima PON1	43
3.6.4. Određivanje masene koncentracije enzima PON3	44
3.6.5. Određivanje aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 lipoproteinskim subfrakcijama	45
3.7. Izdvajanje lipoproteinskih frakcija korišćenjem tehnike ultracentrifugiranja	46
3.7.1. Izdvajanje VLDL lipoproteinske frakcije	48
3.7.2. Izdvajanje LDL lipoproteinske frakcije	49
3.7.3. Izdvajanje HDL lipoproteinske frakcije	50
3.7.4. Agaroza gel elektroforeza	51
3.7.5. Gel filtracija za uklanjanje molekula soli iz izdvojenih lipoproteina (VLDL, LDL, HDL)	51
3.8. Određivanje masene koncentracije pentraksina-3	52
3.9. Određivanje masene koncentracije galektina-3	53
3.10. Određivanje masene koncentracije matriks metaloproteinaze-9	54
3.11. Određivanje masene koncentracije tkivnog inhibitora metaloproteinaza-1	55
3.12. Izračunavanje skorova rizika za kardiovaskularne bolesti	56
3.12.1. Izračunavanje Framingamskog skor rizika	56
3.12.2. Izračunavanje zbirnog skora dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije (DOI)	58
3.13. Statistička analiza	59
4. Rezultati istraživanja	60
4.1. Osnovni demografski podaci i rezultati biohemijskih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika	60
4.2. Distribucija LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika	65
4.2.1. Osnovni demografski podaci i rezultati biohemijskih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom	68
4.2.2. Spearmanova korelaciona analiza parametara lipidnog statusa, dijametra LDL čestica i relativnih udela LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika	71
4.3. Distribucija HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika	72
4.3.1. Spearmanova korelaciona analiza između parametara lipidnog statusa, dijametra i relativnih udela HDL subfrakcija	75
4.4. Analiza eritrocitnih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika	76
4.4.1. Eritrocitni parametri kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom	78

4.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika	79
4.5.1. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom	81
4.5.2. Spearmanova korelaciona analiza parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa parametrima lipidnog statusa i veličinom LDL i HDL čestica kod bubrežnih bolesnika.....	83
4.6. Određivanje statusa enzima PON1	84
4.6.1. Određivanje arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika.....	90
4.6.2. Određivanje statusa PON1 pre i posle procesa hemodijalize.....	94
4.6.3. Spearmanova korelaciona analiza parametara koji opisuju status enzima paraoksonaze sa biohemijskim parametrima, parametrima lipidnog statusa, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	97
4.7. Određivanje oksidativno-stresnog statusa u lipoproteinskim frakcijama	99
4.7.1. Poređenje oksidativno-stresnog statusa VLDL, LDL i HDL lipoproteinskih frakcija kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika	103
4.7.2. Spearmanova korelaciona analiza oksidativno-stresnog statusa u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama sa parametrima redoks statusa u serumu i relativnim udelom HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika.....	105
4.8. Koncentracije pentraksina-3, galektina-3, matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i inhibitora matriks metaloproteinaze-1 (TIMP-1) kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika.....	106
4.8.1. Analiza ROC krivih u identifikovanju bubrežnih bolesnika sa visokim rizikom za razvoj KVB	108
4.8.2. Spearmanova korelaciona analiza galektina-3, pentraksina-3 i MMP-9 sa parametrima lipidnog statusa, parametrima koji opisuju status enzima PON1 i LDL dijametrom kod bubrežnih bolesnika	110
4.9. Izračunavanje zbirnog skora dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije	111
4.9.1. Spearmanova korelaciona analiza skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora, inflamatornog skora i zbirnog DOI skora sa ostalim ispitivanim parametrima kod bubrežnih bolesnika.....	114
5. Diskusija.....	116
6. Zaključci	134
7. Literatura	136

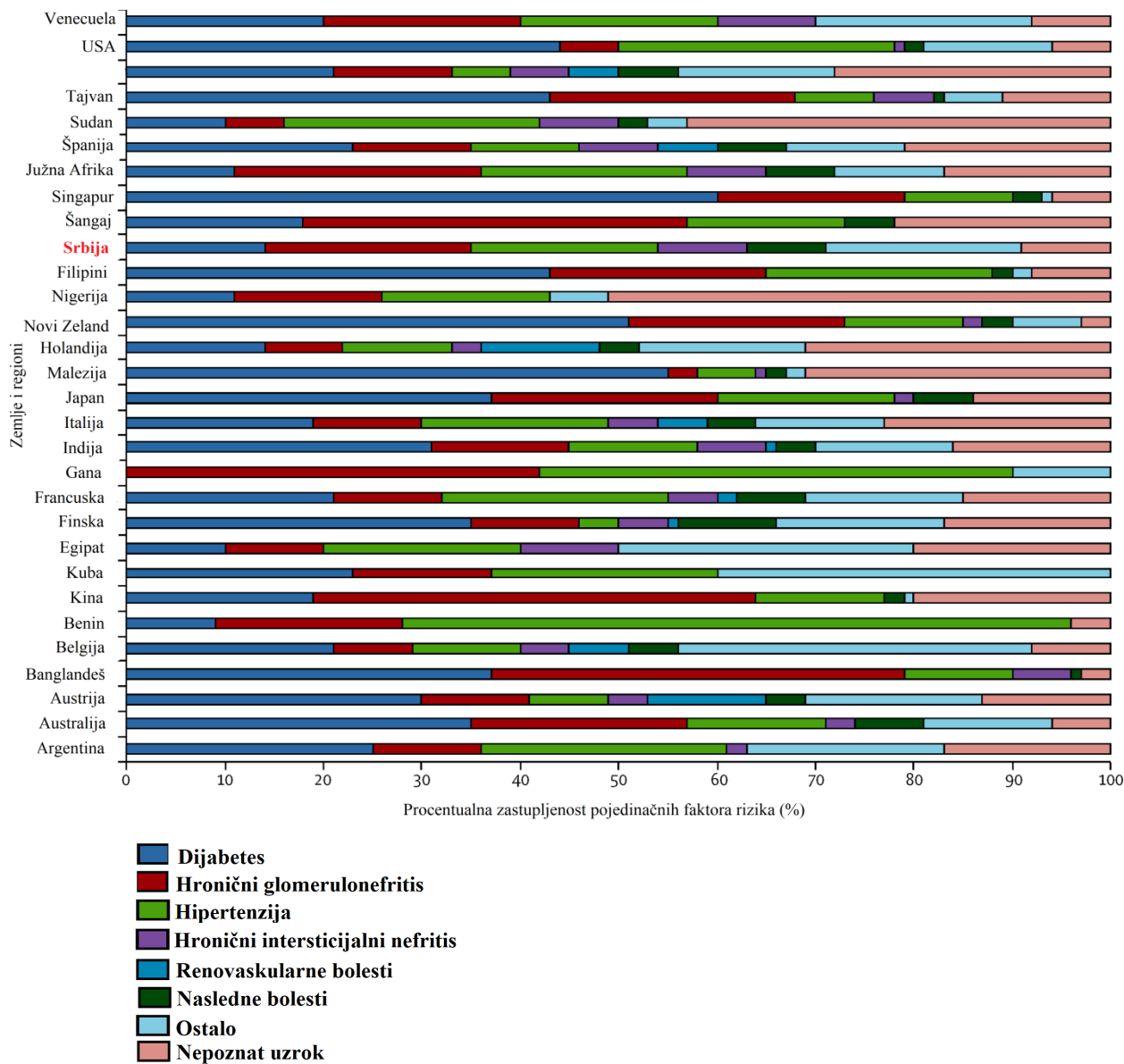
1. Uvod

1.1 Epidemiologija hronične bolesti bubrega

Hronična bolest bubrega (HBB) predstavlja grupu heterogenih poremećaja koji zahvataju strukturu i funkciju bubrega, a koji se međusobno razlikuju po uzroku, stepenu težine bolesti i progresiji (1). Imajući u vidu da bubrezi zauzimaju centralnu ulogu u održavanju homeostatskih mehanizama u organizmu, patološki procesi i promene koje dovode do smanjenja bubrežne funkcije predstavljaju jedan od vodećih uzročnika morbiditeta i mortaliteta širom sveta (2). Asimptomatski tok u ranim stadijumima bolesti i neadekvatan tretman dovode do potpunog gubitka funkcije bubrega i nastanka terminalne bubrežne bolesti (TBB) kada pacijenti zahtevaju dijalizu ili transplantaciju bubrega kako bi održali vitalne funkcije (3). Prema rezultatima najnovijih studija, preko dva miliona pacijenata je trenutno na terapiji dijalizom što predstavlja samo 10 % od ukupnog broja kojima je ovaj tretman potreban (4,5). Takođe prema procenama proisteklim iz ovih studija smatra se da će do 2030. godine broj pacijenata na dijalizi dostići 5,5 miliona na svetskom nivou (5,6). Naime rezultati ovih studija pokazuju da 10-15% svetske populacije, tačnije oko 600 miliona ljudi ima određeni oblik HBB (5,6). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije iz 2012. godine, 1,5 % svih smrtnih slučajeva u svetu mogu se pripisati HBB, pri čemu se na listi vodećih uzročnika smrti, nalazi na četrnaestom mestu (7). Studija *Global Burden of Disease* je 1990. godine rangirala HBB kao 27. uzročnik smrtnosti, za samo dve decenije, 2010. godine HBB su zauzele 10. mesto, ovakav porast osim HIV (eng. *human immunodeficiency virus*) infekcije nije zabeležila ni jedna druga bolest (8). U Srbiji je 2015.godine metodama za zamenu funkcije bubrega lečeno 5673 bolesnika, a 818 novih bolesnika je započelo lečenje, pri čemu se smatra da je broj obolelih u ranijim stadijumima bolesti bubrega znatno veći (9). Takođe, uočena je tendencija opadanja broja umrlih bolesnika lečenih metodama za zamenu funkcije bubrega, tako je 2015. godine u Srbiji umrlo 632 bolesnika koji su lečeni metodama za zamenu funkcije bubrega, dok je u 2014.godine broj umrlih bolesnika iznosio 762 (9,10). Generalno, incidenca i prevalenca HBB se dosta razlikuju između zemalja i regiona (11). Karakteristično je da se broj obolelih u različitim stadijumima HBB razlikuje između razvijenih zemalja i zemlja u razvoju, što se najčešće pripisuje različitom načinu života, socioekonomskom statusu, rasi, ceni zdravstvenog osiguranju u toj zemlji, ali i životnom veku stanovništva (12).

1.2. Faktori rizika za nastanak hronične bolesti bubrega

Imajući u vidu stalni porast broja bolesnika sa HBB, kao i bolesnika na dijalizi, poslednjih decenija sve se više pažnje posvećuje ranom prepoznavanju faktora rizika koji postepeno mogu dovesti do razvoja bolesti bubrega, kao i njihovoj prevenciji. Zbog heterogenosti i složenosti interakcija između različitih faktora rizika, predložena je podela na inicirajuće i faktore rizika koji ubrzavaju progresiju HBB (13). U inicirajuće faktore koji se povezuju sa razvojem bolesti bubrega spadaju dijabetes, muški pol i starije životno doba, a u faktore koji se povezuju sa pogoršanjem stanja bubrega spadaju hipertenzija, proteinurija i hiperurikemija (13). Mnogo češće korišćena podela jeste na tradicionalne i netradicionalne faktore rizika koji mogu dovesti do HBB, a zatim i do terminalne bubrežne bolesti (14). U tradicionalne faktore rizika spadaju: dijabetes, hipertenzija, gojaznost i starije životno doba a u netradicionalne glomerulonefritis, izlaganje nefrotoksinima, kamen u bubregu, faktori životne sredine i akutna bubrežna bolest (14). Bez obzira na način podele, epidemiološke studije su izdvojile dijabetes, hipertenziju i starost kao dominantne faktore rizika koji dovode do razvoja i progresije HBB (15). Prema Nacionalnoj fondaciji za bubreg SAD (*National Kidney Foundation*), u 2013. godini je bilo preko pedeset hiljada novoregistrovanih bolesnika sa HBB koje su nastale kao posledica dijabetesa (15). Dijabetes pored mikrovaskularnih komplikacija dovodi do epitelne disfunkcije, propadanja podocita, fokalne i difuzne glomerularne skleroze, vakuolizacije tubula, intersticijalne inflamacije i na kraju do fibroze (16, 17). Prethodne studije su pokazale da čak 85-95% bolesnika sa HBB ima povišen krvni pritisak (18). Između hipertenzije i HBB postoji jaka uzajamna veza. Naime nekontrolisano povišen krvni pritisak dovodi pre svega do oštećenja glomerula, a zatim i do smanjenja brzine glomerularne filtracije, što rezultuje u nagomilavanju tečnosti i proizvoda metabolizma, a kasnije i do povećanog krvnog pritiska. Na taj način se stvara začarani krug u kome dolazi do oštećenja endotela krvnog suda i do nastanka kardiovaskularnih komplikacija (19,20). Posle 30. godine života dolazi do postepenog fiziološkog gubitka funkcije bubrega, s tim da se ubrzan pad beleži posle pedesete godine života (21). Prema istraživanjima koja su sprovedena na životinjama brojni procesi, kao što su ishemija, metabolički poremećaji i gojaznost su uključeni u stvaranje ožiljnog tkiva tokom starenja (21). U različitim zemljama zastupljenost pojedinih faktora rizika se značajno razlikuje, što je prikazano na slici 1. U razvijenim zemljama dijabetes i hipertenzija predstavljaju vodeće faktore rizika, dok je na području Azije i Afrike najviše zastupljen glomerulonefritis kao faktor rizika (22).



Slika 1. Vodeći faktori rizika za nastanak i razvoj HBB u različitim zemljama.

Preuzeto uz izmene na srpski jezik iz: Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*. 2013; 382: 260-72. (11)

1.3. Definicija i klasifikacije hronične bolesti bubrega

Prema definiciji koju je dala Nacionalna fondacija za bubreg SAD u Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) vodiču, a koju su prihvatili nacionalni vodiči širom sveta hronična bolest bubrega se definiše kao oštećenje strukture i funkcije bubrega i/ili smanjenje jačine glomerularne filtracije ispod $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ koje traje duže od tri meseca (22). Pored svega navedenog kod ovih bolesnika su prisutne promene u strukturi bubrega koje se otkrivaju patohistološkim pregledom ili nekom od tehnika vizuelizacije. Takođe pregledom urina je moguće uočiti prisustvo proteina, leukocita, eritrocita ili cilindara što ukazuje na smanjenu funkciju bubrega (22). Na osnovu preporuka koje daje naš Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, a koji je u skladu sa KDOQI vodičem, hronična bolest bubrega ima pet stadijuma uzimajući u obzir jačinu glomerularne filtracije (JGF) kao parametar sveobuhvatne funkcije bubrega (Tabela 1) (22, 23).

Tabela 1. Klasifikacija hroničnih bubrežnih bolesti prema Nacionalnom vodiču dobre kliničke prakse (22)

Stadijum	Opis	JGF ($\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$)
I	Oštećenje bubrega sa normalnom ili povećanom JGF	≥ 90
II	Oštećenje bubrega sa blagim smanjenjem JGF	60-89
IIIa	Oštećenje bubrega sa umerenim smanjenjem JGF	45-59
IIIb		30-44
IV	Teško smanjenje JGF	15-29
V	Terminalna bubrežna bolest	≤ 15 (Dijaliza ili transplantacija bubrega)

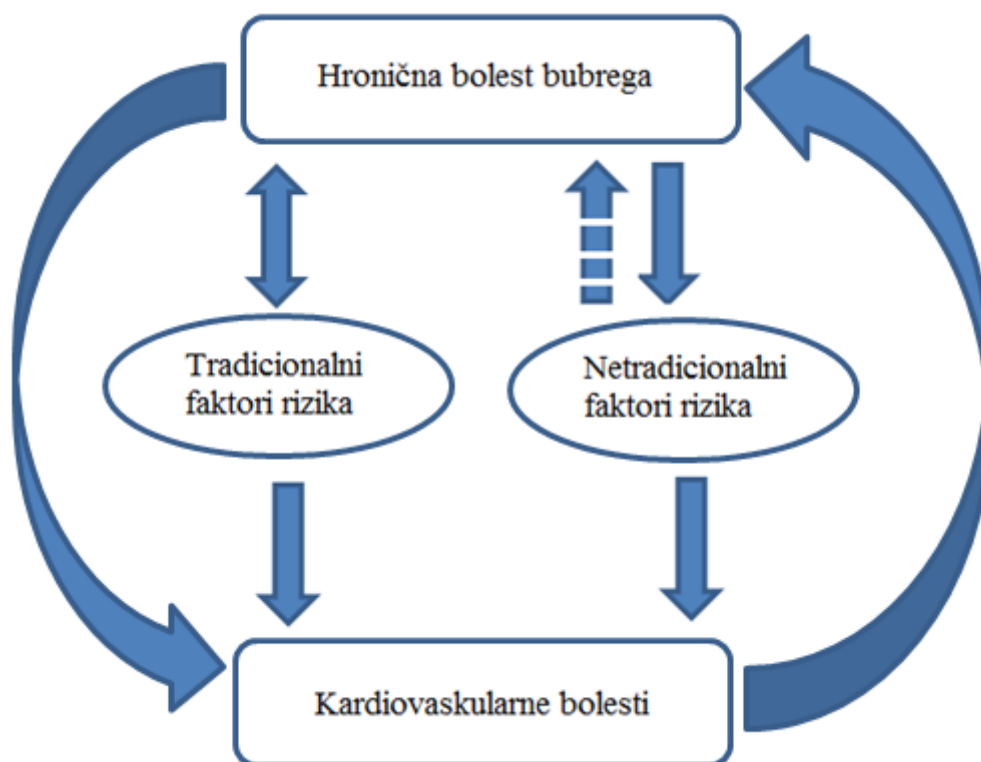
Rano otkrivanje bolesnika sa povećanim rizikom za razvoj HBB sprečava dalju progresiju bolesti i ujedno omogućava odlaganje kardiovaskularnih komplikacija koje predstavljaju glavni uzrok smrtnosti kod ovih bolesnika (24).

1.4. Kardiovaskularne bolesti kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega

Brojne epidemiološke studije su pokazale da kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa HBB (25, 26). Naime iako vremenom dolazi do postepene progresije bolesti bubrega i razvoja terminalne bubrežne bolesti, najveći broj obolelih umire od posledica kardiovaskularnih komplikacija, a tek nakon toga sledi smrtnost usled potpunog prestanka rada bubrega (26). Povećanje rizika od neželjenog kardiovaskularnog događaja je proporcionalno smanjenju funkcije bubrega (27). Tako je utvrđeno da bolesnici sa terminalnom bubrežnom bolešću koji su na dijalizi imaju 10-30 puta veći rizik u odnosu na zdrave ispitanike slične po godinama, polu i rasnoj pripadnosti (28). Studija Go i saradnika je pokazala da je rizik za kardiovaskularne događaje obrnuto proporcionalan jačini glomerularne filtracije, pri čemu su Manjunath i saradnici kvantifikovali taj odnos i utvrdili da se sa smanjenjem jačine glomerularne filtracije za 10 mL/min/1,73 m² rizik od neželjenog kardiovaskularnog događaja povećava za 5% (29,30). U prilog ovim istraživanjima govore rezultati iz više epidemioloških studija koji su pronašli da je rizika za KVB dva puta veći kod bolesnika koji se nalaze u trećem stadijumu HBB i tri puta veći kod bolesnika u četvrtom stadijumu HBB u odnosu na zdrave ispitanike sa očuvanom funkcijom bubrega (31). Stoga Američka nacionalna fondacija za bubreg i Američka asocijacija za srce (*American Heart Association, AHA*) svrstavaju HBB u grupu bolesti koje su ekvivalenti koronarnoj bolesti, naglašavajući visok rizik za razvoj kardiovaskularnih komplikacija, posebno u grupi bolesnika koji se nalaze na hroničnom programu lečenja hemodijalizom (32).

Povišena incidenca KVB kod bolesnika sa HBB, posebno kod bolesnika na hemodijalizi se samo delimično može objasniti prisustvom tradicionalnih faktora rizika (33). Složenost patofizioloških procesa koji se nalaze u osnovi HBB i koji dovode do razvoja KVB, ukazuju na međusobnu interakciju kako tradicionalnih, tako i netradicionalnih faktora rizika. Starost, hipertenzija, dijabetes, dislipidemija, pušenje i gojaznost predstavljaju tradicionalne faktore rizika koji su široko rasprostranjeni u opštoj populaciji, uključujući i bolesnike sa HBB. S druge strane netradicionalni faktori rizika koji se nazivaju i "uremija specifični" faktori su mnogo češće prisutni kod bolesnika sa HBB i terminalnom bubrežnom bolešću u odnosu na opštu populaciju. U ove faktore spadaju povišen oksidativni stres, inflamacija, hiperparatireoidizam, anemija, endotelna disfunkcija i metaboličke bolesti kostiju (33). Povezanost različitih tradicionalnih i netradicionalnih faktora rizika ostvaruje sinergistički efekat koji doprinosi ubrzanom razvoju ateroskleroze kod ovih bolesnika (33, 34).

Kompleksna interakcija između tradicionalnih i netradicionalnih faktora rizika je prikazana na slici 2.

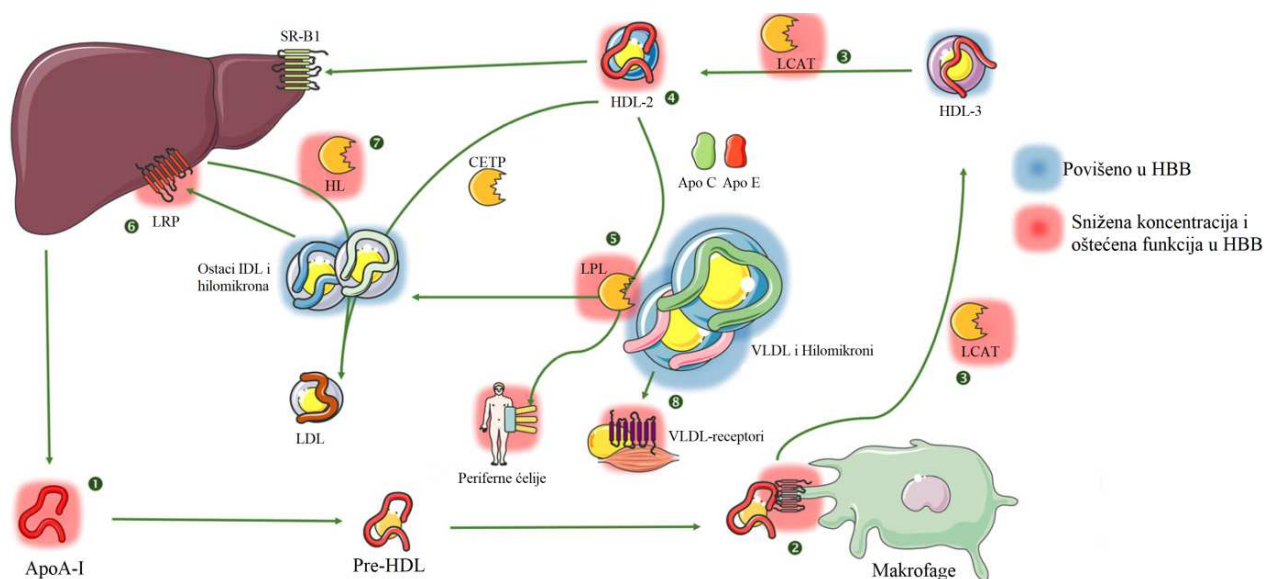


Slika 2. Tradicionalni i netradicionalni faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti i progresiju HBB

Poslednjih godina sve se više pažnje posvećuje vezi koja postoji između dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije kao bitnim faktorima rizika koji svojim efektima i međusobnom povezanošću ostvaruju uticaj na preostale faktore rizika, čime značajno doprinose progresiji HBB i razvoju kardiovaskularnih komplikacija kod ovih bolesnika (35). Rano otkrivanje ovih faktora rizika i kvantifikovanje veze koja postoji između njih, može pružiti doprinos u prevenciji KVB i uticati na dalji tok bolesti bubrega.

1.5. Dislipidemija u hroničnoj bolesti bubrega

Hronična bolest bubrega i terminalna bubrežna bolest se karakterišu kvantitativnim i kvalitativnim promenama lipoproteina koje dovode do pojave specifične dislipidemije kod ovih pacijenata (36). Abnormalnosti u metabolizmu lipoproteina kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega se javljaju se na nivou sinteze, oslobađanja, metabolizma i razgradnje lipida, lipoproteina i apolipoproteina (36). Ove promene se javljaju u ranoj fazi oštećenja funkcije bubrega i rezultiraju dislipidemijom koja predstavlja jedan od vodećih faktora rizika za razvoj ateroskleroze (37). Dislipidemija koja prati HBB karakteriše se povišenom koncentracijom triglicerida, sniženim vrednostima holesterola unutar lipoproteina velike gustine (HDL-h), dok su koncentracije ukupnog holesterola i holesterola unutar lipoproteina male gustine (LDL-h) u granicama optimalnih vrednosti (38). Sve promene na nivou sinteze, oslobađanja, metabolizma i razgradnje lipida kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega su prikazane na slici 3 (39).



Slika 3. Dislipidemija kod bolesnika sa HBB.

Preuzeto uz izmene na srpski jezik iz: Florens N, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage CO. Modified Lipids and Lipoproteins in Chronic Kidney Disease: A New Class of Uremic Toxins. *Toxins*. 2016; 8: 376. (39)

1.5.1. Promene na nivou VLDL čestica

Hipertrigliceridemija kao jedna od najčešćih karakteristika dislipidemije kod pacijenata sa HBB, počinje da se javlja u ranim fazama bolesti, a najviše vrednosti pokazuje kod pacijenata na dijalizi i u slučaju nefrotskog sindroma (40). Povećana koncentracija triglicerida se javlja kao posledica usporenog katabolizma ili pojačanog stvaranja lipoproteina veoma male gustine (VLDL) (41). Smanjena aktivnost lipoproteinske lipaze usled snižene ekspresija gena za lipoproteinsku lipazu (42) i prisustva inhibitora samog enzima (43), predstavljaju glavni razlog usporene razgradnje triglicerida kod ovih bolesnika. Usled insulinske rezistencije koja je prisutna kod ovih bolesnika i koja je udružena sa smanjenom JGF dolazi do razgradnje triglicerida u masnom tkivu, pojačanog oslobađanja masnih kiselina zbog čega izostaje inhibicioni efekat insulina na hormon-senzitivnu lipazu. Kao posledica ovog procesa, javlja se pojačana sinteza triglicerida iz masnih kiselina u jetri, što dovodi do stvaranja VLDL čestica (44). Kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom bolešću pored prisustva svih pomenutih mehanizama koji učestvuju u nastanku hipertrigliceridemije, značajnom povećanju nivoa triglicerida doprinosi i sam postupak dijalize. Primećeno je da upotreba različitih membrana za dijalizu i dijalizata može imati određen uticaj na lipidni profil ovih bolesnika (40). Tako ponovljena primena niskomolekularnog heparina kao antikoagulansa može dovesti do odvajanja lipoproteinske lipaze sa površine endotela, usled čega dolazi do gubitka aktivnosti enzima i samim tim se ograničava katabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima (45). Međutim, studije koje su testirale ulogu heparina u patogenezi dijalizom-indukovane dislipidemije pokazale su kontradiktorne rezultate (46). Oprečne rezultate su pokazale i studije koje su se bavile ispitivanjem uticaja dijaliznih membrana na nivo lipida u serumu bolesnika na hemodijalizi (46). Studija Wanner i saradnika je pokazala da primena polisulfona visokog fluksa ili triacetatne celulozne membrane dovodi do značajnog smanjenja koncentracije triglicerida u serumu (47). Međutim, druge studije nisu potvrdile ovaj rezultat (46,48), tako da uticaj dijalize još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

Iako su detaljno ispitani mehanizmi kojima dolazi do povećanja koncentracije triglicerida kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi, malo se zna o kvalitativnim promenama koje se dešavaju na nivou VLDL čestica. U uremijskim uslovima produženo prisustvo VLDL čestica u cirkulaciji, potencijalno može uticati da ove čestice bogate trigliceridima podležu oksidativnim modifikacijama, pri čemu i same mogu postati izvor slobodnih radikala. Studija koju su sproveli Liu i saradnici pronašla je znatno viši nivo parametara oksidativnog stresa na VLDL česticama kod osoba koje su imale povišenu

koncentraciju triglicerida u serumu (49). S druge strane, rezultati studije Saxena i saradnika su pokazali da postprandijalna hipertigliceridemija značajno povećava nivo oksidativnog stresa kod bolesnika sa dijabetesom u odnosu na zdrave ispitanike (50). Međutim, mali broj istraživanja se bavio ispitivanjem promena na nivou VLDL čestica kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega (51).

1.5.2. Promene na nivou LDL čestica

Pored hipertrigliceridemije, lipidni profil ovih bolesnika se karakteriše i optimalnim vrednostima ukupnog holesterola i LDL-h, što ujedno predstavlja i “bubrežni paradoks” imajući u vidu da se povećana incidenca kardiovaskularnih događaja povezuje sa povišenim vrednostima LDL-h (52) HBB u odsustvu teške proteinurije ne dovodi do značajnih promena u sintezi holesterola s obzirom na to da je genska ekspresija ključnog enzima u sintezi holesterola - hidrokso-3-metil glutaril-CoA reduktaze (HMG-CoA reduktaze) nepromenjena. Takođe kod ovih bolesnika nisu zabeležene promene u aktivnosti holesterol 7 α -hidroksilaze, enzima koji je odgovora za eliminaciju holesterola (53), kao ni promene u preuzimanju holesterola, s obzirom da nema poremećaja u sintezi LDL receptora (53).

Međutim, iako se koncentracija LDL-h nalazi u okviru preporučenih vrednosti, kvalitativna analiza pokazuje značajno veću zastupljenost malih gustih LDL čestica (*small dense LDL*-sdLDL) (40). Naime, u cirkulaciji je prisutno više diskretnih subfrakcija LDL čestica koje se međusobno razlikuju po veličini, gustini, hemijskom sastavu i metaboličkim osobinama. (54) Tako razlikujemo velike (LDL I), srednje (LDL II), male (LDL III) i vrlo male (LDL IV) subfrakcije, pri čemu se smatra da osobe koje imaju dominantno prisutne velike subfrakcije LDL, čiji je dijametar veći od 25 nm pripadaju LDL A fenotipu, dok osobe sa povećanom zastupljenošću malih LDL subfrakcije čiji je dijametar manji od 25,5 nm odgovaraju aterogenijem LDL B fenotipu (54). Karakteristično prisustvo sdLDL čestica je zabeleženo čak i u ranim stadijumima oštećenja funkcije bubrega, s tim da sa progresijom bolesti dolazi do znatnog povećanja zastupljenosti ovih čestica (55). Naime smatra se da hipertrigliceridemija prisutna kod bolesnika sa HBB, posebno kod bolesnika na dijalizi pogoduje razmeni triglicerida i estara holesterola između VLDL i LDL čestica pri čemu nastaju LDL čestice koje su bogate trigliceridima (56). Ova razmena se odvija pod dejstvom holesterol-estar transfernog proteina (CETP), čija je aktivnost povećana kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega (57). Dalja razgradnja LDL čestica bogatih trigliceridima se odvija pod uticajem hepatične lipaze, što postepeno dovodi do nastanka sdLDL čestica (56).

Eksperimentalna istraživanja su pokazala da se male, guste LDL čestice sporije uklanjaju iz cirkulacije, lakše prelaze u intimu krvnog suda i duže zadržavaju u subendotelnom prostoru, gde lakše podležu oksidativnim modifikacijama, a to su ujedno i glavni mehanizmi kojima se objašnjava njihov izrazito proaterogeni potencijal (58). Imajući u vidu da oksidovani LDL (oxLDL) igra bitnu ulogu u inicijaciji i progresiji aterosklerotskog procesa kako u opštoj populaciji tako i kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega, kvalitativna analiza LDL čestica pruža mogućnost adekvatne prevencije kardiovaskularnih bolesti (59). U uremijskim uslovima, pored oksidativnih modifikacija, LDL čestice podležu i glikaciji i karbamilaciji, što dodatno otežava preuzimanje ovih čestica od strane LDL receptora i njihov metabolizam (39,60).

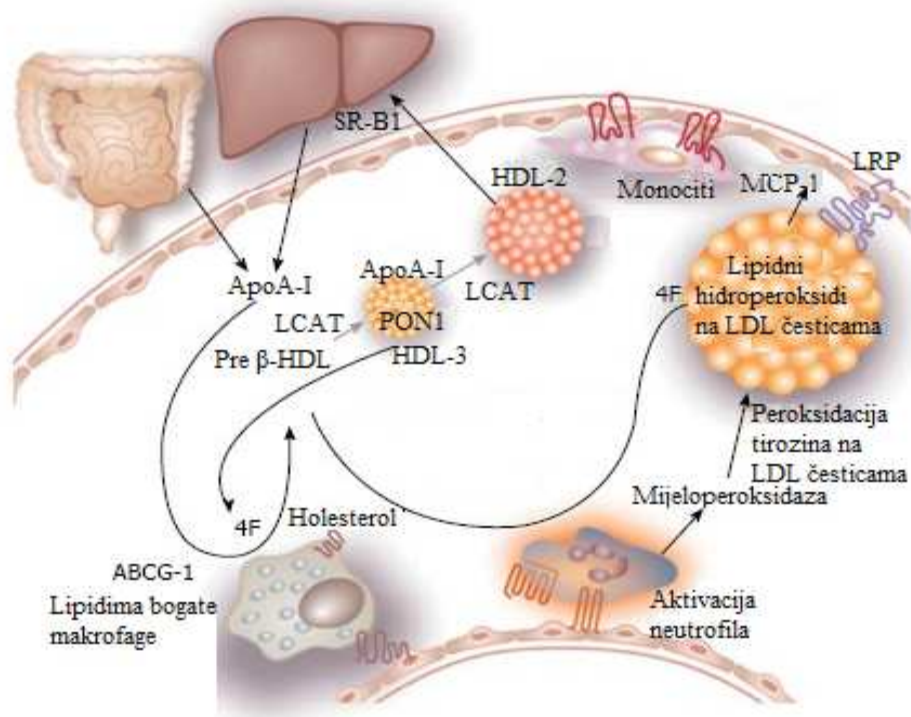
1.5.3. Promene na nivou HDL čestica

Snižena koncentracija HDL-h predstavlja jedan od osnovnih lipidnih poremećaja prisutnih kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega, a javlja se zbog neadekvatne sinteze, sazrevanje i katabolizma HDL čestica (61).

Osnovna uloga HDL-h jeste da učestvuje u reverznom transportu holesterola, međutim kod bolesnika sa HBB, ova funkcija je u velikoj meri ugrožena (61).

U fiziološkim uslovima, stvaranje HDL čestica započinje sintezom apolipoproteina A-I (apoA-I) u jetri i intestinumu, odakle se oslobađa u cirkulaciju. Međutim kod bolesnika sa HBB, prisustvo uremijskih toksina inhibira ekspresiju gena za apoA-I i utiče na stabilnost mRNA čime se u velikoj meri objašnjava snižena koncentracija apoA-I, a samim tim i HDL čestica kod ovih bolesnika (62). Nastale nascentne HDL čestice učestvuju u reverznom transportu holesterola tako što se preko apoA-I vezuju za ATP-vezujući transporter klase A1 (eng. *ATP-binding cassette transporter- ABCA1*) na makrofagama i preuzimaju holesterol. Međutim niska koncentracija apoA-I i oksidativnom modifikacijom promenjena struktura apoA-I i HDL čestica otežavaju vezivanje za ABCA1 receptore i u velikoj meri remete efluks holesterola kod ovih bolesnika (63). Pored toga, kod bolesnika sa HBB dolazi do povećane aktivnosti acetil-koenzim A acetiltransferaze (ACAT) koja pospešuje intracelularnu esterifikaciju holesterola i dodatno otežava efluks holesterola preko ABCA1 receptora (64). Kod zdravih osoba nakon preuzimanja slobodnog holesterola iz makrofaga, dolazi do esterifikacije pod dejstvom lecithin-holesterol aciltransferaze (LCAT) i do premeštanja estara holesterola u unutrašnjost HDL čestica. Na ovaj način se nascenti HDL transformišu u diskoidalne HDL 3, a potom u velike sferne HDL 2 čestice bogate holesterolom (65).

Međutim kod bolesnika sa HBB je primećena smanjena sinteza i aktivnost LCAT enzima, što rezultuje u neadekvatnom sazrevanju HDL čestica, smanjenju udela HDL 2 i posledičnom nagomilavanju HDL 3 čestica, posebno kod bolesnika na hemodijalizi (66). Kao što je ranije pomenuto kod ovih bolesnika zbog prisutne hipertrigliceridemije i povećane aktivnosti CETP enzima, dolazi do intenziviranja razmene triglicerida i estara holesterola između HDL i VLDL čestica pri čemu nastaju HDL čestice bogate trigliceridima (57,67). Ove čestice se dalje razlažu pod uticajem hepatične lipaze i tako nastaju male guste HDL 3 čestice, koje se preuzimaju procesom endocitoze i brzo razgrađuju (67). Promene u metabolizmu i funkcionalnosti HDL čestica su prikazane na slici 4 (68).



Slika 4. Promene u metabolizmu i funkcionalnosti HDL čestica kod bolesnika sa HBB.

Preuzeto uz izmene na srpski jezik iz: Kumar S, Bogle R, Banerjee D. Why do young people with chronic kidney disease die early? World Journal of Nephrology. 2014; 3: 143-155. (68)

Međutim iako je sam mehanizam nastanka HDL 2 i HDL 3 čestica gotovo u potpunosti razjašnjen, još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno koja od HDL čestica ima bolji antiaterogeni potencijal (69). Brojne studije su pokazale znatno nižu zastupljenost HDL 2 subfrakcija kod bolesnika sa kardiovaskularnim bolestima (70), dok s druge strane postoje brojni dokazi koji ukazuju da HDL 3 čestice pružaju bolju zaštitu od razvoja ateroskleroze (71). HDL čestice prisutne u cirkulaciji su široko heterogene u pogledu njihovih fizičko-hemijskih osobina, metabolizma i biološke aktivnosti. Korišćenjem gradijent-gel elektroforeze moguće je razdvojiti HDL čestice na velike HDL 2 (HDL 2b i HDL 2a) i male

HDL 3 (HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) subfrakcije koje se razlikuju ne samo u veličini, nego i u strukturi i funkciji koju obavljaju (72). U fiziološkim uslovima povećana zastupljenost HDL 3 subfrakcije, veći sadržaj proteina i centralna uloga u reverznom transportu holesterola, nameću zaključak da su ove čestice najvećim delom odgovorne za antiaterogeni potencijal HDL čestica (73). Međutim, u kompleksnim patološkim stanjima kao što su kardiovaskularne bolesti i ekvivalenti kardiovaskularnih bolesti može doći do ozbiljnih strukturnih i funkcionalnih promena koje čine da HDL 3 čestice gube svoja zaštitna svojstva (74).

Pored uloge u reverznom transportu holesterola, HDL čestice svoj anti-aterogeni potencijal ostvaruju tako što deluju antoksidativno, antiinflamatorno i sprečavaju agregaciju trombocita. Međutim kod bolesnika sa HBB dolazi do značajnog smanjenja i promene protektivnih aktivnosti HDL čestica (61, 75).

Antioksidativna uloga HDL čestica se zasniva na karakteristikama apoA-I kao i na prisustvu enzima kao što su paraoksonaza 1 (PON1), glutation- peroksidaza i acetil-hidrolaza faktora aktivacije trombocita (PAF-AH) (76). ApoA-I zahvaljujući ostacima metionina u svojoj strukturi konvertuje lipidne hidroperoksida do metionin-sulfoksida koji je značajno manje reaktivan. Funkcionalan HDL pored preuzimanja i neutralizacije lipidnih peroksida, stimuliše i njihovu eliminaciju putem jetre (76, 77). HDL svoju antioksidativnu ulogu, najvećim delom ostvaruje preko enzima PON1. Familija paraoksonaza se sastoji iz paraoksonaze 1, paraoksonaze 2 (PON2) i paraoksonaze 3 (PON3). PON1 se sintetise u jetri, a zatim dospeva u cirkulaciju gde se preko svog hidrofobnog N-terminalnog kraja vezuje za fosfolipide na HDL česticama (78). Između PON1 i HDL postoji uzajamna zavisnost jer HDL olakšava sekreciju PON1 i stvara hidrofobno okruženje koje je neophodno za aktivnost enzima, dok PON1 za uzvrat sprečava oksidaciju HDL čestica i olakšava preuzimanje holesterola iz makrofaga (78,79). ApoA-I nije neophodan za ostvarivanje veze između PON1 i HDL čestica, ali je neophodan za stabilnost i aktivnost enzima, kao i joni kalcijuma (80). U manjoj meri PON1 je prisutan na VLDL česticama i hilomikronima, dok se na LDL česticama ne nalazi (78). PON1 hidrolizuje različite supstrate zahvaljujući svojoj organofosfatnoj, arilesteraznoj, laktonaznoj i peroksidaznoj aktivnosti, međutim tačan fiziološki supstrat još uvek nije sa sigurnošću utvrđen (78). PON1 ima direktnu antioksidativnu i antiinflamatornu ulogu. Deluje tako što štiti LDL i HDL od oksidativnih modifikacija, jer razgrađuje oksidovane fosfolipide i estre holesterola, poput holesteril-linolat hidroperoksida i hidroperoksida linolenske kiseline (81). Pored toga hidolizuje lipidne peroksida unutar aterosklerotskih lezija (79). Sposobnost PON1 da direktno deaktivira oksidovane lipide se zasniva na prisustvu specifičnog cisteinskog ostatka na poziciji 284 (81). Oksidovani lipidi,

kao i njihovi proizvodi degradacije imaju proinflamatorna svojstva i deluju tako što aktiviraju endotelne ćelije da eksprimiraju različite adhezione molekule i hemokine, što predstavlja jedan od ranih znakova ateroskleroze (81). Razgradnjom oksidovanih lipida, PON1 ostvaruje svoj antiaterogeni potencijal, jer sprečava negativne efekte oksidativnog stresa i inflamacije (81). Korišćenjem gradijent gel elektroforeze i imunohemijskih tehnika, znatno veća aktivnost PON1 je pronađena na HDL 2 subfrakcijama (82), dok je s druge strane nakon ultracentrifugiranja PON1 aktivnost bila dominantno zastupljena u HDL 3 subfrakciji (83). Pretpostavlja se da PON1 prati normalan metabolički put sazrevanja HDL čestica i da nakon inicijalnog vezivanja za HDL 3, posle sazrevanja ovih čestica i transformacije u HDL 2 čestice i PON1 postaje sastavni deo HDL 2 čestica. Međutim, još uvek ne postoji jedinstven zaključak da li je PON1 dominantno lokalizovana na HDL 2 ili HDL 3 (78).

Pored PON1, i PON2 i PON3, takođe imaju antioksidativnu ulogu. PON2 deluje isključivo unutar ćelije, dok se PON3 enzim sintetiše u jetri i manjim delom u bubrezima, a zatim oslobađa u cirkulaciju gde se nalazi vezan za HDL čestice (84). PON3 ostvaruje pre svega laktonaznu aktivnost, dok za razliku od PON1 ima ograničenu arilesteraznu i paraoksonaznu aktivnost (85). PON3 ima antioksidativnu i antiinflamatornu ulogu, sprečava nagomilavanja lipidnih hidroperoksida i oksidovanih fosfolipida na LDL česticama i ujedno njihovom razgradnjom ograničava hemotaksu monocita. (86). Pored toga *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da PON3, zajedno sa PON2 štiti od infekcija izazvanih bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* tako što inaktivira N-acil-homoserin lakton koji je odgovoran za virulentnost (87).

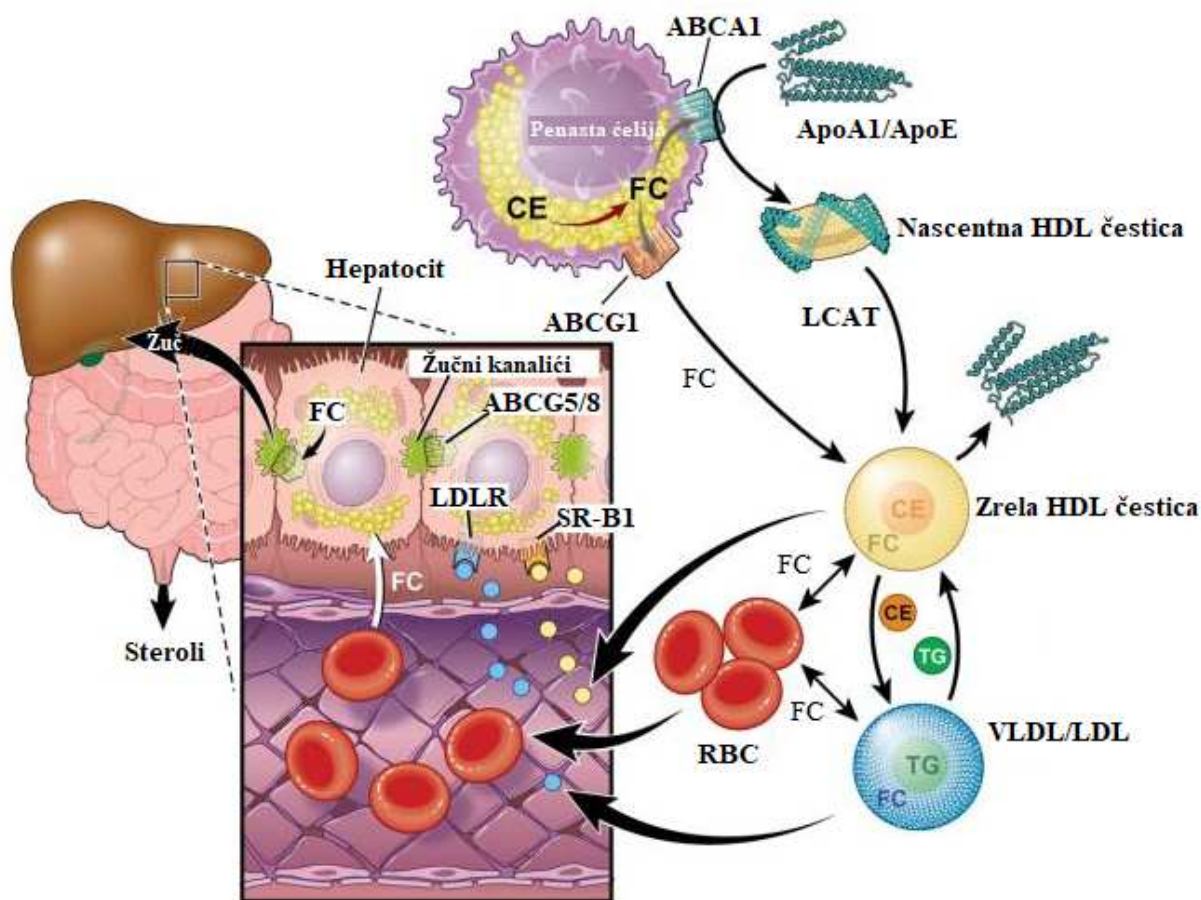
Kvantitativne i kvalitativne promene na HDL česticama, kao i prisustvo uremijskih toksina dovode do smanjene aktivnosti i koncentracije PON1 enzima kod bolesnika sa HBB, posebno kod bolesnika na hemodijalizi (88). S druge strane, aktivnost i koncentracija enzima PON3 nisu dovoljno ispitane kod ovih bolesnika. Glikacija, karbamilacija i oksidacija HDL čestica smanjuje aktivnost PON1, tako što remete vezivanje i stabilnost enzima (89). Kao posledica smanjene aktivnosti PON1, dolazi do pojačane oksidacije lipida i proteina unutar LDL i HDL čestica što se značajno odražava na njihov metabolizam i funkcionalnost. Oksidativnim modifikacijama apoA-I narušava se vezivanje za ABAC-1 receptore, što dovodi do otežanog reverznog transporta holesterola (89). Takođe aldehidi stvoreni tokom lipidne peroksidacije usled izostanka adekvatne antioksidativne zaštite menjaju strukturu HDL čestica i smanjuju aktivnost LCAT enzima što dovodi do poremećaja u maturaciji HDL čestica (89).

Dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija, dovode do strukturalnih promena što se odražava i na funkcionalnost HDL čestica, koje ne samo da gube svoju antiaterogena svojstva

nego postaju proaterogene i zajedno sa ostalim promenjenim lipidima učestvuju u razvoju i progresiji ateroskleroze kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega (90).

1.6. Reverzni transport holesterola posredovan eritrocitima

Kao što je objašnjeno, proces reverznog transporta holesterola odvija se posredstvom HDL čestica (91). Međutim, studije na životinjama su pokazale da jedan deo holesterola može biti transportovan u sklopu membrane eritrocita do ćelija jetre (92). Unutar membrane eritrocita se nalazi slobodni holesterol koji se može uzajamno razmenjivati sa holesterolom unutar lipoproteina plazme, pri čemu su *ex vivo* studije pokazale da se ravnoteža postiže za oko 6 sati (93). Uprkos značajnoj sposobnosti eritrocita da prenose holesterol, mali broj studija se bavio ispitivanjem reverznog transporta holesterola koji je posredovan eritrocitima. Istraživanje na životinjama je pokazalo da apoA-I deficijentni miševi veći deo holesterola transportuju upravo preko eritrocita (92). Hung i saradnici su predložili potencijalni mehanizam koji objašnjava kako eritociti učestvuju u reverznom transportu holesterola. Prema ovom modelu, kod apoA-I deficijentnih miševa, bitnu ulogu u reverznom transportu holesterola igra apoE, kao i drugi apolipoproteini koji se tokom rezervnog transporta holesterola razmenjuju između različitih lipoproteina (92). ApoE se vezuje za ABCA-1 receptore koji se nalaze na makrofagama, preuzima holesterol i formira nascentnu HDL česticu. Ovako formirana HDL čestica u cirkulaciji dolazi u kontakt sa eritrocitima pri čemu se slobodan holesterol prenosi na membranu eritrocita. Nakon toga, eritociti prolaze kroz kapilare jetre gde mogu predati slobodni holesterol direktno sinusoidnim endotelnim ćelijama, koje dalje predaju holesterol hepatocitima, pri čemu još uvek nije razjašnjeno da li se ovaj korak odvija sasvim pasivno ili uključuje i prisustvo određenih nosača. Alternativno, prenos holesterola iz eritrocita u hepatocite može ponovo biti posredovan slobodnom razmenom holesterola između eritrocita i lipoproteina (Slika 5) koji mogu migrirati u perisinusoidni prostor i isporučiti holesterol u hepatocite. U ovaj model nije uključen CETP, pošto kod miševa nije prisutan ovaj enzim, međutim smatra se da kod ljudi i ovaj enzim ima odgovarajuću ulogu u transportu holesterola koji je posredovan eritrocitima. Prikaz reverznog transporta holesterola posredovanog eritrocitima je ilustrovan na slici 5.



Slika 5. Reverzni transport holesterola posredovan eritrocitima

Preuzeto uz izmene na srpski jezik iz: Hung KT, Berisha SZ, Ritchey BM, Santore J, Smith JD. Red Blood Cells Play a Role in Reverse Cholesterol Transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32:1460-1465 (92).

Pored holesterola iz membrane eritrocita pronađen je i holesterol vezan za hemoglobin za koji se pretpostavlja da ima zaštitnu ulogu i da privremeno uklanja višak holesterola iz cirkulacije (94). Proces formiranja veze između hemoglobina i holesterola je relativno spor i odvija se u dve faze. U prvoj fazi dolazi do vezivanja holesterola iz cirkulacije za fosfolipide prisutne u membrani eritrocita, a u drugoj fazi holesterol se vezuje za hemoglobin i nastaje stabilan produkt (95). Prema rezultatima *in vitro* studije, pored holesterola iz membrane eritrocita i holesterol vezan za hemoglobin može da učestvuje u reverznom transportu, tako što dolazi do transfera holesterola nazad u membranu odakle interaguje sa HDL česticama iz cirkulacije (95, 96).

Kod bolesnika sa HBB, čak i u ranim stadijumima bolesti dolazi do značajnog smanjenja broja eritrocita, što se pogoršava sa progresijom bolesti (97). Anemija kod ovih bolesnika nastaje pre svega kao posledica neadekvatnog stvaranja eritropoetina u oštećenim

bubrežima. Pored toga sam proces dijalize, nedostatak gvožđa, vitamina B12 i folne kiseline, kao i skraćeni životni vek eritrocita i supresija eritropoeze uremijskim toksinima predstavljaju dodatne razloge značajnog smanjenja broja eritrocita kod ovih bolesnika (97). Anemija doprinosi i progresiji HBB, tako što smanjen broj eritrocita i niska koncentracija hemoglobina uzrokuju neadekvatnu isporuku kiseonika ćelijama bubrega usled čega se javlja bubrežna ishemija, zatim intersticijalne povrede i fibroza (98).

Methemoglobinemija kao stanje koje se karakteriše povećanom koncentracijom methemoglobina u kome je Fe^{3+} može izazvati akutno oštećenje bubrega kod ljudi (99). Morfološke karakteristike koje su zabeležene kod ovih bolesnika slične su onima u akutnom oštećenju bubrega izazvanom methemoglobinom u eksperimentalnim modelima (99,100). Brojne studije su pokazale da usled trovanja i posledičnog povećanja koncentracije methemoglobina, dolazi do akutnog oštećenja funkcije bubrega (101,102). Međutim, mali broj studija se bavio ispitivanjem methemoglobina kod bolesnika sa HBB (103).

1.7. Oksidativni stres kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega

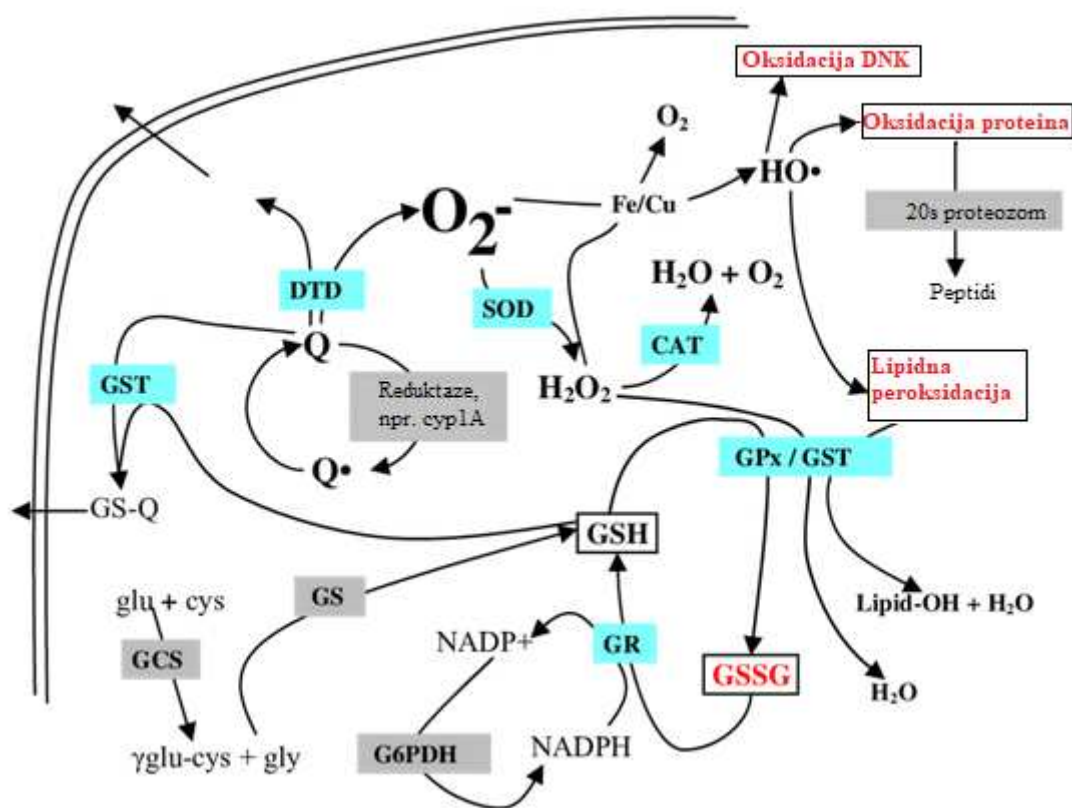
U fiziološkim uslovima mala količina slobodnih radikala nastaje u toku ćelijskog disanja kada dolazi do "curenja" superoksidnog anjona iz mitohondrija. Takođe pod uticajem egzogenih faktora sredine kao što su jonizujuće, UV zračenje, pušenje i u prisustvu teških metala može doći do stvaranja različitih slobodnih radikala (104). Za održavanje fizioloških funkcija organizma neophodan je nizak nivo slobodnih radikala koji učestvuju u procesima proliferacije, odbrane organizma od patogena, transdukcije signala i ekspresije gena (105). Velika reaktivnost ovih jedinjenja je zasnovana na prisustvu jednog ili više nesparenih elektrona na atomima, atomskim grupama ili molekulima. U cilju postizanja stabilnosti, slobodni radikali teže da predaju nespareni elektron na neki drugi molekul ili da preuzmu elektron sa drugog molekula, pri čemu na taj način nastaju novi slobodni radikali što dovodi do lančane reakcije i do oštećenja brojnih ćelijskih struktura (105). U zavisnosti od atoma gde se nalazi nespareni elektron, slobodni radikali se dele na reaktivna kiseonikova jedinjenja (eng. *Reactive oxygen species*- ROS), reaktivna azotova jedinjenja, reaktivna sumporna jedinjenja i reaktivna ugljenikova jedinjenja (106). Pored superoksidnog anjona (O_2^-), u reaktivna kiseonikova jedinjenja spadaju i vodenik peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal (HO^\cdot), hidroperoksil radikal (HOO^\cdot), hipohloritini anjon (OCl^-) i singlet kiseonik (106). Superoksidni anjon nastaje direktno delimičnom redukcijom kiseonika u mitohondrijama tokom ćelijskog disanja, gde se pod uticajem superoksid dismutaze prevodi u H_2O_2 . Ukoliko ne dođe do

uklanjanja H_2O_2 dejstvom katalaze, H_2O_2 lako prolazi kroz membrane i u reakciji koja je poznata kao „Fentonova reakcija“ sa atomima gvožđa i bakra daje jako reaktivna jedinjenja ($HO\cdot$, HO^-). Vodonik preoksid iako predstavlja molekul niske reaktivnosti, jer ne sadrži nesparene elektrone, zbog reakcije sa drugim jonima i metalima smatra se izvorom brojnih slobodnih radikala (107). Tako u reakciji sa hloridnim jonima u prisustvu mijelopreoksidaze dovodi do nastanka hipohlorne kiseline i jako reaktivnog OCl^- koji dalje dovodi do ozbiljnog oštećenja ćelije (107). Pored ROS i reaktivna azotova jedinjenja kao što su azotmonoksidni radikal ($NO\cdot$), azotdioksidni radikal ($NO_2\cdot$) i peroksinitritni anjon ($ONOO^-$) predstavljaju izuzetno jake slobodne radikale (108). U fiziološkim uslovima, azot-monoksid (NO) učestvuje u vazodilaciji, sprečava agregaciju trombocita, doprinosi nespecifičnoj odbrani organizma od patogena i predstavlja neurotransmiter u centralnom i perifernom nervnom sistemu (109). S druge strane, u patološkim uslovima, prekomerna proizvodnja i produženo delovanje NO mogu dovesti do oštećenja tkiva. U reakciji NO sa O_2^- nastaje peroksinitritni anjon koji dovodi do lipidne peroksidacije i do oštećenja proteinskih struktura (108,109).

U fiziološkim uslovima negativnom uticaju slobodnih radikala suprotstavljaju se brojni enzimski i neenzimski antioksidansi (110). U enzimске antioksidanse spadaju superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza koji deluju tako što prevode slobodne radikale u manje reaktivna jedinjenja (111). Neenzimski antioksidansi svoj pozitivan efekat ostvaruju tako što prihvataju slobodan elektron ili doniraju elektron reaktivnim jedinjenjima kiseonika, pri čemu i sami postaju slobodni radikali, ali znatno manje reaktivni od slobodnih radikala koje su neutralisali (110). Nakon toga na nenezimске antioksidanse koji su prihvatili slobodan elektron deluju odgovarajući enzimi ili drugi antioksidansi i na taj način se regenerišu (110). Takođe, neenzimski antioksidansi ostvaruju svoju ulogu tako što heliraju metalne jone koji učestvuju u Fentonovoj reakciji ili podstiču dejstvo enzima koji su odgovorni za neutralizaciju slobodnih radikala (110). U nenezimске antioksidanse spadaju tioli (glutation, N-acetilcistein), koenzim Q10, melatonin, mokraćna kiselina, bilirubin, proteini koji vezuju metalne jone (ceruloplazmin, transferin, albumin, feritin, mioglobin), vitamin C, vitamin E, polifenoli, flavonoidi, karotenoidi, selen, omega-3 i omega-6 masne kiseline (110,111).

Kada negativan uticaj slobodnih radikala nadvlada antioksidativne mehanizme zaštite nastaje oksidativni stres. Pooksidativno-antioksidativni disbalans koji se karakteriše nagomilavanjem ROS sa jedne strane i slabljenjem antioksidativne zaštite sa druge strane, vodi u jedan začarani krug gde oksidativni stres naknadno amplifikuje sintezu slobodnih

radikala (104). Mehanizam nastanka oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite je prikazan na slici 6.



Slika 6. Mehanizam nastanka oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (112)

Povišen nivo oksidativnog stresa dovodi do oštećenja strukture lipida, proteina i nukleinskih kiselina, čime se narušava integritet membrane, remeti se uloga ključnih enzima i dolazi do poremećaja na nivou ekspresije gena (113). Proces lipidne peroksidacije uključuje niz lančanih reakcija u kojima ROS napada polinezasićene masne kiseline što dovodi do stvaranja toksičnih aldehida i novih slobodnih radikala (114). Na ovaj način dolazi do ozbiljnog oštećenja koje se odražava na funkcionalnost ćelije, jer se narušava integritet, fluidnost i funkcija membrane (113,114). Nastali malondialdehid, akrolein, 4-hidroksi-2-nonenal i izoprostani se koriste za procenu lipidne peroksidacije (113). Tokom oksidacije proteina može doći do direktne veze slobodnih radikala sa aminokiselinama, do cepanja polipeptidne veze ili do nastanka derivata proteina koji su podložni degradaciji (115). Oksidativne modifikacije proteina mogu dovesti do gubitka enzimske aktivnosti, funkcionalnih promena, gubitka strukturnog integriteta i agregacije proteina (116). Svi aminokiselinski ostaci mogu biti meta slobodnih radikala, pri čemu su metionin i cistein posebno osetljivi i lako podležu oksidaciji čak i u uslovima blagog oksidativnog stresa.

Međutim zahvaljujući odgovarajućim reduktazama koje su prisutne u organizmu, i metionin i cistein se brzo regenerišu. Upravo iz ovih razloga, proteini koji imaju visok sadržaj metionina i cisteina imaju ujedno i veliki antioksidativni kapacitet (117). U cilju procene oksidativnih modifikacija proteina mogu se koristiti uznapredovali produkti oksidacije proteina (118). Oksidativna oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) mogu dovesti do prekida lanaca, baznih modifikacija i unakrsnih povezivanja (119). Ukoliko nakon oksidativnog oštećenja, ne dođe do pravilne i efikasne popravke DNK, može doći do mutacija, grešaka tokom replikacije, genomske nestabilnosti, pa i do smrti ćelije (119). Kao marker za procenu oksidativnog oštećenja DNK molekula može se koristiti 8 hidroksideoksi guanozin (113,119).

Visok nivo oksidativnog stresa prati proces normalnog starenja, ali se povezuje i sa brojnim akutnim i hroničnim patološkim stanjima uključujući i HBB (120). Ranija istraživanja su pokazala da se disbalans u oksidativno-stresnom statusu javlja u ranijim stadijumima bolesti, pri čemu se pogoršava sa progresijom bolesti. U razvoju oksidativnog stresa kod bolesnika sa HBB bitnu ulogu igraju uremijski toksini, ali značajno doprinose i dislipidemija, inflamacija i anemija (121). Kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom bolešću na dijalizi uklanjanje antioksidativnih jedinjenja tokom dijalize, bioinkompatibilnost sistema za dijalizu i prisustvo male količine endotoksina, predstavljaju potencijalne razloge zbog kojih kod ovih bolesnika dolazi do značajnog narušavanja oksidativno-stresnog balansa. Takođe kod bolesnika na dijalizi, pojačana aktivacija fagocita doprinosi dodatnoj produkciji ROS, što može dovesti do oštećenja leukocitne DNK (122). Pored svega navedenog, intravenska primena gvožđa, usled teške anemije može pokrenuti stvaranje slobodnih radikala preko Fentonove reakcije i dodatno ugroziti antioksidativni sistem (123).

1.8. Inflamacija kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega

Inflamacija se definiše kao složeni biološki odgovor tkiva na štetne stimulanse, kao što su različiti patogeni, oštećene ćelije ili toksične materije, zato inflamaciju treba posmatrati kao zaštitni mehanizam pomoću koga organizam pokušava da ukloni štetne agense i da pokrene proces zarastanja tkiva (124). Iako akutno oslobađanje proinflamatornih citokina poput interleukina-1(IL-1), interleukina-6 (IL-6) i faktora nekroze tumora α (TNF- α) ima povoljne efekte, hronično visoke vrednosti citokina dovode do oštećenja tkiva. Hronično nizak stepen inflamacije kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega karakteriše stalno prisutna stimulacija inflamatornog procesa što dovodi do progresije bolesti (124,125). Kod bolesnika sa HBB, posebno kod bolesnika na hemodijalizi, visok nivo proinflamatornih citokina nastaje kao posledica smanjenog bubrežnog klirensa i povećane produkcije citokina (125). Citokini međusobno interaguju na kompleksan način koji može biti aditivan, sinergistički ili antagonistički. U uremijskim uslovima kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi, sinergistička interakcija između citokina i posledično stalno prisutan nizak nivo inflamacije predstavljaju značajan faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod ovih bolesnika (124). Takođe, faktori koji se odnose na sam proces hemodijalize kao što je membranska bioinkompatibilnost i ostali faktori poput stalnih infekcija, komorbiditeta i genetski faktori mogu doprineti iniciranju i održavanju inflamacije kod ovih bolesnika (125). Povišen nivo oksidativnog stresa kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega takođe deluje proinflamatorno, pri čemu između inflamacije i oksidativnog stresa postoji uzajamna veza. Povišen nivo slobodnih radikala koji nastaje u uremijskim uslovima pokreće kaskadu intracelularnih signalnih puteva, zbog čega dolazi do pojačane ekspresije proinflamatornih gena. S druge strane aktivirani neutrofili oslobađaju veliku količinu slobodnih radikala što dovodi do povišenog oksidativnog stresa na mestu inflamacije (126). Dislipidemija prisutna kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega može biti još jedan od uzročnika povišene inflamacije. Holesterol, masne kiseline i modifikovani lipidi mogu direktno da aktiviraju inflamatorne puteve, s druge strane proinflamatorni citokini mogu da utiču na metabolizam lipida. Stvaranje penastih ćelija koje se nalaze u osnovi aterosklerotskog plaka, nastaje kao posledica preuzimanja oksidovanih LDL čestica od strane makrofaga, nakon čega dolazi do pokretanja inflamatornog odgovora i produkcije brojnih citokina, što dovodi do privlačenja ćelija imunskog sistema na mesto aterosklerotske lezije (127). Pored broja leukocita, za procenu nisko-stepene inflamacije kod bolesnika sa HBB mogu se koristiti i visoko osetljivi C-reaktivni protein (hsCRP), IL-6, fibrinogen i pentraksin-3 (124).

Pentraksini predstavljaju familiju proteina akutne faze koji se u zavisnosti od strukture i dužine molekula dele na kratke i duge pentraksine. U grupu kratkih pentraksina spadaju CRP i serumski amiloid A koji se proizvode u jetri kao odgovor na prisustvo interleukina-6. S druge strane pentraksin-3 koji pripada grupi dugih pentraksina stvara se lokalno na mestu inflamacije (128). Sintetisan molekul pentraksina-3 se skladišti u granulama neutrofila odakle se oslobađa nakon stimulacije citokinima ili bakterijskim endotoksinima i aktivira sistem komplementa. Povišen nivo pentraksina-3 je pronađen u aterosklerotskim lezijama, što ukazuje na značaj ovog proteina u kardiovasukarnim bolestima (129). Pored toga, povišena vrednost je pronađena u mnogim patološkim stanjima uključujući i HBB (130).

1.9. Remodelovanje ekstracelularnog matriksa kod bolesnika sa hroničnom bolešću bubrega

Ekstracelularni matriks (ECM) pored toga što učestvuje u održavanju integriteta i elastičnosti tkiva, predstavlja i dinamičnu strukturu koje je stalno podložna promenama kako bi se kontrolisala homeostaza tkiva. Prisutan je u svim tkivima i od suštinskog je značaja za normalno funkcionisanje organizma (131). Funkcionalni značaj ECM-a je ilustrovan kroz širok spektar različitih poremećaja tkiva koji se javljaju usled poremećaja na nivou ECM (132). U sastav ECM ulazi veliki broj proteina i glikozaminoglikana gde između ostalih spadaju i kolagen, proteoglikani i glikoproteini. Komponente ECM-a stalno su u kontaktu sa epitelnim ćelijama, čime regulišu adheziju, migraciju, proliferaciju, apoptozu, preživljavanje ili diferencijaciju ćelija (131). Remodelovanje ECM predstavlja proces koji se neprekidno dešava, jer ćelije konstantno obnavljaju i remodeluju ECM kroz sintezu, degradaciju, i hemijsku modifikaciju (133). Ovi procesi su složeni i moraju biti čvrsto regulisani kako bi se održala homeostaza tkiva, u suprotnom može doći do nastanka i progresije bolesti (131).

Matriks metaloproteinaze (MMP) su glavni enzimi uključeni u degradaciju ECM-a. U fiziološkim uslovima aktivnost MMP je niska, ali se povećava usled povreda kada dolazi do remodelovanja tkiva (134). Većina MMP se izlučuje u obliku zimogena, a zatim se aktivira proteolizom. Kako bi se izbeglo prekomerno razlaganje ECM i posledično oštećenje tkiva, tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMP) reverzibilno inaktiviraju MMP (134,135). Kod bolesnika sa HBB u uslovima povišenog oksidativnog stresa, dolazi do promene u ravnoteži MMP-TIMP, što može dovesti do progresije bolesti i do nastanka renalne fibroze (136,137). U ranim stadijumima bolesti, oštećenje tkiva i posledično remodelovanje ECM, dovodi do povećane aktivnosti MMP, koja ukoliko nije adekvatno kontrolisana može dovesti

do dodatnih oštećenja i progresije bolesti. S druge strane prekomerna inhibicija MMP može biti razlog renalne fibroze (136,137). Oksidativni stres povećava koncentraciju i aktivnost MMP, dok s druge strane MMP pospešuje inflamaciju tako što učestvuje u razgradnji ECM i olakšava hemotaksu inflamatornih ćelija (136,138). Na ovaj način nastaje začaran krug u kome dolazi do amplifikacije ovih procesa što dodatno doprinosi progresiji bolesti bubrega. Poslednjih godina sve veću pažnju privlače studije koje se bave ispitivanjem uticaja MMP na metabolizam lipida, jer je pokazano da degradacijom apoA-I, matriks metaloproteinaze otežavaju reverzni transport holesterola i sazrevanje HDL čestica (89).

Galektin-3 predstavlja multifunkcionalni lektin koji je odgovoran za mnoge fiziološke i patofiziološke procese u organizmu (139). Učestvuje u organogenezi, apoptozi, produkciji proinflamatornih citokina, indukuje stvaranje slobodnih radikala i tako pospešuje aktivaciju makrofaga (139). Iako njegova primarna uloga nije u regulaciji ekstracelularnog matriksa, prethodne studije su pokazale da i tu ima uticaja. U studiji sprovedenoj na životinjskim modelima, težina fibroze uretre je bila značajno povećana kod miševa koji su imali nedostatak gena za galektin-3 (140). Pored toga, intracelularni galektin-3 sprečava apoptozu, tako što u citoplazmi inhibira aktivaciju kaspaza. Na ovaj način galektin-3 poboljšava oporavak tubularnih ćelija, jer sa jedne strane ograničava apoptozu, a sa druge strane promoviše proliferaciju ćelija tokom hronične povrede bubrega (140). Galektin-3 predstavlja i receptor za uznapredovale proizvode glikacije-AGE (eng. *Advanced Glycation End-products*) (141), pri čemu za razliku od RAGE receptora (eng. *Receptor for Advanced Glycation End products*), koji promovišu oštećenje tkiva kroz indukciju oksidativnog stresa, galektin-3 uklanja AGE i sprečava povrede na nivou bubrega (142).

2. Ciljevi

Uzimajući u obzir povezanost dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije, kao i efekta koji ostvaruju na metabolizam lipoproteina i remodelovanje ekstracelularnog matriksa, ova studija je imala sledeće ciljeve:

1. Odrediti oksidativno-stresni status merenjem koncentracija parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega i zdravih ispitanika.
2. Ispitati da li postoji razlika u vrednostima parametara koji opisuju ulogu eritrocita u transportu i čuvanju holesterola (holesterol vezan za hemoglobin i holesterola iz membrane eritrocita) između bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega i zdravih ispitanika. Uporediti relativni udeo methemoglobina između bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega i zdravih ispitanika.
3. Utvrditi dijemetre i raspodele subfrakcija LDL i HDL čestica, i uporediti dobijene vrednosti između bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika.
4. Ispitati povezanost LDL fenotipa (LDL A i LDL B) sa biohemijskim parametrima, parametrima oksidativno-stresnog statusa i eritrocitnim parametrima kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega i kod zdravih ispitanika.
5. Odrediti status enzima paraoksonaze, merenjem arilesterazne i paraoksonazne aktivnosti enzima PON1 u serumu, kao i merenjem koncentracija PON1 i PON3 enzima kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega i kod zdravih ispitanika.
6. Utvrditi da li postoji razlika u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite unutar različitih lipoproteinskih frakcija (VLDL, LDL i HDL) izolovanih ultracentrifugiranjem kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika. Takođe ispitati da li postoji razlika u koncentraciji parametara oksidativno-stresnog statusa između VLDL, LDL i HDL lipoproteinske frakcije u svim ispitivanim grupama
7. Odrediti aktivnost PON1 na pojedinačnim HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama zimogram metodom kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i kod zdravih ispitanika.
8. Ispitati da li postoji razlika u stepenu inflamacije merenjem koncentracije pentraksina-3, između bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika.

9. Odrediti nivo parametara čija se aktivnost povezuje sa remodelovanjem ekstracelularnog matriksa (MMP9, TIMP1 i galektina-3) kod bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i kod zdravih ispitanika.
10. Utvrditi povezanost Framingamskog skora rizika (FRS) sa pentraksinom-3, galektinom-3, MMP9, TIMP1 i jačinom glomerularne filtracije kod bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja.
11. Na osnovu standardizovanih vrednosti parametara lipidnog statusa, oksidativno-stresnog statusa i inflamacije, izračunati odgovarajuće skorove dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije kako si se procenio sinergistički efekat ovih procesa kod bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

U istraživanju je učestvovalo 100 bolesnika sa različitim stadijumom hroničnog oštećenja bubrega, starosti od 57 ± 14 godina. Selekcija ispitanika je sprovedena prilikom redovne kontrole praćenja bolesti na odeljenju za nefrologiju u Kliničkom centru Srbije, u Beogradu, kao i u opštoj bolnici "Sveti Luka" u Smederevu. U toku preliminarnog ispitivanja, iz daljeg istraživanja su isključeni svi bolesnici koji su bolovali od kardiovaskularnih, bolesti jetre ili malignih bolesti, kao i bolesnici kod kojih su bili prisutni znaci akutne infekcije. S obzirom na to da su dalja ispitivanja podrazumevala detaljnu analizu lipidnog profila i određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa, iz studije su isključeni i bolesnici koji su koristili lekove sa antihiperlipidemijskim delovanjem ili neki vid antioksidativne suplementacije. Nakon ovakve selekcije u studiju je finalno uključeno 20 bolesnika sa HBB na konvencionalnoj terapiji lekovima (ACE inhibitori, blokatori receptora angiotenzina-2, hipoglikemici) i 57 bolesnika sa terminalnom bolešću bubrega koji su bili na hroničnom programu lečenja hemodijalizom. Primarne bolesti koje se nalaze u osnovi HBB uključivale su: hronični glomerulonefritis (29,8%), nefroangiosklerozu (12,9 %), dijabetična nefropatiju (22,3%), policističnu bolest bubrega (7,8%), nepoznate uzročnike bolesti (14,3%) i ostalo (12,9%). Dijagnoza bolesti je postavljena na osnovu kriterijuma Nacionale fondacije za bubreg (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) (15). Prema ovim preporukama, kao i prema preporukama koje daje „Nacionalni vodič za prevenciju, dijagnostifikovanje i lečenje hronične bolesti bubrega“, bolesnici na dijalzi su bili na hroničnom programu hemodijalize tri puta nedeljno (u trajanju 4-5 h), uz primenu poliamidnih i polisulfonskih membrana, niskog ili visokog fluksa. Kontrolnu grupu, sastavljenu od 40 zdravih ispitanika bez klinički evidentiranih oboljenja činili su najvećim delom zaposleni na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu kao i zdravi ispitanici koji su se dobrovoljno javili da učestvuju u studiji. Prilikom uzimanja biološkog materijala svi ispitanici su detaljno upoznati sa ciljevima i očekivanim ishodom studije. Nakon informisanja i potpisivanja pristanka za učestvovanje putem usmenog intervjua sa ispitanicima, prikupljeni su demografski podaci, podaci o životnim navikama: pušački status, fizička aktivnosti, konzumiranje alkohola, kao i podaci o terapiji i porodičnoj istoriji bolesti. Takođe tada je izmeren i krvni pritisak. Ispitanici su smatrani hipertenzivnim ukoliko su u više navrata imali vrednosti sistolnog krvnog pritiska ≥ 140 mm Hg i/ili dijastolnog pritiska ≥ 90 mm Hg ili su

već bili na nekom obliku antihipertenzivne terapije (143). Izmerena je i težina i visina svih ispitanika, nakon čega je izračunat indeks telesne mase (ITM) (težina (kg)/visina (m)²), a ispitanici su na osnovu izračunatih vrednosti ITM-a podeljeni u tri grupe: normalno uhranjene (20 kg/m²<ITM<25 kg/m²), predgojazne (25 kg/m²<ITM<30 kg/m²) i gojazne (ITM ≥30 kg/m²) (144).

Studija je planirana i sprovedena prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Uzorci krvi su dobijeni nakon dvanaestočasovnog noćnog gladovanja, venepunkcijom iz prednje kubitalne vene, pri čemu je kod bolesnika na hemodijalizi, krv vađena pre procesa hemodijalize. Za ispitivanje uticaja hemodijalize, krv je sakupljana naknadno, tako što je uzorkovanje izvršeno pre i posle tretmana hemodijalizom. Krv za izdvajanje plazme je prikupljena u epruvetama sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom (EDTA) i heparinom, dok su za izdvajanje seruma korišćene epruvete sa separator gelom. Nakon centrifugiranja (10 minuta na 1500 *x g*), plazma i serum su odvajani u alikvote i čuvani na -80°C do trenutka analiziranja.

3.2. Osnovne biohemijske analize

Koncentracije ukupnog holesterola (UH) i triglicerida su određene korišćenjem enzimskih metoda na automatskom analizatoru. HDL-h je izmeren metodom selektivne precipitacije, pomoću reagenasa koji prvo dovode do agregacije lipoproteina koji sadrže apoB-100, a zatim se korišćenjem kuplovanih enzimskih reakcija određuje koncentracija holesterola unutar HDL lipoproteina. Kod bolesnika kod kojih je koncentracija triglicerida bila manja od 4,2 mmol/L, koncentracija LDL-h izračunata je pomoću Friedewald-ove formule:

$$\text{LDL-h (mmol/L)} = \text{Ukupni holesterol (mmol/L)} - \text{HDL-h (mmol/L)} - \text{Trigliceridi (mmol/L)/2,22 (145)}$$

Ukoliko je koncentracija triglicerida bila veća od 4,52mmol/L, koncentracija LDL-h je određena direktnom homogenom metodom na automatskom analizatoru. Koncentracija apoA-I je izmerena imunoturbidimetrijskom metodom korišćenjem komercijalnih reagenasa.

Takođe, na automatskom analizatoru komercijalnim testovima izmerena je koncentracija glukoze (metoda sa glukoza-oksidadom), ukupnih proteina (biuretska metoda) i albumina (metoda sa bromkrezol-zelenim). Koncentracije ureje, kreatinina i mokraćne kiseline su određene standardnim laboratorijskim metodama na automatskom analizatoru, dok je koncentracija hemoglobina određena korišćenjem Drapkinogov reagensa na spektrofotometru UV-1800 UV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Za sva automatska merenja korišćen je analizator ILab 300⁺ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy) i reagensi proizvođača BioSystems (BioSystems S.A., Barcelona, Spain).

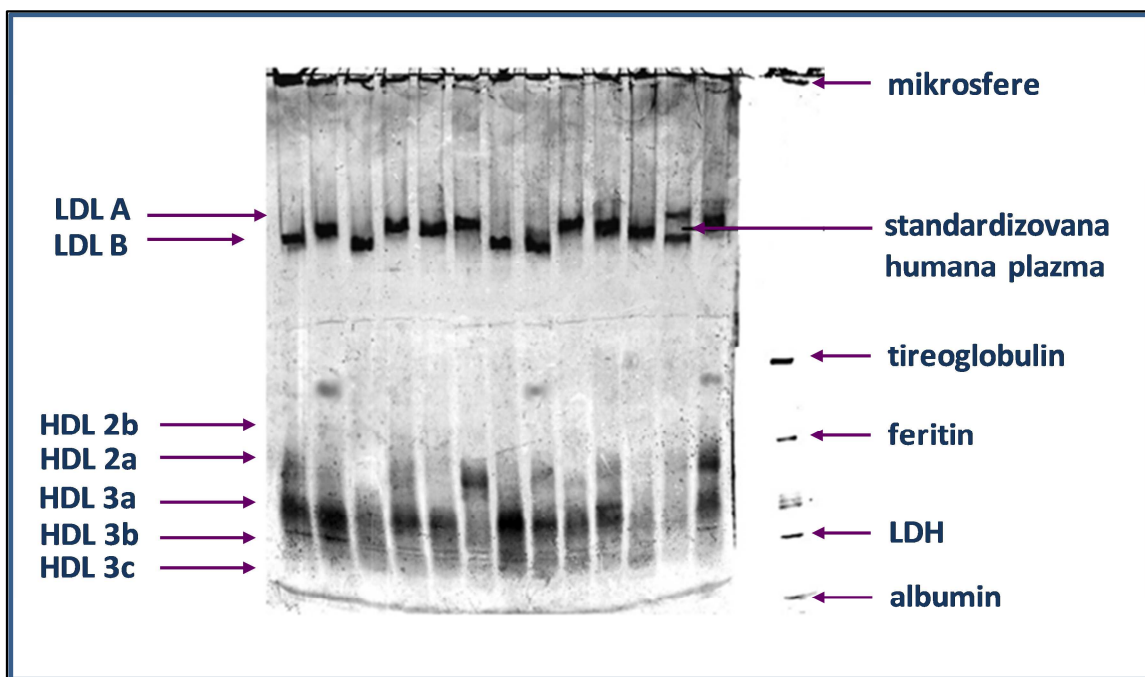
Jačina glomerularne filtracije je izračunata na osnovu koncentracije kreatinina, pola i starosti bolesnika korišćenjem MDRD (eng. *Modification of Diet in Renal Disease*) formule (146):

$$\text{JGF (mL/min/1,73m}^2\text{)} = 175 \times [\text{Koncentracija kreatinina u serumu (}\mu\text{mol/L)} \times 0,0113]^{-1,154} \times \text{Godine}^{-0,203} (\times 0,742 \text{ za žene)}$$

3.3. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija korišćenjem gradijent gel elektroforeze

Razdvajanje HDL i LDL lipoproteina izvršeno je korišćenjem vertikalne gradijent gel elektroforeze na nedенaturišućem poliakrilamidnom gradijent gelu (3-31%). Princip razdvajanja lipoproteina zasniva se na različitoj veličini HDL i LDL lipoproteinskih frakcija, s obzirom da se veličina pora gela smanjuje sa povećanjem koncentracije poliakrilamida. Primena jednosmerne struje i konstatnog napona, omogućava kretanje lipoproteinskih čestica kroz gel, a potporni medijum sastavljen od poliakrilamida različite koncentracije omogućava efekat „molekularnog prosejavanja“ i razdvajanje lipoproteinskih čestica na osnovu razlike u veličini. Elektroforetsko razdvajanje i analiza lipoproteinskih subfrakcija vršena je po originalnoj metodi koju su predložili Rainwater i saradnici (147), a koja je modifikovana i prilagođena našim laboratorijskim uslovima (148). Razdvajanju lipoproteina prethodilo je izlivanje gelova pomoću sistema Hoefer SE 675 (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria), dok je formiranje odgovarajućeg gradijent (3-31%) gela, postignuto kontrolisanim mešanjem monomera poliakrilamida korišćenjem peristaltičkih pumpi *Masterflex L/S* (Cole Parmer Instrumental Company, Vernon Hills, IL, SAD) i softvera *Masterflex Linkable Instrument Control Software (WinLIN)* istog proizvođača. Nakon izlivanja i polimerizacije gelova, za elektroforetsko razdvajanje HDL i LDL lipoproteinskih subfrakcija korišćena je vertikalna kada (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Gelovi su kalibrisani pomoću smeše proteina velike molekulske mase koji sadrže proteine poznatog dijametra: tireoglobulin (17,0 nm), feritin (12,2 nm), laktat-dehidrogenazu (8,4 nm) i albumin (7,1 nm) (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Takođe za kalibraciju su korišćene karboksilovane polistirenske čestice (mikrosfere) dijametra 40 nm (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, SAD) i standardizovana humana plazma. Nakon elektroforeze gelovi su isprani u etanolnom rastvoru, fiksirani, a zatim bojeni odgovajućom bojom: deo gela gde se nalaze lipoproteinske česti je preko noći stajao u etanolnom rastvoru boje Sudan black B, dok je deo sa proteinskim standardima bojen rastvorom Coomassie brilliant blue G-250. Nakon toga, višak boje je uklonjen pomoću smeše za odbojavanje, a zatim su gelovi ostavljeni preko noći u rastvoru Tris pufera pH=8,35 kako bi postigli prvobitan oblik i veličinu. Densitometrijsko skeniranje razdvojenih subfrakcija, vršeno je na skeneru Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) uz korišćenje programa Magic Scan software (version 4.6;1999; UMAX Data Systems, Inc), dok je za analizu dobijenih rezultata korišćen program Image Quant software (version 5.2;1999; Molecular Dynamics).

Za definisanje LDL i HDL subfrakcija, korišćene su kalibracione krive na osnovu kojih je bilo moguće odrediti regione koji odgovaraju svakoj LDL i HDL subfrakciji pojedinačno. Korišćenje gradijent gel elektroforeze omogućilo je razdvajanje LDL-h na sledeće subfrakcije: LDL I (27,2-28,5 nm), LDL II (25,5-27,2 nm), LDL III (24,2-25,5 nm), LDL IV (22,0-24,2 nm), dok je HDL-h razdvojen na: HDL 2b (9,7-12,0 nm), HDL 2a (8,8-9,7 nm), HDL 3a (8,2-8,8 nm), HDL 3b (7,8-8,2 nm) i HDL 3c (7,2-7,8 nm) subfrakcije. Osobe kod kojih su dominantno bile prisutne LDL subfrakcije čiji je dijametar veći od 25,5 nm (zbir LDL I i LDL II) označene su fenotipom A, dok su osobe kod kojih su dominantno bile prisutne LDL subfrakcije čiji je dijametar manji od 25,5 nm (zbir LDL III i LDL IV) označene fenotipom B. Na slici 7 je prikaz izgleda gela nakon elektroforetskog razdvajanja.



Slika 7. Izgled gela sa razdvojenim LDL i HDL subfrakcijama (148)

3.4. Određivanje eritrocitnih parametara

3.4.1. Priprema uzorka hemolizata

U cilju određivanja methemoglobina (metHb), holesterola vezanog za hemoglobin i holesterola iz membrane eritrocita bilo je neophodno napraviti odgovarajuće hemolizate. Nakon izdvajanja plazme, eritrociti su isprani 3 puta hladnim fiziološkim rastvorom i svaki put centrifugirani (Eppendorf Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany) 5 minuta na $3000 \times g$. Za izdvajanje hemolizata sa membranama, u jednu zapreminu ispranih eritrocita (oko $120 \mu\text{l}$) dodato je 14 zapremina ledeno-hladne destilovane vode (oko $1,7 \text{ mL}$) koja je imala za cilj da pospeši razaranje membrane eritrocita. Uzorak je zatim dobro izmešan i ostavljen da stoji 30 minuta u frižideru na 4°C , a nakon toga uzorak je čuvan na -20°C . Za izdvajanje membrana eritrocita i hemolizata bez membrana eritrocita, uzima se novi alikvot ispranih eritrocita (oko $120 \mu\text{l}$) dodaje se 14 zapremina ledeno-hladne destilovane vode (oko $1,7 \text{ mL}$) i nakon mešanja, uzorak se centrifugira 30 minuta na $15\,000 \times g$. Nakon centrifugiranja, bilo je potrebno izdvojiti supernatant u kome se nalazi hemoglobin bez membrane eritrocita. I ovaj uzorak je čuvan na -20°C . Na dnu mikrocentrifuske epruvete, nakon centrifugiranja ostaju membrane eritrocita koje je bilo potrebno isprati bar tri puta sa po 14 zapremina hladnog (4°C) 10 mM Tris-HCl pufera pH 7,4, a zatim suspendovati u maloj zapremini (oko $150 \mu\text{l}$) TRIS-HCl pufera. Uzorak membrane eritrocita je čuvan na -20°C (149).

3.4.2. Određivanje ukupnog hemoglobina

Koncentracija ukupnog hemoglobina (Hb) u uzorcima hemolizata (sa i bez membrane) određena je primenom cijano-methemoglobinske metode uz korišćenje Drabkinovog reagensa (150). Princip metode se zasniva najpre na oksidaciji hemoglobina do methemoglobina u prisustvu $K_3[Fe(CN)_6]$, a zatim methemoglobina u reakciji sa KCN daje stabilan cijano-methemoglobin čiju apsorbanciju merimo na 540 nm. Za izračunavanje koncentracije ukupnog hemoglobina korišćena je sledeća formula:

$$Hb = \frac{16114 \times A_{540} \times R}{11000}$$

U datoj jednačini vrednost od 16114 predstavlja molekulsku masu hemoglobina u odnosu na gvožđe, R faktor razblaženja, dok 11000 odgovara milimolarnom ekstinkcionom koeficijentu za hemoglobin. Koncentracija ukupnog hemoglobina je izražena u g/L.

Koncentracija hemoglobina u membranama eritrocita određena je istom metodom uz dodatak natrijum-dodecil sulfata.

3.4.3. Određivanje koncentracije methemoglobina

Koncentracija methemoglobina je izračunata korišćenjem metode koju su predložili Szebeni i saradnici (151). Prema ovoj metodi, sadržaj methemoglobina u svežim hemolizatima se računa na osnovu vidljivog spektra uzorka u opsegu 500–700 nm. Relativna zastupljenost methemoglobina određuje se na osnovu jednačine u koju ulaze ekstinkcioni koeficijenti oksidovanog i hemihromnog hemoglobina i apsorbancija izmerena na talasnim dužinama: 577, 630 i 560 nm. Nakon merenja, neophodno je vrednosti umanjiti za apsorbanciju na 700 nm (151).

$$[\text{metHb}] = 7,0 \times A_{577} + 76,8 \times A_{630} - 13,8 \times A_{560}$$

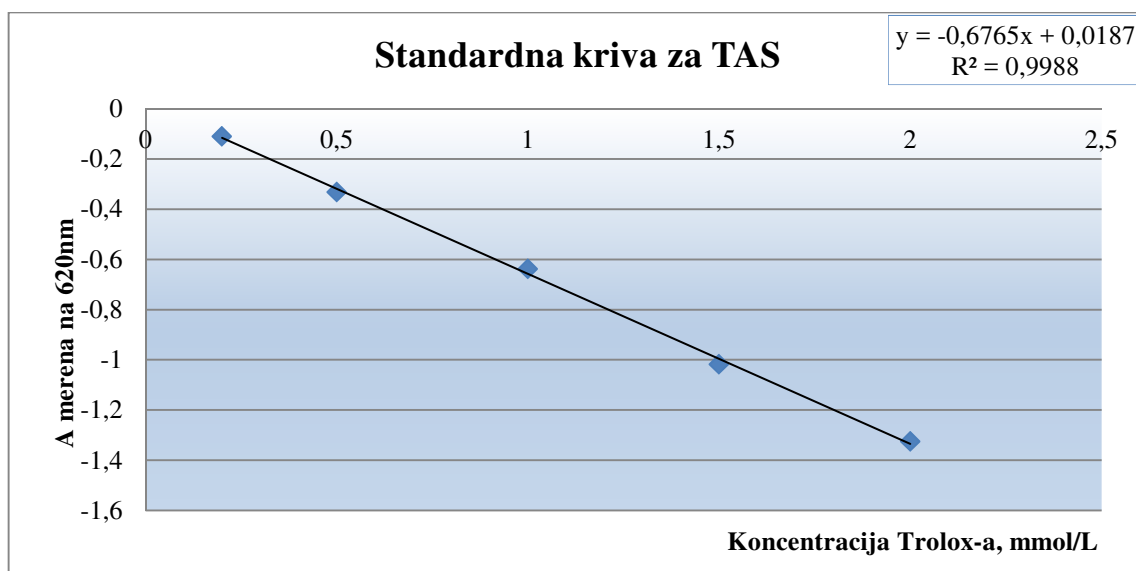
3.4.4. Određivanje koncentracije holesterola u eritrocitima

Reakciji za određivanje holesterola, prethodi ekstrakcija lipida primenom metanola i hloroforma. U dobijene hemolizate (250 μ L ukupnog hemolizata sa membranama eritrocita i 250 μ L hemolizata bez membrana eritrocita) i u 150 μ L suspenzije membrana eritrocita, najpre dodati 5 zapremina metanola, a zatim još 5 zapremina hloroforma. Dobijenu suspenziju inkubirati na 37°C u vodenom kupatilu 5 minuta, a zatim centrifugirati 10 minuta na 3000 \times g. Nakon toga je bilo potrebno ukloniti supernatant, a metanolno-hloroformski ostatak upariti do suva u struji argona. Kompletanu ekstrakciju ponoviti još dva puta, a dobijeni suvi ostatak potom ekstrahovati još tri puta sa 1,25 mL hloroforma. Na kraju dobijeni hloroformski ekstrakt podeliti na dva jednaka dela i upariti do suva (152). Ovako dobijeni suvi ekstrakt je korišćen za određivanje koncentracije holesterola enzimskom metodom. Dobijene vrednosti za sadržaj holesterola u ukupnom hemolizatu (sa i bez membrana eritrocita) izražavane su kao milimol holesterola na L spakovanih eritrocita (mmol holesterola/ L RBC). U preparatima membrana dobijene vrednosti holesterola se izražavaju na mg membranskih proteina (μ mol holesterola/ mg membranskih proteina) i dobijena vrednost predstavlja relativni udeo holesterola u membrane eritrocita (RBC-Mh). U hemolizatima bez membrana izmerena koncentracija holesterola se izražava na mol hemoglobina (mol holesterola/ mol Hb) nakon čega se dobijena vrednost predstavlja kao relativni udeo holesterola vezanog za hemoglobin (Hb-h). Koncentracija proteina u membrani eritrocita je određena primenom modifikovane Lowry-jeve metode (153).

3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

3.5.1. Totalni antioksidativni status

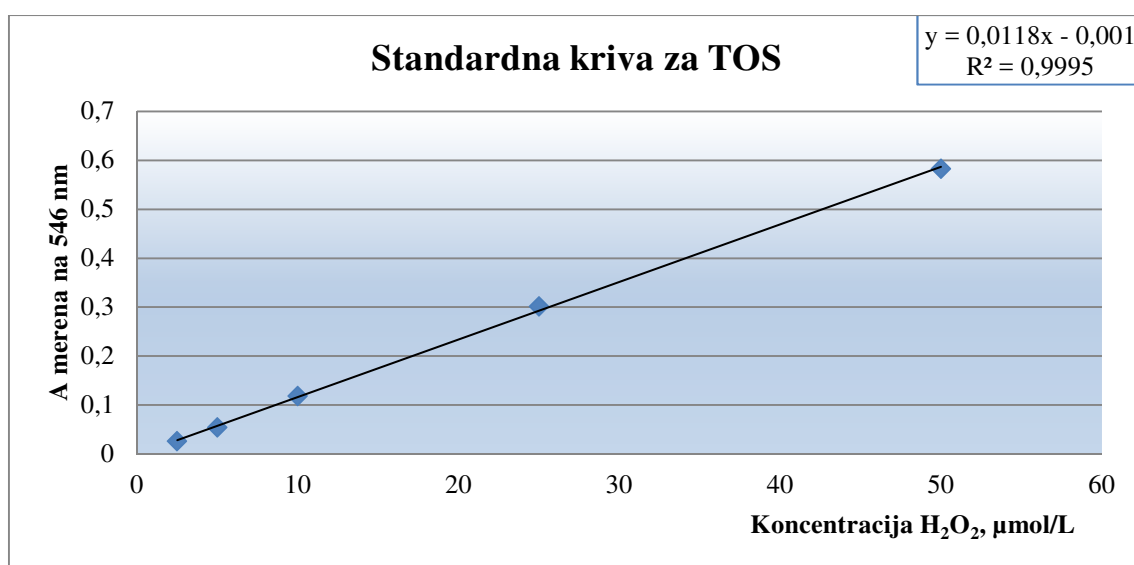
Erel i saradnici su 2004. godine (154) opisali metodu za merenje totalnog antioksidativnog statusa, koja se zasniva na obezbojavanju (redukciji) katjona 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), koji se koristi kao hromogen. Intenzitet obezbojavanja smaragdno zelenog hromogena, odnosno smanjenje apsorbancije srazmerno je koncentraciji ukupnih antioksidanasa prisutnih u serumu. Za preračunavanje koncentracije totalnog antioksidativnog statusa (TAS) konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,2-2mmol/L), pri čemu je kao standard korišćen hidrosolubilni ekvivalent vitamina E- *Trolox* (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) 2mmol/L rastvoren u fosfatnom puferu (30 mmol/L) pH=7,4. Dobijeni rezultati su izraženi u mmol/L *Trolox* ekvivalenta.



Slika 8. Standardna kriva za TAS

3.5.2. Totalni oksidativni status

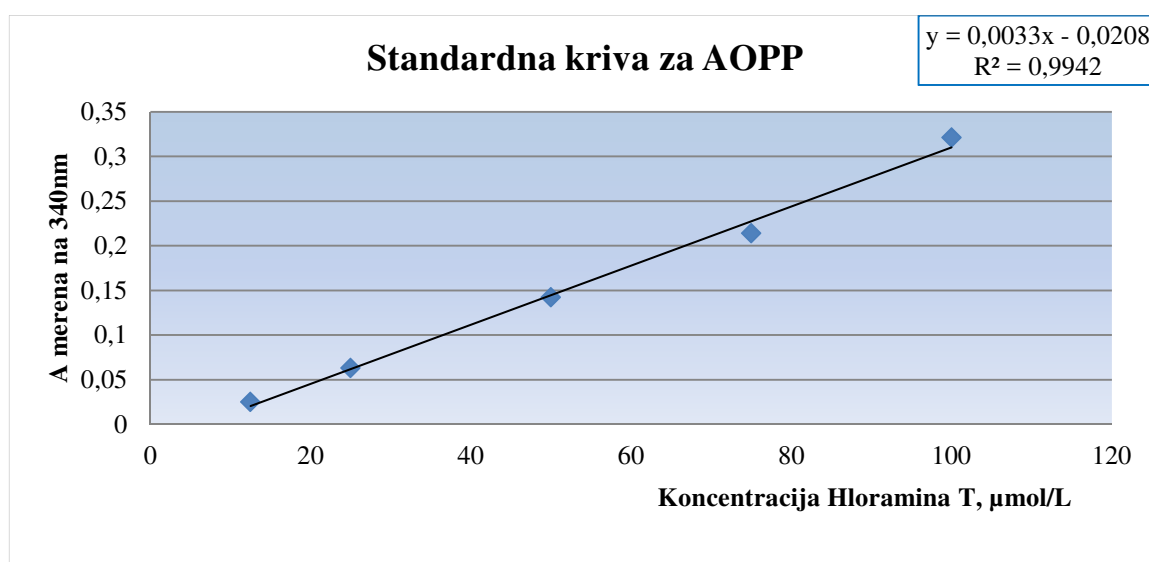
Metoda za određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS) (155) se zasniva na oksidaciji ferio jona iz kompleksa sa o-dianizidinom do ferio jona pod uticajem oksidanasa prisutnih u serumu. Nastali ferio jon zatim formira obojeni kompleks sa ksilenol oranžom u kiseljoj sredini, a povećanje apsorbancije izmereno na 546 nm je proporcionalno koncentraciji ukupnih oksidanasa prisutnih u uzorku. Za preračunavanje koncentracije totalnog oksidativnog statusa konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 2,5-50 $\mu\text{mol/L}$), pri čemu je kao standard korišćen vodeni rastvor vodonik-peroksida. Dobijeni rezultati su izraženi u $\mu\text{mol/L}$ vodonik peroksid ekvivalenata ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L).



Slika 9. Standardna kriva za TOS

3.5.3. Uznappedovali produkti oksidacije proteina

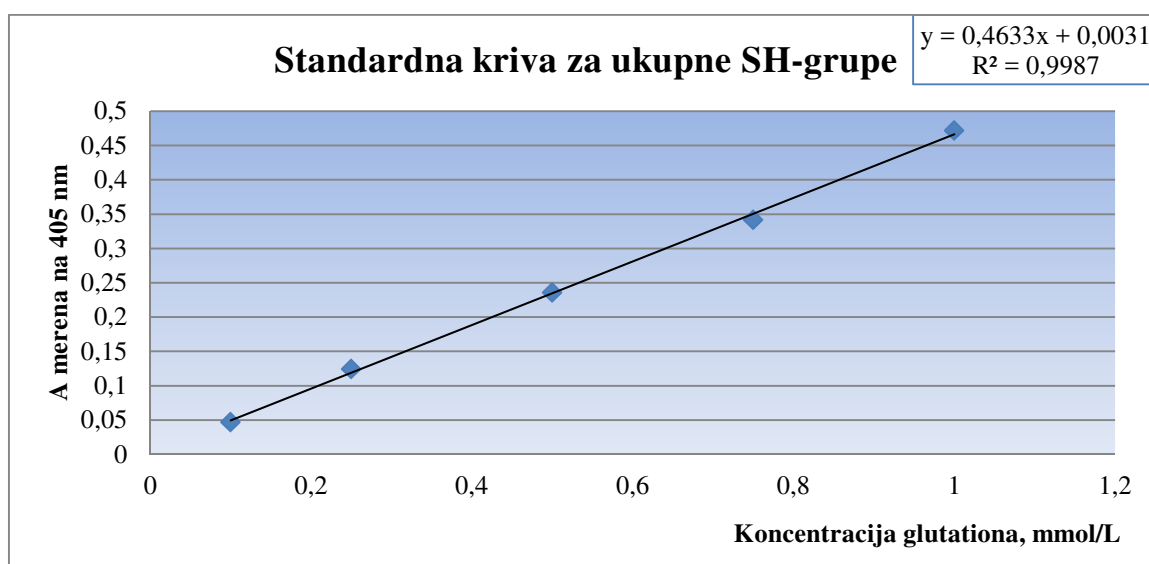
Uznappedovali produkti oksidacije proteina (AOPP) su određeni spektrofotometrijskom metodom koju su postavili Witko-Sarsat i saradnici (156). Princip metode se zasniva merenju apsorbancije razblaženog uzorka (uzorak se razblažuje sa fosfatni pufer, pH 7,4 u odnosu 1:5) na 340nm nakon dodatka sirćetne kiseline i rastvora KJ. S obzirom na to da povišena koncentracija triglicerida može da predstavlja potencijalnu interferenciju u metodi za određivanje AOPP, uzorci su razblaženi i korišćena je slepa prova uzorka kako bi se sprečile potencijalne interferencije. Za izradu standardne krive (opseg koncentracije 10-100 $\mu\text{mol/L}$) koristi se rastvor hloramina T u fosfatnom puferu pH 7,4. Koncentracija AOPP se izražava preko $\mu\text{mol/L}$ hloramina T ekvivalenta (μmol hloramina T Equiv./L).



Slika 10. Standardna kriva za AOPP

3.5.4. Ukupne sulfhidrilne grupe

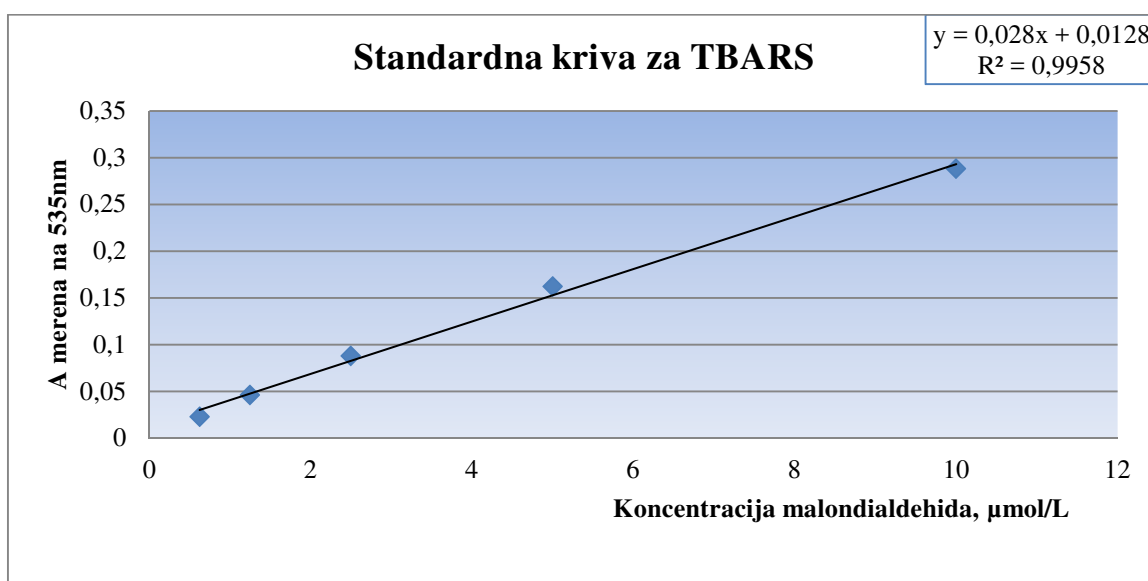
Metoda za određivanje ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH grupe) po Ellman-u (157) zasniva se na reakciji alifatičnih tiolnih jedinjenja prisutnih u uzorku sa 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojevom kiselinom (DTNB) u baznoj sredini (fosfatni pufer (0,2 mol/L K_2HPO_4 - EDTA) pH 9,0). Kao proizvod ove reakcije nastaje p-nitrofenoksidni anjon, čiju apsorbanciju merimo na 412 nm. Za preračunavanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,1 mmol/L -1 mmol/L) pri čemu je kao standard korišćen vodeni rastvora redukovanog glutaciona.



Slika 11. Standardna kriva za ukupne SH-grupe

3.5.5. Tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance

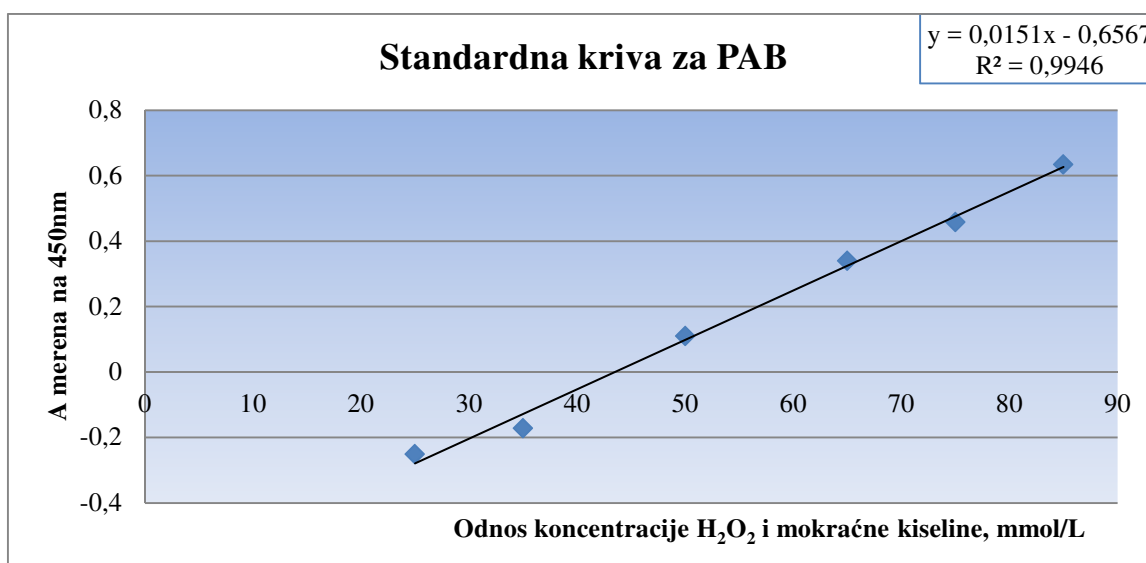
Metoda za određivanje tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci (TBARS) (158) zasniva se na reakciji TBARS, uključujući i malondialdehid sa tiobarbiturnom kiselinom, pri čemu nastaje kompleks čiju apsorbanciju merimo na 535 nm. Za preračunavanje koncentracije tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,1 mmol/L -1 mmol/L) pri čemu je kao standard korišćen vodeni rastvora malondialdehid bis(dietil-acetal), 97%.



Slika 12. Standardna kriva za tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance

3.5.6. Prooksidativno-antioksidativni balans

Merenje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) omogućava istovremeno određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a samim time i merenje postojeće ravnoteže između njih. Princip metode za određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa se zasniva na reakciji hromogena 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) sa H_2O_2 u prisustvu enzima peroksidaze, ali i na istovremenoj reakciji TMB hromogena sa mokraćnom kiselinom kao antioksidantom, pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta boje hromogena. Intenzitet boje proporcionalan je količini prisutnih prooksidanasa, dok smanjenje intenziteta boje ukazuje na dominantno prisustvo antioksidanasa u uzorku (159). Za preračunavanje prooksidativno-antioksidativnog balansa konstruisana je standardna kriva sastavljena od rastvora 1mmol/L H_2O_2 i 3mmol/L mokraćne kiseline u različitim odnosima. Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorim.



Slika 13. Standardna kriva za prooksidativno-antioksidativni balans

3.6. Određivanje statusa enzima paraoksonaze-1

3.6.1. Određivanje paraoksonazne aktivnosti enzima paraoksonaze-1 (PON1) u serumu

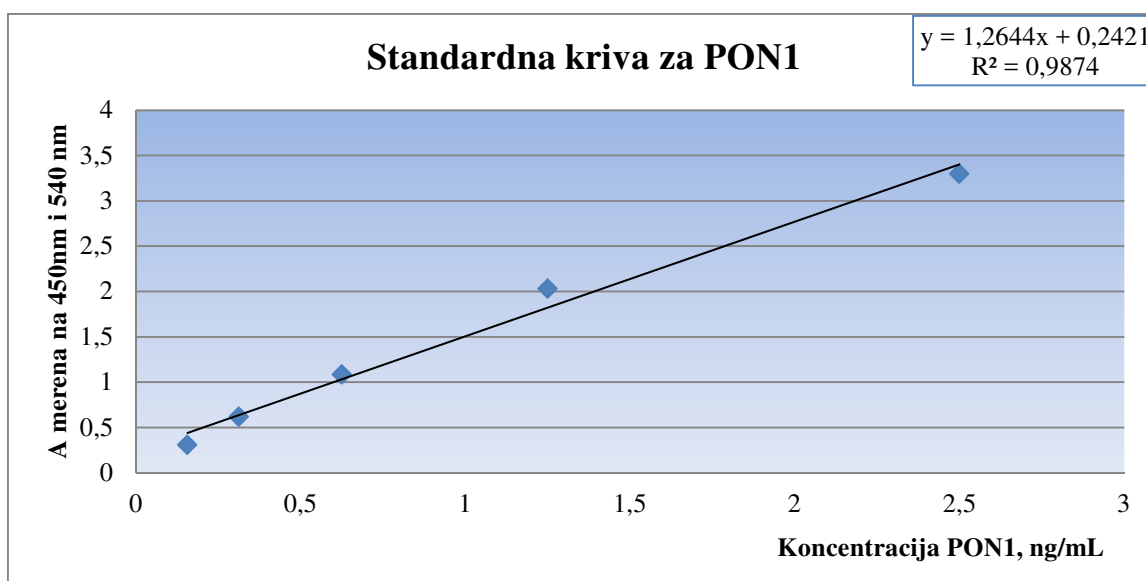
Prema metodi koju su predložili Richter i Furlong (160) određivanje paraoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju enzima PON1 iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksona do p-nitrofenola koji se u baznoj sredini nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona. Brzina nastanka p-nitrofenoksidnog anjona se prati kinetički u toku tri minuta na 405 nm i računa se promena apsorbancije po minuti. Aktivnost PON1 se izražava u IU/L.

3.6.2. Određivanje arilesterazne aktivnosti enzima PON1 u serumu

Metoda za određivanje arilesterazne aktivnosti PON1 zasniva se na razgradnji fenilacetata pri čemu u baznoj sredini dolazi do nastanka fenola. Brzina nastanka proizvoda razgradnje merena je na 270nm u toku tri minuta, na analizatoru Shimatzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Pre analize, urađena je slepa proba reagensa, kako bi se izvršila korekcija usled spontane hidrolize fenilacetata. Aktivnost enzima je izražavana u kIU/L (161).

3.6.3. Određivanje masene koncentracije enzima PON1

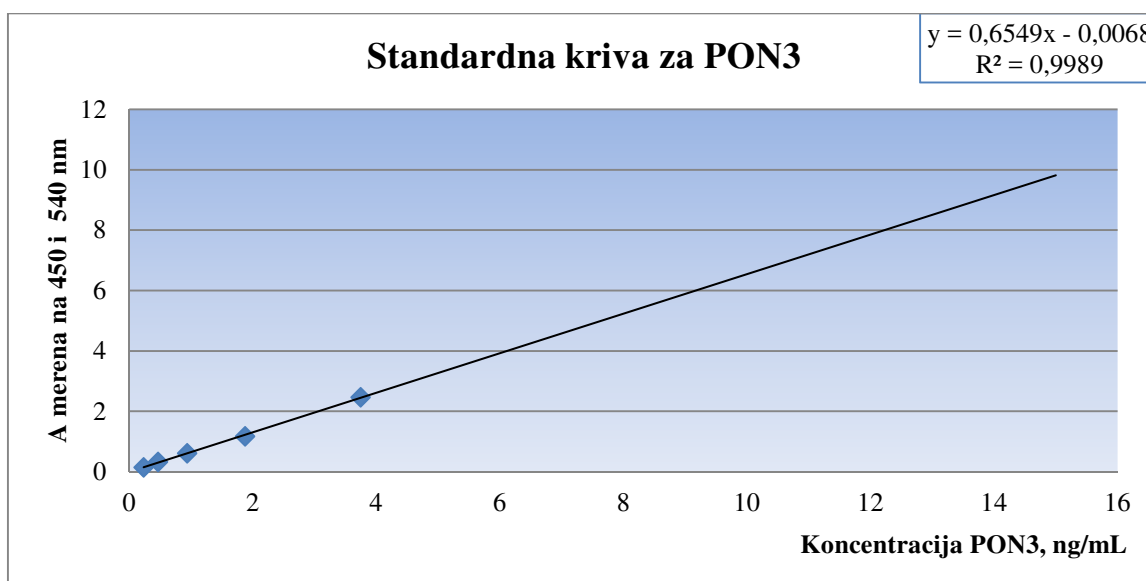
Masena koncentracija PON1 je određena korišćenjem tehnike enzimskog imunoeseja - ELISA "sendvič" testa (R&D systems, Minneapolis, SAD). Princip metode se zasniva na reakciji između primarnog monospecifičnog antitela koje je imobilisano na mikroploči i odgovarajućeg epitope na molekulu PON1. Nakon perioda inkubacije sledi dodavanje sekundarnog antitela koje se vezuje za drugi specifičan epitop na PON1 i tako nastaje kompleks ("sendvič") primarno antitelo- PON1- sekundarno antitelo. U sledećem koraku se dodaje streptavidin za koji je zakačen enzim peroksidaza koji se vezuje za sekundarno antitelo. Dodatkom rastvora H₂O₂ i odgovarajućeg hromogena pod dejstvom enzima peroksidaze dolaze do razvoja boje čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji PON1 u uzorku. Za preračunavanje koncentracije PON1 konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,156 ng/mL -2,5 ng/mL) pri čemu je kao standard korišćen rastvor PON1 u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4). Uzorci su razblaženi na sledeći način: serum-1:800, lipoproteinske frakcije-1:100.



Slika 14. Standardna kriva za PON1

3.6.4. Određivanje masene koncentracije enzima PON3

Masena koncentracija PON3 je određena korišćenjem ELISA "sendvič" imunoeseja (R&D systems, Minneapolis, SAD). Princip metode se zasniva na imunohemijskoj reakciji između primarnog monospecifičnog antitela kojim se oblaže mikroploča i odgovarajućeg epitopa na molekulu PON3. Nakon perioda inkubacije i uklanjanja viška anti-PON3 antitela ispiranjem, sledi dodavanje sekundarnog antitela koje se vezuje za drugi specifičan epitop na PON3 gradeći kompleks primarno antitelo- PON3- sekundarno antitelo. U sledećem koraku se dodaje strepdavidin za koji je vezan enzim peroksidaza koji se vezuje za sekundarno antitelo. Boja se razvija nakon dodatka rastvora H_2O_2 i odgovarajućeg hromogena koji predstavljaju supstrat za enzim peroksidazu, pri čemu je intenzitet srazmeran koncentraciji PON3 u uzorku. Za preračunavanje koncentracije PON3 konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,234 ng/mL -3,75 ng/mL) pri čemu je kao standard korišćen rastvor PON3 u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4).Uzorci su razblaženi na sledeći način:serum- 1:10,HDL lipoproteinska frakcija-1:5, VLDL lipoproteinska frakcija-bez razblaženja.



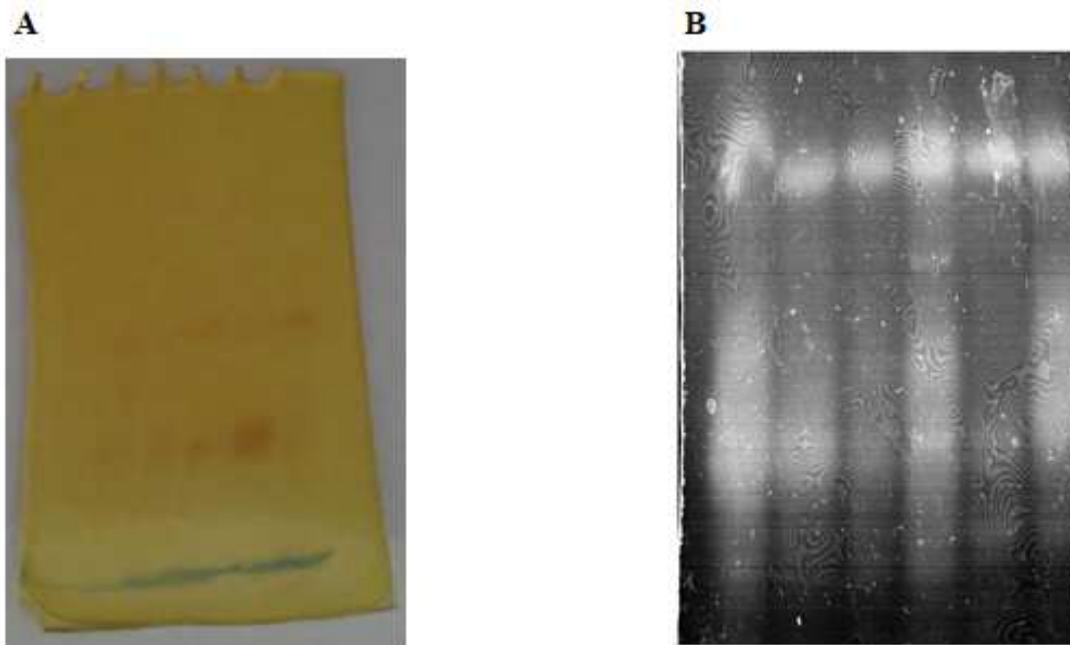
Slika 15. Standardna kriva za PON3

3.6.5. Određivanje aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 lipoproteinskim subfrakcijama

Nakon razdvajanja HDL lipoproteina korišćenjem gradijent gel elektroforeze, aktivnost enzima PON1 na HDL 2 i HDL 3 lipoproteinskim subfrakcijama je određena koristeći metodu koju su predložili Gugliuchi i saradnici (162). Princip metode se zasniva na arilesteraznoj aktivnosti PON1 i sposobnosti ovog enzima da razlaže fenil-acetat do fenola. Nastali fenol zatim u reakciju sa 4 aminoantipirinom i $K_3[Fe(CN)_6]$, daju ružičasto obojene frakcije na gelu koje su proizvod aktivnosti PON1 na HDL 2, odnosno HDL 3 subfrakcijama. Reakcija se zaustavlja dodatkom EDTA pufera koji vezuje kalcijum i blokira enzim PON1. Nakon zaustavljanja reakcije, relativni udeo PON1 aktivnosti unutar svake HDL subfrakcije (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) određena je denzitometrijski, skeniranjem gelova na skeneru Image Scanner III (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) uz primenu programa Magic Scan software (version 4,6;1999; UMAX Data Systems, Inc). Relativni udeo PON1 u svakoj HDL subfrakciji je izražena kao procenat ukupne površine ispod krive.

Izvođenje metode:

Odmah nakon elektroforeze, potrebno je aktivirati gelove korišćenjem sveže napravljenog TRIS-HCl pufera (0,1 mol/L TRIS-HCl; 2mmol/L $CaCl_2$; pH 8,3). Gel stoji u 200 mL aktivacionog pufera, dva puta po 15 minuta (nakon 15 minuta, prosuti pufer u kome je gel stajao, sipati 200 mL svežeg pufera i ostaviti gel da stoji još 15 minuta), na 25°C, uz lagano mešanje. Nakon aktiviranja, gel prebaciti u posudu gde se nalazi 200mL rastvora 20 mmol/L 4 aminoantipirin-a i 2 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$. Gel inkubirati 15 minuta, na 25°C, uz lagano mešanje, zaštićen od delovanja svetlosti. Nakon perioda inkubacije, izvući 80 mL rastvora 4 aminoantipirin-a i $K_3[Fe(CN)_6]$ i direktno na gel dodati 54,4 μ l fenil acetata, a zatim vratiti 80mL rastvora nazad na gel. Gel inkubirati 20 minuta, na 25°C, uz lagano mešanje, zaštićen od delovanja svetlosti. Nakon pojave ružičastih linija na gelu, prosuti rastvor koji je služio za razvijanje boje i nežno isprati rastvor led-hladnim rastvorom 5mmol/L EDTA i ostaviti gel da stoji u hladnom rastvoru EDTA 5 minuta uz lagano mešanje, zaštićen od delovanja svetlosti. Na slici 16 su prikazani gelovi nakon skeniranja i nakon bojenja.



Slika 16. Izgled gela nakon bojenja (A) i nakon skeniranja (B)

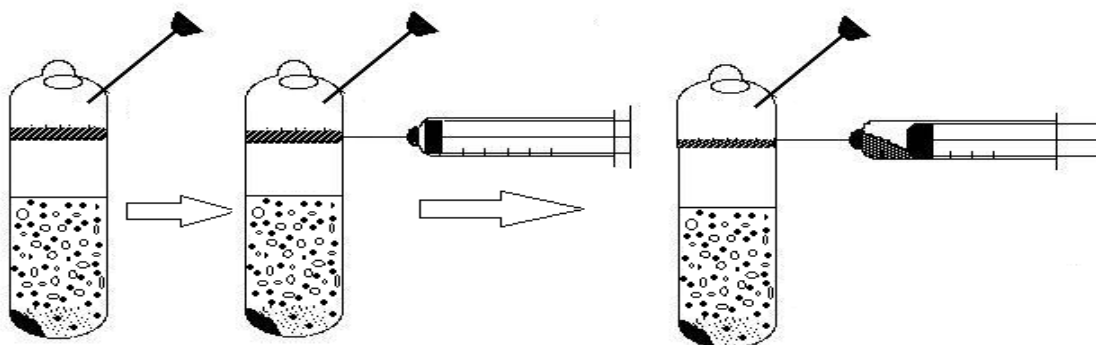
3.7. Izdvajanje lipoproteinskih frakcija korišćenjem tehnike ultracentrifugiranja

Za razdvajanje VLDL, LDL i HDL lipoproteinskih frakcija plazme korišćena je metoda sekvencionalnog ultracentrifugiranja, zasnovana na različitoj gustini lipoproteinskih čestica. Ovakav postupak podrazumeva višekratno ultracentrifugiranje, pri čemu se u svakom koraku podešava gustina uzorka tako da odgovara maksimalnoj gustini lipoproteinske frakcije koju izdvajamo. Lipoproteinska frakcija koja ima istu ili manju gustinu od rastvora u kome se nalazi, izdvojiće se na vrhu epruvete, dok će se sve teže frakcije naći na dnu. S obzirom da je gustina VLDL lipoproteinske frakcije $< 1,006$ g/mL, za izdvajanje ove lipoproteinske frakcije, bilo je potrebno podesiti gustinu uzorka na $1,006$ g/mL dodatkom rastvora NaCl iste gustine, kako bi se nakon ultracentrifugiranja VLDL lipoproteinska frakcija našla na vrhu epruvete, dok su sve ostale lipoproteinske frakcije, uključujući i proteine ostali na dnu epruvete. Gustina LDL lipoproteinske frakcije se kreće u opsegu od $1,019$ - $1,063$ g/mL, pa je nakon izdvajanja VLDL lipoproteinske frakcije primenom čvrstog KBr gustina uzorka podešena na $1,063$ g/mL kako bi se nakon ultracentrifugiranja LDL lipoproteinska frakcija izdvojila na vrhu epruvete. Nakon uklanjanja VLDL i LDL lipoproteinske frakcije, za razdvajanje HDL lipoproteinske frakcije čija se gustina kreće u opsegu od $1,063$ - $1,21$ g/mL od proteina plazme, bilo je potrebno podesiti gustinu uzorka na $1,21$ g/mL korišćenjem KBr, kako bi se nakon višestrukog ultracentrifugiranja HDL izdvojio na površini epruvete.

Primenjena tehnika brzog ultracentrifugiranja zasnovana je na metodi koju su predložili McEney i saradnici (163), a koja je modifikovana u skladu sa raspoloživom opremom. Za razliku od originalne procedure koja je podrazumevala primenu ultracentrifuge Beckman Optima MAX-E Table Top (Beckman Coulter, SAD) sa fiksnim rotorom (Beckman-TL100.3) mi smo koristili ultracentrifuga Sorvall™ WX+ (Thermo Scientific,SAD) sa fiksnim rotorom T-8100 (Thermo Scientific, SAD) što je sa sobom povlačilo i upotrebu posebnih polipropilenskih epruveta (Ultracrimp tubes, Thermo Scientific,SAD) veće zapremine. Primenjeni sistem je omogućio odgovarajuće razdvajanje VLDL, LDL i HDL lipoproteinske frakcije plazme. Kako bi proverili da li tokom razdvajanja nije došlo do mešanja lipoproteinskih frakcija, tačnije da li su sve izdvojene lipoproteinske frakcije čiste, primenili smo agarozu gel elektroforezu. Za prečišćavanje izdvojenih lipoproteinskih frakcija, odnosno uklanjanje malih molekula, pre svega molekula soli (KBr), korišćene je metoda gel filtracije.

3.7.1. Izdvajanje VLDL lipoproteinske frakcije

Kako bi izdvojili VLDL lipoproteinsku frakciju čija je gustina $< 1,006 \text{ g/mL}$ bilo je potrebno pripremiti rastvor NaCl iste gustine ($1,006 \text{ g/mL}$). U cilju provere tačnosti gustine pripremljenog rastvora NaCl, na analitičkoj vagi je tri puta izmerena masa 1 mL rastvora, a zatim iz dobijene srednje vrednosti mase izračunata gustina. Nakon pripreme pomenutog reagensa, 2,3 mL plazme je sipano u posebne epruvete za ultracentrifugiranje, a zatim je epruveta do vrha napunjena rastvorom NaCl ($3,5 \text{ mL NaCl}$ gustine $1,006 \text{ g/mL}$). Epruvete su zatvorene pomoću unutrašnjeg i spoljašnjeg čepa, korišćenjem posebnog sistema za zatvaranje (Ultracrimp Tube Sealing System, Thermo Scientific, SAD). Nakon zatvaranja i blagog mešanja, uzorci su stavljeni u ultracentrifugu Sorvall™ WX+ (Thermo Scientific, SAD) sa fiksnim rotorom T-8100 (Thermo Scientific, SAD) koja je korišćena za izdvajanje lipoproteinskih frakcija. Uzorci su centrifugirani 2 sata na $82\ 100 \text{ rpm}$ ($541\ 000 \times g$), na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$. Nakon ultracentrifugiranja, epruvete su pažljivo punktirane pomoću igle na visini od 3,3cm (mereno od dna epruvete) i pomoću šprica je izvučen gornji sloj u kome se nalazi VLDL lipoproteinska frakcija. Kako bi se omogućilo lakše izvlačenje lipoproteinske frakcije i ujedno izbeglo stvaranje vakuuma pomoću druge igle smo punktirali sam vrh epruvete. Postupak izolovanja VLDL frakcije nakon ultracentrifugiranja prikazan na slici 17.



Slika 17. Postupak izolovanja VLDL frakcije nakon ultracentrifugiranja

Preostali deo uzorka, koji ostaje na dnu epruvete nakon izdvajanja VLDL lipoproteinske frakcije predstavlja infranatant u kome se nalaze LDL, HDL lipoproteinske frakcije i proteini koji dalje podležu procesu ultracentrifugiranja. Čistoća VLDL frakcije je proverena primenom agarozna gel elektroforeze, a razdvojene frakcije su čuvane na -80°C . Pre zamrzavanja preko VLDL frakcije je puštena “struja” azota, kako bi se istisnuo kiseonik i sprečila oksidacija lipida unutar lipoproteinske frakcije.

3.7.2. Izdvajanje LDL lipoproteinske frakcije

Za izdvajanje LDL lipoproteinske frakcije iz infranatanta koji je ostao nakon uklanjanja VLDL lipoproteinske frakcije, bilo je potrebno podesiti gustinu uzorka na 1,063 g/mL i pripremiti rastvor KBr iste gustine kako bi obezbedili jednaku gustinu u čitavom medijumu. Gustina uzorka je proverena tako što je na analitičkoj vagi tri puta merena masa 1mL uzorka zatim je iz dobijene srednje vrednosti mase izračunata gustina. Nakon toga je određena masa čvrstog KBr koju je bilo potrebno dodati kako bi gustinu uzorka bila podešena na 1,063 g/mL, a za to je korišćena formula koju su dali Radding i Steinberg (164):

$$M_{\text{KBr}} = \frac{V(d_2 - d_1)}{(1 - v_5)d_2}$$

M_{KBr} = potrebna masa KBr, V = zapremina uzorka čiju gustinu podešavamo, d_1 = izmerena gustina uzorka (rastvora) čiju gustinu podešavamo na 5 °C, d_2 = gustina uzorka (rastvora) koju želimo da postignemo na 5 °C, v_5 = parcijalni specifični volumen KBr na 5 °C (za gustinu 1,063 g/mL iznosi 0,2769).

Za pripremu rastvora KBr gustine 1,063 g/mL kao polazni rastvor je korišćen prethodno pripremljen rastvor NaCl ($d=1,006$ g/mL) u koji je dodata odgovarajuća masa čvrstog KBr, izračunata na osnovu pomenute formule. Nakon pripreme rastvora KBr i provere gustine, 3mL uzorka je preneto u posebne epruvete za ultracentrifugiranje, koje su zatim napunjene do vrha rastvorom KBr (2,8 mL KBr gustine 1,063 g/mL). Epruvete su zatvorene, uzorci su blago promešani, a zatim centrifugirani 3 sata na 82 100 rpm ($541\ 000 \times g$), na temperaturi od +4°C, pri čemu se LDL lipoproteinska frakcija kao najlakša našla u supernatantu, dok su HDL lipoproteinska frakcija i proteini ostali u infranatantu, na dnu epruvete. Nakon završetka ultracentrifugiranja, epruvete su pažljivo punktirane pomoću igle na visini od 3,5 cm (mereno od dna epruvete) i pomoću šprica je izvučen gornji sloj u kome se nalazi LDL lipoproteinska frakcija. U cilju lakšeg izvlačenja lipoproteinske frakcije pomoću druge igle je punktiran sam vrh epruvete i tako je izbegnuto stvaranje vakuuma. Sam princip izdvajanja nakon ultracentrifugiranja je identičan kao i kod izdvajanja VLDL frakcije, što je grafički prikazano na slici 17. Nakon izdvajanja LDL frakcije, primenjena je agarozna gel elektroforeza u cilju provere efikasnost razdvajanja i čistoće izolovane LDL frakcije. Razdvojene frakcije su čuvane na -80°C, a pre zamrzavanja je preko LDL frakcije puštena "struja" azota, kako bi se istisnuo kiseonik.

3.7.3. Izdvajanje HDL lipoproteinske frakcije

U poslednjoj fazi ultracentrifugiranja bilo je potrebno izdvojiti HDL lipoproteinsku frakciju od proteina, što je postignuto podešavanjem gustine uzorka na 1,21 g/mL i primenom rastvora KBr iste gustine. Slično prethodnom koraku izdvajanja, na samom početku neophodno je bilo proveriti gustinu uzorka. Nakon utvrđivanja gustine, pomoću formule koju su dali Radding i Steinberg (164), izračunata je masa KBr koju je bilo potrebno dodati, kako bi gustina svakog ispitivanog uzorka bila 1,21 g/mL (parcijalni specifični volumen KBr na 5 °C za gustinu 1,21 g/mL iznosi 0,2944). Za pripremu rastvora KBr gustine 1,21 g/mL kao polazni rastvor korišćen je prethodno pripremljen rastvor NaCl ($d=1,006$ g/mL) u koji je dodata odgovarajuća masa čvrstog KBr, izračunata na osnovu pomenute formule. Procesu ultracentrifugiranja je prethodila provera gustine uzorak i rastvora, nakon čega je oko 3,2 mL uzorka prebačeno u epruvete za ultracentrifugiranje koje su zatim do vrha dopunjene rastvorom KBr (2,6 mL KBr gustine 1,21g/mL). Uzorci su centrifugirani 6 sati na 82 100 rpm ($541\ 000 \times g$), na temperaturi od +4°C, nakon čega je došlo do adekvatnog razdvajanja HDL lipoproteinske frakcije od proteina, s obzirom na to da se HDL frakcija kao lakša izdvojila u supernatantu dok su se proteini istaložili na dnu epruvete. Kako bi se izbeglo stvaranje vakuuma i omogućilo lakše izvlačenje HDL lipoproteinske frakcije, pomoću jedne igle je punktiran sam vrh epruvete, a pomoću druge je pažljivo punktirana epruveta na visini od 3 cm (mereno od dna epruvete) i izvučen je gornji sloj u kome se nalazi HDL lipoproteinska frakcija. Princip izdvajanja HDL lipoproteinske frakcije nakon ultracentrifugiranja je identičan kao i kod izdvajanja VLDL i LDL frakcije, što je grafičku prikazano na slici 17. Elektroforetsko razdvajanje lipida na agarozu gelu je korišćeno kako bi proverili čistoću izolovane HDL frakcije nakon ultracentrifugiranja. U cilju uklanjanja kiseonika i sprečavanja oksidacije lipida unutar HDL lipoproteinske frakcije, preko uzoraka je propuštana "struja" azota što je dovelo do istiskivanja kiseonika iz uzorka. Lipoproteinske frakcije su čuvane na -80°C i odmrzavane neposredno pre dalje analize.

3.7.4. Agaroza gel elektroforeza

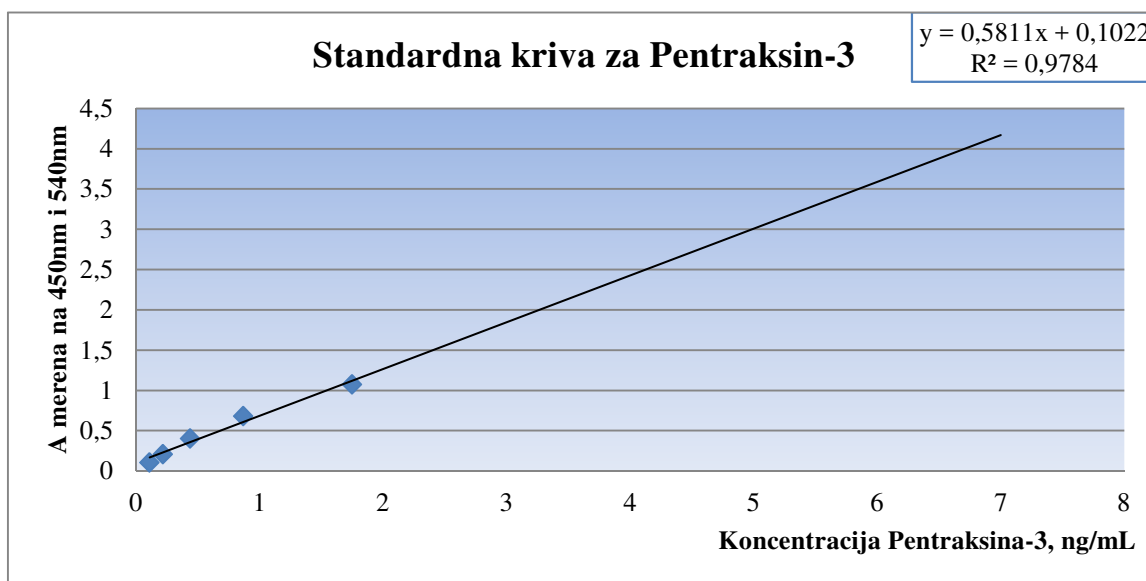
Provera čistoće izolovanih lipoproteina (VLDL, LDL i HDL) nakon ultracentrifugiranja izvršena je korišćenjem agaroza gel elektroforeze. Princip razdvajanja lipoproteina pomoću elektroforeze kao fizičko-hemijske metode jeste njihove različita pokretljivost u električnom polju, što je posledica različitog naelektrisanja proteinske komponente (apolipoproteina) u spoljašnjem omotaču lipoproteina. U skladu sa tim HDL lipoproteinska frakcija koja ima najveći sadržaj proteina, putuje najbrže i nalazi se u blizini anode, LDL lipoproteinska frakcija je spora i nalazi se u blizini katode, dok se VLDL lipoproteinska frakcija nalazi između HDL i LDL regiona. Nakon ultracentrifugiranja, na agaroza gel su nanete izdvojene VLDL, LDL i HDL lipoproteinske frakcije, pri čemu je odsustvo ostalih frakcija u određenoj lipoproteinskoj frakciji potvrdilo potpuno i adekvatno razdvajanje lipoproteinskih frakcija. Uporedo sa lipoproteinskim frakcijama, na agaroza gel je nanet i uзорak seruma koji je nakon razdvajanja imao jasno definisanu svaku lipoproteinsku frakciju što je poslužilo kao standard za proveru čistoće izdvojenih lipoproteinskih frakcija. Razdvajanju lipoproteina je prethodilo izlivanje gelova pomoću *SVG-SYS vari-gel mini* sistema (Alphametrix biotech, Rodermark, Germany) dok je za sam proces elektroforeze korišćena horizontalna kada *HU10 Mini-Plus Horizontal* (Alphametrix biotech, Rodermark, Germany). Elektroforeza se odvijala pri konstantnoj jačini struje u prisustvu barbituratnog pufera pH 8,6, a izdvojene lipoproteinske frakcije su detektovane pomoću sveže pripremljene boje Fat Red 7B (165).

3.7.5. Gel filtracija za uklanjanje molekula soli iz izdvojenih lipoproteina (VLDL, LDL, HDL)

Za uklanjanje soli KBr koja je korišćena za postizanje gustinskog gradijenta tokom ultracentrifugiranja, primenili smo PD-10 kolone ispunjene sefadksom G-25. Ove kolone omogućavaju razdvajanje velikih molekula ($M_r > 5000$), od malih ($M < 1000$) po principu gel filtracije, pri čemu se makromolekuli prvi eluiraju sa kolone, dok mali molekuli prolaze kroz pore i zadržavaju se unutar kolone.

3.8. Određivanje masene koncentracije pentraksina-3

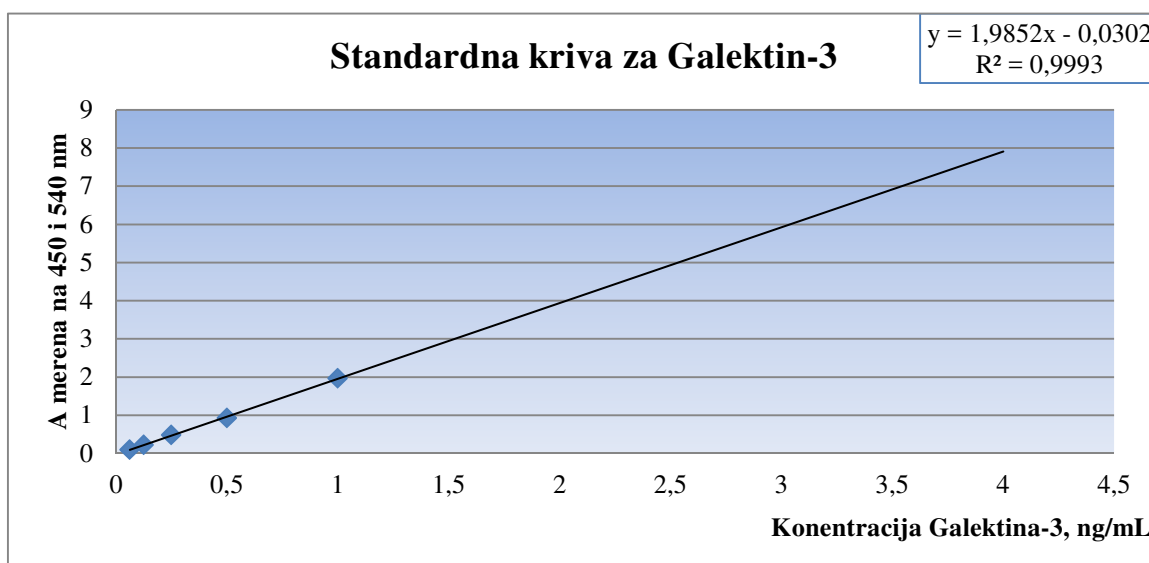
Masena koncentracija pentraksina-3 je određena pomoću ELISA "sendvič" imunoseja (R&D systems, Minneapolis, SAD). U ovom „sendvič“ ELISA imunoseju, monoklonsko antitelo specifično za jedinstveni domen na molekulu PTX-3 je prethodno imobilisano na mikroploču. Nakon dodatka uzorka seruma i perioda inkubacije sledi, sledi ispiranje, a zatim dodavanje sekundarnog PTX-3 specifičnog antitela koje se vezuje za drugi epitop na pentraksinu-3 i tako nastaje "sendvič" primarno antitelo- pentraksin-3- sekundarno antitelo. U sledećem koraku se dodaje strepdavidin koji za sebe ima vezan enzim peroksidazu i koji se vezuje za sekundarno antitelo. Dodatkom rastvora H₂O₂ i odgovarajućeg hromogena pod dejstvom enzima peroksidaze dolaze do razvoja boje čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji pentraksina-3 u uzorku. Za preračunavanje koncentracije pentraksina-3 konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,1 ng/mL -1,75 ng/mL) pri čemu je kao standard korišćen rastvor pentraksina-3 u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4). Uzorci su razblaženi sa reagens diluentom u odnosu 1:5.



Slika 18. Standardna kriva za pentraksin-3

3.9. Određivanje masene koncentracije galektina-3

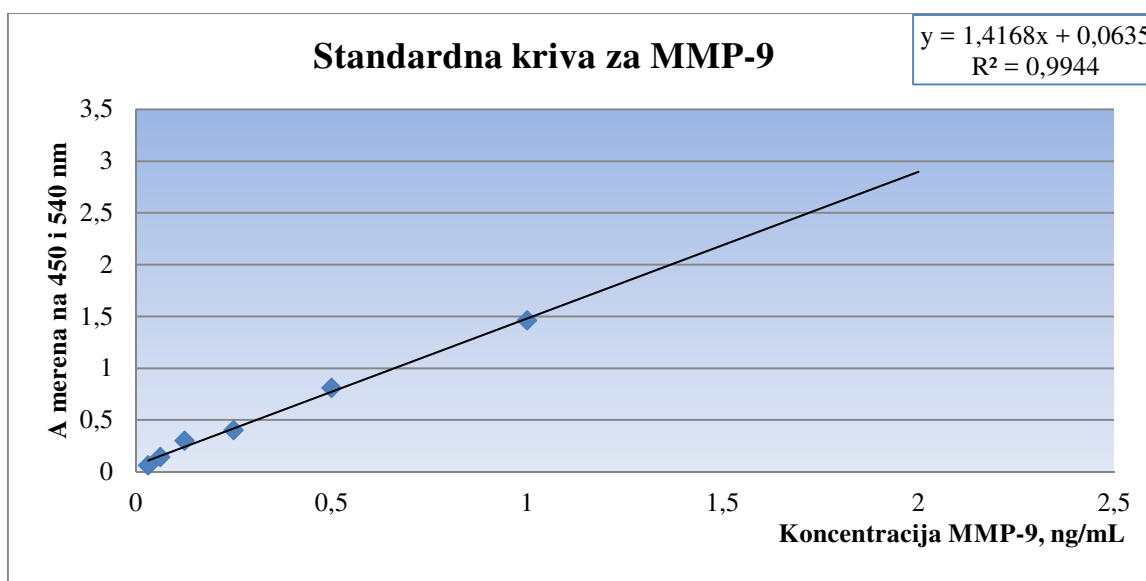
Za određivanje masene koncentracije galektina-3 korišćena je ELISA "sendvič" tehnika (R&D systems, Minneapolis, SAD). U ovom kvantitativnom „sendvič“ imunoseju, monoklonsko antitelo za galektin-3 imobilisano je na ELISA mikroploči i specifično prepoznaje odgovarajući domen na galektin-3. Nakon perioda inkubacije i reakcije između primarnog antitela i galektina-3 koji se nalazi u uzorku, sledi dodavanje sekundarnog antitela koje se vezuje za drugi specifičan epitop na galektin-3. Na ovaj način nastaje kompleks primarno antitelo- galektin-3- sekundarno antitelo. U sledećem koraku se dodaje strepdavidin za koji je vezan enzim peroksidaza koji se vezuje za sekundarno antitelo. Nakon ispiranja kojim se uklanja nevezani reagens, dodaje se supstrat (H_2O_2 i odgovarajućeg hromogena), pri čemu pod dejstvom enzima peroksidaze dolaze do razvoja boje čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji galektina-3 u uzorku. Za preračunavanje koncentracije galektina-3 konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0, 0625 ng/mL -1ng/mL) pri čemu je kao standard korišćen rastvor galektina-3 u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4). Uzorci su razblaženi sa reagens diluentom u odnosu 1:5.



Slika 19. Standardna kriva za galektin-3

3.10. Određivanje masene koncentracije matriks metaloproteinaze-9

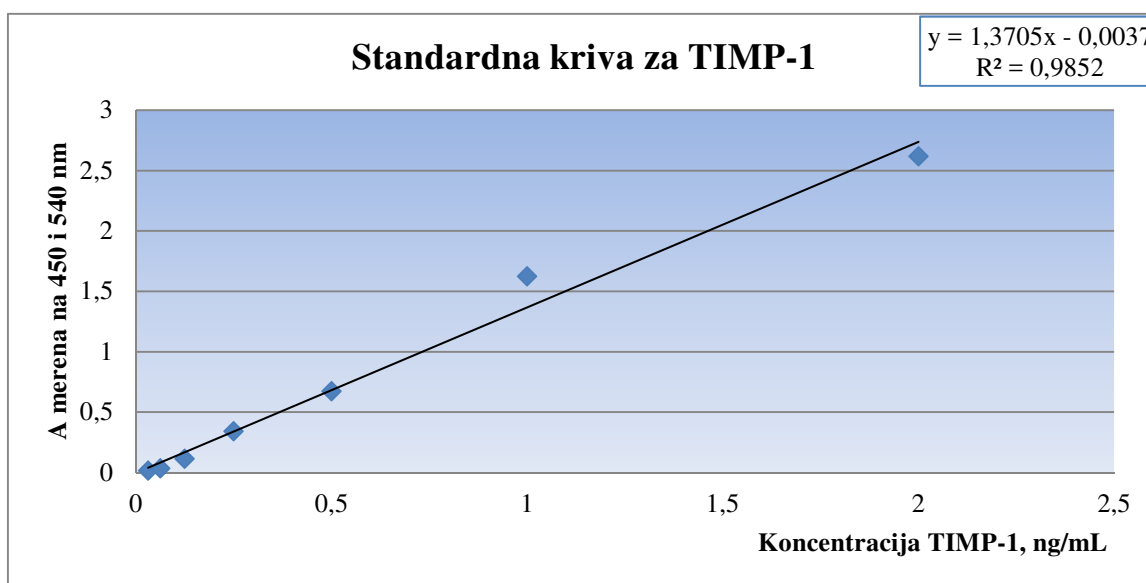
ELISA "sendvič" imunosej (R&D systems, Minneapolis, SAD) je korišćen za određivanje masene koncentracije MMP-9. Princip metode se zasniva na reakciji između primarnog monospecifičnog antitela koje je imobilisano na mikroploči i odgovarajućeg epitope na molekulu MMP-9. Nakon reakcije između primarnog antitela i MMP-9 iz uzorka, sledi dodavanje sekundarnog antitela koje se vezuje za drugi specifičan epitop na MMP-9 gradeći kompleks primarno antitelo- MMP-9- sekundarno antitelo. U sledećem koraku se dodaje strepdavidin za koji je vezan enzim peroksidaza koji se vezuje za sekundarno antitelo. Dodatkom rastvora H₂O₂ i odgovarajućeg hromogena pod dejstvom enzima peroksidaze dolaze do razvoja boje čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji MMP-9 u uzorku. Za preračunavanje koncentracije MMP-9 konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,0312 ng/mL -1ng/mL) pri čemu je kao standard korišćen rastvor MMP-9 u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4). Uzorci su razblaženi 1:600 sa reagens diluentom.



Slika 20. Standardna kriva za MMP-9

3.11. Određivanje masene koncentracije tkivnog inhibitora metaloproteinaza-1

Masena koncentracija TIMP-1 je određena korišćenjem ELISA "sendvič" imunoseja (R&D systems, Minneapolis, SAD). Princip metode se zasniva na reakciji između primarnog monospecifičnog antitela koje je imobilisano na mikroploči i odgovarajućeg epitope na molekulu TIMP-1. Nakon perioda inkubacije sledi dodavanje sekundarnog antitela koje se vezuje za drugi specifičan epitop na TIMP-1 i tako nastaje kompleks ("sendvič") primarno antitelo- TIMP-1- sekundarno antitelo. U sledećem koraku se dodaje strepdavidin za koji je zakačen enzim peroksidaza koji se vezuje za sekundarno antitelo. Nakon ispiranja kojim se uklanja nevezani reagens, dodaje se supstrat (vodonik peroksida i odgovarajući hromogen), pri čemu pod dejstvom enzima peroksidaze dolaze do razvoja plave boje čiji je intenzitet srazmeran koncentraciji TIMP-1 u uzorku. Za preračunavanje koncentracije TIMP-1 konstruisana je standardna kriva (opseg koncentracije 0,0312 ng/mL -2 ng/mL) pri čemu je kao standard korišćen rastvor TIMP-1 u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4). Uzorci su razblaženi sa reagens diluentom u odnosu 1:600.



Slika 21. Standardna kriva za TIMP-1

3.12. Izračunavanje skorova rizika za kardiovaskularne bolesti

3.12.1. Izračunavanje Framingamskog skor rizika

Framingamski skor rizika predstavlja algoritam koji se koristi za izračunavanje desetogodišnjeg rizika za pojavu KVB. Pol, starost, pušački status, koncentracije UH i HDL-h, kao i vrednost sistolnog pritiska i/ili tretman hipertenzije predstavljaju faktore rizika koji ulaze u proračun za FRS (166). Svaki od pomenutih faktora rizika nosi odgovarajući broj poena u zavisnosti od pola i starosti (Tabela 2), a zbir svih poena predstavlja izračunat FRS prema kome se ispitanici svrstavaju u odgovarajuće kategorije rizika (Tabela 2). Kategorije rizika prema izračunatom FRS su: nizak (FRS<10%), umereni (FRS 10-20%) ili visok (FRS>20%) rizik za pojavu KVB u narednih 10 godina.

Tabela 2. Izračunavanje FRS za muškarce i žene (166)

Starost	Poeni	Pušački status	Poeni za 20-39 godina	Poeni za 40-49 Godina	Poeni za 50-59 godina	Poeni za 60-69 godina	Poeni za 70-79 godina
20-34	-9 (-7)	Pušači	8 (9)	5 (7)	3 (4)	1 (2)	1 (1)
35-39	-4 (-3)	Nepušači	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
40-44	0 (0)	UH (mmol/L)	Poeni za 20-39 godina	Poeni za 40-49 Godina	Poeni za 50-59 godina	Poeni za 60-69 godina	Poeni za 70-79 godina
45-49	3 (3)	<4,14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
50-54	6 (6)	4,14-5,15	4 (4)	3 (3)	2 (2)	1 (1)	0 (1)
55-59	8 (8)	5,16-6,19	7 (8)	5 (6)	3 (4)	1 (2)	0 (1)
60-64	10 (10)	6,20-7,23	9 (11)	6 (8)	4 (5)	2 (3)	1(2)
65-69	11(12)	≥7,24	11 (13)	8 (10)	5 (4)	3 (2)	1(1)
70-74	12 (14)	Sistolni krvni pritisak	Bez terapije	Sa terapijom	FSR -Rizik	FSR –Rizik	FSR Rizik
75-79	13 (16)	<120	0 (0)	0 (0)	<9-<1%	14-2%	20-11%
HDL-h	Poeni	120-129	0 (1)	1 (3)	9-1%	15-3%	21-14%
≥1,55	-1 (-1)	130-139	1 (2)	2 (4)	10-1%	16-4%	22-17%
1,30-1,54	0 (0)	140-149	1 (3)	2 (5)	11-1%	17-5%	23-22%
1,03-1,29	1(1)	150-159	2 (4)	3 (6)	12-1%	18-6%	24-27%
<1,03	2 (2)				13-2%	19-8%	25->30%

Vrednosti FRS za žene su date u zagradi

3.12.2. Izračunavanje zbirnog skora dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije (DOI)

Imajući u vidu da su brojni faktori rizika uključeni u složenu patologiju bubrežnih bolesti i uzimajući u obzir međusobnu interakciju različitih faktora izračunali smo DOI skor, kao zbir pojedinačnih skorova, dislipidemije (**D**), oksidativno-stresnog statusa (**O**) i inflamacije (**I**).

S obzirom na to da smo proveravanjem distribucije podataka utvrdili da podaci ne prate normalnu raspodelu, sve vrednosti korišćene za izračunavanje su najpre logaritmovane ($\log_{10}X$).

Za izračunavanje skora dislipidemije bilo je potrebno standardizovati vrednosti za HDL-h, LDL-h i trigliceride odnosno izračunati z-skor za ove parametre na osnovu poznavanja srednje vrednosti i standardne devijacije populacije. Podatke o populacionoj srednjoj vrednosti i standardnoj devijaciji su dobijeni iz dugogodišnjeg određivanja ovih parametara u našoj laboratoriji kod zdrave sredovečne populacije. Nakon toga dislipidemija skor je izračunat tako što se od srednje vrednosti standardizovanih LDL-C i triglicerida oduzimaju standardizovane vrednosti HDL-h.

$$\text{Skor dislipidemije} = \frac{\text{z-skor LDL-h} + \text{z-skor trigliceridi}}{2} - \text{z-skor HDL-h}$$

Skor oksidativnog stresa je izračunat na osnovu jednačine koju su predložili Vegila i saradnici (167), a koja se zasniva na računanju razlike prooksidativnog i antioksidativnog skora. Kao i kod skora dislipidemije i ovde je bilo potrebno standardizovati parametre oksidativnog stresa (AOPP) i antioksidativne zaštite (ukupne SH-grupe i paraoksonazna aktivnost enzima PON1), što smo učinili izračunavanjem z-skora. Nakon toga smo od prooksidanasa, tačnije od standardizovanih vrednosti AOPP oduzimali srednje vrednosti standardizovanih ukupnih SH grupa i aktivnosti PON1.

$$\text{Skor oksidativno-stresnog statusa} = \text{z-skor AOPP} - \frac{(\text{z-skor ukupne SH grupe} + \text{z-skor PON1})}{2}$$

Za izračunavanje skora inflamacije, bilo je potrebno standardizovati vrednosti pentraksina-3, tačnije izračunati vrednosti z-skora za pentraksin-3.

Sabiranjem sva tri skora dobili smo zbirni DOI skor, kao sumu skora dislipidemije, skora oksidativno-stresnog statusa i skora inflamacije.

3.13. Statistička analiza

Shapiro-Wilk-ov test je korišćen za proveru tipa raspodele kontinuiranih podataka, pri čemu je izračunavanjem koeficijenta asimetričnosti (skewness) i zaobljenosti (kurtosis) raspodele kao i konstrukcijom histograma ispitivana normalnost raspodele.

Kontinuirani podaci koji su sledili normalnu raspodelu prikazani su kao aritmetičke srednje vrednosti \pm standardne devijacije. Kontinuirani podaci koji primarno nisu bili normalno distribuirani, ali su nakon logaritmovanja sledili normalnu raspodelu, prikazani su kao geometrijske srednje vrednosti i 95% intervali pouzdanosti (95% CI). Promenljive koje ni nakon logaritamske transformacije nisu pratile normalnu raspodelu prikazane su kao medijane i interkvartilni rasponi, dok su kategorički podaci prikazani kao apsolutne frekvence.

Student-ov t-test ili jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje podataka koji slede normalnu raspodelu kao i podataka koji su nakon logaritmovanja normalno distribuirani. Podaci koji ne prate normalnu raspodelu poređeni su Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovima. Razlike između kategoričkih promenljivih proveravane su upotrebom Chi-kvadrat (χ^2). Ispitivanje postojanja razlike između grupa nakon korekcije za godine izvršeno je analizom kovarijanse (ANCOVA).

Spearman-ovu neparametarsku korelacionu analizu smo primenili za proveru korelacije između ispitivanih parametara, dok je binarna logistička regresiona analiza korišćena u cilju provere prediktivne sposobnosti pojedinih ispitivanih parametara. Primena ROC analize (eng. *Receiver Operating Characteristics*) omogućila je procenu dijagnostičke tačnosti određenih parametara u razlikovanju bolesnika od zdravih ispitanik.

Kao minimalni uslov za postojanje statističke značajnosti smatrana je verovatnoća $P \leq 0,05$. Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskog softvera SPSS, verzija 22.0 (IBM, New York, SAD).

4. Rezultati istraživanja

4.1. Osnovni demografski podaci i rezultati biohemijskih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

U tabeli 3 su prikazani osnovni demografski podaci, kao i rezultati biohemijskih parametara kod 77 bubrežnih bolesnika i 40 zdravih ispitanika. Imajući u vidu da su bubrežni bolesnici bili stariji od zdravih ispitanika, upotrebom analize kovarijanse (ANCOVA) ispitali smo postojanje razlike između grupa nakon korekcije za uticaj godina.

Tabela 3. Demografske karakteristike i biohemijski parametri kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=40	Bubrežni bolesnici N=77	p vrednost
Starost, godine	46,6±10,4	57,4±14,7	<0,001
Pol, m/ž	18/22	49/28	0,053
ITM, kg/m ²	24,7±4,1	25,1±4,2	0,750
Sistolni krvni pritisak, mm Hg	125±14	136±23	0,136
Dijastolni krvni pritisak, mm Hg	82,3±10,4	81,7±12,8	0,841
JGF, mL/min/1,73m ² *	77,8 (75,2-84,8)	8,52 (5,25-13,00)	<0,001
Glukoza, mmol/L*	5,14 (4,82-5,51)	5,40 (4,80-6,20)	0,186
Urea, mmol/L*	5,93 (5,13-7,28)	24,3 (19,1-26,8)	<0,001
Kreatinin, μmol/L	87,9±13,5	775±332	<0,001
Mokraćna kiselina, μmol/L*	356 (276-442)	412 (366-508)	<0,001
Ukupni proteini, g/L*	68,5 (66,9-71,4)	66,3 (62,5-70,0)	<0,01
Ukupan kolesterol, mmol/L	5,01±0,88	4,86±1,26	0,525
Trigliceridi, mmol/L [#]	1,26 (1,21-1,67)	1,41 (1,40-1,89)	0,266
LDL-h, mmol/L	3,10±0,78	3,37±1,14	0,101
HDL-h, mmol/L*	1,48 (1,26-1,75)	0,70 (0,41-0,96)	<0,001
apoA-I, g/L	179±23	151±27	<0,001
FSR,%*	2,34 (1,51-9,42)	30,0 (15,6-30,1)	<0,001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu, odnosno kao apsolutne frekvence za kategoričke podatke. [#]Podaci koji nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI). *Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Kategoričke promenljive su poređene Chi-kvadrat testom. Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih koje slede normalnu raspodelu, dok je Mann-Whitney test korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Nakon statističke obrade podataka nije bilo razlike u ITM, kao ni u distribuciji polova između bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. Sistolni i dijastolni pritisak se nisu značajno razlikovali, dok je JGF, kao što je i očekivano bila niža u grupi bolesnika ($p < 0,001$). Koncentracija glukoze se nije statistički razlikovala između ispitivanih grupa. Kod bubrežnih bolesnika su pronađene značajno više vrednosti uree ($p < 0,001$), kreatinina ($p < 0,001$) i mokraćne kiseline ($p < 0,001$), dok je koncentracija ukupnih proteina bila niža u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p < 0,01$). Analizom lipidnih parametara utvrđena je statistički značajno niža koncentracija HDL-h ($p < 0,001$) kod bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike dok su vrednosti ukupnog holestrola, LDL-h i triglicerida bile slične u obe ispitivane grupe. Framingamski skor rizika za KVB je bio značajno viši kod bubrežnih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$).

Sledeći korak u analizi, obuhvatao je ispitivanje osnovnih biohemijskih parametara kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrežne funkcije, zbog čega su bolesnici podeljeni na bolesnike sa HBB i na bolesnike sa terminalnom bolešću bubrega koji su na hemodijalizi. Rezultati su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Demografske karakteristike i biohemijski parametri kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=40	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
Starost, godine	46,6±10,4	55,1±16,9	58,2±13,9 ^{aa}	<0,01
Pol, m/ž	18/22	12/10	37/18	0,250
Glukoza, mmol/L*	5,14 (4,82-5,51)	5,75 (4,80-7,37)	5,40 (4,70-5,90)	0,386
Urea, mmol/L*	5,93 (5,13-7,28)	23,0 (18,2-28,7) ^{aaa}	24,5 (19,7-26,8) ^{aaa,bbb}	<0,001
Kreatinin, μmol/L*	85,5 (78,3-98,7)	437 (217-505) ^{aaa}	897 (760-1116) ^{aaa,bbb}	<0,001
Mokraćna kiselina, μmol/L*	356 (276-442)	553 (480-658) ^{aaa}	401 (351-462) ^{a,bbb}	<0,001
Ukupni proteini, g/L	68,7±3,7	61,4±8,5 ^{aaa}	67,8±5,7 ^{aaa}	<0,01
Ukupan holesterol, mmol/L	5,01±0,88	5,06±1,33	4,78±1,23	0,533
Trigliceridi, mmol/L [#]	1,26 (1,21-1,67)	1,53 (1,15-1,67)	1,36 (1,34-1,84)	0,393
LDL-h, mmol/L	3,10±0,78	3,23±1,26	3,42±1,10	0,264
HDL-h, mmol/L [#]	1,48 (1,26-1,75)	1,03 (1,02-1,09) ^{aaa}	0,51 (0,49-0,68) ^{aaa,bbb}	<0,001
apoA-I, g/L	179±23	162±22	141±28 ^{aaa,b}	<0,001
FSR,%*	2,34(1,51-9,42)	21,2 (15,7-28,8) ^{aaa}	20,1 (15,7-25,9) ^{aaa}	<0,001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu, odnosno kao apsolutne frekvence za kategoričke podatke. [#]Podaci koji nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI). *Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Kategoričke promenljive su poređene Chi-kvadrat testom. ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje kontinuiranih promenljivih koji slede normalnu raspodelu kao i podataka koji su nakon logaritmovanja normalno distribuirani. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnike sa HBB; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Nakon statističke obrade podataka uočena je razlika u godinama između bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika, zbog čega je korišćen ANCOVA test kako bi se ispitalo postojanje razlike između grupa nakon korekcije za godine. Koncentracije uree, kreatinina i mokraćne kiseline su bile značajno više kod bolesnika sa HBB (redom $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$) i kod bolesnika na hemodijalizi (redom $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,05$) u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe s obzirom na prisustvo terminalnog stadijuma bubrežne bolesti, bolesnici na hemodijalizi su imali značajno više koncentracije uree ($p < 0,001$), kreatinina ($p < 0,001$) i mokraćne kiseline ($p < 0,001$) u poređenju sa bolesnicima sa HBB. Ukupni proteini su bili statistički značajno niži kod bolesnika sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,001$) u poređenju sa zdravim isitanicima, dok s druge strane nije bilo razlike u koncentraciji proteina između bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja. Parametri lipidnog statusa, ukupan holesterol, trigliceridi i LDL-h su bili slični u svim ispitivanim grupama, dok su koncentracije HDL-h ($p < 0,001$) i apoA-I ($p < 0,001$) bile statistički značajno niže kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe koncentracija HDL-h je bila značajno niža kod bolesnika sa HBB u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$), dok nije bilo razlike u koncentraciji apoA-I. Poređenjem koncentracije HDL-h i apoA-I, između bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom oštećenja funkcije bubrega, značajno niže vrednosti su uočene kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na bolesnike sa HBB. Kao što je i očekivano Framingamski skor rizika za KVB je bio značajno viši kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi u odnosu na grupu zdravih ispitanika ($p < 0,001$).

4.2. Distribucija LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Pored osnovnih parametara lipidnog statusa, naše istraživanje je obuhvatalo i detaljno ispitivanje raspodele LDL i HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. U tabeli 5 su prikazani rezultati poređenja relativnih udela LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika.

Tabela 5. Relativni udeo veličine i raspodela LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=40	Bubrežni bolesnici N=57	p vrednost
LDL dijametar, nm	27,40 (25,80-28,30)	26,73 (26,07-27,42)	0,225
LDL I, %	26,4 (19,7-29,9)	29,6 (22,55-40,65)	0,153
LDL IIa, %	13,3 (11,2-15,5)	14,7 (12,4-16,3)	0,223
LDL IIb, %	15,3 (12,8-18,7)	16,2 (13,5-19,8)	0,987
LDL IIIa, %	12,1 (10,7-15,8)	11,9 (10,2-14,8)	0,682
LDL IIIb, %	6,2 (4,55-7,4)	5,7 (4,7-6,6)	0,406
LDL IVa, %	10,6 (6,8-12,3)	8,2 (7,1-10,1)	0,060
LDL IVb, %	13,9 (8,1-16,1)	10,2 (7,2-12,6)	0,075
sdLDL, %	44,7 (34,1-48,8)	37,5 (31,9-42,8)	0,071

Svi rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Mann-Whitney test je korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Dijametar LDL čestica se nije statistički značajno razlikovao između zdravih osoba i bubrežnih bolesnika, kao ni relativni udeli LDL I i LDL IIa subfrakcija. Takođe, nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa nakon poređenja relativnih udela LDL IIIa, LDL IIIb, odnosno LDL IVa i LDL IVb subfrakcija. Konačno, relativni udeo sdLDL čestica se nije razlikovao kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika.

Dodatne analize su obuhvatale poređenje relativnih udela LDL subfrakcija kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi, kao i kod zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=40	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
LDL dijametar, nm	27,40 (25,81-28,32)	27,03 (26,35-27,85)	26,54 (25,50-27,04)	0,146
LDL I, %	26,4 (19,7-29,9)	37,7 (22,9-48,8)	27,7 (22,1-31,1)	0,058
LDL IIa, %	13,3 (11,2-15,5)	14,9 (13,5-16,3)	14,6 (13,1-15,9)	0,443
LDL IIb, %	15,3 (12,8-18,7)	16,3 (14,7-19,3)	16,1 (14,7-17,6)	0,760
LDL IIIa, %	12,1 (10,7-15,8)	11,1 (10,2-13,5)	13,1 (11,8-14,5)	0,570
LDL IIIb, %	6,2 (4,5-7,4)	5,2 (4,4-5,0)	6,3 (5,1-7,1)	0,062
LDL IVa, %	10,6 (6,8-12,3)	7,3 (6,4-10,2) ^a	9,5 (7,7-10,1)	<0,05
LDL IVb, %	13,9 (8,1-16,1)	8,80 (5,1-9,5) ^{aaa}	12,3 (10,4-13,9) ^{bb}	<0,001
sdLDL, %	44,7 (34,1-48,8)	32,4(28,1-38,7) ^{aa}	40,0(36,7-46,0) ^{bb}	<0,01

Svi rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnika sa HBB; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Statističkom obradom podataka, nije uočena razlika u LDL dijametru, kao ni u relativnom udelu LDL I subfrakcija. Takođe, poređenjem relativnih udela LDL IIa i LDL IIB subfrakcija, dobijene su slične vrednosti u svim ispitivanim grupama. Nije bilo statistički značajne razlike ni u relativnom udelu LDL IIIa, subfrakcija, dok je relativna zastupljenost LDL IIIb subfrakcija bila na granici statističke značajnosti. Relativni udeo LDL IVa subfrakcija je bio značajno niži kod bolesnika sa HBB u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,05$), dok nisu pronađene značajne razlike između ostalih ispitivanih grupa. Relativni udeo LDL IVb je pokazao značajno niže vrednosti kod bolesnika sa HBB u odnosu na zdrave ($p < 0,001$) i u odnosu na bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,01$). U skladu sa prethodnim rezultatima udeo sdLDL čestica je bio niži kod bolesnika sa HBB ($p < 0,001$) u odnosu na bolesnike na hemodijalizi ($p < 0,01$) i zdrave ispitanike ($p < 0,01$).

4.2.1. Osnovni demografski podaci i rezultati biohemijskih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom

Nakon ispitivanja relativnih udela LDL subfrakcija, bubrežni bolesnici i zdravi ispitanici su podeljeni prema LDL fenotipu na bolesnike i zdrave kod kojih je prisutan LDL A fenotip odnosno kod kojih dominiraju LDL čestice čiji je dijametar veći od 25,5 nm, kao i na bolesnike i zdrave kod kojih su prevashodno prisutne male guste LDL čestice (LDL B fenotip) čiji je dijametar manji od 25 nm. Rezultati su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Biohemijski parametri kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa			Bubrežni bolesnici		
	LDL A	LDL B	p	LDL A	LDL B	p
	fenotip N=20	fenotip N=20	vrednost	fenotip N=32	fenotip N=8	vrednost
Starost, godine	44,1±9,8	49,2±10,4	0,085	55,2±15,8 ^a	48,1±17,2	0,316
ITM, kg/m ²	23,6±3,0	26,7±4,6	<0,05	24,1±4,4	25,7±3,8	0,447
Glukoza, mmol/L	5,11±0,48	5,30±0,59	0,302	5,62±1,27 ^a	5,03±0,75	0,090
Urea, mmol/L	6,30±1,89	6,21±1,16	0,821	23,3±6,0 ^{aaa}	17,3±4,9 ^{bbb}	<0,05
Kreatinin, μmol/L	82,8±9,4	92,9±15,1	<0,05	594±314 ^{aaa}	852±439 ^{bb}	0,063
Mokraćna kiselina, μmol/L	320±75	388±117	<0,05	480±131 ^{aaa}	497±135 ^b	0,750
Ukupan holesterol, mmol/L	5,13±1,01	5,10±0,71	0,857	4,91±1,45	4,40±1,22	0,319
Trigliceridi, mmol/L [#]	1,12 (0,87-1,32)	1,52 (1,17-1,95)	<0,01	1,54 (1,22-1,84) ^a	1,90 (1,34-2,68)	0,641
HDL-C, mmol/L	1,70±0,34	1,42±0,23	<0,05	0,98±0,28 ^{aaa}	0,69±0,06 ^{bbb}	<0,01
Ukupni proteini, g/L	69,1±4,8	68,2±3,3	0,598	62,7±6,1 ^{aaa}	65,7±3,4	0,215

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke. [#]Podaci su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI). Kontinuirane promenljive su poređene Student-ovim t testom, p vrednost predstavlja statističke razlike između kontrolnih subjekata i između bubrežnih bolesnika prema LDL fenotipu. a- Statistički značajne razlike između kontrolne grupe i bubrežnih bolesnika sa LDL A fenotipom; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike između kontrolne grupe i bubrežnih bolesnika sa LDL B fenotipom; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001.

Statistička obrada podataka je pokazala da su bubrežni bolesnici sa LDL A fenotipom značajno stariji od zdravih ispitanika sa istim fenotipom ($p < 0,05$), dok su ispitanici u ostalim ispitivanim grupama bili ujednačeni u pogledu godina. U kontrolnoj grupi je pronađena razlika u ITM između zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipovima, pri čemu su značajno više vrednosti bile prisutne kod zdravih ispitanika sa LDL B fenotipom ($p < 0,05$). Koncentracija glukoze je bila statistički značajno viša kod bubrežnih bolesnika sa LDL A fenotipom, u poređenju sa zdravim ispitanicima kod kojih je bio prisutan isti fenotip ($p < 0,05$). Nakon poređenja bubrežnih markera: uree, kreatinina i mokraćne kiseline značajno više vrednosti su pronađene kod bolesnika sa LDL A fenotipom u odnosu na zdrave ispitanike sa istim fenotipom ($p < 0,001$). Takođe, više vrednosti uree ($p < 0,001$), kreatinina ($p < 0,01$) i mokraćne kiseline ($p < 0,05$) su utvrđene kod bolesnika sa LDL B fenotipom u poređenju sa kontrolnom grupom koja je imala isti fenotip. Ispitivanjem bubrežnih markera unutar kontrolne grupe, pronađene su značajno više vrednosti kreatinina ($p < 0,05$) i mokraćne kiseline ($p < 0,05$) kod osoba sa LDL B fenotipom u odnosu na zdrave ispitanike sa LDL A fenotipom. Koncentracija triglicerida je bila statistički značajno viša kod bubrežnih bolesnika sa LDL B fenotipom u poređenju sa zdravim ispitanicima koji su imali isti fenotip ($p < 0,01$). Takođe, kod zdravih ispitanika sa LDL B fenotipom je dobijena znatno viša koncentracija triglicerida u poređenju sa zdravim ispitanicima koji su imali LDL A fenotip ($p < 0,01$). S druge strane, poređenjem HDL-h statistički značajno niža koncentracija je pronađena kod bubrežnih bolesnika sa LDL A fenotipom u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$). Takođe i bubrežni bolesnici sa LDL B fenotipom su imali značajno niže vrednosti HDL-h u poređenju sa zdravim ispitanicima koji su imali isti fenotip ($p < 0,001$). Unutar kontrolne grupe ($p < 0,05$), kao i kod bubrežnih bolesnika ($p < 0,01$), niža koncentracija HDL-h je pronađena kod ispitanika sa LDL B fenotipom u odnosu na ispitanike sa LDL A fenotipom. Koncentracije ukupnog holesterola i ukupnih proteina su bile slične u svim ispitivanim grupama.

4.2.2. Spearmanova korelaciona analiza parametara lipidnog statusa, dijametra LDL čestica i relativnih udela LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika

Dalja analiza je uključivala ispitivanje korelacija između osnovnih biohemijskih parametara i distribucije LDL subfrakcija kao i korelaciju sa dijametrom LDL čestica kod bubrežnih bolesnika. U tabeli 8 su prikazane značajne korelacije dobijene statističkom obradom pomenutih parametara. LDL dijametar je pokazao pozitivnu korelaciju sa HDL-h ($p<0,01$) i apoA-I ($p<0,01$). Pronađena je i jaka negativna korelacija između relativnog udela LDL I subfrakcije i koncentracije triglicerida ($p<0,01$), dok je s druge strane relativni udeo LDL I subfrakcije bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h ($p<0,05$). Negativna korelacija je zabeležena između relativnog udela LDL IIIa subfrakcije i koncentracije HDL-h ($p<0,01$), kao i sa koncentracijom apoA-I ($p<0,01$). Slični rezultati su dobijeni i za relativni udeo LDL IIIb subfrakcije koja je takođe bila u negativnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h ($p<0,01$) i apoA-I ($p<0,05$). Relativni udeo sdLDL subfrakcija je pokazao pozitivnu korelaciju sa koncentracijom triglicerida ($p<0,01$), dok je s druge strane postojala negativna korelacija sa koncentracijom HDL-h ($p<0,05$) i apoA-I ($p<0,05$).

Tabela 8. Spearmanova korelaciona analiza osnovnih biohemijskih parametara, dijametra i relativnih udela LDL čestica kod bubrežnih bolesnika

	HDL-h, mmol/L	Trigliceridi, mmol/L	apoA-I, g/L
LDL dijametar, nm	0,502**	-0,218	0,424**
LDL I, %	0,367*	-0,401**	0,290
LDL IIIa, %	-0,413**	0,300	-0,376**
LDL IIIb, %	-0,426**	0,242	-0,355*
sdLDL, %	-0,392*	0,321*	-0,318*

Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

4.3. Distribucija HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

U daljoj analizi ispitivali smo profil HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Veličina i raspodela HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bubrežni bolesnici N=77	p vrednost
HDL dijametar, nm*	10,01 (9,55-11,07)	10,15 (9,10-11,02)	0,690
HDL 2b, %	53,7±9,7	44,5±11,1	<0,01
HDL 2a, %*	18,5 (16,0-21,5)	21,4 (18,0-24,0)	<0,05
HDL 3a, %	11,5±3,22	14,1±4,1	<0,01
HDL 3b, %*	6,2 (3,8-8,3)	7,6 (5,9-10,7)	<0,05
HDL 3c, %*	10,4 (6,0-11,4)	10,4 (6,8-15,2)	0,376
HDL 2, %*	71,9 (68,2-79,2)	66,5 (59,6-74,9)	<0,05
HDL 3, %*	28,2 (20,8-31,8)	33,4 (25,1-40,4)	<0,05
HDL 2/HDL 3*	2,6 (2,1-3,8)	1,9 (1,5-3,0)	<0,05

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu.*Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih koje slede normalnu raspodelu, dok je Mann-Whitney test korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Nakon statističke obrade, nije uočena razlika u HDL dijametru između zdravih ispitanika i bubrežnih bolesnika. Relativni udeo HDL 2b subfrakcija je bio značajno niži kod bubrežnih bolesnika ($p < 0,01$), dok su s druge strane, rezultati statističke obrade pokazali značajno više vrednosti relativnih udela HDL 2a, HDL 3a i HDL 3b kod bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$ redom). Relativni udeo HDL 3c subfrakcija se nije statistički značajno razlikovao između bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. Konačno, kad se sve pogleda zbirno, relativni udeo HDL 2 subfrakcija je bio viši kod kontrolne grupe ($p < 0,05$). Bilo je razlike i u odnosu HDL 2/HDL 3 subfrakcija, pri čemu su više vrednosti zabeležene kod zdravih ispitanika ($p < 0,05$).

Pored inicijalne analize koja je podrazumevala poređenje rezultata bolesnika i zdravih u pogledu zastupljenosti različitih HDL subfrakcija, u sledećem koraku smo ispitivali veličinu HDL čestica i distribuciju HDL subfrakcija kod bolesnika u zavisnosti od stepena oštećenja bubrega i rezultate smo poredili sa zdravim ispitanicima. Rezultati su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10. Veličina i raspodela HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
HDL dijametar, nm*	10,01 (9,55-11,07)	10,72 (9,60-11,15)	9,33 (8,80-10,52) ^{a, bb}	<0,01
HDL 2b, %	54,1±9,7	46,2±9,8 ^a	44,4±11,6 ^{aa}	<0,01
HDL 2a, %*	18,1 (16,1-21,5)	20,3 (17,9-23,6)	22,3 (18,1-24,1)	0,060
HDL 3a, %	11,2±3,2	13,2±2,8	14,3±4,5 ^{aa}	<0,01
HDL 3b,%*	6,2 (3,8-8,3)	7,4 (5,4-9,3)	7,7 (6,6-11,0) ^{aa}	<0,01
HDL 3c, %*	10,4 (6,0-11,4)	13,9 (5,2-16,1)	10,2 (6,8-14,8)	0,612
HDL 2, %*	71,9 (68,2-79,2)	66,4 (59,0-76,7)	67,2 (59,5-74,9) ^a	<0,05
HDL 3,%*	28,2 (20,8-31,8)	34,4 (23,2-40,9)	33,2 (25,1-40,5) ^a	<0,05
HDL 2/HDL 3*	2,6 (2,1-3,8)	1,9 (1,4-3,3)	2,0 (1,5-2,9) ^a	<0,05

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu. *Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje kontinuiranih promenljivih koji slede normalnu raspodelu. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnike sa HBB; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Naime, veličina HDL čestica procenjena na osnovu dijametra je bila statistički značajno veća kod zdravih ispitanika u odnosu na bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,05$). Takođe kod bolesnika na hemodijalizi HDL dijametar je bio značajno niži nego kod bolesnika sa HBB ($p < 0,01$). Poređenjem relativnih udela HDL subfrakcija kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega i zdravih ispitanika, utvrđeno je da je relativni udeo HDL 2b subfrakcije značajno više zastupljene kod zdravih u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,05$) i bolesnike na hemodijalizi ($p < 0,01$), dok nije bilo razlike u relativnom udelu HDL 2a subfrakcija između ispitivanih grupa. Relativni udeo HDL 3c je bio sličan u svim ispitivanim grupama, dok su vrednosti relativnih udela HDL 3a i HDL 3b bile značajno više kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$ i $p < 0,01$, redom). Konačno relativni udeo HDL 2 subfrakcija je bio značajno viši kod zdravih osoba u odnosu na bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,05$). Takođe utvrđena je i razlika u odnosu relativnih udela HDL 2/HDL 3 subfrakcija, pri čemu su statistički značajno niže vrednosti pronađene kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,05$).

4.3.1. Spearmanova korelaciona analiza između parametara lipidnog statusa, dijametra i relativnih udela HDL subfrakcija

U toku dalje analize, primenili smo Spearmanovu korelacionu analiza kako bi ispitali povezanost između parametara lipidnog statusa, dijametra i relativnih udela HDL subfrakcija. U tabeli 11 su prikazane značajne korelacije dobijene statističkom obradom pomenutih parametara.

Tabela 11. Spearmanova korelaciona analiza parametara lipidnog statusa, dijametra i relativnih udela HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika

	Ukupan holesterol, mmol/L	HDL-h, mmol/L	Trigliceridi, mmol/L
HDL dijametar	0,502**	-0,218	0,424**
HDL 2,%	0,367*	-0,401**	0,290

Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Primenom Spearmanove korelacione analize uočena je pozitivna korelacija između HDL dijametra i koncentracije ukupnog holesterola ($p < 0,01$). Takođe HDL dijametar je bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida ($p < 0,01$). Relativan udeo HDL 2 subfrakcija je pozitivno koreliralo sa koncentracijom ukupnog holesterola ($p < 0,05$) dok je sa druge strane bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h ($p < 0,01$).

4.4. Analiza eritrocitnih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Analiza eritrocitnih parametara kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika je prikazana u tabeli 12.

Tabela 12. Eritrocitni parametri kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=40	Bubrežni bolesnici N=40	p vrednost
Hb, g/L	134±9	119±11	<0,001
Hb-h, % total Hb	5,10±1,89	3,23±1,03	<0,001
Met-Hb, % total Hb [#]	3,82 (3,51-4,61)	4,44 (4,22-4,90)	0,102
RBC-Mh, mmol/L	2,30±0,12	2,38±0,12	<0,05

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu. [#]Podaci koji nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI). Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Nakon statističke obrade kod bubrežnih bolesnika su zabeležene statistički značajno niže vrednosti ukupnog hemoglobina ($p < 0,001$), kao i holesterola vezanog za hemoglobin ($p < 0,001$). Vrednosti methemoglobina se nisu razlikovale između ispitivanih grupa, dok je u membrani eritrocita bubrežnih bolesnika bilo prisutno više holesterola u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p < 0,05$).

U daljoj analizi ispitivali smo razlike u eritrocitnim parametrima između zdravih ispitanika i bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Eritrocitni parametri kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=40	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=20	p vrednost
Hb, g/L	134±9	123±8 ^{aaa}	115±11 ^{aaa,b}	<0,001
Hb-h,% ukupnog Hb	5,10±1,89	3,30±1,17 ^{aaa}	3,10±0,89 ^{aaa}	<0,001
Met-Hb, % ukupnog Hb [#]	3,82 (3,51-4,61)	4,20 (3,86-4,97)	4,63 (4,28-5,15)	0,180
RBC-Mh, mmol/L	2,30±0,12	2,33±0,12	2,42±0,11 ^{aa}	<0,01

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu. [#]Podaci koji nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI). ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje kontinuiranih promenljivih koji slede normalnu raspodelu kao i podataka koji su nakon logaritmovanja normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnike sa HBB; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Kao što smo i očekivali, koncentracija hemoglobina je bila značajno niža kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike (p<0,001 i p<0,001, redom). Sem toga, u grupi bolesnika sa HBB izmerena koncentracija hemoglobina je bila statistički značajno viša u odnosu na bolesnika na hemodijalizi (p<0,05). Rezultati poređenja su pokazali da je holesterol vezan za hemoglobin statistički značajno niži kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,001 i p<0,001, redom). Iako je postojao trend ka višim vrednostima Met-Hb kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na zdrave ispitanike. Holesterol iz membrane eritrocita je bio povišen kod bolesnika na hemodijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom (p<0,001).

4.4.1. Eritrocitni parametri kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom

U cilju ispitivanja da li LDL fenotip ima uticaj na eritrocitne parametre, podelili smo kontrolnu grupu i grupu bubrežnih bolesnika na LDL A i LDL B fenotip. Rezultati su prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Eritrocitni parametri kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa			Bubrežni bolesnici		
	LDL A fenotip N=20	LDL B fenotip N=20	p vrednost	LDL A fenotip N=32	LDL B fenotip N=8	p vrednost
Hb, g/L	136±10	133±7	0,481	120±11 ^a	118±11 ^b	0,619
Hb-h, % ukupnog Hb	5,41±1,85	4,82 ±1,95	0,387	3,21±1,04 ^a	3,11±1,07 ^b	0,851
Met-Hb, % ukupnog Hb	2,12±0,81	1,91±0,94	0,192	2,32±0,60	2,40±0,61 ^b	0,501
RBC-MCh, mmol/L	2,33±0,14	2,34±0,10	0,498	2,35±0,12	2,45±0,10 ^b	0,051

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu. Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih. a- Statistički značajne razlike između kontrolne grupe i bubrežnih bolesnika sa LDL A fenotipom; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001, b- Statistički značajne razlike između kontrolne grupe i bubrežnih bolesnika sa LDL B fenotipom; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001.

Analiza rezultata je pokazala da su vrednosti ukupnog hemoglobina značajno više kod zdravih ispitanika sa LDL A fenotipom u odnosu na bubrežne bolesnika koji imaju isti fenotip. Slično, više vrednosti ukupnog hemoglobina su utvrđene u kontrolnoj grupi sa LDL B fenotipom, u odnosu na bolesnike koji su imali LDL B fenotip. Relativni udeo holesterola vezanog za hemoglobin je bio statistički značajno viši kod zdravih ispitanika u odnosu na bolesnike sa LDL A fenotipom. Takođe značajno više vrednosti holesterola vezanog za hemoglobin, pronađene su kod zdravih ispitanika sa LDL B fenotipom u poređenju sa bubrežnim bolesnicima koji imaju LDL B fenotip. S druge strane vrednosti methemoglobina su bile više kod bolesnika sa LDL B fenotipom u poređenju sa kontrolom koja je imala isti fenotip, dok nije bilo razlike između kontrolne grupe i bolesnika sa LDL A fenotipom. Holesterol iz membrane eritrocita je bio povećan kod bubrežnih bolesnika sa LDL B fenotipom, u odnosu na zdrave ispitanike koji su imali isti fenotip, dok s druge strane nije bilo razlike između bolesnika i kontrolne grupe sa LDL A fenotipom.

4.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Rezultati ispitivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika, prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri	Kontrolna grupa N=40	Bubrežni bolesnici N=57	p vrednost
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1119 \pm 106	1264 \pm 120	<0,001
Ukupne SH grupe, mmol/L*	0,607 (0,581-0,640)	0,443 (0,400-0,491)	<0,001
TOS, $\mu\text{mol/L}$ *	4,61 (3,80-5,05)	5,40 (4,58-6,10)	<0,01
TBARS, $\mu\text{mol/L}$	0,453 \pm 0,267	0,621 \pm 0,208	<0,05
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	44,0 \pm 22,5	66,1 \pm 24,6	<0,01
PAB, HKU	72,2 \pm 21,1	85,3 \pm 42,3	0,175

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu.* Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih. Mann-Whitney test je korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Nakon statističke obrade podataka vrednosti TAS su bile značajno više u grupi bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). S druge strane, koncentracija ukupnih SH grupa je bila niža kod bubrežnih bolesnika nego kod zdravih ispitanika. ($p < 0,001$). Kao što je i očekivano svi izmereni parametri oksidativnog stresa kao što su TOS ($p < 0,01$), TBARS ($p < 0,05$) i AOPP ($p < 0,01$) su bili značajno povišeni u grupi bolesnika. Nije bilo razlike u vrednostima PAB između ispitivanih grupa.

U sledećem koraku smo ispitivali da li postoji razlika u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu bubrežnih bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika. Rezultati su predstavljeni u tabeli 16.

Tabela 16. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika

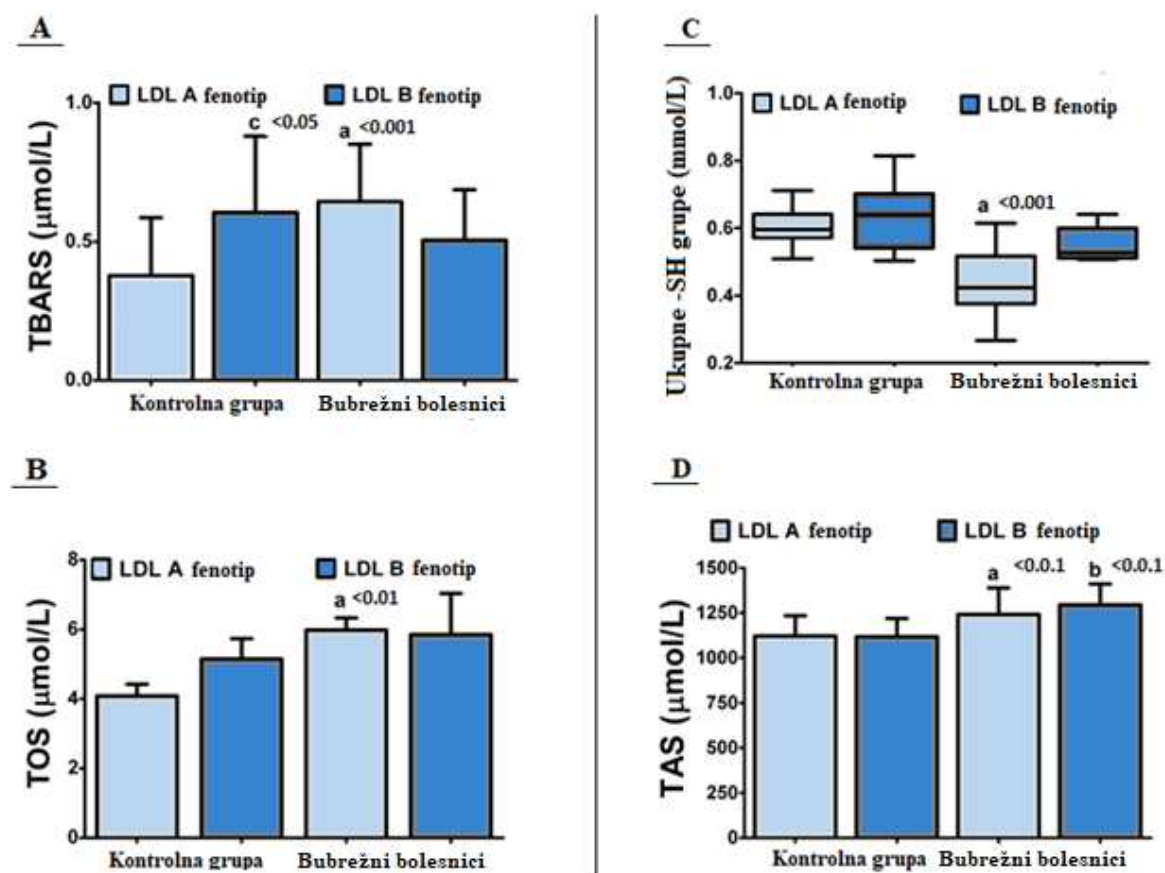
Parametri	Kontrolna grupa N=40	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
TAS, $\mu\text{mol/L}^*$	1112 (1033-1188)	1219 (1112-1390) ^{aa}	1284 (1239-1337) ^{aaa}	<0,01
Ukupne SH grupe, mmol/L*	0,607 (0,581-0,640)	0,413 (0,355-0,509) ^{aaa}	0,351 (0,251-0,471) ^{aaa}	<0,001
TOS, $\mu\text{mol/L}^*$	4,61 (3,80-5,05)	6,10 (4,41-9,62) ^{aa}	5,41 (4,25-6,01) ^a	<0,01
TBARS, $\mu\text{mol/L}$	0,453 \pm 0,267	0,621 \pm 0,195 ^a	0,606 \pm 0,215 ^a	<0,01
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	44,0 \pm 22,1	57,2 \pm 14,2	69,1 \pm 27,1 ^{aa}	<0,01
PAB, HKU	72,2 \pm 21,2	81,3 \pm 39,1	89,1 \pm 39,3	0,421

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu.* Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje kontinuiranih promenljivih koji slede normalnu raspodelu. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnike sa HBB; b-, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

TAS je bio značajno viši kod HBB (p<0,01) i bolesnika na hemodijalizi (p<0,001) u odnosu na kontrolnu grupu, dok je koncentracija ukupnih SH grupa bila snižena kod obe grupe bolesnika (p<0,001). TOS, kao parametar koji služi za procenu ukupnog oksidativnog stresa bio je značajno povišen kod bolesnika sa HBB (p<0,01) i bolesnika na hemodijalizi (p<0,05) u odnosu na zdrave ispitanike. Slično i koncentracija TBARS je bila viša kod obe grupe bolesnika (p<0,05), dok je koncentracija AOPP pokazala značajno više vrednosti kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave (p<0,01). Nivo prooksidativno-antioksidativnog balansa je bio sličan kod obe grupe bolesnika i zdravih ispitanika.

4.5.1. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom

U cilju sveobuhvatnije analize povezanosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa karakteristikama LDL čestica, uporedili smo redoks status ispitanika sa LDL A i LDL B fenotipom



Slika 22. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa različitim LDL (A ili B) fenotipom

a- Statistički značajne razlike između kontrolnih subjekata i bubrežnih bolesnika sa istim fenotipom LDL A.

b- Statistički značajne razlike između kontrolnih subjekata i bubrežnih bolesnika sa istim fenotipom LDL B

c- Statistički značajne razlike između kontrolnih subjekata sa različitim LDL

p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

A- Koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci; **B**- Koncentracija totalnog oksidativnog statusa; **C**-

Koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa; **D**- Koncentracija totalnog antioksidativnog statusa

Nakon poređenja parametara oksidativnog stresa, dobili smo da su i TBARS ($p < 0,001$) i TOS ($p < 0,01$) bili značajno viši kod bolesnika sa LDL A fenotipom u poređenju sa kontrolnom grupom koja je imala isti fenotip (Slika 22 A i 22 B). S druge strane, nije bilo značajne razlike u prosečnom nivou totalnog oksidativnog statusa kod bolesnika i zdravih sa LDL B fenotipom (Slika 22 B). Pored toga, nakon statističke obrade podataka, uočena je značajna razlika u koncentraciji TBARS između zdravih ispitanika sa različitim LDL fenotipom, pri čemu je koncentracija TBARS bila povišena kod kontrolnih subjekata sa LDL B fenotipom ($p < 0,05$) (Slika 22 A). Zdravi ispitanici sa LDL A fenotipom imali su značajno višu koncentraciju ukupnih -SH grupa nego odgovarajuća grupa bolesnika ($p < 0,001$) (Slika 22 C). S druge strane, rezultati pokazuju da bubrežni bolesnici kako sa LDL A ($p < 0,01$), tako i sa LDL B ($p < 0,01$) fenotipom imaju viši nivo TAS od kontrolne grupe sa istim fenotipom (Slika 22 D).

4.5.2. Spearmanova korelaciona analiza parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa parametrima lipidnog statusa i veličinom LDL i HDL čestica kod bubrežnih bolesnika

U toku dalje analize ispitivana je korelacija između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa parametrima lipidnog statusa, veličinom HDL i LDL čestica, kao i korelacija sa relativnim udelom HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika. U tabeli 17 su prikazane značajne korelacije dobijene primenom odgovarajuće statističke analize.

Tabela 17. Spearmanova korelaciona analiza parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa parametrima lipidnog statusa i veličinom LDL i HDL čestica kod bubrežnih bolesnika

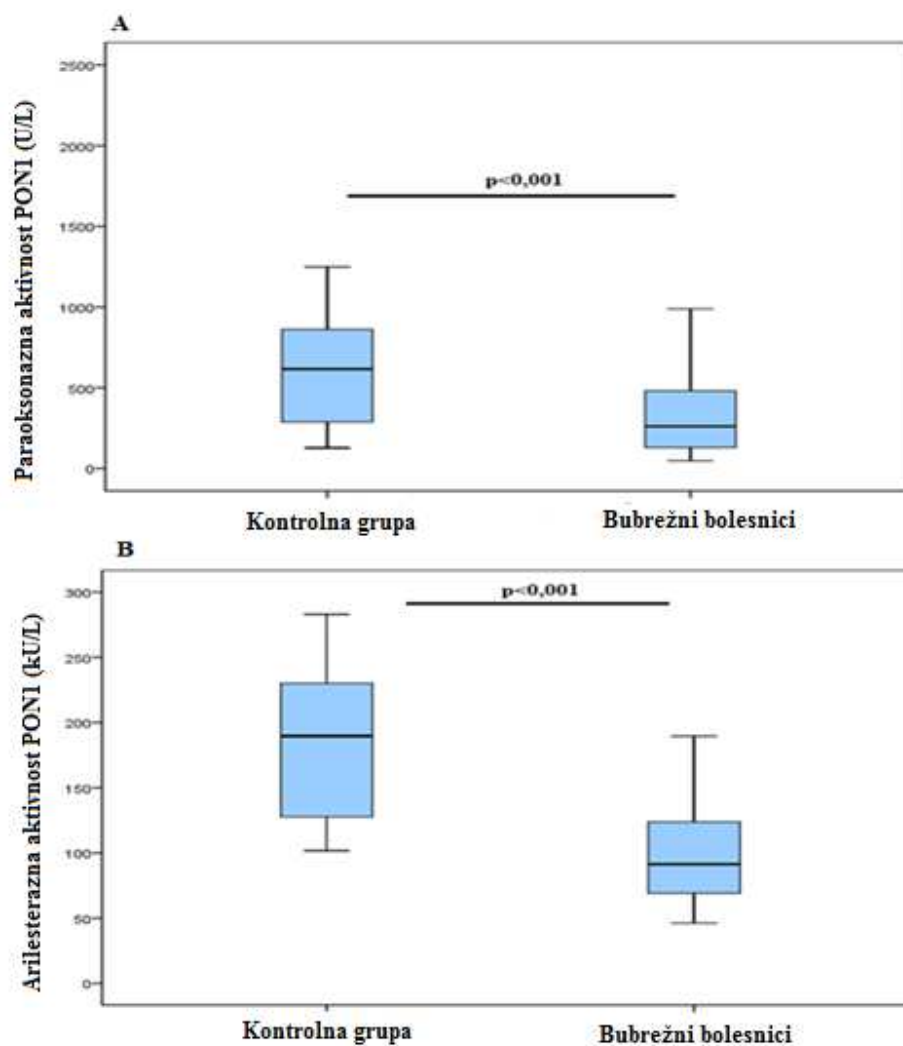
	AOPP, $\mu\text{mol/L}$	Ukupne SH grupe, mmol/L
HDL-h, mmol/L	-0,424**	0,417**
LDL-h, mmol/L	0,449***	0,346**
Trigliceridi, mmol/L	0,172	-0,348**
LDL dijametar, nm	-0,048	-0,436**
HDL dijametar, nm	-0,232	-0,375*
HDL 2, %	-0,366**	0,066
HDL 3, %	0,371**	-0,068

*Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Uznepredovali produkti oksidacije proteina su pokazali negativnu korelaciju sa koncentracijom HDL-h ($p < 0,01$), kao i sa relativnim udelom HDL 2 subfrakcija ($p < 0,01$), dok je s druge strane postojala jaka pozitivna korelacija između koncentracije AOPP i LDL-h ($p < 0,001$) kao i AOPP sa relativnim udelom HDL 3 subfrakcija ($p < 0,01$) kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega. Koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa kao vid antioksidativne zaštite pozitivno korelira sa koncentracijom HDL-h i LDL-h ($p < 0,01$ i $p < 0,01$ redom), dok je s druge strane zabeležena negativna korelacija sa koncentracijom triglicerida ($p < 0,01$), sa LDL i HDL dijametrima ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, redom).

4.6. Određivanje statusa enzima PON1

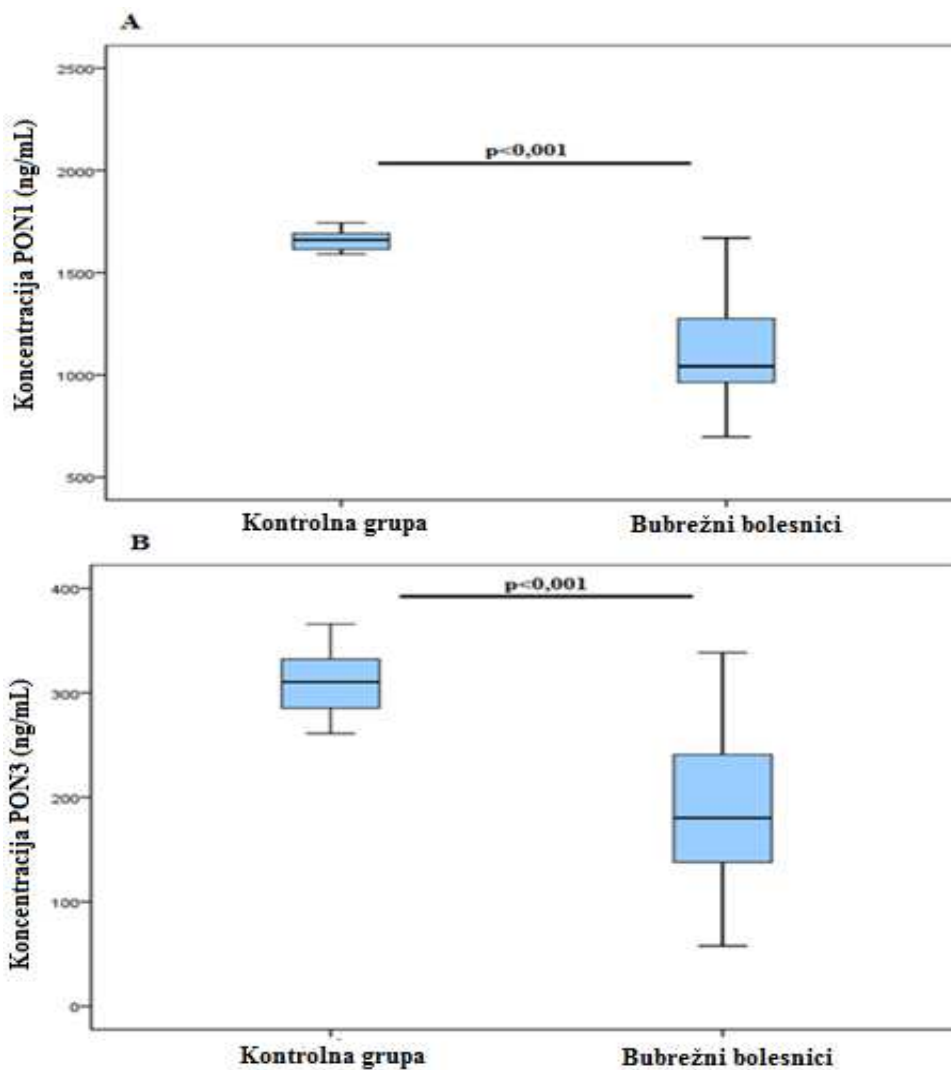
U cilju ispitivanja statusa enzima PON1, izmerena je paraoksonazna i arilesterazna aktivnost enzima prema paraoksonu i fenilacetatu kao supstratima. Rezultati su prikazani na slikama 23A i 23B



Slika 23. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. A- Paraoksonazna aktivnost PON1; B- Arilesterazna aktivnost PON1. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Ispitivanjem aktivnosti enzima paraoksonaze 1, utvrđeno je da su i paraoksonazna ($p < 0,001$) i arilesterazna ($p < 0,001$) aktivnost PON1 statistički značajno niže kod bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike.

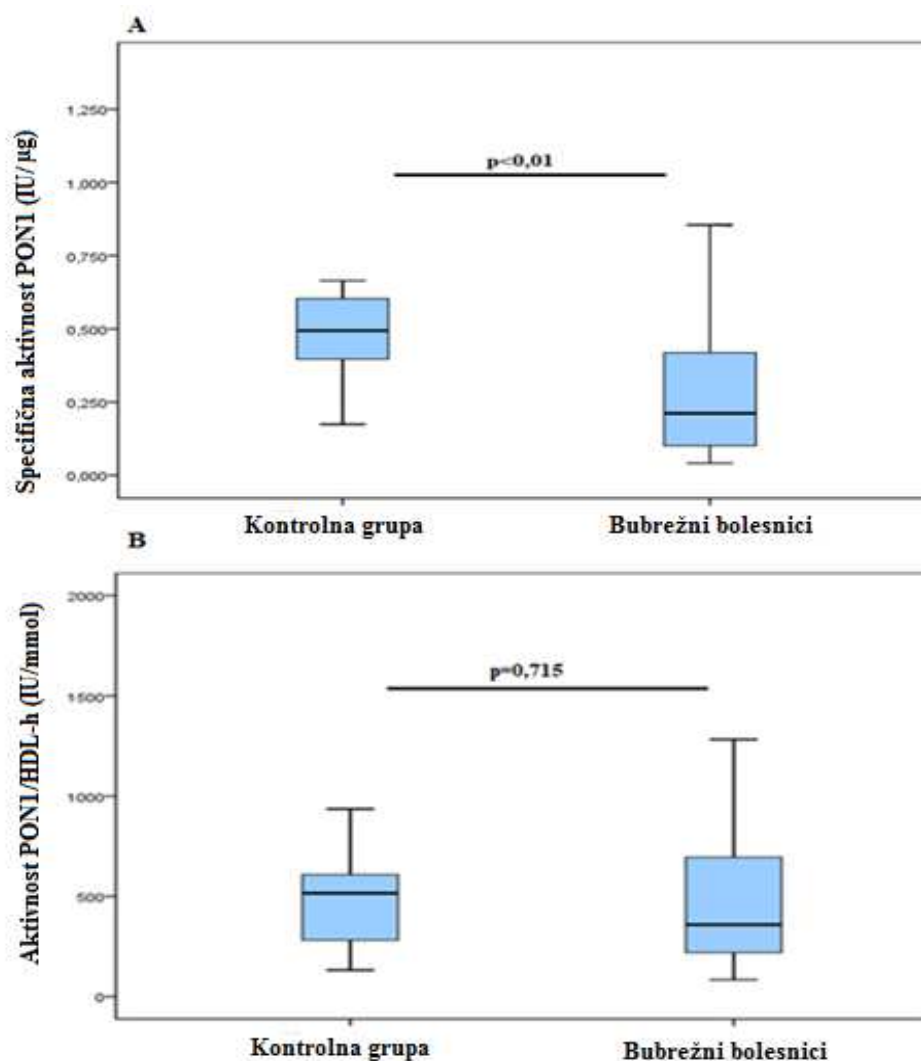
Pored aktivnost, kako bi se stekao potpuni uvid u status enzima, izmerena je koncentracija PON1 i PON3 u serumu bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani na slikama 24A i 24 B.



Slika 24. Masena koncentracija PON1 i PON3 kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. A-Koncentracija PON1; B- Koncentracija PON3. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Pored aktivnosti, i koncentracije enzima PON1 ($p < 0,001$) i PON3 ($p < 0,001$) bile su značajno snižene kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega u poređenju sa kontrolnom grupom.

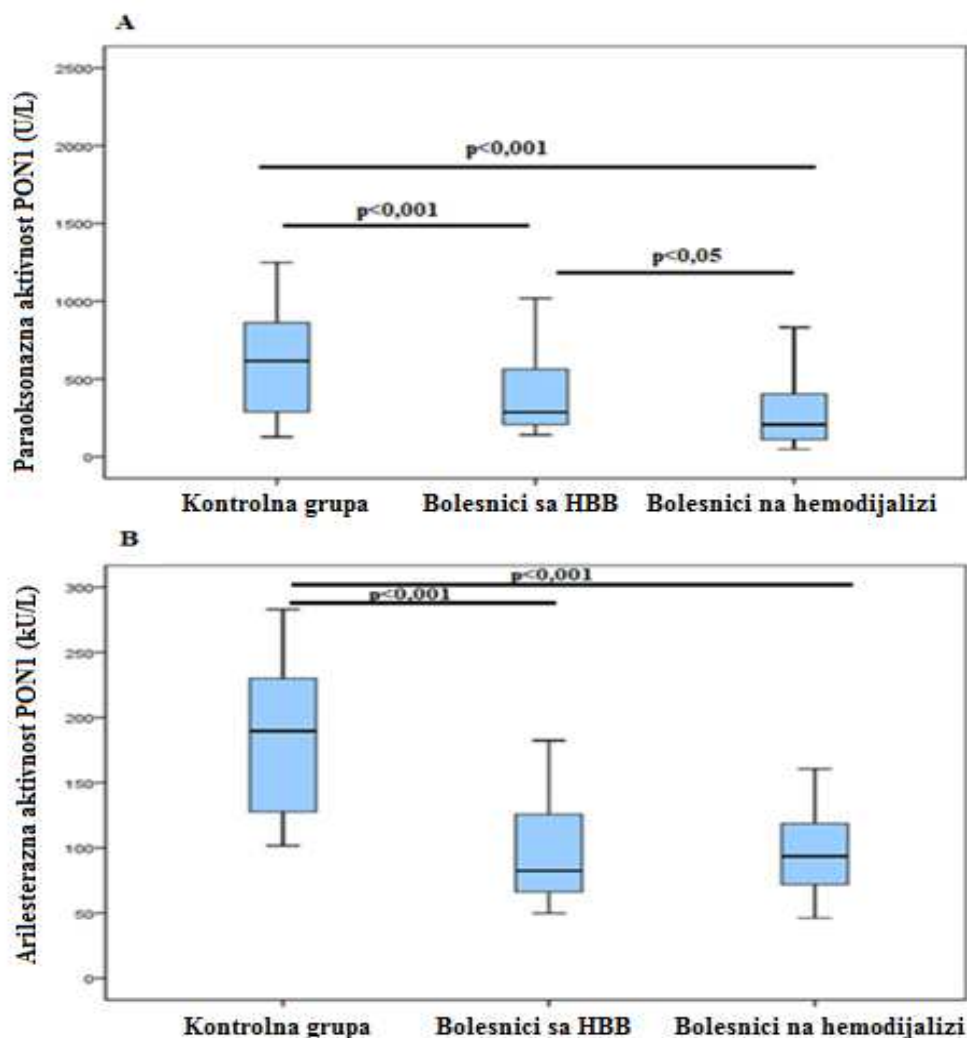
Specifična aktivnost PON1 kao odnos paraoksonazne aktivnosti i koncentracije PON1, zajedno sa odnosom aktivnosti enzima PON1 i koncentracijom HDL-h je izračunata kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani na slikama 25A i 25 B.



Slika 25. Specifična aktivnost PON1 i odnos aktivnosti PON1 i koncentracije HDL-h kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika A-Specifična aktivnost PON1; B- Odnos aktivnosti PON1 i koncentracije HDL holoesterola. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Specifična aktivnost PON1 je bila značajno snižena kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$), dok nije bilo razlike u izračunatom odnosu aktivnosti PON1 i koncentracije HDL holesterola.

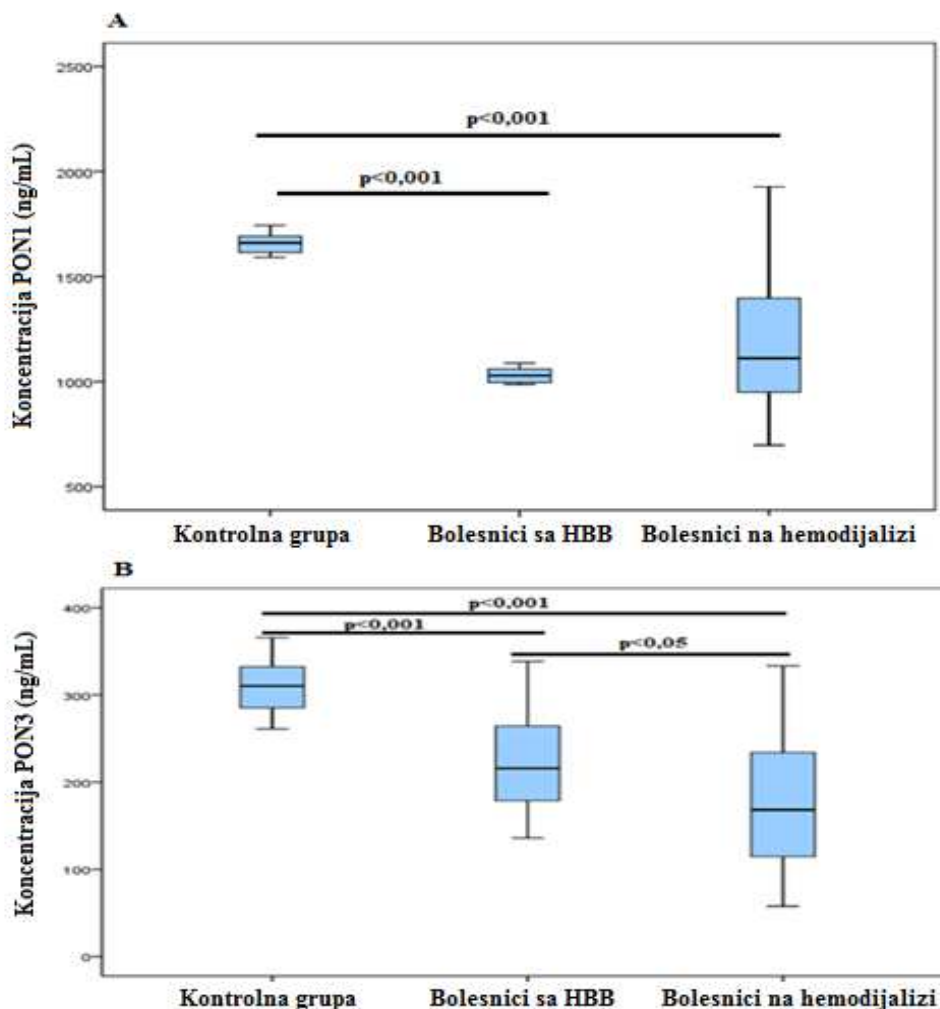
U daljoj analizi ispitivali smo razlike u serumskoj aktivnosti PON1 između zdravih ispitanika i bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega. Rezultati su prikazani na slici 26A i 26B.



Slika 26. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i kod zdravih ispitanika. A-Paraoksonazna aktivnost PON1; B- Arilesterazna aktivnost PON1. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Kao što je i očekivano, statistički značajno niža paraoksonazna aktivnost izmerena je kod bolesnika sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, kod bolesnika koji su na redovnoj terapiji hemodijalizom primećena je značajno niža paraoksonazna aktivnost PON1 u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,05$). Arilesterazna aktivnost PON1 je bila snižena kod obe grupe bolesnika u poređenju sa kontrolnom grupom (kontrolna grupa-bolesnici sa HBB $p < 0,001$; kontrolna grupa –bolesnici na hemodijalizi $p < 0,001$).

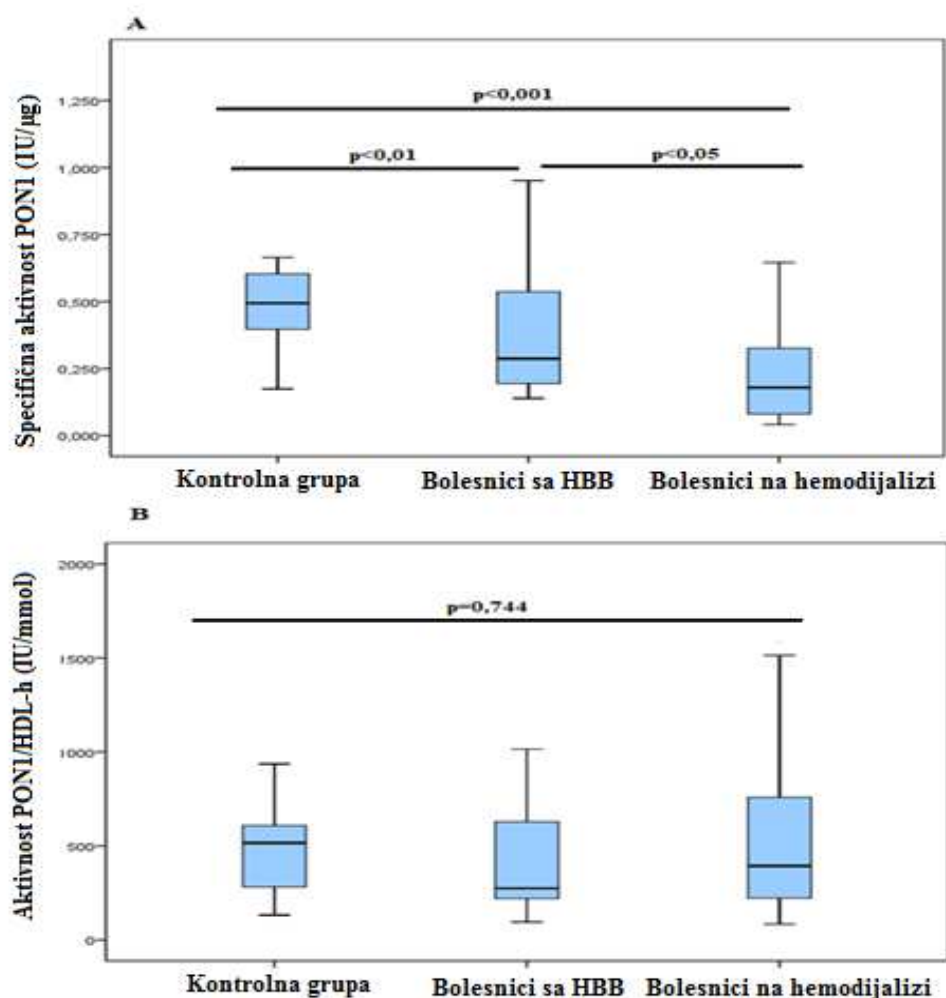
Dalja procena statusa enzima paraoksonaze podrazumevala je merenje masene koncentracije enzima PON1 i PON3 u serumu bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja. Rezultati ispitivanja su prikazani na slici 27 A i 27 B.



Slika 27. Masena koncentracija PON1 i PON3 kod bubrežnih bolesnika, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika. A-Koncentracija PON1; B- Koncentracija PON3. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Poređenjem vrednosti koncentracije enzima utvrđene su značajno niže koncentracije enzima u serumu obe grupe ispitivanih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu (kontrolna grupa-bolesnici sa HBB $p < 0,001$; kontrolna grupa –bolesnici na hemodijalizi $p < 0,001$). Slično, merenjem koncentracije enzima PON3, bolesnici sa HBB i bolesnici na hemodijalizi imali su snižene vrednosti koncentracije PON3 u poređenju sa zdravim ispitanicima. Takođe, kod bolesnika na terapiji hemodijalizom izmerena je značajno niža koncentracija PON3 u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,05$).

Rezultati specifične aktivnosti i odnosa aktivnosti PON1 enzima i koncentracije HDL kod zdravih ispitanika i bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega su prikazani na slikama 28A i 28B.



Slika 28. Specifična aktivnost PON1 i odnos aktivnosti PON1 i koncentracije HDL-h kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika. A-Specifična aktivnost PON1; B- Odnos aktivnosti PON1 i koncentracije HDL holesterola. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Ispitivanje specifične aktivnosti je pokazalo da bolesnici sa HBB i bolesnici na hemodijalizi imaju statistički značajno nižu specifičnu aktivnost PON1 u poređenju sa zdravim ispitanicima. Takođe, ovim poređenjem je utvrđeno da postoji razlika između bolesnika u zavisnosti od stepena oštećenja bubrega, pri čemu su bolesnici na hemodijalizi imali znatno nižu specifičnu aktivnost PON1 u odnosu na bolesnike sa HBB. S druge strane, odnos aktivnosti PON1 i koncentracije HDL-h se nije statistički značajno razlikovao između ispitivanih grupa.

4.6.1. Određivanje arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

U nastavku smo analizirali relativne udele aktivnosti PON1 na pojedinačnim HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama i određivali arilesteraznu aktivnosti enzima PON1 na HDL subfrakcijama kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani u tabeli 18.

Tabela 18. Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bubrežni bolesnici N=77	p vrednost
<i>Relativni udeo PON1:</i>			
PON1 HDL 2b (%)	53,1 (51,0-57,6)	52,2 (47,7-56,3)	0,815
PON 1 HDL 2a (%)	25,5 (23,8-27,9)	21,9 (20,8-23,9)	<0,001
PON 1 HDL 3a (%)	11,1 (9,4-12,3)	11,7 (10,0-13,6)	0,355
PON 1 HDL 3b (%)	4,90 (3,40-6,21)	5,57 (4,80-6,52)	0,312
PON 1 HDL 3c (%)	4,91 (3,11-6,41)	5,89 (4,82-8,10)	<0,05
PON 1 HDL 2 (%)	79,1 (74,9-83,1)	75,7 (71,2-78,7)	<0,01
PON 1 HDL 3 (%)	20,9 (16,8-24,9)	24,3 (21,3-28,8)	<0,01
<i>Aktivnost PON1:</i>			
PON1 HDL 2b U/L	88,1 (68,8-134,8)	46,5 (34,5-64,2)	<0,001
PON 1 HDL 2a U/L	40,5 (31,4-63,2)	19,0 (14,7-27,7)	<0,001
PON 1 HDL 3a U/L	16,9 (13,2-26,7)	11,2 (7,3-14,7)	<0,001
PON 1 HDL 3b U/L	8,31 (5,4-15,9)	5,27 (3,6-6,9)	<0,01
PON 1 HDL 3c U/L	7,52 (5,60-13,21)	5,63 (3,90-9,91)	0,210
PON1 HDL 2 U/L	150 (102-192)	67 (47-95)	<0,001
PON 1 HDL 3 U/L	34,6 (22,9-50,2)	22,6 (15,9-31,1)	<0,001
PON1-HDL 2/PON1-HDL 3	3,78 (2,40-3,81)	3,12 (2,52-3,73)	<0,01

Svi rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Mann-Whitney test je korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Relativni udeo PON1 aktivnosti je bio značajno manje zastupljen na HDL 2 subfrakcijama bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. Preciznije, kod bubrežnih bolesnika, utvrđen je značajno manji udeo aktivnosti enzima PON1 na HDL 2a subfrakciji u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$), dok nije bilo značajne razlike u relativnom udelu PON1 aktivnosti na HDL 2b česticama. S druge strane, posmatranjem HDL 3 subfrakcija, utvrđena je značajno viša relativna aktivnost PON1 kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$). Naime kod bubrežnih bolesnika je relativni udeo aktivnosti PON1 bio viši na najmanjim HDL 3c česticama ($p < 0,05$), dok nije bilo razlike u distribuciji PON1 između bolesnika i zdravih na ostalim HDL subfrakcijama. Daljom analizom, pored relativne distribucije arilesterazne aktivnosti enzima PON1, izračunali smo i tačnu aktivnost u svakoj HDL subfrakciji tako što smo ukupnu arilesteraznu aktivnost u serumu, pomnožili sa relativnom zastupljenošću aktivnosti PON1 na pojedinačnim HDL subfrakcijama. Nakon statističke obrade podataka, ustanovili smo da je arilesterazna aktivnost PON1 i na HDL 2b i HDL 2a značajno snižena kod bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$). Takođe, niža aktivnost enzima PON1 je izmerena na HDL 3a i HDL 3b subfrakcijama kod bubrežnih bolesnika u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$ i $p < 0,01$ redom), dok nije bilo razlike u aktivnosti PON1 na HDL 3c subfrakciji. Izračunata arilesterazna aktivnost PON1 je bila statistički značajno niža kod bubrežnih bolesnika i na HDL 2 i na HDL 3 subfrakcijama ($p < 0,001$), iz čega proizilazi da je i odnos aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama bio smanjen kod bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$).

U cilju ispitivanja postojanja razlike u distribuciji aktivnosti enzima PON1 na pojedinačnim HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega, bolesnici su podeljeni u dve grupe, na bolesnike sa HBB i bolesnike na hemodijalizi i njihove vrednosti su upoređene sa zdravim ispitanicima. Rezultati su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
<i>Relativni udeo PON1</i>				
PON1 HDL 2b (%)	53,1 (51,0-57,6)	52,8 (49,6-59,8)	51,5 (47,1-56,2)	0,127
PON 1 HDL 2a (%)	25,5 (23,8-27,9)	21,0 (18,7-23,9) ^{aaa}	22,4 (21,1-23,8) ^{aa,b}	<0,001
PON 1 HDL 3a (%)	11,1 (9,4-12,3)	10,6 (8,1-12,0)	12,2 (10,5-14,9) ^{aa,bb}	<0,01
PON 1 HDL 3b (%)	4,90 (3,45-6,19)	5,42 (5,20-6,16)	5,73 (4,80-7,11)	0,200
PON 1 HDL 3c (%)	4,91 (3,11-6,41)	5,71 (4,90-12,92) ^a	5,92 (4,71-8,20) ^{aa}	<0,05
PON 1 HDL 2 (%)	79,1 (74,9-83,1)	76,4 (71,0-78,9) ^a	74,9 (71,1-78,7) ^{aa}	<0,01
PON 1 HDL 3 (%)	20,9 (16,8-24,9)	23,5 (21,0-28,9) ^a	25,0 (21,3-28,8) ^{aa}	<0,01
<i>Aktivnost PON1</i>				
PON1 HDL 2b U/L	88,1 (68,8-134,8)	44,3 (34,5-71,6) ^{aaa}	46,6 (33,3-60,7) ^{aaa}	<0,001
PON 1 HDL 2a U/L	40,5 (31,4-63,2)	17,6 (12,9-29,6) ^{aaa}	21,6 (15,1-26,9) ^{aaa}	<0,001
PON 1 HDL 3a U/L	16,9 (13,2-26,7)	7,6 (6,2-14,) ^{aaa}	11,3 (8,2-15,3) ^{aaa}	<0,001
PON 1 HDL 3b U/L	8,31 (5,4-15,9)	5,01 (3,50-7,51) ^{aa}	5,32 (3,63-6,84) ^{aa}	<0,01
PON 1 HDL 3c U/L	7,52 (5,60-13,21)	8,32 (3,12-12,21)	5,50 (3,91-9,53)	0,294
PON1 HDL 2 U/L	150 (102-192)	61 (47-103) ^{aaa}	68 (48-93) ^{aaa}	<0,001
PON 1 HDL 3 U/L	34,6 (22,9-50,2)	27,0 (14,6-32,9) ^a	22,4 (16,7-29,6) ^{aa}	<0,01
PON1-HDL 2/PON1-HDL 3	3,78 (2,40-3,81)	3,25 (2,51-3,82) ^{aa}	2,99 (2,53-3,70) ^{aaa}	<0,001

Svi rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnike sa HBB; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Izmerena aktivnost PON1 na HDL 2a subfrakcijama je bila značajno niža kod bolesnika sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,01$) u odnosu na zdrave ispitanike. Detaljnija statistička analiza je pokazala da postoji i razlika između bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežne bolesti, pri čemu su bolesnici na hemodijalizi imali statistički značajno viši relativni udeo aktivnosti PON1 na HDL 2a subfrakciji u poređenju sa grupom bolesnika sa HBB ($p < 0,05$). S druge strane, posmatranjem HDL 3 subfrakcija, utvrđen je značajno viši relativni udeo PON1 aktivnosti na HDL 3a subfrakcijama kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,01$), ali i bolesnike sa HBB ($p < 0,01$). Takođe, izmeren relativni udeo PON1 aktivnosti na HDL 3c subfrakciji je bio viši kod bolesnika sa HBB ($p < 0,05$) i bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu, dok nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti PON1 na HDL 3b subfrakciji. Ukratko, kod zdravih ispitanika aktivnost PON1 je bila značajno više distribuirana na HDL 2 subfrakcijama (bolesnici sa HBB $p < 0,05$; bolesnici na hemodijalizi $p < 0,01$), dok je u obe grupe bolesnika relativna aktivnost PON1 smeštena prevashodno na malim HDL 3 subfrakcijama (bolesnici sa HBB $p < 0,05$; bolesnici na hemodijalizi $p < 0,01$). Pored relativne distribucije aktivnosti PON1 između različitih HDL subfrakcija, detaljnija analiza je podrazumevala izračunavanje i tačne arilesterazne aktivnosti u svakoj HDL subfrakciji tako što smo ukupnu arilesteraznu aktivnost izmerenu u serumu, pomnožili sa relativnom zastupljenošću PON1 na pojedinačnim HDL subfrakcijama. Na osnovu statističke analize podataka, utvrđeno je da i bolesnici sa HBB i bolesnici na hemodijalizi imaju značajno nižu arilesteraznu aktivnost na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p < 0,001$ i $p < 0,01$, redom). Naime, preciznije određivanje arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2b subfrakcijama ukazuje na smanjenu aktivnost enzima kod obe grupe ispitivanih bolesnika (bolesnici sa HBB $p < 0,001$; bolesnika na hemodijalizi $p < 0,001$). Slično i na HDL 2a, viša arilesterazna aktivnost je izmerena u kontrolnoj grupi u poređenju sa bolesnicima sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnicima na hemodijalizi ($p < 0,001$). Takođe, kod zdravih ispitanika, dobijena je statistički značajno viša aktivnost PON1 na HDL 3a subfrakcijama u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnike na hemodijalizi ($p < 0,001$). Arilesterazna aktivnost PON1 je bila povišena i na HDL 3b kod zdravih ispitanika u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,01$) i bolesnike na hemodijalizi ($p < 0,01$), dok nije bilo značajne razlike na HDL 3c subfrakcijama. Zbirno posmatrano, na HDL 2 subfrakcijama, aktivnost PON1 je bila značajno niža kod obe grupe ispitivanih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$). Slično i HDL

3 subfrakcije su pokazale nižu arilesteraznu aktivnost PON1 i kod bolesnika sa HBB ($p < 0,05$) i kod bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu. U skladu sa svim navedenim i odnos PON1 aktivnosti na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama je bio viši kod zdravih u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,01$) i bolesnike na hemodijalizi ($p < 0,001$).

4.6.2. Određivanje statusa PON1 pre i posle procesa hemodijalize

U daljoj analizi ispitivan je uticaj hemodijalize na parametre lipidnog statusa, distribuciju HDL subfrakcija i status aktivnosti enzima PON1, tako što su vrednosti ovih parametara merene pre i posle hemodijalize. Rezultati su prikazani u tabeli 20.

Tabela 20. Parametri lipidnog statusa, distribucija HDL subfrakcija i status aktivnosti enzima PON1 pre i posle procesa hemodijalize

Parametri	Pre hemodijalize N=26	Posle hemodijalize N=26	p vrednost
Ukupan holesterol, mmol/L	4,60 (4,17-5,32)	4,90 (4,20-5,65)	0,523
Trigliceridi, mmol/L	1,75 (1,36-2,44)	1,60 (1,07-2,95)	0,409
HDL-h,mmol/l	0,54 (0,29-0,59)	0,41(0,30-0,60)	0,220
LDL-h, mmol/L	3,36 (2,84-3,97)	3,95 (2,83-4,26)	0,839
Paraoksonazna aktivnost PON1,U/L	125 (79-295)	133 (90-306)	<0,01
Arilesterazna aktivnost PON1, kU/L	84,1 (74,6-91,2)	74,2 (61,4-81,4)	<0,01
HDL 2b (%)	50,3 (45,3-54,4)	47,4 (37,9-54,0)	0,191
HDL 2a (%)	21,1 (18,7-22,9)	21,2 (18,4-24,1)	0,949
HDL 2 (%)	69,6 (65,7-75,1)	69,6 (61,4-75,2)	0,484
HDL 3a (%)	12,8 (10,4-16,9)	15,0 (11,2-17,2)	0,406
HDL 3b (%)	7,82 (6,11-8,83)	8,20 (5,64-10,43)	0,570
HDL 3c (%)	8,30 (6,71-10,20)	7,62 (5,61-10,21)	0,799
HDL 3 (%)	30,4 (24,9-34,3)	30,3 (24,8-38,6)	0,482
HDL 2/HDL 3	2,29 (1,91-3,02)	2,29 (1,52-3,03)	0,819
PON 1 HDL 2b (%)	52,5 (48,0-55,5)	52,9 (47,7-55,0)	0,947
PON 1 HDL 2a (%)	22,3 (20,4-23,5)	23,1 (20,6-25,5)	<0,05
PON 1 HDL 2 (%)	74,9 (69,2-78,2)	75,6 (70,8-79,1)	0,246
PON 1 HDL 3a (%)	11,9 (10,7-13,8)	11,4 (10,0-13,1)	0,659
PON 1 HDL 3b (%)	6,12 (4,93-8,24)	5,44 (4,99-7,15)	0,090
PON 1 HDL 3c (%)	6,88 (5,27-9,74)	6,93 (5,08-9,14)	0,713
PON 1 HDL 3 (%)	25,1 (21,8-30,8)	24,3 (20,9-29,2)	0,246
PON 1 HDL 2b (U/L)	41,2 (36,0-46,8)	39,1 (30,8-43,1)	<0,01
PON 1 HDL 2a (U/L)	18,2 (14,4-21,7)	16,3 (13,7-19,3)	0,053
PON 1 HDL 2 (U/L)	64,4 (51,5-67,1)	55,2 (43,6-63,1)	<0,01
PON 1 HDL 3a (U/L)	9,41 (8,22-12,67)	8,62 (6,31-11,42)	<0,05
PON 1 HD 3b (U/L)	5,35 (3,66-8,52)	3,97 (3,27-5,52)	<0,01
PON 1 HDL 3c (U/L)	4,90 (4,15-8,22)	4,92 (2,90-6,65)	0,147
PON 1 HDL 3 (U/L)	22,1 (16,8-29,3)	18,2 (13,9-21,9)	<0,01

Svi rezultati su predstavljeni kao medijana i interkvartilni raspon. Wilxonov test je korišćen za poređenje kontinuiranih varijabli pre i posle procesa hemodijalize

Hemodijaliza kao vid terapije za zamenu funkcije bubrega, nije dovela do promena u koncentraciji parametara lipidnog statusa koji su ostali isti kao i pre samog procesa hemodijalize. S druge strane, nakon hemodijalize došlo je do značajnog povećanja paraoksonazne aktivnosti PON1 ($p < 0,01$), dok je arilesterazna aktivnost PON1 bila niža posle hemodijalize ($p < 0,01$). Proces hemodijalize nije uticao na relativne udele HDL subfrakcija, kao ni na relativni udeo PON1 aktivnosti na većini HDL sufrakcija, izuzev na HDL 2a, gde je relativni udeo arilesterazne aktivnosti bio značajno viši posle procesa hemodijalize ($p < 0,05$). S obzirom na to da je ukupna arilesterazna aktivnost u serumu bila niža posle procesa hemodijalize, niža arilesterazna aktivnost PON1 je primećena i na HDL 2b subfrakcijama. Slično, i ukupna arilesterazna aktivnost na HDL 2 subfrakcijama je bila niža posle procesa hemodijalize ($p < 0,01$). Takođe, posle hemodijalize, PON1 arilesterazna aktivnost je bila niža i na HDL 3a ($p < 0,05$) i HDL 3b subfrakcijama ($p < 0,01$), dok nije bilo razlike u aktivnosti na HDL 3c subfrakciji. Ako posmatramo ukupnu arilesteraznu aktivnost na HDL 3 subfrakciji, ona je bila značajno niža posle procesa hemodijalize ($p < 0,01$).

4.6.3. Spearmanova korelaciona analiza parametara koji opisuju status enzima paraoksonaze sa biohemijskim parametrima, parametrima lipidnog statusa, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U tabeli 21 su prikazane značajne korelacije dobijene nakon Spearmanove analize parametara koji opisuju status enzima PON1, osnovnih biohemijskih parametara i parametara redoks statusa u grupi bubrežnih bolesnika.

Tabela 21. Spearmanova korelaciona analiza parametara koji opisuju status enzima paraoksonaze sa biohemijskim parametrima, parametrima lipidnog statusa i parametrima antioksidativne zaštite kod bubrežnih bolesnika

	Kreatinin, μmol/L	HDLh, mmol/L	LDL-h, mmol/L	Ukupne SH grupe, mmol/L
Paraoksonazan aktivnost PON1,U/L	-0,361 **	0,472***	-0,122	0,334*
Arilesterazna aktivnost PON1,kU/L	-0,125	0,440**	0,014	0,412**
PON3,ng/mL	-0,016	0,516***	0,023	0,214
PON1 HDL 2 (%)	-0,213	0,031	-0,378**	-0,067
PON1 HDL 3 (%)	0,213	-0,031	0,378**	0,067
PON1 HDL 2 (U/L)	-0,140	0,404**	-0,044	0,386**
PON1 HDL 3 (U/L)	-0,038	0,379**	0,229	0,315*

Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Paraoksonazna aktivnost PON1 je pokazala negativnu korelaciju sa koncentracijom kreatinina ($p < 0,01$), dok je s druge strane utvrđena pozitivna korelacija sa koncentracijom HDL-h ($p < 0,001$) i ukupnim sulfhidrilnim grupama ($p < 0,05$). Takođe, primećena je i pozitivna korelacija između arilesterazne aktivnosti PON1 i koncentracije HDL-h ($p < 0,001$) i ukupnih SH grupa ($p < 0,01$). Nakon primenjene korelacione analize, pronađena je jaka pozitivna korelacija između koncentracije PON3 i koncentracije HDL-h ($p < 0,001$) u serumu. Pored svega navedenog, relativni udeo PON1 aktivnosti na HDL 2 subfrakcijama je bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom LDL-h ($p < 0,01$), dok je s druge strane arilesterazna aktivnost PON1 na HDL 2 subfrakcijama bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h u serumu ($p < 0,01$) i ukupnim sulfhidrilnim grupama ($p < 0,01$).

4.7. Određivanje oksidativno-stresnog statusa u lipoproteinskim frakcijama

S obzirom na to da je jedan od osnovnih ciljeva ove studije bio da se proceni nivo oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u različitim lipoproteinskim česticama, nakon ultracentrifugiranja u izdvojenim VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama odredili smo AOPP kao parametar oksidativnog stresa i koncentracije PON1 i PON3 kao parametre antioksidativne zaštite. Rezultati su prikazani u tabeli 22.

Tabela 22. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u VLDL LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bubrežni bolesnici N=77	p vrednost
VLDL			
AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina *	0,100 (0,072-0,201)	0,172 (0,076-0,375)	0,215
PON1, ng/mL	242 \pm 80	253 \pm 116	0,845
PON3, ng/mL *	0,849 (0,547-1,27)	0,592 (0,338-1,048)	0,114
LDL			
AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ protein *	0,051 (0,046-0,090)	0,064 (0,053-0,078)	0,798
HDL			
AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina *	0,015 (0,011-0,026)	0,013 (0,011-0,018)	0,225
PON1, ng/mL *	1251 (1006-1528)	680 (377-1074) ^{aaa}	<0,01
PON3, ng/mL	94 \pm 54	76 \pm 42	0,420

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu. *Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon za podatke koji nisu sledili normalnu raspodelu. Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih, dok je Mann-Whitney test korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

U VLDL lipoproteinskim frakcijama nije bilo značajne razlike u koncentraciji AOPP, PON1 i PON3 između bolesnika i zdravih ispitanika. Takođe, vrednosti AOPP u LDL frakciji bile su slične u obe ispitivane grupe. S druge strane, značajno niža koncentracija PON1 izmerena je kod bubrežnih bolesnika u HDL lipoproteinskoj frakciji u odnosu na kontrolnu grupu, dok se vrednosti PON3 i AOPP izmerene na ovoj lipoproteinskoj frakciji nisu razlikovale između bolesnika i zdravih.

Detaljnija analiza je podrazumevala ispitivanje redoks statusa u lipoproteinskim frakcijama bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i poređenje sa zdravim ispitanicima. Koncentracije parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama su prikazani u tabeli 23.

Tabela 23. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

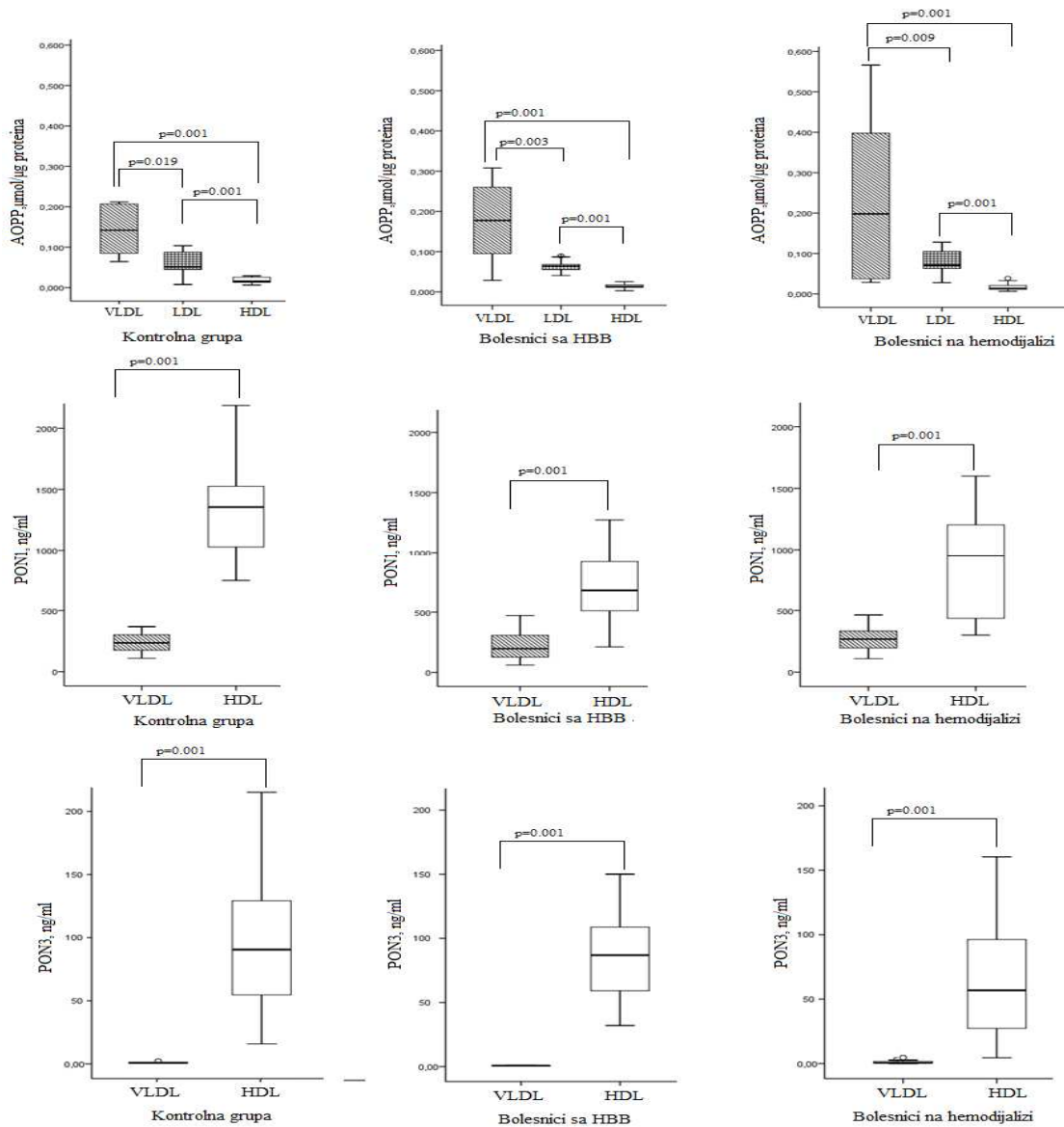
Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
VLDL				
AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina *	0,100 (0,072-0,201)	0,201 (0,114-0,782)	0,154 (0,071-0,397)	0,396
PON1, ng/mL	242 \pm 80	225 \pm 129	277 \pm 102	0,313
PON3, ng/mL *	0,849 (0,547-1,27)	0,653 (0,448-0,878)	0,446 (0,262-1,861)	0,210
LDL				
AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ protein *	0,051 (0,046-0,090)	0,064 (0,551-0,775)	0,063 (0,042-0,093)	0,987
HDL				
AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina *	0,015 (0,011-0,026)	0,013 (0,011-0,018)	0,014 (0,011-0,019)	0,479
PON1, ng/mL *	1251 (1006-1528)	680 (509-948) ^{aaa}	715 (311-1146) ^{aaa,bbb}	<0,001
PON3, ng/mL	94 \pm 54	87 \pm 32	66 \pm 48	0,148

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu.*Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje kontinuiranih promenljivih koji slede normalnu raspodelu. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; aaa-p<0,001. b- Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnike sa HBB; b-, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

U VLDL lipoproteinskoj frakciji ni u jednoj od ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike u koncentraciji AOPP kao parametra oksidativnog stresa, kao ni u koncentracijama PON1 i PON3 koji su oslikavale antioksidativnu zaštitu. Takođe, u LDL lipoproteinskoj frakciji koncentracija AOPP je bila slična kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi kao i kod kontrolne grupe. Unutar HDL lipoproteinske frakcije, koncentracija PON1 je bila statistički značajno veća kod zdravih ispitanika u odnosu na bolesnike sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnike na hemodijalizi ($p < 0,001$). Pored toga, kod bolesnika koji su bili na redovnom tretmanu hemodijalizom koncentracija PON1 je bila viša nego kod bolesnika sa HBB ($p < 0,001$). S druge strane, nije bilo razlike u koncentraciji AOPP i PON3 između ispitivanih grupa.

4.7.1. Poređenje oksidativno-stresnog statusa VLDL, LDL i HDL lipoproteinskih frakcija kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

Rezultati poređenja redoks statusa u različitim lipoproteinskim frakcijama kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi, kao i kod zdravih ispitanika predstavljeni su na slici 29.



Slika 29. Parametri oksidativnog stresa (AOPP) i antioksidativne zaštite (koncentracija PON1 i PON3) kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika.

Gornji red: AOPP u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

Srednji red: PON1 u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

Donji red: PON3 u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

U svim ispitivanim grupama, kod bolesnika sa HBB ($p < 0,01$) bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,01$) i zdravih ispitanika ($p < 0,05$) izmerena koncentracija AOPP u VLDL lipoproteinskim frakcijama je bila viša u odnosu na LDL lipoproteinske frakcije. Takođe, poređenjem VLDL i HDL lipoproteinskih frakcija, zabeležena je povišena koncentracija AOPP na VLDL česticama u svim analiziranim grupama ($p < 0,001$). Pored toga i LDL lipoproteinske frakcije su imale značajno veću koncentraciju AOPP u odnosu na HDL u svim ispitivanim grupama ($p < 0,001$). Pošto se paraoksonaza 1 ne nalazi na LDL lipoproteinskim frakcijama, poredili smo koncentraciju PON1 i PON3 između VLDL i HDL frakcija kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi kao i kod zdravih ispitanika. Kao što je i očekivano, u svim posmatranim grupama, koncentracija PON1 je bila veća na HDL lipoproteinskoj frakciji na kojoj je ovaj enzim inače i smešten u cirkulaciji u poređenju sa VLDL frakcijama ($p < 0,001$). Slično i koncentracija PON3 je bila značajno viša na HDL lipoproteinskoj frakciji u odnosu na VLDL ($p < 0,001$) u obe grupe bubrežnih bolesnika i kod zdravih ispitanika.

4.7.2. Spearmanova korelaciona analiza oksidativno-stresnog statusa u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama sa parametrima redoks statusa u serumu i relativnim udelom HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika

Spearmanova korelaciona analiza je obuhvatila ispitivanje korelacije između oksidativno-stresnog statusa u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama sa parametrima redoks statusa u serumu i relativnim udelom HDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika. Rezultati su prikazani u tabeli 41.

Tabela 24. Spearmanova korelaciona analiza parametara koji opisuju redoks status u VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama sa parametrima redoks statusa i distribucijom HDL subfrakcija u serumu bubrežnih bolesnika

	Ukupne SH grupe, mmol/L	HDL 2 (%)	HDL 3 (%)
VLDL AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina	0,260	-0,027	0,027
VLDL PON1, ng/mL	-0,464**	-0,294	0,294
VLDL PON3, ng/mL	-0,055	-0,031	0,031
LDL AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina	0,151	0,494*	-0,494*
HDL AOPP, $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteina	0,043	-0,483**	0,483**

Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nakon statističke analize dobijenih podataka utvrđena je jaka negativna korelacija između koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa u serumu i koncentracije PON1 na VLDL lipoproteinskoj frakciji ($p < 0,01$). Takođe, u daljem istraživanju kao značajna, izdvojila se povezanost između relativne zastupljenosti HDL subfrakcija i redoks statusa u izdvojenim VLDL, LDL i HDL lipoproteinskim frakcijama. Naime, koncentracija AOPP na LDL lipoproteinskoj frakciji je bila u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 3 subfrakcija ($p < 0,05$) kod bubrežnih bolesnika, dok je s druge strane koncentracija AOPP na HDL lipoproteinskoj frakciji pozitivno korelirala sa relativnim udelom HDL 3 subfrakcija ($p < 0,01$).

4.8. Koncentracije pentraksina-3, galektina-3, matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i inhibitora matriks metaloproteinaze-1 (TIMP-1) kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

U cilju ispitivanja markera inflamacije, kao i parametara koji se odnose na remodelovanje ECM, izmerena je koncentracija pentraksina-3, MMP-9, TIMP-1 i galektina-3. Rezultati su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25. Koncentracija pentraksina-3, galektina-3, matriks-metaloproteinaze-9 (MMP-9) i tkivnog inhibitora matriks-metaloproteinaze-1(TIMP-1) kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bubrežni bolesnici N=40	p vrednost
Pentraksin-3,ng/mL [#]	0,390 (0,218-0,727)	1,52 (1,52-2,57)	<0,01
Galektin-3, ng/mL*	2,41 (2,06-3,99)	1,64 (0,74-2,55)	<0,05
MMP-9, ng/mL [#]	141 (94-211)	312 (303-456)	<0,01
TIMP-1, ng/mL [#]	138 (115-166)	469 (442-609)	<0,001

[#]Podaci koji nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI).

*Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Student-ov t test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih koje slede normalnu raspodelu nakon logaritmovanja, dok je Mann-Whitney test korišćen za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Kao što je i očekivano, koncentracija inflamatornog markera- pentraksina-3 je bila statistički značajno viša kod bubrežnih bolesnika u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p < 0,01$). S druge strane galektin-3 je bio značajno viši u kontrolnoj grupi nego kod bubrežnih bolesnika ($p < 0,05$), dok su koncentracije MMP-9 ($p < 0,01$) i TIMP-1 ($p < 0,001$) bile značajno više kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega u odnosu na zdrave ispitanike.

Inicijalna analiza je zatim ponovljena uzimajući u obzir stepen oštećenja bubrežne funkcije. Rezultati su prikazani u tabeli 26.

Tabela 26. Koncentracija pentraksina-3, galektina-3, matriks-metaloproteinaze-9 (MMP-9) i tkivnog inhibitora matriks-metaloproteinaza-1 (TIMP-1) kod bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika

Parametri, jedinice	Kontrolna grupa N=20	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=20	p vrednost
Pentraksin-3, ng/mL [#]	0,390 (0,218-0,727)	1,31 (0,88-1,96) ^{aa}	1,77 (1,14-2,74) ^{aaa}	<0,001
Galektin-3, ng/mL*	2,41 (2,06-3,99)	2,24 (1,67-2,89)	0,820 (0,512-1,602) ^{aaa, bb}	<0,001
MMP-9, ng/mL [#]	141 (94-211)	376 (275-515)	304 (236-392) ^{aa}	<0,01
TIMP-1, ng/mL [#]	138 (115-166)	515 (398-665) ^{aaa}	484 (416-563) ^{aaa}	<0,001

[#]Podaci koji nakon logaritmovanja slede normalnu raspodelu su prikazani kao geometrijske sredine (95% CI).

*Podaci koji ne slede normalnu raspodelu su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje podataka koji su nakon logaritmovanja normalno distribuirani. Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test su korišćeni za poređenje podataka koji nisu normalno distribuirani. a-Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu; a-p<0,05, aa-p<0,01, aaa-p<0,001. b-Statistički značajne razlike u odnosu na bolesnika sa HBB; b-p<0,05, bb-p<0,01, bbb-p<0,001. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Poređenjem vrednosti, utvrdili smo da bolesnici sa HBB i bolesnici na hemodijalizi imaju značajno višu koncentraciju pentraksina-3 u odnosu na zdrave ispitanike (redom p<0,01 i p<0,001), dok se vrednosti pentaksina-3 u izmwđu različitih grupa bolesnika nisu značajno razlikovale. Bolesnici na hemodijalizi su imali statistički značajno niže vrednosti galektina-3 u odnosu na bolesnike sa HBB i kontrolnu grupu (redom p<0,01 i p<0,001). S druge strane, koncentracija MMP-9 je bila statistički značajno više kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike (p<0,01), dok je vrednost TIMP-1 bila povišena i kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike (p<0,001).

4.8.1. Analiza ROC krivih u identifikovanju bubrežnih bolesnika sa visokim rizikom za razvoj KVB

U sledećem koraku smo bolesnike razvrstali na osnovu preračunatog FRS na bolesnike sa visokim i umerenim rizikom za KVB, a potom smo koristeći binarnu logističku regresionu analizu, ispitivali prediktivne sposobnosti pojedinačnih parametara (pentraksina-3, galektina-3, MMP-9, TIMP-1, jačine glomerularne filtracije) kao i kombinacije više različitih parametara za rizik za KVB. S obzirom na to da se pojedinačni parametri nisu pokazali kao zadovoljavajući prediktori visokog rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti kod bubrežnih bolesnika, napravljeni su odgovarajući modeli:

Model 1 je obuhvatio pentraksin-3, galektin-3, MMP-9. Model 2 je sadržao pentraksin-3, galektin-3, JGF, a Model 3 - pentraksin-3, galektin-3, MMP-9, JGF. Kako bi proverili dijagnostičku tačnost upotrebe kombinacija ovih parametara primenjena je ROC analiza, a površina ispod krivih je bila mera tačnosti ispitivanih parametara u identifikovanju bubrežnih bolesnika sa povećanim rizikom za razvoj KVB. Prema pravilima Hosmer-a i Lemeshow-a (168) sposobnost kreiranih modela u razdvajanju bubrežnih bolesnika sa različitim stepenom rizika za KVB definisan je na osnovu AUC kao slab ($0,5 \leq AUC < 0,7$), prihvatljiv ($0,7 \leq AUC < 0,8$), odličan ($0,8 \leq AUC < 0,9$) i izvanredan ($AUC \geq 0,9$). Rezultati analize ROC krivih dati su u tabeli 27.

Tabela 27. Analiza ROC krivih u identifikovanju bubrežnih bolesnika sa visokim rizikom za razvoj KVB

	AUC	95% CI	Standardna greška	p ^a
Model 1	0,700*	0,505-0,855	0,102	
Model 2	0,732*	0,536-0,878	0,094	
Model 3	0,716*	0,519-0,867	0,096	0,453

Nivoi ispitivanih parametara: pentraksina-3, galektina-3, MMP-9 i JGF su predstavljeni kao kontinuirane varijable.

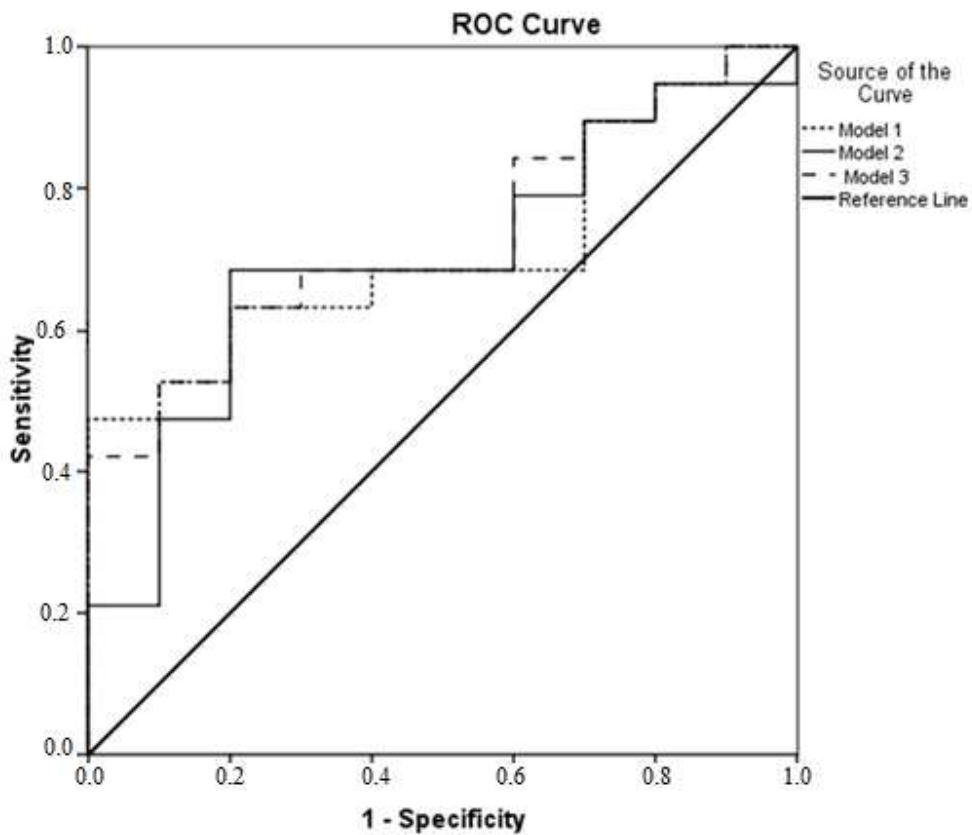
Model 1 - pentraksin-3, galektin-3, MMP-9;

Model 2 - pentraksin-3, galektin-3, JGF i

Model 3 - pentraksin-3, galektin-3, MMP-9, JGF

^aP vrednost za razliku između AUC Model 1, Model 2 i Model 3

Rezultati poređenja ROC krivih za sve pomenute modele su prikazani na slici 30.



Slika 30. Poređenje ROC kriva Model 1 - pentraksin-3, galektin-3, MMP-9; Model 2 - pentraksin-3, galektin-3, glomerularna filtracija i Model 3 - pentraksin-3, galektin-3, MMP-9, glomerularna filtracija.

Prema pravilima Hosmer-a i Lemeshow-a (168), sva tri modela su pokazala zadovoljavajuću sposobnost u razdvajanju bubrežnih bolesnika sa povećanim rizikom za razvoj KVB, s tim da je površina ispod krive (AUC) bila najveća kod Modela 2. Međutim poređenjem ROC krivih, ovaj model se nije statistički značajno razlikovao od Modela 1 i Modela 3.

4.8.2. Spearmanova korelaciona analiza galektina-3, pentraksina-3 i MMP-9 sa parametrima lipidnog statusa, parametrima koji opisuju status enzima PON1 i LDL dijametrom kod bubrežnih bolesnika

Nakon statističke obrade podataka, galektin-3, pentraksin-3 i MMP-9 su pokazali značajnu povezanost sa pojedinim biohemijskim parametrima i parametrima koji opisuju status enzima PON1. Rezultati su prikazani u tabeli 28.

Tabela 28. Spearmanova korelaciona analiza galektina-3, pentraksina-3 i MMP-9 sa parametrima lipidnog statusa, parametrima koji opisuju status enzima PON1 i LDL dijametrom kod bubrežnih bolesnika

	Galektin-3, ng/mL	Pentraksin-3, ng/mL	MMP-9, ng/mL
Ukupan holesterol,mmol/L	0,481**	-0,016	0,319*
LDL-h,mmol/L	0,363**	0,082	0,341*
apoA-I,g/L	0,493**	-0,274	0,320*
LDL dijametar,nm	0,401**	0,241	0,325*
PON1,ng/mL	0,362*	-0,384*	0,218

Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Galektin-3 je bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnog holesterola i apoA-I, kao i sa koncentracijom LDL-h i dijametrom LDL čestica. Takođe, pronađena je pozitivna korelacija između galektina-3 i koncentracije PON1 ($p < 0,05$). S druge strane koncentracija pentraksina-3 je pokazala negativnu korelaciju sa koncentracijom PON1 ($p < 0,05$). Slično galektinu-3, vrednosti MMP-9 su pokazale pozitivnu korelaciju sa koncentracijom ukupnog holesterola i apoA-I, kao i sa koncentracijom LDL-h i dijametrom LDL čestica.

4.9. Izračunavanje zbirnog skora dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije

Uzimajući u obzir prethodne rezultate koji ukazuju da kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega postoje brojne promene u parametrima lipidnog statusa, redoks statusu, kao i u stepenu inflamacije u daljoj analizi smo ispitivali zbirni efekat više različitih faktora rizika preračunavanjem najpre pojedinačnih skorova kao što su skor dislipidemije, oksidativno-stresni skor i inflamatorni skor, a potom i zbirnog DOI skora. Rezultati poređenja izračunatih skorova kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika prikazani su u tabeli 29.

Tabela 29. Lipidni skor, oksidativno-stresni skor, inflamatorni i DOI skor kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika

Parametri	Kontrolna grupa N=20	Bubrežni bolesnici N=77	p vrednost
Skor dislipidemije	-0,580 (-1,380-0,220)	2,18 (1,54-2,82)	<0,001
Oksidativno-stresni skor	-0,435 (-1,203-0,333)	1,74 (1,29-2,19)	<0,001
Inflamatorni skor	0,478 (0,139-0,816)	1,35 (1,07-1,63)	<0,001
DOI skor	-0,537 (-1,921-0,845)	5,27 (4,31-6,23)	<0,001

Svi rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina (95%CI) izvedeni iz log-normalnih vrednosti. Studentov t-test je korišćen za poređenje podataka. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Nakon statističke analize podataka uočeno je da su vrednosti skora dislipidemije ($p<0,001$), oksidativno-stresnog skora ($p<0,001$), inflamatornog ($p<0,001$) i zbirnog DOI skora ($p<0,001$) bile značajno povišene kod bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike.

Dodatna ispitivanja su obuhvatala preračunavanje skorova kod bolesnika koji su imali različiti stepen bubrežnog oštećenja u cilju provere da li postoji razlika između bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi, kao i između bolesnika i zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani u tabeli 30.

Tabela 30. Lipidni skor, oksidativno-stresni skor, inflamatorni i DOI skor kod bolesnika sa HBB, bolesnika na hemodijalizi i zdravih ispitanika

Parametri	Kontrolna grupa N=20	Bolesnici sa HBB N=20	Bolesnici na hemodijalizi N=57	p vrednost
Skor dislipidemije	-0,580 (-1,381-0,220)	1,52 (0,89-2,18) ^{aaa}	2,58 (1,64-3,55) ^{aaa}	<0,001
Oksidativno-stresni skor	-0,435 (-1,203-0,333)	1,95 (1,39-2,51) ^{aa}	1,61 (0,94-2,28) ^{aa}	<0,01
Inflamatorni skor	0,478 (0,139-0,816)	1,06 (0,66-1,45) ^{aaa}	1,53 (1,14-1,91) ^{aaa}	<0,001
DOI skor	-0,537 (-1,921-0,846)	4,53 (3,51-5,56) ^{aaa}	5,73 (4,26-7,21) ^{aaa}	<0,001

Svi rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina (95%CI) izvedeni iz log-normalnih vrednosti. ANOVA-a sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom su korišćeni za poređenje kontinuiranih promenljivih koji slede normalnu raspodelu. p vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da su vrednosti skora dislipidemije, značajno niže u kontrolnoj grupi nego kod bolesnika sa HBB ($p < 0,001$) i bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,001$). Kao što smo i očekivali, izračunati oksidativno-stresni skor je bio značajno viši kod bolesnika na hemodijalizi ($p < 0,01$) i bolesnici sa HBB ($p < 0,01$) u poređenju sa zdravim ispitanicima. Slično, inflamatorni skor je pokazao povišene vrednosti kod obe grupe ispitivanih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu (bolesnici sa HBB $p < 0,001$; bolesnici na hemodijalizi $p < 0,001$). Iz svega navedenog proizilazi da su i vrednosti DOI skora, značajno bile povišene kod bolesnika na hemodijalizi i bolesnika sa HBB u odnosu na kontrolnu grupu, dok razlike između bolesnika nisu uočene ni u jednom izračunatom skoru

Kako bi ispitali diskriminacionu sposobnost svakog pojedinačnog skora (skor dislipidemije, oksidativno-stresni skor, inflamatorni skor) i zbirnog DOI skora za razdvajanje bubrežnih bolesnika od zdravih ispitanika koristili smo analizu ROC krivih, tačnije poredili smo površine ispod ROC krivih (AUC) za svaki skor posebno. Rezultati su ilustrovani u tabeli 31.

Tabela 31. Površina ispod krive i analiza ROC krivih za lipidni skor, oksidativno-stresni skor, inflamatorni skor i DOI skor u cilju razdvajanja bubrežnih bolesnika od zdravih ispitanika.

	AUC	(95% CI)	P vrednost
Skor dislipidemije	0,92	(0,85-0,99)	<0,01
Oksidativno-stresni skor	0,82	(0,70-0,94)	<0,01
Inflamatorni skor	0,81	(0,67-0,95)	<0,01
DOI skor	0,92	(0,82-1,00)	<0,001

Izračunate površine ispod ROC krivih su pokazale da skor dislipidemije, oksidativno-stresni skor i inflamatorni skor imaju odličnu sposobnost da razlikuju bolesnike sa bubrežnom bolešću od zdravih osoba, dok su skor dislipidemije i DOI skor kao zbir svih pomenutih skorova, pokazao izvanrednu sposobnost u razdvajanju bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega od zdravih ispitanika.

4.9.1. Spearmanova korelaciona analiza skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora, inflamatornog skora i zbirnog DOI skora sa ostalim ispitivanim parametrima kod bubrežnih bolesnika

Spearmanova korelaciona analiza je primenjena za ispitivanje korelacija koje postoje između skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora, inflamatornog skora i zbirnog DOI skora sa ostalim ispitivanim parametrima kod bubrežnih bolesnika. Važno je napomenuti da su rađene samo korelacije za parameter koji nisu ušli u proračun za pomenute skorove. Rezultati su prikazani u tabeli 32.

Tabela 32. Spearmanov-a korelaciona analiza skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora, inflamatornog skora i zbirnog DOI skora sa parametrima redoks statusa, parametrima koji opisuju status enzima PON1 i LDL dijametrom kod bubrežnih bolesnika.

	Skor dislipidemije	Oksidativno-stresni skor	Inflamatorni Skor	DOI skor
TBRAS, μ mol/L	-0,097	0,444*	0,109	0,151
PAB,HKU	0,152	0,435*	0,184	0,375
PON1,ng/mL	-0,334	-0,041	0,525**	-0,473*
PON1 HDL 2 (%)	-0,059	0,413*	0,401*	0,213
PON1 HDL 3 (%)	0,059	-0,413*	-0,401*	-0,213
LDL dijametar,nm	-0,108	0,454*	0,116	0,129
PON3-VLDL,ng/mL	-0,613**	0,204	-0,213	-0,594*
AOPP-LDL, μ mol/ μ g proteina	-0,068	0,425*	-0,158	0,510**

Prikazani su Spearman-ovi koeficijenti korelacije; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Značajne korelacije pronađene su između pojedinačnih skorova i zbirnog DOI skora sa parametrima redoks statusa u krvi i lipoproteinskim frakcijama, parametrima koji opisuju status enzima PON1 i LDL dijametrom. Oksidativno-stresni skor je bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom TBARS ($p < 0,05$), prooksidativno-antioksidativnim balansom ($p < 0,05$), kao i sa LDL dijametrom ($p < 0,05$). Takođe i inflamatorni i oksidativno-stresni skor su pokazali negativnu korelaciju sa izmerenom aktivnošću PON1 na HDL 3 subfrakcijama ($p < 0,05$). Pored toga inflamatorni skor je pokazao i pozitivnu korelaciju sa koncentracijom PON1 ($p < 0,01$) i sa aktivnošću PON1 na HDL 2 subfrakcijama ($p < 0,05$), dok je s druge strane zbirni DOI skor bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom PON1 ($p < 0,05$). Takođe pronađena je negativna korelacija između koncentracije PON3 na VLDL frakciji i skora dislipidemije ($p < 0,01$) i DOI skora ($p < 0,05$). S druge strane koncentracija AOPP u LDL frakciji je bila u pozitivnoj korelaciji sa oksidativno-stresnim skorom ($p < 0,05$) i DOI skorom ($p < 0,01$).

5. Diskusija

Rezultati velikog broja studija su potvrdili da različiti tradicionalni i netradicionalni faktori rizika dovode do razvoja KVB kod bolesnika sa HBB. Takođe, brojne epidemiološke studije su pokazale da upravo kardiovaskularne bolesti predstavljaju glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod ovih bolesnika (26). Ova studija je imala za cilj detaljno ispitivanje dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije, kao dominantnih faktora rizika za razvoj KBV kod bolesnika sa HBB, ispitivanje njihove međusobne povezanosti kao i uticaja koji ostvaruju na sastav i funkciju lipoproteina i ekstracelularnog matriksa.

Progresivni gubitak bubrežne funkcije udružen je sa značajnim promenama u metabolizmu lipida i lipoproteina, pa je tako kod ovih bolesnika prisutna povećana koncentracija triglicerida i VLDL-h, snižena koncentracija HDL-h, dok se koncentracije ukupnog holesterola i LDL-h nalaze u okviru preporučenih vrednosti. Pretpostavlja se da hipertrigliceridemija kod bolesnika sa HBB nastaje kao posledica povećanog stvaranja i smanjenog katabolizma lipoproteinskih čestica koje su bogate trigliceridima. Kod bolesnika na hemodijalizi promena u koncentraciji triglicerida se pripisuje i primeni niskomolekularnog heparina koji takođe može uticati na aktivnost lipoproteinske lipaze (46). Naime u ovom istraživanju vrednosti triglicerida (Tabele 4 i 5) su pokazivale trend ka višim koncentracijama u obe grupe bubrežnih bolesnika, međutim ipak nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na zdrave ispitanike. S druge strane koncentracija HDL-h je bila značajno niža u obe ispitivane grupe u odnosu na kontrolnu grupu (Tabele 4 i 5). Razloge za ovakav rezultat treba tražiti u činjenici da poremećaj bubrežne funkcije utiče na sintezu i katabolizam HDL čestica (169). Naime rezultati ovog istraživanja su pokazali da je niska koncentracija HDL-h praćena sniženom koncentracijom apoA-I (Tabele 4 i 5). Snižena koncentracija apoA-I kod obe grupe bolesnika, nastaje najverovatnije kao posledica povećane razgradnje i/ili povećanog gubitka ovog apolipoproteina putem bubrega (170). Takođe, narušavanje integriteta glomerularne membrane kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega, dovodi do pojačanog katabolizma i gubitka i HDL čestica (171). Pored promena u koncentraciji HDL-h kod bolesnika sa HBB dolazi i do značajnih promena u strukturi i funkciji HDL lipoproteinskih čestica, što ukazuje da tek detaljnom analizom lipidnog i proteinskog sastava, kao i procenom funkcionalnosti HDL čestica, možemo proceniti ateroprotektivna svojstva ovih čestica. Studija Holzer i saradnika je pokazala da kod bolesnika na hemodijalizi dolazi do značajnih promena u sastavu proteina na HDL česticama, pri čemu raste koncentracija

serumskog amiloida A1, albumina i apoC-III, a smanjuje se sadržaj apoA-I, apoA-II, apoA-IV i antitripsina (90). Pored toga, dolazi i do promena u sastavu lipida, pa tako opada koncentracija fosfolipida i slobodnog holesterola a raste koncentracija triglicerida u HDL česticama (90). U uremijskim uslovima kod bolesnika sa HBB, pored kvantitativnih promena u sastavu lipida i proteina, dolazi i do kvalitativnih promena u smislu pojačane oksidativne modifikacije, glikozilacije i karbamilacije, što se značajno odražava na funkcionalnost ovog lipoproteina (172).

Imajući u vidu da su HDL čestice prisutne u cirkulaciji izrazito heterogene u pogledu fizičko-hemijskih osobina, metabolizma i biološke aktivnosti (72), naše dalje istraživanje je obuhvatalo ispitivanje relativne distribucije pojedinačnih HDL subfrakcija i procenu njihove funkcionalnosti. Korišćenjem gradijent-gel elektroforeze HDL čestice su razdvojene na velike HDL 2 (HDL 2b i HDL 2a) i male HDL 3 (HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) subfrakcije, pri čemu su kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi značajno više bile zastupljene male guste HDL 3 čestice (Tabele 9 i 10). Naši rezultati su potvrdili prethodna istraživanja Alabakovske i saradnika koja ukazuju da je distribucija HDL subfrakcija pomerena u pravcu malih gustih HDL 3 čestica kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega (173). Potencijalno objašnjene može biti u činjenici da kod bolesnika sa HBB, posebno kod bolesnika na hemodijalizi postoji problem u maturaciji HDL čestica uzimajući u obzir da su prethodne studije pokazale značajno sniženu aktivnost enzima LCAT (66,173). Niska aktivnost LCAT enzima se može objasniti nishodnom regulacijom gena koji kodira sintezu ovog enzima u jetri, kao i inhibitornim efektom uremijskih toksina koji su u visokoj koncentraciji prisutni kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega (174). Prethodne studije su pokazale da inflamacija koja je takođe prisutna kod ovih bolesnika smanjuje ekspresiju gena za LCAT (174). U našoj studiji relativna distribucija HDL 3 subfrakcije je bila značajno viša kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike, što je u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da sa napredovanjem bolesti bubrega dolazi do smanjenja aktivnosti LCAT enzima, a samim tim i posledičnog rasta udela ovih subfrakcija (174). Takođe, jedno od potencijalnih objašnjenja za sniženu aktivnost LCAT jeste i niska koncentracija apoA-I (Tabele 4 i 5), imajući u vidu da ovaj apolipoprotein predstavlja glavni aktivator LCAT enzima (175). Pored svega navedenog, povećan relativni udeo HDL 3 subfrakcije kod bubrežnih bolesnika se može objasniti i povećanom aktivnošću CETP enzima koji je odgovorna za recipročnu razmenu estara holesterola i triglicerida između HDL 2 čestica i lipoproteina koji sadrže apo-B. U uslovima hipertrigliceridemije i pojačane aktivnosti CETP koji

su prisutne kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega, nastaju strukturno promenjene HDL 2 čestice sa većim sadržajem triglicerida, koje se pod dejstvom hepatične lipaze dalje konvertuju u male guste HDL 3 čestice (176). U prilog ovoj tvrdnji govori i pozitivna korelacija pronađena između triglicerida i relativnog udela HDL 3 subfrakcija u grupi bubrežnih bolesnika (Tabela 11). Ranije studije su pokazale da CETP može modifikovati antiinflamatorna i antioksidativna svojstva HDL čestica i na taj način doprineti razvoju oksidativnog stresa i hronične inflamacije, bitnih činioca u nastanku i progresiji ateroskleroze (177).

Međutim i pored detaljnog razumevanja metabolizma HDL čestica još uvek postoje nekonzistentna mišljenja koja HDL subfrakcija ima jači protektivni potencijal i pruža bolju zaštitu od razvoja ateroskleroze (178). Rezultati prethodnih studija su pokazali da je kod pacijenata sa KVB značajno smanjen udeo HDL 2 subfrakcija (67), dok su HDL 3 subfrakcije dominantno zastupljene. S druge strane, postoje brojni dokazi o ateroprotektivnoj ulozi HDL 3 čestica koji ukazuju da zbog velikog sadržaja apoA-I ove čestice učestvuju u inicijalnom preuzimanju i inaktivaciji hidroperoksida na LDL česticama kod zdravih osoba (73). Međutim, primećeno je da u različitim patološkim stanjima dolazi do značajnog narušavanja funkcionalnosti HDL 3 čestica, pri čemu se one mogu smatrati čak i proaterogenim. Shodno tome, povišen relativni udeo HDL 3 subfrakcija koji je pronađen u našoj studiji može ukazati na veći rizik od kardiovaskularnih bolesti kod bubrežnih bolesnika (73). U prilog ovome govori i niži odnos HDL 2/HDL 3 subfrakcija izmeren kod bolesnika na hemodijalizi (Tabela 10) koji se može smatrati posledicom neadekvatne funkcionalnosti procesa reverznog transporta holesterola. Naime, ovakav rezultat je bio očekivan uzimajući u obzir našu prethodnu studiju sprovedenu na cerebrovaskularnim pacijentima, gde smo dobili sličan odnos HDL 2/HDL 3 subfrakcija (179).

Pored dislipidemije i promenjene distribucije HDL subfrakcija koje su dosta ispitivane mali broj studija se bavio istraživanjem distribucije holesterola unutar eritrocita. Aktuelna studija je prema našem saznanju pružila prve podatke o holesterolu vezanom za hemoglobin i holesterolu iz membrane eritrocita kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega. Prethodne studije su pokazale da je slobodan holesterol prisutan u eritrocitnim membranama u ravnoteži sa holesterolom unutar lipoproteina u cirkulaciji (180). Naime, veliki broj eritrocita u čijim se membranama nalazi holesterol čini ove ćelije dostupnim za razmenu holesterola iz membrane eritrocita sa lipoproteinima u cirkulaciji, posebno sa HDL česticama (180). Studije na životinjama su potvrdile da se određena količina holesterola transportuje upravo preko eritrocita

u slučaju otežanog reverznog transporta holesterola (92). U prilog tome govore i rezultati ove studije s obzirom da su vrednosti holesterola iz membrane eritrocita bile mnogo više kod bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (Tabele 12 i 13). Možemo pretpostaviti da vezivanje holesterola za membrane eritrocita predstavlja alternativni put prenosa holesterola u slučaju neadekvatnog reverznog transporta holesterola koji se javlja zbog nedostatka ili promenjene funkcije HDL čestica, kao što je slučaj kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega. Pored holesterola iz membrane eritrocita, naše istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje holesterola vezanog za hemoglobin. Prema istraživanju koje su sproveli Nikolić i saradnici (94) kod zdravih osoba, holesterol vezan za hemoglobin u eritrocitima predstavlja prolazno "skladištenje" viška slobodnog holesterola koji se na taj način uklanja iz cirkulacije. Takođe prema rezultatima *in vitro* studije, pored holesterola iz membrane eritrocita i holesterol vezan za hemoglobin može da učestvuje u reverznom transportu, tako što dolazi do transfera holesterola nazad u membranu odakle interaguje sa HDL česticama iz cirkulacije (96). Naši rezultati su pokazali da u eritrocitima bubrežnih bolesnika postoji značajno niža koncentracija holesterola vezanog za hemoglobin u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabele 12 i 13), što ukazuje na to da eritrociti kod zdravih osoba imaju bolji "puferski" kapacitet za privremeno uklanjanje potencijalno štetnog viška holesterola iz krvi. U skladu sa rezultatima prethodne studije (96), možemo da pretpostavimo da smanjena koncentracija HDL-h kod bubrežnih bolesnika dovodi do intenziviranja reverznog transporta holesterola preko eritrocita i shodno tome dolazi do kraćeg zadržavanja holesterola u eritrocitima, što predstavlja razlog snižene koncentracije holesterola vezanog za hemoglobin. Nasuprot tome, kod zdravih osoba kod kojih je reverzni transport holesterola posredovan HDL česticama funkcionalan, možemo da pretpostavimo da dolazi do postepenog prelaska holesterola sa membrane eritrocita u unutrašnjost, gde se vezuje za hemoglobin i privremeno uklanja, što rezultira sniženim vrednostima holesterola u membrani eritrocita, a povišenim vrednostima holesterola vezanog za hemoglobin (96). Pored svega navedenog, anemija koja je prisutna kod bubrežnih bolesnika može dodatno otežati proces reverznog transporta holesterola, s obzirom na to da pored smanjene koncentracije HDL-h, pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega imaju i smanjenu koncentraciju Hb i kraći životni vek eritrocita, što umanjuje mogućnost da se najbrojnije ćelije krvi uključe u reverzni transport holesterola (181).

Jedan deo našeg istraživanja je obuhvatao i ispitivanje nivoa methemoglobina kod bolesnika sa promenjenom funkcijom bubrega. Patogeneza bubrežnog oštećenja izazvanog methemoglobinom je proučavana na životinjskim modelima, pri čemu su Schaefer i saradnici pokazali da intravenska primena methemoglobina dovodi do akutnih povreda bubrega u životinjskim modelima (182). Mali broj studija se bavio ispitivanjem nivoa methemoglobina kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega. Studija Torres i saradnika je pokazala da kod bolesnika na hemodijalizi usled neadekvatnog uklanjanja hloramina može doći do povećanja nivoa methemoglobina u krvi (183). U našoj studiji iako su vrednosti methemoglobina pokazivale trend ka višim vrednostima u obe grupe ispitivanih bolesnika, nije pronađena statistički značajna razlika između bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja i zdravih ispitanika (Tabele 12 i 13). Međutim, detaljnijom analizom koja je podrazumevala praćenje promena eritrocitnih parametara u zavisnosti od LDL fenotipa, utvrdili smo da su vrednosti methemoglobina bile značajno povećane kod pacijenata sa LDL B fenotipom u poređenju sa zdravim ispitanicima koji imaju isti fenotip (Tabela 14). Povišena koncentracija methemoglobina može se javiti kao rezultat smanjene antioksidativne zaštite i posledično povećane proizvodnje slobodnih radikala, što dovodi do oksidacije i konverzije hemoglobina u methemoglobin (184). S obzirom na to da su bubrežni pacijenti sa LDL B fenotipom izloženi povećanom oksidativnom stresu, to bi mogao biti potencijalni razlog za povećanu koncentraciju methemoglobina u ovoj podgrupi (185). Slično, pronađena veća koncentracija holesterola unutar membrane eritrocita kod bubrežnih pacijenata sa LDL B fenotipom (Tabela 14) može biti posledica proaterogenog profila koji je prisutan kod ovih bolesnika (186). S druge strane, niži nivo holesterola vezanog za hemoglobin u eritrocitima bolesnika sa LDL B fenotipom, ukazuje da pored proaterogenog profila postoji i smanjeni kapacitet uklanjanja viška holesterola posredstvom eritocita.

Pored dislipidemije kao tradicionalnog faktora rizika, brojne studije su pokazale da oksidativni stres ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji ateroskleroze kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega. Oksidativni stres generalno nastaje kao posledica povećane produkcije slobodnih radikala i neadekvatne antioksidativne zaštite što je kod bolesnika sa HBB dodatno praćeno i smanjenim klirensom prooksidativnih supstanci (186,187). Takođe, dijabetes mellitus, hipertenzija, dislipidemija, inflamacija i starost, predstavljaju prooksidativna stanja koja su udružena sa HBB i koja dodatno doprinose razvoju oksidativnog stresa kod ovih bolesnika (122). Bez obzira na uzročnike koji se nalaze u osnovi oksidativnog stresa, prethodne studije su

pokazale da povećana produkcija slobodnih radikala, zajedno sa uremijom koja je prisutna kod ovih bolesnika dovodi do modifikacije lipida i proteina prisutnih u cirkulaciji, što uzrokuje esencijalne promene u njihovoj strukturi i funkciji (186). U ovoj studiji u cilju procene oksidativno-stresnog statusa kod bolesnika sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja pored TBARS, određivana je i AOPP i nivo TOS. Kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi pojačana oksidativna modifikacija lipida izmerena na osnovu koncentracije TBARS (Tabele 15 i 16) ukazuje na nagomilavanja biološki aktivnih produkata lipidne peroksidacije koji predstvaljaju stimulans za inflamaciju i nalaze se u osnovi aterosklerotskih promena (188,189). Pored modifikacije lipida, oksidativni stres dovodi i do promena u strukturi proteina što se odražava na njihovu stabilnost, funkcionalnost i degradaciju (116). Kod bolesnika na hemodijalizi zabeležene su značajno više vrednosti AOPP-a u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 16). Naime, unakrsne veze unutar AOPP-a koje nastaju kao posledica oksidativnih promena na molekulima tirozina teže podležu degradaciji, što rezultuje u dužem zadržavanju i akumulaciji ovog produkta u plazmi bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega (190). Takođe pronađena je pozitivna korelacija između koncentracije AOPP i relativnog udela HDL 3 subfrakcija što potencijalno može ukazati na promenjenu strukturu, a samim tim i funkcionalnost HDL 3 subfrakcija (Tabela 17). Uzimajući u obzir ovakve rezultate bilo je očekivano da vrednost totalnog oksidativnog statusa budu povišena u obe grupe bolesnika (Tabele 15 i 16) pošto je veliki broj istraživanja pokazao da progresija bubrežne bolesti dovodi do pojačanog oksidativnog stresa koji zajedno sa ostalim faktorima rizika pospešuje razvoj KVB (191). U toku dalje analize, nakon što smo podelili bubrežne bolesnike i zdrave ispitanike u odnosu na LDL fenotip, utvrdili smo da zdravi ispitanici sa LDL A fenotipom imaju statistički značajno niži nivo TBARS u poređenju sa bubrežnim bolesnicima sa istim fenotipom (Slika 22 A), što ukazuje na viši stepen lipidne peroksidacije u grupi bubrežnih pacijenata bez obzira na prisustvo određenog fenotipa. U aktuelnoj studiji smo utvrdili da i zdravi ispitanici sa dominantno prisutnim LDL B fenotipom imaju značajno povećanu koncentraciju TBARS u poređenju sa LDL A fenotipom u istoj grupi (Slika 22 A). Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje ukazuju da je LDL B fenotip povezan sa povećanim vrednostima TBARS kao krajnjih produkata lipidne peroksidacije čak i kod zdravih osoba (82) iz čega proizilazi da prisutan LDL B fenotip anulira razliku između pacijenata i zdravih ispitanika. Takođe i TOS je korišćen za upoređivanje nivoa oksidativnog stresa u ispitivanim podgrupama, tačnije kod bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa

različitim LDL fenotipom (Slika 22 B). Dobijeni rezultati su pokazali da pacijenti bez obzira na dominantno prisustvo povoljnijeg LDL A fenotipa imaju povećan nivo TOS u poređenju sa zdravim ispitanicima sa istim fenotipom (Slika 22 B). S druge strane, nije pronađena statistički značajna razlika u nivou TOS između bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa dominantno prisutnim LDL B fenotipom (Slika 22 B). Ovakav rezultat se može objasniti rezultatima naše prethodne studije (82), koji ukazuju da čak i zdrave osobe kod kojih su najvećim delom prisutne male guste LDL čestice imaju visok nivo oksidativnog stresa. Dokazano je da kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega, posebno kod pacijenata na dijalizi pored povećane produkcije slobodnih radikala, postoji i poremećaj na nivou antioksidativne zaštite. Rezultati naše studije su potvrdili ove tvrdnje. Ukupne sulfhidrilne grupe koje najvećim delom vode poreklo iz proteina plazme smatraju se jednim od glavnih antioksidanasa koji učestvuju u neenzimskoj zaštiti od slobodnih radikala (192), međutim povećan gubitak proteina kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega, pruža objašnjenje zašto je koncentracija ukupnih SH grupa značajno niža kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (Tabele 15 i 16) (193). Pored toga, poređenjem kontrolne grupe i bubrežnih bolesnika, pronađene su značajno niže vrednosti ukupnih sulfhidrilnih grupa kod pacijenata sa LDL A fenotipom nego kod zdravih ispitanika sa istim fenotipom, dok s druge strane nije bilo razlika između pacijenata i kontrole sa LDL B fenotipom (Slika 22 C). Potencijalno objašnjenje može biti u povišenom nivou totalnog oksidativnog statusa koji je prisutan kod pacijenata sa LDL A fenotipom i koji može biti razlog za povećanu potrošnju ukupnih SH grupa (194). Takođe ukupne sulfhidrilne grupe su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h, što govori o antioksidativnoj ulozi ovih lipoproteinskih čestica. S druge strane, negativna korelacija između ukupnih sulfhidrilnih grupa i triglicerida govori u prilog prethodnom rezultatu kod bolesnika sa LDL B fenotipom (Slika 22 C). TAS kao indikator sposobnosti plazme da neutrališe slobodne radikale, bio je značajno povećan kod bubrežnih pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabele 15 i 16). Slični rezultati su dobijeni ikada smo poredili bubrežne bolesnike i zdrave ispitanike u odnosu na LDL fenotip (Slika 22 D). Prethodne studije su pokazale da je povećan nivo TAS kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega primarno prisutan kao posledica povećanog nivoa mokraćne kiseline, ali i drugih proizvoda metabolizma koji imaju redukciona svojstva (194). U prilog tome govore i dokazi da nakon hemodijalize dolazi do značajnog pada u nivou TAS u odnosu na nivo pre samog tretmana (195), usled uklanjanja krajnjih metaboličkih produkata. Pored svega navedenog, u toku našeg

istraživanja određivali smo i prooksidativno-antioksidativni balans, kao parameter koji govori o ravnoteži između slobodnih radikala i mehanizama odgovornih za njihovo neutralisanje, međutim nije pronađena značajna razlika između bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika (Tabele 15 i 16). Potencijalno objašnjenje može biti u činjenici da zadržavanje antioksidanasa poput mokraćne kiseline, zajedno sa primenom ACE inhibitora prividno umanjuje nivo oksidativnog stresa kod ovih bolesnika što se odrazilo na vrednosti PAB (196).

Pored promena u sazrevanju HDL čestica, što posledično dovodi do izmenjene distribucije HDL subfrakcija, rezultati našeg istraživanja su pokazali da je značajno smanjen i antioksidativni potencijal ovih čestica kod pacijenata sa HBB, posebno kod pacijenata na dijalizi. Naime, snižena aktivnost PON1 enzima u serumu obe grupe pacijenata, nedvosmisleno ukazuje na smanjenu sposobnost ovih čestica da učestvuju u sprečavanju oksidativne modifikacije lipoproteina i ćelijskih membrana (Slike 23 i 26). U prilog ovome govori i snižena specifična aktivnost PON1 koja je zabeležena u obe grupe pacijenata (Slike 25 i 28). Prethodne studije su pokazale da oksidativni stres i inflamacija zajedno sa određenim uremijskim toksinima mogu promeniti sastav HDL čestica što posledično dovodi do smanjenja aktivnosti PON1 kod bubrežnih bolesnika (39,197). Naime, pored strukturalnih promena HDL čestica snižena paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 se objašnjavaju i sniženom koncentracijom apoA-I koji je odgovoran za stabilizaciju aktivnosti PON1 (197). Pored toga, niska koncentracija HDL-h i apoA-I, kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi ukazuju na manji broj HDL čestica koje prenose PON1 u cirkulaciji (198). Takođe, pronađena je značajna negativna korelacija između paraoksonazne aktivnosti PON1 i kreatinina kod bubrežnih bolesnika (Tabela 21), što se može objasniti studijom koju su sprovedi Gugliucci i saradnici a koja ukazuje da povećan nivo uremijskih toksina može uticati na aktivnost PON1 (199). Pored toga, paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 su pokazale jaku pozitivnu korelaciju sa koncentracijom HDL-h kao i sa koncentracijom ukupnih SH grupa (Tabela 21). Ovakav rezultat je donekle bio i očekivan imajući u vidu da su upravo sulfhidrilne grupe u aktivnom centru PON1 odgovorne za održavanje enzimske aktivnosti PON1 i za sprečavanje lipidne peroksidacije LDL čestica (200). Takođe, dijabetična nefropatija koja je dominantno prisutna u grupi pacijenata na dijalizi, može biti dodatni razlog smanjene aktivnosti PON1. Ranije studije su pokazale da kod pacijenata sa dijabetesom dolazi do neenzimskog vezivanja glukoze za PON1 (201), a zatim i disocijacije PON1 enzima sa HDL čestica što uzrokuje sniženu aktivnost PON1 (202).

Pored svega navedenog, prepostavili smo da bi izmenjena distribucija HDL subklasa mogla biti jedno od mogućih objašnjenja smanjene aktivnosti PON1 kod bubrežnih bolesnika (82,173). U ovom istraživanju je po prvi put analizirana raspodela enzima PON1 između različitih HDL subklasa zajedno sa arilesteraznom aktivnošću PON1 na HDL 2 i HDL 3 subklasama, pri čemu smo utvrdili značajno veći relativni udeo PON1 aktivnosti na HDL 3 subfrakciji bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabele 18 i 19). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjem Shiavona i saradnika, koja ukazuje da je aktivnost enzima PON1 kod pacijenata na hemodijalizi gotovo u potpunosti prisutna na HDL 3 česticama (203). Takođe navedena studija je pokazala da smanjen relativni udeo HDL 2 subklasa može biti razlog snižene aktivnosti paraoksonaze na ovoj frakciji kod bolesnika na hemodijalizi. Kao što je ranije i pomenuto, rezultati ove studije su utvrdili da su HDL 3 subklase dominantno prisutne u obe grupe pacijenata, te je stoga i bilo očekivano da aktivnost PON1 bude najvećim delom zastupljena upravo na HDL 3 česticama, što nije bio slučaj sa zdravim ispitanicima. U kontrolnoj grupi je relativan udeo HDL 2 subfrakcija bio znatno povišen, te je s toga i bilo očekivano da će relativni udeo PON1 aktivnosti biti više zastupljen upravo na ovim česticama (Tabele 18 i 19). Pored relativne distribucije PON1 na svakoj od HDL subklasa, odredili smo i PON1 aktivnost u određenoj subfrakciji tako što smo relativnu distribuciju PON1 pomnožili sa ukupnom arilesteraznom aktivnošću PON1 u serumu. Tako smo utvrdili da je arilesterazna aktivnost PON1 i na HDL 2 i na HDL 3 bila znatno niža kod pacijenata u poređenju sa zdravim osobama (204) (Tabele 18 i 19). Sorenson i saradnici su pokazali da je aktivnost PON1 enzima zavisna od prisutnih lipida, tako da bi hidrofobno i lipidima bogato okruženje prisutno u HDL 2 česticama moglo biti potencijalni razlog za povišenu PON1 aktivnost kod zdravih ispitanika (205). Sa druge strane, Carnuta i saradnici su ukazali na značajan uticaj apoA-II na stabilizaciju strukture i funkcije HDL čestica. Oni su došli do zaključka da smanjena aktivnost PON1 u HDL 2 česticama kod bolesnika sa kardiovaskularnim bolestima može nastati kao posledica povišene koncentracije apoA-II koja favorizuje zamenu PON1 mijeloperoksidazom, što uzrokuje oksidaciju apoA-I i slabi vezu između PON1 i apoA-I (206). Ovakva oksidativna modifikacija proteinskog sastava u HDL 3 česticama, pored toga što destabilišu PON1, potencijalno smanjuje sposobnost metionina u apoA-I da inaktivira lipidne hidroperokside (206). Takođe, jedno od mogućih objašnjenja za smanjenu aktivnost PON1 kod bubrežnih bolesnika može biti i povećana aktivnost CETP enzima i posledična zamena holesterol

estara sa HDL čestica, trigliceridima iz lipoproteina koji sadrže apo B. Prema studiji Brites i saradnika, u HDL 3 česticama, koje su bogate trigliceridima, dolazi do konformacionih promena u strukturi apoA-I, što rezultira narušavanjem veze između PON1 i apoA-I i potencijalnim gubitkom ovog enzima sa HDL čestice (76). Naša studija je potvrdila da HDL 3 čestice poseduju moćan antioksidativni potencijal kod zdravih osoba, dok je ovaj efekat značajno smanjen kod bubrežnih bolesnika (207). Dobro je poznato da pod fiziološkim uslovima HDL lipoproteini, malih dimenzija i visoke gustine imaju jake antiateroge karakteristike, ali sa druge strane štetni efekti inflamacije i oksidativnog stresa koji su stalno prisutni kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega mogu dovesti do toga da ove čestice postanu proaterogene (207). U prilog ovome govori i pozitivna korelacija između arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama i koncentracije ukupnih SH-grupa (Tabela 21), jer u uslovima povećanog oksidativnog stresa i smanjene antioksidativne zaštite, kada dolazi do oksidativnih promena na lipoproteinima, dolazi i do smanjenja antioksidativne zaštite i na HDL 2 i na HDL 3 subfrakcijama. Naše prethodno istraživanje zasnovano na analizi HDL subfracija nakon elektroforetskog razdvajanja, takođe je pokazalo da PON1 aktivnost prema diazoksonu kao supstratu značajno i pozitivno korelira sa dijametrom HDL čestica (82). Ovaj dinamički proces transformacije HDL čestica kao i aktivnost PON1 na različitim HDL subfrakcijama je jako teško posmatrati kad se HDL čestice razdvajaju na subfrakcije metodom ultracentrifugiranja, s obzirom na to da jaka centrifugalna sila u toku procedure može promeniti strukturu i funkciju HDL-a (76). S druge strane zimogram metoda korišćena tokom ovog istraživanja pruža mogućnost da se odredi tačna lokalizacija PON1 aktivnosti unutar HDL čestica bez uticaja na njihovu strukturu (162).

Pored aktivnosti, značajno je smanjena i PON1 koncentracija kod pacijenata na dijalizi u poređenju sa bolesnicima sa HBB (Slike 24 i 27). Luscher i saradnici su pokazali da snižena koncentracija PON1 može biti rezultat smanjene sinteze PON1 proteina u jetri koja nastaje delimično kao posledica inhibitorynog efekta uremijskih toksina (208). Imajući u vidu da PON1 sadrži slobodne sulfidrilne grupe koje mogu reagovati i neutralisati oksidovane fosfolipide i estre holesterola, smanjena koncentracija PON1 ukazuje na smanjeni antioksidativni potencijal HDL čestica kod pacijenata na dijalizi i bolesnika sa HBB što za posledicu ima oksidativno oštećenje različitih lipoproteina, uključujući i HDL (198) Generalno, možemo da pretpostavimo da smanjena sinteza i izmenjena struktura apoA-I dovode do smanjene koncentracije i aktivnosti

PON1, a time i do slabljenja antioksidativnog potencijala HDL čestica. Kako oksidativna modifikacija LDL predstavlja ključnu fazu u razvoju aterosklerotskog plaka, niska aktivnost i koncentracija PON1, posebno kod pacijenata na dijalizi, predstavlja dodatni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja (209, 210).

Pored ispitivanja aktivnosti i koncentracije PON1, ova studija se bavila i promenama na nivou PON3 enzima, pri čemu je primećeno da obe ispitivane grupe pacijenata imaju značajno nižu koncentraciju PON3 u poređenju sa zdravim ispitanicima (Slike 24 i 27). Studija koju su sprovedi Reddy i saradnici sugerije da PON3 može igrati važnu ulogu u metabolizmu lipoproteina na nivou bubrega (86). Pored toga, istraživanje na životinjskim modelima je pokazalo da nedostatak PON3 dovodi do povišenog nivoa superoksidnog anjona na nivou mitohondrija, zatim do povećane ekspresije gena za proteine uključene u proces inflamacije i posledično do povećanog stvaranja aterosklerotskih lezija (211). Iz ovoga se može zaključiti da snižena koncentracija PON3 takođe može biti potencijalni razlog za povišen oksidativni stres na nivou bubrega kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi. Svakako ulogu enzima PON3 kod bubrežnih bolesnika bi trebalo detaljnije ispitati u studiji koja bi obuhvatala veći broj pacijenata.

Takođe, jedan od ciljeva ove studije je bio i ispitivanje uticaja hemodijalize na raspodelu HDL čestica kao i na PON1 aktivnost unutar različitih HDL subklasa. Ova studija je potvrdila rezultate ranijih istraživanja da hemodijaliza dovodi do aktivacije PON1, ali tačan mehanizam još uvek nije u potpunosti razjašnjen (207). Možemo da pretpostavimo da eliminacija uremijskih toksina predstavlja jedan od potencijalnih razloga za višu paraoksonaznu aktivnost posle procesa hemodijalize koja je uočena u ovoj studiji (Tabela 20). Analiza distribucije PON1 aktivnosti na HDL subklasama je pokazala da nakon hemodijalize postoji znatno veći udeo PON1 aktivnosti na HDL 2a česticama (Tabela 20). Potencijalno objašnjenje može biti u hemijskim promenama nakon hemodijalize koje su posebno poboljšale antioksidativni potencijal zrelih HDL 2 čestica. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa studijom Gugliucci i saradnika, koji su pronašli da povećano prisustvo PON1 aktivnosti na HDL 2 česticama zapravo odražava poboljšano sazrevanje ovih čestica koje se intenzivnije odvija nakon hemodijalize (212). Sa druge strane, arilesterazna aktivnost PON1 je bila značajno smanjena nakon hemodijalize (213), pa je samim tim i izračunata arilesterazna aktivnost PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama pokazala niže vrednosti posle samog tretmana. Na osnovu ovih rezultata, proizilazi pretpostavka da u cirkulaciji

nakon hemodijalize i dalje ostaju prisutni određeni inhibitori koji utiču na aktivnost enzima za određeni supstrat.

Kako su rezultati ove studije nedvosmisleno pokazali promene u oksidativno-stresnom statusu u krvi kod bolesnika sa HBB sledeći korak u istraživanju je bio ispitati nivo oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite unutar izolovanih lipoproteinskih frakcija. Naime prethodne studije su pokazale da inflamacija, zajedno sa oksidativnim stresom dovodi do promena na nivou lipida i proteina unutar VLDL, LDL i HDL frakcija čineći ih važnim činiocima u procesu ateroskleroze (39). U ovoj studiji koncentracije PON1 i PON3 kao antioksidativnih enzima se nisu značajno razlikovale između kontrolne grupe i bubrežnih bolesnika u VLDL frakcijama (Tabele 22 i 23), pri čemu potencijalno objašnjenje treba tražiti u niskom antioksidativnom potencijalu VLDL čestica u svim ispitivanim grupama. Pretpostavljamo da se VLDL čestice usled nedostatka sopstvenih antioksidativnih mehanizama, oslanjaju na antioksidanse prisutne u serumu, čemu u prilog govori i negativna korelacija između koncentracije PON1 u VLDL frakcijama i ukupnih SH-grupa u serumu (Tabela 24). Iako je postojao trend ka višim koncentracijama AOPP u izolovanim VLDL i LDL frakcijama bubrežnih bolesnika, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na zdrave ispitanike. S druge strane, ova studija je pokazala da su HDL frakcije bubrežnih bolesnika značajno oslabljene u pogledu antioksidativne zaštite s obzirom na to da je koncentracija PON1 unutar izolovanih HDL frakcija bila niža u grupi bolesnika (Tabele 22 i 23). Takođe značajna pozitivna korelacija između koncentracije AOPP u HDL frakciji i relativne distribucije HDL 3 subfrakcija predstavlja još jedan dokaz strukturnih promena unutar HDL 3 subfrakcija kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi (Tabela 24). Ovakav rezultat predstavlja direktan dokaz promenjene strukture HDL čestica, koji prema nalazima prethodnih studija nastaje usled međusobne interakcije inflamacije, oksidativnog stresa i uremijskih toksina koji su u velikoj meri prisutni kod bubrežnih bolesnika bez obzira na stepen oštećenja funkcije bubrega (90). Uprkos činjenici da je koncentracija PON3 u serumu bila znatno niža u obe grupe pacijenata (Slike 24 i 27), nismo pronašli značajnu razliku u koncentraciji PON3 u izolovanim HDL frakcijama kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Tabele 22 i 23). Objašnjenje za ovakav rezultat možemo tražiti u prethodnim studijama koje su utvrdile da PON3 primarno deluje na nivou jetre i bubrega, dok se u cirkulaciji nalazi kao posledica različitih kako fizioloških tako i patofizioloških procesa (86). Generalno, ispitivanje PON3 u patologiji bubrežnih bolesti nije dovelo do konačnih zaključaka i ostavilo je prostor za dalje istraživanja kako promene u strukturi

HDL čestica utiču na koncentraciju i aktivnost ovog enzima kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega. U ovom istraživanju je prvi put istovremeno analiziran oksidativno-stresni status unutar glavnih klasa lipoproteina (Slika 29). Utvrdili smo da je koncentracija uznapredovalih produkata oksidacije proteina bila najveća u VLDL frakciji kada se uporedi sa LDL i HDL frakcijom i da je ovakav rezultat dobijen kako kod bubrežnih pacijenata tako i kod zdravih ispitanika (Slika 29). S toga je bilo logično pretpostaviti da oksidacija polinenasićenih masnih kiselina u VLDL frakcijama daje velike količine lipidnih peroksida, koji mogu dovesti do oksidacije strukture proteina unutar VLDL frakcija, što ukazuje da je VLDL podložan dejstvu različitih oksidansa upravo zbog nedovoljne antioksidativne zaštite (214). S druge strane, značajno niže koncentracije, PON1 i PON3 u VLDL frakciji u poređenju sa HDL frakcijom u svim studijskim grupama, su bile očekivane pošto se paraoksonaza uglavnom nalazi vezana za HDL (Slika 29). Povišena koncentracija AOPP u LDL frakciji, u odnosu na HDL u svim posmatranim grupama ukazuje na povećane oksidativne modifikacije apoB-100 u LDL česticama (209).

Inflamacija kod pacijenata sa HBB predstavlja jedan od ključnih faktora rizika koji zajedno sa oksidativnim stresom i dislipidemijom doprinosi iniciranju i progresiji ateroskleroze. Između ovih procesa postoji uzajamna veza, pri čemu je pokazano da oksidativni stres i dislipidemija stimulišu inflamatorne procese, dok s druge strane inflamacija podstiče oksidativni stres i utiče na metabolizam lipida. Pentraksin-3 predstavlja protein akutne faze koji stvaraju različita tkiva, uključujući i bubrežni korteks, medulu, glomerule i mezangijalne ćelije (128) i u ovoj studiji obe grupe pacijenata su imale višu koncentraciju u odnosu na zdrave ispitanike, pri čemu su najviše vrednosti bile prisutne kod bolesnika na hemodijalizi (Tabele 25 i 26). Postoji pretpostavka da povećani nivo pentraksina-3 nastaje kao posledica oštećenja funkcije bubrega, što dovodi do pojačane sinteze i oslobađanja pentraksina-3 (215). Pored toga povećana koncentracija pentraksina-3 se takođe može objasniti smanjenim klirensom ovog proteina (129, 216). U prilog ovome govori i sama struktura pentraksina-3 koji je prototip dugih pentraksina, sa velikom molekulskom masom i karakterističnom pentamernom strukturom, što sve zajedno može biti razlog povećanog zadržavanja ovog proteina kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega (217). Nedavna studija Debana i saradnika je pokazala da pentraksin-3 može izazvati morfološke promene u mezangijalnim ćelijama, što dovodi do posledičnog smanjenja glomerularne filtracije (218). Viši nivo pentraksina-3 je povezan sa nižom JGF i nezavisno predviđa incidencu HBB kod

starijih muškaraca i žena (219). S druge strane, pentraksin-3 može učestvovati u imunološkom odgovoru na patogene, u regulaciji zapaljenskih reakcija, kao i u uklanjanju apoptopskih ćelija (215). Pored toga, rezultati ove studije su pokazali značajno veću koncentraciju pentraksina-3 kod pacijenata na hemodijalizi (Tabela 26). U skladu sa prethodnim studijama pretpostavljamo da prisustvo uremijskih toksina, oksidativnog stresa i dislipidemije kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega može biti okidač za pojačano stvaranje pentraksina-3 što dovodi do kontinuirane sistemske inflamacije niskog stepena (220,221). Takođe, Rusnati i saradnici su ukazali na povezanost ekspresije pentraksina-3 sa procesom reorganizacije matriksa i angiogeneze (222).

Takođe postoje dokazi da oksidativni stres i inflamacija mogu uticati na remodelovanje ekstracelularnog matriksa i posledično doprineti oštećenju funkcije bubrega (223,224). Naime prethodne studije su pokazale da intenzivo remodelovanje ekstracelularnog matriksa značajno doprinosi kako iniciranju tako i progresiji HBB (225). Saglasno sa svojom ulogom, MMP u ranim stadijumima bubrežne bolesti doprinosi razgradnji kolagena tipa IV, primarne komponente ECM u bazalnim membranama glomerula i mezangijalnom matriksu (226). Rezultati ove studije pokazali su povećane koncentracije i MMP-9 i TIMP-1 kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi (Tabele 25 i 26) u poređenju sa zdravim ispitanicima, što sa sobom povlači pretpostavku da povećana sinteza MMP-9 može dovesti do prekomerne degradacije ECM (227). S druge strane, ukoliko je aktivnost MMP prekomerno inhibirana usled povećane aktivnosti tkivnog inhibitora matriks metaloproteinaza, dolazi do akumulacije ECM i renalne fibroze (136, 228). Povećana koncentracija TIMP-1 u serumu bila je prisutna u obe grupe bubrežnih bolesnika što sugeriše da bi produžena i prekomerna inhibicija MMP-9 mogla biti faktor za razvoj fibroze u terminalnom stadijumu HBB (229). Studija Ronco i saradnika smatra da je neravnoteža između aktivnosti MMP-9 i odgovarajuće inhibicije TIMP-1 povezana sa razvojem ateroskleroze kod bolesnika sa HBB, kao i sa progresijom bolesti (228). Pored svega navednog, brojne studije su ukazale na značaj oksidativnog stresa i inflamacija kao dva važna faktora koji indukuju ekspresiju gena i sintezu enzima MMP-9 (227, 230). Pokazano je da oksidativni stres pored toga što stimuliše sintezu enzima MMP, utiče i na oksidaciju sulfhidrilnih grupa unutar enzima i tako aktivira MMP (135). Imajući u vidu da su rezultati ove studije nedvosmisleno pokazali da ispitivani bolesnici bez obzira na stepen oštećenja funkcije bubrega imaju visok nivo i oksidativnog stresa i inflamacije, pretpostavljamo da su upravo ovi procesi odgovorni za

povećane koncentracije MMP-9 i TIMP-1. Takođe, prethodne studije su pokazale da povišena aktivnost matriks metaloproteinaze remeti normalno funkcionisanje reverznog transporta holesterola, tako što razgrađuje apoA-I, što može biti još jedan od dodatnih razloga za dislipidemiju kod ovih bolesnika (89). Naime, rezultati ove studije su pokazali postojanje pozitivne korelacije između koncentracije ukupnog holesterola i relativne zastupljenosti malih gustih LDL čestica sa koncentracijom MMP-9 (Tabela 28). Međutim pozitivna korelacija između koncentracije apoA-I i koncentracije MMP-9 ukazuje da je neophodno dalje ispitivanje uticaja matriks metaloproteinaza na metabolizam lipida.

Pored ravnoteže MMP i TIMP, koja je važna za regulaciju degradacije ECM, određene studije ukazuju da je galektin-3 takođe bitan činilac u ovom procesu (140). Prethodne studije su pokazale da galektin-3 ima bitnu ulogu u sprečavanju fibroze tkiva, tako što utiče na razgradnju ekstracelularnog matriksa (140). Rezultati ove studije su pokazali da pacijenti na hemodijalizi imaju znatno nižu koncentraciju galektina-3 u poređenju sa bolesnicima sa HBB i kontrolnom grupom (Tabele 25 i 26). Pretpostavljamo da ovako niske vrednosti galektina-3 zajedno sa visokom koncentracijom MMP i TIMP ukazuju na lošu regulaciju sinteze i razgradnje ekstracelularnog matriksa kod pacijenata na hemodijalizi. U studiji sprovedenoj na životinjskim modelima, stepen težine fibroze uretre bio je značajno veći kod miševa koji su imali nedostatak gena za galektin-3 (140). Pored toga, intracelularni galektin-3 sprečava apoptozu, tako što u citoplazmi inhibira aktivaciju kaspaza. Na ovaj način galektin-3 poboljšava oporavak tubularnih ćelija, jer sa jedne strane ograničava apoptozu, a sa druge strane promovira proliferaciju ćelija tokom hroničnog oštećenja bubrega (140). Uzimajući u obzir sve ove činjenice, smanjena koncentracija galektina-3 kod pacijenata na dijalizi može ukazati na povećanje apoptotičkih procesa, što dovodi do progresije bubrežnog oštećenja (140). Pored uloge u remodelovanju ekstracelularnog matriksa, prethodne studije su pokazale da galektin-3 posreduje u preuzimanju oksidovanih LDL čestica (231). S obzirom na to da su male guste LDL čestice podložnije oksidaciji, bilo je očekivano da postoji veza između galektina-3 i LDL dijametra, što je tokom naše studije i potvrđeno (Tabela 28). Mali broj istraživanja se bavio ispitivanjem povezanosti između galektina-3 i parametara lipidnog statusa, posebno kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega. Pozitivna korelacije je pronađena između ukupnog holesterola, LDL-h i apoA-I sa galektinom-3 što potvrđuje ulogu galektina-3 u promenjenom metabolizmu lipida kod bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega (Tabela 28). Međutim, potrebne su dodatne studije

koje će u potpunosti razjasniti tačan mehanizam kojim galektin-3 ostvaruje uticaj na metabolizam lipida. Takođe s obzirom na to da galektin-3 predstavlja i receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije- AGE, smanjena koncentracija galektina-3 kod bolesnika na hemodijalizi pronađena u ovoj studiji, posledično dovodi do zaključka da je kod ovih bolesnika smanjeno uklanjanje i AGE i modifikovanih lipida iz cirkulacije, što može predstavljati dodatni okidač za inflamatorne procese kod ovih bolesnika (141,142). Pored toga, prethodne studije su pokazale da AGE stimuliše akumulaciju ECM tako što utiče na regulaciju različitih citokina (231), tako da pretpostavljamo da smanjena koncentracija galektina-3 rezultira povećanim nivoima AGE i olakšanim preuzimanjem od strane RAGE receptora, nakon čega sledi povećanje oksidativnog stresa i nagomilavanje ekstracelularnog matriksa.

Rezultati ROC analize su pokazali da paralelno određivanje galektina-3, pentraksina-3, MMP-9 i JGF predstavlja kombinaciju koja najbolje može razdvojiti bubrežne pacijenate sa niskim odnosno visokim rizikom za kardiovaskularne bolesti koji je preračunat preko FRS skora (Tabela 27, Slika 30). U toku ove studije smo primetili da pored procenjene JGF, galektin-3, pentraksin-3 i MMP-9 mogu biti snažni prediktori visokog rizika za kardiovaskularne bolesti kod bubrežnih pacijenata.

S obzirom na činjenicu da bubrežni bolesnici imaju više tradicionalnih i netradicionalnih faktora rizika koji doprinose razvoju ateroskleroze što je i potvrđeno u našim prethodnim studijama koje su pokazale da dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija značajno doprinose progresiji KVB, naš krajnji cilj je bio da različite faktore rizika iskombinujemo u jedinstven indikator koji bi na najbolji način prikazao kompleksnu interakciju između različitih faktora rizika (232,233). Tako smo u aktuelnoj studiji koristili DOI skor, kao zbir skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i inflamatornog skora kako bi sumirali interakciju između različitih, ali međusobno povezanih faktora rizika. Kao što je i očekivano, svi pojedinačni skorovi, kao i zbirni DOI skor bili su značajno viši kod bubrežnih bolesnika u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabele 29 i 30), što ukazuje da se DOI skor može koristiti da prikaže ukupan efekat različitih faktora rizika koji su uključeni kako u progresiju bubrežne bolesti, tako i u razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega. Takođe, rezultati ove studije su pokazali da je vrednost DOI skora najveća u grupi pacijenata na hemodijalizi (Tabela 30), što ukazuje na najsnažniju interakciju između dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije upravo kod pacijenata u terminalnom stadijumu HBB. U cilju provere dijagnostičke tačnosti

pojedinačnih skorova i zbirnog DOI skora, u procesu razdvajanja bubrežnih bolesnika od zdravih ispitanika računate su površine ispod ROC krivih (AUC), kako za skor dislipidemije, oksidativno-stresni i inflamatorni skor, tako i za zbirni DOI skor (Tabela 31). Zanimljivo je da oksidativno-stresni i inflamatorni skor pokazuju na osnovu Hosmer-vih i Lemeshow-ih pravila (168) odličnu dijagnostičku tačnost za izdvajanje osoba sa smanjenom funkcijom bubrega, dok lipidni skor pokazuje izvanrednu dijagnostičku tačnost. Naravno, kao što je i očekivano, zbirni DOI skor, koji objedinjuje različite faktore rizika, pokazao je izvanrednu dijagnostičku tačnost. Značajna negativna korelacija koncentracije enzima PON3 u VLDL frakciji sa skorom dislipidemije i DOI skorom u serumu kod bubrežnih bolesnika (Tabela 32) je u saglasnosti sa prethodnom studijom prema kojoj dislipidemija i oksidativni stres smanjuju ekspresiju enzima PON3 (234), što ujedno predstavlja i dodatni uzrok povećane osetljivosti VLDL čestica prema slobodnim radikalima. Ovakav rezultat ne treba zanemariti imajući u vidu da su VLDL čestice prekursori LDL-a koji je važan akter u aterosklerotskom procesu (36). Konačno utvrdili smo da su i oksidativno-stresni skor i DOI skor u jakoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom uznapredovalih produkata oksidacije proteina u LDL frakcijama (Tabela 32). Brojne studije su pokazale dominaciju proaterogenih, malih gustih LDL čestica kod bubrežnih bolesnika. Ove čestice pored niskog afiniteta za LDL receptore i olakšanog prolaska u subendotelni prostor karakteriše i povećana osetljivost na prisustvo slobodnih radikala, što bi moglo biti potencijalno objašnjenje dobijene korelacije (235). Slični rezultati su pronađeni u prethodnim studijama (229) što potvrđuje značajan kombinovani efekat različitih faktora rizika na oksidativni status u lipoproteinskim česticama. Zanimljivo je da su i PAB i TBARS bili u pozitivnoj korelaciji sa oksidativno-stresnim skorom, što govori u prilog tome da i ostali parametri oksidativnog stresa koji nisu uključeni u proračun pokazuju značajnu povezanost sa izračunatim oksidativno-stresnim skorom. Takođe, primećena je jaka pozitivna korelacija između koncentracije PON1 i inflamatornog skora, kao i između arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2 subfrakcijama i izračunatog inflamatornog skora što govori u prilog antiinflamatornoj ulozi PON1. Prethodne studije su pokazale da PON1 pored toga što sprečava oksidaciju LDL i tako posredno smanjuje inflamatorni odgovor unutar zida krvnog suda, takođe smanjuje i hemotaksu monocita, njihovu diferencijaciju i adheziju za endotelne ćelije (236).

Potencijalna klinička upotreba DOI skora, ogleda se u većoj osetljivosti zbirnog DOI skora u odnosu na pojedinačne parametare koji se koriste za njegovo izračunavanje. Posebno je

važno istaknuti, upotrebu ovog skora u otkrivanju malih razlika između bubrežnih bolesnika u pogledu rizika od KVB. Pored toga, izračunavanje skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije može biti korisno u proceni koji proces je dominantno prisutan u različitim grupama pacijenata i samim tim može služiti kao vodič za dalje preventivne mere koje treba primeniti kako bi se smanjili dominantno prisutni kardiovaskularni faktori rizika.

6. Zaključci

Na osnovu analize dobijenih rezultata u ovoj studiji definisali smo sledeće zaključke:

1. Kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi je utvrđen znatno viši nivo oksidativnog stresa kao posledica lipidne peroksidacije i oksidacije proteina što je potvrđeno visokim vrednostima TBARS, AOPP i TOS. S druge strane, snižene vrednosti ukupnih SH grupa reflektuju snižen nivo antioksidativne zaštite.
2. Utvrđeno je da su HDL frakcije bubrežnih bolesnika značajno oslabljene u pogledu antioksidativne zaštite s obzirom na to da je koncentracija PON1 unutar izolovanih HDL frakcija bila niža u obe grupe bolesnika. S druge strane, VLDL lipoproteinske frakcije su u poređenju sa drugim lipoproteinskim frakcijama imale najviši nivo oksidativnog stresa.
3. Poređenjem bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa LDL A, odnosno LDL B fenotipom, utvrđeno je da bez obzira na prisustvo LDL A fenotipa pacijenti imaju povišene parametre oksidativnog stresa. Takođe, zabeležen je povišen nivo oksidativnog stresa kod zdravih sa LDL B fenotipom u odnosu na zdrave ispitanike sa LDL A fenotipom.
4. Utvrđeno je da su vrednosti Hb-h znatno niže u obe grupe ispitivanih bolesnika. S druge strane pronađene je veći udeo holesterola u membrani eritrocita kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi što ukazuje na potrebu daljeg ispitivanja reverznog transporta holesterola posredovanog eritrocitima.
5. Poređenjem bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa LDL A, odnosno LDL B fenotipom, utvrđeno je da bez obzira na prisustvo LDL fenotipa pacijenti imaju povećan nivo holesterola u membrani eritrocita i snižen nivo holesterola vezanog za hemoglobin. Relativna zastupljenost methemoglobina je bila slična u svim ispitivanim grupama, s tim da je utvrđen značajno viši nivo methemoglobina kod bolesnika sa LDL B fenotipom u odnosu na zdrave ispitanike sa istim fenotipom.
6. Relativni udeo proaterogenih, malih, gustih HDL 3 čestica je bio veći kod bolesnika na hemodijalizi i bolesnika sa HBB u odnosu na zdrave ispitanike.
7. Ispitivanjem statusa enzima paraoksonaze, uočena je značajno niža paraoksonazna i arilesterazna aktivnost enzima PON1, što je praćeno i niskom koncentracijom PON1 i PON3 enzima u serumu bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi.
8. Arilesterazna aktivnost PON1 je bila značajno niža i na HDL 2 i na HDL 3 subfrakcijama kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi u poređenju sa zdravim ispitanicima.

9. Proces hemodijalize je pokazao pozitivan uticaj na paraoksonaznu aktivnost PON1 kao i na udeo aktivnosti PON1 na HDL 2a subfrakciji koje su bile značajno više neposredno posle tretmana hemodijalizom. S druge strane, arilesterazna aktivnost PON1 u serumu je bila značajno snižena, što se odrazilo i na aktivnost PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama koje su takođe bile niže posle tretmana hemodijalizom.
10. Povišen nivo inflamacije kod bolesnika sa HBB i kod bolesnika na hemodijalizi odražava se kroz povišene vrednosti pentraksina-3.
11. Povišene koncentracije MMP-9, TIMP-1 i galektina-3 ukazuju na intenzivan proces remodelovanja ECM kao posledice povrede tkiva bubrega, čemu doprinosi i povišen nivo oksidativnog stresa kod bolesnika sa HBB i bolesnika na hemodijalizi.
12. Preračunavanje pojedinačnih skorova i zbirnog (DOI) skora ukazuje na to da skorovi pružaju uvid u procese koji su dominantno prisutani u različitim grupama pacijenata i služe kao markeri koji bolje opisuju simergistički efekat više različitih faktora rizika nego što je to slučaj sa pojedinačnim parametrima.

7. Literatura:

1. Levey AS, Levin A, Kellum JA. Definition and classification of kidney diseases. *Am J Kidney Dis.* 2013;61:686–688.
2. Slee AD. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutr Metab.* 2012;9:36
3. Roderick P. Epidemiology of end stage renal disease. *Clin Med.* 2002;2:200–204.
4. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P et al. Prevalence of chronic kidney disease in the united states. *J Am Med Assoc.* 2007;298:2038-2047.
5. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011;80:1258-1270.
6. Eckardt KU, Berns JS, Rocco MV, Kasiske BL. Definition and classification of CKD: the debate should be about patient prognosis—a position statement from KDOQI and KDIGO. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:915–920.
7. World Health Organization. Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. Geneva, Switzerland: The World Health Organization. 2015
8. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2013;380: 2095–2128.
9. Godišnji izveštaj o lečenju dijalizama i transplatacijom bubrega u Srbiji, 2015. godine
10. Godišnji izveštaj o lečenju dijalizama i transplatacijom bubrega u Srbiji, 2014. godine
11. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013;382:260–272.
12. Wouters OJ, O'donoghue DJ, Ritchie J, Kanavos PG, Narva AS. Early chronic kidney disease: diagnosis, management and models of care. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11:491-502.

13. Tsai WC, Wu HY, Peng YS, Ko MJ, Wu MS, Hung KY et al. Risk factors for development and progression of chronic kidney disease: A systematic review and exploratory meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:3013-3022.
14. Luyckx VA, Tuttle KR, Garcia-Garcia G, Benghanem Gharbi M, Heerspink H, Johnson DW et al. Reducing major risk factors for chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2017;7:71-87.
15. Rocco MV, Berns JS. KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update. *Am J Kid Dis*. 2012;60:850-886.
16. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest*. 2014;124:2333-2340.
17. Lea JP, Nicholas SB. Diabetes mellitus and hypertension: key risk factors for kidney disease. *J Natl Med Assoc*. 2002;94:7S-15S.
18. Rao MV, Qiu Y, Wang C, Bakris G. Hypertension and CKD: Kidney early evaluation program (KEEP) and national health and nutrition examination survey (NHANES), 1999-2004. *Am J Kidney Dis*. 2008;51:30-37.
19. Shea L, Ricchetti C. Chronic kidney disease and hypertension: A destructive combination. *U. S. pharmacist* 2012;37:26-29.
20. Chade AR, Lerman A, Lerman LO. Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension* 2005;45:1042-1049.
21. Nitta K, Okada K, Yanai M, Takahashi S. Aging and chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 2013;38:109-120.
22. National Kidney Foundation. KDOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: S1-266.
23. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za prevenciju, dijagnostifikovanje i lečenje hronične bolesti bubrega. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd 2013.
24. Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. *Heart Fail Rev*. 2015;20:259-272.

25. Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, Charytan DM, Díez J, Hart RG et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2011;80:572–586.
26. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* 2013;382:339-352.
27. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010; 375:2073–2078.
28. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A et al. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: The CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1918–1927.
29. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004;351:1296–1305.
30. Manjunath G, Tighiouart H, Coresh J, Macleod B, Salem DN, Griffith JL et al. Level of kidney function as a risk factor for cardiovascular outcomes in the elderly. *Kidney Int* 2003;63:1121–1129.
31. Van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int.* 2011; 79: 1341–1352.
32. Briasoulis A, Bakris GL. Chronic kidney disease as a coronary artery disease risk equivalent. *Curr Cardiol Rep.* 2013;15:340-346.
33. Subbiah AK, Chhabra YK, Mahajan S. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: a neglected subgroup. *Heart Asia.* 2016;8:56-61.
34. Wright J, Hutchison A. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5:713-722.

35. Vaziri ND. Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18:265-268.
36. Mikolasevic I, Žutelija M, Mavrinac V, Orlic L. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2017;10:35-45.
37. Parmar JA, Joshi AG, Chakrabarti M. Dyslipidemia and chronic kidney disease. *ISRJ*. 2014;3:396–397.
38. Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290:262-272.
39. Florens N, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage CO. Modified lipids and lipoproteins in chronic kidney disease: A new class of uremic toxins. *Toxins*. 2016;8:376.
40. Tsimihodimos V, Mitrogianni Z, Elisaf M. Dyslipidemia associated with chronic kidney disease. *Open Cardiovasc Med J*. 2011;5:41-48.
41. Prinsen BH, de Sain-van der Velden MG, de Koning EJ, Koomans HA, Berger R, Rabelink TJ. Hypertriglyceridemia in patients with chronic renal failure: possible mechanisms. *Kidney Int Suppl*. 2003;84:S121–4.
42. Vaziri ND, Liang K. Down-regulation of tissue lipoprotein lipase expression in experimental chronic renal failure. *Kidney Int*. 1996;50:1928–1935.
43. Cheung AK, Parker CJ, Ren K, Iverius PH. Increased lipase inhibition in uremia: identification of pre-beta-HDL as a major inhibitor in normal and uremic plasma. *Kidney Int*. 1996;49:1360–1371
44. Mesquita J, Varela A, Medina JL. Dyslipidemia in renal disease: causes, consequences and treatment. *Endocrinol Nutr* 2010;57:440-448.
45. Huttunen JK, Pasternack A, Vanttinen T, Ehnholm C, Nikkila EA. Lipoprotein metabolism in patients with chronic uremia. Effect of hemodialysis on serum lipoproteins and postheparin plasma triglyceride lipases. *Acta Med Scand*. 1978;204:211–218.

46. Katopodis KP, Elisaf M, Balafa O, Nikolopoulos P, Bairaktari E, Katsaraki A, et al. Influence of the type of membrane and heparin on serum lipid parameters during a dialysis session: a pilot study. *Am J Nephrol*. 2004;24:469–473.
47. Wanner C, Bahner U, Mattern R, Lang D, Passlick-Deetjen J. Effect of dialysis flux and membrane material on dyslipidaemia and inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:2570–2575.
48. Ottosson P, Attman PO, Knight C, Samuelsson O, Weiss L, Alaupovic P. Do high-flux dialysis membranes affect renal dyslipidemia? *ASAIO J*. 2001;47:229–234
49. Liu BW, Jiang Y, Fu MD, Liu Y, Fan P. Oxidative modification of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients and hypercholesterolemic rabbits *in vivo*. *Mol Cell Biochem*. 2000;207:131-135.
50. Saxena R, Madhu SV, Shukla R, Prabhu KM, Gambhir JK. Postprandial hypertriglyceridemia and oxidative stress in patients of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Clin Chim Acta*. 2005;359:101-108.
51. Ungurianu A, Margină D, Grădinaru D, Băcanu C, Ilie M, Tsitsimpikou C et al. Lipoprotein redox status evaluation as a marker of cardiovascular disease risk in patients with inflammatory disease. *Mol Med Rep*. 2017;15:256-262.
52. Bulbul MC, Dagele T, Afsar B, Ulus NN, Kuwabara M, Covic A et al. Disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2018;46:144-152.
53. Liang K, Vaziri ND. Gene expression of LDL receptor, HMG-CoA reductase, and cholesterol-7 alpha-hydroxylase in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12:1381–1386.
54. Capell WH, Zambon A, Austin MA, Brunzell JD, Hokanson JE. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1040-1046.
55. Shen H, Xu Y, Lu J, Ma C, Zhou Y, Li Q et al. Small dense low-density lipoprotein cholesterol was associated with future cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *BMC Nephrology*. 2016;17:143-150.
56. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002;43:1363-1379.

57. Seiler S, Schlitt A, Jiang XC, Ulrich C, Blankenberg S, Lackner KJ et al. Cholesteryl ester transfer protein activity and cardiovascular events in patients with chronic kidney disease stage V. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:3599-3604.
58. Mikhailidis DP, Elisaf MS, Rizzo M, Berneis K, Griffin B, Zambon A et al. European Panel on Low Density Lipoprotein (LDL) Subclasses: a statement on the pathophysiology, atherogenicity and clinical significance of LDL subclasses: executive summary. *Curr Vasc Pharmacol* 2011;9:531-532.
59. Samouilidou EC, Karpouza AP, Kostopoulos V, Bakirtzi T, Pantelias K, Petras D et al. Lipid abnormalities and oxidized LDL in chronic kidney disease patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Ren Fail*. 2012;34:160-164.
60. Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. *Curr Opin Lipidol* 2011; 22:254–261.
61. Moradi H, Vaziri ND, Said HM, Kalantar-Zadeh K. Role of HDL dysfunction in end-stage renal disease: A double-edged sword. *J Ren Nutr*. 2013;23:203-206.
62. Batista MC, Welty FK, Diffenderfer MR, Sarnak MJ, Schaefer EJ, Lamon-Fava S et al. Apolipoprotein A-I, B-100, and B-48 metabolism in subjects with chronic kidney disease, obesity, and the metabolic syndrome. *Metabolism* 2004; 53:1255-1261.
63. Zuo Y, Yancey P, Castro I, Khan W, Motojima, Ichikawa I et al. Renal dysfunction potentiates foam cell formation by repressing ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1277-1282.
64. Liang K, Vaziri ND. Upregulation of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in chronic renal failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283:676-681.
65. Kostner GM, Knipping G, Groener JE, Zechner R, Dieplinger H. The role of LCAT and cholesteryl ester transfer proteins for the HDL and LDL structure and metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 1987;210:79-86.
66. Calabresi L, Simonelli S, Conca P, Busnach G, Cabibbe M, Gesualdo L et al. Acquired lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency as a major factor in lowering plasma HDL levels in chronic kidney disease. *J Intern Med*. 2015;277:552-561.
67. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011;17:594-603.

68. Kumar S, Bogle R, Banerjee D. Why do young people with chronic kidney disease die early? *World J Nephrol.* 2014;3:143-155.
69. Gebhard C, Rhainds D, Tardif JC. HDL and cardiovascular risk: is cholesterol in particle subclasses relevant? *Eur Heart J* 2015;36:10–12.
70. Albers JJ, Slee A, Fleg JL, O'Brien KD, Marcovina SM. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis.* 2016;251:454-459.
71. Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Fujinami T. HDL3 exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL 2, *Clin. Biochem.* 1997;30:221–225.
72. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21:229-238.
73. Martin SS, Khokhar AA, May HT, Kulkarni KR, Blaha MJ, Joshi PH et al. HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: The lipoprotein investigators collaborative. *Eur Heart J.* 2015;36:22-30.
74. Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem.* 2011;57:392-410.
75. Kennedy DJ, Wilson Tang WH, Fan Y, Wu Y, Mann S, Pepoy M et al. Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in chronic kidney disease. *J. Am. Heart Assoc.* 2013;2:104-121.
76. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin.* 2017;8:66-77.
77. Smith JD. Dysfunctional HDL as a diagnostic and therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:151-155.
78. Grdic Rajkovic M, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem Med* 2011;21:122-130.

79. Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S et al. Serum Paraoxonase (PON1) and its interactions with HDL: Relationship between PON1 and oxidative stress. *The HDL Handbook 2010*: 77-98.
80. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004;107:435-447.
81. Manolescu BN, Busu C, Badita D, Stanculescu R, Berceanu M. Paraoxonase 1 – an update of the antioxidant properties of high- density lipoproteins. *Mædica*. 2015;10:173-177.
82. Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A et al. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37:715–723.
83. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1986-1994.
84. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. Protectors or traitors: the roles of PON2 and PON3 in atherosclerosis and cancer. *J Lipids* 2012; 2012:1-12
85. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000; 275: 33435-33442.
86. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2001;21:542-547.
87. Schweikert EM, Amort J, Wilgenbus P, Förstermann U, Teiber JF, Horke S. Paraoxonases-2 and -3 are important defense enzymes against pseudomonas aeruginosa virulence factors due to their anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *J Lipids* 2012;2012:1-9.
88. Gugliucci A, Kotani K, Kimura S. Paraoxonase 1 in chronic kidney failure. *J Lipids*. 2012;2012:1-10.

89. Norata GD, Pirillo A, Catapano LA. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *NMCD* 2006;16:371-386.
90. Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, et al. Uremia alters HDL composition and function. *JASN*. 2011;22:1631-1641.
91. Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J*. 1998;19:31-35.
92. Hung KT, Berisha SZ, Ritchey BM, Santore J, Smith JD. Red blood cells play a role in reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32:1460-1465
93. Lange Y, Molinaro AL, Chauncey TR, Steck TL. On the mechanism of transfer of cholesterol between human erythrocytes and plasma. *J Biol Chem*. 1983;258:6920–6926
94. Nikolić M, Ristić- Medić D, Stanić D, Postić M, Arsić A, Niketić V. Dietary lipid intake influences the level of cholesterol bound to haemoglobin in human erythrocytes. *Eur. J. Nutr.* 2008;47:123–130
95. Nikolić M, Stanić D, Baricević I, Jones DR, Nedić O, Niketić V. Efflux of cholesterol and phospholipids derived from the haemoglobin-lipid adduct in human red blood cells into plasma. *Clin Biochem*. 2007;40:305-309
96. Nikolić M, Stanic D, Antonijevic N, Niketic V. Cholesterol bound to hemoglobin in normal human erythrocytes: a new form of cholesterol in circulation? *Clin Biochem*. 2004;37:22–26.
97. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *JASN* 2012;23:1631-1634
98. Mehdi U, Toto RD. Anemia, diabetes, and chronic kidney disease. *Diabetes Care*. 2009;32:1320-1326.
99. Qureshi AH, Soberon DJ1, Asif A, Vachharajani T, Nayer A. Methemoglobinemia-induced acute kidney injury. *Open Urol Nephrol J* 2013;6:36-41
100. Ruiz-Guiñazú A, Coelho JB, Paz RA. Methemoglobin-induced acute renal failure in the rat. *Nephron* 1967;4:257–275.
101. Balwani MR, Bawankule CP, Ramteke V, Tolani P, Vakil S, Yadav R. Methylene blue induced methemoglobinemia with acute kidney injury in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient patient. *Indian J Nephrol*. 2017;27:465-467.

102. Park JS, Kim H, Lee SW, Min JH. Successful treatment of methemoglobinemia and acute renal failure after indoxacarb poisoning. *Clin Toxicol* 2011; 49:744-746.
103. Torres JP, Strom JA, Jaber BL, Hendra KP. Hemodialysis-associated methemoglobinemia in acute renal failure. *AJKD* 2002; 39:1307–1309
104. Nita M, Grzybowski A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016,1-23.
105. Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM. Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;214:329-348
106. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014;224:164-175
107. Wang CH, McNair R, Levins P. Generation of free radicals through organic oxidation—reduction. *Systems J. Org. Chem.* 1965;30:3817-3819
108. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman B.A et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:385-400.
109. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11:669–702.
110. Lü J-M, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010;14:840-860.
111. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS.* 2008;4:89-96.
112. Almroth, BC. Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Department of Zoology/Zoophysiology Goteborg University Sweden. 2008;1-74
113. Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med.* 2012;33:399-417.

114. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. med. cell. Longev.* 2014;2014:1-31
115. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* 2016;473: 805-825.
116. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002;82:47–95.
117. Dunlop RA, Brunk UT, Rodgers KJ. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life.* 2009;61:522–527
118. Ou H, Huang Z, Mo Z, Xiao J. The characteristics and roles of advanced oxidation protein products in atherosclerosis. *Cardiovasc Toxicol.* 2017;17:1-12.
119. Poulsen HE. Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol* 2005;57:161-169.
120. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13:757-772.
121. Scholze A, Jankowski J, Pedraza-Chaverri J, Evenepoel P. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-2.
122. Modaresi A, Nafar M, Sahraei Z. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis.* 2015;9:165–179.
123. Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation.* 2002;106:2212-2217.
124. Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: A hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:49 – 55.
125. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39:84-92
126. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-9
127. Diepen JA, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2013;228:306–315.

128. Fornai F, Carrizzo A, Forte M, Ambrosio M, Damato A, Ferrucci M et al. The inflammatory protein pentraxin 3 in cardiovascular disease. *Immun Ageing* 2016;13:25-34.
129. Jenny NS, Blumenthal RS, Kronmal RA, Rotter JI, Siscovick DS, Psaty BM. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *JTH*. 2014;12:999-1005.
130. Tong M, Carrero JJ, Qureshi AR, Anderstam B, Heimbürger O, Bárány P et al. Plasma pentraxin 3 in patients with chronic kidney disease: Associations with renal function, protein-energy wasting, cardiovascular disease, and mortality. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:889-897.
131. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:786-801
132. Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009;61:198–223.
133. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:50-58
134. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;30 :1–7.
135. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003;200:448-464.
136. Zhao H, Dong Y, Tian X, Kui Tan T, Liu Z, Zhao Y et al. Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases. *World J Nephrol*. 2013;2:84-89.
137. Cheng Z, Limbu MH, Wang Z, Liu J, Liu L, Zhang X,1 et al. MMP-2 and 9 in chronic kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18:776-787.
138. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1603-1616.

139. Dumić J, Dabelić S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:616-35
140. Okamura DM, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, Collins S, Hsu DK, Liu FT et al. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300:245-253.
141. Zhu W, Sano H, Nagai R, Fukuhara K, Miyazaki A, Horiuchi S. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280:1183-1188.
142. Pricci F, Leto G, Amadio L. Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int*. 2000;58:31-39.
143. Grundy SM, Cleeman JJ, Merz BN, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:720–732.
144. World Health Organization. WHO document measuring obesity-classification and description of anthropometric data. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen. 1998.
145. Fukuyama N, Homma K, Wakana N, Kudo K, Suyama A, Ohazama H, et al. Validation of the Friedewald equation for evaluation of plasma LDL-cholesterol. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;43:1–5.
146. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2006;145:247-254.
147. Rainwater DL, Moore PH, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J. Lipid. Res* 2004;45:773-775.
148. Vekić J, Topić A, Zeljković A, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007;40:310-316.

149. Nikolic M, Nikolic-Kokic A, Stanic D, Blagojevic DP, Vranic D, Jones DR et al. Does cholesterol bound to haemoglobin affect the anti-oxidant enzyme defence system in human erythrocytes? *J. Serb. Chem. Soc.* 2007;72: 339–345.
150. Antonini, E., Chiancone, E. and Rossi-Bernardi, L. (1981). *Hemoglobins*. New York: Academic Press.
151. Szebeni J, Winterbourn CC, Carrell RW. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem J.* 1984;220:685-692.
152. Reed CF, Swisher G, Marinetti V, Eden EG. Studies of the lipid of the erythrocyte. Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood cell. *J Lab Clin Med.* 1960;56:281-289.
153. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978;87:206-210.
154. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37:277-285
155. Erel O. A new automated method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38:1103–1111.
156. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49:1304-1313.
157. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–77.
158. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998;39:1529–1542.
159. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem.* 2007;40:248-254.
160. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. *Adv Exp Med Biol.* 2010;660:29–35.

161. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126–1138
162. Gugliucci A, Caccavello R, Kotani K, Sakane N, Kimura S. Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: a practical zymogram method to assess HDL function. *Clin Chim Acta*. 2013;415:162-168.
163. McPherson P, Young I, McKibben B, McEneny J. High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation. *J Lipid Res* 2007;48:86-95.
164. Radding CM, Steinberg D. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J. Clin. Invest.* 1960;39:1560–1569.
165. Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res.* 1968;9:693-700.
166. National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-342
167. Veglia F, Werba JP, Tremoli E, Squellerio I, Sisillo E, Parolari A et al. Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers*. 2009;14:465-472.
168. Cook, E., Hosmer, D. and Lemeshow, S. (2008). *Solutions manual to accompany Applied logistic regression second edition*. New York: Wiley.
169. Baragetti A, Norata GD, Sarcina C, Rastelli F, Grigore L, Garlaschelli K et al. High density lipoprotein cholesterol levels are an independent predictor of the progression of chronic kidney disease. *J Intern Med*. 2013;274:252-262.
170. Moradi H, Said HM, Vaziri ND. Post-transcriptional nature of uremia-induced downregulation of hepatic apolipoprotein A-I production. *Transl Res*. 2011;161:477–485
171. Kon V, Yang H, Fazio S. Residual cardiovascular risk in chronic kidney disease: role of high-density lipoprotein. *Arch Med Res* 2015;46:379-391.

172. Gajjala PR, Fliser D, Speer T, Jankowski V, Jankowski J. Emerging role of post-translational modifications in chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2015;2015:1814-1824.
173. Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, Tosheska KN. LDL and HDL subclass distribution in patients with end-stage renal diseases. *Clin Biochem.* 2002;35:211–216.
174. Kaysen GA. Dyslipidemia in chronic kidney disease: Causes and consequences. *Kidney Int.* 2006;70:55-58.
175. Okubo K, Ikewaki S, Sakai S, Tada N, Kawaguchi Y, Mochizuki S. Abnormal HDL apolipoprotein A-I and A-II kinetics in hemodialysis patients: a stable isotope study. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1008-1015.
176. Kimura H, Miyazaki R, Imura T, Masunaga S, Suzuki S, Gejyo F, et al. Hepatic lipase mutation may reduce vascular disease prevalence in hemodialysis patients with high CETP levels. *Kidney Int.* 2003;64:1829–1837.
177. Pahl MV, Ni Z, Sepassi L, Moradi H, Vaziri ND. Plasma phospholipid transfer protein, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase in end-stage renal disease (ESRD). *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2541–2546.
178. Martin SS, Khokhar AA, May HT, Kulkarni HR, Blaha MJ, Joshi PH et al. HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: the lipoprotein investigators collaborative. *Eur Heart J.* 2015;36:22–30
179. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: Prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010;210:548–555.
180. Eckles NE, Taylor CB, Campbell DJ, Gould RG. The origin of plasma cholesterol and the rates of equilibration of liver, plasma, and erythrocyte cholesterol. *J Lab Clin Med* 1955;46:359–367.
181. Kuypers FA, Larkin S, Beckstead J, Oda M, Ueda K, Ryan RO. Red blood cells facilitate reverse cholesterol transport. *Blood* 2004;104:1589

182. Schaefer JA, Parry WL, Mueller CB. Experimental studies of acute renal failure. Histopathology of the renal lesion produced by methemoglobin. *J Surg Res* 1966;6:247-253
183. Fenves AZ, Gipson JS, Pancorvo C. Chloramine-induced methemoglobinemia in a hemodialysis patient. *Seminars in Dialysis*. 2000;13: 327-329.
184. Harea G, Tsuia A, Crawford J, Patel R. Is methemoglobin an inert bystander, biomarker or a mediator of oxidative stress- The example of anemia? *Redox Biol* 2013;1:65–69.
185. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med*. 1993;94:350-356.
186. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46:241-281.
187. Duni A, Liakopoulos V, Rapsomanikis KV, Dounousi E. Chronic kidney disease and disproportionately increased cardiovascular damage: Does oxidative stress explain the burden? *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-15.
188. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:538-548.
189. Xu G, Luo K, Liu H, Huang T, Fang X, Tu W. The progress of inflammation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Ren Fail*. 2015;37:45–49
190. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:335–340.
191. Dirican M, Sarandol E, Serdar Z, Ocak N, Dilek K. Oxidative status and prevalent cardiovascular disease in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. *Clin Nephrol*. 2007;68:144–150.

192. Balcerczyk A, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszalek M et al. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. *Bio Factors* 2003;17:75-82.
193. Prakash M, Shetty JK, Dash S, Barik B. K, Sarkar A, Awanti SM et al. Urinary protein thiols in different grades of proteinuria. *Indian J Clin Biochem.* 2008;23:404-406.
194. Elshamaa MF, Sabry S, Nabih M, Elghoroury EA, El-Saaid GS, Ismail AAG. Alteration in plasma total antioxidant capacity, cardiotoxic lipid peroxidation product and C-reactive protein: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in children on hemodialysis. *J Clin Basic Cardiol.* 2008;11:2-7.
195. Dzięgielewska-Gęsiak S, Wysocka E, Michalak S, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Muc-Wierzoń M. Role of lipid peroxidation products, plasma total antioxidant status, and Cu-, Zn-superoxide dismutase activity as biomarkers of oxidative stress in elderly prediabetics. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;8:1-8.
196. Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, Cwiklińska A, Ziętkiewicz M, Renke M et al. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34:12-19.
197. Holzer M, Schilcher G, Curcic S. Dialysis modalities and HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:2267-2276.
198. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol.* 2015;6:222-228.
199. Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, Ogata H, Hermo R, Schulze J et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin Chim Acta.* 2007;377:213-220.
200. Tavori H, Rosenblat M, Vaya J, Aviram M. Paraoxonase 1 interactions with atherosclerotic lesions and arterial macrophages protect against foam cell formation and atherosclerosis development. *Clin. Lipidol.* 2010;5:685-697

201. Mastorikou M, Mackness B, Liu Y, Mackness M. Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. *Diabet Med.* 2008;25:1049-1055.
202. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis.* 2006; 187: 74-81.
203. Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanti G, Guidi G. Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clin Chim Acta.* 1996;247:71–80.
204. Honda H, Hirano T, Ueda M, Kojima S, Mashibada S, Hayase Y et al. High-density lipoprotein subfractions and their oxidized subfraction particles in patients with chronic kidney disease. *J AtherosclerThromb* 2016;23:81-94.
205. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billeckes, La Du BN. Human Serum paraoxanase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: Apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Atheroscl.Thromb.Vasc. Biol.* 1999;19:2214–25.
206. Carnuta MG, Stancu CS, Toma L, Sanda GM, Niculescu LS, Deleanu M et al. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep.* 2017;7:7295-7308.
207. Muchova J, Lucia Andrezalova L, Oravec S, Nagyova Z, Garaiova I, Durackova Z. High density lipoprotein subfractions and paraoxonase 1 in children. *Acta Biochim Pol.* 2015;63:555-563
208. Luscher TF, Landmesser U, von Eckardstein A, Fogelman AM. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ Res.* 2014;114:171-182
209. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie.* 2017;132:19-27.

210. Kowalska K, Socha E, Milnerowicz H. The role of paraoxonase in cardiovascular diseases. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45:226-233.
211. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Förstermann U et al. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 2012;19:1549-1560.
212. Gugliucci A, Kinugasa E, Ogata H, Caccavello R, Kimura S. Activation of paraoxonase 1 after hemodialysis is associated with HDL remodeling and its increase in the HDL 2 fraction and VLDL. *Clin Chim Acta.* 2014;430:9-14.
213. Yildiz G, Aydin H, Mağden K, Yilmaz A, Hür E, Candan F. Influence of single hemodialysis session on serum paraoxonase-1, arylesterase activity, total oxidant status and total antioxidant status. *Minerva Med.* 2014;105:79-87.
214. Poirier B, Michel Ofz, Bazin R, Bariéty J, Chevalier J, Myara I. Conjugated dienes: a critical trait of lipoprotein oxidizability in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1598-606.
215. Lech M, Rommele C, Anders HJ. Pentraxins in nephrology: C-reactive protein, serum amyloid P and pentraxin-3. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;28:803-811.
216. Boehme M, Kaehne F, Kuehne A, Bernhardt W, Schröder M, Pommer W et al. Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:2224-2229.
217. Speeckaert MM, Speeckaert R, Carrero JJ, Vanholder R, Delanghe JR. Biology of human pentraxin 3 (PTX3) in acute and chronic kidney disease. *J Clin Immunol.* 2013;33:881-890
218. Deban L, Jaillon S, Garlanda C, Bottazzi B, Mantovani A. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res.* 2011;343:237-249.
219. Sjöberg B, Qureshi AR, Heimbürger O, Stenvinkel P, Lind L, Larsson A et al. Association between levels of pentraxin 3 and incidence of chronic kidney disease in the elderly. *J Intern Med.* 2016;279:173–179.
220. Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, Saglam M, Kilic S, Eyileten T et al. Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:785-792.

221. El Sebai AA, El Hadidi ES, Abdel Al H, El Sayed EY. Pentraxin-3 in hemodialysis patients: Relationship to comorbidities. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2016;27:701-9
222. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*. 2004;104:92-99.
223. Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:246-249.
224. JJ Kaden, CE Dempf, R Grobholz, HT Tran, R Kilic, A Sarikoc et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic stenosis. *Atherosclerosis* 2003;170:205-211
225. Drueke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:723-357.
226. Rysz J, Banach M, Stolarek RA, Mikhailidis DP, Cialkowska-Rysz A, Pokoca L, et al. Serum metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in patients on hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2011;43:491-498.
227. Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M. Circulating b-chemokines and matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system in hemodialyzed patients – role of oxidative stress. *Cytokine*. 2005;31:18-24.
228. Ronco P, Chatziantoniou C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. *Kidney Int*. 2008;74:873-878.
229. Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Kiani A, , Rahimi Z, Tavilani H, Ardalan M et al. Matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress. *Lupus*. 2015;24:597-605.
230. Tian L, Chen K, Cao J, Han Z, Gao L, Wang Y et al. Galectin-3-induced oxidized low-density lipoprotein promotes the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12:4995-5002.

231. Schleicher E, Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int Suppl.* 2007;106:S17-26.
232. Kotur-Stevuljevic J, Simic-Ogrizovic S, Dopsaj V, Stefanovic A, Vujovic A, Ivanic-Corlomanovic T et al. A hazardous link between malnutrition, inflammation and oxidative stress in renal patients. *Clin Biochem.* 2012;45:1202-1205.
233. Vekic J, Zeljkovic A, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V et al. Cox proportional hazard model analysis of survival in end-stage renal disease patients with small-sized high-density lipoprotein particles. *Clin Biochem.* 2011;44:635-641.
234. Hafez MM, Al-Shabanah OA, Al-Harbi NO, Al-Harbi MM, Al-Rejaie SS, Alsurayea SM et al. Association between paraoxonases gene expression and oxidative stress in hepatotoxicity induced by CCl₄. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:893212-893224.
235. Meenakshi Sundaram SP, Nagarajan S, Manjula Devi AJ. Chronic kidney disease—effect of oxidative stress. *Chinese J Biol.* 2014;2014:1-6.
236. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: Implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci.* 2012;4:523-532.

Biografija

Milica Miljković je rođena 06.01.1985. u Kruševcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar upisala je 2004. godine, a završila 17. septembra 2010. godine. Dobitnica je stipendije zadužbine „Dagoljub Marinković” za studente zdravstvenih studija. Po završetku fakulteta, obavezan pripravnički staž je obavila na Institutu za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“, nakon čega je 2011. godine položila državni ispit. U oktobru 2010. godine upisala je doktorske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od januara 2011. godine angažovana je kao istraživač na projektu pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“ koji finansira Ministarstvo prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Na radno mesto saradnika na Katedri za medicinsku biohemiju primljena je 2014. godine, a u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Medicinska biohemija izabrana je 2016.godine. Od početka rada na Katedri za medicinsku biohemiju, učestvuje u pripremi i izvođenju dodiplomske praktične nastave iz obaveznih i izbornih predmeta: Opšta biohemija, Statistika, Klinička enzimologija i Primena informacionih tehnologija u akademskoj praksi na studijskom programu magistar farmacije – medicinski biohemičar i na predmetima Medicinska biohemija, Statistika i Laboratorijska dijagnostika poremećaja metabolizma na studijskom programu magistar farmacije. Bila je član komisija za odbranu velikog broja diplomskih radova. Na studentskim anketama o vrednovanju pedagoškog rada saradnika ocenjivana je odličnim ocenama za obavezne i izborne predmete. Školske 2015/2016 upisala je specijalističke akademske studije na modulu Biohemijska dijagnostika na Farmaceutskom fakultetu, a u aprilu 2017. godine je upisala specijalizaciju zdravstvenih radnika i zdravstvenih saradnika iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu.

Kao autor i/ili koautor objavila je ukupno 24 rada. Od toga 23 rada u međunarodnim časopisima (5 radova u časopisima kategorije M 21, 5 radova u časopisima kategorije M22 i 13 radova u časopisima kategorije M23) i 1 rad u domaćem časopisu (kategorije M52). Učestvovala je sa preko 30 saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima. Učesnik je na više međunarodnih projekata. Iz doktorske disertacije je publikovala četiri rada: dva rad u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i dva rada u međunarodnim časopisima (M23).

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Миљковић

Број индекса 37/10

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Оксидативно-стресни статус у крви и липоротеинским
фракцијама пацијената са хроничном болешћу бубрега

Ментор проф. др Јелена Котур-Стевуљевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 11.07.2018.

Милица Миљковић

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милица Миљковић

Број индекса 37/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Оксидативно-стресни статус у крви и липопротеинским фракцијама пацијената са хроничном болешћу бурега

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 11.07.2018.

Милица Миљковић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Оксидативно-стресни статус у крви и липоротеинским фракцијама пацијената са хроничном болешћу бубрега

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

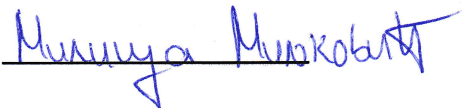
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 11.07.2018.


Milica Marković